На правах рукописи

Нижниченко Владимир Анатольевич

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

1.5.23. Биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН **Долматов Игорь Юрьевич**

Официальные оппоненты:

Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», зав. лабораторией роста и развития Научно-исследовательского института морфологии человека им. акад. А.П. Авцына

Борисенко Илья Евгеньевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», доцент кафедры эмбриологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Защита диссертации состоится 30 сентября 2025 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/70-nizhnichenko-vladimir-anatolevich

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

Автореферат разослан «_____» _____2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Ващенко М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Представители типа Echinodermata обладают хорошими способностями к восстановлению частей тела и органов, включая мышцы. Регенерация у иглокожих протекает без участия стволовых клеток, а формирование утраченных структур происходит за счет дедифференциации и, реже, трансдифференциации специализированных клеток оставшихся частей органов (Долматов, Машанов, 2007). Восстановление мышц в основном изучалось на голотуриях, поскольку они обладают наиболее развитой мышечной системой среди Echinodermata. Эти животные имеют идущие вдоль радиусов тела (амбулакров) продольные мышечные ленты (ПМЛ), которые легко препарируются и доступны для экспериментальных манипуляций. Некоторые виды способны достаточно быстро восстанавливать ПМЛ после поперечного рассечения (Dolmatov, Ginanova, 2001). У голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov, Baranova & Savel'eva, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirotida) регенерация ПМЛ на клеточном уровне описана наиболее подробно. Новые миоциты развиваются за счет миогенной трансформации клеток целомического эпителия. Последние начинают синтезировать мышечные белки, погружаться в подлежащую соединительную ткань и формируют мышечные пучки (Dolmatov, Ginanova, 2001). В то же время, молекулярная основа данного процесса остается не исследованной. Изучение восстановления ПМЛ у *E. fraudatrix* после повреждения позволяет лучше понять происхождение механизмов миогенеза и их эволюции у Bilateria.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день морфологические особенности регенерации мускулатуры иглокожих описаны у морских звезд, морских лилий, офиур и голотурий. Наиболее подробно изучена регенерация ПМЛ у голотурий *E. fraudatrix* и *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Dolmatov et al., Dolmatov, Ginanova, 2001). Однако данных по молекулярным аспектам восстановительных миогенезов накоплено мало. Более того, имеющиеся работы ограничены изучением экспрессии или функции одного или нескольких генов и не позволяют полноценно понять молекулярные механизмы регенерации сократительной системы (Medina-

Feliciano, García-Arrarás, 2021). Кроме того, вне фокуса внимания остались соединительная ткань и ее роль в миогенезе иглокожих. Предварительные данные показывают, что преобразование внеклеточного матрикса имеет существенное значение для формирования мышечных пучков (Dolmatov et al., 2019).

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

Задачи исследования:

1. Поиск генов семейства Myogenic regulatory factors (MRF) и изучение доменной структуры кодируемых ими белков у иглокожих.

2. Поиск генов семейства матриксных металлопротеиназ (MMP) и изучение доменной структуры кодируемых ими белков у иглокожих.

3. Определение с помощью транскриптомного анализа генов транскрипционных факторов и MMP, потенциально вовлеченных в регенерацию ПМЛ.

4. Анализ динамики экспрессии генов-кандидатов при регенерации ПМЛ.

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

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

Методология и методы исследования. Секвенирование транскриптома было выполнено на платформе Illumina NovaSeq 6000. Сборку и аннотацию транскриптомов проводили с использованием классических инструментов SPAdes, BLAST и алгоритмов HomoloCAP, Reconciler, описанных в

работе Boyko et al., 2020. Карта сверхпредставленных процессов и путей построена с помощью программ GSEA, EnrichmentMap и Cytoscape. Для изучения динамики пространственно-временной экспрессии генов во время регенерации применялись методы SISH и кПЦР (количественная полимеразно-цепная реакция). Филогенетические деревья построены алгоритмом RAxML и визуализированы с помощью онлайн сервиса iTOL. Для определения доменной структуры использовались программы Blast CD-search, Smart, SignalP-5.0 и Phobius.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У представителей Echinodermata имеются гомологи генов семейства MRF позвоночных.

