

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

На правах рукописи

ЗАВАЛЬНАЯ ЕВГЕНИЯ ГЕНРИХОВНА

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *PIWI* В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ГОЛОТУРИИ
*EUPENTACTA FRAUDATRIX***

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Елисейкина Марина Геннадьевна

Владивосток – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Механизмы регенерации	15
1.2 Регенерация у иглокожих.....	16
1.3 <i>piwi</i> – молекулярный маркер стволовых клеток	18
1.3.1 Структура и механизм действия <i>Piwi</i> -пиРНК комплекса.....	18
1.3.2 Функции <i>Piwi</i> в клетках зародышевой линии.....	23
1.3.3 Функции <i>Piwi</i> в соматических клетках.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1 Сбор материала.....	29
2.2 Филогенетический анализ	29
2.3 Биохимические методы анализа	30
2.3.1 ПААГ электрофорез.....	30
2.3.2 Вестерн-блоттинг	32
2.3.3 МАЛДИ спектрометрия	32
2.4 Цитологические методы анализа.....	33
2.4.1 Проточная цитометрия	33
2.4.2 Сортировка клеток	34
2.4.3 Иммуноцитохимия	35
2.4.4 Электронная иммуноцитохимия	36
2.5 Молекулярные методы анализа	36
2.5.1 Выделение тотальной РНК	36
2.5.2 Обратная транскрипция.....	38

2.5.3 ПЦР в реальном времени	38
2.5.4 Капельная цифровая ПЦР	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	43
3.1 Характеристика белка Piwi <i>E. fraudatrix</i>	43
3.2 Идентификация белка Piwi в тканях <i>E. fraudatrix</i>	46
3.3 Клеточный состав целомичекой жидкости голотурии <i>E. fraudatrix</i>	48
3.4 Динамика численности целомоцитов в целомической жидкости после эвисцерации	53
3.5 Локализация Piwi-позитивных клеток в целомической жидкости и тканях стенки тела после эвисцерации	58
3.6 Анализ динамики экспрессии генов <i>piwi</i>	61
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	68
4.1 Динамика целомоцитов <i>E. fraudatrix</i> после эвисцерации.....	68
4.2 Белок Piwi как вероятный маркер клеток-предшественников целомоцитов.....	70
4.2.1 Характеристика белков Piwi <i>E. fraudatrix</i>	70
4.2.2 Идентификация белка Piwi в половых клетках <i>E. fraudatrix</i>	72
4.2.3 Идентификация белка Piwi в соматических тканях <i>E. fraudatrix</i> после эвисцерации.....	73
4.2.4 Определение динамики экспрессии генов <i>piwi</i> в ходе восстановления популяции целомоцитов	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ВЫВОДЫ	80
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	82

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БСА – бычий сывороточный альбумин;
ДАПИ – 4',6-диамидино-2-фенилиндол;
ДСН – додецилсульфат натрия;
кДНК – комплементарная ДНК;
киРНК – короткая интерферирующая РНК;
кцПЦР – капельная цифровая ПЦР;
МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация;
мнРНК – малая некодирующая РНК;
ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле;
ПВДФ – поливинилиденфторид;
пиРНК – Рiwi-ассоциированная РНК;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
ФМСФ – фенилметилсульфонил фторид;
ФСБ – фосфатно-солевой буфер;
ЦЖ – целомическая жидкость;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
ЭДТА-Na₂ – ЭДТА динатриевая соль;
CMFSS – солевой раствор без Ca²⁺ и Mg²⁺;
TBST – Трис буфер с Твин-20.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Свойство восстанавливать утраченные части тела сильно варьирует в филогении животных: от способности плоских червей регенерировать целую особь из небольшого фрагмента тела до практически полной неспособности птиц и млекопитающих восстанавливать какие-либо структуры (Bely, Nyberg, 2010; Seifert et al., 2012; Tiozzo, Copley, 2015). Высокий регенерационный потенциал широко распространен среди беспозвоночных (Brockes, Kumar, 2008), а для его реализации используются разные механизмы. Например, регенерация может происходить путем морфаллаксиса (перестройки оставшихся тканей) или эпиморфоза (роста и дифференцировки вновь образующихся тканей), или с помощью некоторой комбинации этих механизмов (Agata et al., 2007; Carlson, 2007; Blau, Pomerantz, 2011; Wagner et al., 2012; Tiozzo, Copley, 2015). Бластема, если таковая возникает, может образовываться за счет стволовых клеток (таких как необласты у планарий) (Eisenhoffer et al., 2008), дедифференцировки зрелой ткани (как в случае регенерации конечностей позвоночных) (Kragl et al., 2009) или комбинации этих способов (у кольчатых червей и иглокожих) (Candia-Carnevali, 2006; Özpolat, Bely, 2016). Исследование молекулярных механизмов регенерации на примере разных моделей восстановительных процессов является плодотворным подходом для изучения процесса клеточной дифференцировки, что в конечном итоге будет способствовать развитию регенеративной медицины.

В настоящее время большой прогресс в исследовании регенерации достигнут благодаря работам, выполненным на классических модельных объектах регенеративной биологии, таких как планарии, гидры, земноводные и рыбы (Alvarado, Tsonis, 2006; Carlson, 2007; Brockes, Kumar, 2008; Mehta, Singh, 2019). Однако для всестороннего понимания разнообразия механизмов регенерации и возможности проследить ход их эволюции, необходимо использование как можно большего количества модельных организмов, принадлежащих к разным таксонам.

Известно, что многие представители иглокожих способны к регенерации внутренних органов после травм или в процессе бесполого размножения

(Dolmatov, 1999; Candia-Carnevali, 2006). В отличие от планарий и гидр, иглокожие принадлежат к вторичноротым и рассматриваются как сестринская по отношению к хордовым группа беспозвоночных (Blair, Hedges, 2005; Swalla, Smith, 2008). Близость к хордовым и выраженные регенеративные способности позволяют использовать иглокожих в качестве ценных модельных организмов для решения задач эволюционной и регенеративной биологии (Hyman, 1955; Gahn, Baumiller, 2010).

Голотурии, или морские огурцы, обладают уникальным защитным механизмом – эвисцерацией, одной из форм аутомии, когда в ответ на стресс они выбрасывают часть своих внутренних органов (García-Arrarás et al., 1998; Zheng et al., 2006; Dolmatov, Ginanova, 2009; Sun et al., 2011). Утраченные органы могут впоследствии достаточно быстро восстанавливаться (Марушкина, Грачева, 1978; Долматов, 2007). Механизмы, используемые голотуриями для регенерации внутренних органов, широко исследуются как на клеточном, так и на молекулярном уровне: считается, что большую роль в морфогенезах играет процесс трансдифференцировки клеток целомического эпителия (Mashanov et al., 2005; Mashanov et al., 2014; Boyko et al., 2020). На сегодняшний день описаны многие гены, регулирующие процессы регенерации у голотурий, и продолжают открываться все новые аспекты их взаимодействий (Sun et al., 2011; Li et al., 2017; Dolmatov, 2021; Dolmatov et al., 2021).

В процессе эвисцерации у голотурий вместе с комплексом внутренних органов удаляется значительный объем целомической жидкости (ЦЖ) с содержащимися в ней клетками – целомоцитами (Byrne, 1986; Li et al., 2018; Ding et al., 2021). Целомоциты являются главным компонентом иммунной системы иглокожих, отвечают за клеточные реакции иммунитета и осуществляют синтез гуморальных факторов иммунной защиты (Smith, Davidson, 1992; Matranga, 1996; Gross et al., 1999; Eliseikina et al., 2004; Golconda et al., 2019). В ЦЖ присутствуют несколько морфологически различных типов целомоцитов, которые опосредуют иммунный ответ через фагоцитоз, инкапсуляцию, цитотоксичность и производство противомикробных агентов (Canicatti, Quaglia, 1991; Chia, Xing,

1996; Dolmatova et al., 2004; Ramírez-Gómez et al., 2010; Vazzana et al., 2018). В процессе регенерации голотуриям необходимо регенерировать свои целоциты, тем самым восстанавливая иммунную функцию (Li et al., 2018). Однако вопрос о клеточных источниках восстановления целоцитов окончательно не решен. Предполагается, что в ЦЖ присутствует популяция циркулирующих стволовых клеток, способных давать начало всем типам целоцитов (Eliseikina, Magarlamov, 2002; Candia-Carnevali, 2006; Xing et al., 2008; Candia-Carnevali et al., 2009; Sharlaimova et al., 2021). Однако, основываясь лишь на морфологических данных, такие предположения нельзя считать достоверными. Необходимы надежные молекулярные маркеры, способные решить вопрос присутствия или отсутствия стволовых клеток в ЦЖ и обозначить их вовлеченность в восстановительные процессы. На сегодняшний день в качестве маркеров стволовых клеток используется группа генов «стволовости», один из которых – ген *piwi* (Alié et al., 2015; Fierro-Constaín et al., 2017).

Ген *piwi* экспрессирует регуляторный белок, встречающийся у животных и простейших, способных к половому размножению (Beuret, Lin, 2011). Основной функцией белка Piwi считается поддержание геномной целостности первичных половых клеток (Vagin et al., 2006; Aravin et al., 2007, Juliano et al., 2011; Mani, Juliano, 2013). Нарушения стабильности генома в результате деятельности мобильных генетических элементов приводят к эктопической рекомбинации, вызывают инсерционный мутагенез и тем самым нарушают целостность генома (Hedges, Deininger, 2007; Wallace et al., 2008). Для защиты генома от мобильных генетических элементов существует эволюционно консервативный путь сайленсинга (замалчивания) транспозонов, включающий белки Piwi и связанные с ними Piwi-взаимодействующие РНК (пиРНК) (Malone et al., 2009; Khurana, Theurkauf, 2010; Sienski et al., 2012). Такие пиРНК часто комплементарны последовательностям транспозонов, а белок Piwi обладает способностью подавлять их деятельность (Itou et al., 2015; Sumiyoshi et al., 2016). Сохранение стабильности генома особенно важно для стволовых клеток зародышевой линии, поскольку нарушения, вызванные в них транспозонами, могут быть переданы

следующему поколению (van Wolfswinkel, 2014; Lim, Kai, 2015). По этой причине Piwi так консервативны и обнаруживаются в первичных половых клетках у всех животных (Seto et al., 2007; Juliano et al., 2010; Bak et al., 2011). Мутации, приводящие к потере белков Piwi, выражаются в дерепрессии транспозонов, сбоях в гаметогенезе и бесплодии (Sienski et al., 2012; Yakushev et al., 2013).

Хотя Piwi наиболее специфичен для клеток зародышевой линии, появляется все больше свидетельств его обнаружения в соматических тканях в основном у беспозвоночных, таких как кишечнополостные, губки, оболочники (Funayama et al., 2010; Rinkevich et al., 2010; Lim et al., 2014; Fierro-Constaín et al., 2017; Prahera et al., 2017). У многих исследованных организмов ген экспрессируется как в стволовых клетках зародышевой линии, так и в соматических мультипотентных, чаще плюрипотентных, стволовых клетках, вовлеченных в регенерацию (De Mulder et al., 2009; Plickert et al., 2012; Fierro-Constaín et al., 2017).

Объектом нашего исследования послужила голотурия *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov & Baranova, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirota), обладающая выраженным регенераторным потенциалом и способная к эвисцерации внутренних органов и целомоцитов с последующим их восстановлением. Использование маркера *piwi* поможет решить вопрос о наличии и локализации стволовых клеток, дающих начало клеткам ЦЖ в процессе регенерации после эвисцерации.

Степень разработанности темы. С открытием соматической экспрессии *piwi*, его функции активно исследуются. Появляются новые сведения о его роли в эмбриогенезе (Mani et al., 2014; Yajima et al., 2014) и в развитии различных патологий (Tan et al., 2015). Исследуются механизмы совместной работы Piwi и малых пиРНК, способы эпигенетической и трансляционной регуляции экспрессии генов, используемые ими для замалчивания транспозонов, спецификации зародышевой линии, поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии, также для осуществления ряда дополнительных функций, таких как регуляция клеточного цикла и участие в мейозе (Sienski et al., 2012; Mani et al., 2014; Itou et al., 2015; Jiang et al., 2016; Ponnusamy et al., 2017; Yashiro et al., 2018;

Zeng et al., 2020). Благодаря привлечению к исследованиям функций *piwi* все больше неклассических объектов молекулярной биологии, таких как губки, оболочники, более очевидной ставится связь гена с регенерацией (Funayama et al., 2010; Rinkevich et al., 2010; Juliano et al., 2014).

Появляются новые данные по исследованию *piwi* у иглокожих (Song, Wessel, 2007; Yajima et al., 2014; Sun et al., 2021). Морские ежи, традиционно используемые в качестве модельных объектов биологии развития, не обладают ярко выраженными регенеративными способностями, однако исследования дифференциальной экспрессии генов, связанных с регенерацией шипов или педицеллярий, показали присутствие экспрессирующих *piwi* мультипотентных стволовых клеток в некоторых соматических тканях (Reinardy et al., 2015; Vodnar, Coffman, 2016). У *Holothuria glaberrima* транскрипты *piwi* были обнаружены в клетках паренхимы, вероятно, принимающих участие в регенерации нервной системы (Mashanov et al., 2015). Однако, данные о соматической экспрессии *piwi* у других иглокожих в настоящее время отсутствуют.

Цель и задачи исследования. Цель представленной работы – изучение механизма восстановления клеточного состава ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* после эвисцерации с использованием гена *piwi* и продукта его активности – белка Piwi, в качестве молекулярных маркеров стволовых клеток.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Основываясь на данных транскриптомного анализа, установить наличие, доменную структуру белка Piwi у голотурии *E. fraudatrix* и его гомологию с белками Piwi у представителей разных систематических групп животных.
2. Детектировать наличие белка Piwi в гонадах голотурии *E. fraudatrix*.
3. Идентифицировать клетки, экспрессирующие белок Piwi, в составе ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* и исследовать их динамику в ходе восстановления целоцитов после эвисцерации.
4. Осуществить поиск места локализации Piwi-содержащих клеток в тканях стенки тела голотурии.

5. Исследовать динамику экспрессии *piwi* в клетках ЦЖ и стенке тела *E. fraudatrix* в процессах восстановления после эвисцерации.

Научная новизна. На основании данных о динамике клеточных популяций целомоцитов в ходе репаративной регенерации показано, что источником основных линий дифференцировки иммунокомпетентных клеток ЦЖ являются низкодифференцированные ювенильные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Впервые в тканях голотурии *E. fraudatrix* обнаружен ген *piwi* и продукт его активности – белок Piwi. Установлено, что экспрессия *piwi* характерна как для половых, так и для соматических клеток голотурии. Показано, что активность гена в половых клетках ограничивается лишь мужской линией.

Впервые в рамках данной диссертационной работы в составе клеток ЦЖ обнаружена субпопуляция Piwi-позитивных клеток, имеющих морфологические признаки ювенильных целомоцитов, и на основании данных о динамике численности клеток в ходе регенерации показано их участие в процессе восстановления клеточного состава ЦЖ. Использование белка Piwi в качестве маркера мульти-/плюрипотентности позволило также идентифицировать в составе стенки тела голотурии *E. fraudatrix* пул Piwi-позитивных клеток. Установлено, что эвисцерация стимулирует их выселение в целомическую полость, что свидетельствует об их участии в восстановлении клеточного состава ЦЖ. Впервые исследована динамика экспрессии гена *piwi* в клетках ЦЖ и в тканях стенки тела после эвисцерации, полученные данные подтверждают наличие внешней по отношению к целомоцитам субпопуляции клеток-предшественников, реализующихся в условиях вызванного эвисцерацией стресса.

Теоретическое и практическое значение работы. У голотурии *E. fraudatrix*, обладающей способностью к эвисцерации и последующему восстановлению комплекса внутренних органов, обнаружен регуляторный белок Piwi. Анализ аминокислотных последовательностей подтвердил структурную и функциональную консервативность белка. Показано, что экспрессия гена *piwi* характерна как для клеток полового пути, так и для соматических клеток, что

свидетельствует об универсальной роли продукта его активности – белка Piwi, в поддержании мульти-/плюрипотентности клеток. Использование гена *piwi* в качестве специфического молекулярного маркера стволовых клеток при исследовании восстановления клеток ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* позволило получить убедительные доказательства гистогенетических взаимоотношений целомоцитов и клеток, локализованных в соединительной ткани стенки тела. Полученные данные способствуют пониманию механизмов, лежащих в основе процесса регенерации целомоцитов иглокожих.

Исследование механизмов, реализуемых в ходе репаративной регенерации, на примере представителя иглокожих актуально как для понимания способов регуляции клеточной дифференцировки, так и для развития представлений об эволюции механизмов регенерации в ряду вторичноротых животных. Полученные в результате исследования данные могут быть использованы для решения задач регенераторной медицины.

Теоретические положения и результаты проведенных исследований использованы при составлении отчетов по теме ННЦМБ ДВО РАН «Регенерация, бесполое размножение и иммунитет у двустворчатых моллюсков и иглокожих» (0268-2019-0001, № гос. регистрации 221022400135-6).

Методология и методы диссертационного исследования. Для исследования механизмов восстановления клеточного состава ЦЖ после эвисцерации голотурии *E. fraudatrix* в данной работе применялись биохимические, цитологические и молекулярные методы анализа. Метод проточной цитометрии был использован для анализа динамики субпопуляций целомоцитов на ранних сроках регенерации. В качестве маркера стволовых клеток в тканях голотурии был выбран ген *piwi*. Для поиска продуктов его экспрессии в тканях *E. fraudatrix* использовали метод вестерн-блоттинга с применением антител к белку Piwi, а также метод МАЛДИ масс-спектрометрии для его идентификации. Исследование местоположения клеток, содержащих белок Piwi, прослеживание их динамики по ходу восстановления клеточного состава ЦЖ, а также установление внутриклеточной локализации белка

осуществляли с помощью методов иммуноцитохимии и электронной иммуноцитохимии. Для количественной оценки экспрессии гена использовали два метода ПЦР: ПЦР в реальном времени и цифровую капельную ПЦР.

Личный вклад автора. В рамках исследования были освоены различные биохимические, цитологические и молекулярные методы. Автором подготовлены и реализованы все этапы экспериментальных работ, а также произведен анализ и статистическая обработка полученных данных, подготовка графиков и иллюстраций. Автор принимал участие в представлении полученных результатов исследования на конференциях и написании научных публикаций.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У представителя иглокожих голотурии *E. fraudatrix* экспрессия гена *piwi* характерна для гонад и некоторых соматических тканей, в частности, для клеток ЦЖ и стенки тела.

2. В составе ЦЖ выявляется субпопуляция Piwi-позитивных клеток, характеризующихся высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и обладающих признаками ювенильных.

3. Источником восстановления клеточного состава ЦЖ в условиях стресса, вызванного эвисцерацией, является внешняя популяция клеток-предшественниц, заселяющих рыхлые и плотные слои стенки тела и выселяющихся в ЦЖ сразу после эвисцерации.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов основывается на использовании современных методов исследования, репрезентативности выборки и корректном анализе полученных данных с помощью методов статистического анализа.

Эксперименты проводили в соответствии с разработанными для каждого метода протоколами и рекомендациями. Осуществляли постановку предварительных экспериментов с подбором оптимальных условий. Воспроизводимость и специфичность каждого используемого в работе метода подтверждали использованием отрицательных контролей и многократных повторов.

Данные проведенных экспериментов задокументированы и представлены в настоящей работе в виде графиков и рисунков. Большая часть полученных в ходе выполнения диссертационной работы результатов опубликована в рецензируемых научных изданиях.

Апробация работы и публикации. Полученные результаты были представлены на XVI Международной конференции по иглокожим (Нагоя, Япония, 2018); на X Европейской конференции по иглокожим (Москва, Россия, 2019); и Ежегодной научной конференции Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, Россия, 2018-2019). По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Scopus/Web of Science и входящих в список изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 2 таблицы и 20 рисунков. Материалы работы представлены в виде введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», а также выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 297 наименований, из них 290 на английском языке.

Финансовая поддержка работы. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-01334.

Благодарности. Выражаю глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н. Марине Геннадьевне Елисейкиной за опытное руководство, помощь в проведении исследования, консультирование по любым возникающим вопросам и всестороннюю поддержку на протяжении всех лет работы в лаборатории. Особую благодарность выражаю к.б.н. Шамшуриной Екатерине Валерьевне за помощь в освоении новых методик и обсуждения результатов. Хочу поблагодарить д.б.н. Ламаш Нину Евгеньевну за обучение биохимическим методам, к.б.н. Бороду Андрея Дмитриевича за помощь в работе на проточном цитометре и клеточном сортере, Вернера Андрея Эдуардовича за консультирование по нюансам работы метода капельной цифровой ПЦР, к.б.н.

Шабалина Сергея Владимировича за помощь в анализе белка Piwi методом МАЛДИ масс-спектрометрии, Черепкову Элеонору Валерьевну и Бойко Алексея Вячеславовича за их ценные комментарии к биоинформатической части работы, к.б.н. Пущина Игоря Игоревича за консультирование по вопросам статистической обработки данных. Глубокую признательность выражаю к.б.н., доценту кафедры клеточной биологии и генетики ДВФУ Токмаковой Наталье Павловне за ознакомление с текстом рукописи, рекомендации и справедливые замечания, а также всему коллективу кафедры за многолетнюю поддержку. Выражаю искреннюю благодарность заведующему лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН д.б.н., чл.-корр. РАН Долматову Игорю Юрьевичу и всему коллективу лаборатории за постоянную и всеобъемлющую помощь в работе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизмы регенерации

Регенерация – это способность клеток взрослого организма использовать некоторую комбинацию пролиферации, миграции и дифференциации с целью восстановления соответствующей структуры тела (Lai, Aboobaker, 2018). В то время как некоторые животные, такие как представители кишечнополостных и плоских червей, могут регенерировать целую особь из небольшого фрагмента тела, другие (птицы, нематоды, пиявки) способны лишь частично или полностью не способны регенерировать (Goss, 1969; Bely, Nyberg, 2010; Tanaka, Reddien, 2011). Потенциал к регенерации может сильно варьировать в пределах одного таксона, среди близкородственных видов и частей одного и того же организма (Seifert et al., 2012; Sandoval-Guzmán et al., 2014; Zattara, Bely, 2016).

В ряде случаев для регенерации определенной структуры тела могут быть привлечены резидентные стволовые клетки. Стволовые клетки – это особый тип клеток, способных самообновляться и производить один или несколько дифференцированных типов клеток (Weissman et al., 2001; Gilbert, 2010). Регенеративный механизм, при котором резидентные стволовые клетки мигрируют непосредственно в область регенерации и дифференцируются в функциональные клетки, получил название «морфаллаксис» (Morgan, 1901; Agata et al., 2007; Cai et al., 2007). Такая стратегия чаще используется беспозвоночными, такими как планарии, которые поддерживают популяцию стволовых клеток, известных как необласты, по всему телу (Müller, 2006; Funayama et al., 2010; Aboukhatwa, Aboobaker, 2015; Gehrke, Mansi, 2016).

Стволовые клетки могут быть унипотентными (например, сперматогенные стволовые клетки) (Griswold, Oatley, 2013), мультипотентными (гемопоэтические стволовые клетки) (Bonnet, 2002), плюрипотентными и тотипотентными (стволовые клетки в раннем развитии) (Wobus, 2001; Müller et al., 2004; He et al., 2009).

При отсутствии стволовых клеток новая ткань может также образовываться из дифференцированных клеток путем дедифференцировки – потери дифференцированного характера клеточного типа с образованием делящейся клетки, которая действует как клетка-предшественник (Jopling et al., 2011; Tanaka, Reddien, 2011; Kikuchi, 2015; Zhu et al., 2021). Механизм, включающий дедифференцировку, пролиферацию и повторную дифференцировку для регенерации поврежденных тканей называется эпиморфозом (Morgan, 1901). При этом механизме полностью дифференцированные клетки теряют свою характерную генетическую программу и возвращаются в недифференцированное состояние, подобное стволовым клеткам, и начинают пролиферировать.

Наконец, новые типы клеток могут возникать в результате трансдифференцировки – изменения состояния от одного клеточного типа к другому (Selman, Kafatos, 1974; Siebert et al., 2008; Jopling et al., 2011).

Основываясь на анализе процессов регенерации у разных систематических групп, кажется вероятным, что регенерация возникла рано в эволюции животных и, возможно, совпадает с происхождением многоклеточности. Морфалаксис более широко распространен и встречается как у билатерий, так и у небилатерий (Funayama et al., 2010; Plickert et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Sandoval-Guzmán et al., 2014; Berberoglu et al., 2017), тогда как эпиморфоз, по-видимому, является приобретением билатерий (Selman, Kafatos, 1974; Jopling et al., 2011; Kikuchi, 2015).

1.2 Регенерация у иглокожих

Тип иглокожие представлен пятью классами: Crinoidea (морские лилии), Asteroidea (морские звезды), Echinoidea (морские ежи), Ophiuroidea (офиуры) и Holothuroidea (морские огурцы) (Medina-Feliciano, García-Arrarás, 2021). Регенерация распространена повсеместно среди представителей разных классов и является признаком всех современных иглокожих (Candia-Carnevali, 2006; Dupont, Thorndyke, 2006). Однако регенеративный потенциал значительно варьирует в пределах типа: от обладающих низким потенциалом морских ежей (Dubois,

Ameye, 2001) до способных регенерировать лучи и тело морских звезд (Ben Khadra et al., 2018) и обладающих эвисцерацией голотурий (Smith, 1981; García-Arrarás et al., 2018).

Регенерация иглокожих тесно связана с бесполом размножением, что объясняет их способность к двунаправленной регенерации: животное, разрезанное пополам, может полностью регенерировать двух особей, как, например, некоторые морские звезды (Emson, Wilkie, 1980; Rubilar et al., 2005); в то время как некоторые другие иглокожие регенерируют унинаправленно: например, при аутомии и поперечном разрезании голотурий только один из двух образующихся фрагментов тела обладает достаточным потенциалом к регенерации утраченных органов (Smith, 1981; Долматов, 2009).

Голотурии также обладают способностью к эвисцерации – одной из форм аутомии, при которой пищеварительный тракт и другие внутренние органы удаляются с последующей их полной регенерацией (Emson, Wilkie, 1980; Byrne, 1986; García-Arrarás et al., 1998; García-Arrarás et al., 2018). Такая реакция является ответом на повреждающее действие внешней среды или защитой от хищников и может быть вызвана в лабораторных условиях с помощью механических, электрических или химических раздражителей (Domantay, 1931; Kille, 1931). Существует два разных типа эвисцерации: голотурии отряда Dendrochirotida, к которому принадлежит вид *E. fraudatrix*, выбрасывают аквафарингеальный комплекс, пищеварительный тракт, часть гонадных трубочек и иногда левого водного легкого через передний конец тела (Leibson, Dolmatov, 1989; Dolmatov, 1992; Leibson, 1992); в то время как морские огурцы отряда Aspidochirotida выбрасывают пищеварительный тракт, водное легкое и часть гонадных трубочек через анальное отверстие (García-Arrarás et al., 1998; Shukalyuk, Dolmatov, 2001).

Регенерация внутренних органов после эвисцерации у голотурий осуществляется путем дедифференцировки или трансдифференцировки специализированных клеток, что подтверждено многими исследованиями (García-Arrarás et al., 1998; Dolmatov, 1999; Dolmatov, Ginanova, 2001; Shukalyuk, Dolmatov, 2001; Mashanov et al., 2005; García-Arrarás, Dolmatov, 2010; Dolmatov et

al., 2012; Kalacheva et al., 2017). Например, регенерация пищеварительной трубки голотурии *E. fraudatrix* после эвисцерации осуществляется за счет механизма дедифференцировки и трансдифференцировки клеток целомического эпителия передней регенерирующей кишки в энтероциты (Mashanov et al., 2005; Boyko et al., 2020).

На сегодняшний день не представлено прямых доказательств наличия у иглокожих соматических стволовых клеток или их участия в морфогенезах (Vogt, 2012; Dolmatov, 2020), однако считается, что циркулирующие стволовые клетки могут принимать участие в восстановлении популяции клеток ЦЖ (Thorndyke et al., 2001; Candia-Carnevali et al., 2009; Petukhova et al., 2018). Также имеются сведения о существовании резидентных стволовых клеток, участвующих в регенерации нервной системы голотурий (Mashanov et al., 2015).

1.3 *piwi* – молекулярный маркер стволовых клеток

1.3.1 Структура и механизм действия Piwi-пиРНК комплекса

Ген *piwi* (P-element-induced wimpy testis) был впервые обнаружен как ген, необходимый для пролиферации клеток зародышевой линии *Drosophila melanogaster* (Cox et al., 1998). Ген кодирует высоко консервативный белок семейства Argonaute. Белки этого семейства делятся на две основные клады: Ago (на основании *Arabidopsis thaliana* Ago1) (Bohmert et al., 1998) и Piwi (*Drosophila melanogaster* Piwi) на основе гомологии последовательностей (Lin, Spradling, 1997). Белки клады Ago связывают микроРНК и короткие интерферирующие РНК (киРНК) и повсеместно экспрессируются в тканях как прокариот, так и эукариот (Carmell et al., 2002; Yuan et al., 2005; Wu, Velasco, 2008). Экспрессия белков клады Piwi, напротив, характерна только для животных (за исключением некоторых одноклеточных эукариот, таких как *Tetrahymena*) и часто ограничивается первичными половыми клетками (Kurth, Mochizuki, 2009; Thomson, Lin, 2009). Белки Piwi связываются с особым классом малых РНК – Piwi-взаимодействующими РНК (пиРНК) (Grivna et al., 2006; Saito et al., 2006; Aravin et al., 2007; Houwing et al., 2007).

Для белков Piwi, как и для семейства Argonaute в целом, характерно наличие двух консервативных доменов: центрального домена PAZ (названного по трем белкам, содержащим этот домен: Piwi, Argonaute и Zwiille) и С-концевого домена PIWI (Cerutti et al., 2000; Höck, Meister, 2008; Schirle, MacRae, 2012). Домен PAZ содержит складку для связывания одноцепочечной нуклеиновой кислоты (Lingel et al. 2003; Yan et al., 2003). Структура домена PIWI подобна ферментам РНКазы Н и обладает эндонуклеазной активностью в отношении целевых РНК (Okamura et al., 2004; Song et al., 2004; Gunawardane et al., 2007). Помимо высококонсервативных доменов в состав белков входят также менее консервативный домен MID и вариабельный N-концевой домен (Song et al., 2004; Boland et al., 2011; Kuhn, Joshua-Tor, 2013).

Расщепление целевых нуклеиновых кислот происходит в домене PIWI, содержащем складку, гомологичную каталитическим центрам бактериальных РНКаз Н. Как и РНКазы Н, каталитический сайт домена PIWI содержит четыре аминокислотных остатка, для слайсерной активности которых требуется наличие двухвалентного катиона Mg (Schwarz et al., 2004; Parker et al., 2009; Matsumoto et al., 2016). Следовательно, свои функции белки семейства Argonaute осуществляют, подобно эндорибонуклеазам, используя катион-зависимый механизм гидролиза целевых молекул РНК (Parker et al., 2004; Schwarz et al., 2004; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005).

