

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Нижниченко Владимир Анатольевич

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ  
ПРОДОЛЬНЫХ МЫШЕЧНЫХ ЛЕНТ У ГОЛОТУРИИ  
*EUPENTACTA FRAUDATRIX***

1.5.23. Биология развития, эмбриология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,  
чл.-корр. РАН  
Долматов Игорь Юрьевич

Владивосток – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Регенерация.....	11
1.2. Регенерация у иглокожих .....	12
1.3. Регенерация мышц .....	14
1.4. Строение, развитие и регенерация ПМЛ у голотурии <i>E. fraudatrix</i> .....	15
1.5. Молекулярные механизмы регенерации мышц.....	18
1.6. Матриксные металлопротеиназы в регенерации мышц .....	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
2.1. Сбор и содержание животных.....	27
2.2. Взятие образцов ткани, выделение и очистка РНК.....	27
2.3. Секвенирование поли-А РНК.....	28
2.4. Сборка транскриптома <i>de novo</i> .....	29
2.5. Анализ дифференциальной экспрессии генов.....	30
2.6. Аннотация белок-кодирующих последовательностей транскриптома .....	30
2.7. Анализ последовательностей .....	31
2.8. Построение филогенетических деревьев .....	32
2.9. Разработка праймеров для кПЦР и клонирования .....	33
2.10. кПЦР .....	33
2.11. Синтез РНК зондов.....	34
2.12. Фиксация тканей и приготовление замороженных срезов .....	35
2.13. Гибридизация <i>in situ</i> на срезах .....	36
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	38
3.1. Анализ мультигенного семейства MRF у иглокожих.....	38
3.2. Анализ мультигенного семейства MMP .....	44
3.2.1. Состав мультигенного семейства MMP у <i>E. fraudatrix</i> и других иглокожих .....	44
3.2.2. Анализ доменной структуры MMP иглокожих .....	46
3.2.3. Филогенетический анализ взаимоотношений MMP иглокожих, позвоночных и полухордовых. ..	50
3.3. Поиск ТФ и MMP, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ у <i>E. fraudatrix</i> . .....	54
3.3.1. Секвенирование и сборка транскриптома <i>de novo</i> .....	54
3.3.2. Анализ дифференциальной экспрессии .....	55
3.3.3. Аннотация .....	57
3.3.4. Поиск ТФ и MMP, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ.....	58

3.3.5. Сеть сверхпредставленных биологических процессов и путей.....	61
3.4. Анализ временной и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов.....	66
3.4.1. Оценка временной экспрессии с помощью кПЦР.....	66
3.4.2. Локализация транскриптов генов ТФ и ММР в регенерирующем амбулакре.....	69
4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	72
4.1. Анализ мультигенного семейства MRF у иглокожих.....	72
4.2. Анализ мультигенного семейства ММР у иглокожих.....	74
4.2.1. Состав семейства ММР у <i>E. fraudatrix</i> и других иглокожих.....	74
4.2.2. Анализ доменной структуры ММР иглокожих.....	76
4.2.3. Филогенетический анализ взаимоотношений ММР иглокожих, позвоночных и полухордовых. ..	79
4.3. Поиск ТФ и ММР, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ у <i>E. fraudatrix</i> .....	81
4.3.1. Анализ дифференциальной экспрессии генов.....	81
4.3.2. Поиск ТФ и ММР, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ.....	83
4.3.3. Анализ сети сверхпредставленных биологических процессов и путей.....	83
4.4. Анализ временной и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	121
1. Праймеры для кПЦР.....	121
2. Праймеры для синтеза зондов на SISH.....	122
3. Последовательности отсеквенированных ампликонов, используемых в SISH.....	123
4. Корреляция оценок экспрессии отдельных генов.....	127

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс;  
ДЭГ – дифференциально экспрессирующийся ген;  
кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция;  
ПМЛ – продольная мышечная лента;  
ТФ – транскрипционный фактор;  
bHLH – basic helix-loop-helix;  
GO – gene ontology;  
HLH – helix-loop-helix;  
ММП – матриксная металлопротеиназа;  
MRF – myogenic regulatory factor;  
MYF5 – myogenic factor 5;  
MYH6 – myosin 6 heavy chain;  
MYOD – myogenic differentiation;  
N-TAD – N-концевой трансактивационный домен;  
PBS – phosphate-buffered saline;  
PGBD – протеогликан-связывающий домен;  
RAR – retinoic acid receptor;  
RUNX – runt-related transcription factor;  
SISH – sections in situ hybridization;  
SOX – SRY-related HMG-box;  
SSC – saline-sodium citrate;  
SSCT – saline-sodium citrate and tween 20;  
TPM – transcript per million;  
ZEB – zink-finger E homeobox-binding.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Сократительная система представляет собой одну из древнейших и важнейших систем многоклеточных животных. Она играет заметную роль в функционировании и жизнедеятельности организмов. В этой связи способность восстанавливать мышцы после повреждения имеет большое значение для выживаемости как отдельных особей, так и всего вида в целом. Несмотря на огромный объем знаний о механизмах регенерации сократительной системы, многие теоретические и практические аспекты восстановления мускулатуры остаются не изученными. Исследование фундаментальных основ репаративного миогенеза важно для сравнительного анализа механизмов восстановительных морфогенезов мышц, их происхождения и эволюции у различных типов животных. У позвоночных регенерация мускулатуры в подавляющем большинстве случаев ограничивается использованием специализированных стволовых клеток, в то время как у ряда беспозвоночных данный процесс может основываться на де- или трансдифференцировке различных типов клеток. Прикладное значение таких исследований состоит в возможности разработки эффективных методов лечения сократительной системы человека.

Представители типа Echinodermata обладают хорошими способностями к восстановлению частей тела и органов, включая мышцы [1]. Регенерация у иглокожих протекает без участия стволовых клеток, а формирование утраченных структур происходит за счет дедифференцировки и, реже, трансдифференцировки специализированных клеток оставшихся частей органов [1–5]. Восстановление мышц в основном изучалось на голотуриях, поскольку они обладают наиболее развитой мышечной системой среди Echinodermata. Эти животные имеют идущие вдоль радиусов тела (амбулакров) продольные мышечные ленты (ПМЛ), которые легко препарируются и доступны для экспериментальных манипуляций. Некоторые виды способны достаточно быстро восстанавливать ПМЛ после поперечного

рассечения [2,6,7]. У голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov, Baranova & Savel'eva, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirotida) регенерация ПМЛ на клеточном уровне описана наиболее подробно. Новые миоциты развиваются за счет миогенной трансформации клеток целомического эпителия. Последние начинают синтезировать мышечные белки, погружаться в подлежащую соединительную ткань и формируют мышечные пучки [2,6,7]. В то же время, молекулярная основа данного процесса остается не исследованной. Изучение восстановления ПМЛ у *E. fraudatrix* после повреждения позволяет лучше понять происхождение механизмов миогенеза и их эволюции у Bilateria.

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день морфологические особенности регенерации мускулатуры иглокожих описаны у морских звезд, морских лилий, офиур и голотурий [1]. Наиболее подробно изучена регенерация ПМЛ у голотурий *E. fraudatrix* и *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) [6,7]. Однако данных, касаемых молекулярного аспекта восстановительных миогенезов накоплено мало. Более того, имеющиеся данные фрагментированы и, как правило, ограничены изучением экспрессии или функции одного или нескольких генов и не позволяют полноценно понять молекулярные механизмы регенерации сократительной системы [8]. Кроме того, вне фокуса внимания остались соединительная ткань и ее роль в миогенезе иглокожих. Предварительные данные показывают, что преобразование внеклеточного матрикса имеет существенное значение для формирования мышечных пучков [9].

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы является выявление генов, потенциально участвующих в регуляции восстановления ПМЛ у голотурии *E. fraudatrix*. Мы сосредоточились на двух группах генов, играющих важную роль в регенерации: транскрипционные факторы (ТФ) и матриксные металлопротеиназы (ММР).

Задачи исследования:

1. Поиск генов семейства Myogenic regulatory factors (MRF) и изучение доменной структуры кодируемых ими белков у иглокожих.
2. Поиск генов семейства матриксных металлопротеиназ (ММР) и изучение доменной структуры кодируемых ими белков у иглокожих.
3. Определение с помощью транскриптомного анализа генов транскрипционных факторов и ММР, потенциально вовлеченных в регенерацию ПМЛ.
4. Анализ динамики экспрессии генов-кандидатов при регенерации ПМЛ.

**Научная новизна.** Впервые проведены секвенирование транскриптома и анализ дифференциальной экспрессии генов при регенерации мышц у иглокожих. Проведен анализ сетей сверхпредставленных процессов и сигнальных путей. Определен список генов, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ у голотурий. Установлена доменная структура и проведен сравнительный анализ ММР и MRF у иглокожих и позвоночных. Методом SISH (sections *in situ* hybridization) подтверждена активность 9 генов в ПМЛ, что указывает на их участие в регенерации.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Секвенирование транскриптома, а также анализ дифференциальной экспрессии и сетей сверхпредставленных процессов позволяют выявить перестройки в работе генов и их ассоциацию с биологическими процессами при регенерации ПМЛ. Полученные данные важны для сравнительного анализа механизмов регенерации у разных групп животных. Сведения об изменении экспрессии генов дают возможность лучше понять происхождение и эволюцию механизмов восстановления сократительной системы. Результаты пространственной и временной оценки экспрессии изученных ТФ и ММР позволяют выявить закономерности миогенеза у *E. fraudatrix*. Также они являются отправной точкой для дальнейших исследований роли этих генов в регенерации мышц иглокожих и сопровождающих ее клеточных процессов (дедифференциация, миграция и дифференциация), более детальное понимание

которых может иметь значение для практического применения в сфере биомедицины. Качественно определенные нуклеотидные последовательности транскриптов могут быть полезны для филогенетических исследований.

**Методология и методы исследования.** Секвенирование транскриптома было выполнено на платформе Illumina NovaSeq 6000. Сборку и аннотацию транскриптомов проводили с использованием классических инструментов SPAdes, BLAST и алгоритмов HomoloCAP, Reconciler, описанных в работе [10]. Карта сверхпредставленных процессов и путей построена с помощью программ GSEA, EnrichmentMap и Cytoscape. Для изучения динамики пространственно-временной экспрессии генов во время регенерации применялись методы SISH и кПЦР (количественная полимеразно-цепная реакция). Филогенетические деревья построены алгоритмом RAxML и визуализированы с помощью онлайн сервиса iTOL. Для определения доменной структуры использовались программы Blast CD-search, Smart, SignalP-5.0 и Phobius.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. У представителей Echinodermata имеются гомологи генов семейства MRF позвоночных.
2. MMP иглокожих имеют типичное для этого типа протеаз строение, однако на филогенетическом дереве основное их число группируется отдельно от MMP позвоночных, вероятно, вследствие активной дупликации и дивергенции предковых генов MMP после разделения Ambulacraria и Chordata.
3. Набор транскрипционных факторов, экспрессирующихся при регенерации ПМЛ у *Eupentacta fraudatrix*, значительно отличается от такового, которые регулируют миогенез у позвоночных.

**Личный вклад автора** заключается в проведении всех экспериментальных работ, подготовке библиотек для секвенирования транскриптомов, анализе и статистической обработке полученных данных, подготовке и написании публикаций.



**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных результатов обеспечивается корректно поставленными экспериментами согласно соответствующим протоколам. Перед проведением экспериментов осуществляли предварительные опыты для подбора оптимальных условий. Для обработки данных использовались статистические методы. Специфичность экспериментальных данных подтверждена использованием отрицательных и положительных контролей. Все эксперименты отвечают требованиям воспроизводимости, поскольку проведены в нескольких повторах.

**Апробация работы и публикации.** Результаты исследований были изложены на Третьей Всероссийской конференции по иглокожим «От прошлого к настоящему» (Москва, Россия, 2023) и Ежегодной научной конференции Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, Россия, 2023). По данной диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК, и 2 тезисов в сборниках материалов конференций.

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 127 страницах, и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы, а также 25 иллюстраций, 7 таблиц и 4 приложения. Список литературы содержит 200 наименований, из которых 194 на английском языке.

**Благодарности.** Выражаю искреннюю благодарность директору ННЦМБ ДВО РАН, д.б.н., чл.-корр. РАН Долматову Игорю Юрьевичу за руководство, консультирование по цито-гистологическим аспектам регенерации, обучению анатомии и препарированию голотурий, написанию и подготовке научных публикаций, а также помощь в интерпретации результатов филогенетических и молекулярных исследований. Очень благодарен Александру Сергеевичу Гиричу за проявленное терпение и обучению меня статистическим методам обработки информации, филогенетическим методам и навыкам молекулярной биологии.

Признателен Алексею Вячеславовичу Бойко, за его отзывчивость и помощь в освоении статистических методов обработки информации и методов филогенетических исследований, а также за сборку транскриптома и анализ дифференциальной экспрессии. Благодарен Екатерине Валерьевне Шамшуриной, Талие Талгатовне Гинановой и Марине Геннадьевне Елисейкиной за консультирование и помощь в освоении гистологических методов, а также Андрею Даниловичу Кухлевскому за секвенирование ампликонов. Также благодарен всему коллективу лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН, в которой мне посчастливилось оказаться и работать.

**Финансовая поддержка работы.** Исследование проведено при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 17-04-01334 и № 20-04-00574) и РНФ (№ 21-74-30004).

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Регенерация

Способность восстанавливать целостность организма после различного рода повреждений или естественного износа является фундаментальным свойством живых существ. Она имеется у всех организмов – начиная с прокариот [11] и заканчивая наиболее высокоорганизованными представителями многоклеточных, а также наблюдается в ходе всего онтогенеза – от раннего эмбриона до самых старших представителей в популяции [12]. Способность к восстановлению клеток и тканей позволяет животным успешнее противостоять неблагоприятным условиям внешней среды и поддерживать гомеостаз. По определению, регенерация — это «морфогенетический процесс замены различных структур (от частей клеток до крупных частей тела) после естественного изнашивания или случайной утраты, результатом которого является сохранение целостности организма и восстановление утраченной функции» [2].

Исследование регенерации идет в двух направлениях: теоретическом и практическом. Практическое направление состоит в изучении процессов восстановления у человека. Основной целью таких работ является развитие эффективных методов лечения, а также формирование новых подходов в трансплантологии и выращивании искусственных органов и тканей. Теоретическое направление больше касается исследований восстановительных морфогенезов у беспозвоночных и низших позвоночных животных [2]. Это связано с тем, что многие виды беспозвоночных являются удобными моделями для исследований в этой области, поскольку обладают хорошо выраженным регенеративным потенциалом.

Различают физиологическую регенерацию, которая служит для поддержания гомеостаза тканей и органов, и репаративную регенерацию, то есть восстановление поврежденных или утраченных частей тела [13]. У высших позвоночных

большинство органов способно лишь к физиологической регенерации [14]. Репаративная регенерация больше свойственна беспозвоночным, хотя также встречается и среди позвоночных, таких как, например, рыбы и амфибии [15,16].

Важнейшим вопросом теории регенерации является вопрос о происхождении клеточного материала, за счет которого происходит восстановление утраченных структур [17]. Существует три механизма формирования пула клеток-предшественников: дифференциация стволовых клеток, дедифференциация или трансдифференциация тканеспецифичных клеток [18]. При физиологической регенерации чаще всего используются тканеспецифичные стволовые клетки, число которых обычно невелико [13,19]. Виды, обладающие способностями к репаративной регенерации, либо сохраняют большое количество плюри-, мульти- и унипотентных стволовых клеток в своем теле, либо обладают большим потенциалом для дедифференцировки и трансдифференцировки [15]. Из видов, обладающих высокими способностями к восстановлению, особого внимания заслуживают иглокожие.

## 1.2. Регенерация у иглокожих

Иглокожие в плане изучения проблем регенерации представляют собой уникальную группу животных [1]. На филогенетическом дереве они вместе с полухордовыми образуют группу *Ambulacraria*, которая является сестринской для хордовых животных [20]. Иглокожие — одна из немногих групп, у которой наличие регенерации установлено еще для палеозойских представителей. Палеонтологические данные свидетельствуют, что морские лилии уже в начале палеозоя обладали способностью к восстановлению утраченных рук и чашечки [21,22].

Современные виды иглокожих составляют 5 классов: морские лилии (*Crinoidea*), морские звезды (*Asteroidea*), офиуры (*Ophiuroidea*), морские ежи

(Echinoidea) и голотурии (Holothuroidea) [23]. Все представители типа Echinodermata обладают радиальной пятилучевой симметрией, но при этом не родственны другим радиально-симметричным животным, например, кишечнополостным. Радиальная симметрия у иглокожих возникла вторично [24].

Особенностью регенерации иглокожих является то, что восстановление у них протекает без участия стволовых клеток [1]. Анализ имеющихся данных показывает, что формирование утраченных органов у этих животных происходит за счет дедифференцировки специализированных клеток оставшихся частей органов [1–3]. Основным механизмом восстановления является эпителиальный морфогенез. В некоторых случаях, когда происходит полное удаление какого-то типа клеток, регенерация осуществляется за счет трансдифференцировки [4,5,25].

Офиуры могут восстанавливать части луча, целые лучи и аборальную часть диска после аутомии или случайной утраты [26]. Морские звезды хорошо восстанавливают лучи после аутомии или искусственного удаления, а также радиальный нерв после его перерезки или удаления участка [27–29]. Морские лилии способны отращивать стебель, а также придатки (руки и циррии) после аутомии [5,30,31]. Виды *Antedon mediteranea* и *Himerometra robustipinna* (Carpenter, 1881) могут регенерировать кишечник, а у стебельчатой лилии *Metacrinus rotundus* верхняя часть стебля, включая базальные пластинки, способна регенерировать всю крону [5,25,32]. Морские ежи обладают наименьшими способностями к регенерации: они могут репарировать небольшие повреждения панциря и отращивать обломанные иглы и педицеллярии [33].

Голотурии являются наиболее интересными объектами среди иглокожих с точки зрения изучения регенерации. Они обладают уникальной способностью к аутомии внутренних органов (эвисцерации). В этой связи регенерацию у этих животных начали исследовать еще в начале 20-го века [2]. В настоящее время наиболее популярными объектами являются два вида - *Holothuria glaberrima* (Risso, 1826) и *A. japonicus*. У этих животных были изучены клеточные механизмы

регенерации пищеварительной системы и водных легких [34–36]. Кроме того, на *A. japonicus* было проведено исследование регенерации ПМЛ [6]. Еще для одного вида, *E. fraudatrix* (Dendrochirotida), был выявлен более широкий спектр восстановительных реакций. У этого животного описана регенерация практически всех систем органов - пищеварительной, амбулакральной, нервной и мышечной. В частности, у *E. fraudatrix* подробно изучены клеточные механизмы регенерации акварингеального комплекса, кишки и продольной мышечной ленты (ПМЛ) [2,7].

### 1.3. Регенерация мышц

Многие животные, как беспозвоночные, так и позвоночные, обладают способностью к регенерации сократительной системы [37]. У разных видов восстановление мышц имеет свои особенности на клеточном и молекулярном уровнях [17]. У позвоночных регенерация скелетной мускулатуры осуществляется за счет стволовых клеток - миосателитов. В ответ на повреждение они активируются, пролиферируют и сливаются с мышечными волокнами, восстанавливая их целостность [14]. Однако, некоторые виды позвоночных имеют и другие клеточные механизмы регенерации мышц. Так, у земноводных формирование мышц при регенерации ампутированной конечности происходит за счет дедифференциации многоядерных мышечных клеток, а репарация сердечной мышцы у *Danio rerio* осуществляется в результате дедифференциации кардиомиоцитов и трансдифференциации фибробластов [38–40].

Беспозвоночные также демонстрируют различные механизмы мышечной регенерации. Например, у медузы *Podocoryna carnea* при повреждении зонтика начинается дедифференциация и миграция миоцитов, которые затем заполняют место раны и редифференцируются в функциональные мышечные клетки [41]. У гидры восстановление мускулатуры происходит за счет стволовых клеток [42,43]. У ланцетника *Branchiostoma belcheri* хвостовые мышцы восстанавливаются в

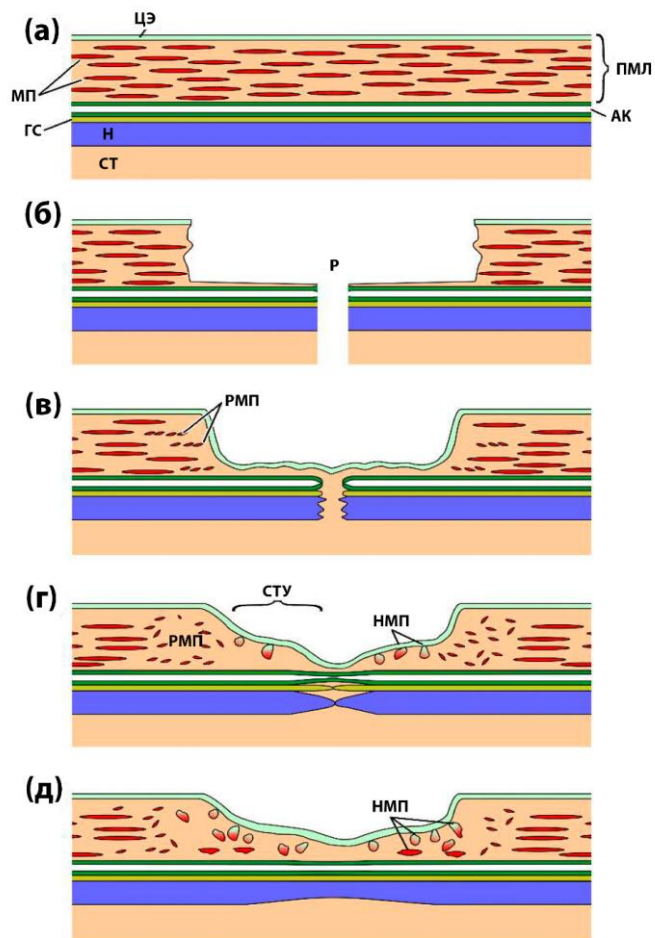
результате дедифференциации сохранившихся миоцитов, а мускулатура ротовых усиков – за счет стволовых клеток [43].

#### **1.4. Строение, развитие и регенерация ПМЛ у голотурии *E. fraudatrix***

Строение сократительной системы у разных классов иглокожих изучено достаточно подробно. По аналогии с позвоночными ее условно можно разделить на соматическую и висцеральную мускулатуру. Основу сократительной системы иглокожих составляют гладкие мышцы [44]. Висцеральная мускулатура представлена миоэпителиальными клетками целомического эпителия внутренних органов, а соматическая – более крупными обособленными структурами [44]. К последним относятся различные мышцы протракторы и ретракторы морских ежей и голотурий [45,46], мышечные пучки, соединяющие сегменты лучей морских лилий и офиур, а также ПМЛ голотурий [47,48].

ПМЛ являются наиболее крупными мышечными структурами у голотурий. Они располагаются вдоль радиусов тела или амбулакров. Амбулакры также включают в себя и другие продольные структуры: радиальный нервный тяж, гемальный сосуд и радиальный амбулакральный канал (Рисунок 1а).

Со стороны целома ПМЛ *E. fraudatrix* покрыты целомическим эпителием, а внутренняя область состоит из отдельных пучков гладкомышечных волокон, окруженных внеклеточным матриксом. Каждый такой пучок образован несколькими миоцитами (обычно 8-20), окруженными базальной мембраной (Рисунок 2) [2]. По существу, мышечный пучок представляет собой миоэпителий, свернутый в трубку и не сильно отличается организацией от висцеральной мускулатуры [44,49]. Такое строение указывает на эпителиальное происхождение соматической мускулатуры иглокожих. Перитонеоциты, миоэпителиальные клетки и миоциты являются последовательными стадиями специализации клеток целомического эпителия [50].

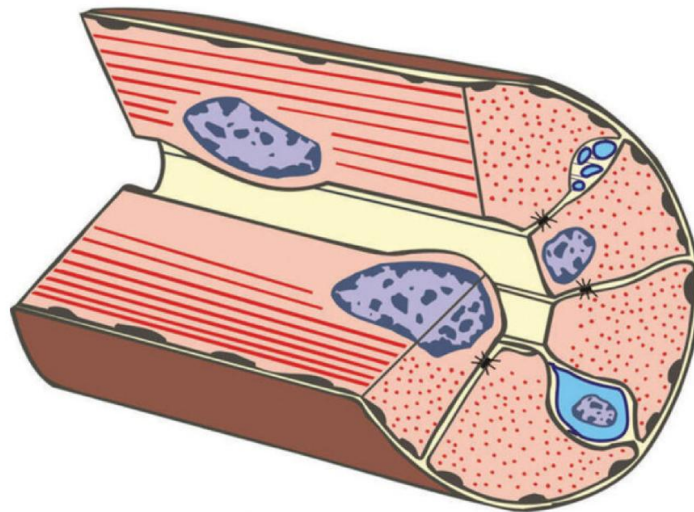


**Рисунок 1.** Схема продольного среза амбулакра голотурии *E. fraudatrix* в норме и на разных стадиях после поперечного разреза (по: [171], с изменениями). (а) Неповрежденный амбулакр. (б) Амбулакр сразу после повреждения. (в) Амбулакр через 2–4 сут после повреждения. (г) Амбулакр через 10 сут после повреждения. (д) Амбулакр через 20 сут после повреждения. АК – радиальный амбулакральный канал; ГС – гемальный сосуд; МП – мышечный пучок; Н – радиальный нервный тяж; НМП – новые мышечные пучки; ПМЛ – продольная мышечная лента; Р – рана; РМП – разрушенные мышечные пучки; СТ – соединительная ткань; СТУ – соединительнотканное утолщение (зачаток); ЦЭ – целомический эпителий.

Формирование ПМЛ у голотурий происходит только после метаморфоза [49]. Вначале клетки целомического эпителия, расположенные над радиальным амбулакральным каналом, трансформируются в миоэпителиальные клетки. Затем они отделяется от целома отростками перитонеоцитов. Далее вокруг миоэпителиальных клеток начинает синтезироваться внеклеточный матрикс,



который разделяет единый пласт клеток на отдельные группы, дающие в последующем, начало мышечным пучкам [2,50].



**Рисунок 2.** Строение мышечного пучка ПМЛ у голотурий (по: [44]). На схеме обозначены миоциты (розовым цветом), базальная мембрана (темно-коричневым цветом), миофиламенты (красные точки и линии), клеточные ядра (фиолетовым цветом), а также тела нейронов и их отростки (синим цветом).

При регенерации ПМЛ используются сходные клеточные механизмы. Новые миоциты формируются за счет миогенной трансформации клеток целомического эпителия [6,7,44]. Регенерация ПМЛ после поперечного разрезания у *E. fraudatrix* занимает 30-40 суток. Сразу после повреждения концы перерезанной ПМЛ сокращаются и расходятся на расстояние 1-1,5 мм друг от друга (Рисунок 1б). В первые 2-4 сут после повреждения (спп) происходит заживление раны (Рисунок 1в). Через 3-5 спп клетки целомического эпителия ПМЛ и интеррадиусов в районе раны начинают дедифференцироваться и мигрировать в очаг повреждения. Через 7-10 спп на концах мышцы происходит образование внеклеточного матрикса, в результате чего возникают растущие во встречном направлении соединительнотканые зачатки (Рисунок 1г). В их формировании большую роль играют различные протеиназы, в частности ММР [51]. Их ингибирование приводит к полной остановке регенерации

ПМЛ [9]. В это же время начинается миогенная дифференцировка клеток целомического эпителия. В их цитоплазме выявляются небольшие пучки миофиламентов. Группы таких миогенных клеток погружаются во внеклеточный матрикс зачатков мышцы. По мере погружения миогенные клетки дифференцируются в миоциты и формируют мышечные пучки. Через 15-20 спп растущие концы ПМЛ соединяются (Рисунок 1д). При этом продолжаются образование соединительной ткани, миогенная трансформация клеток целомического эпителия, их погружение и формирование мышечных пучков. Через 30-40 спп целостность ПМЛ полностью восстанавливается.

### **1.5. Молекулярные механизмы регенерации мышц**

Молекулярно-генетические механизмы лежат в основе любых морфогенезов, в том числе и регенерации, поэтому их изучение дает более глубокое понимание функционирования восстановительных процессов. Основными участниками таких молекулярных взаимодействий являются транскрипционные факторы (ТФ), активирующие или репрессирующие работу генов, сигнальные пути, участвующие в передачи информации внутри и между клетками, структурные белки (в миогенезах это, в основном мышечный миозин, актин и белки внеклеточного матрикса (ВКМ)), а также регуляторы структурных белков, такие как матриксные ММП.

ТФ являются важнейшими регуляторами экспрессии генов. Эти белки являются неотъемлемой частью работы генетического аппарата. ТФ выступают в качестве репрессоров или активаторов, понижая или повышая константу связывания РНК-полимеразы с регуляторными последовательностями гена-мишени и, тем самым, изменяя его экспрессию [52,53]. ТФ различают по механизму действия, регуляторной функции, а также по наличию ДНК-связывающих белковых мотивов, таких как leucine zipper, helix-turn-helix, helix-loop-helix, zink finger и другие [54]. Они могут действовать отдельно или образовывать гомо- и гетеромеры с другими

белками. Формирование таких протеиновых комплексов осуществляется за счет доменов, которые отвечают за межбелковые взаимодействия. Многие ТФ играют ведущую роль в развитии, их активность управляет такими процессами, как клеточная пролиферация, дифференциацией, миграция и т. д. [55].

В регенерации мышц позвоночных набор главных регуляторов довольно консервативен. В основном, это белки семейств MRF (Myogenic factor 5 (*Myf5*), Myogenic Differentiation (*MYOD*), *myogenin* и *MRF4*), *paired box* (*Pax7*, *Pax3*) [56] и ряд других. Среди первичноротых, в целом, слабо изученных в этом отношении, имеются данные по планариям, у которых задействуется похожая комбинация – *MYOD*, *pkx1-1*, *PAX3/7*, *NOX* и др. [57–59]. Активность MRF и *PAX3/7* также была найдена и у низших хордовых животных, таких как оболочники и ланцетник [43].

ТФ семейства MRF играют ключевую роль в миогенезе позвоночных [60]. Данное семейство ТФ состоит из четырех генов – *MYOD*, *Myf5*, *Myogenin* (*MyoG*) и *MRF4*. У беспозвоночных в настоящее время обнаружены ортологи только одного представителя MRF – *MYOD* [61–64]. Предполагается, что у последнего общего предка всех Chordata имелся только один ген этого семейства [65]. Соответственно, эволюция MRF у вторичноротых животных происходила, вероятно, независимо в разных типах как Chordata, так и Ambulacraria.

Гены семейства MRF кодируют транскрипционные факторы, относящиеся к классу II суперсемейства basic helix-loop-helix (bHLH). Их функция заключается в регуляции пролиферации, выводе клеток-предшественников из клеточного цикла, дифференциации и формировании фенотипа миоцита скелетных мышц. Все гены семейства MRF имеют сходное строение и включают участки, кодирующие N-концевой трансактивационный домен (N-TAD) с участком, богатым цистеином/гистидином, центральный участок с мотивом bHLH, включающий два домена, basic myogenic и helix-loop-helix (HLH), а также C-концевой трансактивационный домен *Myf5*, который содержит Helix III [66]. Домены HLH и basic myogenic отвечают за гетеродимеризацию с белками другого семейства bHLH –

Е-протеинами. Образующийся комплекс способен связываться с последовательностью CANNTG в регуляторных участках целевых генов [67]. N- и C-концевые трансактивационные домены важны для дополнительной регуляции функций MRF [68,69]. В отличие от высококонсервативных доменов HLH и basic myogenic, N- и C-концевые последовательности достаточно вариабельны и различаются у белков разных семейств MRF [70].

Высокая гомология участков *bHLH* всех членов семейства MRF указывает на их функциональную схожесть, в то время как различия в других доменах обуславливают наличие у отдельных белков MRF специализированных функций [71]. Например, Myf5 и MYOD не только запускают транскрипцию, но и могут создавать открытую структуру хроматина в генах, связанных с миогенезом. Это, в свою очередь, позволяет белку MyoG регулировать транскрипцию этих генов [67]. Помимо развития мышц, белки семейства MRF также играют ключевую роль в их регенерации [72–76]. На сегодняшний день нет данных об участии MRF в регенерации у иглокожих, однако ранее проводились исследования, показавшие, что *SUM1*, ортолог *MYOD* морского ежа, способен запускать трансдифференциацию фибробластов в миоциты у млекопитающих [61].

О молекулярных механизмах регенерации мышц у иглокожих на сегодняшний день известно мало. Секвенирование транскриптомов офиуры *Ophionotus victoriae* указывает на возможное участие ТФ, таких как HOX и SOX в регенерации лучей после ампутации [77]. Транскриптомные исследования регенерации кишки у голотурий *E. fraudatrix* и *H. glaberrima* показали изменение уровней экспрессии генов, связанных с миогенезом: *Mybbp1a*, *EGR1*, *MKX*, *KLF13*, *SOX4*, *MYC*, *SNAI2*, *MSC*, *ID* и *TBX20* [10,78]. Поскольку кишка включает в себя мышечную ткань, которая регенерирует за счет клеток целомического эпителия, полученные результаты могут быть связаны и с регенерацией мышц.