2. ММР иглокожих имеют типичное для этого типа протеаз строение, однако на филогенетическом дереве основное их число группируется отдельно от ММР позвоночных, вероятно, вследствие активной дупликации и дивергенции предковых генов ММР после разделения Ambulacraria и Chordata.

3. Набор транскрипционных факторов, экспрессирующихся при регенерации ПМЛ у *Eupentacta fraudatrix*, значительно отличается от такового, которые регулируют миогенез у позвоночных.

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

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

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

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

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность директору ННЦМБ ДВО РАН, д.б.н., чл.-корр. РАН Долматову Игорю Юрьевичу за руководство, консультирование по цито-гистологическим аспектам регенерации, обучению анатомии и препарированию голотурий,

написанию и подготовке научных публикаций, а также помощь в интерпретации результатов филогенетических и молекулярных исследований. Очень благодарен Александру Сергеевичу Гиричу за проявленное терпение и обучению меня статистическим методам обработки информации, филогенетическим методам и навыкам молекулярной биологии. Признателен Алексею Вячеславовичу Бойко, за его отзывчивость и помощь в освоении статистических методов обработки информации и методов филогенетических исследований, а также за сборку транскриптома и анализ дифференциальной экспрессии. Благодарен Екатерине Валерьевне Шамшуриной, Талие Талгатовне Гинановой и Марине Геннадьевне Елисейкиной за консультирование и помощь в освоении гистологических методов, а также Андрею Даниловичу Кухлевскому за секвенирование ампликонов. Также благодарен всему коллективу лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН, в которой мне посчастливилось оказаться и работать.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены основные положения теории регенерации, а также источники клеточного материала и механизмы, за счет которых происходит восстановление утраченных структур. Описаны способности к регенерации у иглокожих, и, в частности, у голотурии *Eupentacta fraudatrix* и показано, что данный вид является походящим модельным объектом для изучения регенерации мышц. Заключительные разделы обзора литературы посвящены генам-регуляторам миогенеза у позвоночных и иглокожих.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Взятие образцов ткани, выделение и отчистка РНК. Для анализа у регенерирующих особей брали небольшой участок отделенного от стенки тела амбулакра (радиальный нервный тяж, гемальный сосуд, амбулакральный канал и ПМЛ) через 10-е (первая стадия регенерации) и 20-е (вторая стадия регенерации) сут после повреждения (спп). Для секвенирования транскриптома на каждую стадию было отобрано по девять особей. Каждая стадия была представлена тремя повторами, а каждый повтор объединял в себе материал трех особей. Таким же образом отбирали животных для кПЦР. Тотальную РНК выделяли с использованием фенол-хлороформной экстракции. Выделенная РНК была обработана ДНКазой I (Thermo Scientific, США) при 37 °С в течение 20 мин и почищена на спин-колонках CleanRNA Standard (Евроген, Россия). РНК, предназначенную для секвенирования транскриптомов, дополнительно очищали с помощью магнитных шариков Dynabeads Oligo(dT)25 (Thermo Fisher Scientific, США) для получения Поли-А РНК фракции.

Секвенирование поли-А РНК. Библиотеки подготовлены с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB, Великобритания). После проверки качества на TapeStation 4200 (Agilent, США) было выполнено парное секвенирование (2 × 100) на секвенаторе NovaSeq 6000 (Illumina, США) компанией Генетико (Россия).

Сборка транскриптома *de novo*. Сырые риды из девяти библиотек, были обработаны с использованием программного обеспечения Trimmomatic 0.3966. Затем чистые риды были классифицированы с использованием программного обеспечения Kraken 2.1.2. Все неклассифицированные парные прочтения были собраны с использованием программного обеспечения SPAdes 3.15.1. Полученные последовательности были обработаны и собраны с помощью

скрипта HomoloCAP. Далее, последовательности были отфильтрованы в соответствии с требованиями NCBI и загружены в базу данных TSA NCBI с индексом GHCL00000000. Полноту транскриптома оценивали с использованием BUSCO 5.2.1.

