

На правах рукописи



ГИРИЧ
Александр Сергеевич

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ У
ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX***

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2015

Работа выполнена в лаборатории сравнительной цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, старший научный сотрудник Долматов Игорь Юрьевич

Официальные оппоненты:

Григория Элеонора Норайровна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, заведующий лабораторией проблем регенерации

Киселев Константин Владимович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «27» марта 2015 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу:

690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/16-girich-aleksandr-sergeevich>

Автореферат разослан

« 2 » февраля 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Вашченко

Вашченко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Одним из важнейших компонентов морфогенетических механизмов являются сигнальные молекулы. Они взаимодействуют со специфическими рецепторами и запускают каскад внутриклеточных реакций, активирующих целевые гены. Примером таких сигнальных молекул могут служить белки семейства Wnt. Запускаемый ими каскад реакций, сигнальный путь Wnt, участвует в регуляции многих биологических процессов, в частности, в формировании осей тела в эмбриогенезе, развитии ряда органов, регенерации и канцерогенезе (Logan, Nusse, 2004; Reya, Clevers, 2005; Poustka et al., 2007; Mashanov et al., 2012). Гены *wnt* выявлены у всех многоклеточных животных, от губок до насекомых и млекопитающих. Кроме белков Wnt, выполняющих роль лигандов, в состав сигнального пути Wnt входят рецепторы Frizzled и LRP5/6, а также внутриклеточные мессенджеры Dishevelled и β -catenin (Komiya, Habas, 2008). Большое число *wnt* и их участие в широком спектре биологических процессов указывает на важность сигнального пути Wnt в жизнедеятельности многоклеточных животных.

Одной из важнейших функций сигнального пути Wnt является регуляция восстановительных процессов. Регенерация является универсальной адаптацией к повреждающему действию окружающей среды и свойственна в той или иной степени всем живым организмам (Лиюэнер, 1982; Карлсон, 1986). Показано, что у планарий в регуляции восстановительного процесса важную роль играют гены *wnt1* и *wnt2* (Petersen, Reddien, 2009). Кроме того, участие *wnt* в регенерации отмечено у широкого круга животных – губок, кишечнополостных, кольчатых червей, асцидий и амфибий (Lengfeld et al., 2009; Petersen, Reddien, 2009; Philip et al., 2009; Lin et al., 2012; Takeo et al., 2013).

Удобными модельными объектами для изучения различных аспектов регенерации являются голотурии. Они способны в ответ на внешние раздражители эвисцерировать (выбрасывать) внутренние органы и затем полностью их восстанавливать (Emson, Wilkie, 1980; Долматов, Машанов, 2007). Недавно было показано, что у голотурий при регенерации активируются гены семейства Wnt: *wnt2*, *wnt6* и *wnt9* (Mashanov et al., 2012, 2014; Sun et al., 2013). В настоящее время достаточно подробно исследованы морфологические и биохимические аспекты регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix* (Dolmatov, 1992; Долматов, Гинанова, 2001; Mashanov et al., 2005, 2008; Lamash, Dolmatov, 2013). С помощью методов масс-спектрометрии было показано, что в



регенерирующих органах у данного вида присутствует белок Wnt5 (Гирич и др., 2011). Кроме того, анализ транскриптомов зачатков регенерирующих органов на начальных стадиях восстановления показал наличие в них фрагментов транскриптов генов семейств *wnt* и *frizzled*, а также генов *dishevelled* и *β -catenin*. Полученные данные указывают на участие сигнального пути Wnt в регуляции регенерации у *E. fraudatrix* (Долматов, 2013).

Целью данной работы была идентификация ряда генов сигнального пути Wnt (*wnt*, *frizzled*, *dishevelled* и *β -catenin*) и изучение их экспрессии в норме и при регенерации после эвисперации у голотурии *E. fraudatrix*.

Задачи исследования:

- 1) Изучить локализацию клеток, содержащих белок Wnt5, и динамику изменения их числа в норме и при регенерации после эвисперации у голотурии *E. fraudatrix*.
- 2) Провести анализ нуклеотидных последовательностей транскриптов генов сигнального пути Wnt, обнаруженных в транскриптомах зачатков внутренних органов голотурии *E. fraudatrix*.
- 3) Установить нуклеотидные последовательности кодирующей части генов семейства Wnt, экспрессирующихся при регенерации после эвисперации у голотурии *E. fraudatrix*.
- 4) Определить органы и ткани, в которых происходит активация генов сигнального пути Wnt при регенерации после эвисперации у *E. fraudatrix*.
- 5) Оценить активность экспрессии генов семейства Wnt в норме, а также при регенерации после эвисперации у голотурии *E. fraudatrix*.

Научная новизна. Впервые для иглокожих исследовано распределение белка Wnt5 в тканях в процессе регенерации. У *E. fraudatrix* клетки с Wnt5 располагаются преимущественно в радиальном нервном тяже и гиподерме. Показано, что число Wnt5-положительных клеток возрастает через 7–10 сут после эвисперации, в период активного морфогенеза. Это указывает на то, что Wnt5 и активируемый им сигнальный путь являются неотъемлемой частью механизмов восстановления внутренних органов у *E. fraudatrix*. Впервые для голотурий отряда Dendrochirotida были установлены нуклеотидные последовательности кодирующей части 4 генов семейства *wnt* – *wntA*, *wnt4*, *wnt6* и *wnt16*. Нуклеотидные последовательности транскриптов *wnt4*, *wntA* и *wnt16* были получены впервые для голотурий. Проведен анализ экспрессии *wntA*, *wnt4*, *wnt6* и *wnt16* в процессе регенерации: *wnt6* – впервые для голотурий отряда Dendrochirotida, а *wnt4* и

wnt16 – впервые для типа Echinodermata. Впервые для многоклеточных животных показано участие гена *wntA* в регенерации. Кроме того, впервые для иглокожих было установлено, что *frizzled1/2/7*, *frizzled4*, *frizzled5/8* и *dishevelled* экспрессируются при регенерации.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты работы по определению нуклеотидных последовательностей генов *wnt* голотурий позволяют глубже понять происхождение и эволюционную динамику белков Wnt. Полученные данные по экспрессии генов сигнального пути Wnt дополняют и расширяют наши представления об участии Wnt-сигналинга в регенерации иглокожих и других организмов. Кроме того, результаты наших исследований являются вкладом в изучение молекулярных механизмов регенерации у многоклеточных животных. Полученный фактический материал свидетельствует, что сигнальный путь Wnt является важной и неотъемлемой частью механизмов восстановления. Понимание конкретных механизмов восстановительных морфогенезов у голотурий поможет в решении общих вопросов теории регенерации, а также в разработке методов активации восстановительных потенциалов органов у млекопитающих, в частности у человека.