Белки семейства Argonaute участвуют в подавлении экспрессии генов, используя малые некодирующие РНК (мнРНК) (Arkov, 2018). мнРНК, такие как киРНК, микроРНК или пиРНК, закрепляются в специфических связывающих карманах белков Argonaute и направляют их к молекулам-мишеням (Ketting, 2011; Hirakata, Siomi, 2016). Белки клады Ago связываются с киРНК и микроРНК и участвуют как в транскрипционном, так и в посттранскрипционном замалчивании генов (Höck, Meister, 2008; Ghildiyal, Zamore, 2009). Piwi связывают пиРНК: 5'-фосфат пиРНК размещается в гидрофильном кармане внутри домена MID, обеспечивающего специфическое распознавание нуклеотидов, а их 3'-конец закрепляется доменом PAZ (Frank et al., 2010; Simon et al., 2011; Tian et al., 2011).

Экспрессия белков Piwi в основном ограничена клетками зародышевой линии, геном которых требует дополнительной защиты от действия мобильных генетических элементов во время гаметогенеза (Wahid et al., 2009; Siomi et al., 2011). Помимо ограничения зародышевой линией, пиРНК отличается большим размером (24 до 31 нуклеотидов вместо 24-27 нуклеотидов у микроРНК и киРНК) и низкая консервативность (Hartig et al., 2007; Ghildiyal, Zamore, 2009). Впервые идентифицированные у *D. melanogaster*, пиРНК были первоначально обозначены как ассоциируемые с повторами короткие интерферирующие РНК (repeat-associated small interfering RNA), поскольку они транскрибируются с участков генома, соответствующих повторяющимся элементам и транспозонам и участвуют в их подавлении (Saito et al., 2006; Vagin et al., 2006; Gunawardane et al., 2007). Впоследствии, поскольку была обнаружена их связь с белками Piwi, но не с белками клады Ago, они были переименованы в пиРНК (Lau et al., 2006; Houwing et al., 2007).

Молекулы пиРНК транскрибируются из определенных геномных локусов: значительный процент происходит из межгенных областей, содержащих транспозоны и повторяющиеся последовательности, чем объясняется консервативная функция белков Piwi по репрессии транспозонов, а мутации белков Piwi выражаются в дерепрессии транспозонов в клетках зародышевой линии (Vagin et al., 2006; Brennecke et al., 2007; Klenov et al., 2007; Girard, Hannon, 2008; Sienski et al., 2012). Также часть пиРНК происходит из 3'-нетранслируемых областей генома (UTRs) многих информационных РНК (Robine et al., 2009), а часть – из нетранспозонных регионов и, следовательно, имеет отличную от регуляции транспозонов функцию (Beyret, Lin, 2011).

Транскрибируемые с геномных локусов пиРНК затем амплифицируются через чередующуюся каталитическую активность двух различных белков Piwi в механизме, известном как «пинг-понг цикл» (Gunawardane et al., 2007; Aravin et al., 2008; Vamezai et al., 2012; Nishida et al., 2015; Gainetdinov et al., 2018; Yashiro et al., 2018). Этот механизм сочетает процесс деградации мРНК активных транспозонов с биогенезом новых пиРНК (рис. 1).

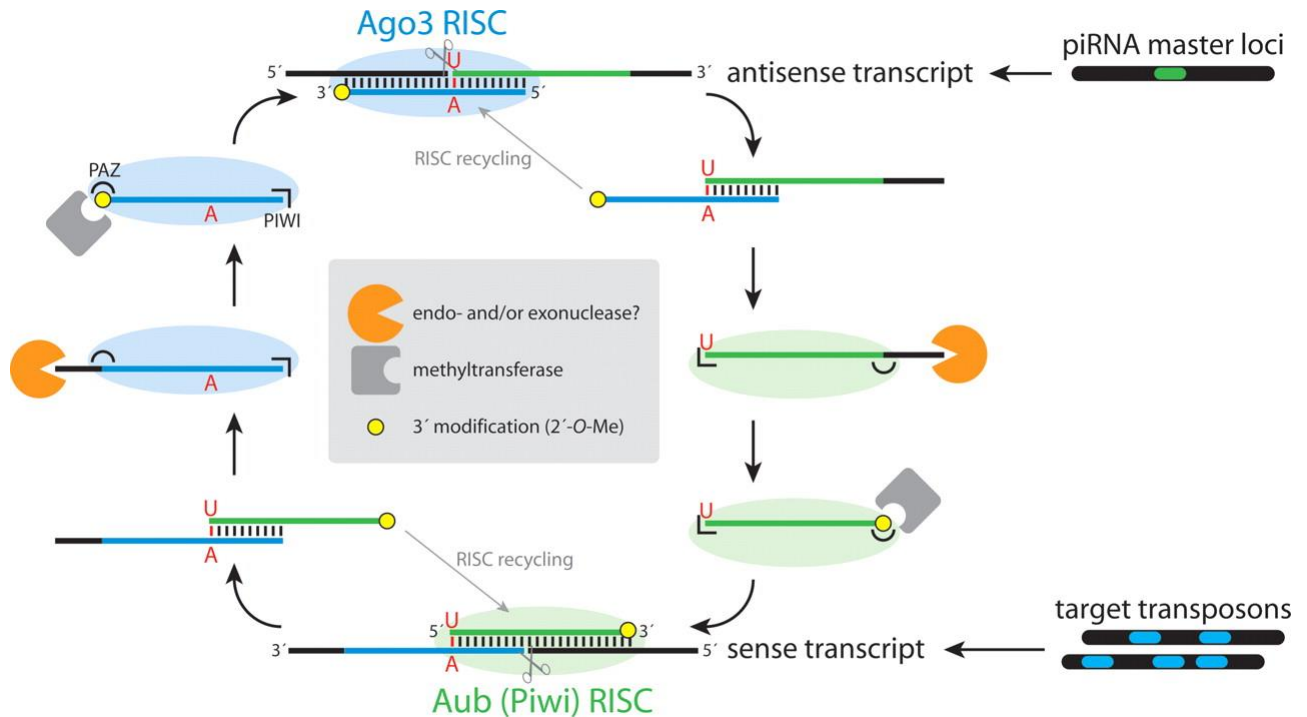


Рисунок 1 – «Пинг-понг» модель функционирования Piwi-пиРНК комплекса (Hartig et al., 2007).

На рисунке 1 представлены 3 белка кланды Piwi *D. melanogaster*: Aub, Piwi и Ago3. Последовательности пиРНК, ассоциирующиеся с белками Aub и Piwi (выделены зеленым цветом), являются антисмысловыми по отношению к транспозонам (target transposons); Ago3 образует комплекс с пиРНК, смысловыми к транспозонам (обозначены голубым цветом). Ago3 вместе с пиРНК расщепляет антисмысловую цепь у пар оснований А:U, создавая уридин-содержащий 5'-конец антисмысловой пиРНК (механизмы формирования их 3'-конца не ясны, предполагается участие ферментов эндо- или экзонуклеаз). Антисмысловая пиРНК, в свою очередь, ассоциируется с белком Aub или Piwi. Эндонуклеазная активность белков Aub/Piwi с пиРНК разрушает транскрипты смысловых транспозонов и одновременно продуцирует новые смысловые пиРНК (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007; Wahid et al., 2009; Czech, Hannon, 2016).

«Пинг-понг цикл» амплификации пиРНК происходит в клетке в структурах, известных как nuage – РНК-богатых электронно-плотных образованиях, локализованных в околядерной области половых клеток (Voronina et al., 2011; Shukalyuk, Isaeva, 2013). Nuage тесно связана с ядерными порами и может

принимать много форм, от диффузного облака до отдельных гранул (Harris, Macdonald, 2001; Brennecke et al., 2007; Ketting, 2011). Она содержит некоторые другие РНК-связывающие белки, такие как Tudor, РНК-хеликаза Vasa, Vasa-подобный белок PL10, РНК-связывающий белок Bruno, необходимые для биогенеза и функционирования пиРНК (Nishida et al., 2009; Reuter et al., 2009; Gustafson, Wessel, 2010; Huang et al., 2011; Xiol et al., 2014; Nishida et al., 2015).

Некодирующие пиРНК действуют, направляя белки Piwi на конкретную нуклеиновую кислоту-мишень (Iwasaki et al., 2015). Белки Piwi могут подавлять активность транспозонов на транскрипционном или посттранскрипционном уровнях, используя для этого механизмы эпигенетической модификации, ингибирования трансляции или деградации мРНК (Huang et al., 2013; Gou et al., 2014; Ito et al., 2015).

Большинство Piwi белков являются цитоплазматическими (например, белки Aub и Ago3 *D. melanogaster*, Mili и Miwi мышей) и локализованы в nuage, что указывает на их роль в посттранскрипционной регуляции (Grivna et al., 2006; Unhavaithaya et al., 2009). Белки Piwi разрушают целевые последовательности мРНК транспозонов, комплементарные пиРНК (Jiang et al., 2016; Ponnusamy et al., 2017). При мутациях по Piwi нарушается активность «пинг-понг» пути синтеза пиРНК и наблюдается дерепрессия транспозонов (Brennecke et al., 2007; Carmell et al., 2007; Li et al., 2021). Однако некоторые белки Piwi присутствуют в ядре и ассоциируются непосредственно с хроматином (Pal-Bhadra et al., 2004; Brower-Toland et al., 2007; Yashiro et al., 2018). Такие белки используют малые некодирующие РНК для эпигенетической регуляции экспрессии генов посредством модификации структуры хроматина, как правило, путем метилирования (Liu et al., 2004; Pelisson et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008). Белки Piwi способны как активировать, так и заглушать экспрессию генов, рекрутируя эпигенетические факторы в определенные геномные локусы для организации статуса хроматина (Smulders-Srinivasan, Lin, 2003; Brower-Toland et al., 2007; Yin, Lin, 2007; Aravin et al., 2008).

1.3.2 Функции Piwi в клетках зародышевой линии

У большинства исследованных животных белки Piwi экспрессируются исключительно в клетках зародышевой линии (Houwing et al., 2008; Wilczynska et al., 2009; Kowalczykiewicz et al., 2012). Белки Piwi играют эволюционную роль в поддержании зародышевой линии во время гаметогенеза у животных, и их активность у различных организмов может быть обнаружена от самой ранней стадии развития первичных половых клеток до поздних стадий гаметогенеза, таких как спермиогенез, активация яйцеклетки и оплодотворение (Cox et al., 1998; Bak et al., 2011).

Роль белков Piwi в спецификации зародышевых клеток во время раннего эмбриогенеза была исследована у *D. melanogaster* (Harris, Macdonald, 2001; Megosh et al., 2006). Зародышевые клетки образуются из части цитоплазмы ооцита, известной как зародышевая плазма (Illmensee, Mahowald, 1974; Voronina et al., 2011). Зародышевая плазма морфологически отличается от остальной цитоплазмы эмбриона наличием в ней nuage (Mahowald, 2001; Zheng et al., 2016). У дрозофилы есть три белка Piwi: Piwi, Aubergine (Aub) и Argonaute3 (Ago3), и все они экспрессируются в зародышевой плазме (Harris, Macdonald, 2001; Megosh et al., 2006). Белки контролируют образование первичных половых клеток из зародышевой плазмы, а у эмбрионов, лишенных материнской Piwi, наблюдается значительное снижение образования гамет (Lin, Spradling, 1997; Cox et al., 2000; Megosh et al., 2006; Brennecke et al., 2007; Li et al., 2009).

Ранее упомянутая электронно-плотная перинуклеарная структура nuage, содержащая важные для образования первичных половых клеток белки и РНК, обнаружена также у других организмов. В частности, она известна как Р-гранулы у *Caenorhabditis elegans* (Wang, Reinke, 2008), митохондриальное облако у *Xenopus laevis* (Heasman et al., 1984) и хроматоидное тело в семенниках млекопитающих (Saffman, Lasko, 1999; Grivna et al., 2006; Kotaja et al., 2006; Kotaja, Sassone-Corsi, 2007).

Помимо роли в спецификации первичных половых клеток, Piwi также участвует в поддержании жизнеспособности клеток зародышевой линии на последующих этапах гаметогенеза (Lin, Spradling, 1997; Cox et al., 1998). Ингибируя гены дифференцировки, Piwi поддерживает стволовые клетки зародышевой линии в недифференцированном состоянии и, таким образом, регулирует их самообновление и дифференцировку. И самки, и самцы *D. melanogaster*, мутантные по гену *piwi*, теряют первичные половые клетки из-за их неспособности к самообновлению (Lin, Spradling, 1997; Cox et al., 1998).

Два белка Piwi – Ziwi и Zili, экспрессируются у *Danio rerio* на протяжении всего оогенеза в женских и во время митоза и мейоза в мужских половых клетках, но не в зрелых сперматозоидах. У рыб, лишенных белков Piwi, наблюдается снижение количества первичных половых клеток, сопровождаемое отсутствием их дифференцировки в зрелые ооциты или сперматозоиды, что в конечном итоге приводит к потере всех половых клеток к тому времени, когда рыба достигает взрослого возраста (Houwing et al., 2007; Houwing et al., 2008).

Роль белков Piwi в поддержании клеток зародышевой линии сохраняется у млекопитающих. У мышей есть три гомолога Piwi: Miwi, Mili и Miwi2, два из которых входят в состав хроматоидного тела, а третий белок, Miwi2, локализуется в ядре (Deng, Lin, 2002; Carmell et al., 2007; Wang et al., 2009; Beyret, Lin, 2011). Белки демонстрируют отчетливую экспрессию во время спецификации и дифференцировки мужских первичных половых клеток (Beyret, Lin, 2011; Zhang et al., 2015).

Таким образом, очевидно, что белки Piwi требуются для формирования и поддержания зародышевой линии и регулирования разных аспектов гаметогенеза (Carmell et al., 2007; Chen et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Unhavaithaya et al., 2009). Также упоминается роль Piwi в регуляции процессов эмбриогенеза, таких как деградация материнских мРНК и репрессия трансляции у ранних эмбрионов, регуляция клеточного цикла и формирование анимально-вегетативной оси тела зародыша (Rodriguez et al., 2005; Rouget et al., 2010; Mani et al., 2014; Yajima et al., 2014; Halbach et al., 2020).

1.3.3 Функции Piwi в соматических клетках

В дополнение к основной функции в поддержании клеток зародышевой линии Piwi экспрессируется во взрослых соматических стволовых клетках некоторых многоклеточных (Mochizuki et al., 2001; Seipel et al., 2004; Funayama et al., 2010). Существует теория, согласно которой классические гены зародышевой линии, такие как *piwi* и *vasa*, имеют консервативные функции по спецификации стволовых клеток и поддержанию в них «стволовости» (Juliano et al., 2010; Juliano, Wessel, 2010; Alié et al., 2011; Isaeva, 2011; Lasko, 2013). Самообновляющиеся стволовые клетки больше, чем дифференцированные, нуждаются в повышенной защите от активности транспозонов, поэтому в соматических стволовых плюрипотентных клетках часто встречаются перинуклеарные nuage-подобные структуры, пиРНК с сигнатурами «пинг-понг» цикла, белки Vasa, PL10, Tudor и другие консервативные компоненты стволовых клеток зародышевой линии (Rebscher et al., 2008; Gustafson, Wessel, 2010; Juliano et al., 2014).

Соматическая экспрессия Piwi встречается чаще у беспозвоночных животных, обладающих потенциалом к частичной или полной регенерации тела (Seipel et al., 2004; Reddien et al., 2005; Giani et al., 2011).

Например, у небилатеральных животных, таких как губки, белки Piwi избирательно экспрессируются в археоцитах – взрослых стволовых клетках, способных дифференцироваться как в соматические, так и зародышевые клетки, и обуславливающие высокие регенеративные способности губок (Funayama et al., 2010). У кишечнополостных гомологи Piwi были обнаружены в интерстициальных клетках – мигрирующих плюрипотентных стволовых клетках, дающих начало разным клеточным линиям, таким как нематоциты, нейроны, зародышевые клетки (Müller et al., 2004; Seipel et al., 2004; Juliano et al., 2014; Lim et al., 2014).

Среди билатерально-симметричных животных позицию рано обособившейся группы занимает тип Xenacoelomorpha. Бескишечные турбеллярии обладают клеточной системой стволовых тотипотентных необластов (Bely, Sikes, 2010; Gehrke, Mansi, 2016), экспрессирующих консервативные гены

зародышевой линии, необходимые для их регенерации (De Mulder et al., 2009; Srivastava et al., 2014).

У представителей первичноротых – плоских червей, экспрессия *piwi* была обнаружена в необластах – тотипотентных взрослых стволовых клетках, обладающих потенциалом дифференцироваться во все типы соматических и в зародышевые клетки, обуславливая способность планарий регенерировать целые органы и структуры тела (Baguna et al., 1989; Palakodeti et al., 2008; Gehrke, Mansi, 2016; Zhu, Pearson, 2016). Гомологи *Piwi* локализованы в цитоплазме в электронно-плотных nuage-подобных структурах – хроматоидных тельцах, и участвуют в контроле обновления и дифференцировки необластов, а ингибирование этих генов вызывает дефекты регенерации и гибель животных (Reddien et al., 2005; Rossi et al., 2006; Li et al., 2021).

Наконец, у двух наиболее близких к позвоночным групп вторичноротых животных, бесчерепных и оболочников, также была обнаружена экспрессия гена *piwi*. Она характерна для зоны роста хвостовой почки ланцетника (Zhang et al., 2013) и соматических стволовых клеток колониальных асцидий *Botrylloides leachii* и *Botryllus schlosseri*, способных к регенерации всего тела (Rosner et al., 2009; Rinkevich et al., 2010; Rinkevich et al., 2013).

У позвоночных нет известных случаев регенерации всего тела. Некоторые животные имеют способности к частичной регенерации, например, некоторые земноводные могут регенерировать ампутированные конечности, а рыба *D. rerio* способна регенерировать хвостовой плавник, сердце и печень (Zhu et al., 2012; Gemberling et al., 2013; Sandoval-Guzmán et al., 2014). Стволовые клетки, участвующие в этих процессах, обычно имеют ограниченный потенциал и не проявляют экспрессию *piwi*. Исключением является аксолотль, в дедифференцированных клетках регенерирующих конечностей которого были обнаружены два белка *Piwi*. Ингибирование активности генов *piwi* приводило к снижению пролиферации клеток, вызывало апоптоз и в конечном итоге нарушало процесс регенерации (Zhu et al., 2012).

Две системы стволовых клеток млекопитающих экспрессируют белки подсемейства Piwi: Hiwi и Miwi2, в гемопоэтических стволовых клетках человека и мыши соответственно (Sharma et al., 2001; Nolde et al., 2013). Считается, что функция Hiwi заключается в поддержании деления кроветворных клеток, и его экспрессия снижалась при индукции дифференцировки (Sharma et al., 2001). Избыточная экспрессия другого мышинового белка Piwi – Mili, в клетках костного мозга приводит к повышенной пролиферации клеток. Мышиные мезенхимальные стволовые клетки, которые являются мультипотентными и могут дать начало разнообразным типам клеток, таким как остеобласты и жировые клетки, также экспрессируют Mili. Однако у мышей, у которых все гены *piwi* были отключены, не обнаруживают серьезных дефектов гемопоэза (Nolde et al., 2013).

Плюрипотентные стволовые клетки позвоночных, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и эмбриональные стволовые клетки, также экспрессируют гены *piwi*, где их функция, предположительно, заключается в сайлесинге транспозонов (Cheng et al., 2014).

Также Piwi у позвоночных могут экспрессироваться в некоторых типах раковых клеток (Qiao et al., 2002; Lee et al., 2006; Liu et al., 2006; Chen et al., 2007). Избыточная экспрессия этих белков проявляется в чрезмерной пролиферации и метастазировании и ассоциируется с неблагоприятным долгосрочным прогнозом (Lee et al., 2006; Taubert et al., 2007; Wang et al., 2012; Tan et al., 2015; Wang et al., 2016). Однако имеются типы рака, при которых, напротив, сверхэкспрессия белков Piwi положительно коррелировала с выживаемостью пациентов (Cheng et al., 2012; Lim et al., 2014; Chu et al., 2015).

Таким образом, большинство плюрипотентных стволовых клеток, вовлеченных в репаративную регенерацию, демонстрирует экспрессию *piwi* и других piage-ассоциированных генов, что указывает на наличие некоторых соматических функций белков Piwi в дополнение к их роли в клетках зародышевой линии (Thomson, Lin, 2009; Juliano et al., 2011). Однако, у представителей двух крупных клад, линяющие и позвоночные, белки Piwi в соматических стволовых клетках отсутствуют, при этом они функционируют в

зародышевой линии, где хорошо описаны и играют значимую роль (Grivna et al., 2006; Megosh et al., 2006). Более того, большинство представителей этих групп имеют соматические стволовые клетки, хоть и ограниченные одной клеточной линией (Griswold, Oatley, 2013; Tiozzo, Copley, 2015). В отличие от соматических стволовых клеток других таксонов, отсутствие у них экспрессии *Piwi* показывает, что наличие этого белка не являются необходимыми для их функционирования. Эти две клады в ходе эволюции также утратили способность к регенерации всего тела (Mehta, Singh, 2019), но даже у них в условиях искусственного увеличения пластичности клеток (например, в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках или при канцерогенезе) уровни экспрессии *Piwi*, как правило, увеличиваются (Su et al., 2012; Cheng et al., 2014; Fagegaltier et al., 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор материала

Объектом исследования послужила голотурия *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov & Baranova, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirota). Животных собирали на акватории Амурского залива, акклиматизировали и содержали в аквариумах с аэрируемой морской водой при температуре 15°C. Эвисцерацию стимулировали введением 0,1 мл 2% KCl в целомическую полость подопытных животных.

2.2 Филогенетический анализ

Поиск нуклеотидных последовательностей, соответствующих генам *piwi*, в транскриптом *E. fraudatrix* (TSA NCBI, GHCL00000000) (Boyko et al., 2020) проводили с помощью программы BLAST.

Белковые домены анализировали с помощью сайта Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и базы данных консервативных доменов NCBI (Conserved Domain Database, CCD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

Последовательности гомологов *Piwi* других организмов для проведения множественного выравнивания и реконструкции филогенетических отношений были взяты из базы данных Protein NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) (табл. 1).

Таблица 1 – Аминокислотные последовательности из базы данных Protein

Идентификатор	Наименование	Вид	Ссылка на публикацию
QQA03725.1	Piwi	<i>Apostichopus japonicus</i>	Sun et al., 2021
PIK36602.1	Seali	<i>Apostichopus japonicus</i>	Zhang et al., 2017
ALI93846.1	Piwi	<i>Holothuria glaberrima</i>	Mashanov et al., 2015
AAG42533.1	Seawi	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Rodriguez et al., 2005
NP_001107667.1	Seali	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Tu et al., 2012
AAD08704.1	Piwi	<i>Drosophila melanogaster</i>	Cox et al., 1998
NP_899181.1	Ziwi	<i>Danio rerio</i>	Cox et al., 1998
ACH96370.1	Zili	<i>Danio rerio</i>	Houwing et al., 2008
AAC97371.2	Hiwi	<i>Homo sapiens</i>	Cox et al., 1998
NP_001129193.1	Hili	<i>Homo sapiens</i>	Sasaki et al., 2003

Множественное выравнивание последовательностей проводили с помощью программы ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson et al., 1997). Филогенетическое дерево было построено в программе MEGA (версия 5.05) (Tamura et al., 2011) с использованием метода максимального правдоподобия и модели WAG (Whelan, Goldman, 2001). Перевод последовательностей из формата FASTA в формат MEGA осуществлялся в программе PROSEQ (версия 2.91) (Filatov, 2002). Наиболее подходящая модель для построения филогенетического дерева по имеющимся последовательностям была также подобрана в программе MEGA. Каждая ветвь дерева была подтверждена бутстрэп-методом на основе 500 повторений.

2.3 Биохимические методы анализа

2.3.1 ПААГ электрофорез

Поликлональные кроличьи антитела против Piwi *E. fraudatrix* были получены путем иммунизации пептидом, который включал высоко консервативный участок, отвечающий за связывание 5'-конца пиРНК,

расположенный в PIWI домене (VATKVAMQLNCKLGG). Синтез пептида и продукция первичных антител осуществлялись компанией Almbion (Россия).

ЦЖ с содержащимися в ней клетками в объеме по 200 мкл с 10 животных через 1 ч после эвисцерации собирали в 1,5 мл микропробирки с помощью двусторонней иглы Improvacuter 0,6x38 мм (Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай). Для предотвращения образования агрегатов клеток в пробирки предварительно добавляли 20 мкл 0,5 М ЭДТА до конечной концентрации 50 мМ. Клетки фильтровали через газ с размером ячейки 24 мкм, центрифугировали 5 мин при 600 g (4°C), супернатант удаляли (центрифуга Allegra X-30, Beckman Coulter Life Sciences, США). Осадок целоцитов промывали в 1 мл mQ, центрифугировали 2 мин при 1500 g (4°C). Все манипуляции по взятию целоцитов проводились на льду.

Гонады 6 голотурий (по 3 особи каждого пола) были взяты тотально. Образцы целоцитов и тканей гонад гомогенизировали на льду в лизирующем буфере (0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, содержащий 0,15 М NaCl и 0,1% Тритон X-100) в объеме 1:3 с добавлением 2 мМ ФМСФ, 30 мМ ЭДТА-Na₂ и коктейля ингибиторов протеаз (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:100. Гомогенизировали при 80% амплитуды ультразвуковой волны (96 мкм) 5 раз по 1 мин с перерывом в 1 мин (Q125 Sonicator, Qsonica, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин (Jouan BR4i, Thermo FS, США). Белковые экстракты хранили в виде аликвот при -70°C.

Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с построением калибровочной кривой по белку БСА (Thermo FS, США; xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, США) (Bradford, 1976).

Для разделения белков проводили электрофорез в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (Laemmli, 1970). Белковые экстракты смешивали с 2-кратным буфером для образцов (2x Laemmli sample buffer, Bio-Rad, США), добавляли 5% β-меркаптоэтанол, денатурировали кипячением в течение 5 мин и наносили на гель. В каждую лунку геля вносили по

20 мкг белка. Для определения молекулярной массы использовали белковый стандарт Spectra multicolor broad range protein ladder (Thermo FS, США).

Электрофорез проводили в Трис-глициновом электродном буфере (0,025 М Трис, 0,192 М Глицин, рН 8,6-8,7) с добавлением 0,1% ДСН при постоянном напряжении: 100 В до и 150 В после входа образцов в разделяющий гель (камера для вертикального электрофореза VE-2М, Helicon, Россия).

2.3.2 Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг проводили по стандартной методике (Towbin et al., 1979). Разделенные электрофорезом белки переносили на активированную метанолом ПВДФ мембрану (0,45 мкм, Bio-Rad, США) в модифицированном Лэммли электродном буфере (0,025 М Трис, 0,19 М глицин (рН 8,2-8,3), 0,01% ДСН, 20% метанол) с помощью мокрого переноса (150 мА в течение 1,5 ч в камере для блоттинга Criterion Blotter, Bio-Rad, США), промывали буфером TBST (0,01 М Трис-НСl (рН 7,5), 0,15 М NaCl, 0,03% Твин-20). Вся процедура проходила на льду. Мембрану инкубировали в блокирующем буфере (TBST, содержащий 5% обезжиренное молоко (AppliChem GmbH, Германия)) в течение 1 ч при комнатной температуре при постоянном помешивании на шейкере (Mini Rocker-Shaker MR-1, BioSan, Латвия). Очищенные поликлональные антитела против Piwi разводили в соотношении 1:5000 на TBST, содержащем 0,5% обезжиренного молока, и инкубировали при 4°C в течение ночи на шейкере. Мембрану промывали 3 раза TBST, после чего инкубировали в течение 1 ч с козьим антимышиным IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (Vector Laboratories, США), разведенным в соотношении 1:10000 в TBST, содержащем 0,5% обезжиренного молока. Мембрану промывали TBST и проводили детектирование с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) в камере ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

2.3.3 МАЛДИ спектрометрия

Образцы тканей, продемонстрировавших специфическое окрашивание антителами против белка Piwi на блоте, дополнительно разделяли с помощью

ПААГ-электрофореза. По окончании электрофореза гель фиксировали в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 40% этанола, в течение 1 ч, затем окрашивали 0,0025%-ным раствором Кумасси (0,0025% Кумасси бриллиантового синего R-250, 25% этанола, 10% уксусной кислоты) в течение ночи и отмывали в нескольких сменах раствора, содержащего 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Из геля вырезали полосы, соответствующие молекулярной массе 100 кДа, и подготавливали для МАЛДИ масс-спектрометрии (система 5800 MALDI TOF/TOF (AB Sciex Pte.Ltd., Сингапур)).

2.4 Цитологические методы анализа

2.4.1 Проточная цитометрия

Анализ динамики субпопуляций целомоцитов проводили с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). У 5 подопытных животных перед эвисцерацией и через 1, 4, 24 ч после начала эксперимента отбирали по 300 мкл ЦЖ. Для предотвращения образования агрегатов в образцы добавляли по 10 мкл 0,03 М ЭДТА. Образцы фиксировали 1 ч с добавлением в ЦЖ 25% глутарового альдегида, так, чтобы конечная концентрация фиксатора в образце составляла 2,5%. После чего их центрифугировали (Allegra X-30R, Beckman Coulter, США) до образования осадка и промывали добавлением фосфатно-солевого буфера (ФСБ), ресуспендировали, добавляли ДАПИ (GERBU Biotechnik GmbH, Германия) с конечной концентрацией 1 мкг/мл. В каждом образце оценивали, по крайней мере, 30000 событий. Исключение из анализа клеточных агрегатов производили путем треугольного гейтирования на двухпараметрических диаграммах FSC-A (прямое светорассеивание) против FSC-H (боковое светорассеивание). ДАПИ-позитивные клетки детектировали с использованием 450/45 ВР канала. Приблизительный размер клеток в образцах определяли с использованием калибровочных частиц для проточной цитофотометрии на FSC-A графике (Molecular Probes, США).

Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA 12 (StatSoft, США). Данные представлены как среднее значение \pm

стандартное отклонение. Статистическая значимость результатов оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с последующим LSD тестом. При этом значение $p < 0,05$ считалось статистически значимыми.

2.4.2 Сортировка клеток

У 5 подопытных животных перед эвисцерацией и через 1, 4, 24 ч после начала эксперимента отбирали по 300 мкл ЦЖ. Образцы фиксировали 1 ч с добавлением в ЦЖ 25% глутарового альдегида, так, чтобы конечная концентрация фиксатора в образце составляла 2,5%. Разделение целоцитов на субпопуляции проводили на клеточном сортере FACSMelody™ (Becton, Dickinson and Co., США), подключенном к компьютеру с установленным программным обеспечением BD FACSCorus™ (Becton, Dickinson and Co., США). Перед сортировкой целоциты окрашивали с помощью ДАПИ (GERBU Biotechnik GmbH, Германия) с конечной концентрацией 1 мкг/мл. Каждая отдельная частица (фрагменты клеток, одиночные или агрегированные клетки), обнаруженные сортером, считались «событием». Для получения достоверных результатов из анализа и сортировки последовательно исключали агрегаты клеток (события, не вошедшие в треугольный гейт на двумерном графике FSC-A против FSC-H) и клеточный дебрис (ДАПИ-отрицательные события и события, не вошедшие в прямоугольный гейт на двумерном графике FSC-A против FSC-W). События, прошедшие описанный отбор, считали одиночными целоцитами. Их разделяли на 4 субпопуляции на двумерном графике FSC-A против SSC-A в зависимости от относительного размера и грануляции клеток. Для каждой субпопуляции было получено не менее 10^6 клеток. Степень чистоты сортировки субпопуляций проверяли на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США), подключенном к компьютеру с программным обеспечением CytExpert (версия 2.4, Beckman Coulter, США).