Другое исследование заключалось в сравнительном анализе транскриптомов стенки тела (включая ПМЛ) голотурии *Cladolabes schmeltzii* (Ludwig, 1875) в норме

и при делении особей [79]. Ввиду того, что стенка тела голотурии была вырезана во время ее сокращения при бесполом размножении, но до разделения на две части и разрыва ПМЛ, участие найденных ТФ в регенерации этой структуры находится под вопросом и нуждается в уточнении. Однако, некоторые из них все же заслуживают внимания, поскольку задействованы в регенерации мышц у позвоночных. Было показано увеличение экспрессии ряда ТФ, таких как *Cs-RUNX*, *Cs-ZEB1/2*, *Cs-RARb*, *Cs-SOX9*, *Cs-SOXD1*.

ТФ Runt-related transcription factors (RUNX) обнаружены у всех Metazoa и играют важную роль в развитии множества клеток и тканей, онкогенезе, а также в регуляции работы иммунной системы [80,81]. Столь разнообразные функции обеспечиваются альтернативным сплайсингом транскриптов RUNX, а также широким репертуаром пост-трансляционных модификаций [81]. Гены RUNX позвоночных имеют два альтернативных промотора (дистальный и проксимальный), которые дают отличающиеся по размеру изоформы белков: дистальные длиннее и начинаются с аминокислотной последовательности MAS(D/N)S, а проксимальные - с мотива MRIPV [80]. Позвоночные имеют 3 белка данного семейства: RUNX1, RUNX2, RUNX3, включающие в себя несколько общих консервативных участков. Расположенный ближе к N-концу высоко консервативный Runt homology domain (RD) распознает специфическую последовательность ДНК “PyGPyGGTPy”, а также участвует в белок-белковых взаимодействиях [82,83]. Домены nuclear localization signal (NLS) и nuclear matrix targeting sequence (NMTS) обеспечивают ядерную и субъядерную локализацию белков RUNX [84]. На C-конце присутствуют менее консервативные последовательности: трансактивационный и ингибиторный домены, а также мотив, состоящий из пяти аминокислот и предназначенный для связывания ко-репрессоров Groucho/TLE [85]. Помимо общих для всего семейства аминокислотных участков, есть также один уникальный для RUNX2 богатый глутамином и аланином N-концевой трансактивационный домен [86]. Несмотря на то, что у позвоночных RUNX1 не экспрессируется в развивающихся или взрослых

мышечных тканях, он показывает большую активность в мышцах в ответ на их повреждение и совместно с MYOD и AP-1 способствует пролиферации миобластов [87].

Семейство ТФ Zinc-finger E homeobox-binding (ZEB), включает в себя *ZEB1* и *ZEB2*. Доменная организация ZEB достаточно сложная и включает в себя множество консервативных структур. На N и C-концах расположены кластеры zinc finger, необходимые для связывания с последовательностями ДНК E-box (5'-CANNTG). Аминокислотные последовательности *ZEB1* и *ZEB2* максимально сходны именно в этих участках. По другим доменам наблюдается меньшее совпадение – они несут более специфичные функции и отвечают за белок-белковые взаимодействия [88,89]. ZEB, по большей части, являются репрессорами транскрипции за счет привлечения корепрессоров или комплексов гистон-деацетилаз, делающих хроматин менее доступным [90], но также могут выступать и транскрипционными активаторами. Например, *ZEB1*, взаимодействуя с SRF и SMAD3, индуцирует дифференциацию гладких мышечных клеток [91]. ТФ ZEB запускают эпителио-мезенхимный переход (за счет репрессии эпителиальных генов), а также выполняют функцию поддержания свойств стволовых клеток и предотвращают апоптоз [92,93]. ZEB необходимы для полноценной регенерации мышц у позвоночных. *ZEB1* поддерживает состояние покоя миогенных предшественников, предотвращая их преждевременную активацию после повреждения, а также регулирует уровень воспаления, ингибируя опосредованную хемокином CCL2 инфильтрацию поврежденных мышц макрофагами [94]. *ZEB2* несет иную функцию, вызывая миогенную дифференцировку у плюрипотентных стволовых клеток и миосателлитов [95].

Retinoic acid receptors (RAR) относятся к ядерным ТФ [96]. Позвоночные имеют три гена RAR (*RARA*, *RARB*, *RARG*), в то время как у оболочников, бесчерепных и иглокожих был обнаружен только один ген [97]. RAR является компонентом сигнального пути ретиноевой кислоты (RA), который играет важную роль в дифференциации, пролиферации и апоптозе клеток [98,99]. Молекула RAR

включает 3 домена. На N-конце располагается неконсервативный N-terminal domain (NTD). В центральной области имеется DNA-binding domain (DBD), а в C-концевой области - ligand-binding domain (LBD) [100]. LBD, помимо связывания ретиноидов, также отвечает за гетеродимеризацию с retinoid x receptor (RXR). RAR/RXR связывается с последовательностями RA response element, расположенными в промоторах генов-мишеней [101]. После присоединения лиганда конформационные изменения LBD приводят к высвобождению ассоциированных с RAR комплексов белков, которые удерживают хроматин в конденсированном состоянии и, тем самым препятствуют инициации транскрипции [99].

При регенерации мышц у позвоночных сигнальный путь RA регулирует пролиферацию, дифференциацию и апоптоз не-мышечных клеток – фибро-адипогенных предшественников [102]. На ранних стадиях фибро-адипогенные предшественники пролиферируют и выделяют ряд трофических факторов, способствующих миогенезу, однако, далее на стадии ремоделирования, когда их присутствие и дальнейшая дифференциация может привести к фиброзу и оссификации (что способствует дегенерации мышц), они подвергаются апоптозу [102–104]. Участие RA в регенерации было показано и у голотурий. Фармакологические исследования показали, что блокирование RAR снижает пролиферацию и дифференциацию клеток целомического эпителия, а также нарушает процессы ремоделирования ВКМ [105].

Семейство ТФ SRY-related HMG-box (SOX), относится к суперсемейству high mobility group box (HMG-box). Оно насчитывает 20 белков, входящих в 9 подсемейств или групп [106,107]. Гены, кодирующие SOX, обнаружены у всех Metazoa [108]. У всех представителей семейства SOX имеется домен HMG, обуславливающий их основную функцию. Он распознает участок C[A/T]TTG[T/A][T/A] в малой бороздке ДНК, связывается с ним, изменяет пространственную структуру ДНК и, тем самым способствует присоединению других факторов и изменению экспрессии генов-мишеней [109]. Представители всех

групп сходны между собой по домену HMG, в то время как белки внутри группы гомологичны еще и по другим участкам, выполняющих разные функции [108]. Так, группа SOXB2 отличается наличием трансрепрессивного домена, когда все остальные имеют трансактивационный домен, за исключением SOXD, где отсутствуют оба, но присутствует домен coiled-coil для димеризации с другими белками SOXD [110]. Важно отметить, что регулятивная активность SOX возможна только совместно с ТФ-партнерами, которые специфичны для каждой группы [107]. Результатом таких взаимодействий является широкий спектр эффектов в различных тканях, таких как спецификация клеток-предшественников, терминальная дифференциация множества типов клеток, а также регуляция пролиферации [111]. В регенерации скелетных мышц у позвоночных SOX15 способствует дифференциации миосателлитов [112], в то время как SOX17 влияет на их самообновление, а дифференциацию, наоборот, ингибирует [113]. В регенерирующей кишке голотурии *E. fraudatrix* с помощью метода гибридизации *in situ* выявили экспрессию *Ef-Sox9/10* и *Ef-Sox17* в месте погружения клеток целомического эпителия и образования кишечного эпителия, что указывает на возможное участие данных ТФ в трансдифференциации [114].

В изучении регенерации большой интерес представляют гены НОХ, поскольку они управляют морфогенезом на раннем этапе эмбрионального развития. Несмотря на то, что убедительные данные об участии НОХ в регенерации мышц отсутствуют, известно, что они вовлечены в миогенные процессы во время эмбрионального развития позвоночных и насекомых [115]. Гены НОХ являются подсемейством гомеобоксных генов и присутствуют у всех билатеральных животных, а также у Cnidaria [116,117]. У большинства видов они расположены кластерами на хромосомах, что отражает основную функцию их продуктов – последовательную спецификацию сегментов вдоль переднезадней оси тела в развитии [118]. Также белки НОХ вовлечены в регуляцию множества клеточных процессов, таких как апоптоз, пролиферация, миграция и дифференциация [119]. ТФ НОХ имеют



консервативный гомеодомен, который содержит мотив helix-turn-helix, отвечающий за распознавание и связывание консенсусной последовательности ДНК [117]. У иглокожих проводились исследования экспрессии генов HOX, показавшие повышение их транскриптов во время регенерации различных структур: кишки у *H. glaberrima* и радиального нерва у *Asterias rubens* [120,121].

### 1.6. Матриксные металлопротеиназы в регенерации мышц

Основная роль MMP заключается в ремоделировании ВКМ за счет деградации его белков [122,123]. При повреждениях мышц позвоночных MMP препятствуют фиброзу тканей в результате разрушения коллагена и, тем самым способствуя миграции миобластов [123–125].

У позвоночных мультигенное семейство MMP включает в себя до 24 белков и входит в состав суперсемейства протеаз metzincin. Общая доменная структура MMP включает в себя N-концевой сигнальный пептид, за которым следуют пропептидный домен, протеогликан-связывающий домен (PGBD), цистеиновый переключатель (cysteine switch) и каталитический домен. На C-конце молекулы имеется переменное число гомопексин-подобных повторов (за исключением MMP7 и MMP26) [126]. Пропептид поддерживает неактивное состояние. Каталитический домен MMP содержит характерный для данного класса протеаз цинк-связывающий мотив HEXHXXGXXH и отвечает за деградацию белков [127].

Помимо основных доменов, у разных членов подсемейства присутствуют и другие специфичные структуры: мотивы фибронектина II типа, распознавания фурина, трансмембранный/цитоплазматический домены и пр. [126].

Функции и роль MMP в регенерации и иглокожих четко не установлены. Тем не менее, было показано, что ряд MMP экспрессируется у голотурий при регенерации и бесполом размножении [79,128]. Ингибитор MMP (GM60001) полностью блокирует регенерацию ПМЛ и других структур амбулакра у *E. fraudatrix*

[9]. Все эти результаты указывают на важную роль MMP в морфогенезах у иглокожих.

Таким образом, на сегодняшний день молекулярные механизмы регенерации мышц у голотурий не изучены, в том числе отсутствуют данные о генах и белках, которые могут быть связаны с этим процессом.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Сбор и содержание животных

Взрослые особи голотурии *E. fraudatrix* были собраны в заливе Петра Великого Японского моря и далее в течение одной недели содержались в аквариумах объемом 3м<sup>3</sup> с аэрируемой морской водой температурой 16-18 °С. Затем животным ножницами перерезали правый дорзальный амбулакр примерно в середине тела. Прооперированные голотурии помещались обратно в аквариумы с аэрируемой морской водой температурой 16-18 °С, где и происходила регенерация поврежденных структур.

### 2.2. Взятие образцов ткани, выделение и очистка РНК

Поперечное рассечение амбулакра производилось хирургическими ножницами. Для анализа у регенерирующих особей брали небольшой участок отделенного от стенки тела амбулакра (радиальный нервный тяж, гемальный сосуд, амбулакральный канал и ПМЛ) через 10-е (первая стадия регенерации) и 20-е (вторая стадия регенерации) спп. В качестве контроля (норма) брали участок амбулакра в средней части тела у интактных особей.

Для секвенирования транскриптома на каждую стадию было отобрано по девять особей. Каждая стадия была представлена тремя повторами, а каждый повтор объединял в себе материал трех особей. Таким же образом отбирали животных для кПЦР. Поскольку толщина срезов 20 мкм позволяет с одного амбулакра получить материал на несколько опытов, для гибридизации *in situ* на срезах (SISH) на каждой стадии регенерации для всех генов использовали срезы, полученные с амбулакров нескольких особей. Каждая стадия представлена тремя повторами.

Перед выделением тотальной РНК ткань помещали в стерильную морскую воду. Тотальную РНК выделяли с использованием фенол-хлороформной экстракции, основываясь на протоколе ExtractRNA (Евроген, Россия). Гомогенизацию проводили в 1мл среды ExtractRNA (Евроген, Россия) с пятью металлическими шариками на гомогенизаторе TissueLyser LT (Quagen, Германия) в течение 10 мин на максимальной скорости. Далее к лизату добавляли 100 мкл 1-бром-3-хлорпропана, перемешивали на вортексе и инкубировали 10 мин при комнатной температуре на шейкере при 90 оборотах в мин. Далее, полученную суспензию центрифугировали при 4 °С с ускорением 12000 g в течение 15 мин. После этого отбирали верхнюю водную фазу, помещали в новую пробирку объемом 1,5 мл и добавляли 600 мкл 100% изопропанола. Содержимое перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Затем образец центрифугировали при 12000 g 10 мин, после чего удаляли супернатант, добавляли 1 мл 70% этанола и снова центрифугировали при тех же условиях. После удаления супернатанта осадок сушили при комнатной температуре до исчезновения следов жидкости в пробирке и с последующим растворением осадка в 50 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз. Выделенная РНК была обработана ДНКазой I (Thermo Scientific, США) при 37 °С в течение 20 мин и почищена на спин-колонках CleanRNA Standard (Евроген, Россия).

РНК, предназначенную для секвенирования транскриптомов, дополнительно очищали с помощью магнитных шариков Dynabeads Oligo(dT)25 (Thermo Fisher Scientific, США) для получения Поли-А РНК фракции.

### **2.3. Секвенирование поли-А РНК**

Библиотеки были подготовленные с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB, Великобритания). Были отобраны фрагменты длиной 300–500 нуклеотидов, включая адаптеры. После проверки качества на

TapeStation 4200 (Agilent, США) было выполнено парное секвенирование ( $2 \times 100$ ) на секвенаторе NovaSeq 6000 (Illumina, США) компанией Генетико (Россия). Необработанные риды были загружены в базу данных SRA NCBI с регистрационными номерами от SRR16928147 до SRR16928155 для нормальной мышцы и двух стадий регенерации.

#### 2.4. Сборка транскриптома *de novo*

Необработанные риды из девяти библиотек, полученные в формате FASTQ, были обработаны с использованием программного обеспечения Trimmomatic 0.3966 с параметрами «LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:5:20 AVGQUAL:25 MINLEN:25» для достижения чистых ридов, удалением адаптерных последовательностей, последовательностей поли-N или низкокачественных оснований. Затем чистые риды были классифицированы с использованием программного обеспечения Kraken 2.1.2 с пользовательской базой данных, содержащей последовательности архей, бактерий, вирусов, плазмид, человека, UniVec Core, простейших, грибов и рРНК из SILVA v138.1 и рРНК голотурий из NCBI (последовательности были загружены 23.06.2021). Пороговое значение достоверности было получено с использованием ряда значений от 0,0 до 0,8 и построения графика количества прочтений на уникальный ранг таксономии. Все неклассифицированные парные прочтения были собраны с использованием программного обеспечения SPAdes 3.15.1 [129] с длиной k-mer 33 и 49. Впоследствии полученные последовательности были обработаны и собраны с помощью скрипта HomoloCAP, как описано в статье Vouko et al. [130]. Полученные последовательности были отфильтрованы в соответствии с требованиями NCBI и загружены в базу данных TSA NCBI с индексом GHCL00000000. Полноту транскриптома оценивали с использованием BUSCO 5.2.1 [131] в режиме «protein» с набором данных Metazoa 10.

## 2.5. Анализ дифференциальной экспрессии генов

Чтобы найти дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ), количество сопоставленных прочтений было рассчитано в программе RSEM 1.3.1 [132]; риды с парными концами были выровнены в программе Bowtie 2.4.4 [133] с параметрами: «--nofw --no-mixed --no-discordant --no-contains --gbar 1000 -N 1 --end-to-end -k 20 -q --maxins 1000». После фильтрации генов со значением CPM менее 0,5 по крайней мере в двух повторах, дифференциальная экспрессия для последовательностей была оценена в программном обеспечении DESeq2 1.28.1 [134]. Контрольным образцом выступала интактная мышца. Актуальными считали ДЭГ, уровень экспрессии которых в пробе был в два раза выше, чем в контроле, а скорректированное значение  $p$  было меньше 0,05.

## 2.6. Аннотация белок-кодирующих последовательностей транскриптома

Аннотирование проводилось по нескольким белковым базам данных со стандартным значением  $e$  для BLASTP 2.12.0, которое составляло  $1e-5$ . Базовая аннотация взята из базы данных NR NCBI (19.12.21); аннотацию для анализа обогащения выполняли поиском BLASTP по белкам человека из базы данных Ensemble v105 [135]; аннотация для поиска факторов транскрипции была основана на белках человека из Ensemble и белках морского ежа из проекта Echinobase [136]. Ортологи человеческих белков идентифицировали с помощью пользовательского скрипта Python, который реализует модифицированный метод взаимного поиска лучшего совпадения, как описано в статье Boyko et al. [10]. Список ТФ человека был взят из базы данных «The Human Transcription Factors» версии 1.01. Список ТФ морских ежей взят из Echinobase (02.12.21). Анализ сверхпредставленности биологических процессов и путей был выполнен с помощью программного обеспечения GSEA 4.1 [137] в соответствии с протоколом EnrichmentMap для

данных РНК-секвенирования [138]. Наборы генов для биологических процессов и путей были получены из базы данных MsigDB v7.4 [137]. Затем результаты анализа обогащения были визуализированы с использованием плагинов EnrichmentMap в программе Cytoscape 3.9 [139].

## 2.7. Анализ последовательностей

Для анализа были использованы геномы морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857) (PRJNA13728), *Eucidaris tribuloides* (Lamarck, 1816) (PRJNA63057) и *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (PRJNA657258), морских звезд *Patiria miniata* (Brandt, 1835) (PRJNA683060), *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758) (PRJNA397419) и *Asterias rubens* (Linnaeus, 1758), (PRJNA626669), голотурий *A. japonicus* (PRJNA354676) и *Apostichopus parvimensis* (Clark, 1913) (PRJNA182998), морской лилии *Anneissia japonica* (Müller, 1841) (PRJNA615663), а также человека *Homo sapiens* (Linnaeus, 1758) (PRJNA168), лягушки *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (PRJNA338693), рыбы *D. rerio* (PRJNA13922), ланцетника *B. belcheri* (Gray, 1847) (PRJNA12118), асцидии *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) (PRJNA187185), полухордового *Saccoglossus kowalevskii* (Agassiz, 1873) (PRJNA42857) и насекомого *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (PRJNA164). Помимо геномов, были использованы транскриптомы: кишки морской лилии *H. robustipinna* (Долматов и др., 2014) и голотурии *E. fraudatrix* [10], амбулакров и целомического эпителия голотурий *C. schmeltzii* (Ludwig, 1875) [79] и *H. glaberrima* (PRJNA158511), а также яйцеклеток голотурии *Sclerodactyla briareus* (Lesueur, 1824) (PRJNA236087) и морской звезды *Henricia sp.* (PRJNA236087).

Поиск последовательностей производился в программе Ugene, а также по базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) алгоритмами blastp, tblastx, blastn. Для определения рамок считывания использовали blastx. Окончательную сборку контигов, определение и выравнивание предполагаемых аминокислотных

последовательностей производили в программе Mega X с использованием алгоритма Muscle. Для сравнительного анализа гомологии белков MRF позвоночных и предполагаемых аминокислотных последовательностей найденных транскриптов у иглокожих, дополнительно были использованы аминокислотные последовательности различных белков *B. belcheri* и *S. kowalevskii*, которые входят в суперсемейство bHLH, но при этом не являются MRF. Сравнение выполняли инструментом blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Структура доменов была выявлена с помощью онлайн сервисов Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), Blast NCBI, и программы Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Кроме того, для более точно определения наличия сигнальных пептидов и трансмембранных доменов в молекулах белков MMP использовались онлайн сервисы SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) и Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/index.html>).

## 2.8. Построение филогенетических деревьев

Для построения филогенетических деревьев были использованы консервативные участки предполагаемых аминокислотных последовательностей, полученных из нуклеотидных последовательностей геномов и транскриптомов позвоночных, иглокожих и ряда других беспозвоночных. Определение консервативных участков предполагаемых аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы Gblocks (0.91b).

Построение филогенетических деревьев MMP и MRF осуществлялось алгоритмом RAxML-HPC BlackBox (8.2.12) онлайн сервиса CIPRES (<http://www.phylo.org>); деревья TF HOX5, ZNF318, RARB, SOX17, RUNX1 и ZEB2 сгенерированы в программе Mega11 алгоритмом Maximum Likelihood. Визуализация деревьев осуществлялась при помощи онлайн сервиса iTOL (<https://itol.embl.de>).



На построенных филогенетических деревьях методом RAxML-HPG BlackBox уровни поддержки (bootstrap support levels) в ключевых для данного исследования узлах достаточно высокая (88-100). Деревья, построенные с помощью RAxML-HPG BlackBox, имеют укоренения на внешнюю группу (консервативные участки белков *D. melanogaster*). У деревьев, сгенерированных в программе Mega11 алгоритмом Maximum Likelihood, укоренение отсутствует.

## 2.9. Разработка праймеров для кПЦР и клонирования

Для подбора праймеров брали последовательности транскриптов изучаемых генов, полученных при сборке транскриптома ПМЛ *E. fraudatrix* (*Ef-HOX5*, *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, *Ef-MYOD1*, *Ef-MYOD3*, *Ef-MMP16.2*, *Ef-MMP24.1* и *Ef-МҮН6* (*myosin 6 heavy chain*)), а также генов *Ef-GAPDH* и *Ef-efla*, используемых в качестве референсов для кПЦР, а также *Ef-18s* рибосомальной РНК для синтеза контрольного зонда. Поиск и подбор праймеров проводили с помощью веб сервиса PrimerQuest Tool (IDT, США) используя параметры: длина ампликона для кПЦР и клонирования – 150-200 и 300-900 нуклеотидов соответственно, содержание GC – 45-60, длина праймера 19-25 нуклеотидов, температура плавления 61-62 °С. Последовательности полученных праймеров указаны в Приложениях 1 и 2.

## 2.10. кПЦР

Обратную транскрипцию РНК проводили поли-dT праймерами, как описано в протоколе набора MMLV RT (Евроген, Россия). Эффективность праймеров оценивали в программе CFX Manager v3.1 с использованием десяти серийных разведений (1:2) объединенной из всех образцов кДНК (Bio-Rad, США). qPCR осуществляли с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по

протоколу производителя на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). qPCR проводили на трех независимых образцах РНК для каждого срока. Каждый образец анализировали два раза, следя за тем, чтобы разница между техническими повторами была менее 0,5 Ct. Образцы интактной мышцы использовали в качестве контрольного образца. Все значения экспрессии были нормализованы относительно среднего арифметического Ct генов *Ef-GAPDH* и *Ef-EF1a*. Для оценки экспрессии использовали метод  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Статистическую достоверность результатов оценивали с помощью непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA).

### 2.11. Синтез РНК зондов

С кДНК амбулакра были амплифицированы фрагменты генов *Ef-HOX5*, *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, *Ef-MYOD3*, *Ef-MMP16.2*, *Ef-MMP24.1*, а также последовательности *Ef-18s* РНК. Размеры ампликонов составили 300-900 нуклеотидов. Полученные фрагменты ДНК были отчищены на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Далее ампликоны были лигированы в вектор pAL2-T (Евроген, Россия) и трансформированы в компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue (Евроген, Россия) путем электропорации. Трансформированные клетки культивировались при 37°C в течение ночи в чашках Петри с агаром Luria-Bertani, содержащим 100 мкг/мл ампицилина, 50 мкМ IPTG и 40 мкг/мл x-GAL. Для подтверждения вставки должной длины в белых клонах использовали ПЦР с двумя праймерами M13 F (5'-GTTGTAACGACGGCCAGT-3') и M13 R (5'-CACAGGAAACAGCTATGACC-3'), а также с двумя ген-специфичными праймерами. Отобранные белые колонии наращивали на отдельных чашках. Рекombинантные плазмиды выделяли с помощью набора реактивов GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, США). Для определения положения вставки в плазмиде проводили ПЦР, используя четыре комбинации ген-специфических и M13

праймеров. Для получения фрагментов с сайтами для посадки РНК полимеразы проводили ПЦР, в которой один праймер был ген-специфическим, а другой - M13. Проверка ампликонов проводилась секвенированием на ABI Prism 3130xL (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (Приложение 3). Для транскрипции ДНК ампликонов в РНК зонды использовали DIG-RNA-labeling mix (Roche, Швейцария), RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, США), 0.1 М DTT (Thermo Fisher Scientific, США), РНК полимеразу T7/Sp6 (Thermo Fisher Scientific, США). Инкубация проводилась в течение ночи при 37°C. Для каждого гена были синтезированы антисмысловые зонды в качестве опыта, и смысловые – в качестве контроля. Также были синтезированы зонды 18s рибосомальной РНК для положительного и отрицательного контролей. Синтезированные зонды были обработаны ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 мин и отчищены на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Зонды были разведены в буфере для гибридизации NYB (4× SSC, 50% формамид, Torula RNA (Sigma, Германия) (5 мг/мл) и гепарин (0.15 мг/мл)) до концентрации 5 нг/мл и разделены на аликвоты.

## **2.12. Фиксация тканей и приготовление замороженных срезов**

Животных предфиксировали в течение 5 мин путем введения 4% раствора формальдегида (Sigma, США) на буфере PBS (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCL, 10 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 18 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) в полость тела. Затем участок амбулакра вместе с поврежденным местом вырезали ножницами и помещали в фиксатор. Для контроля были взяты участки нормального амбулакра примерно в середине тела животного. Фиксация как опытных, так и контрольных образцов проводилась 4% формальдегидом в течение 12 ч при 4°C. Далее материал отмывали в PBS 2 раза по 5 мин, после чего хранили в метаноле при -20°C. Перед приготовлением замороженных срезов образцы последовательно держали по 5 мин в 75%, 50% и 25%

растворе метанола в PBS, и далее инкубировались в 30% сахарозе при 4 °С в течение ночи, после чего были заключены в среду Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, США). Замороженные срезы толщиной 20 мкм были изготовлены с помощью криомикротомы Thermo Scientific HM 560 CryoStar (Thermo Fisher Scientific, США). Их помещали на предметные стекла Menzel Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, США) и высушивали в течение 6 часов при 40°C.

### 2.13. Гибридизация *in situ* на срезах

За основу был взят протокол гибридизации на срезах, описанный в работе Komminoth [140]. Стекла со срезами последовательно инкубировали 2 x 5 мин в PBS, 2 x 5 мин в PBS с 100 мМ глицином, 15 мин в PBS с 0,3% Triton X-100, 2 x 5 мин в PBS, затем 30 мин обрабатывали протеиназой К (Евроген, Россия) (2,5 мкг/мл) на буфере TE (100 мМ Tris-HCl, 50 мМ EDTA, pH 8,0). Постфиксацию проводили 4% формальдегидом в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего срезы отмывали в PBS 2 x 5 мин. На этапе прегибридации срезы во влажных камерах обрабатывались раствором НУВ (50% Формамид, 25% 20xSSC, 50 мг/мл Гепарин, 10% Tween20, 50 мкг/мл РНК дрожжей Torula) при 37°C в течение 10 мин. Аликвоты разведенных в НУВ РНК зондов денатурировались в течение 10 мин при 80°C. Гибридизацию проводили в отдельных влажных камерах при 43 °С в течение ночи. На этапе постгибридации срезы отмывали на шейкере при 37°C 2 x 15 мин в буфере 2xSSCT (NaCl, 0,3 М Цитрат тринатрия, Tween 20) и 2 x 15 мин в 1xSSCT. Чтобы избавиться от одноцепочечных не связавшихся зондов, срезы обрабатывали РНКазой (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 20 мкг/мл на буфере NTE (500 мМ NaCl, 10 мМ Трис, 1 мМ EDTA) 30 мин при 37°C. От РНКазы срезы отмывали на шейкере при 37°C 2 x 30 мин в 0,1xSSCT. Далее на шейкере при комнатной температуре срезы инкубировали в буфере 1 (100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl) 2 x 10 мин и покрывали на 30 мин блокирующим раствором (буфер 1,

0,1 Triton X-100, 2% овечья сыворотка), а затем на 2 ч во влажной камере покрывали буфером 1, с 0,1 Triton X-100, 1% овечьей сывороткой и sheep anti-DIG-alkaline phosphatase [Fab fragments] (Roche, Германия) в соотношении 1:1000. Затем срезы отмывали на шейкере в буфере 1 2 x 10 мин. Для подготовки к окраске срезы инкубировали 10 мин в Staining buffer (0,1 М Tris pH 9,5; 0,1 М NaCl, 20% Tween 20, mQ). Окрашивали с помощью раствора BCIP/NBT (BCIP/NBT tablets; Roche, Германия) в течение 30 мин во влажной камере в темноте при 37°C. Окраску останавливали 4 % раствором PFA и отмывали срезы дистиллированной водой.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Анализ мультигенного семейства MRF у иглокожих

В результате поиска в геномах и транскриптомах иглокожих генов, входящих в семейство MRF, ни у одного из исследуемых видов нами не были обнаружены гомологи генов *Myf5*, *MyoG* и *MRF4*. В то же время были найдены гомологи *MYOD*. У разных видов иглокожих число ортологов *MYOD* различается и варьирует от одного до трех.

Анализ геномов морских звезд *P. miniata* и *A. planci*, голотурий *A. japonicus* и *A. parvimensis*, морского ежа *E. tribuloides* и морской лилии *A. japonica* показал наличие у этих видов гена *MYOD1*. *MYOD1* *A. planci*, *A. japonicus* и *A. japonica* кодирует белок, который содержит 4 домена: N-TAD, basic myogenic, HLH и Myf5. В то же время как *MYOD1* *P. miniata*, *E. tribuloides* и *A. parvimensis* содержит только информацию о доменах N-TAD, basic myogenic и HLH.

Транскрипты *MYOD1* с полными рамками считывания были найдены в транскриптомах голотурий *E. fraudatrix* и *H. glaberrima*, а также у морской лилии *H. robustipinna*. При этом транскрипты *E. fraudatrix* и *H. glaberrima* содержат участки, кодирующие все четыре домена белка MYOD1, а у *H. robustipinna* Myf5 отсутствует. В транскриптом голотурии *C. schmeltzii* был обнаружен транскрипт *MYOD1* с неполной рамкой считывания, имеющий участки, кодирующие все четыре домена. В транскриптомах голотурии *S. briareus* и морской звезды *Henricia sp.* продукты этого гена не были обнаружены. Наличие у представителей иглокожих генов *MYOD1*, а также домен-кодирующих участков белков MYOD1 представлено в Таблице 1.

**Таблица 1.** Наличие гена *MYOD1* и доменная структура MYOD1 у представителей разных классов иглокожих

Класс	Вид	Домен			
		N-TAD	Basic	HLH	Myf5
Голотурии	<i>A. japonicus</i>	+	+	+	+
	<i>C. schmeltzii</i>	+	+	+	+
	<i>E. fraudatrix</i>	+	+	+	+
	<i>H. glaberrima</i>	+	+	+	+
	<i>A. parvimensis</i>	+	+	+	-
	<i>S. briareus</i>	Транскрипт не обнаружен			
Морские ежи	<i>E. tribuloides</i>	+	+	+	-
	<i>L. variegatus</i>	+	+	+	+
	<i>S. purpuratus</i>	+	+	+	+
Морские звезды	<i>A. planci</i>	+	+	+	+
	<i>Henricia sp.</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>P. miniata</i>	+	+	+	-
Морские лилии	<i>A. japonica</i>	+	+	+	+
	<i>H. robustipinna</i>	+	+	+	-

В геномах морских ежей *L. variegatus*, *E. tribuloides*, морской звезды *A. planci* и морской лилии *A. japonica* был обнаружен ген *MYOD2*. Он кодирует белок с доменами N-TAD, basic myogenic и HLH. В геномах голотурий *A. parvimensis*, *A. japonicus* и морской звезды *P. miniata* этот ген отсутствует.

Дополнительно в транскриптоме морской звезды *Henricia sp.* был выявлен транскрипт *MYOD2* с полной рамкой считывания. Он содержит участки, кодирующие домены N-TAD, basic myogenic и HLH. В транскриптомах остальных исследованных видов иглокожих продукты *MYOD2* отсутствуют. Наличие среди представителей иглокожих генов *MYOD2*, а также домен-кодирующих участков белков MYOD2 представлено в Таблице 2.