Личный вклад автора заключается в сборе материала, фиксации, проведении иммуноцитохимических реакций и анализе препаратов, биоинформационном анализе нуклеотидных последовательностей исследуемых генов в транскриптоме, подготовке материала и проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР в реальном времени (qPCR), быстрой амплификации концов кДНК (RACE), самостоятельном анализе полученных данных и подготовке публикаций.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2012, 2013, 2014); на Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2011); на 14-й международной конференции по иглокожим (Brussels, 2012); на Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2012); на Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе три статьи в отечественных журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 116 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 44 иллюстрации (рисунка). Список литературы состоит из 166 наименований, из них 151 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю благодарность всем сотрудникам лаборатории сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН за разностороннее содействие и поддержку, оказанную в ходе проведения работы. Сердечно благодарю своего научного руководителя д.б.н. И.Ю. Долматова за интересную и актуальную тему исследования, помощь и руководство на всем протяжении исследовательской работы и оформления диссертации, а также за ценные советы и рекомендации. Отдельную благодарность выражаю к.б.н. М.Г. Елисейкиной за помощь в освоении методов иммуоцитохимии, к.б.н. Е.В. Шамшуриной за обучение методам qPCR, а также к.б.н В.В. Паньковой за обучение методам молекулярной биологии. Также особую благодарность выражаю к.м.н. М.П. Исаевой и всем сотрудникам лаборатории морской биохимии ТИБОХ за неоценимую помощь в обучении методам RACE и проведении исследований. Кроме того, хотел бы поблагодарить к.б.н. Е.Н. Толкунову (лаборатория молекулярной биологии стволовых клеток Института цитологии РАН) за возможность стажировки и помощь в освоении методов молекулярной биологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-00408, 14-04-00239), ДВО РАН (гранты № 13-III-B-06-117, 14-III-B-06-067) и Правительства РФ (грант № 11.G34.31.0010).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Исследования выполнены на голотурии *Eupentacta fraudatrix* Djakonov et Baranova (Holothuroidea, Dendrochirotida). Отлов животных проводили в зал. Петра Великого Японского моря. Эвисперацию вызывали инъекцией в полость тела дистиллированной воды (Лейбсон, Долматов, 1989). При определении стадий регенерации внутренних органов использовали схему, представленную в работе Ламаш и Долматова (Lamash, Dolmatov, 2013).

Для иммуноцитохимических исследований брали переднюю четверть тела животного, в которой содержался аквафарингеальный комплекс (АК) и начальные отделы кишки. Неповрежденных особей и голотурий через 3, 5, 7, 9, 12, 14 и 24 сут после эвисцерации фиксировали 4% параформальдегидом на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение часа. На каждый срок регенерации брали по три особи. Срезы толщиной 5–14 мкм изготавливали на криотоме Cryo-Star HM 560 MV. Для выявления белка Wnt5 использовали поликлональные кроличьи антитела, полученные на искусственный пептид GTNGSTLMCCGRGYNSFTK, идентичный участку молекулы Wnt5 *E. fraudatrix*. Срезы изучали и фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META.

Транскриптомы зачатков АК и кишки *E. fraudatrix* на 3, 5 и 7 сут регенерации анализировали с помощью ресурсов www.ncbi.nlm.nih.gov и программ Blast, Mega, Gene Runner, Ugene. На основе полученных последовательностей транскриптов проводили дизайн праймеров, используя программу Primer Premier 5. Концевые участки транскриптов генов определяли с помощью метода RACE. Полученные кодирующие последовательности использовали для построения филогенетических деревьев. С помощью ПЦР изучали наличие продуктов генов у интактных животных в гонаде, водных легких, кишке, продольных мышечных лентах, стенке тела и АК, а также в заднем зачатке кишки (ЗЗ) через 3, 5, 7, 10, 14 и 20 сут после эвисцерации.

Динамику активности генов оценивали с помощью метода qPCR и статистической обработки данных в программе Microsoft Excel 2010. Анализировали АК и передний участок кишки интактных голотурий, а также зачатки этих органов (ПЗ) через 3, 5, 7, 10, 14 и 20 сут после эвисцерации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение белка Wnt5 в тканях *E. fraudatrix* в норме и при регенерации

В нашем исследовании было обнаружено, что у неповрежденных голотурий Wnt5-положительные клетки в небольшом числе присутствуют только в соединительной ткани стенки тела (гиподерме) и в эктонейральной части радиальных нервных тяжей (рис. 1, 2А, Б). В соединительной ткани клетки имеют округлую форму, не образуют отростки и располагаются преимущественно на внешней границе гиподермы (рис. 2А). В нервных тяжях одиночные Wnt5-положительные клетки лежат на периферии эктонейральной

части нервов (рис. 2Б). Они имеют длинные отростки, уходящие во внутреннюю часть тяжа. Кроме того, единичные клетки с меткой были выявлены в целоме.