2.4.3 Иммуноцитохимия

В эксперимент были взяты по 3 особи голотурии *E. fraudatrix* на каждую экспериментальную точку: интактные особи (контроль), 4 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации.

Для приготовления мазков целомоцитов по 200 мкл ЦЖ отбирали у каждого из подопытных животных. ЦЖ помещали на стекла, обработанные полилизинном, и инкубировали 15 мин во влажной камере при температуре 18°C, после чего препарат фиксировали в течение 15 мин 4% параформальдегидом (ПАР), приготовленном на ФСБ, рН 7,4 (AMRESCO, США), промывали в трех порциях ФСБ в течение суток.

Образцы тканей стенки тела фиксировали 4% ПАР в ФСБ, рН 7,4, (AMRESCO, США) в течение 4 ч и промывали тремя порциями ФСБ в течение дня. Кусочки ткани помещали в 15% раствор сахарозы в ФСБ (12 ч) и заливали в среду NEG-50™ (Thermo SF, США). Срезы замороженного материала изготавливали на криомикротоме HM 560 CryoStar (Thermo SF, США).

Окрашивание мазков целомоцитов и срезов замороженного материала проводили по аналогичной методике. Чтобы предотвратить неспецифическое связывание первичных антител, образцы обрабатывали блокирующим буфером в течение 2 ч (3% рыбный желатин (Teleostean galatin, Sigma-Aldrich, США), 0,3 М глицин, 0,5% Тритон X-100 на ФСБ), инкубировали с первичными иммунными анти-Piwi антителами, разведенными 1% БСА на ФСБ в соотношении 1:300 в течение суток при 4°C, затем промывали 1% БСА на ФСБ, содержащим 0,02% Твин-20 (3 раза по 10 мин) и окрашивали 1 ч при комнатной температуре вторичными антикроличьими антителами, мечеными Alexa 546 (Molecular Probs, США), разведенными 1% БСА на ФСБ в соотношении 1:750. После промывки в нескольких порциях ФСБ препараты заключали в специальную среду, содержащую ДАПИ для окраски ядерной ДНК (Vectashield, Vector Laboratories, США). Материал анализировали с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Подсчитывали

количество меченых антителами клеток в ЦЖ на 1000 клеток. Полученные данные выражали в процентах. Индивидуальные различия выражали с учетом среднего квадратичного отклонения.

2.4.4 Электронная иммуоцитохимия

В эксперимент были взяты 5 особей голотурии *E. fraudatrix* через 24 ч после эвисцерации. Образцы целомоцитов фиксировали 4% ПАР на ФСБ в течение 1 ч, после чего промывали в ФСБ 3 раза по 30 мин, каждый раз центрифугируя клетки перед сменой буфера (4000 g, 10 мин) на центрифуге MiniSpine Plus (Eppendorf, Германия). Затем материал заключали в 1% легкоплавкую агарозу LE (GERBU, Германия), приготовленную на ФСБ, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в среду LR White (Sigma-Aldrich, США). Ультратонкие срезы изготавливали с использованием ультрамикротомы UC7 (Liesa, Германия). Срезы обрабатывали блокирующим буфером в течение 30 мин (3% рыбный желатин (Teleostean galatin, Sigma-Aldrich, США), 0,3 М глицин, 0,5% Тритон X-100 на ФСБ), инкубировали с первичными иммунными анти-Piwi антителами, разведенными на 3% БСА на ФСБ в соотношении 1:30 в течении 12 ч при 4°C. Затем образцы промывали 1% БСА на ФСБ (3 раза по 15 мин) и помещали во вторичные антикроличьи антитела, меченные коллоидным золотом с размером частиц 11 нм (Sigma-Aldrich, США), разведенные в соотношении 1:50 в 1% БСА на ФСБ на 1,5 ч. Промывали ФСБ и деионизированной водой. Материал анализировали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

2.5 Молекулярные методы анализа

2.5.1 Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК образцы ЦЖ с содержащимися в ней клетками отбирали от одних и тех же 3 особей в «норме», через 1 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации. ЦЖ в объеме 200 мкл от каждого животного собирали в 2 мл микропробирки с помощью двусторонней иглы Improvacuter 0,6x38 мм (Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай). Для предотвращения

образования агрегатов клеток в пробирки предварительно добавляли 20 мкл 0,5 М ЭДТА до конечной концентрации 50 мМ. Клетки фильтровали через 24 мкм газ, центрифугировали 10 мин при 100 g, супернатант удаляли. Затем клетки промывали и ресуспензировали добавлением 1 мл CMFSS (Kanungo, 1982), после чего вновь осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 500 g. Хранили клетки в жидком азоте.

Образцы тканей стенки тела брали тотально у интактных особей, а также через 1 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации. На каждый срок было взято по 10 животных.

Изолированные ткани замораживали жидким азотом и гомогенизировали с помощью TissueLyzer (Qiagen, Германия) при 50 Гц в течение 5 мин в буфере для экстракции ExtractRNA (Евроген, Россия). Экстрагировали РНК из лизатов тканей путем добавления бромохлоропропана в объеме 0,1 мл на каждые 500 мкл реагента ExtractRNA. Образцы центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин (центрифуга Eppendorf 5430, Германия). РНК осаждали добавлением к полученной изолированной РНК-содержащей фракции равного объема изопропанола и промывали этанолом. Осажденную путем повторного центрифугирования РНК растворяли в 20 мкл свободной от РНКаз воды.

Полученные образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo FS, США) в течение 30 мин при 37°C и затем чистили набором CleanRNA Standard (Евроген, Россия).

Концентрацию РНК оценивали с помощью УФ-спектрофотометров BioSpec-nano (Shimadzu, Япония) и UV7 (Mettler Toledo, США) при длине волны 260 нм, а ее качество – по соотношению показателей поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (соотношение показателей поглощения при 260/280 нм всех образцов были в пределах 2,0-2,1). Дополнительно качественную и количественную оценку выделенной РНК осуществляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в трис-ацетатном (ТАЕ) буфере, содержащем 40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, рН 7,6. Визуализировали окрашиванием

бромистым этидием с последующим проявлением УФ-трансиллюминатором при длинах волн 290-330 нм (ChemiDoc XRS+ Imaging System, Bio-Rad, США).

2.5.2 Обратная транскрипция

Тотальную РНК в количестве 800 нг подвергали реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) с Oligo(dT) (Thermo FS, США) и случайным декануклеотидным праймерами (Евроген, Россия). Реакционную смесь инкубировали в амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad, США) в течение 1 ч при 42°C и останавливали прогреванием при 70°C в течение 10 мин. Полученную кДНК хранили при -20°C и использовали в качестве матриц для проведения ПЦР.

2.5.3 ПЦР в реальном времени

Определение уровня экспрессии генов проводили с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для приготовления 20 мл реакционной смеси использовали следующие компоненты: 4 мкл 5X qPCRmix-HS SYBR, по 2 мкл 5 мМ прямого и обратного праймеров, 11 мкл деионизированной воды и 1 мкл кДНК в конечной концентрации 50 нг.

ДНК праймеры для проведения ПЦР разрабатывали с использованием программного обеспечения Primer-BLAST, они были синтезированы компанией Евроген (Россия). Последовательности праймеров для целевых и референсных генов перечислены в таблице 1.

Таблица 2 – Праймеры, использованные для проведения ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>piwi</i>	5'-TAGAATACACCCAGAAGTGGCAGG-3'	5'-CTTCAGTGGCACAGTGGAGACAA-3'
<i>seali</i>	5'-GAACAAGGCGGTCTGGCAGTA-3'	5'-TGTGGGAGTTGGATGGGTAGGT-3'
<i>tubulin</i>	5'-GGCTGAAGGTTGCGACTGTTT-3'	5'-TACGGTCGGGGTATTCCTCAC-3'
<i>efla</i>	5'-AACACCGAGCCACCCTACAGC-3'	5'-CCGTCCCTCTCCATCCCTT-3'

Для определения оптимальной температуры отжига праймеров проводили тестирование температурного градиента при 60-65°C. Для определения эффективности реакции на основе серийных 2-кратных разведений были построены стандартные кривые для каждого гена. Все праймеры показали хорошую эффективность реакций (от 90 до 110%) с одиночным пиком кривой плавления.

Каждый образец анализировали в трех технических повторах. Отрицательный контроль с использованием свободной от нуклеаз воды вместо матрицы воспроизводили также в трех повторах для каждого гена. Во всех отрицательных контролях сигнал отсутствовал.

Условия проведения ПЦР в реальном времени включали предварительную денатурацию при 95°C в течение 3 мин, затем 35 циклов: денатурацию при 95°C в течение 10 с, отжиг при 63°C – 30 с и элонгацию при 72°C в течение 10 с. После чего строили кривую плавления продукта, увеличивая температуру денатурации с 60°C до 95°C с шагом в 0.5°C.

Для анализа данных ПЦР использовали программное обеспечение CFX Maestro Software (версия 3.1, Bio-Rad, США). Для статистического анализа данные были экспортированы в Microsoft Excel (Microsoft, США). Определение относительного уровня экспрессии целевых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода (Livak, Schmittgen, 2001) с нормализацией по референсным генам *ef1a* и *tubulin*.

2.5.4 Капельная цифровая ПЦР

Капельную цифровую ПЦР (кцПЦР) проводили с использованием системы ddPCR QX200 (Bio-Rad, США). Для каждого образца заготавливали 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл двукратного QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad), 5 мкл свободной от ДНКаз воды, по 2 мкл 5 мМ праймера (прямого и обратного) и 1 мкл кДНК с конечной концентрацией 100 нг к объему реакционной смеси.

Затем смесь помещали в пластиковый картридж генератора капель (DG8 Gaskets for QX100/QX200 Droplet Generator, Bio-Rad, США) и смешивали с 70 мкл минерального масла (Droplet Generator Oil for EvaGreen, Bio-Rad, США) для образования капель (QX200 Droplet Generator, Bio-Rad, США). Полученную эмульсию переносили в 96-луночный планшет для ПЦР, герметизировали фольгой в планшетном запаивателе (PX PCR Plate Sealer, Bio-Rad, США) при 180°C в течение 2 мин и амплифицировали в термоциклере C1000 Touch (Bio-Rad, США). ПЦР проводили при следующих условиях: после предварительной денатурации при 95°C в течение 5 мин следовало 40 циклов амплификации при 95°C в течение 30 с и 60°C в течение 1 мин с финальной элонгацией при 98 °C в течение 10 мин и инкубацией при 4°C в течение ночи.

Анализ данных ПЦР производился с помощью устройства для считывания капель (QX200 droplet reader, Bio-Rad, США) и программного обеспечения QuantaSoft v1.7.4 (Bio-Rad, США). Абсолютная количественная оценка каждого транскрипта была представлена в виде числа копий транскрипта на мкл амплифицированной смеси для ПЦР.

Каждый образец был представлен в трех повторах, все прогоны ПЦР содержали лунки с отрицательным контролем в трех экземплярах на каждый ген. Каждую реакцию анализировали индивидуально. Порог устанавливали преимущественно вручную, основываясь на данных графиков амплитуды флуоресценции: любые капли выше порога считали «положительными», ниже – «отрицательными». Пример установки пороговых значений представлен на рисунке 2.

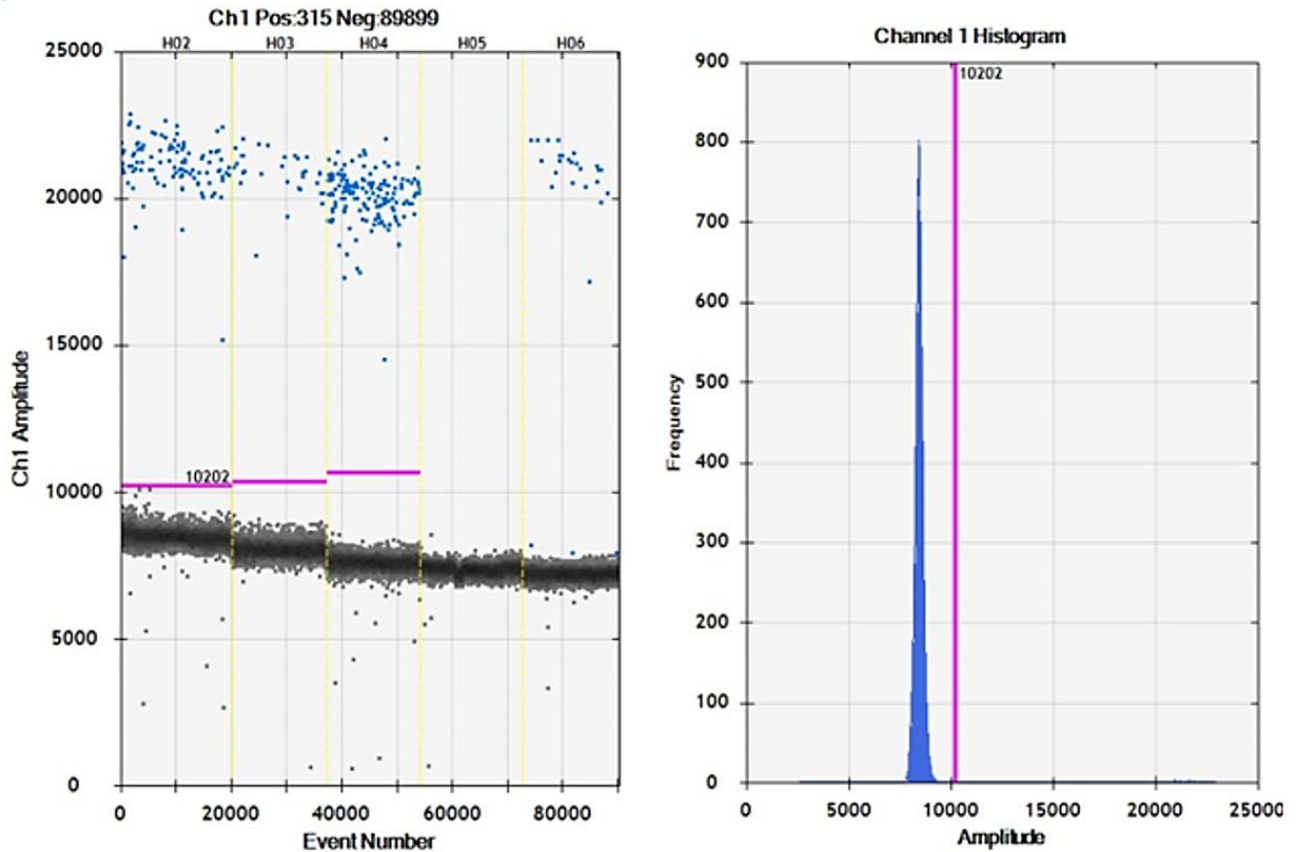


Рисунок 2 – Ручная установка порога флуоресценции каплей для кцПЦР. Сиреневая линия соответствует установленному порогу флуоресценции; синим цветом обозначены все «положительные» капли, содержащие образец транскрипта, серым – «отрицательные» капли, исключенные из анализа.

В качестве внутренних контролей для кцПЦР использовали те же гены, что и для ПЦР в реальном времени. Оптимизации условий ПЦР были проведены в соответствии с рекомендациями MIQE (Bustin et al., 2009).

После установки пороговых значений анализируемые данные экспортировали в Microsoft Excel (Microsoft, США). Для анализа результатов кцПЦР рассчитывали соотношение количества копий гена в образце к эталонному на разных сроках после эвисцерации. Полученные значения усреднялись и нормировались по соотношению в «норме». Статистическая значимость результатов оценивалась с помощью непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA), при этом значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Два метода ПЦР сравнивались с помощью

корреляционного теста Пирсона. Для проведения статистического анализа использовался пакет программ STATISTICA 12 (StatSoft, США), Microsoft Excel (Microsoft, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Характеристика белка *Piwi E. fraudatrix*

В ходе анализа транскриптома *E. fraudatrix* были обнаружены две последовательности мРНК *piwi*, в дальнейшем именуемые *piwi* и *seali*, гомологичные соответственно *piwi Holothuria glaberrima* (Mashanov et al., 2015) и *seali Apostichopus japonicus* (Zhang et al., 2017). На их основании были выведены последовательности из 848 (*piwi*) и 914 (*seali*) аминокислотных остатков с прогнозируемыми молекулярными массами 97 кДа и 99 кДа соответственно.

Анализ доменной структуры показал, что обе последовательности обладают консервативными доменами PAZ и PIWI и менее консервативной N-концевой областью (рис. 3). Процент идентичности аминокислотных последовательностей *piwi* и *seali* составляет 43%, а для участков консервативных доменов PAZ и PIWI – 46% и 56% соответственно. Напротив, более вариабельный N-концевой домен имеет более низкий процент идентичности – 32% (рис. 3).

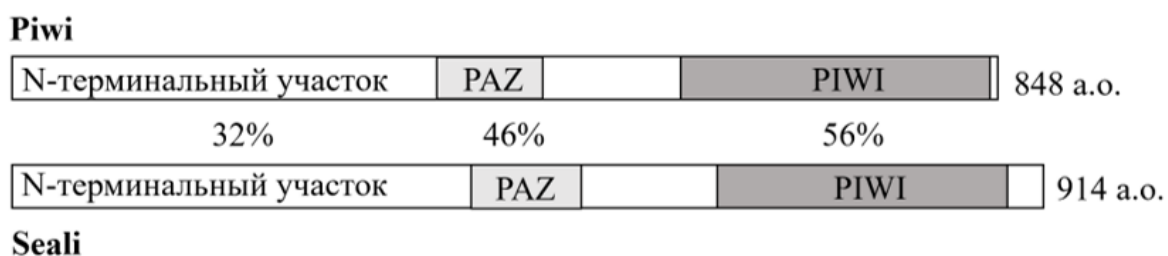


Рисунок 3 – Схема доменной организации выведенных аминокислотных последовательностей *piwi* и *seali E. fraudatrix*. Показаны консервативные домены PAZ и PIWI; количество аминокислотных остатков (а.о.). Процент идентичности между двумя последовательностями показан для соответствующих областей.

Было показано, что домен PAZ расположен в центре аминокислотной последовательности, и в его состав входит сайт связывания нуклеиновой кислоты из 7 консервативных аминокислот (рис. 4). С-концевой домен PIWI состоит из двух субдоменов, один из которых содержит сайт из 11 аминокислот, необходимых для закрепления 5'-конца РНК, второй – активный сайт, содержащий мотив из двух остатков Asp, остатков His и Tyr (рис. 5).

Выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что Piwi *E. fraudatrix* имеет высокий процент идентичности с белками Piwi других иглокожих, таких как *H. glaberrima* (75%), *A. japonicus* (74%); так же как и последовательность Seali с гомологичными ей Seali *A. japonicus* (82%) и морского ежа *S. purpuratus* (61%). Множественные выравнивания последовательностей белков подсемейства Piwi в области консервативных доменов представлены на рис. 4 и 5.

<i>E. fraudatrix</i> Piwi	ESVLNVLDDL---WESAGDQFQDKASKALVGEI V M T R Y N N K T Y R I D E I V W N Q N P S S T E N T	57
<i>A. japonicus</i> Piwi	DSVLDVLYDLSAKFRGDDAAFRDTATKKLVGEI V M T R Y N N K T Y R V D E I M W Q N P T Q S F S T	60
<i>H. glaberrima</i> Piwi	DSVLNVFRDLHDKVRGNASQFRDLATKKLVGEI V M T R Y N N K T Y R V D E I V W D Q N P Q S K F S T	60
<i>S. purpuratus</i> Seawi	QTVWEVMNDL---FNKARGREKKEEITKLMIGQIVLTKYNNKTYRVDDIDFDTPADTFET	57
<i>D. melanogaster</i> Piwi	----ETIYDIMRRCSHNPARHQDEVRVNVLDLI V L T D Y N N R T Y R I N D V D F G Q T P K S T F S C	56
<i>H. sapiens</i> Hiwi	ETVLDFMFNFYHQTE--EHKFOEQVSKELIGLVLT KY N I K T Y R V D D I D W Q N P K S T F K K	58
<i>E. fraudatrix</i> Seali	ESILDTMTRIA---EQHKMDYKEACMRELVGCVLTKYNNQTYRVDDINWDITPQDTFQL	57
<i>A. japonicus</i> Seali	ETILD TMSNIFKNMQSNKNYKDECVRELVGCVLTRYNNQTYRVDDINWDLNPQSTFTL	60
<i>S. purpuratus</i> Seali	ESVLESMAIYQRI-PNNIRFREECVRQIVGTVVLTRYNNKTYRVDDIDWDSNPQTTEKS	59
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	PRG-DISFVDYKTYQYDRDITDLQOPLIMSLPRSRDVQGE---KRMPIILLVPELCLLTGL	113
<i>A. japonicus</i> Piwi	KQG-DITFMQYDEQYQRKITDPTQPLIMSLPRSKDVQGE---ERKPILLIPELCLMTGI	116
<i>H. glaberrima</i> Piwi	PRG-DISFVEYKQYERKITDPTQPLIMSLPKAKQT-AE---ARGPILLVPELCLMTGL	115
<i>S. purpuratus</i> Seawi	RSG-PVSYVDYFKKSYERVIHDVNQPMIVSRPKKREE-KK---GVGPAYLPELCLFTGL	112
<i>D. melanogaster</i> Piwi	KG-RDISFVEYLT KY N I R I R D H N Q P L I S K N R D K A L K T N --- A S E L V V L I P E L C R V T G L	112
<i>H. sapiens</i> Hiwi	ADGSGVSFLEYRKYNOEITDLKQPVLVSQPKRRRG--PGGTLPGPAMLIPELCYLTGL	116
<i>E. fraudatrix</i> Seali	RKGEVISYETYKRSYEIDITPQOPLLVNWPKKK-GDEEVT----PIHLVPELCSRTGL	112
<i>A. japonicus</i> Seali	RKGETLSYQEYKRYNDIDISDGKQPLLVNWPKKRQPDEEIT----PIHLVPELCSRTGL	116
<i>S. purpuratus</i> Seali	RD-EEISFIDYKKSYSLEISDPGQPLIISRIKKQLNPNPVTVEEIRLIPELSSRTGL	118
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	SDDMRNFTIMKDIAVHTRVNPG	136
<i>A. japonicus</i> Piwi	SEEMRSNFSIMKDIGHTRVNPG	139
<i>H. glaberrima</i> Piwi	SEEMRSNFTIMKDVGVHTRVVP	138
<i>S. purpuratus</i> Seawi	SDDMRADFNVMKDMGQHTRVGPQ	135
<i>D. melanogaster</i> Piwi	NAEMRSNFQLMRAMSSYTRMNP	135
<i>H. sapiens</i> Hiwi	TDKMRNDFNVMKDLAVHTRVTP	139
<i>E. fraudatrix</i> Seali	TDQMRADFKVMKDLAMHTRVTP	135
<i>A. japonicus</i> Seali	TDKMRDEFKVMKDLAMHTRVTP	139
<i>S. purpuratus</i> Seali	TDDMRADFRIMKDLAMHTRVTPQ	141

Рисунок 4 – Выравнивание аминокислотных последовательностей Piwi; область домена PAZ. Выведенные последовательности *E. fraudatrix* обозначены красным цветом; серым цветом выделены регионы идентичных аминокислотных остатков; желтым – консервативные аминокислотные остатки, отвечающие за связывание 3'-конца РНК.

<i>E. fraudatrix</i> Piwi	LVMCILT ^{SNR} KERYDAIKKVCV ^{EN} PVPS ^Q MMLGKTI ^{SKR} QGLMSVATK ^{VAM} Q ^L NCKLGG	60
<i>A. japonicus</i> Piwi	LVMCILP ^{TN} KKERYDSIKKVCV ^{NE} CPIPS ^Q MILGKTI ^{SKR} QMVMSVATK ^{VAM} Q ^L NCKLGG	60
<i>H. glaberrima</i> Piwi	LVMCILTSARKERYDSIKKVCV ^{NE} CPIPS ^Q MILSKTIF ^{FK} NTLMSVATK ^{VAM} Q ^L NCKLGG	60
<i>S. purpuratus</i> Seawi	IVVVILPTNRKDRYDAIKKTCV ^V THPCPS ^Q VIVSR ^T LSKQ ^Q MLMSVATK ^{IAM} Q ^M NCKMGG	60
<i>D. melanogaster</i> Piwi	LILCLVPNDNAERYSSIKKRGY ^V DRAPT ^Q VVTLKT-TKNRSLMSIATK ^{IAI} Q ^L NCKLGY	59
<i>H. sapiens</i> Hiwi	IVVCLLSSNRKDKYDAIKKYLCT ^D CPT ^S QCVVARTLGK ^Q QTVMAIATK ^{IAI} Q ^M NCKMGG	60
<i>E. fraudatrix</i> Seali	MVVAIFP ^T SRDDRYSAFKKLC ^{CE} EAPIPS ^Q AIISRTIS ^Q KQK ^L RSV ^Q KIALQ ^L NCKMGG	60
<i>A. japonicus</i> Seali	MVVAIFP ^T SRDDRYSAFKKLC ^{CE} EAPIPS ^Q AIISRTIS ^Q KQK ^L RSV ^Q KIALQ ^L NCKMGG	60
<i>S. purpuratus</i> Seali	LVIAIFP ^T SRDDRYSAFKKLC ^{CE} APVPS ^Q VINGRTIS ^Q KQK ^L RSV ^Q KIALQ ^L NCKLGG	60
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	DLWAVDIE ^L PKELM ^V VGIDCYHDSAT ^R GRSAVGFV ^{AS} MNAHLTK-YHSR ^V AFQHTDQEIID	119
<i>A. japonicus</i> Piwi	DLWAVEI ^L PLSDL ^M VVGIDCYHDSSTR ^R GRSAVGFV ^{AS} MNKTLTK-YHSR ^C AFQHTDQEITD	119
<i>H. glaberrima</i> Piwi	DLWRDLI ^P MSDL ^M VVGIDCYHDSSTR ^R GRSAVGFV ^{AS} MNKTLTK-YHSR ^C TFQTHQEIID	119
<i>S. purpuratus</i> Seawi	DLWRVEI ^L PLSNL ^M IIGIDSYHDSLTKGRSVLGFV ^{AS} MNKSQTS-FFS ^C AFQHAQGEFGA	119
<i>D. melanogaster</i> Piwi	TPWMIEI ^L PLSGL ^M TIGTFI ^A KSTRDRKRAYGALIAS ^M DLQ ^N STYFSTVTECSAFDVLAN	119
<i>H. sapiens</i> Hiwi	ELWRVDI ^L PLKLV ^M IVGIDCYHDMTAGRRS ^I AGFVAS ^I NEG ^M TR-WFSR ^C IFQDRGQELVD	119
<i>E. fraudatrix</i> Seali	ELWALNI ^L PLKGL ^M VIGIDVYHERN--RQSIGAYV ^{AS} MNSTL ^T R-WYSR ^V CFQQGQELID	117
<i>A. japonicus</i> Seali	ELWALNI ^L PLKGL ^M VAGIDVYHERN--RPSIGAFV ^{AS} MNSTL ^T R-WYSR ^T CSQQHGQELID	117
<i>S. purpuratus</i> Seali	ELWALDV ^L LSKLM ^V IGIDVYHDPNRGKKSIGAFV ^{AS} MNRDL ^T S-WFSR ^V CIQTPHQELIG	119
*		
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	SLLTSM ^T ACLRRYFEINQAY ^{PAK} IIVYRDGV ^{GD} QLPAVVEHEVP ^Q LED ^C FSRVMQ--G-	176
<i>A. japonicus</i> Piwi	SLLTSM ^H ACLKRYNAINNSY ^{PSK} IIVYRDGV ^{GD} QLA ^{AV} VEHEVP ^Q LED ^C FSRLSP--N-	176
<i>H. glaberrima</i> Piwi	NLMY ^C MTACLKRYHEINKSY ^{PQK} IIVYRDGV ^{GD} QLPAV ^{VQ} HEVP ^Q LED ^C FSRVIP--N-	176
<i>S. purpuratus</i> Seawi	NLSTLM ^N NALKRYYQINEK ^F PERI ^I IFRDGV ^{GD} SQVNLV ^{VD} YELK ^Q IKDTL ^D KVYP--Q-	177
<i>D. melanogaster</i> Piwi	TLWPMIA ^K ALRQYQHEHR ^{KL} PSR ^I VFYRDGV ^{SS} GLK ^Q LFEFEV ^{KD} II ^E KLK ^T EYARV ^Q L	179
<i>H. sapiens</i> Hiwi	GLK ^V CLQ ^A ALRAWNS ^{CE} YMP ^S R ^I IIVYRDGV ^{GD} QLK ^T LVN ^{YE} VP ^Q FLD ^{CL} KSIG---R-	176
<i>E. fraudatrix</i> Seali	GLK ^V CM ^T AGLRKYHEVN ^H CLPEK ^I VYRDGV ^{GD} QLAM ^V ATYE ^{KE} Q ^L SEC ^F AYFD---D-	173
<i>A. japonicus</i> Seali	GLK ^V CM ^T ASLRKYHEVN ^H CLPEK ^I VYRDGV ^{GD} QLSM ^V ATYE ^{KE} Q ^L SEC ^F AYFD---D-	173
<i>S. purpuratus</i> Seali	GLK ^L CF ^T SS ^L KKYHDIN ^H ALPEK ^I VIFRDGV ^{GD} QLNV ^V ATYE ^Q E ^Q LS ^Q CF ^S MF ^G A--D-	176
*		
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	YKPKLS ^F IVVKKR ^I NNR ^F FM ^P SGGGG---GGRG ^R GRG ^R GG--RGGG ^D DDGS ^F IN ^P PPG	230
<i>A. japonicus</i> Piwi	YKPKL ^T VIVVKKR ^I NNR ^F FM ^L SGGGG--RGRG ^D RGRG ^R GG--GRGG ^N DGG ^I M ^N PPSG	232
<i>H. glaberrima</i> Piwi	YKPKLS ^V VIVVKKR ^I NNR ^F FL ^S N ^G GGGGYRGG ^R GRD ^R GRG ^R GRGG ^D DDG ^M VN ^P PPG	236
<i>S. purpuratus</i> Seawi	TVHKLAV ^V VVKKR ^I NNR ^F FANL-----RGL ^S SN ^P PPG	209
<i>D. melanogaster</i> Piwi	SPPQLAY ^I VVTR ^S MNTR ^F FLNG-----QNP ^P PPG	207
<i>H. sapiens</i> Hiwi	YNPRL ^T VIVVKKR ^V NTR ^F FAQS-----GGR ^L Q ^N PL ^P G	208
<i>E. fraudatrix</i> Seali	YQPSLAI ^V VVQKR ^I NTR ^L EHV ^L NDR-G-----REN ^L EN ^M MPG	209
<i>A. japonicus</i> Seali	YHPSMAI ^V VVQKR ^I NTR ^L EHV ^L NDRPG-----REN ^L EN ^M MPG	210
<i>S. purpuratus</i> Seali	YKPQLCIV ^V VQKR ^I NTR ^I ESVAG-----GN ^Y EN ^P YPG	208
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	AVVDSV ^V TKRQ ^L DFFL ^S QS ^V RQ ^T VSPT ^S YNV ^I KNGAGL ^K PD ^H AQRL ^T YK ^L TH ^L YFNW	290
<i>A. japonicus</i> Piwi	TVVDNV ^V TKRQ ^L DFFL ^S QS ^V RQ ^T VSPT ^S YNV ^I RNGV ^L KPD ^H LQRL ^T YK ^L TH ^L YFNW	292
<i>H. glaberrima</i> Piwi	TVVDSV ^V TKS ^Q LDFFL ^S QS ^V RQ ^T VSPT ^S YNV ^V KNGV ^L KPD ^H LQRL ^T YK ^L TH ^L YFNW	296
<i>S. purpuratus</i> Seawi	TVIDDV ^V TKPH ^L YDYFII ^S QS ^V RQ ^S VSPT ^S YNV ^V YDTTGL ^K PD ^H MORL ^T YK ^L TH ^L YFNW	269
<i>D. melanogaster</i> Piwi	TIVDDV ^I LPER ^Y DFY ^L VS ^Q QV ^R Q ^T VSPT ^S YNV ^L YSSM ^G LSPE ^K M ^Q LTY ^K MCH ^L YFNW	267
<i>H. sapiens</i> Hiwi	TVIDVE ^V TRPEW ^Y DF ^F I ^V SQ ^A VR ^S GS ^V SP ^T HY ^N V ^I YD ^N SG ^L KPD ^H IQRL ^T YK ^L CH ^I YFNW	268
<i>E. fraudatrix</i> Seali	MVVDHT ^I TRRN ^W HDFFL ^S Q ^H VR ^Q T ^V SP ^T HY ^V I ^V YN ^T N ^F KPD ^H HQRL ^A YK ^L TH ^L YFNW	269
<i>A. japonicus</i> Seali	VVVDHT ^I TRRN ^W HDFFL ^S Q ^H VR ^Q T ^V SP ^T HY ^V I ^V YN ^T S ^T Q ^F KPD ^H HQRL ^A YK ^L TH ^L YFNW	270
<i>S. purpuratus</i> Seali	MVIDHT ^I TRPT ^W YDFFL ^S Q ^H VR ^Q T ^V TP ^T HY ^V V ^V H ^D ST ^Q LKPD ^H MORL ^A YK ^L TH ^L YFNW	268
<i>E. fraudatrix</i> Piwi	P ^G T ^I R ^V P ^A P ^C L ^Y A ^H K ^L A ^F L ^V G ^S L ^H	315
<i>A. japonicus</i> Piwi	P ^G T ^V R ^V P ^A P ^C L ^Y A ^H K ^L A ^F L ^V G ^S T ^H	317
<i>H. glaberrima</i> Piwi	P ^G T ^I R ^V P ^A P ^C L ^Y A ^H K ^L A ^F L ^V G ^Q ---	318
<i>S. purpuratus</i> Seawi	P ^G T ^V R ^V P ^A P ^C M ^Y A ^H K ^L A ^F L ^I G ^S V ^H	294
<i>D. melanogaster</i> Piwi	S ^G T ^T R ^V P ^A V ^C Q ^Y A ^K K ^L A ^T L ^V G ^T N ^L H	292
<i>H. sapiens</i> Hiwi	P ^G V ^I R ^V P ^A P ^C Q ^Y A ^H K ^L A ^F L ^V G ^S I ^H	293
<i>E. fraudatrix</i> Seali	P ^G T ^V R ^V P ^A P ^C Q ^Y A ^H K ^L A ^L Y ^L V ^G Q ^N L ^H	294
<i>A. japonicus</i> Seali	P ^G T ^V R ^V P ^A P ^C Q ^Y A ^H K ^L A ^L Y ^L V ^G G ^N L ^G	295
<i>S. purpuratus</i> Seali	P ^G T ^V R ^V P ^A P ^C Q ^Y A ^H K ^L A ^L Y ^L V ^G Q ^N L ^H	293

Рисунок 5 – Выравнивание аминокислотных последовательностей Piwi; область домена PIWI. Выведенные последовательности *E. fraudatrix* обозначены красным цветом; серым – регионы идентичных аминокислотных остатков; желтым – консервативные аминокислотные остатки, отвечающие за связывание 5'-конца РНК; звездочками обозначены два остатка Asp в активном сайте.