**Таблица 2.** Наличие гена *MYOD2* и доменная структура *MYOD2* у представителей разных классов иглокожих

Класс	Вид	Домен			
		N-TAD	Basic	HLH	Myf5
Голотурии	<i>A. japonicus</i>	Ген не обнаружен			
	<i>C. schmeltzii</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>E. fraudatrix</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>H. glaberrima</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>A. parvimensis</i>	Ген не обнаружен			
	<i>S. briareus</i>	Транскрипт не обнаружен			
Морские ежи	<i>E. tribuloides</i>	+	+	+	-
	<i>L. variegatus</i>	+	+	+	-
	<i>S. purpuratus</i>	+	+	+	-
Морские звезды	<i>A. planci</i>	+	+	+	-
	<i>Henricia sp.</i>	+	+	+	-
	<i>P. miniata</i>	Ген не обнаружен			
Морские лилии	<i>A. japonica</i>	+	+	+	-
	<i>H. robustipinna</i>	Транскрипт не обнаружен			

Анализ геномов морского ежа *L. variegatus*, голотурии *A. japonicus* и морской лилии *A. japonica* показал наличие у этих видов гена *MYOD3*. Кодированная им аминокислотная последовательность содержит консервативные участки basic myogenic и HLH. В транскриптах морской лилии *H. robustipinna* и голотурии *S. briareus* выявлены транскрипты *MYOD3* с полными рамками считывания. В каждом из них содержится участок, кодирующий домены basic myogenic и HLH. Транскрипт *MYOD3* с неполной рамкой считывания был найден в транскрипте голотурии *E. fraudatrix*. Тем не менее, он содержит области, соответствующие basic myogenic и HLH (Рисунок 3). У остальных исследованных видов иглокожих ген *MYOD3* или его продукты не были обнаружены. Домен basic myogenic белка *MYOD3* имеет значительные отличия в аминокислотной последовательности от таковых у *MYOD1*



позвоночных и иглокожих и MYOD2 иглокожих (Рисунок 3). Наличие среди представителей иглокожих генов MYOD3, а также домен-кодирующих участков белков MYOD3 представлено в Таблице 3.

**Таблица 3.** Наличие гена MYOD3 и доменная структура MYOD3 у представителей разных классов иглокожих

Класс	Вид	Домен			
		N-TAD	Basic	HLH	Myf5
Голотурии	<i>A. japonicus</i>	-	+	+	-
	<i>C. schmeltzii</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>E. fraudatrix</i>	-	+	+	-
	<i>H. glaberrima</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>A. parvimensis</i>	Ген не обнаружен			
	<i>S. briareus</i>	-	+	+	-
Морские ежи	<i>E. tribuloides</i>	Ген не обнаружен			
	<i>L. variegatus</i>	-	+	+	-
	<i>S. purpuratus</i>	-	+	+	-
Морские звезды	<i>A. planci</i>	Ген не обнаружен			
	<i>Henricia sp.</i>	Транскрипт не обнаружен			
	<i>P. miniata</i>	Ген не обнаружен			
Морские лилии	<i>A. japonica</i>	-	+	+	-
	<i>H. robustipinna</i>	-	+	+	-

	BASIC	HELIX1	LOOP	HELIX2
1. M. mus. MYOD1	RRKAAATMREERRR	LSKVNEAFETLKRCT	SSNPNQRLPKV	EILRNNAIRYIEGL
2. X. lae. MYOD1	RRKAAATMREERRR	LSKVNEAFETLKRYS	TNPNQRLPKV	EILRNNAIRYIESL
3. D. rer. MYOD1	RRKAAATMREERRR	LSKVNDAFETLKRCT	STNPNQRLPKV	EILRNNAISYIESL
4. Ap. jap. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKKHT	CTNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
5. C. sch. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKKHT	CTNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
6. E. fra. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKKHT	CTNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
7. H. gla. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKKHT	CTNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
8. P. par. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKKHT	CTNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
9. S. pur. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	CANPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
10. E. tri. MYOD1	KRKAATMREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	CANPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
11. L. var. MYOD1	KRKAATLREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	CANPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
12. P. min. MYOD1	KRKAATMREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	SANPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
13. H. sp. MYOD1	KRRAATDRERRR	LTKVNAAFEILKRHT	CTNPEQRM	PKVTEILRNNAIQYIERL
14. A. pla. MYOD1	KRKAATMREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	SANPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
15. H. rob. MYOD1	KRKAATMREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	CTNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
16. An. jap. MYOD1	KRKAATMREERRR	LKRVNEAFEALKRHT	CANPNQRLPKV	EILRNNAIEYIEKL
17. An. jap. MYOD2	KRRAATMREERRR	LGVNAAFEILKRHT	CPNPDQRIP	KVMILRNHAIQYIDRL
18. L. var. MYOD2	KRRAATQREERRR	LCKVNAAFEILKQRT	CSNPEQRM	PKVTILRNNAIQYIERL
19. E. tri. MYOD2	KRRAATQREERRR	LCKVNAAFEILKQRT	CANPEQRM	PKVTILRNNAIQYIERL
20. S. pur. MYOD2	KRRAATQREERRR	LCKVNSAFEILKQRT	CSNPEQRM	PKVTILRNNAIQYIERL
21. A. pla. MYOD2	KRRAATDRERRR	LTKVNAAFEVLKRRT	CTNPEQRM	PKVTILRNNAIQYIERL
22. L. var. MYOD3	VRQNAATAREERRR	LAEVNRAYSNLSNHV	PQHLLGNATK	LEVIN--FHILFL
23. H. rob. MYOD3	VRESATEERERKRL	LLLNDAYTKLSNVL	QDFIGNGT	KLDILRGAIKYINLL
24. S. bri. MYOD3	SRLNATIIRERQR	LAKINRLLARLSSAV	PEEFQGLATK	ADVIRGAADYIRTL
25. E. fra. MYOD3	SRLNATIIRERQR	LAKINHLLERLSSRAV	PEEFQGLATK	ADVIRGAADYIRTL
26. S. pur. MYOD3	VRQNAATAREERRR	LAEVNRAYSNLSNHV	PQHLLGNATK	LEVIRGAACYIELL
27. Ap. jap. MYOD3	SRLNATIIRERQR	LAKINRLLNLSNHTV	PEEFQGLATK	VEVIRGVTDYIRTL
28. An. jap. MYOD3	VRESATEAREERRR	LLLVNDAYTRLSNALP	QDFIGNGT	KLDILRGAVKYITLL
29. D. mel. Nautilus	RRKAAATMREERRR	LKRVNEAFEILKRRTS	SSNPNQRLPKV	EILRNNAIEYIESL

**Рисунок 3.** Домены Basic и HLH в белках MYOD у позвоночных и иглокожих, а также в белке Nautilus у *D. melanogaster* (по: [142], с изменениями).

*A. par.* – *A. parvimensis*, *A. pla.* – *A. planci*, *An. jap.* – *A. japonica*, *Ap. jap.* – *Ap. japonicus*, *C. sch.* – *C. schmeltzii*, *D. rer.* – *D. rerio*, *E. fra.* – *E. fraudatrix*, *E. tri.* – *E. tribuloides*, *H. gla.* – *H. glaberrima*, *H. rob.* – *H. robustipinna*, *H. sp.* – *Henricia sp.*, *L. var.* – *L. variegatus*, *M. mus.* – *M. musculus*, *P. min.* – *P. miniata*, *S. bri.* – *S. briareus*, *S. pur.* – *S. purpuratus*, *X. lae.* – *X. laevis*, *D. mel.* – *D. melanogaster*.

На филогенетическом дереве MYOD1, MYOD2 и MYOD3 иглокожих и MRF позвоночные достоверно разделяются на отдельные группы (Рисунок 4). MYOD3 отстоят на значительном расстоянии от всех остальных групп, но тем не менее, они имеют связь с белками семейства MRF.



С помощью сравнительного анализа предполагаемых аминокислотных последовательностей определен уровень гомологии MRF позвоночных и MYOD1, MYOD2, MYOD3 иглокожих. Наибольшее сходство выявлено между видами иглокожих по соответствующим белкам: MYOD1 – 72%, MYOD2 – 71%, MYOD3 – 53%. Гомология предполагаемых аминокислотных последовательностей транскриптов MYOD1 исследованных иглокожих с транскрипционными факторами семейства MRF и остальными членами bHLH хордовых и полухордовых составила 56% и 35,7%, соответственно. Примерно такой же уровень сходства показали и последовательности MYOD2. Гомология с белками MRF позвоночных составила 53%, а с другими белками bHLH хордовых и полухордовых – 32%. Наибольшие отличия выявились у MYOD3 иглокожих. Их сходство с белками семейства MRF составило 40%, а с остальными членами bHLH хордовых и полухордовых – 34%.

### 3.2. Анализ мультигенного семейства MMP

#### 3.2.1. Состав мультигенного семейства MMP у *E. fraudatrix* и других иглокожих

В результате поиска гомологов MMP в транскриптом ПМЛ *E. fraudatrix* выявлены 22 последовательности MMP, которые обозначены названиями соответствующих ортологов морского ежа *S. purpuratus* (Таблица 4). Для ряда MMP *E. fraudatrix* ортологи у *S. purpuratus* отсутствуют, поэтому их идентификация проводилась с помощью поиска Blastx по базе NCBI. Так, Efra.gene13472\_i0, Efra.gene58669\_i0, Efra.gene59032\_i0, Efra.gene58967\_i0, Efra.gene60046\_i0 обозначены как *Ef-72 kDa type IV collagenase*, *Ef-MMP21*, *Ef-MMP16*, *Ef-MMP16.5*, *Ef-MMP16.6* соответственно.

**Таблица 4.** Обнаруженные в транскриптом *E. fraudatrix* ММР и соответствующие им ортологи морского ежа.

<b>ID контига <i>E. fraudatrix</i></b>	<b>название гена <i>E. fraudatrix</i></b>	<b>ID ортолога <i>S. purpuratus</i></b>	<b>название ортолога <i>S. purpuratus</i></b>
Efra.gene10190_i0_len1785.p1	<i>Ef-MMP24.1</i>	ECB-GENE-23106037	<i>MMP24</i>
Efra.gene11801_i1_len1506.p1	<i>Ef-MMP13.1</i>	ECB-GENE-23106043	<i>MMP13</i>
Efra.gene13165_i0_len1686.p1	<i>Ef-MMP16.2</i>	ECB-GENE-23106023	<i>MMP16</i>
Efra.gene13472_i0_len1581.p1	<i>Ef-72 kDa type IV collagenase</i>	-	-
Efra.gene13691_i0_len2472.p1	<i>Ef-MMP16.3</i>	ECB-GENE-23145298	<i>uncharacterized protein</i>
Efra.gene1750_i0_len2304.p1	<i>Ef-MMP21.1</i>	ECB-GENE-23074958	<i>MMP21</i>
Efra.gene58151_i0_len1837.p1	<i>Ef-MMP1.1</i>	ECB-GENE-23076691	<i>MMP1</i>
Efra.gene58669_i0_len2070.p1	<i>Ef-MMP21</i>	-	-
Efra.gene58993_i0_len1662.p1	<i>Ef-MMP1.2</i>	ECB-GENE-23110522	<i>MMP1</i>
Efra.gene59028_i0_len1644.p1	<i>Ef-MMP13</i>	ECB-GENE-23065828	<i>MMP13</i>
Efra.gene59032_i0_len1644.p1	<i>Ef-MMP16</i>	-	-
Efra.gene59219_i0_len1605.p1	<i>Ef-72 kDa type IV collagenase.5</i>	ECB-GENE-23046569	<i>MMP2</i>
Efra.gene59241_i0_len1602.p1	<i>Ef-72 kDa type IV collagenase.2</i>	ECB-GENE-23113052	<i>MMP2</i>
Efra.gene59488_i0_len1623.p1	<i>Ef-72 kDa type IV collagenase.3</i>	ECB-GENE-23023510	<i>MMP2</i>
Efra.gene59904_i0_len1695.p1	<i>Ef-MMP16.4</i>	ECB-GENE-23037169	<i>MMP16</i>
Efra.gene60016_i0_len1731.p1	<i>Ef-MMP24</i>	ECB-GENE-23112114	<i>MMP24</i>
Efra.gene64920_i0_len1479.p1	<i>Ef-72 kDa type IV collagenase.4</i>	ECB-GENE-23042252	<i>MMP2</i>
Efra.gene65340_i0_len1548.p1	<i>Ef-MMP24.2</i>	ECB-GENE-23070850	<i>MMP24</i>
Efra.gene65402_i0_len1539.p1	<i>Ef-MMP11</i>	ECB-GENE-23114102	<i>MMP11</i>
Efra.gene9929_i0_len1794.p1	<i>Ef-MMP1</i>	ECB-GENE-23076557	<i>MMP1</i>
Efra.gene58967_i0_len1662.p1	<i>Ef-MMP16.5</i>	-	-
Efra.gene60046_i0_len1728.p1	<i>Ef-MMP16.6</i>	-	-

Поиск ММР по геномам других иглокожих выявил 22 гена, кодирующих ММР, у морской лилии *A. japonicus*, 20 – у морской звезды *P. miniata*, 22 – у морского ежа *S. purpuratus* и 17 - у голотурии *A. japonicus*.

### 3.2.2. Анализ доменной структуры MMP иглокожих

Молекулы большинства MMP иглокожих имеют типичную для данной группы протеаз доменную структуру. В них можно обнаружить сигнальный пептид, пропептидный домен, PGBD, цистеиновый переключатель, каталитический домен, гемопексин-подобные повторы и трансмембранные домены. Схемы строения MMP у представителей разных классов иглокожих представлены на Рисунке 5.

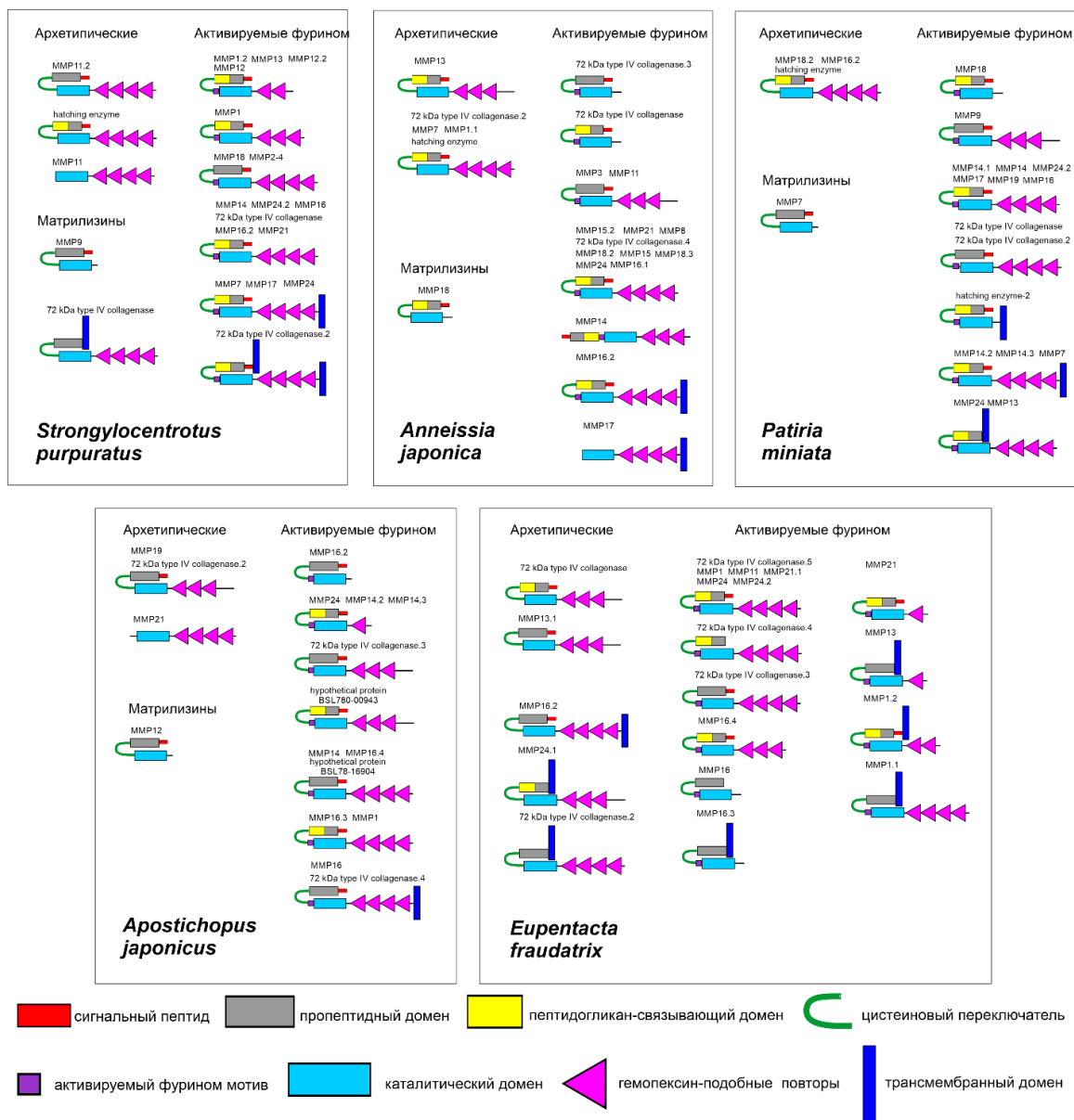


Рисунок 5. Схемы доменной структуры MMP иглокожих (по: [128], с изменениями).

Аминокислотный состав цистеинового переключателя в большинстве ММП иглокожих близок таковому позвоночных (PRCGXPD) (Рисунок 6). Однако довольно часто у иглокожих Р (пролин) заменяется треонином (Т), серином (С), аланином (А), глутамином (Q) или лизином (К) (Рисунок 6). В некоторых случаях пропептид заканчивается последовательностью, полностью отличной от мотива цистеинового переключателя позвоночных. Например, морские лилии *A. japonicus* имеют последовательности SPCRDAE (XM\_033271712.1) и IКCGFRE (XM\_033270068.1). У некоторых ММП иглокожих цистеиновый переключатель отсутствует.

Во всех изученных ММП *E. fraudatrix* присутствуют цистеиновые переключатели, причем их мотивы достаточно консервативны и близки таковым позвоночных. Исключением может быть последовательность PRCKVVD протеазы Ef-72 kDa type IV collagenase, в которой глицин (G) заменен лизином (K). Многие ММП иглокожих имеют активируемый фурином мотив RX[K/R]R, расположенный перед каталитическим доменом.

	цистеиновый переключатель	активируемый фурином мотив
1. E. fra. MMP24	EETGSLTAETRDLLDKPRCGVVDTPQ	RAKRYAHSGL
2. E. fra. MMP24.1	KSTGELDEETKRIMQAPRCGVVDVV	RRTQDI EYFD
3. E. fra. MMP16.2	NETGVLDDATIAMLDSPRCGVDPSP	RLSRFTHTGG
4. E. fra. 72 kDa type IV collagenase.5	EETGAINAETMKATKRPRCGLGEQS	RAKRYT LSGA
5. E. fra. MMP16.3	TPTGEVDDITLGMESPRCGFPDKG	RKKRYIL DGG
6. E. fra. 72 kDa type IV collagenase	TNDFSLDDELLAVLRQPRCKVVDPIV	MNQPFTFI GG
7. E. fra. MMP13.1	NQTGEIDEPTARAMSRPRCGCHDMI	- - KRYKAAAGT
8. E. fra. 72 kDa type IV collagenase.2	NQTGEINEPTARAISRPRCGCHDII	- - KRYETLGP
9. E. fra. 72 kDa type IV collagenase.3	KQTGEFNEPTARAMSWPRCGVYDTI	RMKRYVLSGS
10. E. fra. MMP16	NQTGEIDEPTARVMTWPRCGTYDTV	RKKRYVLSGP
11. E. fra. MMP13	DQTGEIDEPTARAMAWPRCGVHDTV	RKKRYVLSGP
12. E. fra. MMP24.2	NITGELNDATREVMRPRCGFSDLE	RVRRYTLIGK
13. E. fra. MMP21.1	PVTGLLDRTTLDL INKPRCGVSDLA	RGRGVYAST
14. E. fra. MMP21	PVTGLLDQTTLNVISKPRCGVSDSA	RRKRGVYSSA
15. E. fra. 72 kDa type IV collagenase.	TMSGKLDNETMTKMNQPRCGVPDMM	RKKRYSTFGQ
16. E. fra. MMP1	TVTGT LNEETKELMSSPRCGNPDHG	RKKRFTRTGT
17. E. fra. MMP1.1	EETGIFDLATKKNMNSPRCGNPDFG	RRKRFTTLGT
18. E. fra. MMP16.4	TVTGE LDKAT INKMNSPKCGNPDFG	RRKRWTTLGS
19. E. fra. MMP1.2	-VTGALDNATLGIMNEARCGLPDMY	RYKRYAALPV
20. E. fra. MMP11	EPTGVVDEPTREL IATPRCGNRDVF	RARRYAASQY
21. An. jap. MMP14	KGTGILTEETLQMEESP CRDAETN	RKRRSIPVIH
22. An. jap. MMP11	LKRHSV SQKLN GTHT EIKCGFREDN	RCKRYAFYQK
23. P. min. MMP14.1	PEETGILDDATIELLSKERCGVEDII	REKRYNIDGG
24. P. min. MMP24.2	NQTGILDOPTVRMMNTARCCHDEP	RKKRYVVAGL
25. S. pur. MMP2.4	E LNDLENEEDVND AEEQANVGR - - -	RQKRYALAGD
26. S. pur. MMP18	TMTGT LDEESMELMNTPRCGMKDME	RRKRYALGPR
27. Ap. jap. MMP16.2	TPTGNLDDTTCEKMDSSRCGFDPKE	RAKRYVLDGG
28. Ap. jap. protein BSL7800943	- - - - -DTLKM MENPPCKEEDAN	RTT RYLLARN
29. H. sap. MMP1	KVTGKPD AETLKV MKQPRCGVVDVA	- - -GFVLT EG

**Рисунок 6.** Выравнивание аминокислотных последовательностей цистеиновых переключателей и активируемых фурином мотивов ММП *E. fraudatrix*, а также некоторых ММП других иглокожих (*A. japonicus*, *P. miniata*, *A. japonica*) и *H. sapiens* (по: [128], с изменениями).

An. jap. – *A. japonica*, Ap. jap. – *A. japonicus*, E. fra. – *E. fraudatrix*, H. sap. – *H. sapiens*, P. min. – *P. miniata*, S. pur. – *S. purpuratus*.

На основании доменной структуры MMP иглокожих можно разделить на архетипические, матрилизины и MMP, активируемые фурином. Архетипические MMP у разных видов иглокожих представлены 1-3 генами. Почти все они имеют сигнальный пептид, пропептидный домен с цистеиновым переключателем, каталитический домен и 3–4 гемопексин-подобных повтора, а отличаются друг от друга, в основном, наличием или отсутствием домена PGBD. У голотурии *E. fraudatrix* он имеется в одном из двух архетипических MMP. Ни один из трех белков *A. japonicus* не содержит этот домен. PGBD отсутствует у двух из трех MMP морского ежа *S. purpuratus*. У *A. japonica* и *P. miniata* все представители архетипических MMP содержат PGBD.

Ранее в геноме *S. purpuratus* были идентифицированы MMP с отсутствующим пропептидным доменом [141]. Мы также обнаружили MMP такой структуры у этого вида. Кроме того, голотурия *A. japonicus* также имеет одну MMP, в которой отсутствует пропептидный домен. Эти MMP классифицируются как архетипические MMP, поскольку в них отсутствует активируемый фурином мотив и имеются гемопексин-подобные повторы.

У всех исследованных иглокожих, кроме *E. fraudatrix* имеется по одному MMP, который можно отнести к группе матрилизинов. Они имеют сходную структуру и состоят из сигнального пептида, пропептидного домена с цистеиновым переключателем и каталитического домена.

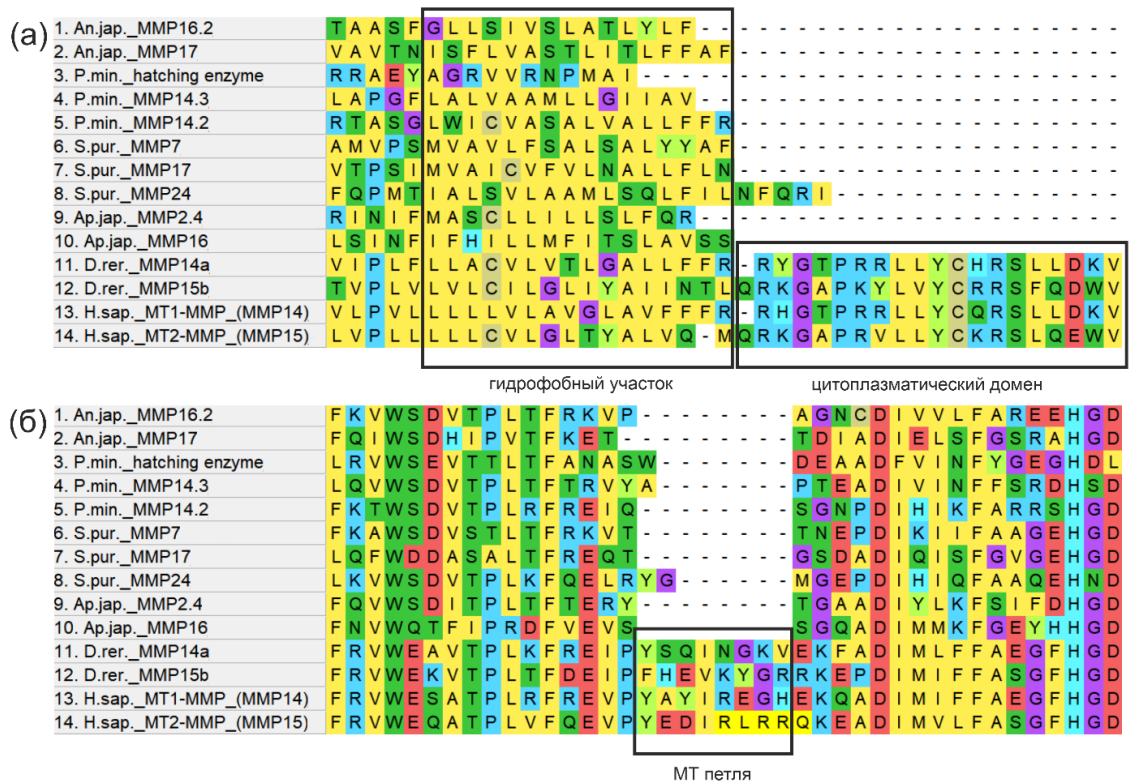
подавляющее большинство MMP иглокожих содержат фурин-активируемые мотивы и, соответственно, их можно отнести к группе фурин-активируемых MMP. В эту группу входят протеазы с различной доменной структурой. Большинство из них структурно сходны с архетипическими MMP и матрилизинами. Они различаются числом гемопексин-подобных повторов и наличием или отсутствием PGBD (Рисунок 5).

Также найдены MMP иглокожих с трансмембранными доменами. У каждого изученного вида иглокожих было идентифицировано 1-3 MMP с трансмембранным



доменом на С-конце. MMP с N-концевым трансмембранным доменом найдены у морской звезды *P. miniata*, морского ежа *S. purpuratus*, а также, в большом количестве у *E. fraudatrix* (Рисунок 5). Почти все из них относятся к группе активируемых фурином MMP. Но, также мы обнаружили у *S. purpuratus*, *A. japonica* и *E. fraudatrix* MMP с N- или С-концевыми трансмембранными доменами, у которых мотив, активируемый фурином, отсутствует. Не считая наличия трансмембранных доменов, они имеют признаки строения архетипических MMP.

У MMP иглокожих с задним трансмембранным доменом имеется С-концевой гидрофобный участок, при этом цитоплазматических домен отсутствует (Рисунок 7). Также в данных протеазах не обнаружены последовательности MT-Loop, присутствующие в трансмембранных MT-MMP I типа (MT1-, MT2-, MT3- и MT5-MMP) позвоночных.



**Рисунок 7.** Выравнивание аминокислотных последовательностей MMP с С-концевым трансмембранным доменом позвоночных и иглокожих (по: [128], с изменениями). (а) С-концевые участки MMP. (б) каталитический домен с MT-петлей.

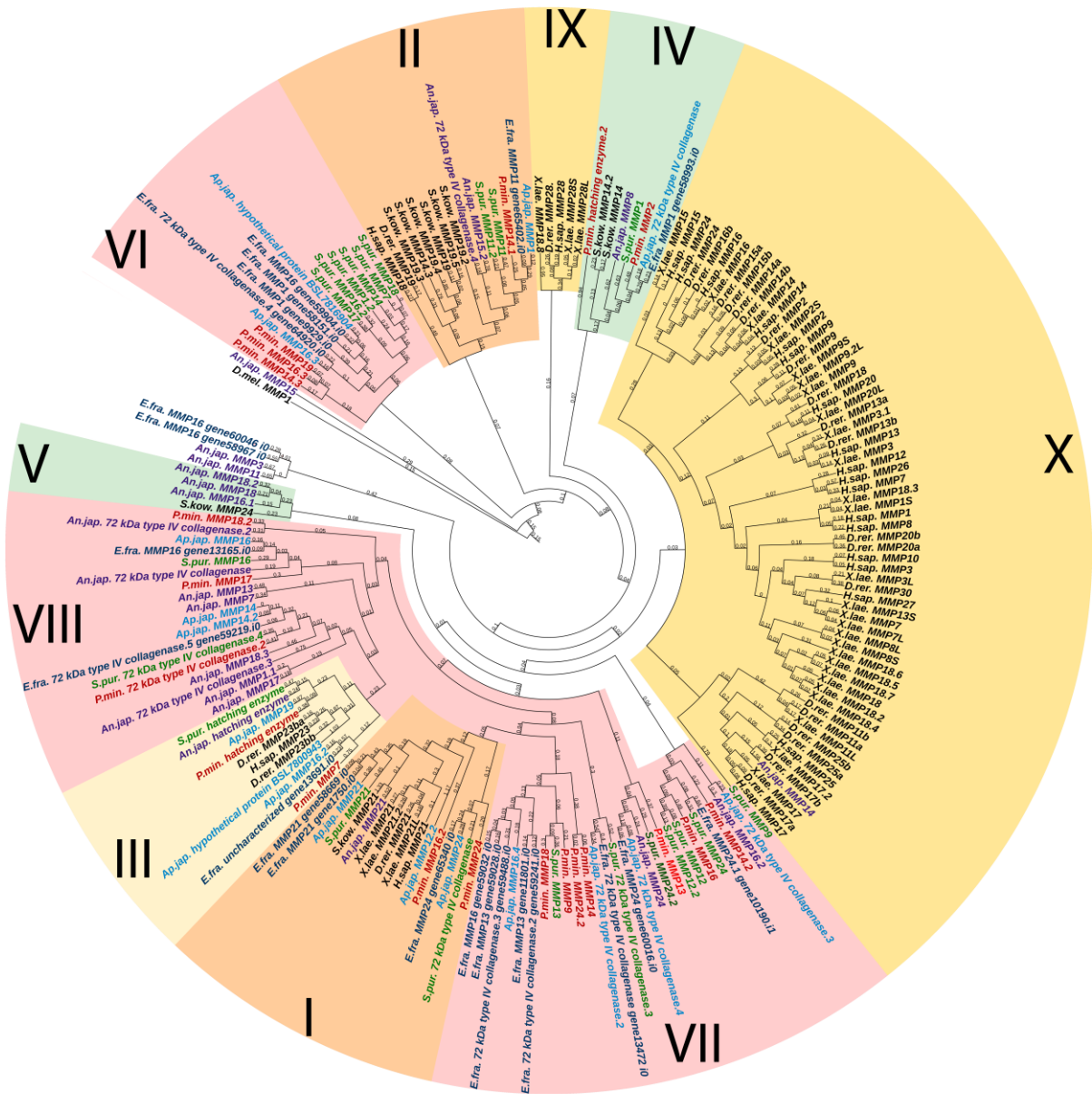
An. jap. – *A. japonica*, Ap. jap. – *A. japonicus*, D. rer – *D. rerio*, H. sap. – *H. sapiens*, P. min. – *P. miniata*, S. pur. – *S. purpuratus*.

### 3.2.3. Филогенетический анализ взаимоотношений ММР иглокожих, позвоночных и полухордовых.

На филогенетическом дереве большинство ММР иглокожих группируется отдельно от ММР позвоночных (Рисунок 8). Всего можно выделить десять групп, которые при необходимости можно разделить на подгруппы. В первую, вторую и третью группы входят ММР всех исследованных видов вторичноротых. Данные группы отличаются расположением на дереве. Первая и третья находятся дальше остальных относительно корня, в то время как вторая, напротив, находится почти у самого основания дерева.

Четвертая и пятая группы объединяют только ММР представителей *Ambulacraria* (Рисунок 8). В пятой группе, помимо ММР *S. kowalevskii* присутствуют только ММР морской лилии, в то время как в четвертой содержатся ММР всех видов иглокожих, взятых для анализа. Кроме того, пятая группа находится дальше от корня дерева, чем четвертая.