Через 3–5 сут после эвисцерации (2–3 стадии) число меченых клеток у голотурий возрастало (рис. 1). В соединительной ткани они образовывали небольшие скопления (рис. 2В). По форме эти клетки отличались от таковых в норме: клетки удлинялись, у них появлялись отростки. Белок Wnt5 присутствовал также в цитоплазме некоторых амебоцитов, находящихся в полостях органов амбулакральной системы (рис. 2Г). В неповрежденной части нервных тяжей антителами окрашивались почти все клетки периферии эктонейральной части радиального нерва (рис. 2Д). Кроме того, белок Wnt5 выявлялся и в растущих концах радиальных нервных тяжей, расположенных в зачатке АК (рис. 2Е). Достаточно интенсивная метка была обнаружена в апикальной части клеток целомического эпителия интеррадиусов стенки тела (рис. 2Ж).

Через 6–7 сут после эвисцерации (стадия 4) мезентерий, на котором формируется зачаток кишки, содержал многочисленные отростки клеток, маркирующиеся антителами к Wnt5 (рис. 23). В самом зачатке кишки и покрывающем его целомическом эпителии Wnt5-положительные клетки отсутствовали. Относительное число Wnt5-положительных клеток в соединительной ткани на данной стадии регенерации увеличивалось до $11 \pm 2,3\%$ (рис. 1). Они встречались не только в гиподерме стенки тела, но и во внутренних областях зачатка АК, где были представлены как отдельными клетками, так и достаточно крупными скоплениями.

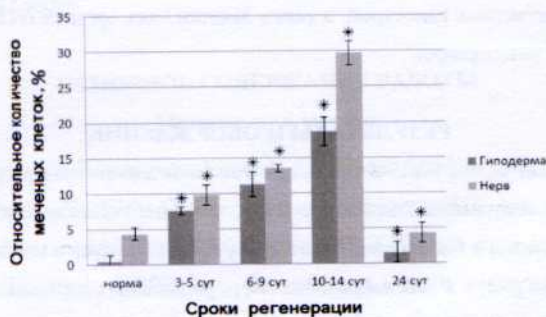


Рис. 1. Изменение количества Wnt5-положительных клеток в радиальных нервах и соединительной ткани у голотурии *Eupentacta fraudatrix* при регенерации. Данные представлены как среднее значение \pm SE (N = 9). Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($P < 0,05$).

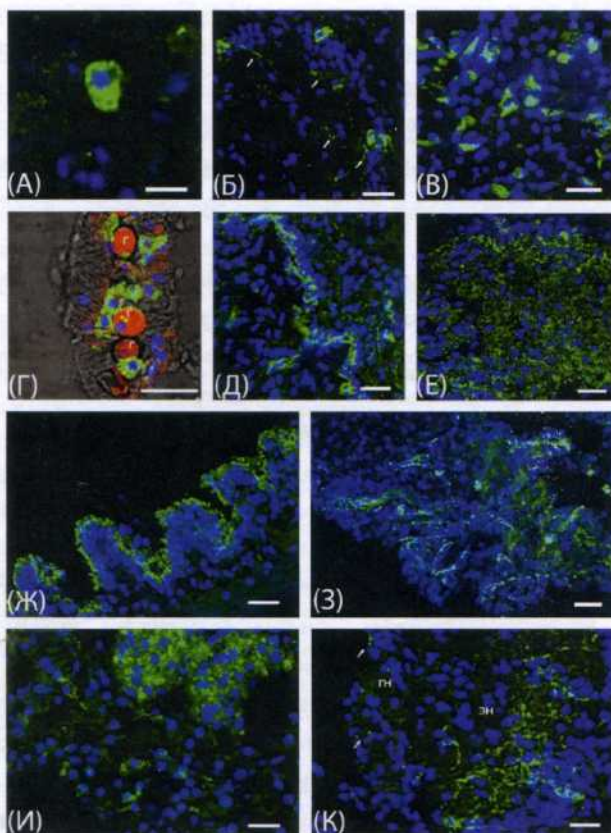


Рис. 2. Распределение Wnt5-положительных клеток в тканях голотурии *Eupentacta fraudatrix*. А – гиподерма в норме, Б – радиальный нерв в норме, В – гиподерма на 3 сут регенерации, Г – ампула амбулакральной ножки на 3 сут регенерации, Д – радиальный нерв на 3 сут регенерации, Е – нерв зачатка АК на 3 сут регенерации, Ж – целомический эпителий на 3 сут регенерации, З – кишечный мезентерий на 7 сут регенерации, И – зачаток АК на 7 сут регенерации, К – радиальный нерв на 7 сут регенерации. Условные обозначения: г – гемоциты, гн – радиальный гипонейральный тяж, эн – радиальный эктонейральный тяж. Стрелками обозначены отростки нервных клеток. Масштаб: А – 10 мкм, Б–К – 20 мкм.

В этот период возрастала активность экспрессии исследуемого гена и в нервной системе. Белок Wnt5 выявлялся в большинстве клеток эктонейральной части нервного тяжа и в отдельных нейронах гипонейральной части. Относительное число меченых клеток составляло $13,5 \pm 0,4\%$ (рис. 1).

Через 10–14 сут после эвисцерации (стадии 5 и 6) характер распределения Wnt5-положительных клеток в тканях голотурий сохранялся. Как и на предыдущей стадии, белок Wnt5 присутствовал в клетках соединительной и нервной ткани, в амебocyтах и апикальной части перитонеоцитов целомического эпителия интеррадиусов стенки тела. При этом число меченых клеток в радиальном нервном тяже и гиподерме по сравнению с предыдущей стадией увеличилось и достигло своих максимальных значений, 29% и 17% соответственно.

В дальнейшем, через 24 сут после эвисцерации, белок Wnt5 выявлялся лишь в нервах стенки тела и редких эллипсоидных клетках в гиподерме. Такое распределение меченых клеток близко к норме. Снизилось и число Wnt5-положительных клеток (рис. 1).