Филогенетический анализ показал, что используемые в работе последовательности группируются в две клады. Обе последовательности *E. fraudatrix* наиболее тесно связаны с белками других иглокожих.

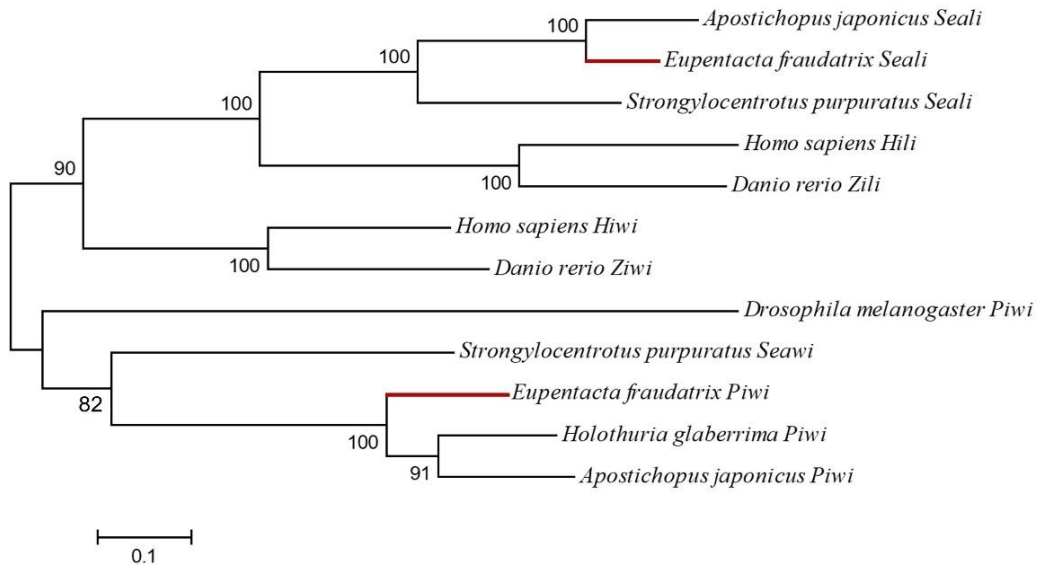


Рисунок 6 – Филограмма белков подсемейства Piwi, построенная методом максимального правдоподобия. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Числами показана в процентах достоверность ветвления 500 альтернативных деревьев, подтвержденная бутстрэп-методом. Красным цветом обозначено положение последовательностей *E. fraudatrix*. Информация об используемых в работе последовательностях представлена в табл. 1.

3.2 Идентификация белка Piwi в тканях *E. fraudatrix*

Для идентификации в тканях *E. fraudatrix* белка Piwi использовали анти-Piwi кроличьи поликлональные антитела. Экспрессия *seali* не была исследована методами иммуноблоттинга и иммуноцитохимии.

Методом вестерн-блоттинга в образцах мужских гонад *E. fraudatrix* был обнаружен белок Piwi (рис. 7). Антитела выявляют специфически окрашенную полосу молекулярной массой примерно 100 кДа, что соответствует ожидаемой молекулярной массе белка Piwi. В белковых экстрактах зрелых женских гонад специфическое окрашивание антителами отсутствовало. Вестерн-блоты,

повторенные на трех разных животных каждого пола, дали одинаковые результаты.

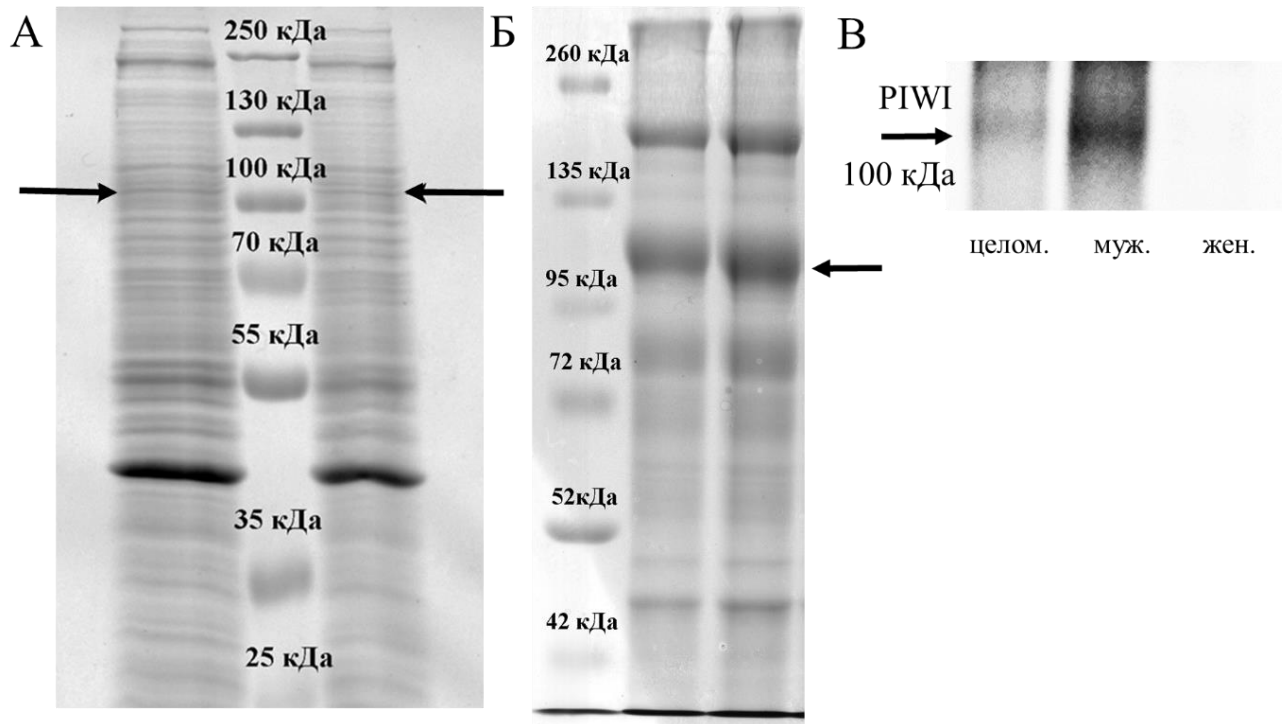


Рисунок 7 – Идентификация белка Piwi в тканях *E. fraudatrix*. А, Б – ПААГ-электрофорез тотальных лизатов целоцитов (А) и зрелых гонад (Б) *E. fraudatrix*. Количество белка в каждой лунке равно 20 мкг. Обозначены стандартные значения молекулярных масс. Окраска Кумасси G-250. В – Вестерн-блот анализ образцов целоцитов (целом.), женских (жен.) и мужских (муж.) зрелых гонад *E. fraudatrix* с использованием поликлональных антител против белка Piwi (1:5000). Обозначенная стрелкой полоса массой 100 кДа была вырезана для МАЛДИ масс-спектрометрии.

Иммуноблоттинг белковых экстрактов целоцитов также показал наличие в них белка Piwi, представленного в виде тонкой полосы, идентифицирующей на грани чувствительности метода (рис. 7).

Методом МАЛДИ масс-спектрометрии белок Piwi был определен в тотальных лизатах целоцитов и мужских гонад. Установлено, что последовательность Piwi, содержит 900 аминокислот и имеет среднюю молекулярную массу 100,7 кДа. Данные спектрометрии предполагают наличие

вариантов естественной последовательности, содержащих две аминокислотные замены: Ser467Thr и Asn449Ser.

3.3 Клеточный состав целомичекой жидкости голотурии *E. fraudatrix*

В результате сортировки целоמוциты были разделены на 4 субпопуляции, отличающихся по характеристикам прямого (параметр относительного размера клеток) и бокового светорассеивания (параметр относительной грануляции клеток). Степень чистоты сортировки клеток (отсутствие клеток иных субпопуляций) была подтверждена последующей проточной цитометрией (рис. 8 Б-Д) и составляла не менее 80%.

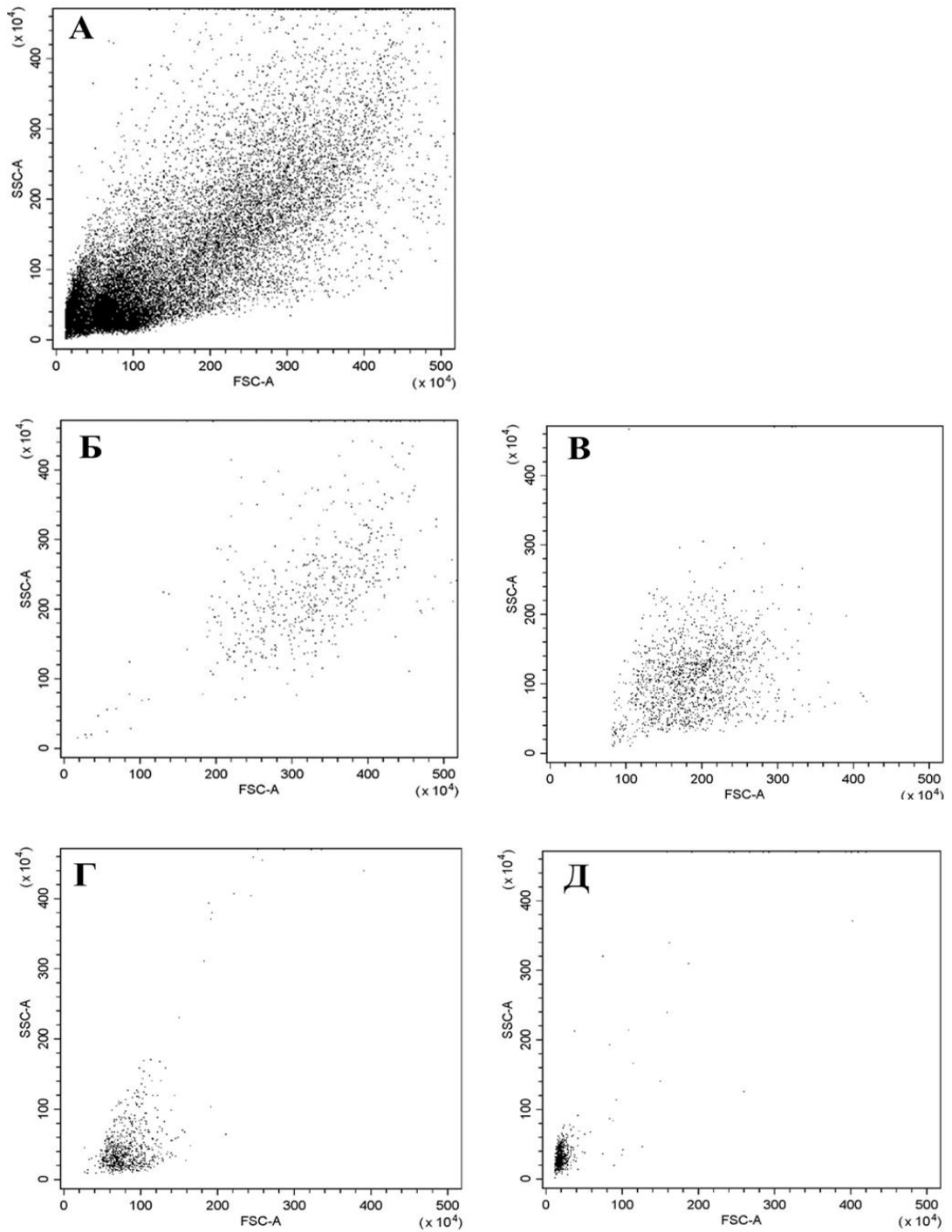


Рисунок 8 – Двумерные графики прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеивания целоцитов голотурии (А) и субпопуляций целоцитов в зависимости от их относительного размера и степени грануляции: крупные и гранулированные (Б), целоциты среднего размера и степени грануляции (В), мелкие целоциты с низкой степенью грануляции (Г), очень мелкие целоциты (Д).

На основании данных о линейных размерах и структуре цитоплазмы целомоциты голотурии *E. fraudatrix* были объединены в три основные группы, различающиеся по степени дифференцированности.

Клетки диаметром 3-5 мкм с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и неразвитой цитоплазмой – низко дифференцированные ювенильные клетки (Рис. 9А).

Клетки диаметром 6-10 мкм с увеличенным объемом цитоплазмы – среднедифференцированные. Имеются клетки с цитоплазмой, содержащей немногочисленные секреторные гранулы, что указывает на начальные этапы дифференцировки морулоподобных клеток, а также клетки, способные формировать небольшие псевдоподии – признак, характерный для амебоцитарного пути дифференцировки (Рис. 9Б).

Дифференцированные клетки диаметром 11-20 мкм (Рис. 9 В, Д) – либо округлые, с развитой цитоплазмой, заполненной секреторными гранулами (морулоподобные целомоциты), либо полиморфные, способные образовывать псевдоподии разной формы (петаллоидные и филоподиальные амебоциты).

В ЦЖ присутствуют также относительно менее представленные морфотипы клеток, осуществляющих физиологические функции, в том числе гемоциты, содержащие дыхательный пигмент гемоглобин (Рис. 9Е), и кристаллические клетки, ответственные за осморегуляцию ЦЖ. Однако данные морфотипы являются относительно малочисленными и не вносят существенного вклада в показатели динамики клеточных популяций целомоцитов в ходе регенерации.

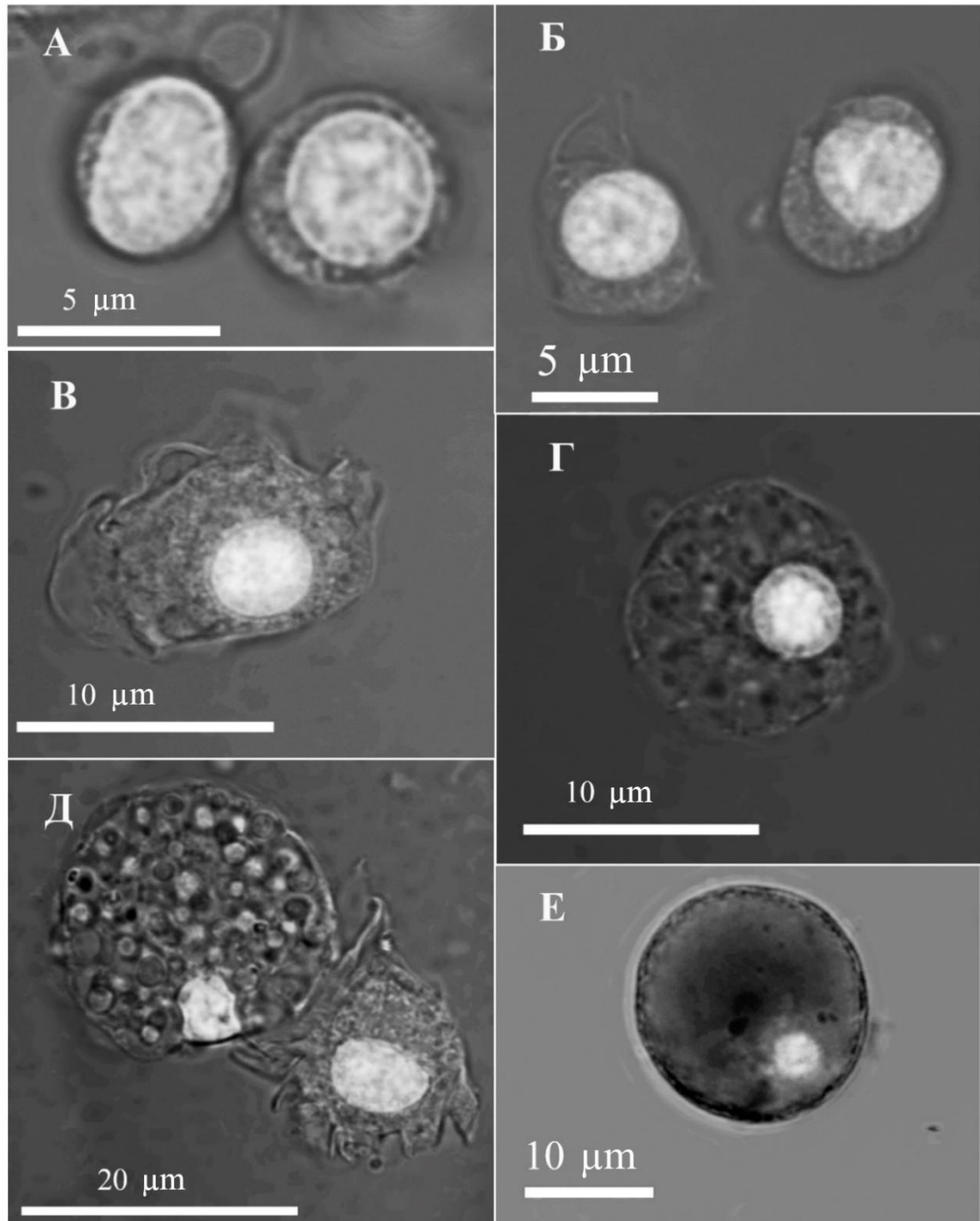


Рисунок 9 – Морфология целомоцитов основных размерных групп (Завальная и др., 2020). А – ювенильные клетки, диаметром 3-5 мкм; Б – средне дифференцированные клетки диаметром 6-10 мкм; В, Г, Д – дифференцированные клетки диаметром от 11 до 20 мкм: амебоциты (В, Д) и морулоподобные клетки (Г, Д); Е – гемоциты.

В составе ЦЖ методом иммуноцитохимии выявляется субпопуляция Рiwi-позитивных клеток с интенсивно окрашенной антителами цитоплазмой. Размер клеток колеблется от 3 до 6 мкм. Они имеют округлое гиперхромное ядро,

которое окружает узкий ободок цитоплазмы; гетеросинтетический аппарат не развит (рис. 10А). На основании морфологических признаков данные клетки следует отнести к морфотипу ювенильных целомоцитов. Piwi-позитивные клетки представляют минорную субпопуляцию клеток ЦЖ, в «норме» в ЦЖ встречаются лишь единичные меченые клетки (рис. 10 Б-Г).

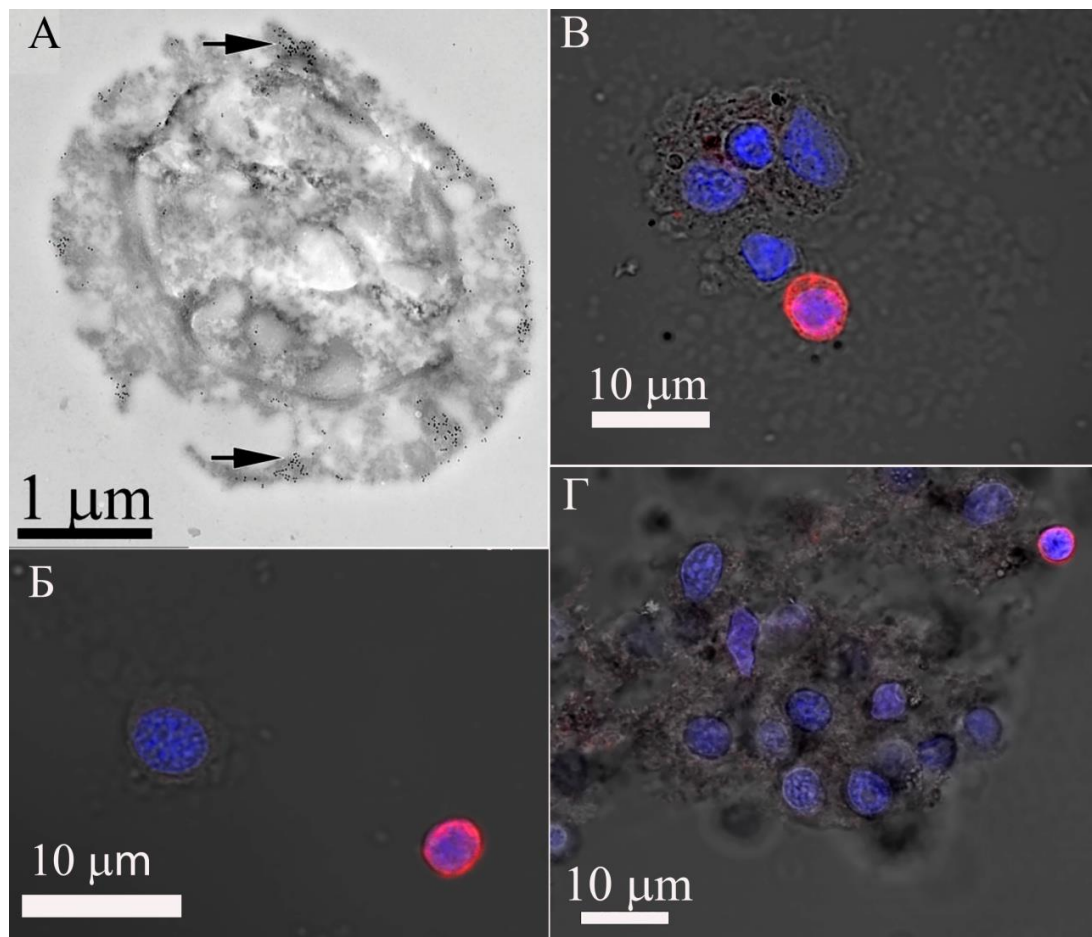


Рисунок 10 – Piwi-позитивные клетки в ЦЖ интактных голотурий *E. fraudatrix*. А. Клетка с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, меченая антителами; стрелки указывают на скопления частиц коллоидного золота. Электронная иммуноцитохимия, вторичные антитела мечены коллоидным золотом с размером частиц 11 нм. Б-Г – Иммуноцитохимическое окрашивание поликлональными кроличьими антителами к белку Piwi, вторичные антитела мечены Alexa 546 (красная флуоресценция). Б. Piwi-позитивная клетка с интенсивно окрашенной цитоплазмой и среднедифференцированный целомоцит. В-Г. Единичные Piwi-позитивные клетки в составе агрегатов целомоцитов.

3.4 Динамика численности целомоцитов в целомической жидкости после эвисцерации

Количество целомоцитов в ЦЖ у интактных животных колеблется от $6 \cdot 10^6$ до $9 \cdot 10^6$ у разных особей. Через 1 ч после эвисцерации количество клеток в ЦЖ резко снижается до $8,7 \cdot 10^5 \pm 2,2 \cdot 10^5$. Этот показатель достигает минимальных значений через 4 ч ($3,2 \cdot 10^5 \pm 5,7 \cdot 10^4$). Через 24 ч после начала эксперимента количество целомоцитов в ЦЖ возрастает до $2,5 \cdot 10^6 \pm 2,9 \cdot 10^5$, не достигая «контрольных» значений ($p < 0,05$) (рис. 11).

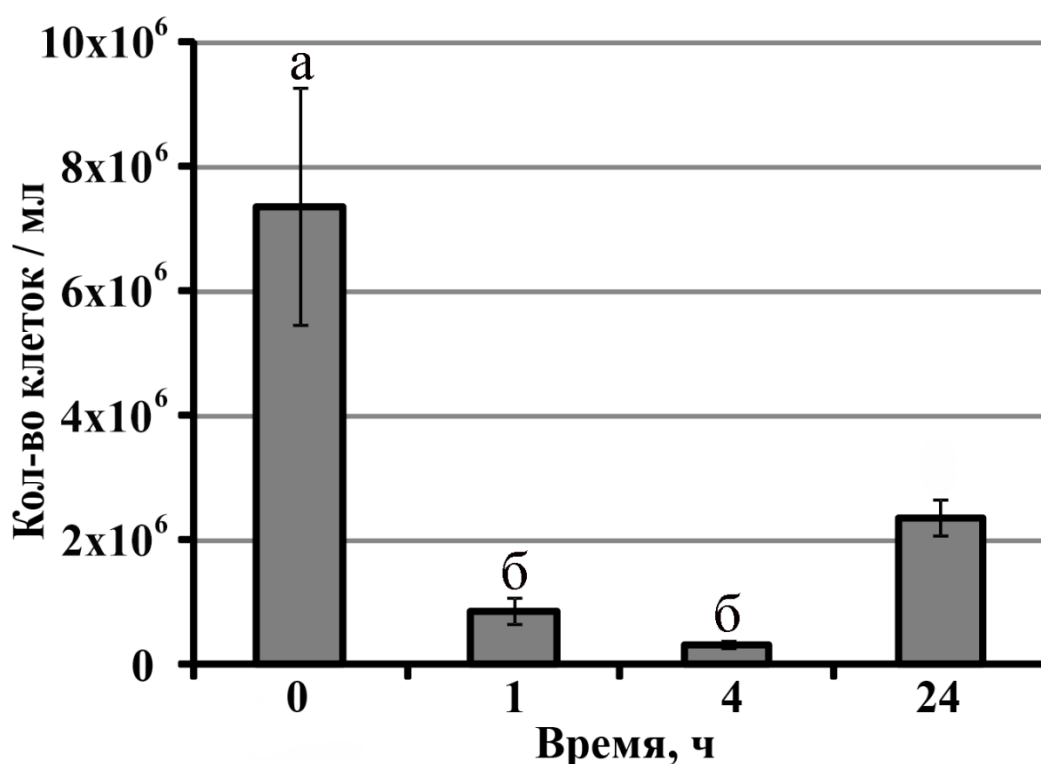


Рисунок 11 – Количество клеток в ЦЖ *E. fraudatrix* у интактных животных и после эвисцерации (Завальная и др., 2020). Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые буквенные индексы, расположенные над столбцами, показывают отсутствие статистически значимых различий между значениями, при $p < 0,05$ и $n=5$. По оси ОХ – время после эвисцерации (0 – интактные животные, 1, 4, 24 ч), по оси ОУ – количество клеток в мл ЦЖ.

В ходе регенерации изменяется не только суммарное количество целоμοцитов в ЦЖ, но и соотношение в ней клеток разных морфотипов (рис. 12). Используя метод проточной цитометрии, в составе ЦЖ на основании показателей прямого и бокового светорассеяния были выделены три четко дифференцирующиеся субпопуляции клеток. Данные субпопуляции были выделены из состава ЦЖ с помощью сортера, и клеточный состав каждой из полученных фракций был проанализирован.

Показано, что у интактных животных основную массу целоμοцитов составляют дифференцированные клетки диаметром 11-20 мкм ($58,2 \pm 7,4\%$).

Вторыми по представленности являются среднедифференцированные клетки диаметром 6-10 мкм ($40,7 \pm 7,04\%$). Минорную клеточную субпопуляцию составляют низкодифференцированные ювенильные клетки диаметром 3-5 мкм ($1,09 \pm 0,37\%$).

Через 1 ч после эвисцерации значительно возрастает доля ювенильных ($14,6 \pm 6\%$) клеток в ЦЖ, в то же время существенно падает содержание дифференцированных клеточных элементов ($32,5 \pm 4,3\%$). Процент среднедифференцированных клеток через 1 ч после эвисцерации также повышается ($52,8 \pm 6,8\%$), но между показателями этой группы целомоцитов отсутствует статистическая значимость ($p > 0,05$). Через 4 ч после эвисцерации доля ювенильных ($3,7 \pm 2,1\%$) и среднедифференцированных ($42,9 \pm 8,6\%$) клеток несколько снижается по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, содержание дифференцированных клеток, напротив, возрастает ($53,3 \pm 7,5\%$). Через 24 ч после начала эксперимента вновь повышается доля ювенильных ($9,5 \pm 4\%$) и среднедифференцированных ($48,7 \pm 9,8\%$) клеток, снижается содержание дифференцированных целомоцитов ($41,8 \pm 7,1\%$).