Шестая, седьмая и восьмая группы содержат только протеазы иглокожих. Шестая расположена у самого основания дерева, а седьмая и восьмая – ближе к вершине. Девятая и десятая группы объединяют ММР позвоночных. Однако в десятой группе имеются две последовательности иглокожих: ММР14 морской лилии *A. japonica* и ММР9 морского ежа *S. purpuratus* (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Филогенетическое дерево, показывающее взаимоотношения MMP иглокожих, позвоночных и полухордовых (по: [128], с изменениями). Голотурии (*A. japonicus*, *E. fraudatrix*) – голубой и синий цвета, соответственно; морские ежи (*S. purpuratus*) – зеленый цвет; морские звезды (*P. miniata*) – красный цвет; морские лилии (*A. japonica*) – фиолетовый цвет; позвоночные (*H. sapiens*, *X. laevis*, *D. rerio*) и полухордовые (*S. kowalevskii*) – черный цвет. Значения, указанные на ветвях, отображают их длину.

An. jap. – *A. japonica*, Ap. jap. – *A. japonicus*, D. mel. – *D. melanogaster*, D. rer. – *D. rerio*, E. fra. – *E. fraudatrix*, H. sap. – *H. sapiens*, P. min. – *P. miniata*, S. kow. – *S. kowalevskii*, S. pur. – *S. purpuratus*, X. lae. – *X. laevis*.

На построенном филогенетическом дереве MMP иглокожих выделяется шесть больших групп протеиназ, каждую из которых при необходимости можно разделить

на подгруппы (Рисунок 9). Хорошо видно, что MMP в пределах типа Echinodermata сильно расходятся, а также отсутствует соответствие между названиями MMP (наиболее вероятные гомологи в BLAST) и эволюционным родством соответствующих протеаз. Например, MMP голотурии *A. japonicus* 72 kDa type IV collagenase.2 (MRZV01000410.1) и 72 kDa type IV collagenase.3 (MRZV01000538.1), которые по NCBI являются «гомологами», расположены на разных ветвях дерева. Наоборот, последовательности, расположенные на одной ветви филогенетического дерева и с большой долей вероятности являющиеся ортологичными, имеют разные обозначения, как, например, MMP18 (XM\_033252622.1) и MMP16.1 (XM\_033252624.1) морской лилии *A. japonicus* из группы V. Все это показывает, что классификация MMP иглокожих требует пересмотра и дополнительных исследований.

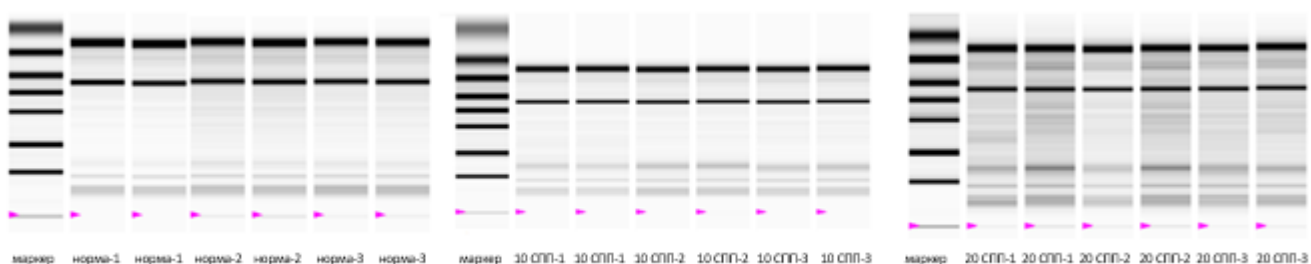
Три последовательности *A. japonica* (72 kDa type IV collagenase.3, MMP3 и MMP11) на построенных деревьях расположены отдельно от сгруппированных MMP. Вместе с ними кластеризуются контиги Efra.gene58967\_i0 и Efra.gene60046\_i0 голотурии *E. fraudatrix*. При поиске по базе NCBI онлайн сервисом BLAST эти последовательности имеют небольшое сходство с MMP16, в связи с чем мы их обозначили как MMP16.5 и MMP16.6, соответственно. На обоих построенных деревьях MMP16.5 и MMP16.6 расположены рядом друг с другом, однако, судя по длинам ветвей, на которых они расположены, эти последовательности отстают на очень больших расстояниях от всех остальных MMP (Рисунок 8, Рисунок 9).



### 3.3. Поиск ТФ и ММР, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ у *E. fraudatrix*.

#### 3.3.1. Секвенирование и сборка транскриптома *de novo*

РНК, выделенная для анализа транскриптома ПМЛ *E. fraudatrix* в норме и процессе регенерации оказалась высокого качества (Рисунок 10). Длина большинства фрагментов, готовых к секвенированию библиотек составляла 300-500 нуклеотидов.



**Рисунок 10.** Капиллярный электрофорез тотальной РНК, выделенной из амбулакров *E. fraudatrix* в норме и при регенерации.

В результате секвенирования девяти библиотек, соответствующих двум стадиям регенерации ПМЛ и интактной мышце голотурии *E. fraudatrix*, было получено в общей сложности 515 миллионов (515 429 309) необработанных прочтений парных концов. После фильтрации и удаления адаптерных последовательностей было сохранено 96% прочтений со средним качеством 35,7 единиц по шкале Phred 33 и средней длиной 99,2 нуклеотида (Таблица 5). Данные прочтения, а также прочтения из эксперимента по регенерации кишки *E. fraudatrix* (BioProject PRJNA509334) использовались в сборке. В результате сборки, фильтрации загрязняющих и некодирующих последовательностей и последующей кластеризации для идентификации изоформ было получено 82 244 изоформы



транскриптов. При учете только самой длинной изоформы (условно далее такие изоформы будут упоминаться как гены) число последовательностей снижается до 66001. В транскриптом удалось идентифицировать 98,4% коровых генов многоклеточных животных (на основе 954 основных генов) и 92,9% однокопийных ортологов среди них.

**Таблица 5.** Статистические показатели результатов секвенирования 9 библиотек РНК ПМЛ *E. fraudatrix* в норме и при регенерации.

Образец	Исходные прочтения			Корректированные прочтения		
	Число прочтений	Длина	Среднее качество	Число прочтений	Длина	Среднее качество
10 спп (повтор1)	64132776	101.0	35.4	60775776	99	35,7
10 спп (повтор2)	61315796	101.0	35.4	58318178	99	35,7
10 спп (повтор3)	49510095	101.0	35.3	46562708	99	35,6
20 спп (повтор1)	58986587	101.0	35.5	56213520	99,2	35,8
20 спп (повтор2)	52629466	101.0	35.5	50589277	99,2	35,8
20 спп (повтор3)	58024074	101.0	35.5	55675573	99,3	35,8
Норма (повтор1)	62555813	101.0	35.6	60400965	99,5	35,8
Норма (повтор2)	54695091	101.0	35.6	52682450	99,5	35,8
Норма (повтор3)	53579611	101.0	35.4	51255484	99,1	35,7

### 3.3.2 Анализ дифференциальной экспрессии

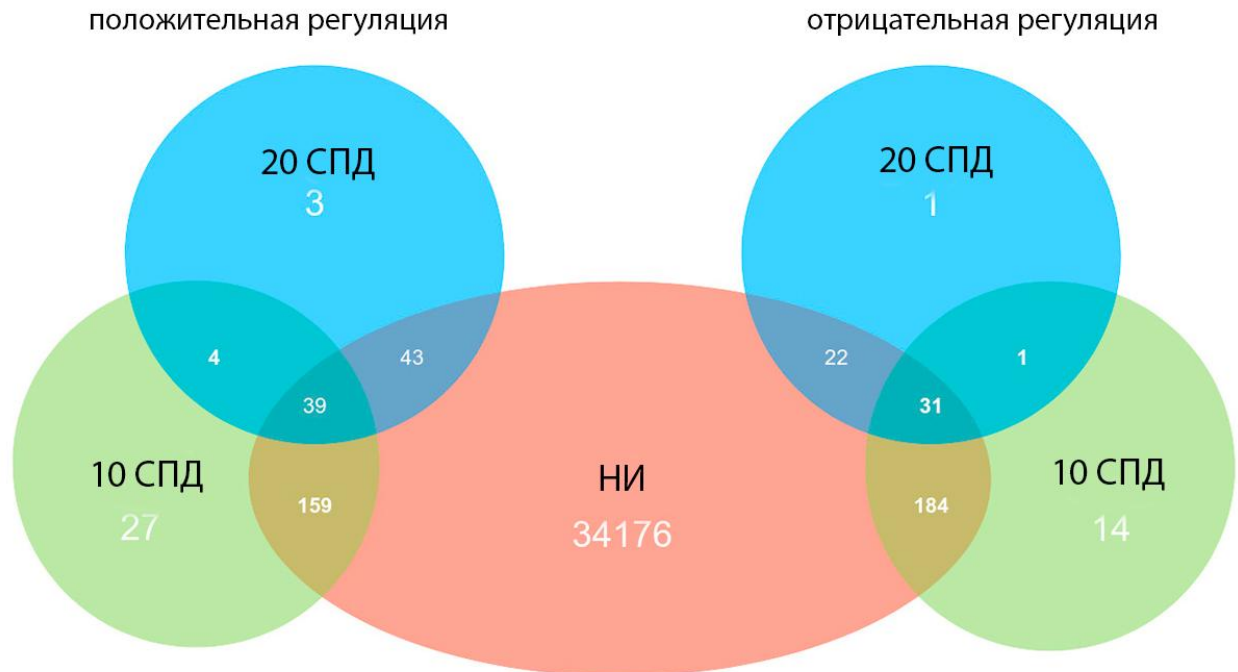
После выравнивания парных прочтений на сборку и подсчета числа успешно выровненных на каждую последовательность прочтений, был проведен корреляционный анализ (Рисунок 11). Показано, что имеется высокая корреляция повторов внутри образцов (около 88%), при этом корреляция со стадиями регенерации была несколько выше (0,91 и 0,88) по сравнению с образцом из интактной ПМЛ (0,85) (Рисунок 11).

	10 спп1	10 спп2	10 спп3	20 спп1	20 спп2	20 спп3	Норма1	Норма2	Норма3
10 спп1	1	0,91	0,89	0,9	0,89	0,88	0,85	0,85	0,85
10 спп2	0,91	1	0,94	0,9	0,88	0,89	0,85	0,84	0,85
10 спп3	0,89	0,94	1	0,88	0,87	0,88	0,84	0,82	0,85
20 спп1	0,9	0,9	0,88	1	0,88	0,88	0,88	0,87	0,87
20 спп2	0,89	0,88	0,87	0,88	1	0,88	0,85	0,84	0,84
20 спп3	0,88	0,89	0,88	0,88	0,88	1	0,84	0,83	0,85
Норма1	0,85	0,85	0,84	0,88	0,85	0,84	1	0,85	0,85
Норма2	0,85	0,84	0,82	0,87	0,84	0,83	0,85	1	0,83
Норма3	0,85	0,85	0,85	0,87	0,84	0,85	0,85	0,83	1

**Рисунок 11.** Тепловая карта квадрата корреляции Пирсона всех образцов РНК и их повторов (по: [171], с изменениями). Номера повторов отмечены цифрами в конце названий образцов.

В результате анализа дифференциальной экспрессии мы обнаружили только 459 и 144 гена с заметными изменениями уровней экспрессии для образцов 10 спп и 20 спп соответственно по сравнению с интактной ПМЛ. Из них 413 и 135 гена соответственно имеют значительные совпадения в базе данных NRP NCBI (Рисунок 12). Таким образом, большая часть ДЭГ выявляется при сравнении двух стадий регенерации с интактным образцом. Об этом же свидетельствует карта корреляций между выборками (Рисунок 11). Таким образом, сравнение указывает на существенные изменения в работе генов после повреждения ПМЛ.





**Рисунок 12.** Диаграмма Венна для ДЭГ с положительной и отрицательной регуляцией (по: [171], с изменениями). НИ – набор последовательностей с попаданием в неизбыточную базу данных NCBI.

### 3.3.3. Аннотация

Аннотация 82 244 последовательностей с помощью поиска BLASTx в базе данных NRP NCBI привела к идентификации 34 654 последовательностей и 25 784 генов со значимыми совпадениями, включая 5053 последовательности, имеющих совпадения только с белками, не имеющими осмысленного названия. Белки лучших совпадений в базе принадлежат 1175 организмам, из них 78,7% последовательностей соответствуют белкам иглокожих. Кроме того, около 3% последовательностей, не относящихся к Metazoa, могут быть контаминацией. Однако отсутствие генома этого или родственного вида голотурий не позволяет нам точно определить источник этих последовательностей. При аннотации белков человека и морского ежа было идентифицировано 10 600 и 14 221 ортологов соответственно. Далее был

осуществлен поиск ТФ и ММР. За них принимались белки, обозначенные как ТФ и ММР в базах HGNC (*H. sapiens*) и Echinobase (*S. purpuratus*).

Поиск гомологов ТФ морского ежа и человека привел к идентификации 174 и 926 ТФ соответственно. Из них 117 гомологов ТФ были обнаружены среди белков как человека, так и морского ежа. В результате поиска гомологов ММР морского ежа и человека у *E. fraudatrix* были идентифицированы 17 и 20 ММР, соответственно. 15 гомологов ММР были обнаружены как среди белков морского ежа, так и человека.

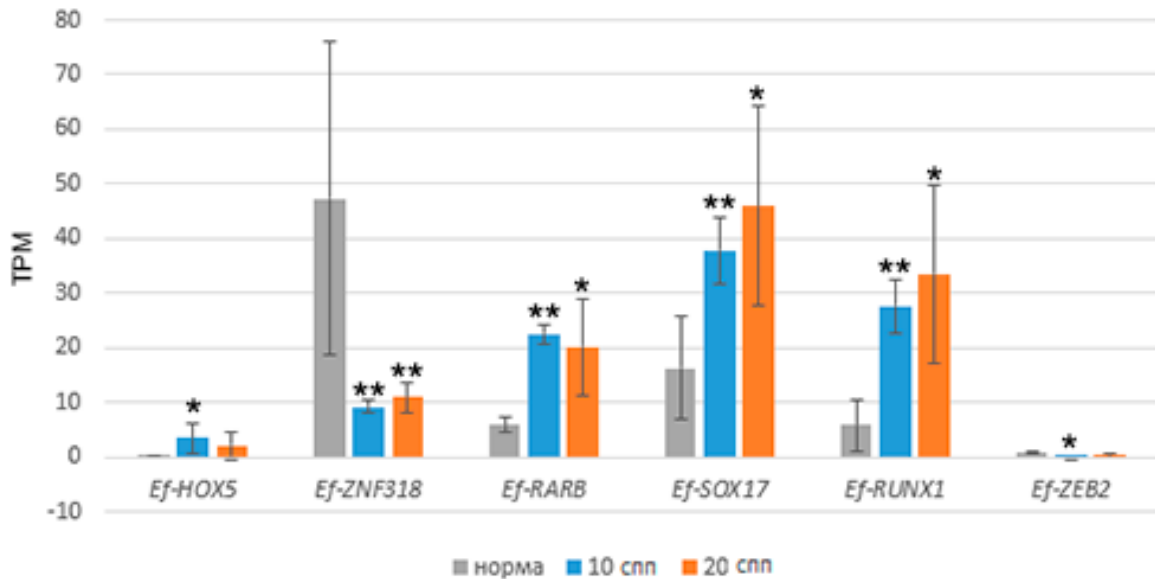
### 3.3.4. Поиск ТФ и ММР, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ

Среди найденных ТФ и ММР были отобраны те, у которых среднее значение LogFC больше 0,5 на первой и второй стадиях регенерации, по сравнению с нормой и значение p-value меньше 0,05. Соблюдение первого условия позволяет отбирать гены с повышенной экспрессией относительно нормы, а второе проверяет достоверность оценки экспрессии.

Было выявлено шесть генов ТФ, которые показывали изменение экспрессии на одной или обеих стадиях регенерации (Таблица 6). У четырех из них экспрессия повышается, у двух – снижается (Рисунок13).

**Таблица 6.** Гены ТФ голотурии *E. fraudatrix*, которые имеют значительное изменение экспрессии.

Название	Ортолог	
	<i>H. sapiens</i>	<i>S. purpuratus</i>
<i>Ef-HOX5</i>	<i>HOXB5</i>	<i>LOC100888432</i>
<i>Ef-ZNF318</i>	<i>ZNF318</i>	<i>LOC579108</i>
<i>Ef-RARB</i>	<i>RARB</i>	<i>RARb</i>
<i>Ef-SOX17</i>	<i>SOX17</i>	<i>SOX17l</i>
<i>Ef-RUNX1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>RUNX2</i>
<i>Ef-ZEB2</i>	<i>ZEB2</i>	<i>LOC594820</i>

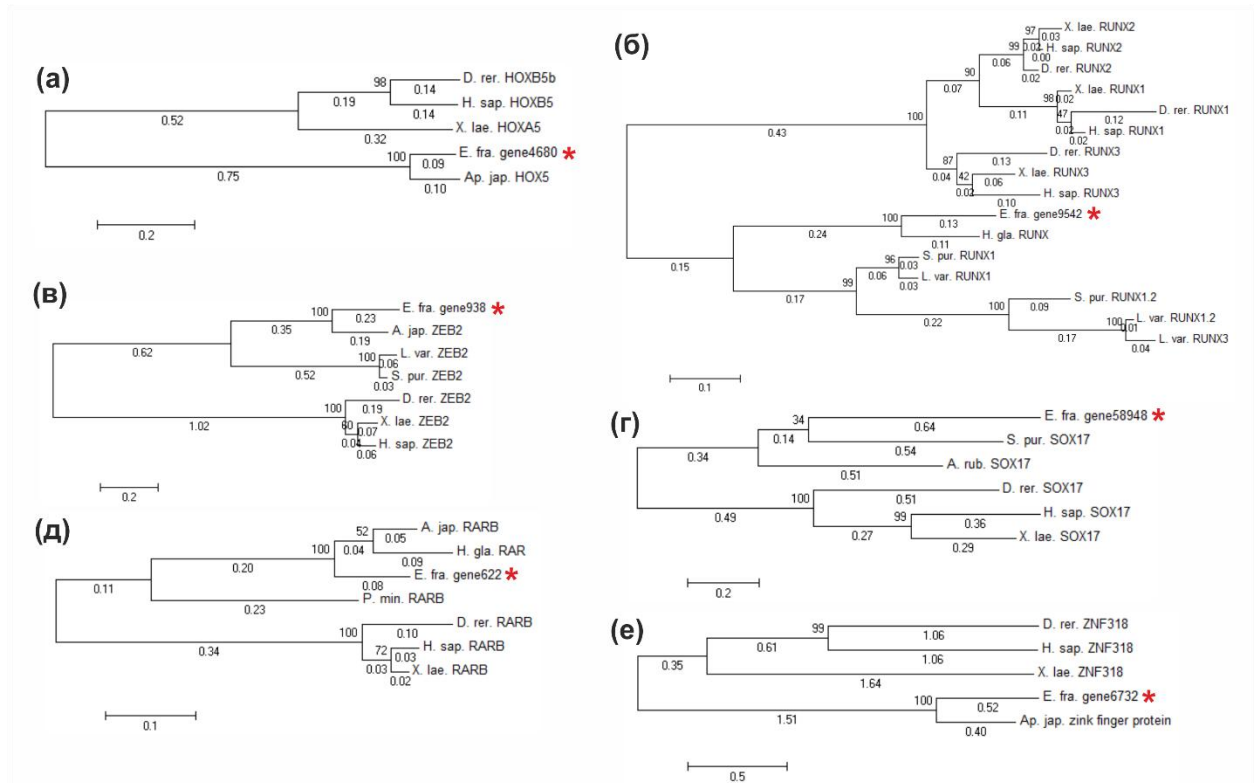


**Рисунок 13.** Значения TPM (transcript per million) ДЭГ ТФ при регенерации ПМЛ (по: [171], с изменениями). \* - значение  $p < 0.05$ , при сравнении стадии регенерации с нормой. \*\* - значение  $p < 0.01$ , при сравнении стадии регенерации с нормой.

Все гомологи были проверены с использованием базы данных NRP NCBI и путем построения филогенетических деревьев с ортологами иглокожих и позвоночных (Рисунок 14).

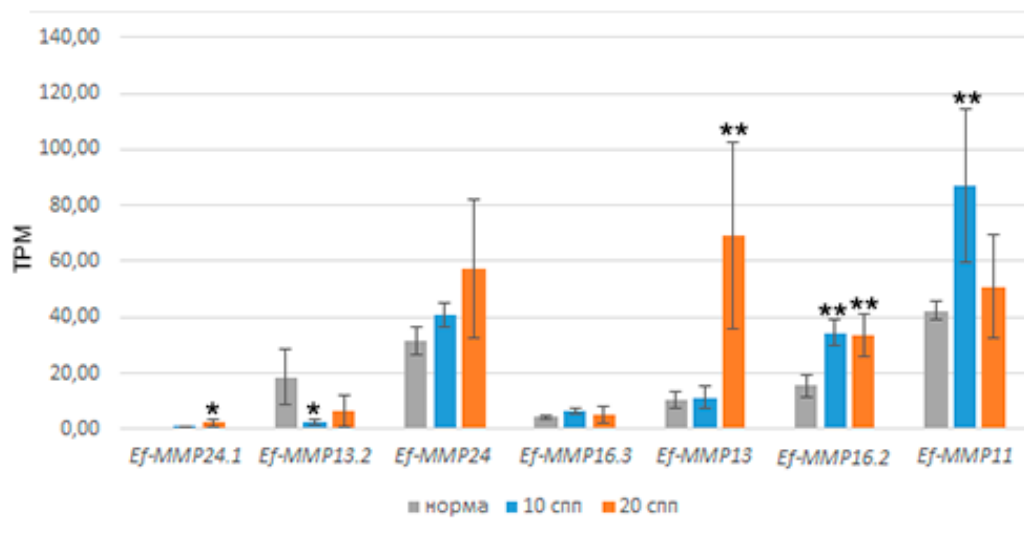
Выявленные гены кодируют белки, которые относятся к 5 классам ТФ: факторы с гомеодоменом (*Ef-HOX5*, *Ef-ZEB*), ядерные рецепторы с цинковыми пальцами С4 (*Ef-RARB*), факторы с доменом runt (*Ef-RUNX1*), факторы с доменом high-mobility group (*Ef-SOX17*), факторы с цинковыми пальцами С2Н2 (*Ef-ZNF 318*).

Семь генов MMP из двадцати обнаруженных показали значительное изменение экспрессии на одной или обеих стадиях регенерации ПМЛ (Рисунок 15). У шести, *Ef-MMP16.3*, *Ef-MMP11*, *Ef-MMP13.2*, *Ef-MMP13*, *Ef-MMP16.2*, *Ef-MMP24* и *Ef-MMP24.1*, экспрессия повышается, а у *Ef-MMP13.2* – снижается.



**Рисунок 14.** Филогенетические деревья, показывающие взаимосвязь последовательностей ТФ *E. fraudatrix* (отмечены красной звездочкой) с белками-гомологами других животных (по: [171], с изменениями). (а) HOX5. (б) RUNX1. (в) ZEB2. (г) SOX17. (д) RARB. (е) ZNF318. Значения, указанные на ветвях, отображают их длину.

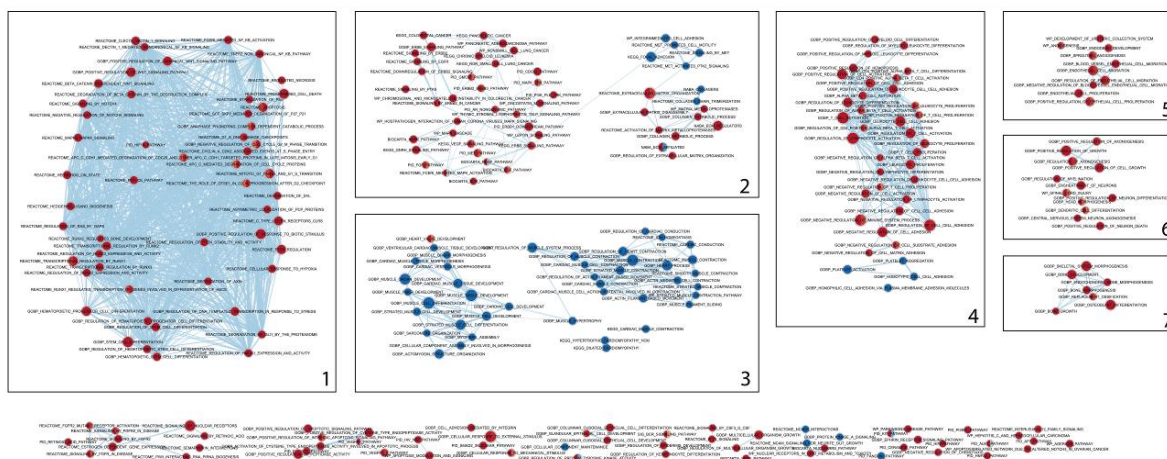
Ap. jap. – *A. japonicus*, A. rub. – *A. rubens*, D. rer. – *D. rerio*, E. fra. – *E. fraudatrix*, H. gla – *H. glaberrima*, H. sap – *H. sapiens*, L. var. – *L. variegatus*, P. min. – *P. miniata*, S. pur. – *S. purpuratus*, X. lae. – *X. laevis*.



**Рисунок 15.** Значения TPM ДЭГ MMP со значительными изменениями в уровнях экспрессии по сравнению с интактным образцом (по: [171], с изменениями). \* - значение  $p < 0.05$ , при сравнении стадии регенерации с нормой. \*\* - значение  $p < 0.01$ , при сравнении стадии регенерации с нормой.

### 3.3.5. Сеть сверхпредставленных биологических процессов и путей

Путем построения сети были получены 570 биологических процессов и путей, объединяющих 5199 гомологов белков человека (Рисунок 16). Из 570 биологических процессов и путей на обеих стадиях регенерации 482 имеют гены с положительной, а 73 – с отрицательной регуляцией относительно интактной ткани. Поскольку большая часть сети занята процессами «домашнего хозяйства», не имеющего прямого отношения к регуляции регенерации, они были удалены.



**Рисунок 16.** Сеть сверхпредставленных процессов и сигнальных путей, ассоциированных с ТФ и ММР со значительными изменениями в уровнях экспрессии по сравнению с интактным образцом (по: [171], с изменениями). Биологические процессы представлены узлами, которые включают в себя набор участвующих генов. Размер узла и толщина ребра отображает число генов. Цвета узлов означают повышение (красный) или понижение (синий) уровня экспрессии (оценка сверхпредставленности) относительно нормы на первой (правая половина узла) и второй (левая половина узла) стадиях регенерации. Цифрами обозначены номера блоков, объединяющих сходные по функциям процессы. В нижней части карты находятся процессы, не входящие ни в один из блоков.

Сеть содержит семь блоков тесно взаимосвязанных узлов, отражающих биологические процессы и пути (Таблица 7). Почти все процессы, за несколькими исключениями, активны во время регенерации ПМЛ.

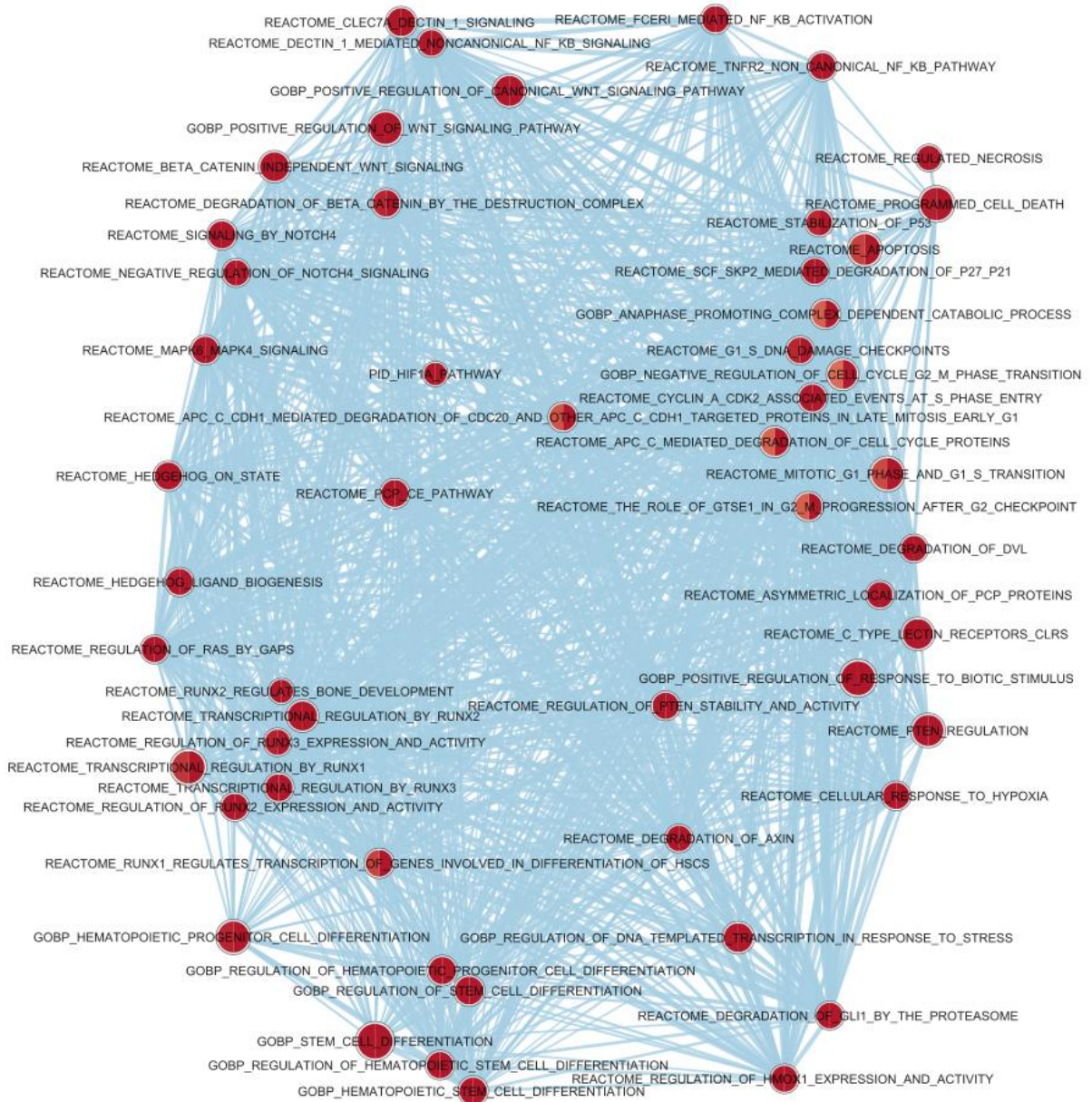
Первый блок, имеющий наибольшее число узлов и внутренних связей, объединяет биологические процессы, связанные с клеточной гибелью (некроз, апоптоз), дифференциацией гематopoэтических стволовых клеток, регуляцией

белков иммунной системы (Рисунок 17). Все процессы первого блока по большей части содержат гены, у которых экспрессия увеличивается как на первой, так и на второй стадиях регенерации.