Наше исследование показало, что при регенерации внутренних органов у *E. fraudatrix* происходит активация синтеза Wnt5. Уже через 3 сут после эвисцерации (стадия 2) клетки с Wnt5 обнаруживаются в соединительной ткани, нервных тяжах, амебocyтах и целомическом эпителии. Целомический эпителий играет важную роль в регенерации у иглокожих (Долматов, 1999). Он первым реагирует на повреждение и уже на ранних сроках восстановления его клетки начинают мигрировать и митотически делиться. Из клеток целомического эпителия формируются мышцы и выстилки перифарингеального целома и кишки (Dolmatov, 1992; Dolmatov, Ginanova, 2001; Murray, García-Arriarás, 2004; Mashanov et al., 2005). Возможно, что именно Wnt5 регулирует преобразование клеток целомического эпителия. Участие Wnt5 в контроле клеточной миграции подтверждается данными по другим животным. У позвоночных при развитии некоторых видов опухолей молекулы Wnt5 воздействуют на раковые клетки, запуская процесс миграции, приводящий к появлению метастазов (Witze et al., 2008). Экспрессия Wnt5 в радиальных нервах при восстановлении у *E. fraudatrix* указывает, что данный белок участвует и в регуляции регенерации нервной системы. Сходную функцию выполняет продукт гомологичного гена *Smed-Wnt5* у планарий. У этих животных Wnt5 является регулятором формирования и роста нервной системы (Adell et al., 2009).

Экспрессия гена *wntA* в норме и при регенерации у *E. fraudatrix*

Нами было показано, что кодирующая последовательность транскрипта гена *wntA* имеет длину 1035 нуклеотидов. Она соответствует аминокислотной последовательности в 345 аминокислотных остатков (а.о.), включающей начальный метионин и стоп-кодон. В составе белковой молекулы имеются 24 остатка цистеина в высоко консервативных местах. Филогенетический анализ данной последовательности показал, что *wntA E. fraudatrix* имеет наибольшую гомологию с *wnt4* морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* (XP_797603.1) – 56%, и с *wntA* представителя полухордовых *Saccoglossus kowalevskii* (NM001171247.1) – 47% (рис. 3).

Нами было установлено, что в норме у *E. fraudatrix* *wntA* активен в водных легких, гонаде, кишке и стенке тела, однако не экспрессируется в мышцах. Различие в экспрессии *wntA* между стенкой тела и мышцами не совсем понятно. У иглокожих целомический эпителий стенки тела содержит большое число миоэпителиальных клеток (García-Agarrás, Dolmatov, 2010). Кроме того, в раннем онтогенезе морских ежей и голотурий миоциты соматической мускулатуры формируются за счет клеток целомического эпителия (Долматов, Ивантей, 1993; Dolmatov et al., 2007). При этом промежуточной стадией является образование миоэпителиальных клеток, что указывает на общее происхождение всей сократительной системы у Echinodermata (Dolmatov, 2010). Разница в экспрессии *wntA* между мышцами и стенкой тела дает основание предположить, что, несмотря на родство, регуляция тканевого гомеостаза миоцитов и миоэпителиальных клеток у иглокожих различна.

Активность *wntA* в ЗЗ наблюдалась начиная с 10 сут после эвисцерации (стадия 5). К этому моменту зачаток кишки уже сформирован и растет по мезентерию вперед (Долматов, Машанов, 2007). В нем происходит пролиферация энтероцитов и их специализация. По-видимому, *wntA* участвует в регуляции этих процессов.

В ПЗ экспрессия *wntA* начинается намного раньше. Уже на стадии 2 регенерации (3 сут после эвисцерации) уровень его активности увеличивается по сравнению с контролем более чем в 5 раз (рис. 4). В этот период начинают запускаться основные механизмы регенерации – происходит активация клеточной миграции, пролиферации, дедифференцировки (Dolmatov, 1992). Своего максимума экспрессия *wntA* достигает на стадии 4 (7 сут после эвисцерации), когда в ПЗ происходит активный морфогенез и закладываются основные структуры передней части кишки и АК. При этом относительный уровень экспрессии превышает норму более чем в 10 раз. В дальнейшем, через 10–20 сут (стадии 5–8), активность гена снижается, но остается достоверно выше

нормы. Исследований, посвященных роли *wntA* при регенерации у других животных, нет. В раннем развитии он может экспрессироваться как в энто- и мезодерме (Guder et al., 2006; Robert et al., 2014), так и в эктодерме (Bolognesi et al., 2008). Такое разнообразие зачатков, в которых активируется *wntA*, возможно, указывает на древность его происхождения.

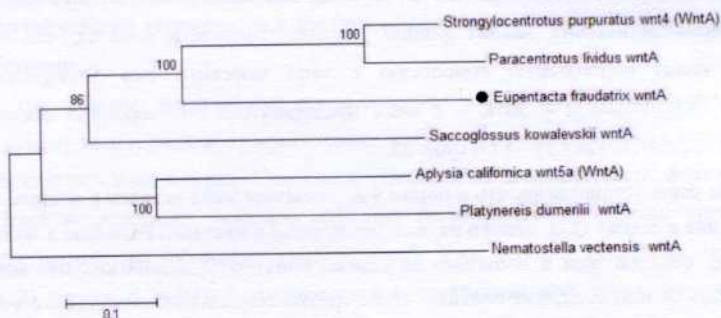


Рис. 3. Филогенетическое дерево транскриптов *wntA* различных животных, построенное с помощью метода «Neighbor-Joining». Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа.

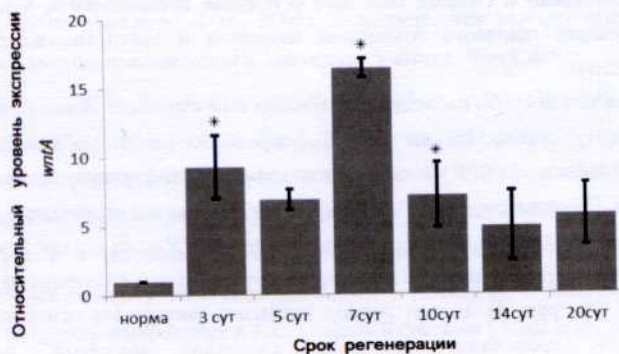


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии гена *wntA* при регенерации аквафрингеального комплекса и переднего зачатка кишки *Eupentacta fraudatrix*. Значения нормализованы по референсному гену – актину. Данные представлены как среднее значение \pm SE (N = 9). Значения нормы приняты в качестве 1. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения (P < 0,05).