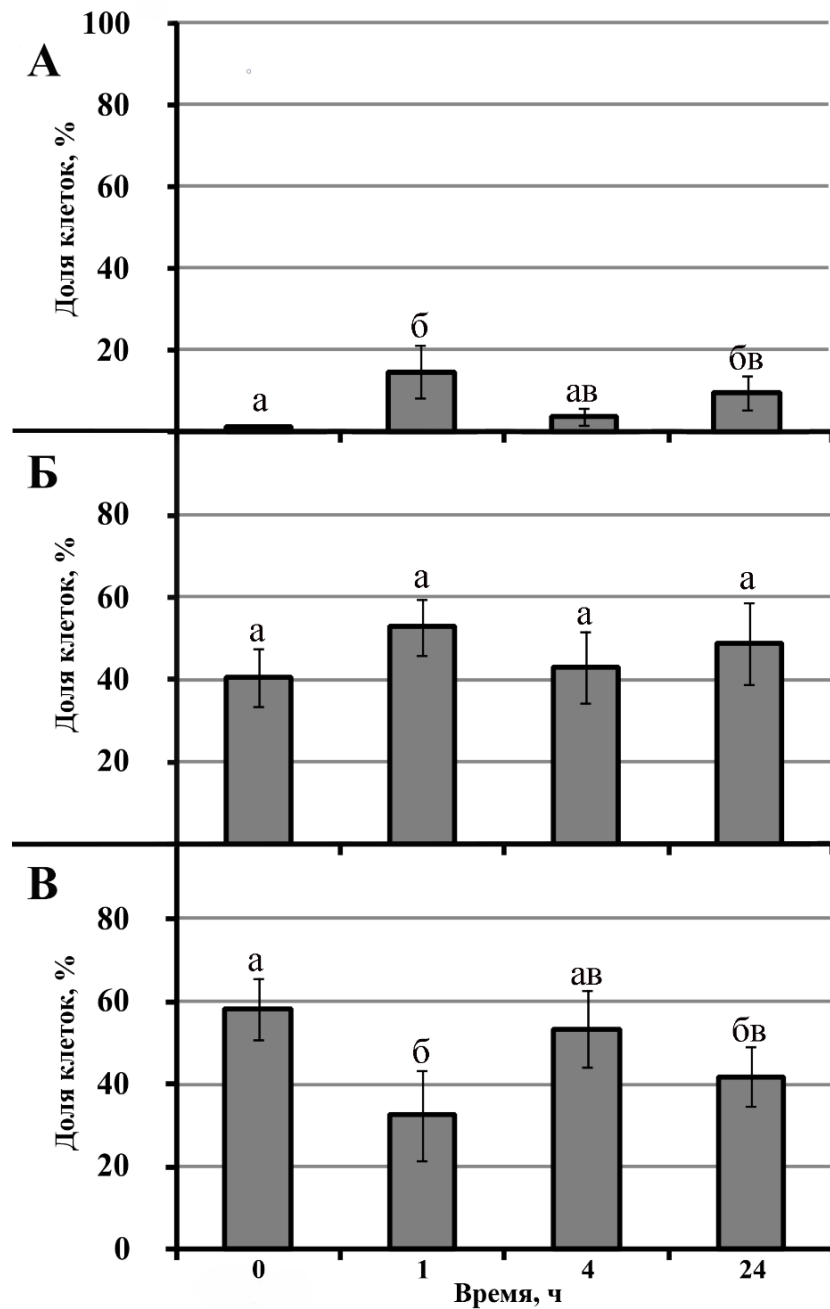


Рисунок 12 – Изменение содержания целомоцитов трех размерных групп в ЦЖ после эвисцерации (Завальная и др., 2020). А – ювенильные клетки, Б – средне дифференцированные клетки, В – дифференцированные клетки. По оси ОХ – время после эвисцерации (0 – интактные животные, 1, 4, 24 ч), по оси ОУ – доля клеток каждой группы, выраженная в процентах от общего количества целомоцитов. Одинаковые буквенные индексы, расположенные над столбцами, показывают отсутствие статистически значимых различий между значениями, при $p < 0,05$ и $n = 5$.

Что касается Рiwi-позитивных клеток, то у интактных животных они представляют минорную популяцию в составе ЦЖ ($0,3 \pm 0,3\%$) (рис. 13). Однако их количество в ЦЖ значительно возрастает через 1 ч ($20 \pm 8\%$) и 4 ч ($17 \pm 8\%$) и вновь снижается до значений, близких к «норме», через 24 ч ($3 \pm 2\%$) после эвисцерации (рис. 13, рис. 14 Б-Г).

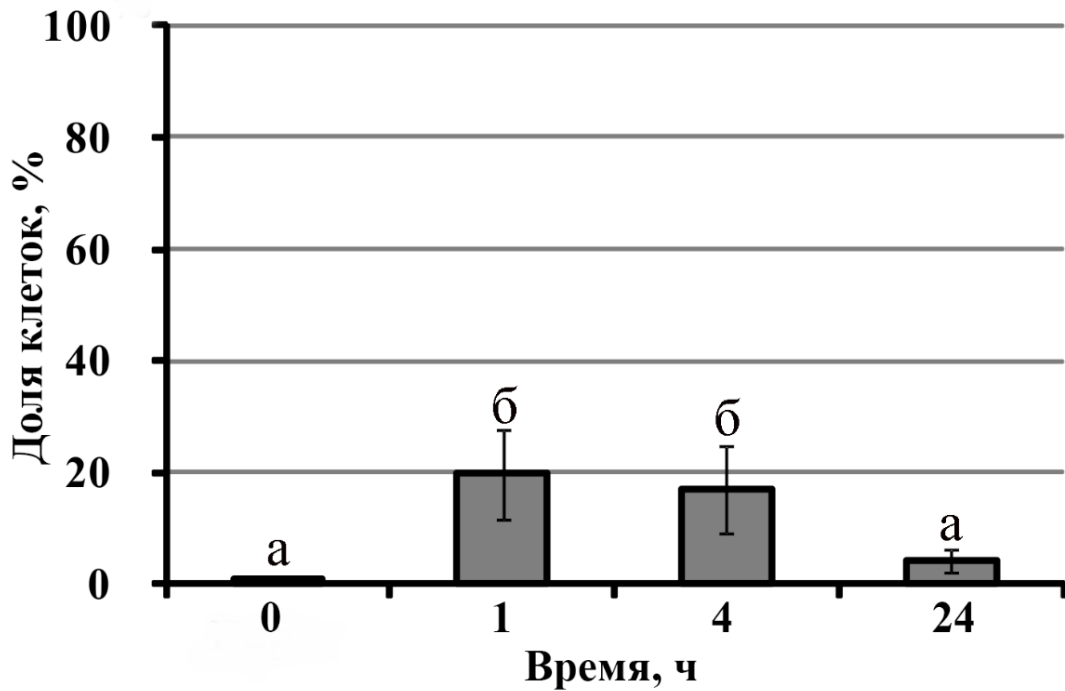


Рисунок 13 – Содержание Рiwi-позитивных клеток в ЦЖ *E. fraudatrix* в норме и после эвисцерации (Завальная и др., 2020). По оси ОХ– время после эвисцерации (0 – интактные животные, 1, 4, 24 ч), по оси ОУ – доля иммунопозитивных клеток, выраженная в процентах. Одинаковые буквенные индексы, расположенные над столбцами, показывают отсутствие статистически значимых различий между значениями, при $p < 0,05$ и $n=5$.

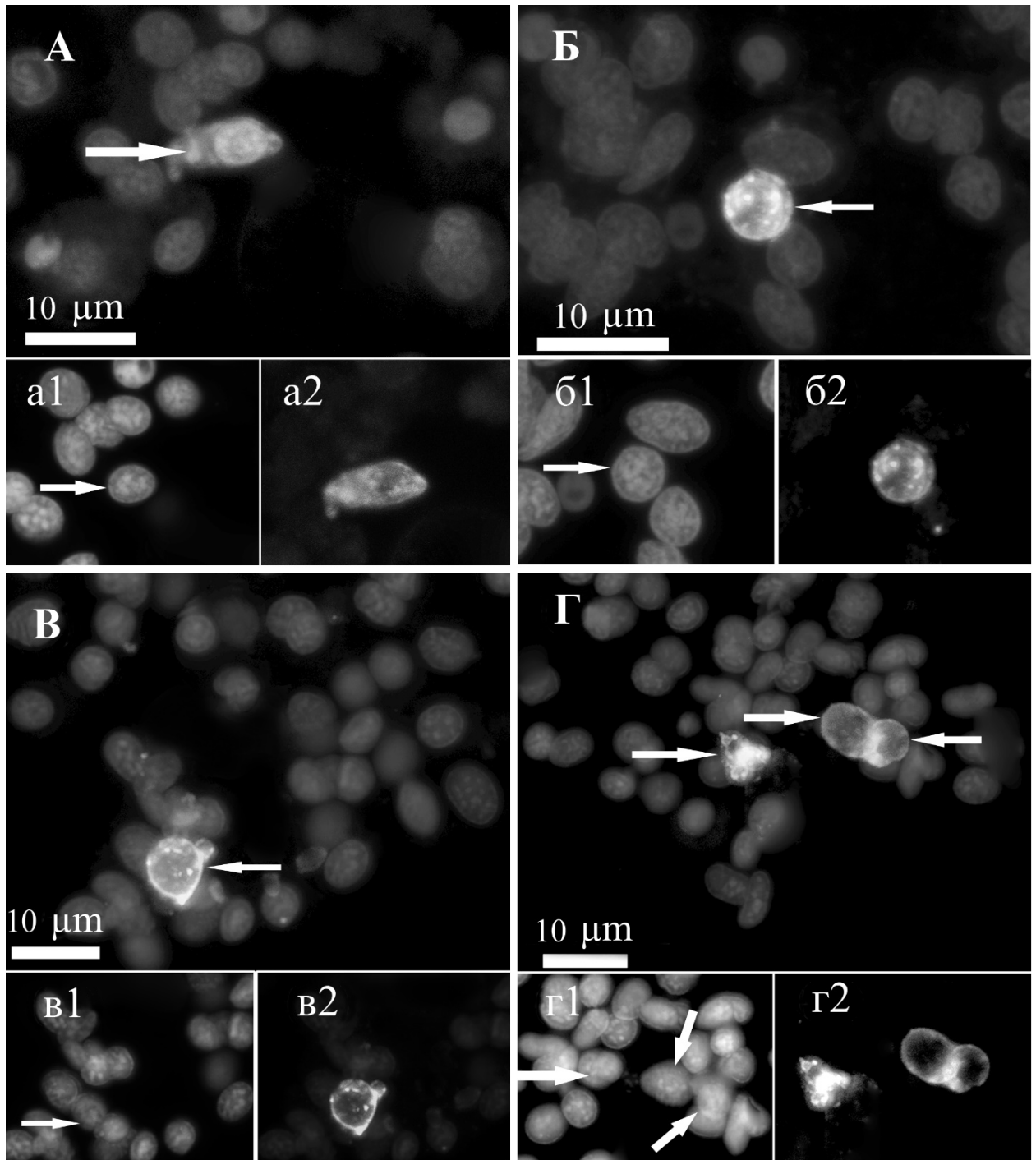


Рисунок 14 – Иммунофлуоресцентное окрашивание Piwi-позитивных клеток в ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* (Завальная и др., 2020): А – интактные животные, Б – 1 ч после эвисцерации, В – 4 ч после эвисцерации, Г – 24 ч после эвисцерации. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к белку Piwi – выделенный канал а2, б2, в2, г2; ядерная ДНК окрашена ДАПИ – выделенный канал а1, б1, в2, г1.

3.5 Локализация Piwi-позитивных клеток в целомической жидкости и тканях стенки тела после эвисцерации

Для идентификации и исследования локализации клеток-предшественников в ЦЖ и тканях голотурии в ходе регенерации использовали иммуноцитохимическое окрашивание антителами к белку Piwi – маркеру мульти- или плюрипотентных клеток. Через 4 ч после эвисцерации меченые антителами клетки обнаруживаются в целомической полости (рис. 15А), а также вблизи поверхности целомического эпителия (рис. 15Б).

Меченые антителами клетки присутствуют в составе целомического эпителия, выстилающего полость тела (рис. 15Б; рис. 16 Б, В). Клетки располагаются как в толще эпителиального пласта, так и на его поверхности. Диаметр клеток составляет 5-7 мкм, они часто имеют вытянутую форму и могут образовывать небольшие отростки, что, вероятно, отражает их способность к перемещению.

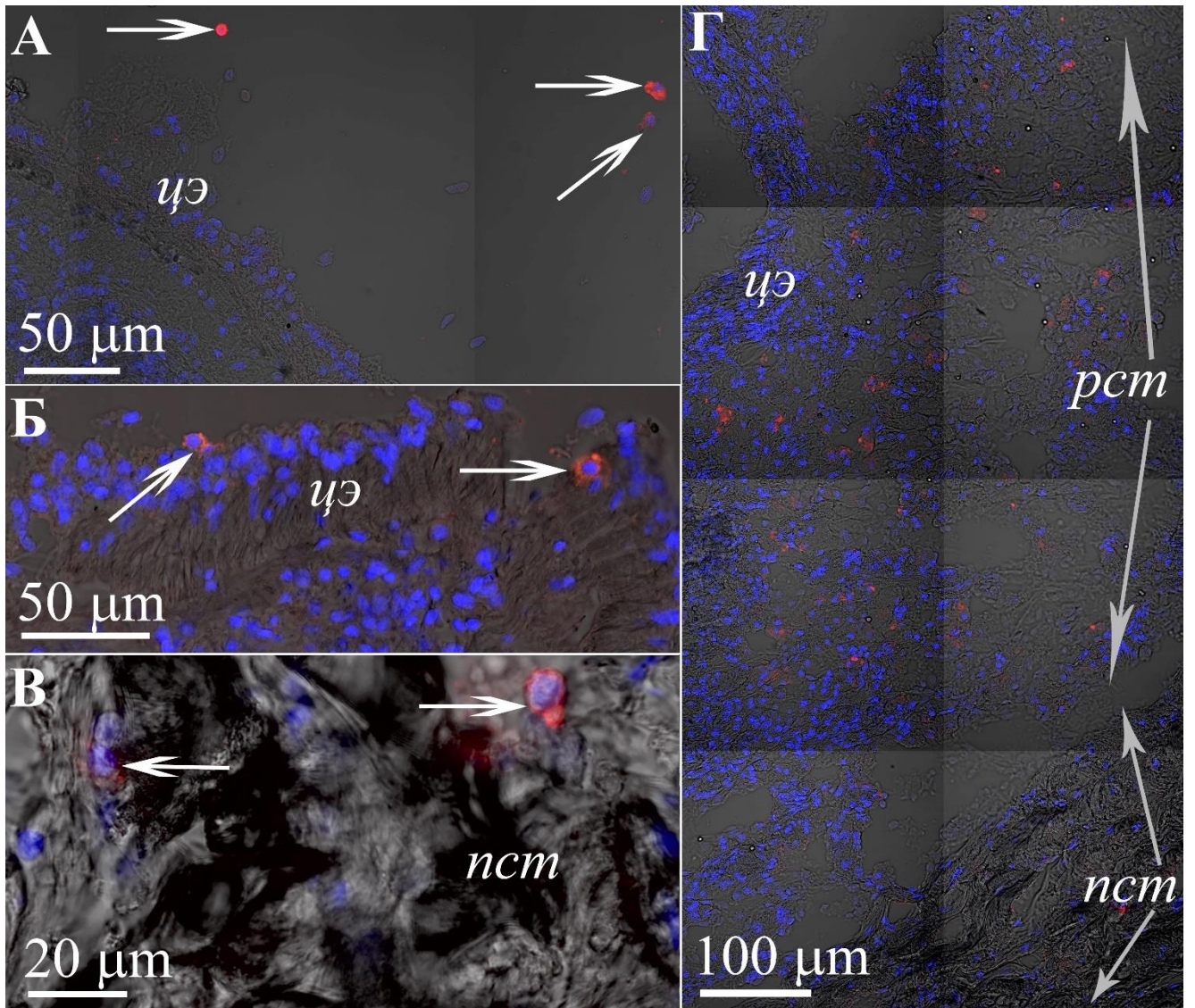


Рисунок 15 – Piwi-позитивные клетки в ЦЖ и тканях стенки тела голотурии *E. fraudatrix*, 4 ч после эвисцерации. Меченые антителами клетки (обозначены белыми стрелками) в целомической полости (А), в толще и на поверхности целомического эпителия (Б), в составе плотной соединительной ткани стенки тела (В). Меченые клетки в составе рыхлой и плотной соединительной ткани стенки тела (Г). Условные обозначения: цэ – целомический эпителий, пст – плотная соединительная ткань, рст – рыхлая соединительная ткань стенки тела. Синяя флуоресценция маркирует ядерную ДНК, окрашенную ДАПИ, красная флуоресценция – компоненты, окрашенные антителами к белку Piwi.

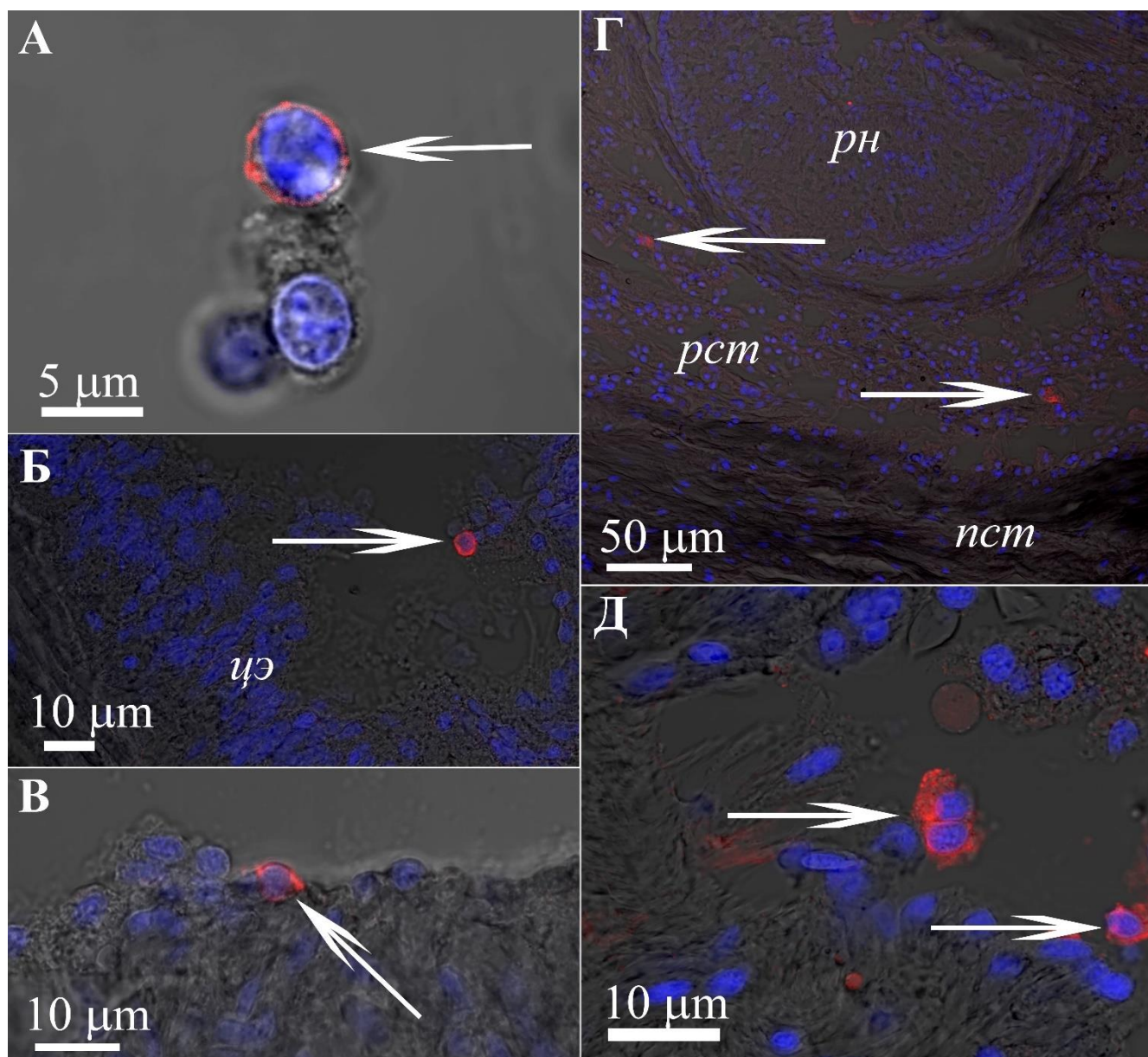


Рисунок 16 – Piwi-позитивные клетки в тканях *E. fraudatrix*, 24 ч после эвисцерации. Меченые антителами клетки в целомической полости (А); на поверхности целомического эпителия (Б); в составе целомического эпителия (В), в рыхлой соединительной ткани стенки тела (Г). Пример тандемного расположения меченых клеток в соединительной ткани стенки тела (Д). Условные обозначения: рн – радиальный нервный тяж, цэ – целомический эпителий, пст – плотная соединительная ткань, рст – рыхлая соединительная ткань стенки тела. Синяя флуоресценция маркирует ядерную ДНК, окрашенную ДАПИ, красная флуоресценция – компоненты, окрашенные антителами к белку Piwi.

Наиболее резко изменяется численность *Piwi*-позитивных клеток в составе соединительной ткани стенки тела. Если через 4 ч после эвисцерации относительно многочисленные меченые клетки обнаруживаются в рыхлой и плотной соединительной ткани, то через 24 ч после эвисцерации в рыхлой соединительной ткани заметны лишь единичные *Piwi*-позитивные клетки. Меченые клетки в составе соединительной ткани часто имеют неправильную форму, их размеры составляют 5-8 мкм (рис. 15 В, Г; рис. 16 Г, Д). Окраска цитоплазмы антителами либо равномерная диффузная, либо иммунопозитивные структуры формируют гранулы, расположенные вблизи ядра. Меченые клетки в соединительной ткани часто расположены парами (тандемами), что может являться следствием недавно завершившегося митоза.

3.6 Анализ динамики экспрессии генов *piwi*

Количественная ПЦР в реальном времени и цифровая капельная ПЦР выявили экспрессию генов *piwi* и *seali* в целомоцитах голотурии *E. fraudatrix*. В небольших концентрациях – $(1,98 \pm 0,17)$ копий в мкл *piwi* присутствует в образцах клеток ЦЖ интактных животных. Сравнивая уровни экспрессии *piwi* у животных в интактном состоянии («норма») и у тех же животных на ранних сроках после эвисцерации (1 ч, 24 ч и 7 сут), с помощью ПЦР в реальном времени было показано двукратное увеличение активности гена в течение 1 ч (рис. 17А). С каждым последующем сроком уровень относительной экспрессии *piwi* постепенно снижался, дойдя на 7 сут до значений меньших, чем у интактных животных.

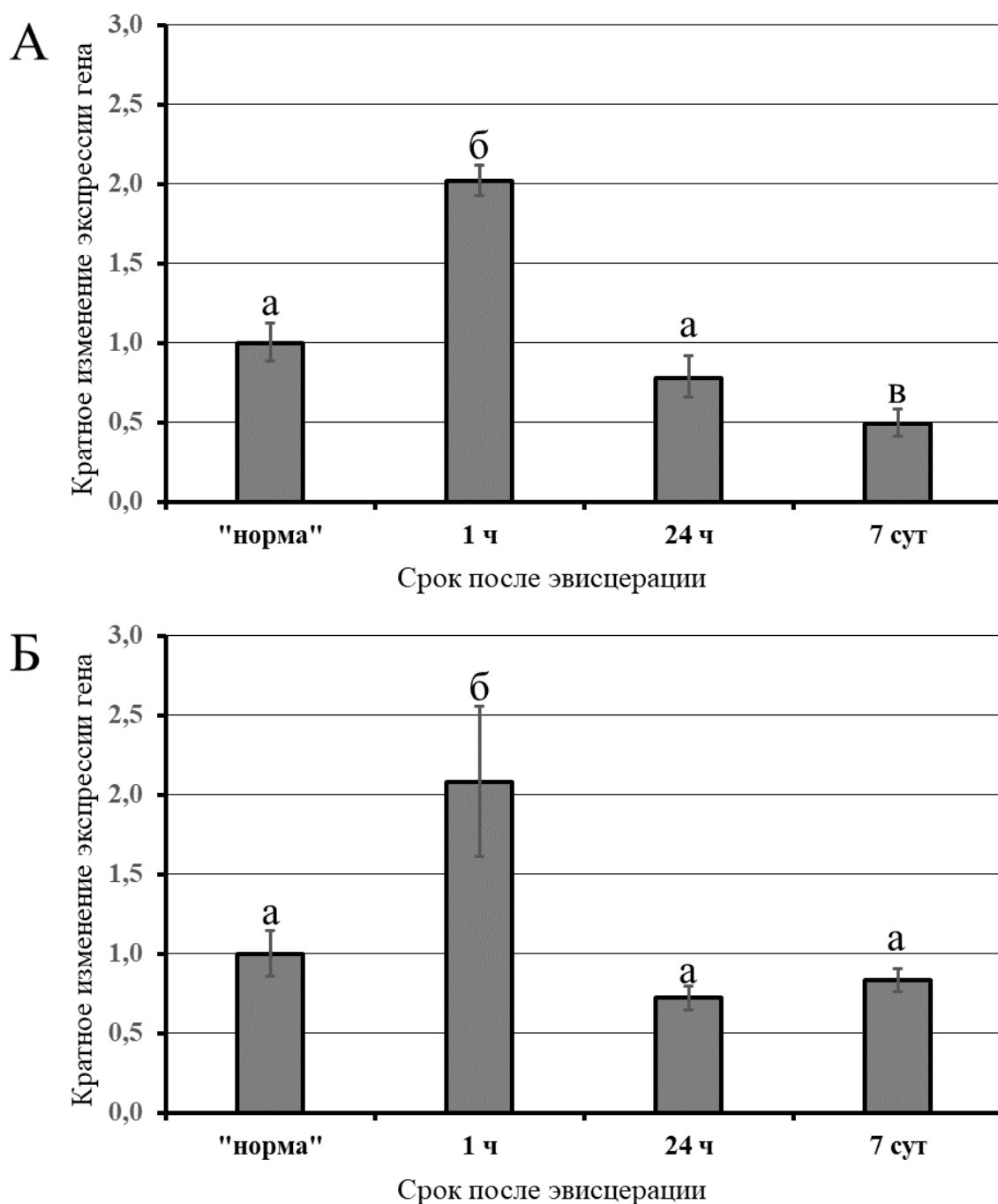


Рисунок 17 – Динамика экспрессии гена *piwi* в целомочитах в зависимости от срока регенерации *E. fraudatrix*. Нормализация по референсному гену *tubulin*, значения «нормы» приняты за единицу. Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий при $p < 0,05$ и $n = 3$. По оси X – срок после эвисцерации, по оси Y – кратное изменение экспрессии гена. А – Анализ методом ПЦР в реальном времени. Подсчет данных методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Б – Анализ методом цифровой капельной ПЦР.

Аналогичные изменения уровней экспрессии *riwi* были получены с помощью технологии кцПЦР (рис. 17Б). Двукратное увеличение количества транскриптов гена обнаружено на 1 ч эксперимента – $(4,5 \pm 1,7)$ копий в мкл. Значительно сниженные по сравнению с предыдущим сроком и близкие к «норме» концентрации мРНК *riwi* наблюдаются на 24 ч – $(2,6 \pm 0,2)$ копии в мкл после эвисцерации и достигают минимальных значений на 7 сут – $(1,9 \pm 0,5)$ копий в мкл.

В стенке тела экспрессия гена *riwi* снижается за время эксперимента (рис. 18). Количество транскриптов, посчитанное с помощью метода кцПЦР, также закономерно снижается, составляет $(0,87 \pm 0,06)$ копий в мкл через 1 ч и достигает своих минимальных значений через сутки после эвисцерации – $(0,8 \pm 0,01)$ копий в мкл. В целом, в стенке тела на протяжении всего эксперимента экспрессия *riwi* остается очень низкой по сравнению с «нормой» и не восстанавливается до исходных значений через 7 сут после начала эксперимента – $(1,55 \pm 0,21)$ копий в мкл.

Измерения экспрессии *riwi* в целомоцитах и стенке тела, выполненные двумя методами, показали очень высокую корреляцию. Коэффициент корреляции Пирсона составил $r = 0,96$ ($p < 0,05$) как для целомоцитов, так и для стенки тела.

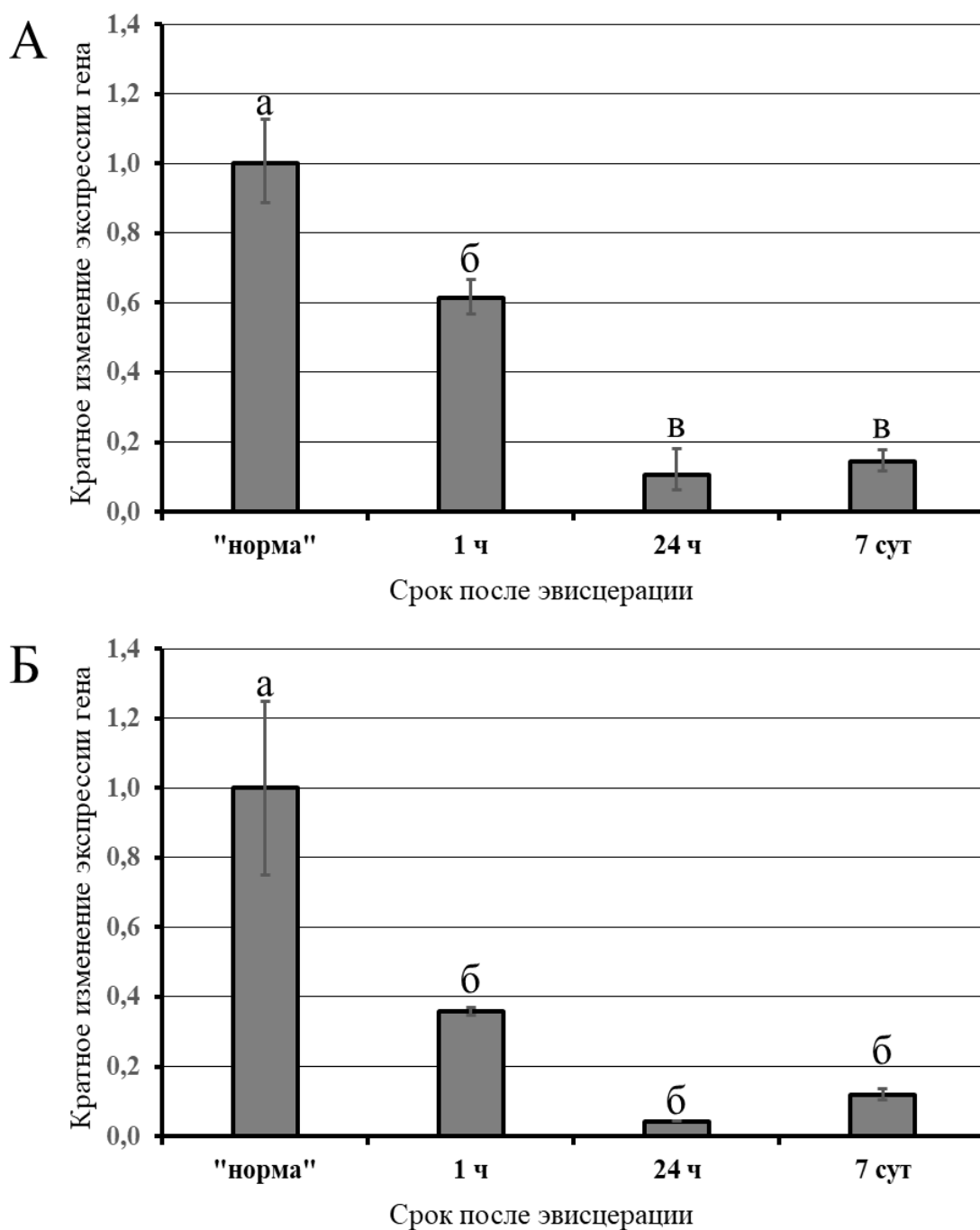


Рисунок 18 – Динамика экспрессии гена *piwi* в стенке тела в зависимости от срока регенерации *E. fraudatrix*. Нормализация по референсному гену *tubulin*, значения «нормы» приняты за единицу. Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий при $p < 0,05$ и $n = 3$. По оси X – срок после эвисцерации, по оси Y – кратное изменение экспрессии гена. А – Анализ методом ПЦР в реальном времени, подсчет данных методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Б – Анализ методом кцПЦР.