Анализ дифференциальной экспрессии генов. Чтобы найти дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ), количество сопоставленных прочтений было рассчитано в программе RSEM 1.3.1; риды с парными концами были выровнены в программе Bowtie 2.4.4. После фильтрации дифференциальная экспрессия для последовательностей была оценена в программном обеспечении DESeq2 1.28.1. Контрольным образцом выступала интактная мышца. Актуальными считали ДЭГ, уровень экспрессии которых в пробе был в два раза выше, чем в контроле, а скорректированное значение p было меньше 0,05.

Аннотация белок-кодирующих последовательностей транскриптома. Аннотирование проводилось по нескольким белковым базам данных со стандартным значением e для BLASTP 2.12.0, которое составляло 1e-5. Базовая аннотация взята из базы данных NR NCBI (19.12.21); аннотацию для анализа обогащения выполняли поиском BLASTP по белкам человека из базы данных Ensemble v105; аннотация для поиска факторов транскрипции была основана на белках человека из Ensemble и белках морского ежа из проекта Echinobase. Ортологи человеческих белков идентифицировали с помощью пользовательского скрипта Python, который реализует модифицированный метод взаимного поиска лучшего совпадения. Список ТФ человека был взят из базы данных «The Human Transcription Factors» версии 1.01. Список ТФ морских ежей взят из Echinobase (02.12.21). Анализ сверхпредставленности биологических процессов и путей был выполнен с помощью программного обеспечения GSEA 4.1 в соответствии с протоколом EnrichmentMap для данных РНК-секвенирования. Наборы генов для биологических процессов и путей были получены из базы данных MsigDB v7.4. Результаты анализа обогащения были визуализированы с использованием плагинов EnrichmentMap в программе Cytoscape 3.9.

Анализ последовательностей и разработка праймеров для кПЦР и клонирования. Для анализа были использованы геномы иглокожих, полухордовых и хордовых. А также транскриптомы различных тканей иглокожих. Поиск последовательностей производился в программе Ugene, а также по базе NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) алгоритмами blastp, tblastx, blastn. Для сравнительного анализа гомологии белков были использовали blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Структура доменов была выявлена с помощью онлайн сервисов Pfam (http://pfam.xfam.org/), Blast NCBI, и программы Smart (http://smart.embl-heidelberg.de). Кроме того, для более точно определения наличия сигнальных пептидов и трансмембранных доменов в молекулах белков MMP использовались онлайн сервисы SignalP-5.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) и Phobius (https://phobius.sbc.su.se/index.html). Поиск и подбор праймеров проводили с помощью веб сервиса PrimerQuest Tool (IDT, США).

Построение филогенетических деревьев. Для построения филогенетических деревьев были использованы консервативные участки предполагаемых аминокислотных последовательностей, полученных из нуклеотидных последовательностей. Определение консервативных участков проводили с помощью программы Gblocks (0.91b). Построение филогенетических деревьев осуществлялось алгоритмами RAxML-HPC BlackBox (8.2.12) онлайн сервиса CIPRES (http://www.phylo.org) и алгоритмом Maximum Likelyhood в программе Mega11.

кПЦР. Обратную транскрипцию РНК проводили поли-dT праймерами, как описано в протоколе набора MMLV RT (Евроген, Россия). qPCR осуществляли с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Все значения экспрессии были нормализованы относительно среднего арифметического Ct генов *Ef-GAPDH* и *Ef-EF1a*. Для оценки экспрессии использовали метод 2-ΔΔCt. Статистическую достоверность результатов оценивали с помощью непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA).