**Таблица 7.** Блоки сети сверхпредставленных биологических процессов и путей

	Обобщенная функция блока	Число генов	Число процессов	Гены с дифференциальной экспрессией в блоке	
				ТФ	MMP
Блок 1	клеточная гибель, дифференциация гемопоэтических стволовых клеток, процессы иммунной системы.	850	88	<i>Ef-RUNX1</i> , <i>Ef-SOX17</i>	-
Блок 2	канцерогенез, преобразование ВКМ, клеточная адгезия	821	53	<i>Ef-RUNX1</i> , <i>Ef-RARB</i>	<i>Ef-MMP16.2</i> , <i>Ef-MMP13.2</i> , <i>Ef-MMP16.3</i> , <i>Ef-MMP11</i> , <i>Ef-MMP24.1</i> , <i>Ef-MMP24</i>
Блок 3	формирование мышечных пучков	664	42	<i>Ef-RUNX1</i> , <i>Ef-RARB</i>	<i>Ef-MMP24</i>
Блок 4	процессы иммунной системы	523	34	<i>Ef-RUNX1</i>	<i>Ef-MMP24</i>
Блок 5	миграция и пролиферация эндотелиальных клеток	279	10	<i>Ef-RARB</i>	<i>Ef-MMP24</i>
Блок 6	нейрогенез	435	22	<i>Ef-RARB</i> , <i>Ef-ZEB2</i>	<i>Ef-MMP24</i>
Блок 7	развитие соединительной ткани	279	7	<i>Ef-HOX5</i> , <i>Ef-RARB</i>	<i>Ef-MMP24</i>





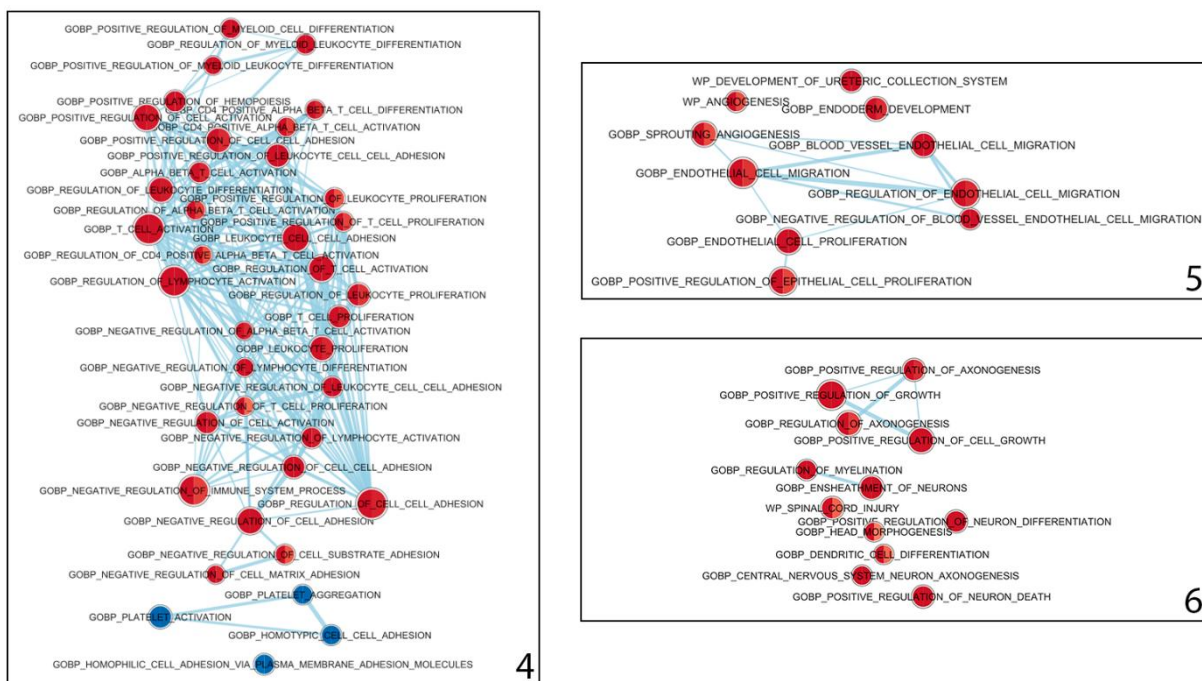
**Рисунок 17.** Блок 1. Содержит процессы, связанные с клеточной смертью (некроз, апоптоз); дифференциацией гематопоэтических стволовых клеток; регуляцией белков иммунной системы (по: [171], с изменениями).

Во второй блок входят процессы, связанные с канцерогенезом, преобразованием ВКМ и регуляцией клеточной адгезии (Рисунок 18). Большинство узлов данного блока имеют гены с повышенной экспрессией на обоих сроках регенерации, за исключением некоторых из узлов, связанных с клеточной адгезией и экспрессией коллагенов.



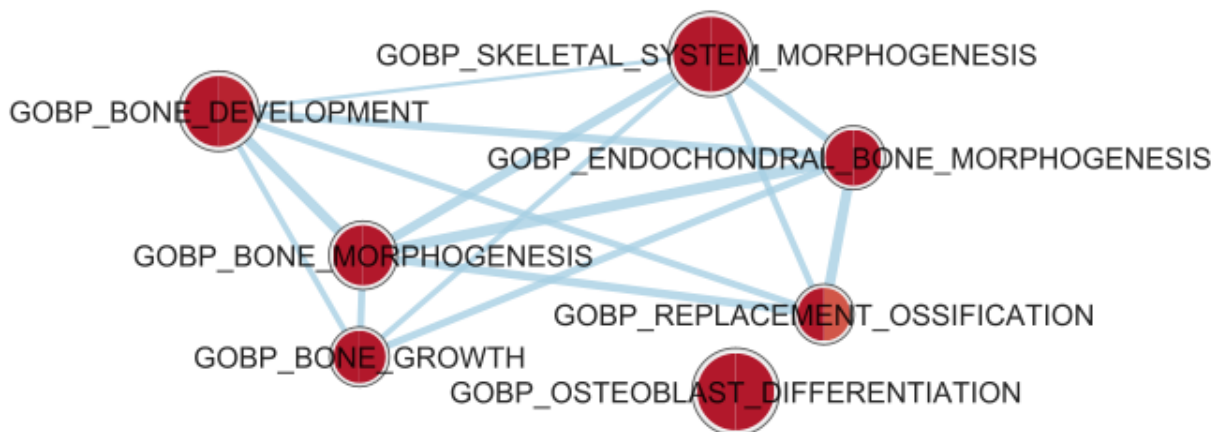


соответственно (Рисунок 20). Большинство генов процессов, входящих в данные блоки, имеют положительную регуляцию на обоих сроках регенерации.



**Рисунок 20.** Блоки 4, 5, 6. Содержат процессы, связанные с иммунной системой (блок 4), миграцией и пролиферацией эндотелиальных клеток (блок 5) и нейрогенезом (блок 6) (по: [171], с изменениями). Цифрами обозначены номера блоков.

Последний, седьмой блок, как и второй, связан с преобразованием соединительной ткани (Рисунок 21). Он содержит такие узлы как “skeletal system morphogenesis” и “bone morphogenesis”.



**Рисунок 21.** Блок 7. Содержит процессы, связанные с развитием соединительной ткани (по: [171], с изменениями).

Также в сети присутствует небольшое число узлов вне перечисленных блоков, которые не связаны с другими узлами как общими генами, так и на функциональном уровне. Этими узлами представлены процессы клеточного сигналинга, регуляции апоптоза, клеточного ответа на механические стимулы, развития и дифференциации эпидермиса и др.

### **3.4. Анализ временной и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов**

#### **3.4.1. Оценка временной экспрессии с помощью кПЦР**

При анализе результатов кПЦР в первую очередь была проверена попарная корреляция между всеми стадиями, повторами и данными РНК-секвенирования. В анализе были использованы ТФ *Ef-HOX5*, *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, *Ef-MMP16.2*, *Ef-MMP24.1* и *Ef-МУН6*, кодирующий мышечный миозин. Поскольку данные кПЦР при обработке нормализуются на референсные гены, для получения точной сравнительной оценки данные РНК секвенирования также были нормализованы на них. Количество прочтений для каждого гена в каждом повторе нормализовали на длины генов в килобазах и, далее, на *Ef-ef1a* и *Ef-GAPDH*.

Анализ показал в целом среднюю корреляцию между данными, полученными РНК-секвенированием и результатами кПЦР. Средний коэффициент корреляции Пирсона между всеми повторами каждого метода составил 0,45 и 0,5 для 10 и 20 спп соответственно. Наибольшие значения – между первым и вторым повторами стадии 10 спп, а также первым и третьим 20 спп (Рисунок 22), в то время как наименьшие – между вторым и третьим 10 спп. Данные, полученные каждым методом в отдельности, показывают сильную корреляцию между собой. При РНК секвенировании средний коэффициент корреляции Пирсона между повторами

составляет 0,95 и 0,87 для 10 и 20 спп соответственно, а при кПЦР – 0,86 и 0,95 для тех же стадий регенерации.

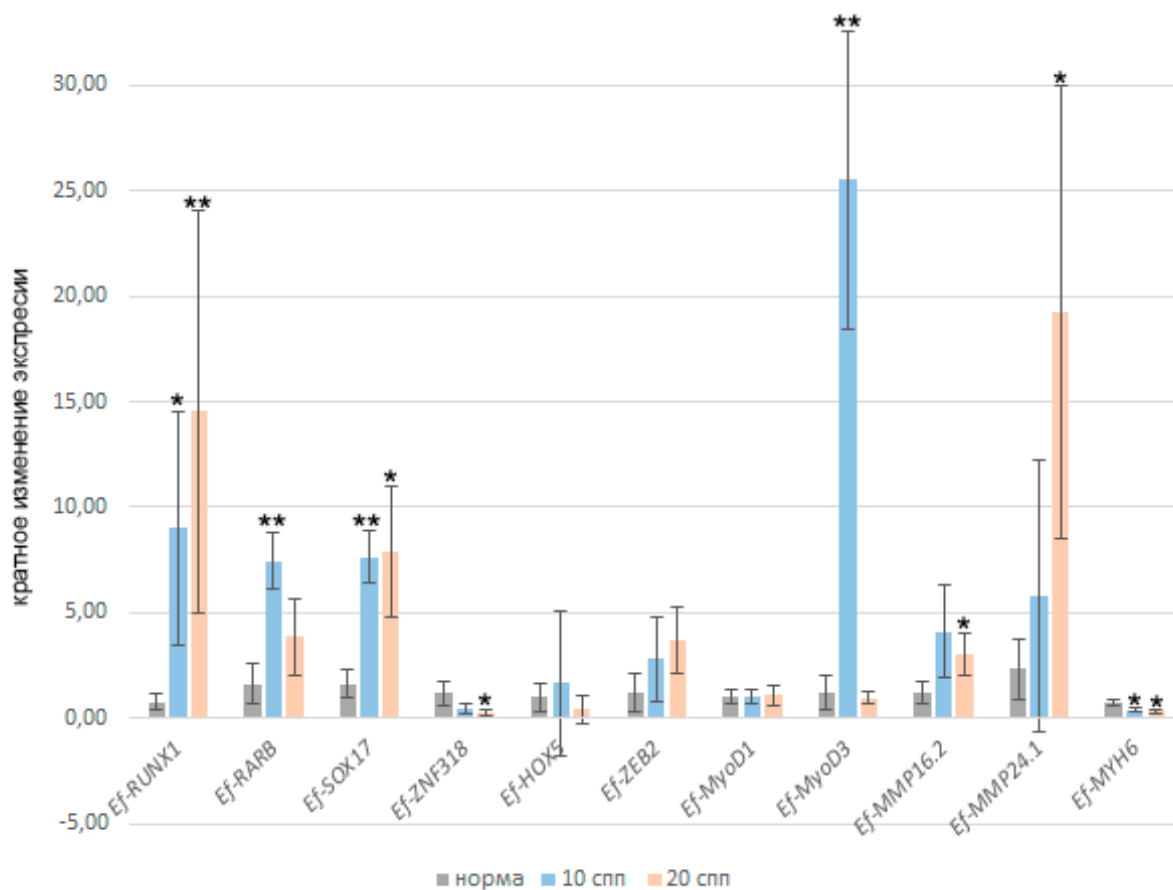
	РНК-сек 10СПД 1	РНК-сек 10СПД 2	РНК-сек 10СПД 3	РНК-сек 20СПД 1	РНК-сек 20СПД 2	РНК-сек 20СПД 3	кПЦР 10СПД 1	кПЦР 10СПД 2	кПЦР 10СПД 3	кПЦР 20СПД 1	кПЦР 20СПД 2	кПЦР 20СПД 3
РНК-сек 10СПД 1	1	0,87	0,94	0,91	0,90	0,86	0,42	0,56	0,62	0,55	0,45	0,42
РНК-сек 10СПД 2	0,87	1	0,97	0,97	0,99	0,65	0,32	0,46	0,34	0,44	0,38	0,36
РНК-сек 10СПД 3	0,94	0,97	1	0,96	0,97	0,71	0,36	0,50	0,44	0,49	0,41	0,38
РНК-сек 20СПД 1	0,91	0,97	0,96	1	0,96	0,74	0,34	0,49	0,50	0,51	0,44	0,46
РНК-сек 20СПД 2	0,90	0,99	0,97	0,96	1	0,72	0,38	0,52	0,40	0,51	0,45	0,42
РНК-сек 20СПД 3	0,86	0,65	0,71	0,74	0,72	1	0,45	0,54	0,74	0,62	0,52	0,54
кПЦР 10СПД 1	0,42	0,32	0,36	0,34	0,38	0,45	1	0,93	0,72	0,81	0,78	0,59
кПЦР 10СПД 2	0,56	0,46	0,50	0,49	0,52	0,54	0,93	1	0,74	0,80	0,84	0,66
кПЦР 10СПД 3	0,62	0,34	0,44	0,50	0,40	0,74	0,72	0,74	1	0,84	0,74	0,75
кПЦР 20СПД 1	0,55	0,44	0,49	0,51	0,51	0,62	0,81	0,80	0,84	1	0,94	0,91
кПЦР 20СПД 2	0,45	0,38	0,41	0,44	0,45	0,52	0,78	0,84	0,74	0,94	1	0,94
кПЦР 20СПД 3	0,42	0,36	0,38	0,46	0,42	0,54	0,59	0,66	0,75	0,91	0,94	1

**Рисунок 22.** Тепловая карта коэффициентов корреляции Пирсона между оценками экспрессии 9 генов (включая ТФ *Ef-HOX5*, *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, а также *Ef-MMP16.2*, *Ef-MMP24.1* и *Ef-MYH6*) методами РНК-секвенирования и кПЦР. Номера повторов отмечены цифрами в конце названий образцов.

Для того чтобы установить вариабельность экспрессии изучаемых генов, был выполнен корреляционный анализ по каждому гену в отдельности (Приложение 4). Отсутствие корреляции между методами оценки экспрессии показывают гены *Ef-ZEB2* и *Ef-HOX5* (коэффициенты -0,2 и -0,3 соответственно), средняя корреляция – у *Ef-MMP16.2* и *Ef-ZNF318* (коэффициенты 0,54 и 0,56), для остальных генов коэффициент корреляции высокий. Самыми вариабельными генами внутри одного

из методов оценки являются *Ef-ZEB2* и *Ef-HOX5*, а результаты оценки изменения относительно нормы с помощью кПЦР достоверными не являются.

Данные кПЦР показывают, что активность транскрипционных факторов *Ef-ZNF318* снижается, тогда как у *Ef-RUNX1*, *Ef-SOX17* и *Ef-RARB*, она, наоборот, повышается на обеих стадиях регенерации относительно нормы (Рисунок 23). У *Ef-MYOD1* на протяжении регенерации количество транскриптов не изменяется, в то время как у *Ef-MYOD3* сильно увеличивается через 10 спп, но через 20 спп приходит возвращается к значению нормы (Рисунок 23). *Ef-MMP24.1* и *Ef-MMP16.2* показывают достоверное повышение активности через 20 спп (Рисунок 23). В процессе регенерации количество транскриптов *Ef-MYH6* незначительно снижается (Рисунок 23).



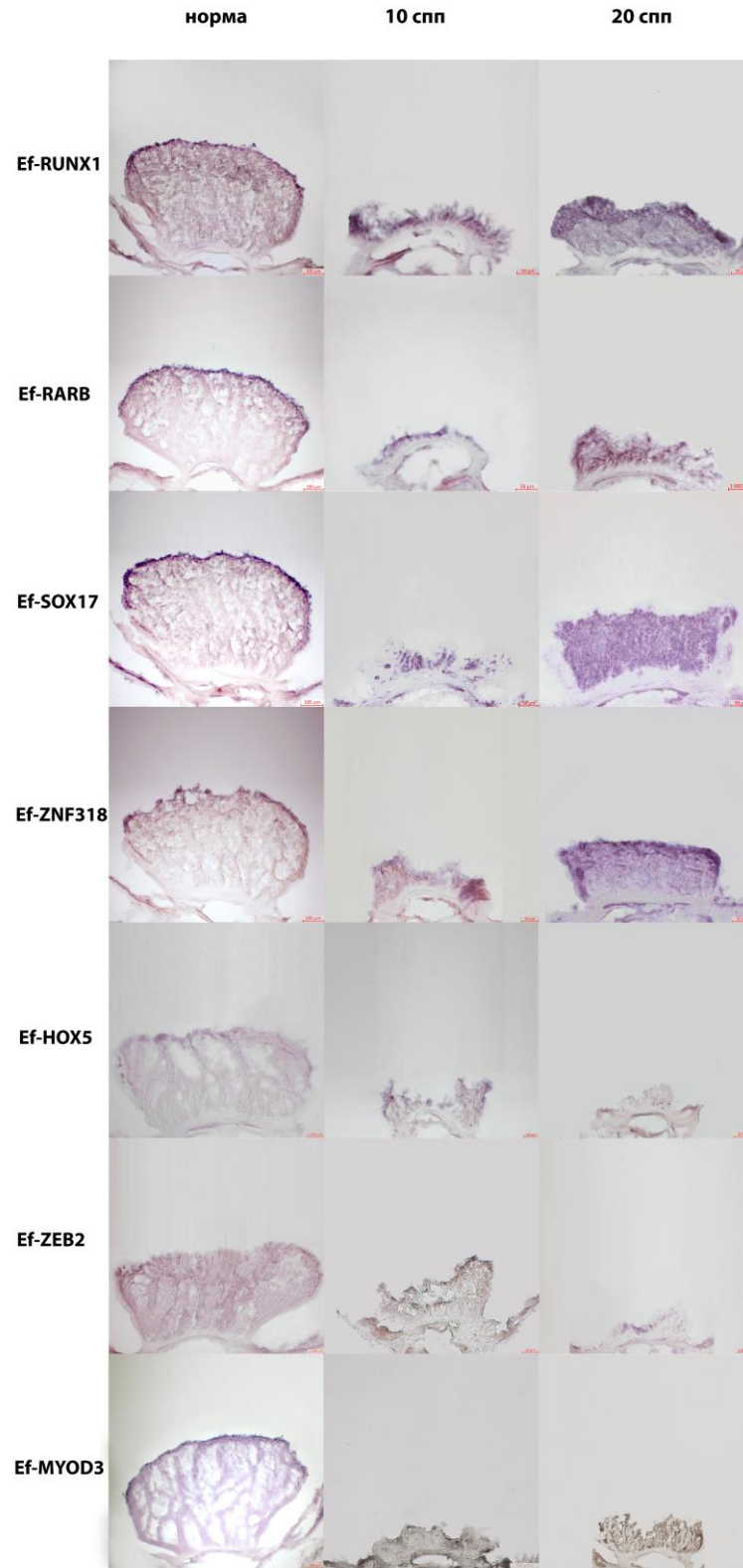
**Рисунок 23.** Полученные методом кПЦР значения оценки экспрессии генов ТФ, ММР и мышечного миозина через 10 и 20 спп. \* - значение  $p < 0.05$ , при сравнении стадии регенерации с нормой. \*\* - значение  $p < 0.01$ , при сравнении стадии регенерации с нормой.

### 3.4.2. Локализация транскриптов генов ТФ и ММР в регенерирующем амбулакре

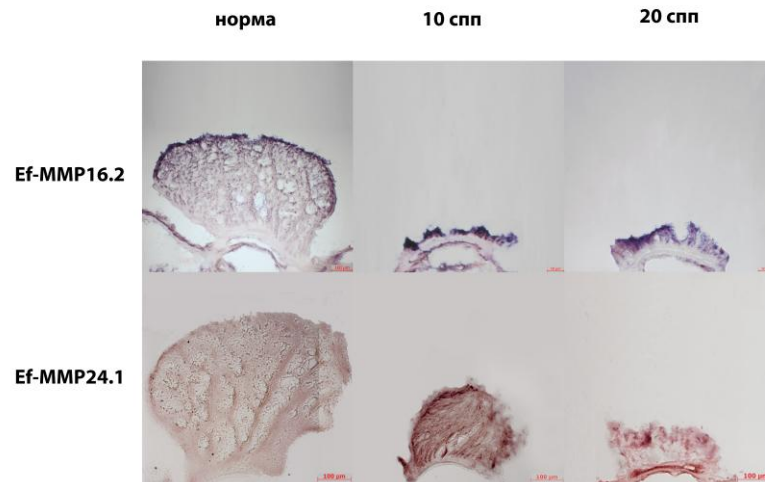
Поскольку для анализа транскриптома брали амбулакр, который помимо ПМЛ, включает в себя и другие структуры (радиальный нервный тяж, гемальный сосуд, амбулакральный канал), для подтверждения активности найденных данным методом ДЭГ именно в мышцах была изучена локализация их транскриптов в норме и при регенерации. В результате методом SISH было показано, что большинство анализируемых генов экспрессируются в ПМЛ (Рисунок 24, Рисунок 25). Кроме того, продукты некоторых из них обнаруживаются в прочих структурах амбулакра и целомическом эпителии интеррадиусов.

В неповрежденной ПМЛ транскрипты большинства исследованных генов обнаруживаются на поверхности мышцы, в целомическом эпителии. Исключение составляет только *Ef-MMP24.1*, мРНК которого в нормальных тканях ПМЛ не регистрируется. Кроме того, в норме продукты *Ef-RUNX1*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17* и *Ef-ZNF318*, *Ef-MYOD3* выявляются в целомическом эпителии и поверхностном слое ПМЛ. Через 10 спп большинство клеток зачатка ПМЛ содержат транскрипты *Ef-MYOD3*, *Ef-ZNF318*, *Ef-SOX17*, *Ef-RARB*, *Ef-RUNX1* и *Ef-MMP16.2*. Локализация мРНК только в целомическом эпителии отмечается для *Ef-HOX5*, *Ef-ZEB2* и *Ef-MMP24.1*.

Через 20 спп транскрипты *Ef-RUNX1* выявляются в целомическом эпителии и поверхностном слое регенерирующей ПМЛ. Продукты *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17* и *Ef-ZEB2*, а также генов обеих ММР отмечаются в большинстве клеток зачатка ПМЛ. Наличие мРНК генов *Ef-HOX5*, *Ef-ZEB2* и *Ef-MYOD3* обнаружено только в некоторых клетках, расположенных, в основном, на поверхности зачатка ПМЛ (Рисунок 24).



**Рисунок 24.** Локализация транскриптов генов транскрипционных факторов в регенерирующей ПМЛ.



**Рисунок 25.** Локализация транскриптов генов ММР в регенерирующей ПМЛ.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Анализ мультигенного семейства MRF у иглокожих

Наше исследование показало, что у иглокожих имеются гомологи генов MYOD семейства MRF позвоночных. В зависимости от вида, число гомологов варьирует от 1 до 3 [142]. В то же время филогенетические взаимосвязи этих генов у вторичноротых достаточно сложные и неоднозначные. MRF позвоночных кластеризуются отдельно от таковых иглокожих (Рисунок 4). При этом дивергенция и формирование членов семейства происходило, вероятно, у хордовых уже после разделения вторичноротых на Ambulacraria и Chordata. В этой связи точную гомологию между генами семейства MRF иглокожих и позвоночных установить невозможно.

Ген *MYOD1* и/или его транскрипты присутствуют у всех изученных иглокожих, за исключением голотурии *S. briareus* и морской звезды *Henricia sp.* Причиной отсутствия *MYOD1* может быть утрата гена этими видами. Однако, учитывая, что у остальных изученных иглокожих *MYOD1* присутствует, а также, что *MYOD1* играет важную роль в поддержке скелетогенной линии, как в эмбриональном развитии, так и в постнатальном периоде [61], утрата этого консервативного гена представляется маловероятной. Скорее всего причиной является неполнота данных в транскриптах *S. briareus* и *Henricia sp.* У этих видов анализировалась мРНК, находящаяся только в яйцеклетках. Вероятно, *MYOD1* не относится к генам материнского эффекта и его транскрипты не накапливаются в половых клетках.

Данные по имеющимся геномам и транскриптомам показывают, что у всех изученных иглокожих ген *MYOD1* кодирует четыре домена (Таблица 1). Такую же доменную структуру имеют и ортологи *MYOD1* исследованных видов полухордовых и хордовых. В то же время, наши исследования показали, что у морской звезды *P.*



*miniata*, морского ежа *E. tribuloides* и голотурии *A. parvimensis* MYOD1 не содержит С-концевой трансактивационный домен Myf5. Нормальное развитие мышечной системы в отсутствие домена Myf5 или даже одного из транскрипционных факторов может объясняться тем, что члены семейства MRF имеют сходные функции [143]. Ранее было показано, что у позвоночных при нокауте одного из генов *MRF*, мышцы развиваются нормально [144], в то время как при инактивации двух генов этого семейства, миогенез не происходит. Эти данные указывают на частичное дублирование функций этими генами [145]. У беспозвоночных ТФ, регулирующие развитие мышц, тоже обладают перекрывающимися функциями [146]. Так, у нематоды *Caenorhabditis elegans* гены *hlh-1*, *unc-120* и *hnd-1* (ортологи *MYOD1*, *MADS-box/SRF* и *HAND/bHLH-1* позвоночных, соответственно) сообща регулируют развитие мышц в эмбриогенезе, при этом утрата любого из них слабо влияет на развитие мышц [143]. *Nautilus*, ортолог *MYOD1* у *D. melanogaster*, тоже не является необходимым для эмбрионального миогенеза [147]. Весьма примечательно, что *hlh-1* и *Nautilus* также не имеют домен Myf5 [148]. Вероятно, отсутствие трансактивационного домена в MYOD1 у *P. miniata*, *E. tribuloides* и *A. parvimensis*, может компенсироваться работой других генов сети регуляции миогенеза.

Среди всех изученных транскриптомов иглокожих, транскрипт *MYOD2* присутствовал лишь у морской звезды *Henricia sp.* Также *MYOD2* был найден в геномах *L. variegatus*, *E. tribuloides*, *A. planci* и *A. japonica*. *MYOD2* у всех этих видов содержал участки, кодирующие домены N-TAD, basic myogenic и HLH (Таблица 2). У голотурий этот ген и/или его транскрипты нами не были обнаружены. Возможно, голотурии утратили его, но тем не менее, это предположение нуждается в проверке на большем числе видов.

Ген *MYOD3* и его транскрипты были выявлены у всех исследованных нами видов голотурий, морских ежей и морских лилий (Таблица 3). В то же время у проанализированных видов морских звезд он отсутствует, что, скорее всего, говорит об его утрате. Домен basic в MYOD3 иглокожих значительно отличается от таковых

в MYOD1 и MYOD2 иглокожих и позвоночных, главным образом заменой первой аминокислоты: лизина (MYOD1 и MYOD2 иглокожих) или аргинина (MYOD1 позвоночных) на серин или валин (Рисунок 3). Лизин и аргинин – основные аминокислоты, они взаимозаменяемы для нормальной работы домена, в то время как валин (нейтральная гидрофобная аминокислота) и серин (нейтральная полярная аминокислота) отличаются физико-химическими свойствами как от первых двух, так и между собой. Такие отличия ставят под вопрос работоспособность этого домена в MYOD3. И, если это так, MYOD3 не имеет возможности связываться с ДНК, поскольку как раз домен basic и отвечает за эту функцию [67]. Такие bHLH белки с нерабочим basic доменом относятся к группе d, члены которой выступают антагонистами белков bHLH группы a, включающую в себя MYOD1 и MYOD2 [149,150,151]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, каким образом MYOD3 участвует в транскрипционных взаимодействиях.

Филогенетический анализ, сравнение предполагаемых аминокислотных последовательностей и результаты поиска через BLAST позволяют сделать вывод, что гены *MYOD3*, хоть и относятся к семейству *MRF*, все же имеют слабую гомологию с другими его представителями (Рисунок 4). Низкая гомология внутри группы *MYOD3* и столь большие отличия в доменах наводят на мысль, что эти уникальные для иглокожих генов сильно дивергировали после дупликации.

## 4.2. Анализ мультигенного семейства ММР у иглокожих

### 4.2.1. Состав семейства ММР у *E. fraudatrix* и других иглокожих

Поиск по транскриптому ПМЛ *E. fraudatrix* выявил 22 последовательности ММР (Таблица 4) однако, филогенетический анализ и анализ доменной структуры

показывают, что последовательности Efra.gene58967\_i0 и Efra.gene60046\_i0 на самом деле к MMP не относятся.

Несмотря на наличие небольшого сходства с MMP16 при поиске по базе NCBI, на построенных филогенетических деревьях MMP, эти последовательности далеко отстоят от всех остальных (Рисунок 8, Рисунок 9). Более того, они значительно отличаются от всех изученных MMP отсутствием каталитического домена, наличием домена HYR, а также высоким количеством гемопексиновых повторов. Вероятно, последовательности Efra.gene58967\_i0 и Efra.gene60046\_i0 являются результатом ошибки при сборке транскриптома. Наличие таких артефактов, а также сложность их выявления филогенетическим анализом и поиском по базам данных, подчеркивают важность проведения дополнительно анализа доменной структуры для идентификации последовательностей, кодирующих белки со сложным мультимодульным строением. Таким образом, секвенированный нами транскриптом ПМЛ *E. fraudatrix* содержит 20 генов MMP. Учитывая, что транскриптом не содержит полную информацию о наличии генов у вида, MMP у *E. fraudatrix* может быть больше. Например, как указано ниже, ни один из найденных в транскриптом ПМЛ *E. fraudatrix* MMP не относится к группе матрилизинов, в то время как во всех геномах других изученных иглокожих они присутствуют. Поэтому, не исключено что и у *E. fraudatrix* имеются матрилизины, но при этом экспрессируется не в амбулакральных структурах, а в других органах. В любом случае, для уточнения количества генов MMP у *E. fraudatrix* необходимо иметь качественный геном данного животного.

Результаты поиска MMP в геномах других иглокожих вместе с данными по транскриптому *E. fraudatrix* показывают, что в разных классах число генов МПП сильно различается (17 MMP у голотурии *A. japonicus* и 22 MMP у морского ежа *S. purpuratus*). Примечательно, что даже среди голотурий *E. fraudatrix* и *A. japonicus* наблюдается достаточно большой разброс по числу MMP – как минимум в три гена.

В целом, число MMP у изученных иглокожих сопоставимо с таковым у позвоночных, у которых насчитывается 25-33 генов MMP [128].

#### 4.2.2. Анализ доменной структуры MMP иглокожих

Изучение доменной структуры MMP иглокожих показывает, что они имеют типичное для этого типа протеаз строение. Наличие у большинства изученных протеиназ N-концевого сигнального пептида и пропептидного домена говорит о том, что они синтезируются в виде неактивного предшественника, зимогена, который затем активируется за счет удаления пропептидного домена. Присутствие PGBD-подобного домена на N-конце ряда MMP иглокожих указывает на то, что эти MMP, как и аналогичные MMP позвоночных, могут связываться с протеогликанами и катализировать деградацию внеклеточного матрикса. Однако не все MMP иглокожих имеют PGBD-подобные домены (Рисунок 5). Возможно, что функция MMP без этих доменов не связана с трансформацией ВКМ. Они могут участвовать в регуляции миграции или дифференцировки клеток путем расщепления определенных белков, таких как интегрины или рецепторы.

Подавляющее большинство MMP иглокожих имеют цистеиновый переключатель, аминокислотная последовательность которого мало отличается от таковой у позвоночных (Рисунок 6). Цистеин, содержащийся в нем, взаимодействует с цинком каталитического домена и инактивирует протеолитическую активность проэнзима [152]. Также для многих MMP иглокожих характерно наличие активируемого фурином мотива  $RX[K/R]R$ , который также распространен у MMP позвоночных. Наличие типичного мотива связывания цинка  $HEXXHXXGXXH$  [126] в каталитическом домене MMP иглокожих, говорит о том, что их механизм расщепления белка аналогичен таковому MMP позвоночных. Таким образом, MMP иглокожих имеют стандартную доменную структуру, сходную со структурой MMP позвоночных, а также, вероятно, аналогичные механизмы действия [153,154].

Тем не менее, ММР иглокожих имеют и много уникальных особенностей. В отличие от млекопитающих у иглокожих можно выделить только три группы ММР: архетипические, матрилизины и ММР, активируемые фурином. Типичные желатиназы, сходные по структуре с желатиназами позвоночных (ММР2 и ММР9), по-видимому, у иглокожих отсутствуют. В ММР2 и ММР9 каталитический домен содержит повторы, подобные фибронектину [153], которые дают возможность связывать и расщеплять желатин. Предполагается, что эти ферменты играют важную роль в ремоделировании коллагена внеклеточного матрикса [155]. Однако ни в одной проанализированной ММР иглокожих не было обнаружено фибронектин-подобных повторов. Тем не менее, ряд ММР иглокожих способны разрушать денатурированный коллаген (желатин) [51,156–160].

Все архетипические ММР у иглокожих имеют сходное строение, в то время как доменная структура активируемых фурином ММР более разнообразна. Белки этих групп присутствуют во всех классах иглокожих, в то время как матрилизины отсутствуют у голотурии *E. fraudatrix*. Они не были обнаружены в изученном нами транскриптом *E. fraudatrix*. Как уже было сказано выше, вероятно, они не экспрессируются в ПМЛ и других структурах амбулакра. Косвенно в пользу этого говорит отсутствие экспрессии матрилизинов в мышечных тканях у млекопитающих [161]. У остальных исследованных иглокожих имеется по одному ММР, которые можно отнести к группе матрилизинов.