Паттерн экспрессии гена *seali* отличается от такового у *piwi*. Методом ПЦР в реальном времени через 1 ч после эвисцерации в целомоцитах не было обнаружено статистически значимого изменения экспрессии (рис. 19А). На 24 ч эксперимента наблюдается снижение экспрессии гена и резкое по сравнению с предыдущим сроком и «нормой» увеличение на 7 сут (в 1,6 раз).

Методом кцПЦР через 1 ч после эвисцерации также не обнаруживается статистически значимых изменений – $(1,24 \pm 0,26)$ копий в мкл. Относительное количество мРНК транскриптов несколько снижается через 24 ч после эвисцерации – $(0,54 \pm 0,03)$ копий в мкл и так же резко возрастает на 7 сут – $(1,68 \pm 0,27)$ копий в мкл (рис. 19Б).

Экспрессия *seali* также обнаруживается в стенке тела интактных животных – $(3,55 \pm 0,26)$ копий гена на мкл образца. Двумя методами ПЦР было показано закономерное снижение *seali* за время эксперимента, более плавное на графике данных, полученных с помощью метода ПЦР в реальном времени, и резкое, согласно данным кцПЦР. Первый метод показал статистически значимые изменения на 24 ч, второй – на 1 ч. Количество транскриптов, обнаруженных методом кцПЦР на 1 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации, слишком мало, чтобы говорить о статистически значимых изменениях между ними (рис. 20).

Сравнение изменений экспрессии *seali* на разных сроках регенерации с помощью двух методов ПЦР показало их очень высокую корреляцию ($r = 0,98$) для целомоцитов и высокую ($r = 0,83$) для данных по стенке тела.

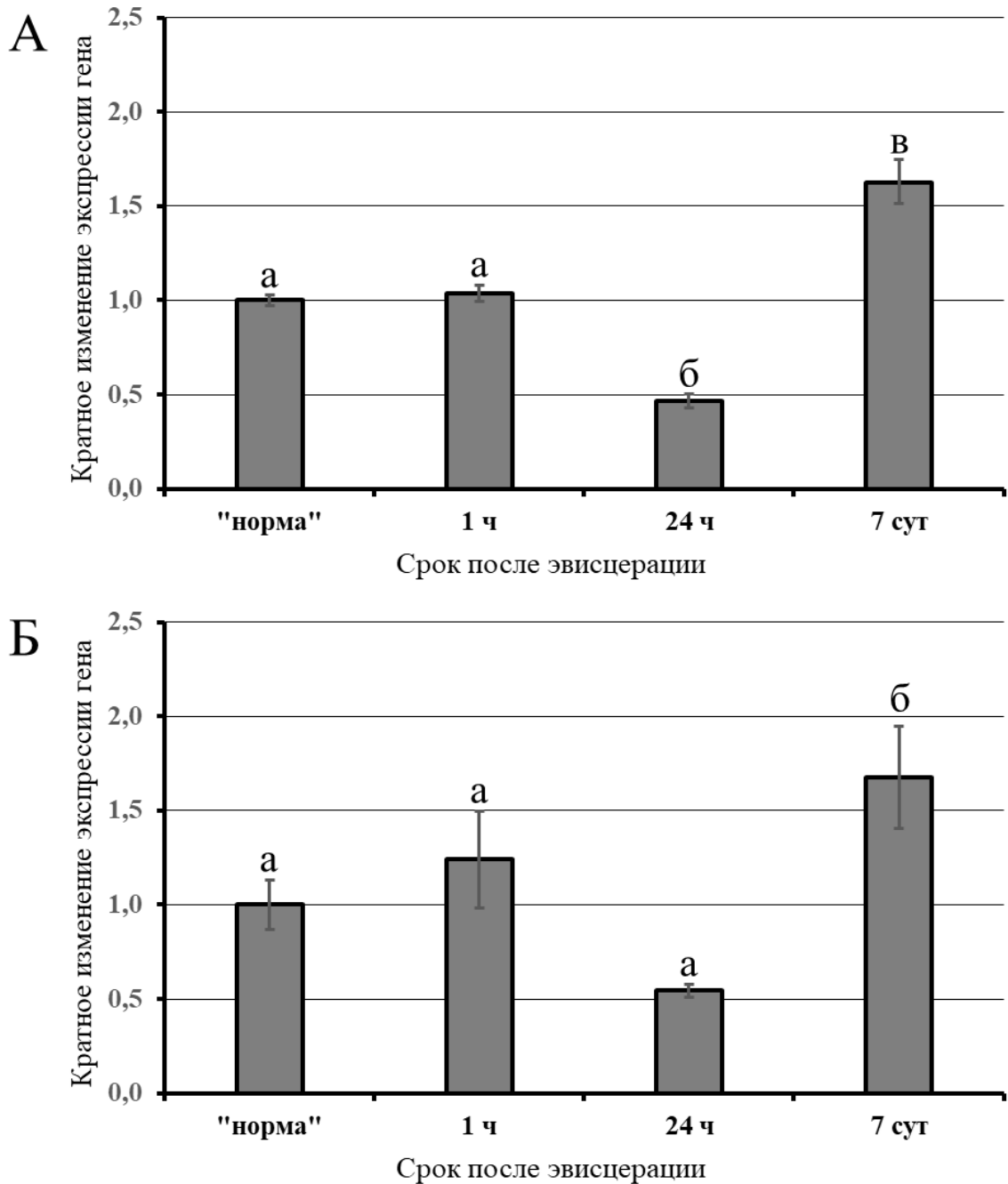


Рисунок 19 – Динамика экспрессии гена *seali* в целомотитах в зависимости от срока регенерации *E. fraudatrix*. Нормализация по референсному гену *tubulin*, значения «нормы» приняты за единицу. Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий при $p < 0,05$ и $n=3$. По оси X – срок после эвисцерации, по оси Y – кратное изменение экспрессии гена. А – Анализ методом ПЦР в реальном времени. Подсчет данных методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Б – Анализ методом цифровой капельной ПЦР.

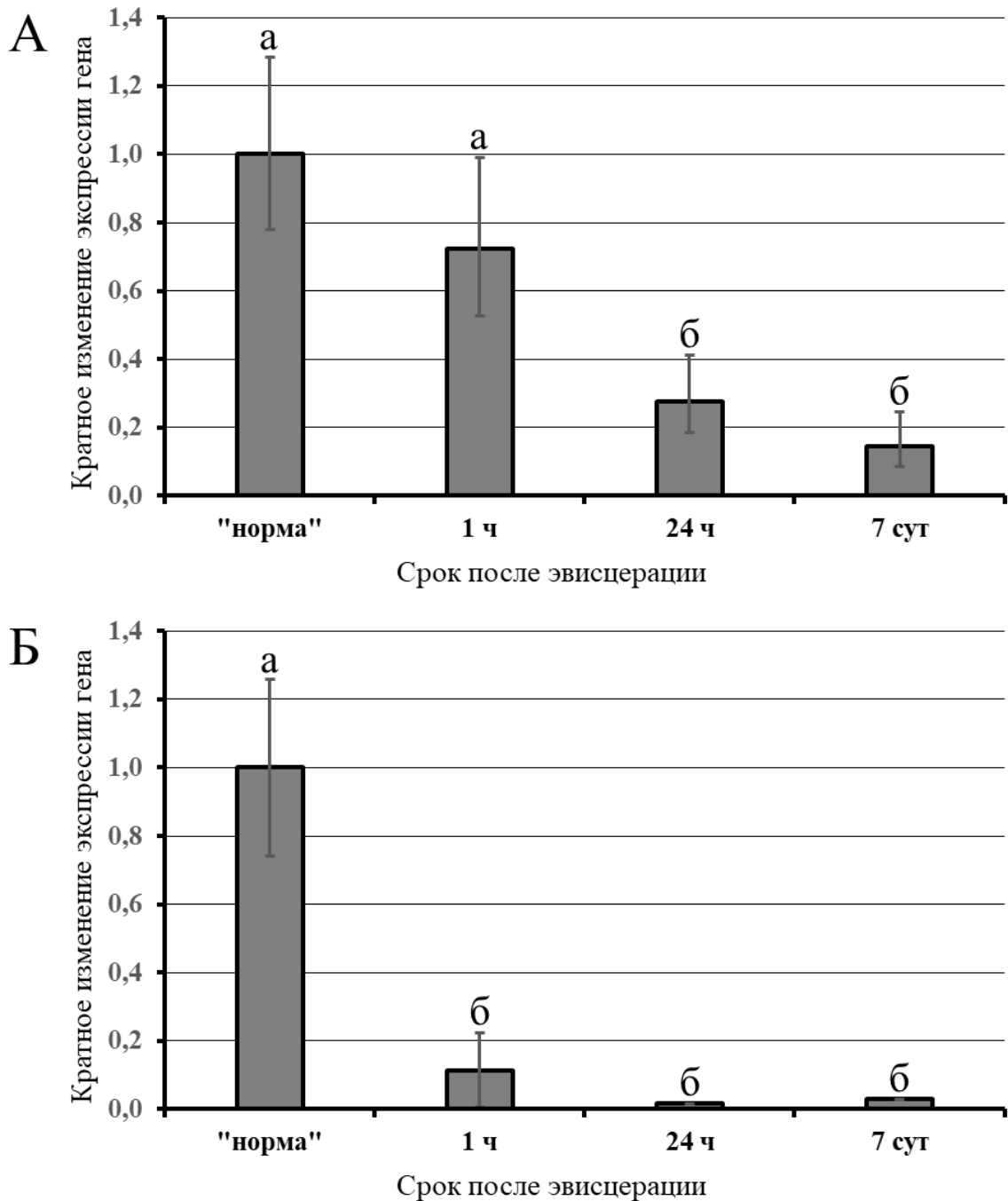


Рисунок 20 – Динамика экспрессии гена *seali* в стенке тела в зависимости от срока регенерации *E. fraudatrix*. Нормализация по референсному гену *tubulin*, значения «нормы» приняты за единицу. Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий при $p < 0,05$ и $n=3$. По оси X – срок после эвисцерации, по оси Y – кратное изменение экспрессии гена. А – Анализ методом ПЦР в реальном времени. Подсчет данных методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Б – Анализ методом цифровой капельной ПЦР.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Динамика целомоцитов *E. fraudatrix* после эвисцерации

Для голотурии *E. fraudatrix* характерна способность к эвисцерации – одной из форм аутомии. При этом животное утрачивает часть внутренних органов, включая аквафарингеальный комплекс и большую часть пищеварительного тракта с их последующим быстрым восстановлением (Долматов, 2007; Долматов, 2009).

В процессе эвисцерации вместе с комплексом внутренних органов удаляется значительный объем ЦЖ с содержащимися в ней клетками целомоцитами. ЦЖ, как известно, участвует в регуляции гомеостаза (Chia, Xing, 1996), а находящиеся в ней многочисленные целомоциты составляют основу иммунной системы иглокожих, опосредуя защитные реакции, такие как фагоцитоз (Smith, Davidson, 1992; Chia, Xing, 1996; Matranga, 1996), инкапсуляция (Hezel, 1965; Canicatti, Quaglia, 1991) и цитотоксичность (Vazzana et al., 2018). В процессе регенерации голотурии необходимо регенерировать свои целомоциты, тем самым восстанавливая иммунную функцию (Eliseikina et al., 2010; Li, 2018). И если механизмы регенерации внутренних органов *E. fraudatrix* на сегодняшний день исследованы достаточно подробно (Dolmatov, 1992; Leibson, 1992; Mashanov et al., 2005), то механизм регенерации ее иммунной системы остается неизученным.

Известно, что ЦЖ *E. fraudatrix* содержит клетки нескольких морфотипов, различающихся структурно и функционально (Магарламов, 2004). Основная масса целомоцитов – это морулоподобные клетки, осуществляющие выработку гуморальных защитных факторов, и амебоциты, ответственные за фагоцитоз. Кроме того, присутствуют относительно малочисленные субпопуляции клеток, отвечающих за физиологический гомеостаз – гемоциты и кристаллические клетки. Сходные морфотипы имеются в ЦЖ других представителей иглокожих (Chia, Xing, 1996; Ramírez-Gómez, García-Arrarás, 2010), в том числе у голотурий

H. glaberrima (Ramírez-Gómez et al., 2010), *A. japonicus* (Xing et al., 2008; Li et al., 2018), *Holothuria tubulosa* (Vazzana et al., 2018).

В представленной работе исследовали процесс восстановления популяции целомочитов *E. fraudatrix* после экспериментальной эвисцерации. На основании данных о линейных размерах и структуре цитоплазмы, в составе ЦЖ интактных животных нами выделены три основные субпопуляции целомочитов: низкодифференцированные ювенильные клетки, среднедифференцированные и высокодифференцированные целомочиты (Завальная и др., 2020).

Исследование клеточного состава ЦЖ в ходе первых 24 ч регенерации *E. fraudatrix* показало, что восстановление количества целомочитов является одной из первых реакций в ответ на стимулированную эвисцерацию (Завальная и др., 2020). Сразу после эвисцерации голотурия теряет значительный объем ЦЖ, количество содержащихся в ней клеток резко снижается, а затем медленно восстанавливается, не достигая, однако, за сутки эксперимента первоначальных значений.

Анализ изменений соотношения дифференцированных и ювенильных форм целомочитов показал, что снижение доли дифференцированных целомочитов через 1 ч после эвисцерации и в меньшей степени через 24 ч сопровождается увеличением содержания ювенильных клеток. Напротив, снижение доли ювенильных клеток в ЦЖ через 4 ч после эвисцерации сопровождается ростом содержания в ней дифференцированных форм. Отмеченная разнонаправленная динамика разных морфотипов целомочитов свидетельствует в пользу идущих в ЦЖ процессов дифференцировки ювенильных клеток в функционально активные морулоподобные клетки и амебоциты, что подтверждает и присутствие в ней переходных, среднедифференцированных форм. Подобные ювенильные морфотипы целомочитов описаны у многих иглокожих (Endean, 1966; Candia-Carnevali, 2006; Sharlaimova, Petukhova, 2012; Smith et al., 2018) и часто рассматриваются в качестве возможных клеток-предшественников всех остальных типов целомочитов (Hetzl, 1965; Gorshkov et al., 2009). Увеличение количества ювенильных клеток через 1 ч после эвисцерации можно объяснить

либо их быстрым делением, либо рекрутированием из определенных соматических ниш.

Известно, что клеточный состав ЦЖ *E. fraudatrix* на первых этапах регенерации восстанавливается при отсутствии митотической активности целомоцитов (Eliseikina et al., 2010). Сходное явление отмечалось ранее для целомоцитов голотурии *A. japonicus* (Li et al., 2018) и других представителей иглокожих, в частности морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* (Holland et al., 1965), морской звезды *Asterias rubens* (Козлова и др., 2006; Holm et al. 2008; Gorshkov et al., 2009; Sharlaimova et al., 2010). Отсутствие пролиферации оставшейся части целомоцитов на начальных этапах регенерации предполагает наличие у данного представителя иглокожих внешней резервной субпопуляции клеток-предшественников, аналогов гемопоэтических стволовых клеток позвоночных, способных мигрировать через ткани в полость целома и дифференцироваться в разные типы целомоцитов. Для доказательства этого предположения представляется эффективным использование молекулярных маркеров, способных идентифицировать стволовые клетки в ходе морфогенеза.

4.2 Белок Piwi как вероятный маркер клеток-предшественников целомоцитов

4.2.1 Характеристика белков Piwi *E. fraudatrix*

Исследования последних лет показали, что некоторые классические гены зародышевой линии, такие как *vasa*, *piwi*, *nanos*, *Bruno*, *PL10*, экспрессируются во взрослых стволовых клетках, необходимы для поддержания состояния «стволовости» и могут быть использованы в качестве маркеров для идентификации стволовых клеток (Mochizuki et al., 2000; Seipel et al., 2004; Gustafson, Wessel, 2010; Juliano et al., 2010; Alié et al., 2011; Önal et al., 2012; Wagner et al., 2012). Проведенный ранее транскриптомный анализ *E. fraudatrix* (Boyko et al., 2020) показал наличие продуктов активности генов семейства *piwi* – одного из общеизвестных молекулярных маркеров плюрипотентности (Reddien et al., 2005; Funayama et al., 2010; Alié et al., 2011).

Два гена были названы *piwi* и *seali*, гомологичные соответственно *piwi* *H. glaberrima* (Mashanov et al., 2015) и *seali* *A. japonicus* (Zhang et al., 2017).

Оба гена кодируют белки, принадлежащие к подсемейству Piwi семейства Argonaute. С помощью программ для поиска по консервативным мотивам мы проверили, какие характерные для семейства белков домены кодируются Piwi *E. fraudatrix* (Завальная и др., 2019). Были обнаружены консервативные домены PAZ и PIWI и менее консервативный N-концевой домен. Исследованные кристаллические структуры белков Piwi демонстрируют расположение доменов в виде двух долей: доли N-PAZ и MID-PIWI, закрепляющие с двух сторон концы пиРНК (Schirle, MacRae, 2012; Kuhn, Joshua-Tor, 2013; Matsumoto et al., 2016). Подобно им, в белках Piwi *E. fraudatrix* домен PAZ расположен в центре аминокислотной последовательности и содержит мотив, ответственный за распознавание и связывание 3'-конца пиРНК. Как известно, этот сайт ответственен за сборку функционального комплекса Piwi-пиРНК (Lingel et al., 2003; Yan et al., 2003; Simon et al., 2011).

Домен PIWI *E. fraudatrix* является С-концевым; в своей передней части имеет карман для связывания 5'-фосфатного выступа малых РНК. В структуре белков Piwi человека этот участок последовательности идентифицируется как отдельный домен MID (Tian et al., 2011). Несмотря на то, что у *E. fraudatrix* MID не определяется как самостоятельный домен, консервативные аминокислоты, необходимые для связывания пиРНК, присутствуют в его структуре и, таким образом, окончательно присоединяют пиРНК к белку Piwi (Завальная и др., 2019). Выравнивание показало, что наиболее консервативная область PIWI домена находится около С-конца аминокислотных последовательностей – обозначается как PIWI-box регион (Yuan et al., 2005; Song, Wessel, 2007; Schirle, MacRae, 2012).

Помимо участка связывания нуклеиновой кислоты, домен PIWI также содержит активный сайт с каталитическим центром из четырех аминокислотных остатков. Домен PIWI позиционирует два иона Mg^{2+} , чтобы дестабилизировать фосфатный остов целевой РНК аналогично тому, как это делает РНКаза Н (Parker et al., 2009). Поскольку РНКаза Н является ферментом, зависимым от

двухвалентного катиона, ее активный сайт должен включать мотив из двух консервативных остатков Asp, участвующих в связывании катиона (Song et al., 2004; Yuan et al., 2005; Song, Wessel, 2007). Подобный DD-содержащий мотив обнаружен в предполагаемом каталитическом центре белков Piwi *E. fraudatrix*.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков Piwi показал их наибольшее родство с гомологичными белками иглокожих.

4.2.2 Идентификация белка Piwi в половых клетках *E. fraudatrix*

Основной функцией белка Piwi считается поддержание геномной целостности посредством репрессии активности транспозонов во время самообновления стволовых клеток зародышевой линии и гаметогенеза (Vagin et al., 2006; Aravin et al., 2007; Juliano et al., 2011; Sousa-Victor et al., 2017). В связи с этим, Piwi совместно с пиРНК обнаруживаются в первичных половых клетках всех Metazoa (Vagin et al., 2006; Brennecke et al., 2008; Thomson, Lin, 2009; Juliano, et al., 2014).

Мы проверили специфичность экспрессии гена *piwi* в репродуктивных тканях *E. fraudatrix*. Вестерн-блот анализ с использованием антител против белка Piwi выявил полосу белка массой около 100 кДа в тканях мужских, но не женских гонад (Zavalnaia et al., 2018). Обнаруженная полоса соответствует расчетной молекулярной массе ожидаемого белка. Подобный паттерн экспрессии *piwi*, ограниченный мужской половой линией, наблюдается и у некоторых других организмов, таких как нематода *C. elegans* (Wang, Reinke, 2008) и представители класса млекопитающие: мышь (Carmell et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Beyret, Lin, 2011) и человек (Sasaki et al., 2003). В то же время у большинства представителей разных классов, таких как двусторчатые моллюски (Rui et al., 2020), насекомые (Cox et al., 1998; Li et al., 2009), костистые рыбы (Houwing et al., 2008), земноводные (Wilczynska et al., 2009) и птицы (Kim et al., 2012), экспрессия *piwi* не ограничивается одним полом. Интересно, что у другого представителя класса голотурий, *A. japonicus*, активность гена *piwi* также

обнаружена в половых клетках как яичников, так и семенников, при этом уровень экспрессии в яичниках был выше (Sun et al., 2021).

Основываясь на наших данных, можно предположить, что Piwi *E. fraudatrix* в гонадах функционирует аналогично Piwi млекопитающих, где они являются необходимыми для спецификации и дифференцировки мужских половых клеток, а их мутации приводят к нарушению сперматогенеза и, в конечном итоге, к стерильности особей (Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Beyret, Lin, 2011). При этом отсутствие белков в женских гонадах млекопитающих не оказывает влияния на созревание ооцитов; вероятно, потому что только мужские зародышевые клетки претерпевают непрерывный митоз и мейоз во взрослом состоянии (Carmell et al., 2007; Zhang et al., 2015). Выраженная экспрессия *piwi* в мужских гонадах голотурии *E. fraudatrix* предполагает сохранение стволовых зародышевых клеток у взрослых самцов и, следовательно, участие гена в их поддержании во время сперматогенеза. Однако, отсутствие Piwi в ооцитах *E. fraudatrix* не исключает его участие в оогенезе и эмбриогенезе, поскольку, как известно, экспрессия гена *piwi* характерна для определенных этапов гаметогенеза и имеет тенденцию к снижению по ходу дифференцировки клеток (Unhavaithaya et al., 2009; Sun et al., 2021). Вероятно, для окончательного решения вопроса о роли Piwi в оогенезе необходимо провести исследование в годичном цикле.

4.2.3 Идентификация белка Piwi в соматических тканях *E. fraudatrix* после эвисцерации

Экспрессия гена *piwi* характерна не только для клеток зародышевой линии, но и для мультипотентных и плюрипотентных стволовых клеток билатеральных животных с высоким регенеративным потенциалом (Gustafson, Wessel, 2010; Juliano et al., 2011; Praher et al. 2017). Piwi обнаруживается в областях плоских червей (Reddien et al., 2005; Palakodeti et al., 2008), циркулирующих стволовых клетках оболочников (Rinkevich et al., 2010), соматических стволовых клетках гребневиков (Alié et al., 2011), интерстициальных клетках квидарий (Leclère et al., 2012; Plickert et al., 2012), археоцитах губки (Funayama et al., 2010). Обнаружение

экспрессии *piwi* вне гонад может указывать на наличие мульти-/плюрипотентных клеток в тканях *E. fraudatrix*.

В экстрактах целомоцитов с применением поликлональных кроличьих анти-Piwi антител была обнаружена полоса молекулярной массы около 100 кДа, хотя и менее выраженная, чем в тканях мужских гонад, что свидетельствует о существенно более низкой экспрессии *piwi* в соматических тканях (Zavalnaia et al., 2018). С помощью MALDI масс-спектрометрии обнаруженные в семенниках и целомоцитах полосы белка были идентифицированы как Piwi, что подтверждает специфичность антител и наличие белка в данных половых и соматических тканях *E. fraudatrix*.

Иммуноцитохимическое исследование ЦЖ *E. fraudatrix* показало наличие в составе ювенильных целомоцитов субпопуляции клеток, иммунопозитивных по Piwi (Завальная и др., 2020). Данная субпопуляция, минорная у интактных животных, через 1 ч после эвисцерации значительно возрастает в количестве. Наблюдаемое увеличение числа недифференцированных ювенильных целомоцитов, экспрессирующих Piwi, в течение первых суток регенерации при отсутствии пролиферации может быть связано с выселением пула резервных клеток из стенки тела или других соматических тканей в целомическую полость. Согласно данным литературы, нишами стволовых клеток у иглокожих могут быть эпителиальные и соединительные ткани различных органов (Chia, Xing, 1996; Rinkevich, Matranga, 2009; Sharlaimova et al., 2021), в частности, гемального кольца и сосудов (Hetzl, 1965; Li, 2018), осевого органа (Holm et al. 2008; Petukhova et al., 2018; Golconda et al., 2019), водных легких (Endean, 1958), стенки тела (Holland et al., 1965; Eliseikina et al., 2010) или перитонеальной выстилки целомических полостей (Hetzl, 1965; Maes, Jangoux, 1983). По мнению ряда авторов, единой ниши стволовых клеток не существует, и клетки-предшественники целомоцитов разбросаны по эпителиальным (Bossche, Jangoux 1976; Maes, Jangoux, 1983) или эпителиальным и соединительным тканям разных органов (Holland, 1965).

С целью исследовать локализацию и динамику клеток-предшественников целомоцитов провели иммуноцитохимический анализ структур стенки тела на разных этапах регенерации (Dolmatov et al., 2021). Анализ показал наличие Piwi-позитивных клеток в составе тканей, составляющих стенку тела, в частности в плотных и рыхлых слоях соединительной ткани. Примечательно, что если у интактных животных эти клетки относительно редки, то через 4 ч после эвисцерации иммунопозитивные клетки были многочисленны в соединительной ткани стенки тела. Меченые клетки обнаруживались также в целомическом эпителии. При этом, расположение клеток как на поверхности, так и в толще эпителия, а также их форма свидетельствуют о том, что они не являются резидентными в составе эпителиального пласта, а лишь преодолевают его в процессе миграции из соединительной ткани в целомическую полость, где служат предшественниками разных типов целомоцитов.

Иммуноцитохимическое исследование продемонстрировало специфическую локализацию белка Piwi в цитоплазме соматических клеток *E. fraudatrix* (Завальная и др., 2020; Dolmatov et al., 2021). Среди Piwi-экспрессирующих клеток соединительной ткани встречались клетки с равномерно окрашенной антителами цитоплазмой и клетки, у которых иммунопозитивные компоненты сформированы в виде гранул, расположенных вблизи ядра. Подобные околядерные гранулы, положительные по белку Piwi, внешне напоминают nuage – электронно-плотную структуру, обнаруженную в клетках зародышевой линии, а также в стволовых клетках низших многоклеточных, и, предположительно, являющуюся сайтом посттранскрипционного пиРНК-опосредованного замалчивания транспозонов и амплификации пиРНК через цикл «пинг-понг» (Brennecke et al., 2007; Voronina et al., 2011; Shukalyuk, Isaeva, 2013; Lim, Kai, 2015).

Локализация белка Piwi в клетке отражает механизм его действия: «пинг-понг» модель биогенеза пиРНК и функционирования Piwi-пиРНК комплекса требует присутствия белка в цитоплазме, в то же время для выполнения эпигенетических функций белкам Piwi по крайней мере временно необходимо находиться в ядре (Le Thomas et al., 2013). По этой причине для некоторых

организмов в дополнение к цитоплазматическому характерно также внутриядерное расположение Piwi (Wilczynska et al., 2009; Mikhaleva et al., 2015; Yashiro et al., 2018). Это позволяет белку связываться с хроматином и регулировать экспрессию генов посредством модификации гистонов или метилирования ДНК (Yin, Lin, 2007; Aravin et al., 2008; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008). Наблюдаемая в целомоцитах *E. fraudatrix* цитоплазматическая локализация Piwi в виде piuage является более распространенной среди белков подсемейства, чем ядерная (Megosh et al., 2006; Brennecke et al., 2007; Houwing et al., 2007). В цитоплазме комплекс Piwi-пиРНК участвует в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, и было показано, что для участия в процессах поддержания стволовости требуется именно цитоплазматическая, а не ядерная локализация Piwi (Brennecke et al., 2007; Klenov et al., 2011; Yakushev et al., 2013).

С учетом того, что поддержание мульти-/плюрипотентности требует постоянного синтеза белка Piwi (Sharma et al., 2001) можно предположить наличие разных по уровню потентности клеток-предшественников в тканях стенки тела *E. fraudatrix*. В пользу этого предположения говорит и наличие в составе соединительной ткани тандемов Piwi-позитивных клеток, что является следствием процесса асимметричного митоза, характерного для стволовых клеток (Gilbert, 2010). Известно, что в результате такого деления образуется резидентная стволовая клетка, необходимая для поддержания пула стволовых клеток, и дочерняя клетка-предшественница, способная к дифференцировке (Lin H., Spradling, 1997; Cox et al., 1998; Weissman et al., 2001).

4.2.4 Определение динамики экспрессии генов *piwi* в ходе восстановления популяции целомоцитов

Для количественной оценки экспрессии генов *piwi* и *seali* в целомоцитах и стенке тела *E. fraudatrix* использовали два метода ПЦР: ПЦР в реальном времени и цифровую капельную ПЦР (Завальная и др., 2019; Zavalnaia, Shamshurina, 2019). Преимущество цифровой капельной ПЦР заключается в том, что для анализа реакционная смесь делится на десятки тысяч микрокапель, в каждой из которых

проходит независимая ПЦР. Это позволяет провести точную количественную оценку представленности транскрипта в образце, выраженную в числе копий на мкл. Результаты, полученные разными методами ПЦР, коррелируют между собой и показывают схожую динамику экспрессии генов на ранних сроках регенерации (через 1 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации).

Обнаруженная в целомоцитах интактных животных низкая экспрессия гена *piwi* в ответ на стимулированную эвисцерацию резко возрастает и уже через 1 ч достигает своего пика, после чего снижается. Резкий рост *piwi* через 1 ч после эвисцерации, установленный с помощью ПЦР и визуализированный иммуногистохимически на мазках целомоцитов, согласуется с описанным ранее фактом увеличения доли ювенильных клеток в ЦЖ в этот период (Zavalnaia, Shamshurina, 2019; Завальная и др., 2020; Dolmatov et al., 2021). В стенке тела при этом количество мРНК транскриптов *piwi*, напротив, снижается, вероятно из-за выселения клеток в полость целома.

Наблюдаемое снижение экспрессии *piwi* в стенке тела через 24 ч после начала эксперимента, возможно, является свидетельством истощения резервной популяции клеток-предшественников при восстановлении клеточного состава ЦЖ. Действительно, в это время в ЦЖ наблюдается повторный рост доли ювенильных клеток, вероятнее всего, мигрирующих из стенки тела (Завальная и др., 2020). Однако достаточно низкий, близкий к «норме» уровень экспрессии *piwi* в целомоцитах демонстрирует, что не вся популяция ювенильных клеток может экспрессировать данный ген или что в ЦЖ присутствуют разные по уровню потенции клетки. Существует ряд исследований, доказывающих, что по мере дифференцировки стволовые клетки утрачивают способность синтезировать *Piwi* (Sharma et al., 2001; Unhavaithaya et al., 2009; Lim et al., 2014).