Экспрессия гена *wnt4* в норме и при регенерации у *E. fraudatrix*

Кодирующая последовательность транскрипта гена *wnt4* имеет длину 1077 нуклеотидов. Она соответствует аминокислотной последовательности в 359 а.о., включающей начальный метионин и стоп-кодон. Имеются 24 остатка цистеина в высоко консервативных местах. Филогенетический анализ *wnt4* голотурии *E. fraudatrix* показал, что данный ген имеет большую гомологию с *wnt4* морского ежа *Paracentrotus lividus* (АНУ22359.1) – 69%, с *wnt4* *S. kowalevskii* (XP002737259.1) – 63% и с *wnt4* млекопитающих – 63–65% сходства (рис. 5).

У неповрежденных животных активность *wnt4* обнаружена во всех исследуемых органах: мышцах, стенке тела, гонадах, АК, водных легких и кишке. Это указывает, что данный ген участвует в регуляции различных физиологических процессов. Наши результаты соответствуют данным, полученным на других животных. Показано, что у млекопитающих мутации по этому гену приводят к нарушениям функционирования половых органов (Biason-Lauber et al., 2007). Кроме того, у позвоночных Wnt4 регулирует формирование нервно-мышечных контактов и соотношение быстрых и медленных мышечных волокон (Strohlic et al., 2012).

При формировании 33 экспрессия *wnt4* наблюдалась на всех сроках восстановления. С помощью qPCR было показано, что уровень экспрессии *wnt4* в неповрежденных АК и кишке относительно невисок (рис. 6). Эвисцерация, видимо, вызывает быструю активацию *wnt4*, поскольку уже через 3 сут после удаления внутренностей (стадия 2) уровень экспрессии достигает своих максимальных значений. Далее через 5 сут экспрессия гена уменьшается и вновь достоверно увеличивается на стадии 4, в период активного морфогенеза (7 сут после эвисцерации). Повышение экспрессии *wnt4* указывает, что он участвует в регуляции закладки основных структур переднего конца тела – АК и кишки. В период с 10 по 14 сут после эвисцерации уровень активности гена снижается, но остается достоверно выше нормы. У *E. fraudatrix* через 8–12 сут после эвисцерации (стадии 5 и 6) в АК запускаются механизмы кальцификации, в результате чего формируется окологлоточное известковое кольцо (Dolmatov, 1992). В этой связи интересны недавно полученные данные о том, что у млекопитающих *wnt4* регулирует процесс обызвествления костной ткани (Yu et al., 2014). Необычным оказалось статистически достоверное увеличение активности *wnt4* через 20 сут после эвисцерации (стадия 8). В этот период регенерация внутренних органов уже завершена и происходит

увеличение их размеров (Mashanov et al., 2005; Долматов, Машанов, 2007). Возможно, *wnt4* регулирует ростовые процессы в сформированных структурах.

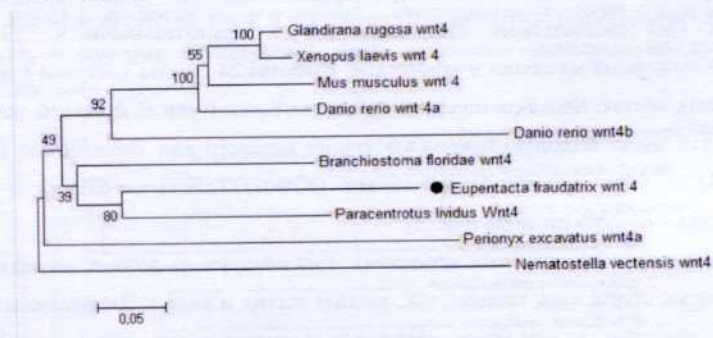


Рис. 5. Филогенетическое дерево транскриптов *wnt4* различных животных, построенное с помощью метода «Neighbor-Joining». Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа.

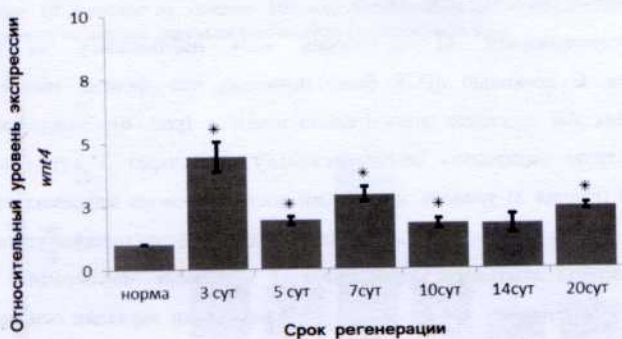


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии гена *wnt4* при регенерации аквафарингеального комплекса и переднего зачатка кишки *Eupentacta fraudatrix*. Значения нормализованы по актину. Данные представлены как среднее значение \pm SE (N = 9). Значения нормы приняты в качестве 1. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения (P < 0,05).

Экспрессия гена *wnt6* в норме и при регенерации у *E. fraudatrix*

Кодирующая последовательность транскрипта гена *wnt6* имеет длину 1077 нуклеотидов. Она соответствует аминокислотной последовательности в 359 а.о., включающей начальный метионин и стоп-кодон. 24 остатка цистеина расположены в высоко консервативных местах. Транскрипт *wnt6* имеет наибольшее сходство с *wnt6* голотурии *Apostichopus japonicus* (AGA62464.1) – 71%. Сходство с *wnt6* морских ежей *S. purpuratus* и *P. lividus* составляет 62%, а с *wnt6* позвоночных животных – 55% (рис. 7).