Кроме того, в некоторых ММР иглокожих обнаружены трансмембранные домены (Рисунок 5). Поскольку на N- и C-конце молекулы ММР находится большое число гидрофобных аминокислот (валин, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин), к определению наличия трансмембранных доменов у иглокожих следует подходить с осторожностью. В данной работе мы указывали трансмембранный домен только тогда, когда его присутствие было подтверждено несколькими способами. У исследованных видов иглокожих трансмембранные домены обнаружены как на N-, так и на C-конце молекулы ММР.

У каждого изученного вида иглокожих было идентифицировано 1-3 MMP с С-концевым трансмембранным доменом. Такие MMP отличаются по своей структуре от матриксных металлопротеиназ мембранного типа (MT-MMP I) позвоночных. В протеазах MT-MMP I типа каталитический домен содержит характерную последовательность из 8-9 аминокислот, MT-петлю [162–164]. Предполагается, что MT-Loop играет важную роль в регуляции функции MT-MMP I [163]. У иглокожих такой последовательности нет ни в одной из изученных MMP (Рисунок 7). Кроме того, все MT-MMP I позвоночных имеют цитоплазматический домен DUF3377 на С-конце, отсутствующий у MMP иглокожих. В то же время гидрофобный сайт на С-конце MMP иглокожих сходен с таковым MT-MMP гликозилфосфатидилинозитолового (GPI) типа (MT4- и MT6-MMP) позвоночных [165–167]. Таким образом, MMP иглокожих с трансмембранным доменом на С-конце более сходны с (GPI)-заякоренными MT-MMP. Однако это предположение требует дополнительной проверки.

Другая группа MMP иглокожих — протеиназы, у которых трансмембранный домен выявляется на N-конце молекулы. В этом отношении они имеют некоторое сходство с MMP мембранного типа II (MMP23) позвоночных [168, 169]. В отличие от MMP23 позвоночных, они не имеют сигнального пептида, но содержат цистеиновый переключатель и гемопексин-подобные повторы. Исключением является MMP 16.3 *E. fraudatrix*, у которой гемопексин-подобные повторы отсутствуют. Более того, у *E. fraudatrix* и *S. purpuratus* некоторые из этих протеиназ не имеют активируемого фурином мотива. Таким образом, MMP иглокожих с трансмембранным доменом на N-конце существенно отличаются не только от MMP мембранного типа II млекопитающих, но также и от MMP низших позвоночных, у которых отсутствуют С-концевые цистеин-богатые токсиноподобные и иммуноглобулиноподобные домены молекул клеточной адгезии [168] и, очевидно, не являются их гомологами. Тем не менее, возможное присутствие трансмембранного домена на N-конце молекулы указывает на то, что

рассматриваемые ММР иглокожих могут функционировать внутриклеточно, как и ММР23 у млекопитающих [169].

Отдельный вопрос вызывает большое число ММР с передним трансмембранным доменом у *E. fraudatrix*, особенно, учитывая, что у другой голотурии, *A. japonicus*, они вообще отсутствуют. Выше мы упоминали, о сложностях, связанных с достоверным выявлением трансмембранных доменных в ММР у иглокожих. Ввиду этого считаем, что данный момент нуждается в уточнении другими методами.

В дополнение к ММР с одним трансмембранным доменом было отмечено, что ММР2.2 (ХМ\_776482.5) морского ежа *S. purpuratus* имеет трансмембранные домены на обоих концах молекулы (Рисунок 3). Не ясно, является ли это ошибкой обнаружения этих доменов используемым программным обеспечением или это действительно так. Поскольку эта ММР имеет цистеиновый переключатель и активируемый фурином мотив, очевидно, что его активация связана с удалением пропептида вместе с возможным передним трансмембранным доменом. Эта структура, вероятно, отражает особенности биосинтеза и/или секреции данной протеиназы. В любом случае этот факт заслуживает дальнейшего изучения, поскольку у млекопитающих существуют функционирующие белки с трансмембранными доменами на обоих концах молекулы [170].

#### **4.2.3. Филогенетический анализ взаимоотношений ММР иглокожих, позвоночных и полухордовых.**

Несмотря на явное сходство доменной организации ММР позвоночных и иглокожих, на филогенетическом дереве большинство ММР иглокожих группируются отдельно от ММР позвоночных (Рисунок 8). Такая отдельная кластеризация, по-видимому, связана с тем, что после разделения Chordata и

*Ambulacraria* происходила активная дупликация и дивергенция предковых генов MMP независимо в обеих группах.

Всего на дереве можно выделить десять групп (Рисунок 8). Филогенетический анализ показывает, что группы, содержащие MMP иглокожих, можно разделить на четыре категории, различающиеся по близости к MMP позвоночных и, следовательно, к предковым формам MMP. В первую и вторую группы входят MMP всех исследованных видов вторичноротых. Вероятно, они образовались в результате дупликации и дивергенции нескольких предковых генов. В них входят такие MMP млекопитающих, как MMP18 и MMP21. По-видимому, гены MMP иглокожих из этой группы можно считать их ортологами. В третьей группе MMP иглокожих кластеризуются с MMP23 позвоночных. Судя по всему, MMP иглокожих из данной группы являются их ортологами. Интересно, что все MMP иглокожих, кластеризующиеся с MMP23 позвоночных, не имеют N-концевого трансмембранного домена. Это еще раз подтверждает тезис о том, что MMP иглокожих и позвоночных сильно дивергировали после разделения вторичноротых.

Четвертая и пятая группы объединяют только MMP представителей *Ambulacraria*. По-видимому, они образовались после отделения хордовых. Примечательно, что состав иглокожих в этих группах отличается: в пятой группе присутствуют только MMP морской лилии *A. japonica*, в то время как в четвертой – MMP всех исследованных видов *Ambulacraria*. Crinoidea является наиболее древним классом из ныне живущих иглокожих и, соответственно, ближе расположены к полухордовым. Такая кластеризация иллюстрирует возможную эволюцию MMP.

Шестая, седьмая и восьмая группы содержат только MMP иглокожих. Эти протеазы, по-видимому, сформировались уже после разделения иглокожих и полухордовых. Таким образом, MMP, принадлежащие к группам IV-VIII, не имеют прямой гомологии ни с одной из MMP млекопитающих.

Девятая и десятая группы объединяют MMP позвоночных. В десятой группе MMP14 морской лилии *A. japonicus*, несмотря на большое расстояние (судя по длине



ветвей), находится на одной ветви с MMP17b рыбы *D. rerio*, которая является представителем наиболее древней группы позвоночных в нашем анализе.

Наличие на филогенетических деревьях несгруппированных с другими протеазами последовательностей *A. japonica*, возможно, указывает на наличие у морских лилий предковых генов МПП, которые образовались у них после отделения Crinoidea от других иглокожих.

Построенное филогенетическое дерево MMP иглокожих показывает, что в пределах типа Echinodermata MMP также сильно дивергировали (Рисунок 9). Кроме того, хорошо видно, что между названиями MMP (наиболее вероятные гомологи в BLAST) и эволюционным родством соответствующих протеаз нет соответствия. В настоящее время идентификация MMP иглокожих осуществляется исключительно на основании близости их аминокислотной или нуклеотидной последовательности к другим протеазам в базе данных NCBI. Однако, как указано выше, основная часть MMP этих животных не ортологичны MMP позвоночных. Поэтому делать выводы о гомологии и на этом основании о сходстве функций этих протеиназ не имеет смысла. Таким образом, классификация MMP иглокожих требует пересмотра и дополнительных исследований.

### **4.3. Поиск ТФ и MMP, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ у *E.***

#### ***fraudatrix***

##### **4.3.1. Анализ дифференциальной экспрессии генов**

Анализ транскриптома выявил заметные изменения уровней экспрессии по сравнению с интактной ПМЛ у 459 генов через 10 спп и 144 - через 20 спп [171]. На первой стадии немного преобладает отрицательная регуляция (184 гена против 159), в то время как на второй стадии число генов с положительной регуляцией в 2 раза больше (43 гена против 22). При этом, среди этих двух стадий регенерации

обнаружено примерно одинаковое число общих ДЭГ с положительной и отрицательной регуляцией - 39 и 31, соответственно. Полученные данные говорят о значительной перестройке работы генома клеток во времени регенерации амбулакра у *E. fraudatrix*.

С другой стороны, найденное нами число ДЭГ значительно ниже, чем при регенерации кишки у этого же вида. В ранее проведенном исследовании на трех стадиях регенерации в сумме было выявлено 17227 ДЭГ [10]. По-видимому, такие различия объясняются особенностями морфогенезов кишки и ПМЛ. У *E. fraudatrix* при эвисцерации удаляется вся пищеварительная система и кишечная трубка формируется, фактически, *de novo* [3,10,114]. В этой связи необходима кардинальная перестройка работы генома множества клеток, особенно тех, которые задействованы в закладке кишечного эпителия. В случае регенерации структур амбулакра ситуация несколько иная. Во-первых, при перерезке радиуса голотурии сохраняются все ткани поврежденных структур и основой регенерации является частичная дедифференцировка оставшихся клеток. Глобальной перестройки работы генома при этом не требуется. Относительно небольшое число ДЭГ наблюдается и при регенерации кишки у *A. japonicus* [172]. У этого вида голотурий восстановление пищеварительной системы также происходит за счет дедифференцировки клеток оставшихся тканей пищевода [173]. При этом число ДЭГ более чем в два раза меньше такового при регенерации кишки у *E. fraudatrix*. Во-вторых, низкое число ДЭГ связано, по нашему мнению, с особенностями гомеостаза ПМЛ. По-видимому, в неповрежденной ПМЛ *E. fraudatrix* высока интенсивность миогенеза и физиологического обновления ткани, которая сопоставима с таковой при регенерации этой структуры после повреждения. Репаративная регенерация ПМЛ является продолжением нормального миогенеза и задействует те же клеточные механизмы. В этой связи при повреждении активация или ингибирование генов связано не столько с миогенезом, сколько с иммунным ответом на повреждение, восстановлением амбулакрального канала и нервного тяжа, синтезом

соединительной ткани стенки тела и зачатка ПМЛ. Все это хорошо видно при анализе сверхпредставленных биологических процессов (см. ниже).

#### 4.3.2. Поиск ТФ и MMP, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ

Для всех найденных ТФ, кроме *Ef-ZNF318*, известны функции их гомологов у позвоночных. Продукты генов *ZEB2*, *RUNX1*, *RARB*, *SOX17* вовлечены в регенерацию мышц у позвоночных [87,94,95,102,113,174]. Более того, имеются данные об участии *SOX17* и *RARB* в регенерации у голотурий [105,114]. *HOX5* связан с миогенезом у позвоночных, а также вовлечен в развитие множества других тканей [115,118,119]. Гены MMP же, как известно, играют ключевую роль в процессах преобразования ВКМ. MMP иглокожих имеют сходную доменную структуру и, очевидно, сходную функцию. Кроме того, они также способны к деградации белков соединительной ткани [51,128]. MMP являются критически важными для успешной регенерации мышц у голотурий [9,51]. Таким образом, выявленные нами гены являются хорошими кандидатами на роль регуляторов регенерации мышцы у *E. fraudatrix*. По *ZNF318*, к сожалению, нет данных о каких-либо функциях, ввиду его малой изученности.

#### 4.3.3. Анализ сети сверхпредставленных биологических процессов и путей

Построение карты биологических процессов и сигнальных путей помогает подтвердить вовлеченность найденных генов в процесс регенерации ПМЛ. Однако, как упоминалось ранее [10], мы не можем буквально интерпретировать процессы, отраженные в сети, поскольку основу онтологии генов составляют процессы, описанные у человека и других млекопитающих. Особенно это касается толкования таких групп терминов, как «biological process» и «molecular function». Набор органов беспозвоночных отличается от такового млекопитающих, а возможно гомологичные

органы могут иметь иное строение и функции [10]. Другая проблема заключается в большой эволюционной дистанции между видами, которая напрямую связана как с различиями в генах, так и с составом генных семейств. Поскольку в основе метода построение карт биологических процессов и сигнальных путей лежит использование информации о функциях генов человека, при определении функций гомологичных генов человека у беспозвоночных необходимо иметь в виду, что результаты могут быть не точными. Пример гена *SOX17* весьма показателен. Строение мышц и механизмы их обновления весьма существенно различаются у иглокожих и позвоночных [43]. Этим, вероятно, объясняется отсутствие гена *Ef-SOX17* в узлах, связанных с миогенезом у *E. fraudatrix* (Таблица 7), в то время как его транскрипты выявляются в зачатках ПМЛ (Рисунок 24).

Тем не менее набор блоков сети достаточно хорошо согласуется с процессами, происходящими при регенерации амбулакра. Помимо ПМЛ были повреждены и другие его структуры, такие как амбулакральный канал, радиальный нервный тяж и стенка тела. Блоки, связанные с регенерацией этих структур, четко проявляются в реконструированной сети.

Первой реакцией организма на повреждение является активация иммунной системы, что также характерно для иглокожих [175]. Блоки 1 и 4, имеющие наибольшее число узлов и внутренних связей, содержат процессы, связанные с различными аспектами функционирования иммунной системы (Рисунок 17, Рисунок 20). Вероятно, они отражают активацию иммунной системы и регенерацию популяции целомоцитов. При повреждении стенки тела голотурии теряют целомическую жидкость вместе с целомоцитами. Наличие в блоках 1 и 4 терминов GO (gene ontology), связанных с дифференцировкой гемопоэтических клеток, клеточным циклом и митотической активностью, различными сигнальными путями, свидетельствует об участии генов этих блоков в регуляции иммунного ответа и восстановлении популяции иммунных клеток.

Блок 5 содержит термины GO, относящиеся к миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (Рисунок 20). Эти процессы, вероятно, соответствуют трансформации эпителия радиального амбулакального канала в месте повреждения амбулакра. Регенерация радиального нерва, другой структуры амбулакра, отражается в блоке 6. Здесь объединены термины GO, связанные с нейрогенезом.

Интерпретация блока 2 является довольно сложной задачей. Он представляет собой большую группу процессов, связанных с канцерогенезом (Рисунок 18). На сегодняшний день исследователям не удалось обнаружить или вызвать новообразования ни в одном органе иглокожих. Вероятно, морфогенетические процессы, происходящие при регенерации у *E. fraudatrix*, данным методом в терминах GO интерпретируются как процессы канцерогенеза. Другая часть терминов GO данного блока ассоциирована с активностью ММР и модификацией белков соединительной ткани и, таким образом отражает преобразование ВКМ и его клеток при регенерации. Блок 7 также включает в себя процессы изменения соединительной ткани (Рисунок 21). Он содержит такие термины GO, как «морфогенез скелетной системы», «морфогенез кости» и др. Таким образом в блоках 2 и 7 содержатся процессы, связанные как с репарацией стенки тела, так и с регенерацией ПМЛ. Синтез ВКМ необходим в обоих случаях. В частности, регенерация мышц начинается с образования соединительнотканного зачатка, куда затем погружаются клетки целомического эпителия [44]. В связи с этим большую роль в этом процессе играют синтез и трансформация ВКМ. Кроме того, было показано, что блокирование ММР приводит к полной остановке регенерации ПМЛ у *E. fraudatrix* [9].

Блок 3 отражает процесс формирования мышечных пучков (Рисунок 19). Он содержит термины GO, связанные с морфогенезом структур сократительной системы. Большинство процессов, которые он содержит, имеют отрицательную регуляцию, то есть их активность ниже, чем в неповрежденной мышце. Вероятно, это можно объяснить высоким уровнем обновления мышечной ткани в норме. В

случае повреждения эти процессы либо замедляются, либо прекращаются. Также причиной относительного снижения активности миогенных процессов в ткани может быть масштабная гибель миоцитов в месте повреждения [7]. В результате этого процесса число клеток, в которых активны «мышечные» гены, снижается. Это может приводить к уменьшению количества соответствующей мРНК и занижением показателей экспрессии на стадиях регенерации.

Кроме того, такой результат может свидетельствовать о резком различии миогенеза у иглокожих и млекопитающих. У последних обновление мышц осуществляется за счет специальных стволовых клеток, миосателлитов [14]. Миогенез заключается в активации миосателлитов, их пролиферации, миогенной дифференцировке и, затем, слиянии для формирования мышечного волокна [14]. У иглокожих образование мышечных пучков как в постличиночном развитии, так и при регенерации происходит в результате миогенной трансформации части клеток целомического эпителия и формирования из них новых мышечных пучков [2,6,7,44]. Очевидно, что анализ ДЭГ выявил относительно низкий относительно нормы уровень экспрессии мышечных генов и не смог выявить уникальные гены, регулирующие процесс миогенной дифференцировки эпителиальных клеток и их погружения в ВКМ.

В этом отношении особый интерес представляет узел, содержащий гены, объединенные термином GO «heart valve development». Это единственный узел в блоке 3, который содержит положительно регулирующиеся гены (Рисунок 19). Наличие этого GO термина в сети биологических процессов регенерации ПМЛ у голотурии можно объяснить некоторым сходством морфологических и молекулярных особенностей формирования сердечного клапана у позвоночных с регенерацией ПМЛ у иглокожих [176,177]. В обоих случаях происходит накопление ВКМ с дальнейшей миграцией клеток в него.

Наличие *Ef-RUNX1* и *Ef-RARB* в блоке процессов, связанных с развитием сократительной системы, подтверждает их участие в регенерации ПМЛ. У

позвоночных RUNX1 активен при регенерации мышц после повреждения [87,174]. При этом, как и у млекопитающих, *Ef-RUNX1*, вероятно, мультифункционален. Известно, что RUNX1 способен участвовать в развитии и гомеостазе соединительной ткани, а также при различных патологиях влиять на уровень фиброза [178,179]. В сети сверхпредставленных процессов *Ef-RUNX1* присутствует в положительно регулируемых узлах блока 2, связанных с активацией MMP, катаболизма коллагена и разрушением ВКМ. В этой связи данный ген может участвовать не только в процессах миогенеза, но и формирования и модификации ВКМ у голотурий.

*Ef-RARB* в блоке миогенеза ассоциирован с процессом дифференциации мышечных клеток. Эксперименты на клеточных линиях мышей показали, что ретиновый сигналинг через RARA запускает процесс миогенной дифференциации в миообластах [180,181]. Возможно, *Ef-RARB* несет сходную функцию при регенерации ПМЛ. Присутствует RARB и в узлах блока 7, связанных с развитием соединительной ткани. Ретиновая кислота влияет на экспрессию целого ряда белков ВКМ, включая коллагены, ламинины и протеогликаны. В дополнение, RARB вовлечен в дифференциацию нервных и эпителиальных клеток. Таким образом, можно предположить, что *Ef-RUNX1* и *Ef-RARB* оказывают плеiotропное действие и имеют большое значение не только для регенерации ПМЛ, но и всего амбулакра.

HOXb5 млекопитающих согласно карте биологических процессов, функционирует только в соединительной ткани. Известно, что он положительно влияет на экспрессию генов *tenascin-C* и *FGF10* [182]. Несмотря на то, что тенасцины отсутствуют у иглокожих [79], роль *Ef-HOX5* в реорганизации ВКМ при восстановлении амбулакра не исключена. *Ef-SOX17* и *Ef-ZEB2* находятся в блоках 1 и 6 соответственно, которые не связаны с мышцами или соединительной тканью.

Каждый из блоков карты биологических процессов содержит ортологи изученных дифференциально экспрессирующиеся ТФ и MMP, за исключением блока 1, в котором MMP отсутствуют.

Их предположительные функции с точки зрения карты биологических процессов и путей описаны в разделе «Анализ временной и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов». Исключениями являются *Ef-ZNF318* и *Ef-MMP13*. *ZNF318* не был найден в карте процессов и путей, видимо, по причине отсутствия сведений о его функции, а *Ef-MMP13* не имеет ортологов среди человеческих генов, поэтому данным методом информацию о нем получить нельзя.

#### **4.4. Анализ временной и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов**

Мы показали, что данные, полученные РНК-секвенированием и кПЦР, имеют среднюю корреляцию, что говорит о расхождениях в количественной оценке уровней экспрессии этими двумя методами. В то же время, уровни корреляций повторов внутри каждого из методов оценки - выше. Различные гены могут отличаться вариабельностью экспрессии и, соответственно влиять на общую картину корреляции. Составленные карты попарных корреляций между повторами всех изученных стадий по генам в отдельности позволяют определить вклад каждого из них (Приложение 4). Таким образом, видно, *Ef-HOX5* и *Ef-ZEB2* имеют отрицательную корреляцию между оценками разными методами и сильно влияют на общий коэффициент. На точность определения уровня экспрессии при РНК секвенировании может влиять, отсутствие полной кодирующей последовательности транскрипта. Часть последовательности *Ef-ZEB2* действительно отсутствует. Скорее всего, причиной этого является, в целом, низкий уровень экспрессии гена и, следовательно, низкие количества прочтений при секвенировании и повышенная вероятность получения неполного транскрипта. Действительно, количество прочтений *Ef-ZEB2*, а также *Ef-HOX5* значительно ниже, чем у всех остальных генов. Это также соответствует данным кПЦР, которые подтверждают их низкую экспрессию: при амплификации количество транскриптов *Ef-ZEB2* и *Ef-HOX5*



превышает значение базовой линии лишь на очень поздних циклах. Слабый уровень активности гена может сам по себе влиять на расхождение в оценке изменения его экспрессии при регенерации разными методами по причине отличающихся принципов их работы. Поэтому, даже несмотря на наличие для *Ef-HOX5* полной последовательности, в силу его низкой активности, сравнительная оценка его экспрессии на разных стадиях регенерации, как и у *Ef-ZEB2* может вызывать затруднения.

По данным SISH транскрипты *Ef-HOX5* в ПМЛ наблюдаются через 10 спп (Рисунок 24). Как уже было сказано в разделе «Обзор литературы», в ходе регенерации в мышцу погружаются дедифференцированные клетки целомического эпителия для последующей миогенной трансформации (Рисунок 1г). *HOXa5*, ортолог *Ef-HOX5* у млекопитающих, во время эмбрионального развития блокирует формирование эпаксиальной мускулатуры [183]. Также на клетках мышей было показано, что при повышении экспрессии этого гена ингибируется дедифференцировка гладкомышечных клеток в синтетический фенотип, который отвечает за накопление межклеточного вещества в бляшке при атеросклерозе [184]. В наших экспериментах тоже прослеживается связь *Ef-HOX5* с процессами в соединительной ткани. Согласно карте биологических процессов данный ТФ функционирует только в блоке 7, который связан с ее развитием. Как уже было сказано, *HOXb5* положительно влияет на экспрессию двух генов ВКМ: *TNC* и *FGF10* [182]. Процессы, связанные с преобразованием соединительной ткани, играют ключевую роль в восстановлении различных структур у голотурий [2]. Спустя 10 спп после повреждения амбулакра, на концах поврежденной ПМЛ происходит накопление ВКМ и появление соединительнотканых зачатков, которые начинают рост во встречном направлении. С учетом вышесказанного, вероятно, *Ef-HOX5* участвует в регуляции дифференцировки погружающихся в соединительную ткань клеток, а также синтеза молекул ВКМ.

Транскрипты *Ef-ZEB2* наблюдаются в небольшом количестве на краю ПМЛ (Рисунок 24). Известно, что два ортолога *Ef-ZEB2* позвоночных выполняют противоположные функции: *ZEB1* является ингибитором дифференциации мышц [185,186], а *ZEB2*, наоборот, способствует дифференциации [95]. Таким образом мы предполагаем, *Ef-ZEB2* может быть вовлеченным в процесс миогенной трансформации дедифференцированных клеток целомического эпителия при их погружении в соединительнотканый зачаток. На карте биологических процессов *Ef-ZEB2* представлен только в блоке 6, связанным с нейрогенезом. По-видимому, отсутствие связи этого ТФ с миогенезом на карте биологических процессов объясняется различием в строении и механизмах обновления мышц у иглокожих и позвоночных [43]. Кроме того, *Ef-ZEB2* может участвовать в нейрогенезе при регенерации радиального нервного тяжа [60].

Экспрессия *Ef-RARB* по данным qPCR через 10 спп превышает значение нормы, что указывает на вовлеченность его продукта в регенерацию мышц (Рисунок 23). У голотурии *H. glaberrima* его гомолог участвует в дедифференцировке миоэпителиальных клеток [105]. Как было сказано ранее, новые мышечные пучки при регенерации ПМЛ формируются из клеток целомического эпителия, которые претерпевают дедифференцировку и далее мигрируют в место повреждения. Возможно, *Ef-RARB* в ходе регенерации участвует в дедифференцировке миоэпителиальных клеток. Кроме того, транскрипты *Ef-RARB* обнаружены и в ПМЛ, причем в ходе регенерации (Рисунок 24). Более того, на карте биологических процессов *RARB* присутствует в блоке миогенеза и ассоциирован с процессом дифференциации мышечных клеток. Эксперименты на клеточных линиях мышей показали, что ретиноевый сигналинг через сходный белок RARA запускает процесс миогенной дифференциации в миобластах [180,181]. Таким образом, мы предполагаем, что *Ef-RARB* принимает активное участие в регенерации ПМЛ и может выполнять противоположные функции: обеспечивать как дедифференцировку

миоэпителиальных клеток, так и регулировать процесс миогенной трансформации погружающихся в соединительную ткань дедифференцированных клеток.

Судя по карте биологических процессов, *Ef-RARB* кроме миогенеза также вовлечен в ряд других процессов. *RARB* присутствует в узлах блока 7, связанных с развитием соединительной ткани. Ретиноевая кислота способна влиять на экспрессию целого ряда белков ВКМ, включая коллагены, ламинины и протеогликаны [187–190]. Возможно, *Ef-RARB* может регулировать и перестройку соединительной ткани при регенерации. Присутствие *RARB* в узлах ассоциированных с регенерацией нейронов, указывает на возможную активность *Ef-RARB* в нервных клетках, принимающих участие в регенерации ПМЛ. Данное предположение также подкрепляется сведениями об участии *RARB* в регенерации аксонов после повреждения спинного мозга у позвоночных [191]. В дополнение, *RARB* найден в узлах дифференциации эпителиальных клеток. Вероятно, это также связано с процессами, происходящими в целомическом эпителии *E. fraudatrix*. Таким образом, можно предположить *Ef-RARB* оказывает плеiotропное действие и имеет большое значение не только для регенерации ПМЛ, но и всего амбулакра.

*Ef-RUNX1* имеет высокие показатели изменения экспрессии относительно нормы на протяжении всего процесса восстановления (Рисунок 23). ТФ *RUNX* играют важную роль в онкогенезе, кроветворении, остеогенезе, пролиферации, дифференциации и, возможно, дедифференциации клеток [80,81,192–196]. У позвоночных *RUNX1* активно участвует в регенерации мышц при повреждении [87,174]. У морского ежа *S. purpuratus* *RUNX1* контролирует пролиферацию, выживание и дифференцировку клеток на эмбриональной и личиночной стадиях развития [197–200]. Метод SISH показывает заметное количество транскриптов *Ef-RUNX1* как в интактной, так и при регенерирующей ПМЛ, что указывает на его возможную роль в миогенной дифференцировке клеток целомического эпителия (Рисунок 24). Это предположение согласуется с данными анализа сверхпредставленности биологических процессов: ортолог *RUNX1* присутствует в

узлах, связанных с развитием сердечных мышц. Наличие экспрессии *Ef-RUNX1* только во внешней части ПМЛ говорит о том, что этот ген может быть вовлечен в механизмы переключения эпителиального фенотипа на мышечный на ранних этапах миогенной дифференциации.

Данный ген обнаруживается и в других блоках на карте биологических процессов. Большой интерес представляет его присутствие в положительно регулируемых узлах блока 2, связанных с активацией MMP, катаболизма коллагена и разрушением ВКМ. Известно, что RUNX1 способен при патологиях влиять на уровень фиброза, а в норме участвовать в развитии и гомеостазе соединительной ткани [178,179]. Также этот ген встречается в узлах процессов дифференциации гемопоэтических стволовых клеток; развития и дифференциации клеток эпидермиса; и иммунного ответа. Судя по всему, *Ef-RUNX1*, как и *Ef-RARB* оказывает плеiotропное действие и, возможно, вовлечен в регенерацию ряда амбулакральных структур.

При регенерации в ПМЛ отмечается наличие транскриптов *Ef-SOX17* (Рисунок 24). *SOX17*, ортолог *Ef-SOX17* у позвоночных, во время регенерации мышц влияет на самообновление и ингибирует дифференцировку миосателлитных клеток [113]. У *E. fraudatrix* *Ef-SOX17* экспрессируется в дедифференцированных клетках целомического эпителия регенерирующего кишечника [114]. Транскрипты *Ef-SOX17* локализованы в целомическом эпителии поверхности ПМЛ и внутри нее в норме и при регенерации. А также в целомическом эпителии интеррадиусов в норме. Мы предполагаем, что *Ef-SOX17* активно вовлечен в регенерацию ПМЛ и возможно необходим для поддержания клеток целомического эпителия в дедифференцированном состоянии, с целью защиты от преждевременной дифференциации во время их погружения в соединительнотканый зачаток ПМЛ.

*Ef-ZNF318* является ортологом *ZNF318* позвоночных. Информация о функциях этого гена отсутствует. Это объясняет почему *ZNF318* не обнаруживается

ни в одном из узлов карты биологических процессов. Однако факт его локализации в ПМЛ указывает на участие в восстановлении этой структуры у *E. fraudatrix*.

Также мы показали различия в экспрессии генов семейства MRF у *E. fraudatrix*. При регенерации мышц экспрессия *Ef-MYOD3* увеличивается значительно, в то время как число транскриптов *Ef-MYOD1* не меняется (Рисунок 23). Это может указывать на особую роль *Ef-MYOD3* в регенерации ПМЛ, а также на различия в миогенезе у позвоночных и иглокожих. Сложно говорить о конкретных функциях данного гена, поскольку он не имеет ортологов за пределами типа Echinodermata. По данным SISH, транскрипты *Ef-MYOD3* локализованы на поверхности интактной и регенерирующей ПМЛ и показывают повышенную активность через 10 спп (Рисунок 24). Вероятно, *Ef-MYOD3* является одним из регуляторов миогенеза у *E. fraudatrix*.

Ортологи MMP человека для шести из семи MMP *E. fraudatrix*, экспрессия которых меняется после повреждения, находятся в блоке процессов ВКМ. Это ожидаемо, поскольку данные протеазы в основном участвуют в реорганизации соединительной ткани. *Ef-MMP13* отсутствует на карте биологических процессов, поскольку он не имеет ортологов среди человеческих генов. *MMP14*, ортолог *Ef-MMP24* помимо кластера ВКМ, также присутствует в большинстве остальных блоков, что подразумевает у него наличие нескольких функций. Таким образом, наши данные указывают на возможное участие шести протеаз в регенерации ПМЛ. Для *Ef-MMP16.2* и *Ef-MMP24.1* была произведена оценка пространственно-временной экспрессии, результаты которой подтверждают предположение о вовлеченности MMP в регенерацию (Рисунок 23, Рисунок 25). Транскрипты *Ef-MMP16.2* наблюдаются в большинстве мышечных клеток интактной и регенерирующей ПМЛ – возможно это говорит о том, что данная протеаза обеспечивает погружение клеток целомического эпителия в соединительную ткань за счет разрушения ВКМ.

Отдельный интерес представляет наличие транскриптов большинства изученных генов в целомическом эпителии поверхности мышцы и под ним. Присутствие транскриптов на поверхности ПМЛ говорит о более активных миогенных процессах в этой области. Мы предполагаем, что они экспрессируются клетками целомического эпителия, которые погружаются в регенерирующую мышцу. Интересно, что такая же картина наблюдается для интактных мышц, при этом во всех случаях во внутренней области мышцы наблюдается значительно меньше транскриптов. Такая локализация транскриптов ТФ подтверждает наше предположение о том, что в интактной ПМЛ имеется высокий уровень обновления мышечной ткани (физиологическая регенерация). Кроме того, это объясняет результаты анализа данных РНК-секвенирования транскриптома ПМЛ: экспрессия большинства генов, связанных с миогенезом не увеличивается в ходе регенерации, потому что в норме в продольной мышце *E. fraudatrix* и так идет интенсивный миогенез.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иглокожие обладают значительным набором генов, гомологичных MMP и миогенным ТФ позвоночных животных. В этой связи анализ этих генов представляет интерес для понимания молекулярных механизмов регенерации мышц и, в частности ПМЛ у голотурии *E. fraudatrix*. У всех представителей типа Echinodermata найдены гены MRF, играющие ключевую роль в миогенезе как хордовых, так и многих групп беспозвоночных животных. *MYOD1* и *MYOD2* иглокожих имеют высокую степень гомологии с MRF позвоночных. В то же время *MYOD3*, по-видимому, сильно дивергировал в процессе эволюции Echinodermata. Однако именно этот ген активно экспрессируется при регенерации ПМЛ у *E. fraudatrix*, что однозначно указывает на его участие в миогенезе у голотурий.