Восстановленные на более ранних сроках уровни *piwi* в целомоцитах вновь несколько снижаются через 7 сут после эвисцерации, а наблюдаемый в стенке тела их незначительный рост не достигает характерных для «нормы» значений (Zavalnaia, Shamshurina, 2019). Поскольку на этих сроках регенерации в организме голотурии происходит активное восстановление утраченных при эвисцерации

внутренних органов (Dolmatov, 1992; Долматов, 2007), целоמוциты также могут принимать участие в этих процессах. Вероятно, уменьшение экспрессии *piwi* происходит по мере дифференцировки клеток-предшественников целоמוцитов в функционально активные клетки. Данный факт, а также степень вовлеченности клеток в регенерацию внутренних органов требует дальнейшего исследования.

Паттерн экспрессии гена *seali* отличается от такого *piwi*. Характерного увеличения экспрессии в ЦЖ через 1 ч после эвисцерации обнаружено не было: количество мРНК транскриптов *seali* после эвисцерации постепенно снижается, но резко увеличивается на 7 сут (Завальная и др., 2019; Zavalnaia, Shamshurina, 2019). При этом в стенке тела уровни экспрессии гена остаются низкими по сравнению с «нормой» на всем протяжении эксперимента. Очевидно, что оба гена вовлечены в восстановительные процессы в соматических тканях *E. fraudatrix*, но, вероятно, выполняют разные функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование гистогенетических взаимоотношений клеток ЦЖ и соединительной ткани стенки тела голотурии *E. fraudatrix* в ходе репаративной регенерации после эвисцерации. Применение комплексного экспериментального подхода, сочетающего клеточные и молекулярно-генетические методы идентификации клеток-предшественников целомоцитов и их ниш, способствовало пониманию механизма быстрого восстановления популяции клеток ЦЖ на начальных этапах регенерации.

В качестве молекулярного маркера клеток-предшественников был использован ген «стволовости» *piwi* и продукт его экспрессии – белок Piwi. В ходе проведенного анализа было установлено, что белок Piwi голотурии *E. fraudatrix* гомологичен белкам Piwi других иглокожих и содержит консервативные для белков данного подсемейства функциональные домены. С использованием биохимических, цитохимических и молекулярных методов исследования было установлено наличие клеток, экспрессирующих *piwi*, в составе субпопуляции ювенильных целомоцитов *E. fraudatrix*. Кроме того, клетки, содержащие белок Piwi, обнаружены в соединительной ткани стенки тела. Исследование экспрессии гена *piwi* в ЦЖ и стенке тела в динамике на ранних сроках регенерации продемонстрировало его вовлеченность в восстановительные процессы *E. fraudatrix*. На основании полученных данных сделано заключение о наличии у *E. fraudatrix* в составе соединительной ткани стенки тела резервной популяции клеток-предшественников целомоцитов, которые выселяются в целомическую полость на начальных этапах регенерации после эвисцерации.

Использование гена *piwi* в дальнейшем в качестве маркера мульти-/плюрипотентности позволит провести скрининговый анализ на наличие клеток-предшественников в тканях других иглокожих, а применение таких молекулярных методов, как нокдаун генов, поможет обозначить его специфические функции в их различных морфогенезах.

ВЫВОДЫ

1. Регуляторный белок *Piwi*, отвечающий за поддержание мульти-/плюрипотентности стволовых клеток, обнаружен у голотурии *E. fraudatrix*. Структурный анализ аминокислотных последовательностей выявил наличие в его молекуле консервативных для белков этой группы функциональных доменов PAZ и PIWI и показал высокую степень идентичности с белками *Piwi* других Metazoa, подтвердив его эволюционную консервативность.

2. Субпопуляция клеток, содержащих в цитоплазме белок *Piwi*, была идентифицирована в составе клеток ЦЖ. Особенности строения *Piwi*-позитивных клеток указывают на их принадлежность к морфотипу ювенильных целомоцитов, являющихся предшественниками двух основных линий дифференцировки клеток ЦЖ – амебоцитов и морулоподобных клеток.

3. Анализ динамики клеточных популяций целомоцитов показал, что восстановление клеточного состава ЦЖ после эвисцерации происходит за счет миграции и выселения из депо низкодифференцированных ювенильных клеток и их последующей дифференцировки. В том числе, это подтверждает динамика содержания *Piwi*-позитивных клеток в ЦЖ, количество которых максимально в первые часы регенерации и возвращается к значениям, характерным для интактных животных, через сутки после эвисцерации.

4. Использование белка *Piwi* в качестве маркера стволовых клеток позволило детектировать в составе плотных и рыхлых слоев соединительной ткани стенки тела субпопуляцию *Piwi*-позитивных клеток. Установлено, что эвисцерация стимулирует их миграцию и выселение в целомическую полость, что подтверждают разнонаправленные показатели экспрессии гена *piwi* в стенке тела и в клетках ЦЖ. Количественным определением транскриптов было подтверждено, что уровень экспрессии *piwi* во время регенерации целомоцитов значительно снижался в стенке тела и в то же время возрастал в ЦЖ. Таким образом, соединительную ткань стенки тела можно рассматривать как депо клеток-предшественников целомоцитов, которые реализуются в условиях

вызванного эвисцерацией стресса и вовлекаются в процессы восстановления клеточного состава ЦЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука. 2007. 212 с.
2. Долматов И.Ю. Регенерация пищеварительной системы у голотурий // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70, № 4. С. 316-327.
3. Завальная Е.Г., Ткачева Е.С., Шамшурина Е.В. Анализ экспрессии генов семейства PIWI в тканях голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'jakonov & Baranova, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirota) в ходе регенерации // Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Годичная научная конференция: сборник материалов. Владивосток, 2019. С. 57-62.
4. Завальная Е.Г., Шамшурина Е.В., Елисейкина М.Г. Иммуноцитохимическая идентификация PIWI-позитивных клеток в ходе восстановления популяции целомочитов после эвисцерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958) (Holothuroidea: Dendrochirota) // Биология моря. 2020. Т. 46, № 2. С. 117-125.
5. Козлова А.Б., Петухова О.А., Пинаев Г.П. Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *Asterias rubens* L. // Цитология. 2006. Т. 48, № 3. С. 175-184.
6. Магарламов Т.Ю. Целомочиты иглокожих и их роль в защитных реакциях // Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток. 2004. 26 с.
7. Марушкина Н.Б., Грачева Н.Д. Авторадиографическое изучение пролиферативной активности в эпителии кишки трепанга *Stichopus japonicus* в нормальных условиях и после аутоотомии // Цитология. 1978. Т. 20, № 4. С. 426-431.
8. Aboukhatwa E., Aboobaker A. An Introduction to planarians and their stem cells // eLS. 2015. P. 1-10.
9. Agata K., Saito Y., Nakajima E. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis // Dev. Growth Differ. 2007. Vol. 49, № 2. P. 73-78.
10. Alié A., Leclère L., Jager M., Dayraud C., Chang P., Guyader H.L., Quéinnec E., Manuel M. Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore:

ancient association of “germline genes” with stemness // *Dev. Biol.* 2011. Vol. 350, № 1. P. 183-197.

11. Alié A., Hayashi T., Sugimura I., Manuel M., Sugano W., Mano A., Satoh N., Agata K., Funayama N. The ancestral gene repertoire of animal stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112, № 51. P. E7093-E7100.

12. Alvarado A.S., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models // *Nat. Rev. Genet.* 2006. Vol. 7, № 11. P. 873-884.

13. Aravin A.A., Hannon G.J., Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race // *Science*. 2007. Vol. 318, № 5851. P. 761-764.

14. Aravin A.A., Sachidanandam R., Bourc’his D., Schaefer C., Pezic D., Toth K. F., Bestor T., Hannon G.J. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to *de novo* DNA methylation in mice // *Mol. Cell*. 2008. Vol. 31, № 6. P. 785-799.

15. Arkov A.L. RNA selection by PIWI proteins // *Trends Biochem. Sci.* 2018. Vol. 43, № 3. P. 153-156.

16. Baguna J., Salo E., Auladell C. Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells // *Development*. 1989. Vol. 107, № 1. P. 77-86.

17. Bak C.W., Yoon T.K., Choi Y. Functions of PIWI proteins in spermatogenesis // *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2011. Vol. 38, № 2. P. 61-67.

18. Bamezai S., Rawat V.P.S., Buske C. Concise review: The Piwi-piRNA axis: pivotal beyond transposon silencing // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, № 12. P. 2603-2611.

19. Bely A.E., Nyberg K.G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field // *Trends Ecol. Evol.* 2010. Vol. 25, № 3. P. 161-170.

20. Bely A.E., Sikes J.M. Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107, № 4. P. 1464-1469.

21. 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. Cham: Springer. 2018. P. 285-320.

22. Berberoglu M.A., Gallagher T.L., Morrow Z.T., Talbot J.C., Hromowyk K.J., Tenente I.M., Langenau D.M., Amacher S.L. Satellite-like cells contribute to pax7-dependent skeletal muscle repair in adult zebrafish // Dev. Biol. 2017. Vol. 424, № 2. P. 162-180.

23. Beyret E., Lin H. Pinpointing the expression of piRNAs and function of the PIWI protein subfamily during spermatogenesis in the mouse // Dev. Biol. 2011. Vol. 355, № 2. P. 215-226.

24. Blair J.E., Hedges S.B. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals // Mol. Biol. Evol. 2005. Vol. 22, № 11. P. 2275-2284.

25. Blau H.M., Pomerantz J.H. Re“evolutionary” regenerative medicine // JAMA. 2011. Vol. 305, № 1. P. 87-88.

26. Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., Benning C. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development // EMBO J. 1998. Vol. 17. P. 170-180.

27. Boland A., Huntzinger E., Schmidt S., Izaurralde E., Weichenrieder O. Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. Vol. 108, № 26. P. 10466-10471.

28. Bodnar A.G., Coffman J.A. Maintenance of somatic tissue regeneration with age in short-and long-lived species of sea urchins // Aging Cell. 2016. Vol. 15, № 4. P. 778-787.

29. Bonnet D. Haematopoietic stem cells // J. Pathol. 2002. Vol. 197, № 4. P. 430-440.

30. Bossche J.P.V., Jangoux M. Epithelial origin of starfish coelomocytes // Nature. 1976. Vol. 261, № 5557. P. 227-228.

31. 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. P. 1-11.

32. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, № 1-2. P. 248-254.
33. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila* // *Cell.* 2007. Vol. 128, № 6. P. 1089-1103.
34. Brennecke J., Malone C.D., Aravin A.A., Sachidanandam R., Stark A., Hannon G.J. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing // *Science.* 2008. Vol. 322, № 5906. P. 1387-1392.
35. Brockes J.P., Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2008. Vol. 24, № 1. P. 525-549.
36. Brower-Toland B., Findley S.D., Jiang L., Liu L., Yin H., Dus M., Zhou P., Elgin S.C.R., Lin H. *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a // *Genes Dev.* 2007. Vol. 21, № 18. P. 2300-2311.
37. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clin. Chem.* 2009. Vol. 55, № 4. P. 611-622.
38. Byrne M. Induction of evisceration in the holothurian *Eupentacta quinquesemita* and evidence for the presence of an endogenous evisceration factor // *J. Exp. Biol.* 1986. Vol. 120, № 1. P. 25-39.
39. Cai S., Fu X., Sheng Z. Dedifferentiation: a new approach in stem cell research // *Bioscience.* 2007. Vol. 57, № 8. P. 655-662.
40. Candia-Carnevali M.D. Regeneration in echinoderms: repair, regrowth, cloning // *Invertebr. Surviv. J.* 2006. Vol. 3, № 1. P. 64-76.
41. Candia-Carnevali M.D., Thorndyke M.C., Matranga V. Regenerating echinoderms: a promise to understand stem cells potential // *Stem cells in marine organisms.* Dordrecht: Springer. 2009. P. 165-186.
42. Canicatti C., Quaglia A. Ultrastructure of *Holothuria polii* encapsulating body // *J. Zool.* 1991. Vol. 224, № 3. P. 419-429.

43. Carlson B.M. An introduction to regeneration // Principles of regenerative biology. NY: Academic Press. 2007. P. 1-30.
44. Carmell M.A., Xuan Z., Zhang M.Q., Hannon G.J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis // Genes Dev. 2002. Vol. 16, № 21. P. 2733-2742.
45. Carmell M.A., Girard A., van de Kant H.J., Bourc'his D., Bestor T.H., de Rooij D.G., Hannon G.J. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline // Dev. Cell. 2007. Vol. 12, № 4. P. 503-514.
46. Cerutti L., Mian N., Bateman A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain // Trends Biochem. Sci. 2000. Vol. 10, № 25. P. 481-482.
47. Chen L., Shen R., Ye Y., Pu X.A., Liu X., Duan W., Wen J., Zimmerer J., Wang Y., Liu Y., Lasky L.C., Heerema N.A., Perrotti D., Ozato K., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Yates A.J., Carson III W.E., Lin H., Barsky S.H., Gao J.X. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation // PloS One. 2007. Vol. 2, № 3. Article No. e293.
48. Cheng E-C., Kang D., Wang Z., Lin H. PIWI proteins are dispensable for mouse somatic development and reprogramming of fibroblasts into pluripotent stem cells // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 9. Article No. e97821.
49. Cheng J., Deng H., Xiao B., Zhou H., Zhou F., Shen Z., Guo J. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates *in vitro* and *in vivo* tumor suppressive activity in human gastric cancer cells // Cancer Lett. 2012. Vol. 315, № 1. P. 12-7.
50. Chia F.S., Xing J. Echinoderm coelomocytes // Zool. Stud. 1996. Vol. 35, № 4. P. 231-254.
51. Chu H., Hui G., Yuan L., Shi D., Wang Y., Du M., Zhong D., Ma L., Tong N., Qin C., Yin C., Zhang Z., Wang M. Identification of novel piRNAs in bladder cancer // Cancer Lett. 2015. Vol. 356, № 2. P. 561-567.
52. Cox D.N., Chao A., Baker J., Chang L., Qiao D., Lin H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal // Genes Dev. 1998. Vol. 12, № 23. P. 3715-3727.

53. Cox D.N., Chao A., Lin H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells // *Development*. 2000. Vol. 127, № 3. P. 503-514.

54. Czech B., Hannon G.J. One loop to rule them all: the ping-pong cycle and piRNA-guided silencing // *Trends Biochem. Sci.* 2016. Vol. 41, № 4. P. 324-337.

55. Deng W., Lin H. *miwi*, a murine homolog of *piwi*, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis // *Dev. Cell*. 2002. Vol. 2, № 6. P. 819-830.

56. De Mulder K., Pfister D., Kualess G., Egger B., Salvenmoser W., Willems M., Steger J., Fauster K., Micura R., Borgonie G., Ladurner P. Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms // *Dev. Biol.* 2009. Vol. 334, № 1. P. 198-212.

57. Ding K., Zhang L., Huo D., Guo X., Liu X., Zhang S. Metabolomic analysis of coelomic fluids reveals the physiological mechanisms underlying evisceration behavior in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Aquaculture*. 2021. Vol. 543. Article No. 736960.

58. Dolmatov I.Y. Regeneration of the aquapharyngeal complex in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) // *Monogr. Dev. Biol.* 1992. Vol. 23. P. 40-50.

59. Dolmatov I.Y. Regeneration in echinoderms // *Russ. J. Mar. Biol.* 1999. Vol. 25, № 3. P. 225-233.

60. Dolmatov I.Y., Ginanova, T.T. Muscle regeneration in holothurians // *Microsc. Res. Tech.* 2001. Vol. 55, № 6. P. 452-463.

61. 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.

62. Dolmatov I.Y., Khang N.A., Kamenev Y.O. Asexual reproduction, evisceration, and regeneration in holothurians (Holothuroidea) from Nha Trang Bay of the South China Sea // *Russ. J. Mar. Biol.* 2012. Vol. 38, № 3. P. 243-252.

63. Dolmatov I.Y. Variability of regeneration mechanisms in echinoderms // *Russ. J. Mar. Biol.* 2020. Vol. 46, № 6. P. 391-404.

64. Dolmatov I.Y. Molecular aspects of regeneration mechanisms in holothurians // *Genes*. 2021. Vol. 12, № 2. P. 1-31.
65. Dolmatov I.Y., 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.
66. Dolmatova L.S., Eliseikina M.G., Romashina V.V. Antioxidant enzymatic activity of coelomocytes of the Far East sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2004. Vol. 40, № 2. P. 126-135.
67. Domantay J.S. Autotomy in holothurians // *Nat. Appl. Sci. Bull.* 1931. Vol. 1, № 4. P. 389-404.
68. Dubois P., Ameye L. Regeneration of spines and pedicellariae in Echinoderms: a review // *Microsc. Res. Tech.* 2001. Vol. 55, № 6. 427-437.
69. Dupont S., Thorndyke M.C. Growth or differentiation? Adaptive regeneration in the brittlestar *Amphiura filiformis* // *J. Exp. Biol.* 2006. Vol. 209, № 19. P. 3873-3881.
70. D'yakonov A.I., Baranova Z.I., Savel'eva T.S. Notes on Holothurians (Ilothurioidea) of the Area of Southern Sakhalin and Southern Kuril Islands // *Issledovaniya dal'nevostochnykh Morei SSSR*. 1958. Vol. 5. P. 358-380.
71. Eisenhoffer G.T., Kang H., Alvarado A.S. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea* // *Cell stem cell*. 2008. Vol. 3, № 3. P. 327-339.
72. Eliseikina M.G., Magarlamov T.Y. Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirotida: Cucumariidae) // *Russ. J. Mar. Biol.* 2002. Vol. 28, № 3. P. 197-202.
73. Eliseikina M.G., Petrova I.Y., Magarlamov T.Y., Dolmatov I.Y., Bulgakov A.A. Mannan-binding lectins of echinoderms are components of humoral defense // *Proceedings of the 11th international Echinoderm conference. Munich, 2004*. P. 119-125.

74. Eliseikina M.G., Magarlamov T.Y., Dolmatov I.Y. Stem cells of holothuroid coelomocytes // Durham proceedings of the 12th international Echinoderm conference. Durham, 2010. P. 163-166.
75. Emson R.H., Wilkie I.C. Fission and autotomy in echinoderms // *Oceanogr. Mar. Biol.* 1980. Vol. 18. P. 155-250.
76. Endean R. The coelomocytes of *Holothuria leucospilota* // *J. Cell Sci.* 1958. Vol. 3, № 45. P. 47-60.
77. Endean R. The coelomocytes and coelomic fluids // *Physiology of echinodermata*. NY: Interscience Publishers. 1966. P. 301-328.
78. Fagegaltier D., Falciatori I., Czech B., Castel S., Perrimon N., Simcox A., Hannon G.J. Oncogenic transformation of *Drosophila* somatic cells induces a functional piRNA pathway // *Genes Dev.* 2016. Vol. 30, № 14. P. 1623-1635.
79. Fierro-Constaín L., Schenkelaars Q., Gazave E., Haguenaer A., Rocher C., Ereskovsky A., Borchiellini C., Renard E. The conservation of the germline multipotency program, from sponges to vertebrates: a stepping stone to understanding the somatic and germline origins // *Genome Biol. Evol.* 2017. Vol. 9, № 3. P. 474-488.
80. Filatov D.A. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. Vol. 2, № 4. P. 621-624.
81. Frank F., Sonenberg N., Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2 // *Nature.* 2010. Vol. 465, № 7299. P. 818-822.
82. Funayama N., Nakatsukasa M., Mohri K., Masuda Y., Agata K. *Piwi* expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges // *Evol. Dev.* 2010. Vol. 12, № 3. P. 275-287.
83. Gahn F.J., Baumiller T.K. Evolutionary history of regeneration in crinoids (Echinodermata) // *Integr. Comp. Biol.* 2010. Vol. 50, № 4. P. 514a-514m.
84. 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.

85. García-Arrarás J.E., Dolmatov I.Y. Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration // *Curr. Pharm. Des.* 2010. Vol. 16, № 8. P. 942-955.
86. García-Arrarás J.E., Lázaro-Peña M.I., Díaz-Balzac C.A. Holothurians as a model system to study regeneration // *Marine organisms as model systems in biology and medicine.* Cham: Springer. 2018. P. 255-283.
87. Gainetdinov I., Colpan C., Arif A., Cecchini K., Zamore P.D. A single mechanism of biogenesis, initiated and directed by PIWI proteins, explains piRNA production in most animals // *Mol. Cell.* 2018. Vol. 71, № 5. P. 775-790.
88. Gehrke A.R., Mansi S. Neoblasts and the evolution of whole-body regeneration // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016. Vol. 40. P. 131-137.
89. Gemberling M., Bailey T.J., Hyde D.R., Poss K.D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration // *Trends Genet.* 2013. Vol. 29, № 11. P. 611-620.
90. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat. Rev. Genet.* 2009. Vol. 10. P. 94-108.
91. Giani V.C., Yamaguchi E., Boyle M.J., Seaver E.C. Somatic and germline expression of piwi during development and regeneration in the marine polychaete annelid *Capitella teleta* // *Evodevo.* 2011. Vol. 2, № 1. P. 1-18.
92. Gilbert S.F. *Developmental biology.* Sunderland: Sinauer Associates. 2010. 711 p.
93. Girard A., Hannon G.J. Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control // *Trends Cell Biol.* 2008. Vol. 18, № 3. P. 136-148.
94. Golconda P., Buckley K.M., Reynolds C.R., Romanello J.P., Smith L.C. The axial organ and the pharynx are sites of hematopoiesis in the sea urchin // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 1-17.
95. Gorshkov A.N., Blinova M.I., Pinaev G.P. Ultrastructure of coelomic epithelium and coelomocytes of the starfish *Asterias rubens* L. in norm and after wounding // *Cell Tissue Biol.* 2009. Vol. 3, № 5. P. 477-490.
96. Goss R.J. *Principles of regeneration.* NY: Academic Press. 1969. 286 p.
97. Gou L.T., Dai P., Yang J.H., Xue Y., Hu Y.P., Zhou Y., Kang J.Y., Wang X., Li H., Hua M.M., Zhao S., Hu S.D., Wu L.G., Shi H.J., Li Y., Fu X.D., Qu L.H., Wang

E.D., Liu M.F. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis // *Cell Res.* 2014. Vol. 24, № 6. P. 680-700.

98. Griswold M.D., Oatley J.M. Concise review: defining characteristics of mammalian spermatogenic stem cells // *Stem Cells.* 2013. Vol. 31, № 1. P. 8-11.

99. Grivna S.T., Pyhtila B., Lin H. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103, № 36. P. 13415-13420.

100. Gross P.S., Al-Sharif W.Z., Clow L.A., Smith L.C. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. Vol. 23, № 4-5. P. 429-442.

101. Gunawardane L.S., Saito K., Nishida K.M., Miyoshi K., Kawamura Y., Nagami T., Siomi H., Siomi M.C. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila* // *Science.* 2007. Vol. 315, № 5818. P. 1587-1590.

102. Gustafson E.A., Wessel G.M. Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells // *Bioessays.* 2010. Vol. 32, № 7. P. 626-637.

103. Halbach R., Miesen P., Joosten J., Taşköprü E., Rondeel I., Pennings B., van Rij R.P. A satellite repeat-derived piRNA controls embryonic development of *Aedes* // *Nature.* 2020. Vol. 580, № 7802. P. 274-277.

104. Harris A.N., Macdonald P.M. Aubergine encodes a *Drosophila* polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C // *Development.* 2001. Vol. 128. P. 2823-2832.

105. Hartig J.V., Tomari Y., Förstemann K. piRNAs – the ancient hunters of genome invaders // *Genes Dev.* 2007. Vol. 21, № 14. P. 1707-1713.

106. He S., Nakada D., Morrison S.J. Mechanisms of stem cell self-renewal // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009. Vol. 25, № 1. P. 377-406.

107. Heasman J., Quarmby J., Wylie C.C. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material // *Dev. Biol.* 1984. Vol. 105, № 2. P. 458-469.

108. Hedges D.J., Deininger P.L. Inviting instability: transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity // *Tissue Eng.* 2007. Vol 616, № 1-2. P. 46-59.
109. Hetzel H.R. Studies on holothurian coelomocytes. II. The origin of coelomocytes and the formation of brown bodies // *Biol. Bull.* 1965. Vol 128, № 1. P. 102-111.
110. Hirakata S., Siomi M.C. piRNA biogenesis in the germline: from transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. Vol. 1859, № 1. P. 82-92.
111. Höck J., Meister G. The Argonaute protein family // *Genome Biol.* 2008. Vol. 9, № 2. P. 1-8.
112. Holland N.D., Phillips J.H., Giese A.C. An autoradiographic investigation of coelomocyte production in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) // *Biol. Bull.* 1965. Vol. 128, № 2. P. 259-270.
113. Holm K., Dupont S., Skold H., Stenius A., Thorndyke M., Hernroth B. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.) // *J. Exp. Biol.* 2008. Vol. 211, № 16. P. 2551-2558.
114. Houwing S., Kamminga L.M., Berezikov E., Cronembold D., Girard A., van den Elst H., Filippov D.V., Blaser H., Raz E., Moens C.B., Plasterk R.H., Hannon G.J., Draper B.W., Ketting R.F. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish // *Cell.* 2007. Vol. 129, № 1. P. 69-82.
115. Houwing S., Berezikov E., Ketting R.F. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish // *EMBO J.* 2008. Vol. 27, № 20. P. 2702-2711.
116. Huang H.Y., Houwing S., Kaaij L.J.T., Meppelink A., Redl S., Gauci S., Vos H., Draper B.W., Moens C.B., Burgering B.M., Ladurner P., Krijgsveld J., Berezikov E., Ketting R.F. Tdrd1 acts as a molecular scaffold for Piwi proteins and piRNA targets in zebrafish // *EMBO J.* 2011. Vol. 30, № 16. P. 3298-3308.
117. Huang X.A., Yin H., Sweeney S., Raha D., Snyder M., Lin H. A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs // *Dev. Cell.* 2013. Vol. 24. P. 502-516.

118. Hyman L.H. The invertebrates: Echinodermata. The coelomate Bilateria. NY: McGraw-Hill. 1955. 763 p.
119. Illmensee K., Mahowald A.P. Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1974. Vol. 71, № 4. P. 1016-1020.
120. Isaeva V.V. Pluripotent gametogenic stem cells of asexually reproducing invertebrates // Embryonic stem cells – basic biology to bioengineering. London: IntechOpen. 2011. P. 449-478.
121. Itou D., Shiromoto Y., Shin-ya Y., Ishii C., Nishimura T., Ogonuki N., Ogura A., Hasuwa H., Fujihara Y., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T. Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells // Curr. Biol. 2015. Vol. 25, № 7. P. 901-906.
122. Iwasaki Y.W., Siomi M.C., Siomi H. PIWI-Interacting RNA: its biogenesis and functions // Annu. Rev. Biochem. 2015. Vol. 84. P. 405-433.
123. Jiang F., Lu F., Li P., Liu W., Zhao L., Wang Q., Cao X., Zhang L., Zhang Y.Q. *Drosophila* homolog of FMRP maintains genome integrity by interacting with Piwi // J. Genet. Genomics. 2016. Vol. 43, № 1. P. 11-24.
124. Jopling C., Boue S., Belmonte J.C.I. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. Vol. 12, № 2. P. 79-89.
125. Juliano C.E., Swartz S.Z., Wessel G.M. A conserved germline multipotency program // Development. 2010. Vol. 137, № 24. P. 4113-4126.
126. Juliano C.E., Wessel G.M. Versatile germline genes // Science. 2010. Vol. 329, № 5992. P. 640-641.
127. Juliano C., Wang J., Lin H. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms // Annu. Rev. Genet. 2011. Vol. 45. P. 447-469.
128. Juliano C.E., Reich A., Liu N., Gotzfried J., Zhong M., Uman S., Reenan R. A., Wessel G.M., Steele R.E., Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs

function in Hydra somatic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. Vol. 111, № 1. P. 337-342.

129. Kalacheva N.V., Eliseikina M.G., Frolova L.T., Dolmatov I.Y. 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.

130. Kanungo K.T. *In vitro* studies on the effect of cell-free coelomic fluid, calcium, and/or magnesium on clumping of coelomocytes of the sea star *Asterias forbesi* (Echinodermata: Asteroidea) // Biol. Bull. 1982. Vol. 163, № 3. P. 438-452.

131. Ketting R.F. The many faces of RNAi // Dev. Cell. 2011. Vol. 20, № 2. P. 148-161.

132. Khurana J.S., Theurkauf W. piRNAs, transposon silencing, and *Drosophila* germline development // J. Cell Biol. 2010. Vol. 191, № 5. P. 905-913.

133. Kikuchi K. Dedifferentiation, transdifferentiation, and proliferation: mechanisms underlying cardiac muscle regeneration in zebrafish // Curr. Pathobiol. Rep. 2015. Vol. 3, № 1. P. 81-88.

134. Kille F.R. Induced autotomy in *Thyone* // Science. 1931. Vol. 74, № 1920. P. 396-396.

135. Kim T.H., Yun T.W., Rengaraj D., Lee S.I., Lim S.M., Seo H.W., Park T.S., Han J.Y. Conserved functional characteristics of the PIWI family members in chicken germ cell lineage // Theriogenology. 2012. Vol. 78, № 9. P. 1948-1959.

136. Klenov M.S., Lavrov S.A., Stolyarenko A.D., Ryazansky S.S., Aravin A.A., Tuschl T., Gvozdev V.A. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, № 16. P. 5430-5438.

137. Klenov M.S., Sokolova O.A., Yakushev E.Y., Stolyarenko A.D., Mikhaleva E.A., Lavrov S.A., Gvozdev V.A. Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. Vol. 108, № 46. P. 18760-18765.

138. Kotaja N., Bhattacharyya S.N., Jaskiewicz L., Kimmins S., Parvinen M., Filipowicz W., Sassone-Corsi P. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. Vol. 103, № 8. P. 2647-2652.
139. Kotaja N., Sassone-Corsi P. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. Vol. 8, № 1. P. 85-90.
140. Kowalczykiewicz D., Pawlak P., Lechniak D., Wrzesinski J. Altered expression of porcine *Piwi* genes and piRNA during development // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 8. Article No. e43816.
141. Kragl M., Knapp D., Nacu E., Khattak S., Maden M., Epperlein H.H., Tanaka E.M. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration // Nature. 2009. Vol. 460, № 7251. P. 60-65.
142. Kuhn C.D., Joshua-Tor L. Eukaryotic Argonautes come into focus // Trends Biochem. Sci. 2013. Vol. 38, № 5. P. 263-271.
143. Kuramochi-Miyagawa S., Watanabe T., Gotoh K., Totoki Y., Toyoda A., Ikawa M., Asada N., Kojima K., Yamaguchi Y., Ijiri T.W., Hata K., Li E., Matsuda Y., Kimura T., Okabe M., Sakaki Y., Sasaki H., Nakano T. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes // Genes Dev. 2008. Vol. 22, № 7. P. 908-917.
144. Kurth H.M., Mochizuki K. 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena* // RNA. 2009. Vol. 15, № 4. P. 675-685.
145. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680-685.
146. Lai A.G., Aboobaker A.A. EvoRegen in animals: Time to uncover deep conservation or convergence of adult stem cell evolution and regenerative processes // Dev. Biol. 2018. Vol. 433, № 2. P. 118-131.
147. Lasko P. The DEAD-box helicase Vasa: evidence for a multiplicity of functions in RNA processes and developmental biology // Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 2013. Vol. 1829, № 8. P. 810-816.