Установлено, что в норме экспрессия *wnt6* происходит в мышцах, гонадах, водных лёгких и кишке. Отсутствие продуктов *wnt6* в стенке тела, как и в случае с *wnt1*, возможно, указывает на различие в регуляции гомеостаза миоцитов и миоэпителиальных клеток. При регенерации динамика экспрессии *wnt6* имела пикообразный характер. В ПЗ голотурий до 7 сут после эвисцерации активность его не отличалась от нормы (рис. 8). Через 7 сут (стадия 4) отмечено резкое возрастание уровня экспрессии, а затем, через 10 сут, такое же резкое снижение. Сходным образом, вероятно, происходит изменение экспрессии *wnt6* и в заднем конце животного. Транскрипты *wnt6* обнаруживаются в ЗЗ только на 7 сут после эвисцерации. Этот период характеризуется началом формирования пищеварительной системы у *E. fraudatrix* (Mashanov et al., 2005). Именно через 7 сут после эвисцерации закладываются передний и задний зачатки кишки. В этой связи можно предположить участие *wnt6* в запуске процесса формирования пищеварительной системы у *E. fraudatrix*, что согласуется с данными по другим голотуриям. В частности, у *A. japonicus* при регенерации кишки активность *wnt6* возрастает, достигая максимума на 7 сут, и в дальнейшем постепенно уменьшается (Sun et al., 2013). В этот период у *A. japonicus* начинается активная дедифференцировка клеток остатка пищевода и формирование переднего зачатка кишки (Шукалюк, Долматов, 1999). Пикообразный характер экспрессии *wnt6*, возможно, указывает на то, что у голотурий этот ген является переключателем, запуская или, наоборот, блокируя какие-то процессы, связанные с дедифференцировкой клеток.

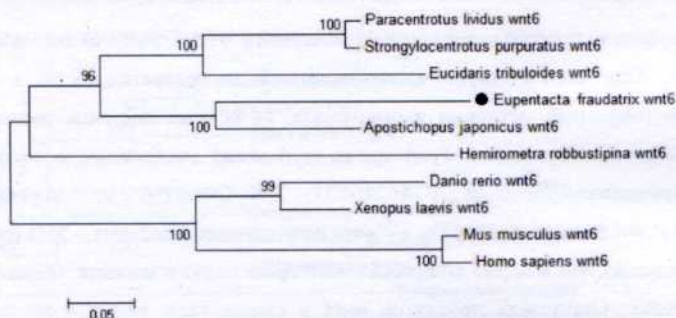


Рис. 7. Филогенетическое древо транскриптов *wnt6* различных животных, построенное с помощью метода «Neighbor-Joining». Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа



Рис. 8. Относительный уровень экспрессии гена *wnt6* при регенерации аквафарингеального комплекса и переднего зачатка кишки *Eupentacta fraudatrix*. Значения нормализованы по актину. Данные представлены как среднее значение \pm SE (N = 9). Значения нормы приняты в качестве 1. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($P < 0,05$).

Экспрессия гена *wnt16* в норме и при регенерации у *E. fraudatrix*

Кодирующая последовательность транскрипта гена *wnt16* имеет длину 1056 нуклеотидов. Она соответствует аминокислотной последовательности в 352 а.о., включающей начальный метионин и стоп-кодон. Имеются 23 остатка цистеина в высоко консервативных местах. Аминокислотная последовательность транскрипта данного гена имеет 49% гомологию с *wnt16 S. kowalevskii* (EU931648.1) и 45% гомологию с *wnt16 P. lividus* (KJ000375.1) (рис. 9).

Было показано, что экспрессия *wnt16* у неповрежденных особей *E. fraudatrix* происходит в водных легких, гонаде и кишке. Для позвоночных было установлено, что Wnt16 через неканонический сигналинг активирует сигнальный путь Notch, который, в свою очередь, контролирует дифференцировку стволовых клеток (Clements et al., 2011). Возможно, что у *E. fraudatrix* в половых трубках он регулирует формирование яйцеклеток и сперматозоидов из первичных половых клеток.

При формировании ПЗ данный ген активен только на 5 сут после эвисцерации (стадия 3). У *E. fraudatrix* в этот период начинается трансдифференцировка клеток целомического эпителия в энтероциты (Mashanov et al., 2005). При этом клетки дедифференцируются и начинают активно митотически делиться. В результате этого они, возможно, приобретают некоторые свойства стволовых клеток. В этой связи можно предположить, что *wnt16* через сигнальный путь Notch участвует в регуляции трансдифференцировки. При формировании ЗЗ транскрипты *wnt16* были найдены на 3 и 10 сут. Функция *wnt16* при восстановлении задней части кишки пока не ясна. Для решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

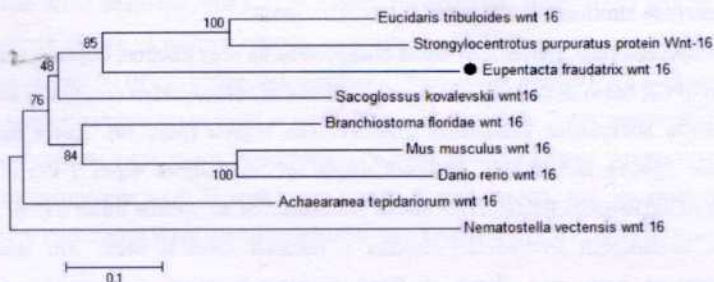


Рис. 9. Филогенетическое дерево транскриптов *wnt16* различных животных, построенное с помощью метода «Neighbor-Joining». Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа.

Экспрессия *β-catenin*, *dishevelled* и рецепторов *frizzled* у *E. fraudatrix*

Анализ транскриптомов регенерирующих органов *E. fraudatrix* выявил наличие фрагментов транскриптов генов семейства Frizzled, а также генов *β-catenin* и *dishevelled*. Транскрипты *β-catenin* были обнаружены на ранних этапах регенерации (3 и 5 сут после эвисцерации). В транскриптомах зачатков на 3, 5 и 7 сут регенерации были выявлены

транскрипты гена *dishevelled*. Белки Dishevelled и β -catenin являются важными участниками сигнальных путей Wnt (Eisenmann, 2005; Komiyu, Habas, 2008). В этой связи не удивительно, что при регенерации *E. fraudatrix* нами были обнаружены транскрипты *dishevelled* и β -catenin. Лигандами для β -catenin-зависимого сигнального пути могут быть Wnt4, Wnt6 и Wnt16 (Lyons et al., 2004; Jiang et al., 2014; Cawthorn et al., 2012).