Гены, кодирующие матриксные металлопротеиназы у иглокожих, по-видимому, неоднократно дублировались и сильно дивергировали после разделения Ambulacraria и Chordata. Их число у иглокожих примерно равно числу MMP у млекопитающих. Кроме того, доменная структура данных протеиназ близка у иглокожих и позвоночных. Это позволяет сделать вывод о том, что у иглокожих MMP, скорее всего, также вовлечены в ремоделирование внеклеточного матрикса и могут быть задействованы в преобразовании соединительной ткани при регенерации ПМЛ.

Анализ данных РНК-секвенирования регенерирующих ПМЛ у *E. fraudatrix* позволил установить семь генов ТФ и MMP, потенциально связанных с миогенезом. Это *Ef-HOX5*, *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, *Ef-MYOD3*, а также *Ef-MMP24.1*, *Ef-MMP16.2*. Полученные результаты коррелируют с данными SISH по локализации транскриптов этих генов в ПМЛ. Были выдвинуты предположения о роли ряда генов в восстановлении ПМЛ у *E. fraudatrix*. Так, вероятно, *Ef-SOX17* защищает клетки целомического эпителия от преждевременной дифференциации во время их погружения в соединительнотканый зачаток, а *Ef-*

*RUNX1*, наоборот, отвечает за дифференциацию клеток целомического эпителия в миоциты; *Ef-RARB* может участвовать как в дифференциации, так и в дедифференциации; *Ef-MMP16.2*, возможно, обеспечивает процесс погружения клеток целомического эпителия в соединительную ткань за счет разрушения ВКМ. Сложно предполагать конкретные роли в миогенезе ПМЛ для *Ef-ZNF318* и *Ef-MYOD3* ввиду того, что функции первого не изучались, а второй не имеет ортологов среди других животных. Однако, очень интересно, что по данным кПЦР и SISH, именно *Ef-MYOD3*, но не *Ef-MYOD1* в ходе регенерации показывает изменение уровня экспрессии и локализации в транскриптов в ПМЛ. Такая разница не просто говорит о потенциальном участии этого гена в регуляции процесса восстановления ПМЛ у *E. fraudatrix*, но также указывает на различия в миогенезе у позвоночных и иглокожих. Это предположение находит отражение в результатах анализа сети сверхпредставленных биологических процессов и путей, в которой большинство узлов, ассоциированных с миогенезом позвоночных, регулируется отрицательно. С другой стороны, отсутствие увеличения активности мышечных процессов в сети может объясняться интенсивным миогенезом в интактной ПМЛ (а уменьшение – гибелью миоцитов в результате некроза после повреждения). Репаративная регенерация ПМЛ является продолжением нормального миогенеза и задействует те же клеточные механизмы. Весьма показательно, что в случае эвисцерации кишки у *E. fraudatrix*, когда удаляются все ткани энтодермального происхождения и происходит трансдифференцировка мезодермальных клеток, восстановление сопровождается более интенсивными перестройками работы генома. Дополнительно, наглядное подтверждение идеи активного миогенеза в норме мы получили методом SISH, который показал, что большинство изученных нами генов экспрессируется в целомическом эпителии интактной ПМЛ и под ним.

Таким образом, нам удалось показать общие особенности миогенеза ПМЛ у голотурий, а также выявить перспективные гены для дальнейших функциональных исследований для понимания работы молекулярных механизмов данного процесса.



## ВЫВОДЫ

1. У морских лилий, морских ежей и голотурий обнаружен ген *MYOD3*, имеющий слабую гомологию с генами MRF хордовых и полухордовых.
2. Матриксные металлопротеиназы иглокожих содержат все основные консервативные домены, свойственные данному классу протеиназ позвоночных, и, вероятно, выполняют сходную функцию.
3. У голотурии *Eupentacta fraudatrix* экспрессия генов *Ef-HOX5*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-MYOD3*, *Ef-MMP24.1*, *Ef-MMP16.2*, *Ef-MMP16.3*, *Ef-MMP13*, *Ef-MMP24* и *Ef-MMP11* увеличивается, а *Ef-ZNF318*, *Ef-ZEB2* и *Ef-MMP13.2* уменьшается при регенерации продольных мышечных лент.
4. Транскрипты генов *Ef-HOX5*, *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, *Ef-MYOD3*, *Ef-MMP24.1* и *Ef-MMP16.2* локализованы в формирующихся продольных мышечных лентах голотурии *Eupentacta fraudatrix*, что указывает на их потенциальное участие в регуляции регенерации данного органа.
5. Транскрипты *Ef-ZNF318*, *Ef-RARB*, *Ef-SOX17*, *Ef-RUNX1*, *Ef-ZEB2*, *Ef-MYOD3*, *Ef-MMP16.2* активно экспрессируются в целомическом эпителии интактной ПМЛ *Eupentacta fraudatrix*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долматов И.Ю., Бобровская Н.В., Гирич А.С. Иглокожие как модельные объекты для изучения механизмов регенерации // Вестник СПбГУ. Серия 3: Биология. 2014, № 3. С. 96- 112.
2. Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука, 2007. 212 p.
3. Mashanov V.S., García-Arrarás J.E. Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments // Biol. Bull. 2011. Vol. 221, № 1. P. 93–109.
4. Mashanov V.S., Dolmatov I.Y., Heinzeller T. Transdifferentiation in holothurian gut regeneration // Biol. Bull. 2005. Vol. 209, № 3. P. 184–193.
5. Mozzi D., Dolmatov I.Y., Bonasoro F., Candia Carnevali M.D. Visceral regeneration in the crinoid: basic mechanisms, tissues and cells involved in gut regrowth // Cent. Eur. J. Biol. 2006. Vol. 1, № 4. P. 609–635.
6. Dolmatov I.Y., Eliseikina M.G., Ginanova T.T., Lamash N.E., Korchagin V.P., Bulgakov A.A. Muscle regeneration in the holothurian *Stichopus japonicus* // Roux's Arch. Dev. Biol. 1996. Vol. 205, № 7. P. 486–493.
7. Dolmatov I.Yu., Ginanova T.T. Muscle regeneration in holothurians // Microsc. Res. Tech. 2001. Vol. 55, № 6. P. 452–463.
8. Medina-Feliciano J.G., García-Arrarás J.E. Regeneration in Echinoderms: Molecular Advancements // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Vol. 9. Article no. 768641. DOI: 10.3389/fcell.2021.768641
9. Dolmatov I.Yu., Shulga A.P., Ginanova T.T., Eliseikina M.G., Lamash N.E. Metalloproteinase inhibitor GM6001 delays regeneration in holothurians // Tissue Cell. 2019. Vol. 59. P. 1–9.
10. Boyko A.V., Girich A.S., Tkacheva E.S., Dolmatov I.Y. The *Eupentacta fraudatrix* transcriptome provides insights into regulation of cell transdifferentiation // Sci. Rep. 2020. Vol. 10, № 1. Article no. 1522. DOI: 10.1038/s41598-020-58470-0

11. Gabor M.H., Hotchkiss R.D. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts // J. Bacteriol. 1979. Vol. 137, № 3. P. 1346–1353.
12. Карлсон Б.М. Регенерация. Москва: Наука, 1986. 296 p.
13. Iismaa S.E., Kaidonis X., Nicks A.M., Bogush N., Kikuchi K., Naqvi N., Harvey R.P., Husain A., Graham R.M. Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues // NPJ. Regen. Med. 2018. Vol. 3. Article no. 6. DOI: 10.1038/s41536-018-0044-5
14. Carlson B.M. Some principles of regeneration in mammalian systems // Anat. Rec. B. New. Anat. 2005. Vol. 287, № 1. P. 4–13.
15. Zhao A., Qin H., Fu X. What Determines the Regenerative Capacity in Animals? // BioScience. 2016. Vol. 66, № 9. P. 735–746.
16. Saera-Vila A., Louie K.W., Sha C., Kelly R.M., Kish P.E., Kahana A. Extraocular muscle regeneration in zebrafish requires late signals from Insulin-like growth factors // PLoS One. 2018. Vol. 13, № 2. Article no. e0192214. DOI: 10.1371/journal.pone.0192214
17. Galliot B., Tanaka E., Simon A. Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair // Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65, № 1. P. 1–7.
18. Jopling C., Boue S., Izpisua Belmonte J.C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. Vol. 12, № 2. P. 79–89.
19. Ciciliot S., Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications // Curr. Pharm. Des. 2010. Vol. 16, № 8. P. 906–914.
20. Swalla B.J., Smith A.B. Deciphering deuterostome phylogeny: molecular, morphological and palaeontological perspectives // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2008. Vol. 363, № 1496. P. 1557–1568.

21. Oji T. Fossil record of echinoderm regeneration with special regard to crinoids // *Microsc. Res. Tech.* 2001. Vol. 55, № 6. P. 397–402.
22. Baumiller T.K., Gahn F.J. Testing predator-driven evolution with Paleozoic crinoid arm regeneration // *Science*. 2004. Vol. 305, № 5689. P. 1453–1455.
23. Догель В.А. Зоология беспозвоночных. Москва: Высшая школа, 1891. 615 p.
24. Rahman I., Zamora S. Origin and early evolution of Echinoderms // *Ann. Rev. Earth Planet Sci.* 2024. Vol. 52. P. 295-320.
25. Kalacheva N.V., Eliseikina M.G., Frolova L.T., Dolmatov I.Yu. Regeneration of the digestive system in the crinoid *Himerometra robustipinna* occurs by transdifferentiation of neurosecretory-like cells // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 7. Article no. e0182001. DOI: 10.1371/journal.pone.0182001
26. Литвинова Н.М., Жаркова И.С. Аутономия и регенерация у офиуры *Amphipholis kochii* // *Зоол. журн.* 1977. Vol. 56, № 9. P. 1320–1327.
27. Magalhães F., Andrade C., Simões B., Brigham F., Valente R., Martinez P., Rino J., Sugni M., Coelho A.V. Regeneration of starfish radial nerve cord restores animal mobility and unveils a new coelomocyte population // *Cell Tissue Res.* 2023. Vol. 394, № 2. P. 293–308.
28. Ben Khadra Y., Sugni M., Ferrario C., Bonasoro F., Oliveri P., Martinez P., Candia Carnevali M.D. Regeneration in stellate Echinoderms: Crinoidea, Asteroidea and Ophiuroidea // *Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine* / ed. Kloc M., Kubiak J.Z. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 285–320.
29. Ben Khadra Y., Ferrario C., Di Benedetto C., Said K., Bonasoro F., Carnevali M.D.C., Sugni M. Wound repair during arm regeneration in the red starfish *Echinaster sepositus* // *Wound Repair Regen.* 2015. Vol. 23, № 4. P. 611–622.
30. Candia Carnevali M.D. Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning // *Invert. Surviv. J.* 2006. Vol. 3, № 1. P. 64–76.

31. Nakano H., Hibino T., Hara Y., Oji T., Amemiya S. Regrowth of the stalk of the sea lily, *Metacrinus rotundus* (Echinodermata: Crinoidea) // J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol. 2004. Vol. 301, № 6. P. 464–471.
32. Amemiya S., Oji T. Regeneration in sea lilies // Nature. 1992. Vol. 357, № 6379. P. 546–547.
33. Reinardy H.C., Emerson C.E., Manley J.M., Bodnar A.G. Tissue regeneration and biomineralization in sea urchins: role of notch signaling and presence of stem cell markers // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 8. Article no. e0133860. DOI: 10.1371/journal.pone.0133860
34. Dolmatov I.Y., Ginanova T.T. Post-autotomy regeneration of respiratory trees in the holothurian *Apostichopus japonicus* (Holothuroidea, Aspidochirotida) // Cell Tissue Res. 2009. Vol. 336, № 1. P. 41–58.
35. García-Arrarás J.E., Greenberg M.J. Visceral regeneration in holothurians // Microsc. Res. Tech. 2001. Vol. 55, № 6. P. 438–451.
36. García-Arrarás J.E., Estrada-Rodgers L., Santiago R., Torres I.I., Díaz-Miranda L., Torres-Avillán I. Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata) // J. Exp. Zool. 1998. Vol. 281, № 4. P. 288–304.
37. Forcina L., Cosentino M., Musarò A. Mechanisms regulating muscle regeneration: insights into the interrelated and time-dependent phases of tissue healing // Cells. 2020. Vol. 9, № 5. Article no. 1297. DOI: 10.3390/cells9051297
38. Jopling C., Sleep E., Raya M., Martí M., Raya A., Belmonte J.C.I. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation // Nature. 2010. Vol. 464, № 7288. P. 606–609.
39. Brockes J.P. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure // Science. 1997. Vol. 276, № 5309. P. 81–87.

40. Beffagna G. Zebrafish as a smart model to understand regeneration after heart injury: how fish could help humans // *Front. Cardiovasc. Med.* 2019. Vol. 6. Article no. 107. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00107
41. Lin Y.C.J., Grigoriev N.G., Spencer A.N. Wound healing in jellyfish striated muscle involves rapid switching between two modes of cell motility and a change in the source of regulatory calcium // *Dev. Biol.* 2000. Vol. 225, № 1. P. 87–100.
42. Leclère L., Röttinger E. Diversity of cnidarian muscles: function, anatomy, development and regeneration // *Front. Cell Dev. Biol.* 2017. Vol. 4. Article no. 157. DOI: 10.3389/fcell.2016.00157
43. Zullo L., Bozzo M., Daya A., Di Clemente A., Mancini F.P., Megighian A., Nesher N., Röttinger E., Shomrat T., Tiozzo S. The diversity of muscles and their regenerative potential across animals // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 9. Article no. 1925. DOI: 10.3390/cells9091925
44. Garcia-Arraras J., Dolmatov I. Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration // *Curr. Pharm. Des.* 2010. Vol. 16, № 8. P. 942–955.
45. Stauber M. The lantern of Aristotle: organization of its coelom and origin of its muscles (Echinodermata, Echinoida) // *Zoomorphology.* 1993. Vol. 113, № 2. P. 137–151.
46. Prosser C.L., Mackie G.O. Contractions of holothurian muscles // *J. Comp. Physiol.* 1980. Vol. 136, № 2. P. 103–112.
47. Hyman L.H. *The Invertebrates: Echinodermata, the coelomate Bilateria.* McGraw-Hill, 1940. 790 p.
48. Carnevali M.D.C., Saita A. Muscle system organization in the echinoderms: II. Microscopic anatomy and functional significance of the muscle-ligament-skeleton system in the arm of the comatulids (*Antedon mediterranea*) // *J. Morphol.* 1985. Vol. 185, № 1. P. 59–74.
49. Dolmatov I.Yu., Ivantey V.A. Histogenesis of longitudinal muscle bands in holothurians // *Russ. J. Dev. Biol.* 1993. № 24. P. 401–405.

50. Dolmatov I.Yu. Origin and development of somatic muscle in phylogeny of Deuterostomia // *Biology Bull.* 1998. № 25. P. 529–539.
51. Shulga A.P., Lamash N.E. Proteinases with gelatinase activity and their role in ambulacrum regeneration in holothurians *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov and Baranova, 1958) and *Cucumaria japonica* (Semper, 1868) (Echinodermata: Holothuroidea) // *Russ. J. Mar. Biol.* 2020. Vol. 46, № 6. P. 461–471.
52. Roeder R.G. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II // *Trends Biochem. Sci.* 1996. Vol. 21, № 9. P. 327–335.
53. Lee T.I., Young R.A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes // *Annu. Rev. Genet.* 2000. Vol. 34. P. 77–137.
54. Frietze S., Farnham P.J. Transcription factor effector domains // *Subcell Biochem.* 2011. Vol. 52. P. 261–277.
55. Hsia C.C., McGinnis W. Evolution of transcription factor function // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003. Vol. 13, № 2. P. 199–206.
56. Musarò A. The basis of muscle regeneration // *Advances in Biology.* Hindawi, 2014. Vol. 2014. Article no. e612471. DOI: 10.1155/2014/612471
57. Cebrià F. Planarian body-wall muscle: regeneration and function beyond a simple skeletal support // *Front Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 4. Article no. 8. DOI: 10.3389/fcell.2016.00008
58. Currie K.W., Brown D.D.R., Zhu S., Xu C., Voisin V., Bader G.D., Pearson B.J. HOX gene complement and expression in the planarian *Schmidtea mediterranea* // *Evodevo.* 2016. Vol. 7. Article no. 7. DOI: 10.1186/s13227-016-0044-8
59. Cutie S., Hoang A.T., Payumo A.Y., Huang G.N. Unconventional functions of muscles in planarian regeneration // *Dev. Cell.* 2017. Vol. 43, № 6. P. 657–658.
60. Buckingham M., Rigby P.W.J. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis // *Dev. Cell.* 2014. Vol. 28, № 3. P. 225–238.

61. Venuti J.M., Goldberg L., Chakraborty T., Olson E.N., Klein W.H. A myogenic factor from sea urchin embryos capable of programming muscle differentiation in mammalian cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991. Vol. 88, № 14. P. 6219–6223.
62. Araki S., Saiga H., Makabe K.W., Satoh N. Expression of AMD 1, a gene for a MyoD 1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi* // Rouxs Arch. Dev. Biol. 1994. Vol. 203, № 6. P. 320–327.
63. Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J. R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. Vol. 287, № 5461. P. 2185–2195.
64. Howard-Ashby M., Materna S.C., Brown C.T., Chen L., Cameron R.A., Davidson E.H. Gene families encoding transcription factors expressed in early development of *Strongylocentrotus purpuratus* // Dev. Biol. 2006. Vol. 300, № 1. P. 90–107.
65. Dehal P., Satou Y., Campbell R.K., Chapman J., Degnan B., De Tomaso A., Davidson B., Di Gregorio A., Gelpke M., Goodstein D.M., Harafuji N., Hastings K.E., Ho I., Hotta K., Huang W., Kawashima T., Lemaire P., Martinez D., Meinertzhagen I.A., Nacula S. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins // Science. 2002. Vol. 298, № 5601. P. 2157–2167.
66. Singh K., Dilworth F.J. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors // FEBS J. 2013. Vol. 280, № 17. P. 3991–4003.
67. Lassar A.B., Davis R.L., Wright W.E., Kadesch T., Murre C., Voronova A., Baltimore D., Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo // Cell. 1991. Vol. 66, № 2. P. 305–315.



68. Bergstrom D.A., Tapscott S.J. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family // *Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 21, № 7. P. 2404–2412.
69. Weintraub H., Dwarki V.J., Verma I., Davis R., Hollenberg S., Snider L., Lassar A., Tapscott S.J. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD // *Genes Dev.* 1991. Vol. 5, № 8. P. 1377–1386.
70. Ishibashi J., Perry R.L., Asakura A., Rudnicki M.A. MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal regions // *J. Cell Biol.* 2005. Vol. 171, № 3. P. 471–482.
71. Atchley W.R., Fitch W.M., Bronner-Fraser M. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. Vol. 91, № 24. P. 11522–11526.
72. White J.D., Scaffidi A., Davies M., McGeachie J., Rudnicki M.A., Grounds M.D. Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice // *J. Histochem. Cytochem.* 2000. Vol. 48, № 11. P. 1531–1544.
73. Pavlath G.K., Dominov J.A., Kegley K.M., Miller J.B. Regeneration of transgenic skeletal muscles with altered timing of expression of the basic helix-loop-helix muscle regulatory factor MRF4 // *Am. J. Pathol.* 2003. Vol. 162, № 5. P. 1685–1691.
74. Karalaki M., Fili S., Philippou A., Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events // *In Vivo.* 2009. Vol. 23, № 5. P. 779–796.
75. Hernández-Hernández J.M., García-González E.G., Brun C.E., Rudnicki M.A. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017. Vol. 72. P. 10–18.
76. Asfour H.A., Allouh M.Z., Said R.S. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2018. Vol. 243, № 2. P. 118–128.

77. Burns G., Thorndyke M.C., Peck L.S., Clark M.S. Transcriptome pyrosequencing of the Antarctic brittle star *Ophionotus victoriae* // *Mar. Genomics*. 2013. Vol. 9. P. 9–15.
78. Quispe-Parra D.J., Medina-Feliciano J.G., Cruz-González S., Ortiz-Zuazaga H., García-Arrarás J.E. Transcriptomic analysis of early stages of intestinal regeneration in *Holothuria glaberrima* // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. Article no. 346. DOI: 10.1038/s41598-020-79436-2
79. Dolmatov I.Yu., Afanasyev S.V., Boyko A.V. Molecular mechanisms of fission in echinoderms: Transcriptome analysis // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 4. Article no. e0195836. DOI: 10.1371/journal.pone.0195836
80. Sullivan J.C., Sher D., Eisenstein M., Shigesada K., Reitzel A.M., Marlow H., Levanon D., Groner Y., Finnerty J.R., Gat U. The evolutionary origin of the Runx/CBFbeta transcription factors – Studies of the most basal metazoans // *BMC Evol. Biol.* 2008. Vol. 8, № 1. Article no. 228. DOI: 10.1186/1471-2148-8-228
81. Seo W., Taniuchi I. The roles of RUNX family proteins in development of immune cells // *Mol. Cells*. 2020. Vol. 43, № 2. P. 107–113.
82. Wang S.W., Speck N.A. Purification of core-binding factor, a protein that binds the conserved core site in murine leukemia virus enhancers // *Mol. Cell Biol.* 1992. Vol. 12, № 1. P. 89–102.
83. Miyoshi H., Ohira M., Shimizu K., Mitani K., Hirai H., Imai T., Yokoyama K., Soeda E., Ohki M. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia // *Nucleic Acids Res.* 1995. Vol. 23, № 14. P. 2762–2769.
84. Choi J.Y., Pratap J., Javed A., Zaidi S.K., Xing L., Balint E., Dalamangas S., Boyce B., van Wijnen A.J., Lian J.B., Stein J.L, Jones S.N, Stein G.S. Subnuclear targeting of Runx/Cbfa/AML factors is essential for tissue-specific differentiation during embryonic development // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98, № 15. P. 8650–8655.

85. Mevel R., Draper J.E., Lie-A-Ling M., Kouskoff V., Lacaud G. RUNX transcription factors: orchestrators of development // *Development*. 2019. Vol. 146, № 17. Article no. dev148296. DOI: 10.1242/dev.148296
86. Newton A.H., Pask A.J. Evolution and expansion of the RUNX2 QA repeat corresponds with the emergence of vertebrate complexity // *Commun. Biol.* 2020. Vol. 3, № 1. Article no. 771. DOI: 10.1038/s42003-020-01501-3
87. Umansky K.B., Gruenbaum-Cohen Y., Tsoory M., Feldmesser E., Goldenberg D., Brenner O., Groner Y. Runx1 transcription factor is required for myoblasts proliferation during muscle regeneration // *PLoS Genet.* 2015. Vol. 11, № 8. Article no. e1005457. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005457
88. Soen B., Vandamme N., Berx G., Schwaller J., Van Vlierberghe P., Goossens S. ZEB proteins in leukemia: friends, foes, or friendly foes? // *Hemasphere*. 2018. Vol. 2, № 3. Article no. e43. DOI: 10.1097/HS9.0000000000000043
89. Bruneel K., Verstaeppe J., Vandamme N., Berx G. Intrinsic balance between ZEB family members is important for melanocyte homeostasis and melanoma progression // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 8. Article no. 2248. DOI: 10.3390/cancers12082248
90. Verstappen G., van Grunsven L.A., Michiels C., Van de Putte T., Souopgui J., Van Damme J., Bellefroid E., Vandekerckhove J., Huylebroeck D. Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFHX1B/SIP1 and NuRD corepressor complex // *Hum. Mol. Genet.* 2008. Vol. 17, № 8. P. 1175–1183.
91. Nishimura G., Manabe I., Tsushima K., Fujiu K., Oishi Y., Imai Y., Maemura K., Miyagishi M., Higashi Y., Kondoh H., Nagai R. DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation // *Dev. Cell*. 2006. Vol. 11, № 1. P. 93–104.
92. Vandewalle C. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 20. P. 6566–6578.

93. Brabletz S., Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? // *EMBO Rep.* 2010. Vol. 11, № 9. P. 670–677.
94. Siles L., Ninfali C., Cortés M., Darling D.S., Postigo A. ZEB1 protects skeletal muscle from damage and is required for its regeneration // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. Article no. 1364. DOI: 10.1038/s41467-019-08983-8
95. Di Filippo E.S., Costamagna D., Giacomazzi G., Cortés-Calabuig Á., Stryjewska A., Huylebroeck D., Fulle S., Sampaolesi M. Zeb2 regulates myogenic differentiation in pluripotent stem cells // *Int. J. Mol Sci.* 2020. Vol. 21, № 7. Article no. 2525. DOI: 10.3390/ijms21072525
96. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors // *FASEB J.* 1996. Vol. 10, № 9. P. 940–954.
97. Marlétaz F., Holland L.Z., Laudet V., Schubert M. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates // *Int. J. Biol. Sci.* 2006. Vol. 2, № 2. P. 38–47.
98. Kam R.K.T., Deng Y., Chen Y., Zhao H. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development // *Cell Biosci.* 2012. Vol. 2, № 1. Article no. 11. DOI: 10.1186/2045-3701-2-11
99. Duong V., Rochette-Egly C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1812, № 8. P. 1023–1031.
100. di Masi A., Leboffe L., De Marinis E., Pagano F., Cicconi L., Rochette-Egly C., Lo-Coco F., Ascenzi P., Nervi C. Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy // *Mol. Aspects Med.* 2015. Vol. 41. P. 1–115.
101. Leid M., Kastner P., Lyons R., Nakshatri H., Saunders M., Zacharewski T., Chen J.Y., Staub A., Garnier J.M., Mader S. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently // *Cell.* 1992. Vol. 68, № 2. P. 377–395.
102. Zhao L., Son J.S., Wang B., Tian Q., Chen Y., Liu X., de Avila J.M., Zhu M.J., Du M. Retinoic acid signalling in fibro/adipogenic progenitors robustly enhances muscle

- regeneration // EBioMedicine. 2020. Vol. 60. Article no. 103020. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103020
103. Joe A.W.B., Yi L., Natarajan A., Le Grand F., So L., Wang J., Rudnicki M.A., Rossi F.M.V. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis // Nat. Cell Biol. 2010. Vol. 12, № 2. P. 153–163.
104. Lemos D.R., Babaeijandaghi F., Low M., Chang C.K., Lee S.T., Fiore D., Zhang R.H., Natarajan A., Nedospasov S.A., Rossi F.M.V. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors // Nat. Med. 2015. Vol. 21, № 7. P. 786–794.
105. Viera-Vera J., García-Arrarás J.E. Retinoic acid signaling is associated with cell proliferation, muscle cell dedifferentiation, and overall rudiment size during intestinal regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* // Biomolecules. 2019. Vol. 9, № 12. Article no. 873. DOI: 10.3390/biom9120873
106. Laudet V., Stehelin D., Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily // Nucleic Acids Res. 1993. Vol. 21, № 10. P. 2493–2501.
107. Kamachi Y., Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation // Development. 2013. Vol. 140, № 20. P. 4129–4144.
108. Bowles J., Schepers G., Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators // Dev. Biol. 2000. Vol. 227, № 2. P. 239–255.
109. Hou L., Srivastava Y., Jauch R. Molecular basis for the genome engagement by Sox proteins // Semin. Cell Dev. Biol. 2017. Vol. 63. P. 2–12.
110. Schock E.N., LaBonne C. Sorting Sox: diverse roles for sox transcription factors during neural crest and craniofacial development // Front. Physiol. 2020. Vol. 11. Article no. 606889. DOI: 10.3389/fphys.2020.606889
111. Chew L.J., Gallo V. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease // J. Neurosci. Res. 2009. Vol. 87, № 15. P. 3277–3287.

112. Lee H.J., Göring W., Ochs M., Mühlfeld C., Steding G., Paprotta I., Engel W., Adham I.M. Sox15 is required for skeletal muscle regeneration // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24, № 19. P. 8428–8436.
113. Alonso-Martin S., Auradé F., Mademtzoglou D., Rochat A., Zammit P.S., Relaix F. SOXF factors regulate murine satellite cell self-renewal and function through inhibition of  $\beta$ -catenin activity // *eLife*. 2018. Vol. 7. Article no. e26039. DOI: 10.7554/eLife.26039
114. Dolmatov I.Yu., Kalacheva N.V., Tkacheva E.S., Shulga A.P., Zavalnaya E.G., Shamshurina E.V., Girich A.S., Boyko A.V., Eliseikina M.G. Expression of Piwi, MMP, TIMP, and Sox during gut regeneration in holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirotida) // *Genes*. 2021. Vol. 12, № 8. Article no. 1292. DOI: 10.3390/genes12081292
115. Poliacikova G., Maurel-Zaffran C., Graba Y., Saurin A.J. Hox proteins in the regulation of muscle development // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. Article no. 731996. DOI: 10.3389/fcell.2021.731996
116. Bürglin T.R., Affolter M. Homeodomain proteins: an update // *Chromosoma*. 2016. Vol. 125, № 3. P. 497–521.
117. Hajirnis N., Mishra R.K. Homeotic genes: Clustering, modularity, and diversity // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. Article no. 718308. DOI: 10.3389/fcell.2021.718308
118. Rux D.R., Wellik D.M. Hox genes in the adult skeleton: Novel functions beyond embryonic development // *Dev. Dyn.* 2017. Vol. 246, № 4. P. 310–317.
119. Hombría J.C.G., Lovegrove B. Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis // *Differentiation*. 2003. Vol. 71, № 8. P. 461–476.
120. Thorndyke M.C., Chen W.C., Beesley P.W., Patrino M. Molecular approach to echinoderm regeneration // *Microsc. Res. Tech.* 2001. Vol. 55, № 6. P. 474–485.
121. Ortiz-Pineda P.A., Ramírez-Gómez F., Pérez-Ortiz J., González-Díaz S., Santiago-De Jesús F., Hernández-Pasos J., Del Valle-Avila C., Rojas-Cartagena C., Suárez-Castillo

- E.C., Tossas K., Méndez-Merced A.T., Roig-López J.L., Ortiz-Zuazaga H., García-Arrarás J.E. Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber // BMC Genomics. 2009. Vol. 10, № 1. Article no. 262. DOI: 10.1186/1471-2164-10-262
122. Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry // Circ. Res. 2003. Vol. 92, № 8. P. 827–839.
123. Chen X., Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis // Cell. Adh. Migr. 2009. Vol. 3, № 4. P. 337–341.
124. Lei H., Leong D., Smith L.R., Barton E.R. Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2013. Vol. 305, № 5. P. C529–C538.
125. Smith L.R., Kok H.J., Zhang B., Chung D., Spradlin R.A., Rakoczy K.D., Lei H., Boesze-Battaglia K., Barton E.R. Matrix Metalloproteinase 13 from satellite cells is required for efficient muscle growth and regeneration // Cell Physiol. Biochem. 2020. Vol. 54, № 3. P. 333–353.
126. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs // Cardiovasc. Res. 2006. Vol. 69, № 3. P. 562–573.
127. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases // J. Pathol. 2003. Vol. 200, № 4. P. 448–464.
128. Dolmatov I.Y., Nizhnichenko V.A., Dolmatova L.S. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in echinoderms: structure and possible functions // Cells. 2021. Vol. 10, № 9. Article no. 2331. DOI: 10.3390/cells10092331
129. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly

- algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. Vol. 19, № 5. P. 455–477.
130. Boyko A.V., Girich A.S., Eliseikina M.G., Maslennikov S.I., Dolmatov I.Y. Reference assembly and gene expression analysis of *Apostichopus japonicus* larval development // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. Article no. 1131. DOI: 10.1038/s41598-018-37755-5
131. Seppey M., Manni M., Zdobnov E.M. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness // *Methods Mol. Biol.* 2019. Vol. 1962. P. 227–245.
132. Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome // *BMC Bioinform.* 2011. Vol. 12. Article no. 323. DOI: 10.1186/1471-2105-12-323
133. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9, № 4. P. 357–359.
134. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014. Vol. 15, № 12. Article no. 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8
135. Zerbino D.R., Achuthan P., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Bhai J., Billis K., Cummins C., Gall A., Girón C.G., Gil L., Gordon L., Haggerty L., Haskell E., Hourlier T., Izuogu O.G., Janacek S.H., Juettemann T., To J.K., Laird M.R. Ensembl 2018 // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № D 1. P. D754–D761. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1098>
136. Kudtarkar P., Cameron R.A. Echinobase: an expanding resource for echinoderm genomic information // *Database.* 2017. Vol. 2017. Article no. bax074. DOI: 10.1093/database/bax074
137. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102, № 43. P. 15545–15550.