Синтез РНК зондов. С кДНК амбулакра были амплифицированы фрагменты генов, которые далее были лигированы в вектор pAL2-T (Евроген, Россия) и трансформированы в компетентные клетки E. coli XL1-Blue (Евроген, Россия) путем электропорации. Проверка ампликонов проводилась секвенированием на ABI Prism 3130xL (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Синтез зондов осуществлялся РНК полимеразой T7/Sp6 (Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого гена были синтезированы антисмысловые зонды в качестве опыта, и смысловые – в качестве контроля. Также были синтезированы РНК зонды для 18s рибосомальной РНК для положительного и отрицательного контролей.

Фиксация тканей и приготовление замороженных срезов. Животных предфиксировали в течение 5 мин путем введения 4% раствора формальдегида (Sigma, США) на буфере PBS (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCL, 10 мМ Na_2PO_4, 18 мМ KH_2PO_4) в полость тела. Затем участок амбулакра вместе с поврежденным местом вырезали ножницами и фиксировали в 4% формальдегиде в течение 12 ч при 4°C. Замороженные срезы толщиной 20 мкм были изготовлены с помощью криомикротома Thermo Scientific HM 560 CryoStar (Thermo Fisher Scientific, США).

Гибридизация *in situ* на срезах. Для выявления локализации продуктов генов использовали хромогенную гибридизацию *in situ* на замороженных срезах. Иммунологическая детекция осуществлялась с помощью anti-DIG-alkaine phosphatase [Fab fragments] (Roche, Германия) и раствора BCIP/NBT (BCIP/NBT tablets; Roche, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Анализ мультигенного семейства MRF у иглокожих

Наше исследование показало, что у иглокожих имеются гомологи генов MYOD семейства MRF позвоночных. В зависимости от вида, число гомологов варьирует от 1 до 3 (Нижниченко, Долматов, 2022). Ген *MYOD1* и/или его транскрипты присутствуют у всех изученных иглокожих, за исключением голотурии *S. briareus* и морской звезды *Henricia sp.* Причиной отсутствия *MYOD1* у данных видов скорее всего является неполнота транскриптомных данных. Среди всех изученных трансриптомов иглокожих, транскрипт *MYOD2* присутствует лишь у морской звезды *Henricia sp.* Также *MYOD2* был найден в геномах *L. variegatus, E. tribuloides, A. planci* и *A. japonica.* У голотурий этот ген и/или его транскрипты нами не были обнаружены. Возможно, голотурии утратили его, но тем не менее, это предположение нуждается в проверке на большем числе видов. Ген *MYOD3* и его транскрипты были выявлены у всех исследованных нами видов голотурий, морских ежей и морских лилий. В то же время у проанализированных видов морских звезд он отсутствует, что, скорее всего, говорит об его утрате. Аминокислотная последовательность домена basic в MYOD3 иглокожих значительно отличается от таковых в MYOD1 и MYOD2 как иглокожих, так и позвоночных. Данные различия ставят под вопрос способность этого домена обеспечивать связывание MYOD3 с ДНК. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, каким образом MYOD3 участвует в транскрипционных взаимодействиях.

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

3.2. Анализ мультигенного семейства MMP

Состав мультигенного семейства MMP у *E. fraudatrix* и других иглокожих. Секвенированный нами транскриптом ПМЛ *E. fraudatrix* содержит 20 генов, последовательности и доменная структура которых соответствует генам MMP хордовых (Таблица 1). Учитывая, что транскриптом не содержит полную информацию о наличии генов у вида, для уточнения количества генов MMP у *E. fraudatrix* необходимо иметь качественный геном данного животного.

Результаты поиска MMP в геномах других иглокожих вместе с данными по транскриптому *E. fraudatrix* показывают, что в разных классах Echinodermata число генов МПП сильно различается (17 MMP у голотурии *A. japonicus* и 22 MMP у морского ежа *S. purpuratus*). В целом, число MMP у изученных иглокожих сопоставимо с таковым у позвоночных, у которых насчитывается 25-33 генов MMP (Dolmatov et al., 2021).

Таблица 1 – Матриксные металлопротеиназы, обнаруженные в транскриптоме *E. fraudatrix*.