У *E. fraudatrix* были обнаружены транскрипты трех рецепторов семейства Frizzled – *frizzled1/2/7*, *frizzled4*, *frizzled5/8*. Транскрипты *frizzled4* были найдены только в транскриптоме зачатков на 3 сут регенерации (стадия 2). У *E. fraudatrix* в этот период наблюдается экспрессия *wntA* и *wnt4*. Возможно, что на ранних этапах восстановления эти лиганды взаимодействуют с Frizzled4, инициируя транскрипцию генов, необходимых для начала регенерации.

Экспрессия *frizzled5/8* обнаружена на 3 и 5 сут регенерации. Имеются данные, что у амфибий рецептор *frizzled5/8* способен взаимодействовать с Wnt5, обеспечивая запуск неканонического сигнального пути (Kuhl et al., 2000). У *E. fraudatrix* экспрессия *frizzled5/8* совпадает с увеличением числа Wnt5-положительных клеток, что, вероятно, указывает на взаимодействие лиганда Wnt5 с рецептором Frizzled5/8.

Экспрессия гена *frizzled1/2/7* была обнаружена на всех стадиях формирования ПЗ. С помощью qPCR было показано, что через 3 сут после эвисцерации (стадия 2) количество транскриптов достоверно снижается относительно нормы (рис. 10). Далее происходит увеличение уровня экспрессии, который достигает максимума через 7 сут (стадия 4). После этого активность *frizzled1/2/7* вновь уменьшается до уровня ниже нормы. В целом динамика активности *frizzled1/2/7* сходна с таковой *wntA* и *wnt6*. Это может быть свидетельством того, что WntA и Wnt6 взаимодействуют с данным рецептором. Корреляция экспрессии *frizzled1/2/7* и *wnt6* наблюдается и у морского ежа *P. lividus* (Robert et al., 2014), что согласуется с нашими данными.

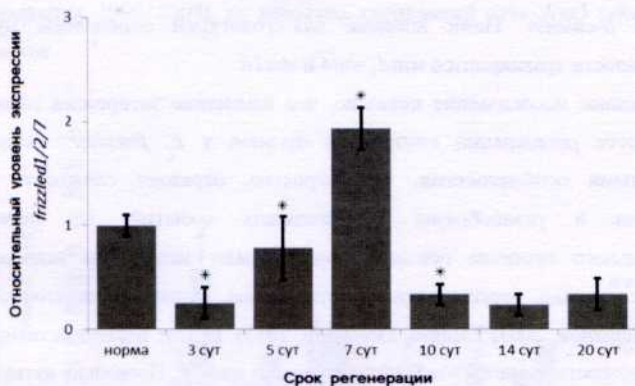


Рис. 10. Относительный уровень экспрессии гена *frizzled1/2/7* при регенерации аквафарингеального комплекса и переднего зачатка кишки *Eupentacta fraudatrix*. Значения нормализованы по референсному гену – актину. Данные представлены как среднее значение \pm SE (N = 9). Значения нормы приняты в качестве 1. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ($P < 0,05$).

Также было показано, что у *E. fraudatrix* транскрипты *frizzled1/2/7* присутствуют в заднем зачатке кишки на ранних стадиях регенерации (3–5 сут после эвисцерации, стадии 2 и 3) и на стадии 5 (10 сут после эвисцерации). Экспрессия *frizzled1/2/7* в 33 совпадает в какой-то мере с активностью *wntA* и *wnt4*. В то же время, на 7 сут после эвисцерации, когда транскрипты гена этого рецептора в заднем зачатке кишки отсутствуют, здесь выявляется экспрессия *wnt6*. В этой связи можно предположить, что, по крайней мере, в задней части голотурии Wnt6 взаимодействует не с Frizzled1/2/7, а с другим рецептором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что сигнальный путь Wnt играет большую роль в жизнедеятельности голотурий. У *E. fraudatrix* были обнаружены продукты пяти генов семейства Wnt: *wntA*, *wnt4*, *wnt5*, *wnt6* и *wnt16*. Таким образом, имеются лиганды, запускающие как канонический (Wnt4, Wnt6) (Lyons et al., 2004; Jiang et al., 2014), так и неканонический сигналинг (Wnt5, WntA) (Philipp et al., 2009; Robert et al., 2014). Wnt16 способен активировать оба вида сигнальных путей (Jiang et al., 2014; Clements et al., 2011). Кроме лигандов, были выявлены и другие компоненты сигнального пути Wnt – транскрипты генов рецепторов *frizzled1/2/7*, *frizzled4*, *frizzled5/8*, а также мессенджеров

dishevelled и β -*catenin*. Нами впервые для голотурий определены нуклеотидные последовательности транскриптов *wntA*, *wnt4* и *wnt16*.

Проведенное исследование показало, что изменение экспрессии генов семейства Wnt в процессе регенерации внутренних органов у *E. fraudatrix* характеризуется индивидуальными особенностями, что, вероятно, отражает сложность механизмов восстановления и разнообразие происходящих событий. На первых этапах восстановительного процесса основную роль играют механизмы вывода клеток из стабильного состояния, переключения работы генома, синтеза межклеточного вещества (Долматов, Машанов, 2007; Lamash, Dolmatov, 2013). В этот период активируются гены *wnt4* и *wntA*, возрастает число Wnt5-положительных клеток. Поскольку активность *wnt4* в этот период достигает максимума (рис. 11), именно Wnt4 является основным кандидатом на роль лиганда, запускающего процессы миграции и дедифференцировки, аналогично Wnt4 у позвоночных (Zhang et al., 2014). Кроме того, возрастание числа Wnt5-положительных клеток в нервных клетках указывает на активацию нервной системы. Хорошо известно, что восстановительный процесс протекает успешно только при иннервации регенерирующего органа (Карлсон, 1986; Короткова, 1997).