148. Lau N.C., Seto A.G., Kim J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Bartel D. P., Kingston R.E. Characterization of the piRNA complex from rat testes // *Science*. 2006. Vol. 313. P. 363-367.

149. Le Thomas A., Rogers A.K., Webster A., Marinov G.K., Liao S.E., Perkins E.M., Hur J.K., Aravin A.A., Tóth K.F. Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state // *Genes Dev*. 2013. Vol. 27. P. 390-399.

150. Leclère L., Jager M., Barreau C., Chang P., Le Guyader H., Manuel M., Houliston E. Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia* // *Dev. Biol*. 2012. Vol. 364, № 2. P. 236-248.

151. Lee J.H., Schütte D., Wulf G., Füzesi L., Radzun H.J., Schweyer S., Engel W., Nayernia K. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway // *Hum. Mol. Genet*. 2006. Vol. 15, № 2. P. 201-211.

152. Leibson N.L., Dolmatov I.Y. Evisceration and regeneration of the inner complex in a sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) // *Zool. Zhurnal*. 1989. Vol. 68, № 8. P. 67-74.

153. Leibson N.L. Regeneration of digestive tube in holothurians *Stichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix* // *Monogr. Dev. Biol*. 1992. Vol. 23. P. 51-61.

154. Li C., Vagin V.V., Lee S., Xu J., Ma S., Xi H., Seitz H., Horwich M.D., Syrzycka M., Honda B.M., Kittler E.L.W., Zapp M.L., Klattenhoff C., Schulz N., Theurkauf W.E., Weng Z., Zamore P.D. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies // *Cell*. 2009. Vol. 137, № 3. P. 509-521.

155. Li D., Taylor D.H., van Wolfswinkel J.C. PIWI-mediated control of tissue-specific transposons is essential for somatic cell differentiation // *Cell Rep*. 2021. Vol. 37, № 1. P. 1-18.

156. Li Q., Ren Y., Liang C., Qiao G., Wang Y., Ye S., Li R. Regeneration of coelomocytes after evisceration in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *Fish Shellfish Immunol*. 2018. Vol. 76. P. 266-271.

157. Li X., Sun L., Yang H., Zhang L., Miao T., Xing L., Huo D. Identification and expression characterization of WntA during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2017. Vol. 210. P. 55-63.

158. Lim R.S.M., Anand A., Nishimiya-Fujisawa C., Kobayashi S., Kai T. Analysis of *Hydra* PIWI proteins and piRNAs uncover early evolutionary origins of the piRNA pathway // *Dev. Biol.* 2014. Vol. 386, № 1. P. 237-251.

159. Lim R.S.M., Kai T. A piece of the pi(e): the diverse roles of animal piRNAs and their PIWI partners // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015. Vol. 47. P. 17-31.

160. Lin H., Spradling A.C. A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary // *Development.* 1997. Vol. 124, № 12. P. 2463-2476.

161. Lingel A., Simon B., Izaurralde E., Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain // *Nature.* 2003. Vol. 426, № 6965. P. 465-469.

162. Liu X., Sun Y., Guo J., Ma H., Li J., Dong B., Jin G., Zhang J., Wu J., Meng L., Shou C. Expression of *hiwi* gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells // *Int. J. Cancer.* 2006. Vol. 118, № 8. P. 1922-1929.

163. Liu Y., Mochizuki K., Gorovsky M.A. Histone H3 lysine 9 methylation is required for DNA elimination in developing macronuclei in *Tetrahymena* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. Vol. 101, № 6. P. 1679-1684.

164. Maes P., Jangoux M. Occurrence of a well-developed pericentriolar complex within the cytoplasm of asteroid coelomocytes (Echinodermata) // *Dev. Comp. Immunol.* 1983. Vol. 7, № 4. P. 691-694.

165. Mahowald A.P. Assembly of the *Drosophila* germ plasm // *Int. Rev. Cytol.* 2001. Vol. 203. P. 187-213.

166. Malone C.D., Brennecke J., Dus M., Stark A., McCombie W.R., Sachidanandam R., Hannon G.J. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary // *Cell.* 2009. Vol. 137, № 3. P. 522-535.

167. Mani S.R., Juliano C.E. Untangling the web: the diverse functions of the PIWI/piRNA pathway // *Mol. Reprod. Dev.* 2013. Vol. 80, № 8. P. 632-664.
168. Mani S.R., Megosh H., Lin H. PIWI proteins are essential for early *Drosophila* embryogenesis // *Dev. Biol.* 2014. Vol. 385, № 2. P. 340-349.
169. Mashanov V.S., Dolmatov I.Y., Heinzeller T. Transdifferentiation in holothurian gut regeneration // *Biol. Bull.* 2005. Vol. 209, № 3. P. 184-193.
170. Mashanov V.S., Zueva O., García-Arrarás J.E. Postembryonic organogenesis of the digestive tube: why does it occur in worms and sea cucumbers but fail in humans? // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2014. Vol. 108. P. 185-216.
171. Mashanov V.S., Zueva O.R., García-Arrarás J.E. Heterogeneous generation of new cells in the adult echinoderm nervous system // *Front. Neuroanat.* 2015. Vol. 9. P. 1-13.
172. Matranga V. Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1996. Vol. 15. P. 235-247.
173. Matsumoto N., Nishimasu H., Sakakibara K., Nishida K.M., Hirano T., Ishitani R., Siomi H., Siomi M.C., Nureki O. Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA // *Cell.* 2016. Vol. 167, № 2. P. 484-497.
174. Medina-Feliciano J.G., García-Arrarás J.E. Regeneration in echinoderms: Molecular advancements // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. P. 1-17.
175. Megosh H.B., Cox D.N., Campbell C., Lin H. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16, № 19. P. 1884-1894.
176. Mehta A.S., Singh A. Insights into regeneration tool box: An animal model approach // *Dev. Biol.* 2019. Vol. 453, № 2. P. 111-129.
177. Mikhaleva E.A., Yakushev E., Stolyarenko A.D., Klenov M.S., Rozovsky Y.M., Gvozdev V.A. Piwi protein as a nucleolus visitor in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Biol.* 2015. Vol. 49, № 1. P. 161-167.
178. Mochizuki K., Sano H., Kobayashi S., Nishimiya-Fujisawa C., Fujisawa T. Expression and evolutionary conservation of *nanos*-related genes in *Hydra* // *Dev. Genes Evol.* 2000. Vol. 210, № 12. P. 591-602.

179. Mochizuki K., Nishimiya-Fujisawa C., Fujisawa T. Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra* // *Dev. Genes Evol.* 2001. Vol. 211, № 6. P. 299-308.
180. Morgan T.H. *Regeneration*. NY: Macmillan. 1901. 316 p.
181. Müller W.A., Teo R., Frank U. Totipotent migratory stem cells in a hydroid // *Dev. Biol.* 2004. Vol. 275, № 1. P. 215-224.
182. Müller W.E.G. The stem cell concept in sponges (Porifera): metazoan traits // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2006. Vol. 17, № 4. P. 481-491.
183. Nishida K.M., Okada T.N., Kawamura T., Mituyama T., Kawamura Y., Inagaki S., Huang H., Chen D., Kodama T., Siomi H., Siomi M.C. Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines // *EMBO J.* 2009. Vol. 28, № 24. P. 3820-3831.
184. Nishida K.M., Iwasaki Y.W., Murota Y., Nagao A., Mannen T., Kato Y., Siomi H., Siomi M.C. Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells // *Cell Rep.* 2015. Vol. 10, № 2. P. 193-203.
185. Nolde M.J., Cheng E-C., Guo S., Lin H. *Piwi* genes are dispensable for normal hematopoiesis in mice // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 8. Article No. e71950.
186. Okamura K., Ishizuka A., Siomi H., Siomi M.C. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways // *Genes Dev.* 2004. Vol. 18, № 14. P. 1655-1666.
187. Önal P., Grün D., Adamidi C., Rybak A., Solana J., Mastrobuoni G., Wang Y., Rahn H.P., Chen W., Kempa S., Ziebold U., Rajewsky N. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells // *EMBO J.* 2012. Vol. 31, №12. P. 2755-2769.
188. Özpolat B.D., Bely A.E. Developmental and molecular biology of annelid regeneration: a comparative review of recent studies // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016. Vol. 40. P. 144-153.

189. Palakodeti D., Smielewska M., Lu Y.C., Yeo G.W., Graveley B.R. The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians // *RNA*. 2008. Vol. 14, № 6. P. 1174-1186.
190. Pal-Bhadra M., Leibovitch B.A., Gandhi S.G., Chikka M.R., Rao M., Bhadra U., Birchler J.A., Elgin S.C. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery // *Science*. 2004. Vol. 303, № 5658. P. 669-672.
191. Parker J.S., Roe S.M., Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity // *EMBO J*. 2004. Vol. 23, № 24. P. 4727-4737.
192. Parker J.S., Parizotto E.A., Wang M., Roe S.M., Barford D. Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein // *Mol. Cell*. 2009. Vol. 33, № 2. P. 204-214.
193. Pelisson A., Sarot E., Payen-Groschene G., Bucheton A. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense *gypsy* transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary // *J. Virol*. 2007. Vol. 81, № 4. P. 1951-1960.
194. Petukhova O., Sharlaimova N., Shabelnikov S., Bobkov D., Martynova M., Bystrova O. Small undifferentiated cells from starfish *Asterias rubens* L.: candidates to the role of progenitor cells // *Invert. Surviv. J*. 2018. Vol. 15. P. 111-112.
195. Plickert G., Frank U., Müller W.A. *Hydractinia*, a pioneering model for stem cell biology and reprogramming somatic cells to pluripotency // *Int. J. Dev. Biol*. 2012. Vol. 56. P. 519-534.
196. Prahera D., Zimmermann B., Genikhovich G., Columbus-Shenkarb Y., Modepallib V., Aharonib R., Moran Y., Technau U. Characterization of the piRNA pathway during development of the sea anemone *Nematostella vectensis* // *RNA Biol*. 2017. Vol. 14, № 12. P. 1727-1741.
197. Ponnusamy M., Yan K.W., Liu C.Y., Li P.F., Wang K. PIWI family emerging as a decisive factor of cell fate: An overview // *Eur. J. Cell Biol*. 2017. Vol. 96, № 8. P. 746-757.

198. Ramírez-Gómez F., Aponte-Rivera F., Méndez-Castaner L., García-Arrarás J.E. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns // *Fish Shellfish Immunol.* 2010. Vol. 29, № 2. P. 175-185.
199. Ramírez-Gómez F., García-Arrarás J.E. Echinoderm immunity // *Invertebr. Surviv. J.* 2010. Vol. 7, № 2. P. 211-220.
200. Rebscher N., Volk C., Teo R., Plickert G. The germ plasm component Vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian *Hydractinia echinata* // *Dev. Dyn.* 2008. Vol. 237, № 6. P. 1736-1745.
201. Reddien P.W., Oviedo N.J., Jennings J.R., Jenkin J.C., Alvarado A.S. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells // *Science.* 2005. Vol. 310, № 5752. P. 1327-1330.
202. 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.
203. Reuter M., Chuma S., Tanaka T., Franz T., Stark A., Pillai R.S. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16, № 6. P. 639-646.
204. Rinkevich B., Matranga V. Stem cells in marine organisms. The Netherlands: Springer. 2009. 371 p.
205. Rinkevich Y., Rosner A., Rabinowitz C., Lapidot Z., Moiseeva E., Rinkevich B. *Piwi* positive cells that line the vasculature epithelium, underlie whole body regeneration in a basal chordate // *Dev. Biol.* 2010. Vol. 345, № 1. P. 94-104.
206. Rinkevich Y., Voskoboynik A., Rosner A., Rabinowitz C., Paz G., Oren M., Douek J., Alfassi G., Moiseeva E., Ishizuka K.J., Palmeri K.J., Weissman I.L., Rinkevich B. Repeated, long-term cycling of putative stem cells between niches in a basal chordate // *Dev. Cell.* 2013. Vol. 24, № 1. P. 76-88.

207. Robine N., Lau N.C., Balla S., Jin Z., Okamura K., Kuramochi-Miyagawa S., Blower M.D., Lai E.C. A broadly conserved pathway generates 3'UTR-directed primary piRNAs // *Curr. Biol.* 2009. Vol. 19, № 24. P. 2066-2076.

208. Rodrigues A.M.C., Christen B., Martí M., Izpisua Belmonte J.C. Skeletal muscle regeneration in *Xenopus* tadpoles and zebrafish larvae // *BMC Dev. Biol.* 2012. Vol. 12, № 1. P. 1-17.

209. Rodriguez A.J., Seipel S.A., Hamill D.R., Romancino D.P., Di Carlo M., Suprenant K.A., Bonder E.M. Seawi – a sea urchin piwi/argonaute family member is a component of MT-RNP complexes // *RNA.* 2005. Vol. 11, № 5. P. 646-656.

210. Rosner A., Moiseeva E., Rinkevich Y., Lapidot Z., Rinkevich B. Vasa and the germ line lineage in a colonial urochordate // *Dev. Biol.* 2009. Vol. 331, № 2. P. 113-128.

211. Ross R.J., Weiner M.M., Lin H. PIWI proteins and PIWI interacting RNAs in the soma // *Nature.* 2014. Vol. 505, № 7483. P. 353-359.

212. Rossi L., Salvetti A., Lena A., Batistoni R., Deri P., Pugliesi C., Loreti E., Gremigni V. *DjPiwi-1*, a member of the *PAZ-Piwi* gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells // *Dev. Genes Evol.* 2006. Vol. 216, № 6. P. 335-46.

213. Rouget C., Papin C., Boureux A., Meunier A.C., Franco B., Robine N., Lai E.C., Pelisson A., Simonelig M. Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo // *Nature.* 2010. Vol. 467, № 7319. P. 1128-1132.

214. Rubilar T., Meretta P.E., Cledón M. Regeneration rate after fission in the fissiparous sea star *Allostichaster capensis* (Asteroidea) // *Rev. Biol. Trop.* 2015. Vol. 63, № 2. P. 321-328.

215. Rui X., Qi L., Hong Y. Expression pattern of Piwi-like gene implies the potential role in germline development in the Pacific oyster *Crossosrea gigas* // *Aquac. Rep.* 2020. Vol. 18. P. 1-9.

216. Saffman E.E., Lasko P. Germline development in vertebrates and invertebrates // *Cell. Mol. Life Sci.* 1999. Vol. 55, № 8. P. 1141-1163.

217. Saito K., Nishida K.M., Mori T., Kawamura Y., Miyoshi K., Nagami T., Siomi H., Siomi M.C. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20, № 16. P. 2214-2222.

218. Sandoval-Guzmán T., Wang H., Khattak S., Schuez M., Roensch K., Nacu E. Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species // *Cell stem cell.* 2014. Vol. 14, № 2. P. 174-187.

219. Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S., Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome // *Genomics.* 2003. Vol. 82, № 3. P. 323-330.

220. Schirle N.T., MacRae I.J. The crystal structure of human Argonaute2 // *Science.* 2012. Vol. 336, № 6084. P. 1037-1040.

221. Schwarz D.S., Tomari Y., Zamore P.D. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease // *Curr. Biol.* 2004. Vol. 14, № 9. P. 787-791.

222. Seifert A.W., Kiama S.G., Seifert M.G., Goheen J.R., Palmer T.M., Maden M. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*) // *Nature.* 2012. Vol. 489, № 7417. P. 561-565.

223. Seipel K., Yanze N., Schmid V. The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea* // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. Vol. 48, № 1. P. 1-7.

224. Sharlaimova N.S., Pinaev G.P., Petukhova O.A. Comparative analysis of behavior and proliferative activity in culture of cells of coelomic fluid and of cells of various tissues of the sea star *Asterias rubens* L. isolated from normal and injured animals // *Cell Tissue Biol.* 2010. Vol. 4, № 3. P. 280-288.

225. Sharlaimova N.S., Petukhova O.A. Characteristics of populations of the coelomic fluid and coelomic epithelium cells from the starfish *Asterias rubens* L. able attach to and spread on various substrates // *Cell Tissue Biol.* 2012. Vol. 6, № 2. P. 176-188.

226. Sharlaimova N., Shabelnikov S., Bobkov D., Martynova M., Bystrova O., Petukhova O. Coelomocyte replenishment in adult *Asterias rubens*: the possible ways // Cell Tissue Res. 2021. Vol. 383, № 3. P. 1043-1060.
227. Sharma A.K., Nelson M.C., Brandt J.E., Wessman M., Mahmud N., Weller K.P., Hoffman R. Human CD34⁺ stem cells express the *hiwi* gene, a human homologue of the *Drosophila* gene *piwi* // Blood. 2001. Vol. 97, № 2. P. 426-434.
228. Shukalyuk A.I., Dolmatov, I.Y. Regeneration of the digestive tube in the holothurian *Apostichopus japonicus* after evisceration // Russ. J. Mar. Biol. 2001. Vol. 27, № 3. P. 168-173.
229. Shukalyuk A.I., Isaeva V.V. Molecular signature and sub-cellular machinery of metazoan gametogenic stem cells // Recent advances in germ cells research. Hauppauge: Nova Science Pub Inc. 2013. P. 1-40.
230. Selman K., Kafatos F.C. Transdifferentiation in the labial gland of silk moths: is DNA required for cellular metamorphosis? // Cell Differ. 1974. Vol. 3, № 2. P. 81-94.
231. Seto A.G., Kingston R.E., Lau N.C. The coming of age for Piwi proteins // Mol. Cell. 2007. Vol. 26, № 5. P. 603-609.
232. Siebert S., Anton-Erxleben F., Bosch T.C.G. Cell type complexity in the basal metazoan *Hydra* is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation // Dev. Biol. 2008. Vol. 313, № 1. P. 13-24.
233. Sienski G., Dönertas D., Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression // Cell. 2012. Vol. 151, № 5. P. 964-980.
234. Simon B., Kirkpatrick J.P., Eckhardt S., Reuter M., Rocha E.A., Andrade-Navarro M.A., Sehr P., Pillai R.S., Carlomagno T. Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein // Structure. 2011. Vol. 19, № 2. P. 172-180.
235. Siomi M.C., Sato K., Pezic D., Aravin A.A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. Vol. 12, № 4. P. 246-258.

236. Smith L.C., Davidson E.H. The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanisms in deuterostomes // *Immunol. Today*. 1992. Vol. 13, № 9. P. 356-362.

237. Smith L.C., Arizza V., Barela Hudgell M.A., Barone G., Bodnar A.G., Buckley K.M., Cunsolo V., Dheilly N.M., Franchi N., Fugmann S.D., Furukawa R., Garcia-Ararras J., Henson J.H., Hibino T., Irons Z.H., Li C., Lun C.M., Majeske A.J., Oren M., Pagliara P., Pinsino A., Raftos D.A., Rast J.P., Samasa B., Schillaci D., Schrankel C.S., Stabili L., Stensväg K. Sutton E. Echinodermata: The complex immune system in echinoderms // *Advances in comparative immunology*. Cham: Springer. 2018. P. 409-501.

238. Smith V.J. *Invertebrate blood cells*. NY: Academic Press. 1981. 513 p.

239. Smulders-Srinivasan T.K., Lin H. Screens for *piwi* suppressors in *Drosophila* identify dosage-dependent regulators of germline stem cell division // *Genetics*. 2003. Vol. 165, № 4. P. 1971-1991.

240. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity // *Science*. 2004. Vol. 305, № 5689. P. 1434-1437.

241. Song J.L., Wessel G.M. Genes involved in the RNA interference pathway are differentially expressed during sea urchin development // *Dev. Dyn*. 2007. Vol. 236, № 11. P. 3180-3190.

242. Sousa-Victor P., Ayyaz A., Hayashi R., Qi Y., Madden D.T., Lunyak V.V., Jasper H. Piwi is required to limit exhaustion of aging somatic stem cells // *Cell Rep*. 2017. Vol 20, № 11. P. 2527-2537.

243. Srivastava M., Mazza-Curll K.L., van Wolfswinkel J.C., Reddien P.W. Whole-body acoel regeneration is controlled by Wnt and Bmp-Admp signaling // *Curr. Biol*. 2014. Vol. 24, № 10. P. 1107-1113.

244. Sumiyoshi T., Sato K., Yamamoto H., Iwasaki Y.W., Siomi H., Siomi M.C. Loss of *l(3)mbt* leads to acquisition of the ping-pong cycle in *Drosophila* ovarian somatic cells // *Genes Dev*. 2016. Vol. 30, № 14. P. 1617-1622.

245. Su C., Ren Z.J., Wang F., Liu M., Li X., Tang H. PIWIL4 regulates cervical cancer cell line growth and is involved in down-regulating the expression of p14ARF and p53 // *FEBS Lett.* 2012. Vol. 586, № 9. P. 1356-1362.
246. Sun L., Chen M., Yang H., Wang T., Liu B., Shu C., Gardiner D.M. Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.* 2011. Vol. 6, № 2. P. 195-205.
247. Sun Z.H., Wei J.L., Cui Z.P., Han Y.L., Zhang J., Song J., Chang Y.Q. Identification and functional characterization of *piwil* gene in sea cucumber, *Apostichopus japonicas* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2021. Vol. 252. Article No. 110536.
248. Swalla B.J., Smith A.B. Deciphering deuterostome phylogeny: molecular, morphological and palaeontological perspectives // *Philos. Trans. R. Soc. B.* 2008. Vol. 363, № 1496. P. 1557-1568.
249. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. Vol. 28, № 10. P. 2731-2739.
250. Tanaka E.M., Reddien P.W. The cellular basis for animal regeneration // *Dev. Cell.* 2011. Vol. 21, № 1. P. 172-185.
251. Tan Y., Liu L., Liao M., Zhang C., Hu S., Zou M., Gu M., Li X. Emerging roles for PIWI proteins in cancer // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2015. Vol. 47, № 5. P. 315-324.
252. Taubert H., Greither T., Kaushal D., Würfl P., Bache M., Bartel F., Kehlen A., Lautenschläger C., Harris L., Kraemer K., Meye A., Kappler M., Schmidt H., Holzhausen H.J., Hauptmann S. Expression of the stem cell self-renewal gene *Hiwi* and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma // *Oncogene.* 2007. Vol. 26, № 7. P. 1098-1100.
253. Thomson T., Lin H. The biogenesis and function PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009. Vol. 25. P. 355-376.

254. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol 25, № 24. P. 4876-4882.
255. Thorndyke M.C., Chen W.C., Beesley P.W., Patruno M. Molecular approach to echinoderm regeneration // *Microsc. Res. Tech.* 2001. Vol. 55, № 6. P. 474-485.
256. Tian Y., Simanshu D.K., Ma J.B., Patel D.J. Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108, № 3. P. 903-910.
257. Tiozzo S., Copley R.R. Reconsidering regeneration in metazoans: an evo-devo approach // *Front. Ecol. Evol.* 2015. Vol. 3. P 1-12.
258. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350-4354.
259. Tu Q., Cameron R.A., Worley K.C., Gibbs R.A., Davidson E.H. Gene structure in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* based on transcriptome analysis // *Genome Res.* 2012. Vol. 22, № 10. P. 2079-2087.
260. Unhavaithaya Y., Hao Y., Beyret E., Yin H., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Lin H. MILI, a piRNA binding protein, is required for germline stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 10. P. 6507-6519.
261. Vagin V.V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline // *Science.* 2006. Vol. 313, № 5785. P. 320-324.
262. Vazzana M., Celi M., Chiaramonte M., Inguglia L., Russo D., Ferrantelli, V., Battaglia D., Arizza V. Cytotoxic activity of *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) coelomocytes // *Fish Shellfish Immunol.* 2018. Vol. 72. P. 334-341.
263. Vogt G. Hidden treasures in stem cells of indeterminately growing bilaterian invertebrates // *Stem Cell Rev. Reports.* 2012. Vol. 8, № 2. P. 305-317.
264. Voronina E., Seydoux G., Sassone-Corsi P., Nagamori I. RNA granules in germ cells // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. 3, № 12. Article No. a002774.

265. Wahid F., Khan T., Hwang K.H., Kim Y. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in animals: The story so far // *Afr. J. Biotechnol.* 2009. Vol. 8, № 17. P. 4002-4006.
266. Wagner D.E., Ho J.J., Reddien P.W. Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis // *Cell Stem cell.* 2012. Vol 10, № 3. P. 299-311.
267. Wallace N.A., Belancio V.P., Deininger P.L. L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity // *Gene.* 2008. Vol. 419, № 1-2. P. 75-81.
268. Wang G., Reinke V.A. *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21URNAs during spermatogenesis // *Curr. Biol.* 2008. Vol. 18, № 12. P. 861-867.
269. Wang J., Saxe J.P., Tanaka T., Chuma S., Lin H. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis // *Curr. Biol.* 2009. Vol. 19, № 8. P. 640-644.
270. Wang Y., Liu Y., Shen X., Zhang X., Chen X., Yang C., Gao H. The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012. Vol. 5, № 4. P. 315-325.
271. Wang Z., Liu N., Shi S., Liu S., Lin H. The role of PIWIL4, an Argonaute family protein, in breast cancer // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 20. P. 10646-10658.
272. Whelan S., Goldman N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18, № 5. P. 691-699.
273. Weissman I., Anderson D., Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. Vol. 17. P. 387-403.
274. Wilczynska A., Minshall N., Armisen J., Miska E.A., Standart N. Two Piwi proteins, Xiwi and Xili, are expressed in the *Xenopus* female germline // *RNA.* 2009. Vol. 15, № 2. P. 337-345.
275. Wobus A.M. Potential of embryonic stem cells // *Mol. Asp. Med.* 2001. Vol. 22, № 3. P. 149-164.
276. van Wolfswinkel J.C. Piwi and potency: PIWI proteins in animal stem cells and regeneration // *Am. Zool.* 2014. Vol. 54, № 4. P. 700-713.

277. Wu L., Belasco J.G. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs // *Mol. Cell*. 2008. Vol. 29, № 1. P. 1-7.
278. Xiol J., Spinelli P., Laussmann M.A., Homolka D., Yang Z., Cora E., Couté Y., Conn S., Kadlec J., Sachidanandam R., Kaksonen M., Cusack S., Ephrussi A., Pillai R.S. RNA clamping by Vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts // *Cell*. 2014. Vol. 157, № 7. P. 1698-1711.
279. Xing K., Yang H.S., Chen M.Y. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus* // *Aquat. Biol.* 2008. Vol. 2, № 1. P. 85-92.
280. Yajima M., Gustafson E.A., Song J.L., Wessel G.M. Piwi regulates Vasa accumulation during embryogenesis in the sea urchin // *Dev. Dyn.* 2014. Vol. 243, № 3. P. 451-458.
281. Yakushev E., Sokolova O.A., Gvozdev V.A., Klenov M.S. Multifunctionality of PIWI proteins in control of germline stem cell fate // *Biochem. (Mosc.)*. 2013. Vol. 78, № 6. P. 585-591.
282. Yan K.S., Yan S., Farooq A., Han A., Zeng L., Zhou M.M. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain // *Nature*. 2003. Vol. 426, № 6965. P. 469-474.
283. Yashiro R., Murota Y., Nishida K.M., Yamashiro H., Fujii K., Ogai A., Siomi M.C. Piwi nuclear localization and its regulatory mechanism in *Drosophila* ovarian somatic cells // *Cell Rep.* 2018. Vol. 23, № 12. P. 3647-3657.
284. Yin H., Lin H. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster* // *Nature*. 2007. Vol. 450, № 7167. P. 304-308.
285. Yuan Y.R., Pei Y., Ma J.B., Kuryavyi V., Zhadina M., Meister G., Chen H. Y., Dauter Z., Tuschl T., Patel D.J. Crystal structure of *A. aeolicus* Argonaute, a site-specific DNA guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage // *Mol. Cell*. 2005. Vol. 19, № 3. P. 405-419.
286. Zattara E.E., Bely A.E. Phylogenetic distribution of regeneration and asexual reproduction in Annelida: regeneration is ancestral and fission evolves in regenerative clades // *Invertebr. Biol.* 2016. Vol. 135, № 4. P. 400-414.

287. Zavalnaia E.G., Petrova I.Y., Eliseikina M.G., Girich A.S., Dolmatov I.Y. Vasa and piwi-like proteins in the tissues of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Dendrichirota, Holothuroidea) // Program and abstracts of the 16th international Echinoderm conference. Nagoya, 2018. P. 210.

288. Zavalnaia E.G., Shamshurina E.V. The expression of *piwi* and *seali* genes in holothurian *Eupentacta fraudatrix* tissues during regeneration // Abstracts of the 10th European conference on Echinoderms. Moscow, 2019. P. 110.

289. Zhang P., Kang J.Y., Gou L.T., Wang J., Xue Y., Skogerboe G., Dai P., Huang D.W., Chen R., Fu X.D., Liu M.F., He S. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes // Cell Res. 2015. Vol. 25, № 2. P. 193-207.

290. Zhang Q.J., Luo Y.J., Wu H.R., Chen Y.T., Yu J.K. Expression of germline markers in three species of amphioxus supports a preformation mechanism of germ cell development in cephalochordates // Evodevo. 2013. Vol. 4, № 1. P. 1-16.

291. Zhang X., Sun L., Yuan J., Sun Y., Gao Y., Zhang L., Li S., Dai H., Hamel J.F., Liu C., Yu Y., Liu S., Lin W., Guo K., Jin S., Xu P., Storey K.B., Huan P., Zhang T., Zhou Y., Zhang J., Lin C., Li X., Xing L., Huo D., Sun M., Wang L., Mercier A., Li F., Yang H., Xiang J. The sea cucumber genome provides insights into morphological evolution and visceral regeneration // PLoS Biol. 2017. Vol. 15, № 10. Article No. e2003790.

292. Zheng F.X., Sun X.Q., Fang B.H., Hong X.G., Zhang J.X. Comparative analysis of genes expressed in regenerating intestine and non-eviscerated intestine of *Apostichopus japonicus* Selenka (Aspidochirota: Stichopodidae) and cloning of endymin gene // Hydrobiologia. 2006. Vol. 571, № 1. P. 109-122.

293. Zheng J., Gao M., Huynh N., Tindell S.J., Vo H.D., McDonald W.H., Arkov A.L. In vivo mapping of a dynamic ribonucleoprotein granule interactome in early *Drosophila* embryos // FEBS Open Bio. 2016. Vol. 6. P. 1248-1256.

294. Zhu S.J., Pearson B.J. (Neo)blast from the past: new insights into planarian stem cell lineages // Curr. Opin. Genet. Dev. 2016. Vol. 40. P. 74-80.

295. Zhu W., Pao G.M., Satoh A., Cummings G., Monaghan J.R., Harkins T.T., Bryant S.V., Voss R., Gardiner D.M., Hunter T. Activation of germline-specific genes

is required for limb regeneration in the Mexican axolotl // *Dev. Biol.* 2012. Vol. 370. P. 42-51.

296. Zhu Y., Do V.D., Richards A.M., Foo R. What we know about cardiomyocyte dedifferentiation // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2021. Vol. 152, № 1. P. 80-91.

297. Zeng Q., Wan H., Zhao S., Xu H., Tang T., Oware K.A., Qu S. Role of PIWI-interacting RNAs on cell survival: Proliferation, apoptosis, and cycle // *IUBMB Life.* 2020. Vol. 72, № 9. P. 1870-1878.