ID контига *E. fraudatrix*	**Название гена *E. fraudatrix***	**ID контига *E. fraudatrix***	**Название гена *E. fraudatrix***
Efra.gene10190_i0_len1785.p1	*Ef-MMP24.1*	Efra.gene59032_i0_len1644.p1	*Ef-MMP16*
Efra.gene11801_i1_len1506.p1	*Ef-MMP13.1*	Efra.gene59219_i0_len1605.p1	*Ef-72 kDa type IV collagenase.5*
Efra.gene13165_i0_len1686.p1	*Ef-MMP16.2*	Efra.gene59241_i0_len1602.p1	*Ef-72 kDa type IV collagenase.2*
Efra.gene13472_i0_len1581.p1	*Ef-72 kDa type IV collagenase*	Efra.gene59488_i0_len1623.p1	*Ef-72 kDa type IV collagenase.3*
Efra.gene13691_i0_len2472.p1	*Ef-MMP16.3*	Efra.gene59904_i0_len1695.p1	*Ef-MMP16.4*
Efra.gene1750_i0_len2304.p1	*Ef-MMP21.1*	Efra.gene60016_i0_len1731.p1	*Ef-MMP24*
Efra.gene58151_i0_len1837.p1	*Ef-MMP1.1*	Efra.gene64920_i0_len1479.p1	*Ef-72 kDa type IV collagenase.4*
Efra.gene58669_i0_len2070.p1	*Ef-MMP21*	Efra.gene65340_i0_len1548.p1	*Ef-MMP24.2*
Efra.gene58993_i0_len1662.p1	*Ef-MMP1.2*	Efra.gene65402_i0_len1539.p1	*Ef-MMP11*
Efra.gene59028_i0_len1644.p1	*Ef-MMP13*	Efra.gene9929_i0_len1794.p1	*Ef-MMP1*

Анализ доменной структуры MMP иглокожих. Изучение доменной структуры MMP иглокожих показывает, что они имеют типичное для этого типа протеаз строение (Рисунок 1). Наличие у большинства изученных протеиназ N-концевого сигнального пептида и пропептидного домена говорит о том, что они синтезируются в виде неактивного предшественника, зимогена, который затем активируется за счет удаления пропептидного домена. Присутствие PGBD-подобного домена на N-конце ряда MMP иглокожих указывает на то, что эти MMP, как и аналогичные MMP позвоночных, могут связываться с протеогликанами и катализировать деградацию внеклеточного матрикса. Подавляющее большинство MMP иглокожих имеют цистеиновый переключатель, аминокислотная последовательность которого мало отличается от таковой у позвоночных. Цистеин, содержащийся в нем, взаимодействует с цинком каталитического домена и инактивирует протеолитическую активность проэнзима (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990). Также для многих MMP иглокожих характерно наличие активируемого фурином мотива RX[K/R]R, который также распространен у MMP позвоночных. Наличие типичного мотива связывания цинка HEXXHXXGXXH (Nagase et al., 2006) в каталитическом домене MMP иглокожих, говорит о том, что их механизм расщепления белка аналогичен таковому MMP позвоночных. Кроме того, в некоторых MMP иглокожих обнаружены N и C -концевые трансмембранные домены, также присутствующие в MMP позвоночных (Pei, 1999; Itoh et al., 1999; Kojima et al., 2000; Galea et al., 2014). Таким образом, MMP иглокожих имеют стандартную доменную структуру, сходную со структурой MMP позвоночных, а также, вероятно, аналогичные механизмы действия (Fanjul-Fernández et al., 2010).