138. Merico D., Isserlin R., Stueker O., Emili A., Bader G.D. Enrichment Map: A network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation // PLoS One. 2010. Vol. 5, № 11. Article no. e13984. DOI: 10.1371/journal.pone.0013984
139. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // Genome Res. 2003. Vol. 13, № 11. P. 2498–2504.
140. Komminoth P. Detection of mRNA in tissue sections using DIG-labeled RNA and oligonucleotide probes. 1996. P. 126–135.
141. Angerer L., Hussain S., Wei Z., Livingston B.T. Sea urchin metalloproteases: A genomic survey of the BMP-1/tolloid-like, MMP and ADAM families // Dev. Biol. 2006. Vol. 300, № 1. P. 267–281.
142. Нижниченко В.А., Долматов И.Ю. Ортологи генов семейства миогенных регуляторных факторов (MRF) и их возможные функции у иглокожих // Биология моря. 2022. Т. 48, № 2. P. 185–194.
143. Baugh L.R., Hunter C.P. MyoD, modularity, and myogenesis: conservation of regulators and redundancy in *C. elegans* // Genes Dev. 2006. Vol. 20, № 24. P. 3342–3346.
144. Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S., Jaenisch R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development // Cell. 1992. Vol. 71, № 3. P. 383–390.
145. Rudnicki M.A., Schlegelsberg P.N., Stead R.H., Braun T., Arnold H.H., Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle // Cell. 1993. Vol. 75, № 7. P. 1351–1359.
146. Fukushige T., Brodigan T.M., Schriefer L.A., Waterston R.H., Krause M. Defining the transcriptional redundancy of early bodywall muscle development in *C. elegans*: Evidence for a unified theory of animal muscle development // Genes Dev. 2006. Vol. 20, № 24. P. 3395–3406.

147. Balagopalan L., Keller C.A., Abmayr S.M. Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila nautilus* gene is not essential for embryonic myogenesis or viability // *Dev. Biol.* 2001. Vol. 231, № 2. P. 374–382.
148. Michelson A.M., Abmayr S.M., Bate M., Arias A.M., Maniatis T. Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos // *Genes Dev.* 1990. Vol. 4, № 12A. P. 2086–2097.
149. Van Doren M., Ellis H.M., Posakony J.W. The *Drosophila* extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes // *Development.* 1991. Vol. 113, № 1. P. 245–255.
150. Van Doren M., Powell P.A., Pasternak D., Singson A., Posakony J.W. Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae // *Genes Dev.* 1992. Vol. 6, № 12B. P. 2592–2605.
151. Ledent V., Vervoort M. The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis // *Genome Res.* 2001. Vol. 11, №5. P. 754–770.
152. Van Wart H.E., Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. Vol. 87, № 14. P. 5578–5582.
153. Fanjul-Fernández M., Folgueras A.R., Cabrera S., López-Otín C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models // *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 2010. Vol. 1803, № 1. P. 3–19.
154. Brkic M., Balusu S., Libert C., Vandenbroucke R.E. Friends or foes: Matrix metalloproteinases and their multifaceted roles in neurodegenerative diseases // *Mediators Inflamm.* 2015. Vol. 2015. Article no. 620581. DOI: 10.1155/2015/620581
155. Overall C.M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites // *Mol. Biotechnol.* 2002. Vol. 22, № 1. P. 51–86.

156. Lamash N.E., Dolmatov I.Y. Proteases from the regenerating gut of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 3. Article no. e58433. DOI: 10.1371/journal.pone.0058433
157. Quiñones J.L., Rosa R., Ruiz D.L., García-Arrarás J.E. Extracellular matrix remodeling and metalloproteinase involvement during intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* // Dev. Biol. 2002. Vol. 250, № 1. P. 181–197.
158. Flood J., Mayne J., Robinson J.J. Identification and characterization of gelatin-cleavage activities in the apically located extracellular matrix of the sea urchin embryo // Biochem. Cell Biol. 2000. Vol. 78, № 4. P. 455–462.
159. Mayne J., Robinson J.J. Localization and functional role of a 41 kDa collagenase/gelatinase activity expressed in the sea urchin embryo // Dev. Growth Differ. 2002. Vol. 44, № 4. P. 345–356.
160. Robinson J.J., Mayne J. The effects of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on the major gelatinase activities present in the sea urchin embryo // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 243, № 1. P. 326–330.
161. Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Pontén F. Tissue-based map of the human proteome // Science. 2015. Vol. 347, № 6220. Article no. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419
162. Fernandez-Catalan C., Bode W., Huber R., Turk D., Calvete J.J., Lichte A., Tschesche H., Maskos K. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor // EMBO J. 1998. Vol. 17, № 17. P. 5238–5248.
163. Woskowicz A.M., Weaver S.A., Shitomi Y., Ito N., Itoh Y. MT-LOOP-dependent localization of membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 49. P. 35126–35137.

164. Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations // *Matrix Biol.* 2015. Vol. 44–46. P. 207–223.
165. Pei D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage // *Cell Res.* 1999. Vol. 9, № 4. P. 291–303.
166. Itoh Y., Kajita M., Kinoh H., Mori H., Okada A., Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 48. P. 34260–34266.
167. Kojima S., Itoh Y., Matsumoto S., Masuho Y., Seiki M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 480, № 2–3. P. 142–146.
168. Galea C.A., Nguyen H.M., George Chandy K., Smith B.J., Norton R.S. Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP23): role in potassium channel trafficking // *Cell Mol. Life Sci.* 2014. Vol. 71, № 7. P. 1191–1210.
169. Velasco G., Pendás A.M., Fueyo A., Knäuper V., Murphy G., López-Otín C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 8. P. 4570–4576.
170. Grinthal A., Guidotti G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? // *Purinergic Signal.* 2006. Vol. 2, № 2. P. 391–398.
171. Nizhnichenko V.A., Boyko A.V., Ginanova T.T., Dolmatov I.Y. Muscle Regeneration in Holothurians without the Upregulation of Muscle Genes // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. № 8. Article no. 16037. DOI: 10.3390/ijms232416037
172. Sun L., Yang H., Chen M., Ma D., Lin C. RNA-Seq reveals dynamic changes of gene expression in key stages of intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. [corrected] // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 8. Article no. e69441. DOI: 10.1371/journal.pone.0069441

173. Dolmatov I.Yu. Variability of regeneration mechanisms in echinoderms // *Russ. J. Mar. Biol.* 2020. Vol. 46, № 6. P. 391–404.
174. Bao M., Liu S., Yu X.Y., Wu C., Chen Q., Ding H., Shen C., Wang B., Wang S., Song Y.H., Li Y. Runx1 promotes satellite cell proliferation during ischemia - Induced muscle regeneration // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. Vol. 503, № 4. P. 2993–2997.
175. Dolmatov I.Y. Molecular aspects of regeneration mechanisms in holothurians // *Genes (Basel)*. 2021. Vol. 12, № 2. Article no. 250. DOI: 10.3390/genes12020250
176. Nakano A., Nakano H., Smith K.A., Palpant N.J. The developmental origins and lineage contributions of endocardial endothelium // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. Vol. 1863, № 7 Pt B. P. 1937–1947.
177. O'Donnell A., Yutzey K.E. Mechanisms of heart valve development and disease // *Development*. 2020. Vol. 147, № 13. Article no. dev183020. DOI: 10.1242/dev.183020
178. Zhang Y., Zuo T., McVicar A., Yang H.L., Li Y.P., Chen W. Runx1 is a key regulator of articular cartilage homeostasis by orchestrating YAP, TGF $\beta$ , and Wnt signaling in articular cartilage formation and osteoarthritis // *Bone Res.* 2022. Vol. 10, № 1. P. 1–11.
179. Dubey S., Dubey P.K., Umeshappa C.S., Ghebre Y.T., Krishnamurthy P. Inhibition of RUNX1 blocks the differentiation of lung fibroblasts to myofibroblasts // *J. Cell. Physiol.* 2022. Vol. 237, № 4. P. 2169–2182.
180. Zhu G.H., Huang J., Bi Y., Su Y., Tang Y., He B.C., He Y., Luo J., Wang Y., Chen L., Zuo G.W., Jiang W., Luo Q., Shen J., Liu B., Zhang W.L., Shi Q., Zhang B.Q., Kang Q., Zhu J., He T.C. Activation of RXR and RAR signaling promotes myogenic differentiation of myoblastic C2C12 cells // *Differentiation*. 2009. Vol. 78, № 4. P. 195–204.
181. Halevy O., Lerman O. Retinoic acid induces adult muscle cell differentiation mediated by the retinoic acid receptor-alpha // *J. Cell Physiol.* 1993. Vol. 154, № 3. P. 566–572.

182. Volpe M.V., Ramadurai S.M., Pham L.D., Nielsen H.C. Hoxb-5 down regulation alters Tenascin-C, FGF10 and Hoxb gene expression patterns in pseudoglandular period fetal mouse lung // *Front. Biosci.* 2007. Vol. 12, № 3. P. 860–873.
183. Holzman M.A., Ryckman A., Finkelstein T.M., Landry-Truchon K., Schindler K.A., Bergmann J.M., Jeannotte L., Mansfield J.H. HOXA5 Participates in brown adipose tissue and epaxial skeletal muscle patterning and in brown adipocyte differentiation // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. Article no. 632303. DOI: 10.3389/fcell.2021.632303
184. Jing Y., Gao B., Han Z., Xia L., Xin S. The protective effect of HOXA5 on carotid atherosclerosis occurs by modulating the vascular smooth muscle cell phenotype // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021. Vol. 534. Article no. 111366. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111366
185. Postigo A.A., Dean D.C. ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation // *EMBO J.* 1997. Vol. 16, № 13. P. 3935–3943.
186. Siles L., Sánchez-Tilló E., Lim J.W., Darling D.S., Kroll K.L., Postigo A. ZEB1 imposes a temporary stage-dependent inhibition of muscle gene expression and differentiation via CtBP-mediated transcriptional repression // *Mol. Cell. Biol.* 2013. Vol. 33, № 7. P. 1368–1382.
187. Fernández I., Tiago D.M., Laizé V., Leonor Cancela M., Gisbert E. Retinoic acid differentially affects in vitro proliferation, differentiation and mineralization of two fish bone-derived cell lines: different gene expression of nuclear receptors and ECM proteins // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014. Vol. 140. P. 34–43.
188. Chang Y.C., Kao Y.H., Hu D.N., Tsai L.Y., Wu W.C. All-trans retinoic acid remodels extracellular matrix and suppresses laminin-enhanced contractility of cultured human retinal pigment epithelial cells // *Exp. Eye Res.* 2009. Vol. 88, № 5. P. 900–909.

189. Damanik F.F.R., Blitterswijk C., van Rotmans J., Moroni L. Enhancement of synthesis of extracellular matrix proteins on retinoic acid loaded electrospun scaffolds // *J. Mater. Chem. B*. 2018. Vol. 6, № 40. P. 6468–6480.
190. Pearson D., Sasse J. Differential regulation of biglycan and decorin by retinoic acid in bovine chondrocytes // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, № 35. P. 25364–25370.
191. Puttagunta R., Di Giovanni S. Retinoic acid signaling in axonal regeneration // *Front. Mol. Neurosci.* 2012. Vol. 4. Article no. 59. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00059
192. Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia // *Oncogene*. 2004. Vol. 23, № 24. P. 4284–4296.
193. Thomas D.M., Johnson S.A., Sims N.A., Trivett M.K., Slavin J.L., Rubin B.P., Waring P., McArthur G.A., Walkley C.R., Holloway A.J., Diyagama D., Grim J.E., Clurman B.E., Bowtell D.D., Lee J.S., Gutierrez G.M., Piscopo D.M., Carty S.A., Hinds P.W. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma // *J. Cell Biol.* 2004. Vol. 167, № 5. P. 925–934.
194. Kagoshima H., Shigesada K., Kohara Y. RUNX regulates stem cell proliferation and differentiation: Insights from studies of *C. elegans* // *J. Cell. Biochem.* 2007. Vol. 100, № 5. P. 1119–1130.
195. Hall A., Choi K., Liu W., Rose J., Zhao C., Yu Y., Na Y., Cai Y., Coover R.A., Lin Y., Dombi E., Kim M., Levanon D., Groner Y., Boscolo E., Pan D., Liu P.P., Lu Q.R., Ratner N., Huang G., Wu J. RUNX represses Pmp22 to drive neurofibromagenesis // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5, № 4. Article no. eaau8389. DOI: 10.1126/sciadv.aau8389
196. Chuang L., Ito Y. The multiple interactions of RUNX with the Hippo–YAP pathway // *Cells*. 2021. Vol. 10, № 11. Article no. 2925. DOI: 10.3390/cells10112925
197. Coffman J.A., Dickey-Sims C., Haug J.S., McCarthy J.J., Robertson A.J. Evaluation of developmental phenotypes produced by morpholino antisense targeting of a sea urchin Runx gene // *BMC Biol.* 2004. Vol. 2, № 1. P. 6.

198. Dickey-Sims C., Robertson A.J., Rupp D.E., McCarthy J.J., Coffman J.A. Runx-dependent expression of PKC is critical for cell survival in the sea urchin embryo // BMC Biol. 2005. Vol. 3, № 1. Article no. 18. DOI: 10.1186/1741-7007-3-18
199. Robertson A.J., Coluccio A., Knowlton P., Dickey-Sims C., Coffman J.A. Runx expression is mitogenic and mutually linked to Wnt activity in blastula-stage sea urchin embryos // PLoS ONE / ed. Venuti J. 2008. Vol. 3, № 11. Article no. e3770. DOI: 10.1371/journal.pone.0003770
200. Robertson A.J., Dickey-Sims C., Ransick A., Rupp D.E., McCarthy J.J., Coffman J.A. CBF $\beta$  is a facultative Runx partner in the sea urchin embryo // BMC Biol. 2006. Vol. 4, № 1. Article no. 4. DOI: 10.1186/1741-7007-4-4



## ПРИЛОЖЕНИЯ

### 1. Праймеры для кПЦР

Ген	Направление	Последовательность	Длина праймера	Длина ампликона	Tm
<i>Ef-EF1a</i> (Efra.gene65745_i0)	прямой	ACATCAACATTGTGGTCATCGG	22	162	61
	обратный	ACGCTCAGCCTTCAGTTTGTCT	21		61
<i>Ef-GAPDH</i> (Efra.gene65988_i0)	прямой	AATACGCTATGTCACAGAACCTACGG	26	176	61
	обратный	GAGTGCTACCTGATGATGGGCTTG	24		61
<i>Ef-HOX5</i> (Efra.gene4680_i0)	прямой	GGCGATATTCAGTACTCAGAC	22	184	62
	обратный	GCACTGCTGCTGAATGTTT	19		62
<i>Ef-ZNF318</i> (Efra.gene6732_i0)	прямой	GAGCAGGCCACACTGATTA	19	159	62
	обратный	CACCTTCTTGGTAGTCCTCTTC	22		62
<i>Ef-RARB</i> (Efra.gene622_i1)	прямой	GTCCTTCAGGAAACTGAGGATAG	23	180	62
	обратный	AAGGCGTACTCTCTTTGGG	21		62
<i>Ef-SOX17</i> (Efra.gene58948_i0)	прямой	GCAGACCTGAGCAAACТАCT	20	161	62
	обратный	CCACGCTGTTTCTTGTCTTC	21		62
<i>Ef-RUNX1</i> (Efra.gene9542_i0)	прямой	GGGAGTCAATACCACAAGCA	20	150	62
	обратный	ATGGGAGGAGCTGGTATCT	19		62
<i>Ef-ZEB2</i> (Efra.gene938_i1)	прямой	CGGTAGGCCTTGCTGTAATA	21	173	62
	обратный	CGACAAGTTCTTTCTGCAGTTC	21		62
<i>Ef-MYOD1</i> (Efra.gene51214_i0)	прямой	GGCGGCTCAGAAAGGTCAAC	20	219	62
	обратный	CGTCTGTCATTCCGTCTGATGATT	25		62
<i>Ef-MYOD3</i> (Efra.gene44526_i0)	прямой	ACCCATCATCGGTAAGAGAAACAGG	21	122	63
	обратный	GTTTCGTCCATCTTCACCACTCCTG	20		63
<i>Ef-MYH6</i> (Efra.gene190_i0)	прямой	CCTGAAGCGACTGTCTGTTTAT	23	166	62
	обратный	GATATCAGCTCCTGCCAGTTT	22		62
<i>Ef-MMP16.2</i> (Efra.gene13165_i0)	прямой	GATGGCCGTATCCCATTCT	20	151	62
	обратный	GGTCCGATTTCGATCACCTT	21		62
<i>Ef-MMP24.1</i> (Efra.gene10190_i1)	прямой	ATTTGAAGCGGTCTGAAATCAC	22	150	62
	обратный	ATGGGCTGTCGTCGTTATG	20		62

## 2. Праймеры для синтеза зондов на SISH

Ген	Направление	Последовательность	Длина праймера	Длина ампликона	Tm
<i>Ef-18s rRNA</i> (Efra.gene42969_i0)	прямой	GAGAAACGGCTACCACATC	19	659	60
	обратный	TCCTCCGACTTTCGTTCT	18		60
<i>Ef-HOX5</i> (Efra.gene4680_i0)	прямой	CAATAGCAGACCGGAACAGATA	22	362	62
	обратный	GCGTAGTCGCTACAGAGTTTAT	22		62
<i>Ef-ZNF318</i> (Efra.gene6732_i0)	прямой	GTGGAAGCCTGAGCGATAAT	20	316	62
	обратный	TGGGATGTAACCATCAAAGAAGA	23		62
<i>Ef-RARB</i> (Efra.gene622_i1)	прямой	TGTGCCAGGATAAGTCATCAG	21	356	62
	обратный	ACTGGAATGCTGGACTCTT	20		62
<i>Ef-SOX17</i> (Efra.gene58948_i0)	прямой	TTACCGGTCAACCAACGATTA	21	358	62
	обратный	CCACGCTGTTTCTTGTTCCTC	22		62
<i>Ef-RUNX1</i> (Efra.gene9542_i0)	прямой	CTCCACCATCACAGCATAACA	20	477	62
	обратный	GGGTCCATCGACTGTTACTTT	21		62
<i>Ef-ZEB2</i> (Efra.gene938_i1)	прямой	CTCTAAACAGCAGCAGGAGAA	21	374	62
	обратный	TCCTCAGCAAGGGATAAAGTTC	22		62
<i>Ef-MYOD3</i> (Efra.gene44526_i0)	прямой	CGTGACTTCATGTAATGTG	24	252	57
	обратный	GGTCTTGTTGTCTGCCCCGT	21		62
<i>Ef-MMP16.2</i> (Efra.gene13165_i0)	прямой	TTATATGGAAGCAGACCCAATGA	23	641	62
	обратный	GGTCCGATTCGATCACCTT	20		62
<i>Ef-MMP24.1</i> (Efra.gene10190_i1)	прямой	ATTTGAAGCGGTCTGAAATCAC	22	520	62
	обратный	TAAACGACTGCGTCGAAGTTA	21		62

### 3. Последовательности отсеквенированных ампликонов, используемых в SISH

1. соответствует последовательности Efra.gene622\_i1, ген *Ef-RARB*

TKKGCCAGGGWAAGTCATCAGGGTACCACTATGGCGTCAGCGCCTGTGAAGG  
 TTGTAAGGGGTTCTTCCGGAGGAGCGTGCAGAAGAACATGTCCTATACCTGCC  
 ATAGAGACAAGAАCTGCGATATCAACAAAATCACCAGAAATAGATGCCAGTA  
 CTGTCGGTTCAGAAAGTGCTTTGCGGTCGGCATGTCCAAAGACTGTGTCAGAA  
 ACGACAGGAACAAGAAGAAGAAGGAATCGGCAGAGGTCTCGCAGAGCACGGC  
 AATCCCGACAGAAATTGAAGACGTCATAAAGTCGGTCACGAAAGCACACAAC  
 GAAACCTTTTTAGCAGAGAACAAGAGTCCAGCATTTCAGTAATGTCTCCGCG  
 GCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATCGCCCTATAKGAG  
 TCCRТАС

2. соответствует последовательности Efra.gene9542\_i0, ген *Ef-RUNX1*

TKKKKKTRWAAAARRGGCGTCSTCCMMCCMYATCMARCAWAMCAAGATGGC  
 GGCARATGGCCTCCACACCCATAACAACAAGGCTAAGTCCCCCCTCCGCGGGA  
 CCGTCGGACACTTGGGGGAACGGACTATCATGGAAGCCTTATCGGAATATCCC  
 GGGGAАCTCGTCAGGACGGAGAGCCCTAACTTCGTCTGTTCGGTCCTGCTGGT  
 CCACTGGCGGTGCAACAAGAGCCTGCCCGTGGCCTTCAAGGTCGTGGCCCTCG  
 GAGATATCAAGGACGGGACCCAGGTCACGATCGCAGCCGGGAACGACGAGAA  
 CTTCTGCGCCGAGTTAAGGAATTGTACCGCGATTATGAAGAATAGAGTGGCCC  
 GGTTC AACGATCTCAGATTCGTTGGCCGGTCGGGGAGAGGTAAAAGCCTTTCC  
 TTGAATATCACCATCCAGACGAGCCCTCCTCAAGTAACCTGCTACAATCGTGC  
 AATAAAAGTAACAGTCGATGGACCCAATGTCTCCGCGGCCGCCATGGCGGCCG  
 GGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATCGCCCTATAGTGACKG

3. соответствует последовательности Efra.gene58948\_i0, ген *Ef-SOX17*

CMGTCACTATAGGGCGATTGGGCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGC  
 GGCCGCGGAGACATTTTACCGGTCAACCAACGATTACGTCAACCGGCTTTTTG  
 CGGGAAAATACGATGGATGTTGGAAAATCTGCGACGGACACCCAGTTCATGGG  
 CCGGAGTCGTCGGGAACAGAGGATTAGGAGGCCTATGAACGCCTTCATGGTGT  
 GGGCTAAGGACGAGAGGAAACGTTTGGCGGACCTAAACCCAGACCTTCACAA  
 CGCAGACCTGAGCAAATACTCGGAAAAGCTTGGAAAGAGCCTCTCTCTCGTCG  
 ACAAGCGCCCCTTCGTCGAGGAAGCAGAGCGTCTTCGCCTCAAGCATATGGCC  
 GACTACCCCGACTACAAATACAGACCCCGTAGACGGAAGAACAAGAAMMMRS  
 SGKGGAA

4. соответствует последовательности Efra.gene9542\_i0, ген *Ef-ZNF318*

TTKGGAAAGCCCGAGCGATAATTCTAACTCATCGGGAAACAGCCGCGAGAGGC  
 GCAGGAGGAGAAGCAGGAGCCGAGGGAGGAAAAGACATGAAAGGAGGGGTA  
 AGCGCGGGAGCACCGGCTCGAGATCTCGCAATGAGAAACGCGGAGGCTCTGG  
 TGGAAGTAAAGAGAGATCCAGGCGGAGTCGGCGGGGCGATGATAACAGTGAA  
 GGTGACTACCGACGAGATAAGAAGCGTAGCAGAGAGAAGGACGCAGGCAGTG  
 ACAGGGATACACATGAACCAGAGGGCACGCTACATTCTTCTTTGATGGTTACA  
 TCCCAAATGTCTCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCC  
 CAATCGCCCTATAGTGACKG

5. соответствует последовательности Efra.gene938\_i0, ген *Ef-ZEB2*

CMGTCACTATAGGGCGATTGGGCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGC  
 GGCCSCGGARACATTTCCCTCAGCAAGGGATAAAGTTCTTGCAGAGATGTCCTC  
 GCCTGCATGAGATCACCCCTTCCTGGGTTGTGCGACTCCAGACATTTAGCCATC  
 GCCTGGGCCTCATGTACTTTCTGGAGGGTGTAACTACGATGTCATAACTCTTG  
 TCTACTTCGTGGACGCCGTTTCCGTTCACGTACACCACTTCTTTCTTCTCCATCT  
 CCTCACTGCTGTCGCTTGCAGCACTGGGAGATACGATGGGATTGGTACTACTGT  
 TCCTACTGAATGACTTCAATTCGTATGGGCTGGCAACCACTGGGGTTTCCTGTG

GTACATGTTTTGTCTTTTTTCAGCTTTGAGATGTCCAGGTGTTGCTTCTCCTGCTG  
TKGTTTTARARG

6. соответствует последовательности Efra.gene44526\_i0, ген *Ef-MYOD3*

CGGGAAAACCRAACACTMKAAGMGCGATTGGMWCGAGKCGAAGGCCARGSC  
GCRGGGAGRTGGCGGAGGGGAGGCTAGTTGTAGGCCGKATGTTGCGTATACG  
GCTGGACGGTCGGATGCGTGGTGGGCGCCTTGGATCTGTCGTGTTTTGGCCCCA  
ACCCTTGRAACTCCTCGGAGACACTGCTACTGAGTCGTTCCAAGARATGGTTG  
ATCTTGKCTAGTCSCTGTCGCTCTCTGATGGKCGCCTTCACTCTACTCCTCTGAA  
RACAAACCTCGAATGGTTCCTTCGATGAACCTCATTACATGAAGACACGACW  
KATTTGTACCYGTGTACYACTTGACRGTA AAACTTACWTCATCATCGCARTGC  
GTGACACCACCAATCCCCGTTTTTTGGTAATACSCAWGCSCCAATACTCCGCCA  
CTGTTTTAWAGTGGGCTGYCGTCCTTGGGCKAACCGGTA

7. соответствует последовательности Efra.gene4680\_i0, ген *Ef-HOX5*

CCGTCGCTCAGCTTTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGC  
GTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGTCGAATTCAGACATTGCGTA  
GTCGCTACAGAGTTTATGGGACTCCGGGACCGGGAGGCAGCGAGCGTCGCGGC  
GGCAGCTTCCTGGCTGACCAGCTGGGAGATGCTTTTTACATTGTTCTCCTTCTT  
CCTTTCATCCGCCGGTTCTGGAAC TATATCTTGATCTGCCTCTCGGTGAGGCC  
GAGGGCGTGTGCGATCTCGATCCGGCGCCGCCTCGTCAGGTATCGGCTGAAGT  
GGAAC TCTTCTTAGCTCTAACGTCTGGTACCTCGTGTAGGCTGTCCTGGAAC  
GTTTGGTGGGCTCGTGGCTGTTATGGTGACCCCCGGTATTGGCGTGAATTCGTC  
TCATCCAGGGATATATCTGTTCCGGTCTGCTATTGA2.

8. соответствует последовательности Efra.gene13165\_i0, ген *Ef-MMP16.2*

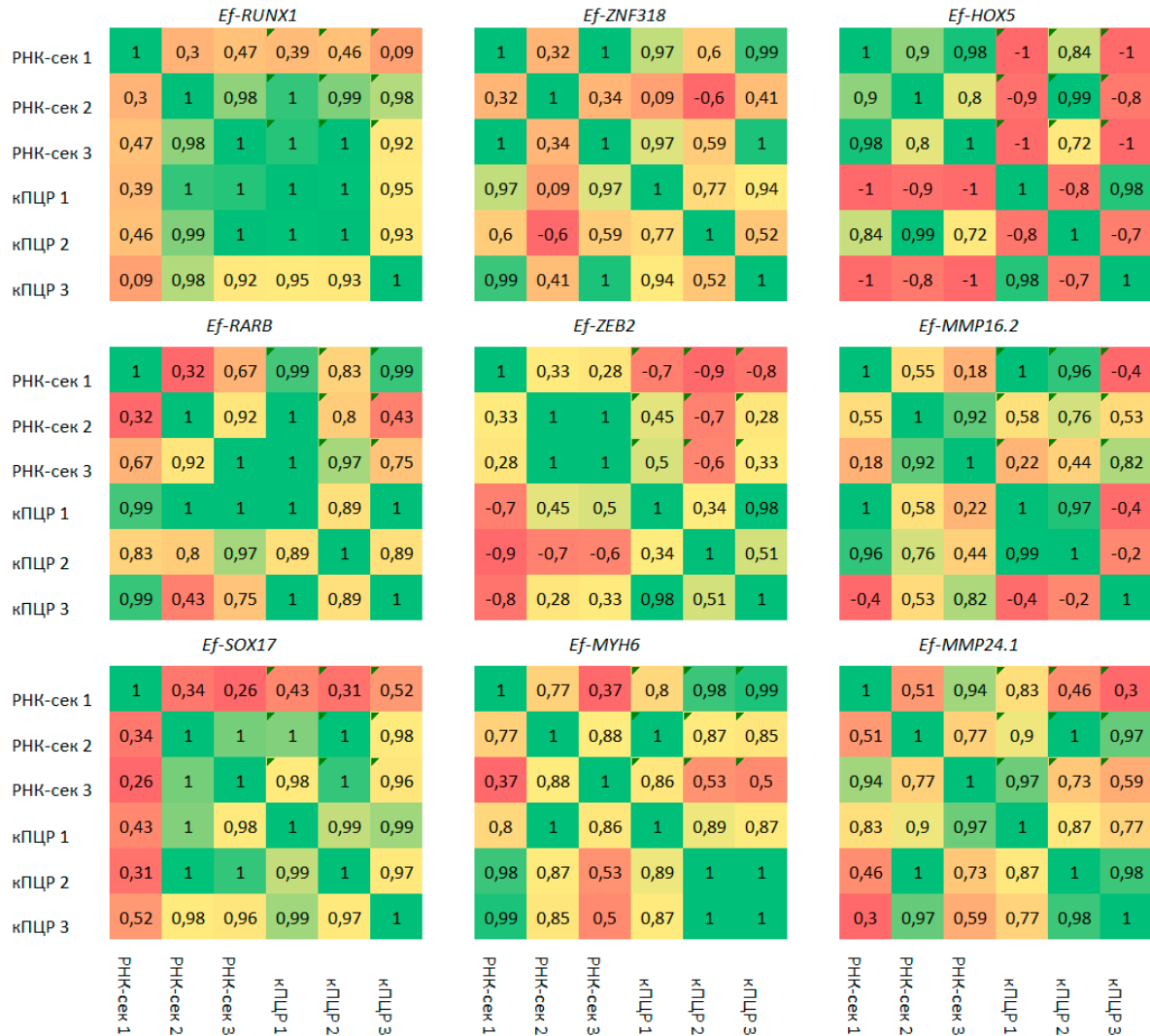
GGGGTCKAYGMTCM TATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC  
GCCATGGCGGCCGCGGAGACATTGGTTCCGATTCGATCACCTTGCCCAGGGTA  
TCGCTGTACGGGTAGTAGTACTTTCCTTTGATGAAGTAGGTGAGCCCATCCACG

TATCTGAATCCGGCATGTAGTCCTTTTGGAACGCCAGGAAAGACTGAAGAAAT  
 GGGATACGGCCATCCATCGTCGACCTTCTTAGTGAACATCATCGTACCGGTAGA  
 CCTTGCCTCGTTTGAAGAAATACACCTTGTGTACTCGCCGTATGTGACAGCGG  
 CTTGTATGTTTCCTGGCAGTGGCGTCGATTGGCTGATATTGGATATGAGCCTAG  
 GATACCCGGGGAGTGGGTCCACGCCGTCATATAACCAGTATTCTTTTCCTTTGA  
 AAAACAGGATCTTGTGTCATAGTACCTCTCGTACGCAGCCTGGATACCATCA  
 GGAAGATCCTTGAAGAAAGTTCTTGTAATATATCCTTCTGGCGGGCAGAGTGG  
 CTCTCCCGGATTCTGACACGCCAGAAACGATCTCCCTTGAAGGCGAAAATTT  
 CCCCTCTGATCAGGGATACGCTGTCGAAAGACATTTTGCAGATGAGAGGTAGT  
 TCCGTCGTCATCTCTTTCGTGGTCGTTGTAGGCGTTGTTGGCTTTGCGCCAGGA  
 TCATTGGTTYTYYYYYYWWWWWWAWAAAAA

9. соответствует последовательности Efra.gene10190\_i1, ген *Ef-MMP24.1*

GMMGMCTYACTTTAGGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCA  
 TGGCGGCCGCGGAGACATTTAAACGACTGCGTCGAAGTTATCGACGTCACAGG  
 CTGGGCTGGTAGGGATCGTGGTCCGGTGCTACTGTGGCTGCGGGATTCTTGGCCT  
 CAGTTAATCTCGGACCATATAGTCTCTGTACAGCCGCTATGTCATCCTCGTGTA  
 ACTCTACGTTGGGGTTGTATCCTCGATACAAGGGCGCCATCACTGCTGCGAAG  
 TTTCTGGAATGATCGAGCCCCAGGCTATGACCGAGCTCGTGCAGTGCAGTAAA  
 GAACAGATTTGTACCTATGTACGACTTGACGGTAAAACCTTTCGTCTTCATCGAA  
 ATGCATGTCACCACCGATCCCCGGCCCAGGGTAATACGCATGCGCCAATACTC  
 CACCACGCCCATCAAATGGGCTGTCGTCGTTGTGCGAACCGGTAGTGAACCAT  
 ATTTGATATCCGGCGTTTCACCTTCGACCGGGTGAAAGGTCAAGGGTGTGAC  
 CTCCTCCATCGACGGAAGGCCTCCTCGACCGCTTCCGTGATTTCKSSCATTTW  
 AAWWWAWAA

#### 4. Корреляция оценок экспрессии отдельных генов



Корреляция оценок экспрессии 9 генов между разными повторами и методами. кПЦР — повторы кПЦР, РНК-сек — повторы РНК-секвенирования. Число означает номер повтора.