Следующим важным этапом восстановления передних структур *E. fraudatrix* является начало формирования кишечной выстилки на 3 стадии регенерации (5 сут после эвисцерации) (Mashanov et al., 2005; Долматов, Машанов, 2007). Запускается процесс трансдифференцировки клеток целомического эпителия. В этот период активность большинства изученных генов *wnt* снижается. Однако только на 5 сут после эвисцерации отмечается экспрессия *wnt16*. Можно предположить, что Wnt16 участвует в механизмах активации трансдифференцировки у голотурий.

Основной стадией регенерации передних структур у *E. fraudatrix* является стадия 4 (6–7 сут после эвисцерации). В этот период закладываются все основные структуры АК: формируется амбулакральный кольцевой сосуд, нервное кольцо, щупальца и другие органы амбулакральной системы (Dolmatov, 1992; Долматов, Машанов, 2007). На данной стадии экспрессия *wntA*, *wnt6* и *frizzled1/2/7* достигает своих максимальных значений за весь период восстановления (рис. 10, 11). При активном формировании органов особенно необходим контроль над расположением клеток, которым, возможно, управляет *wntA* (Guder et al., 2006). Число Wnt5 положительных клеток у *E. fraudatrix* еще более увеличивается. Поскольку у иглокожих большую роль в регенерации играет клеточная

миграция (Долматов, 1999, 2009), то, вероятно, сигнальный путь Wnt5 также активирует миграцию клеток.

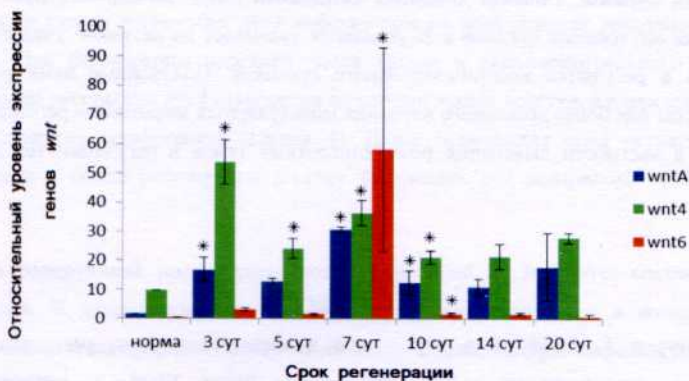


Рис. 11. Относительный уровень экспрессии генов *wntA*, *wnt4* и *wnt6* при регенерации аквафарингеального комплекса и переднего зачатка кишки *E. fraudatrix*. Значения нормализованы по актину. Данные представлены как среднее значение \pm SE (N = 9). Значения экспрессии *wnt6* в норме приняты в качестве 1. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения.

Экспрессия гена *wnt6* на этой стадии регенерации увеличивается более чем в 10 раз, по относительному уровню превышая другие исследуемые гены. У позвоночных Wnt6 участвует в регуляции развития мускулатуры и ряда эпителиальных тканей (Lavery et al., 2008). По всей видимости, у *E. fraudatrix* *wnt6* выполняет сходную функцию, являясь частью механизмов дифференцировки клеток при формировании мышц и целомического эпителия.

На стадиях 5 и 6 (8–14 сут после эвисцерации) основные структуры АК и переднего отдела кишки уже сформированы, и происходит дифференцировка и специализация входящих в них клеток. Этот период характеризуется максимальным содержанием Wnt5-положительных клеток в нервной системе и соединительной ткани (рис. 1). Очевидно, что Wnt5 задействован в регуляции восстановления нервной системы и синтезе внеклеточного матрикса. Экспрессия *wnt6* падает до уровня нормы и в дальнейшем более не увеличивается. Также снижается количество транскриптов *wntA*. Активность *wnt4* постепенно уменьшается к 14 сут, однако уровень экспрессии этого гена даже на 20 сут

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Гирич А.С.**, Долматов И.Ю., Ламаш Н.Е. Распределение белка Wnt5 в тканях голотурии *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirotida) в норме и при регенерации // Биология моря. 2014. Т. 40, № 1. С. 70–75.

2. **Гирич А.С.**, Долматов И.Ю. Экспрессия генов сигнального пути Wnt при регенерации и бесполом размножении у голотурий // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. Т. 55, № 1. С. 31–33.

3. Долматов И.Ю., Бобровская Н.В., **Гирич А.С.** Иглокожие как модельные объекты для изучения механизмов регенерации // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2014. № 3. С. 96–112.

Работы в сборниках трудов и материалах конференций:

4. **Girich A.S.**, Dolmatov I.Y., Lamash N.E., Eliseikina M.G. Wnt5 gene expression in holothurián *Eupentacta fraudatrix* regeneration // 14th International Echinoderm Conference, 20–24 August 2012, Brussels. Conference booklet. Brussels, 2012. P. 103–104.

5. **Гирич А.С.**, Долматов И.Ю., Ламаш Н.Е., Елисейкина М.Г. Белок Wnt5 при регенерации после эвисцерации голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов. Материалы Всероссийской конференции с международным участием. Борок: Изд-во ФГБУН ИБВВ, 2012. С. 85–87.

6. **Гирич А.С.**, Долматов И.Ю., Исаева М.П. Гены семейства Wnt, экспрессирующиеся при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция. Всероссийская конференция с международным участием. Санкт-Петербург: Изд-во ВВМ, 2013. С. 117–118.

Александр Сергеевич Гирич

Экспрессия генов сигнального пути Wnt при регенерации
у голотурии *Eupentacta fraudatrix*

03.03.05 – биология развития, эмбриология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 21.01.2015.
Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 1,00.
Тираж 100 экз. Заказ 009.

Отпечатано в типографии
Дирекции публикационной деятельности ДВФУ
690990, Владивосток, ул. Пушкинская, 10