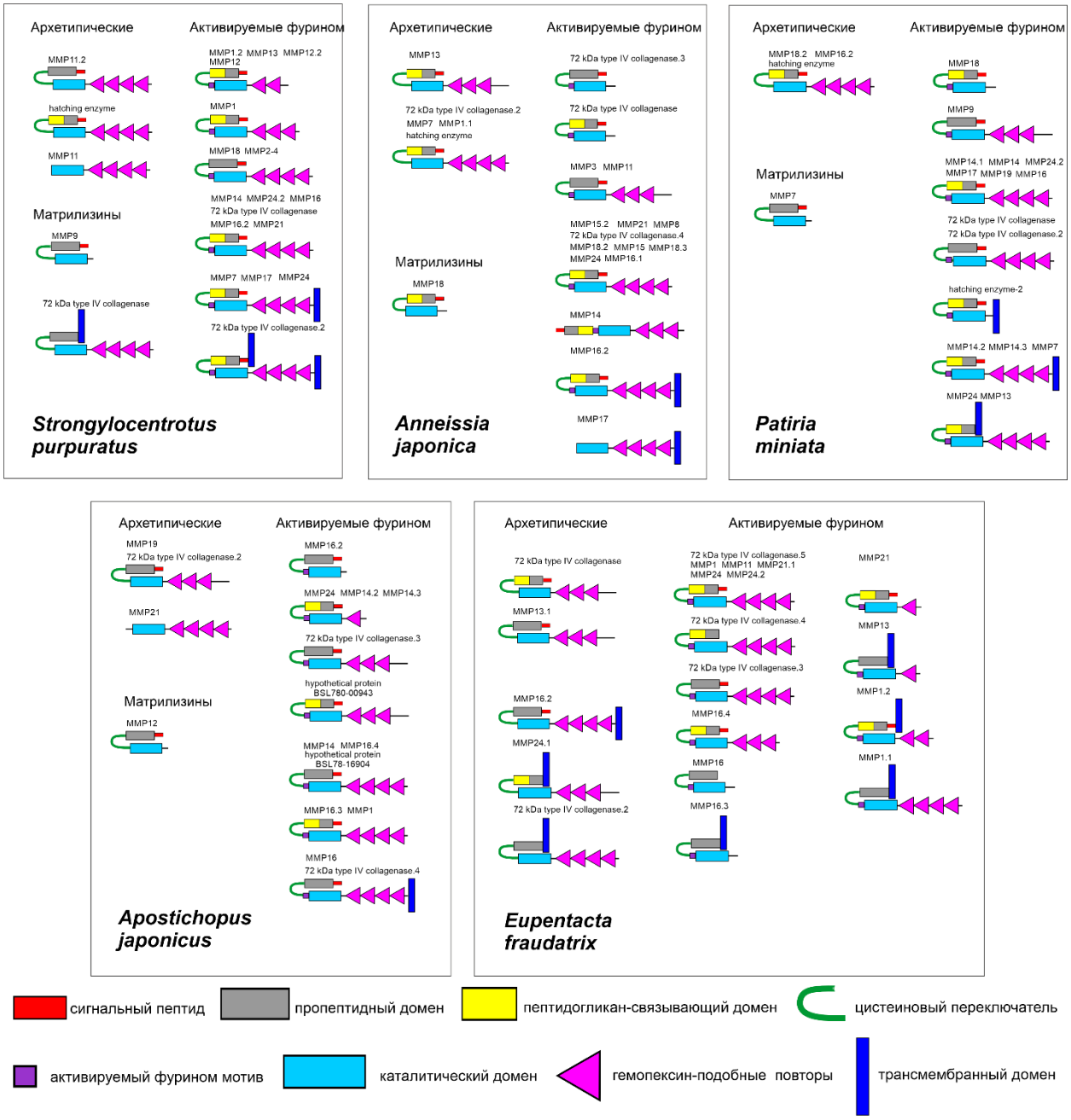

Рисунок 1. Схемы доменной структуры ММР иглокожих (по: Dolmatov et al., 2021, с изменениями).

Филогенетический анализ взаимоотношений ММР иглокожих, позвоночных и полухордовых. Несмотря на явное сходство доменной организации ММР позвоночных и иглокожих, на филогенетическом дереве большинство ММР иглокожих группируются отдельно от ММР позвоночных (Рисунок 2). Такая раздельная кластеризация, по-видимому, связана с тем, что после разделения Chordata и Ambulacraria происходила активная дупликация и дивергенция предковых генов ММР независимо в обеих группах.

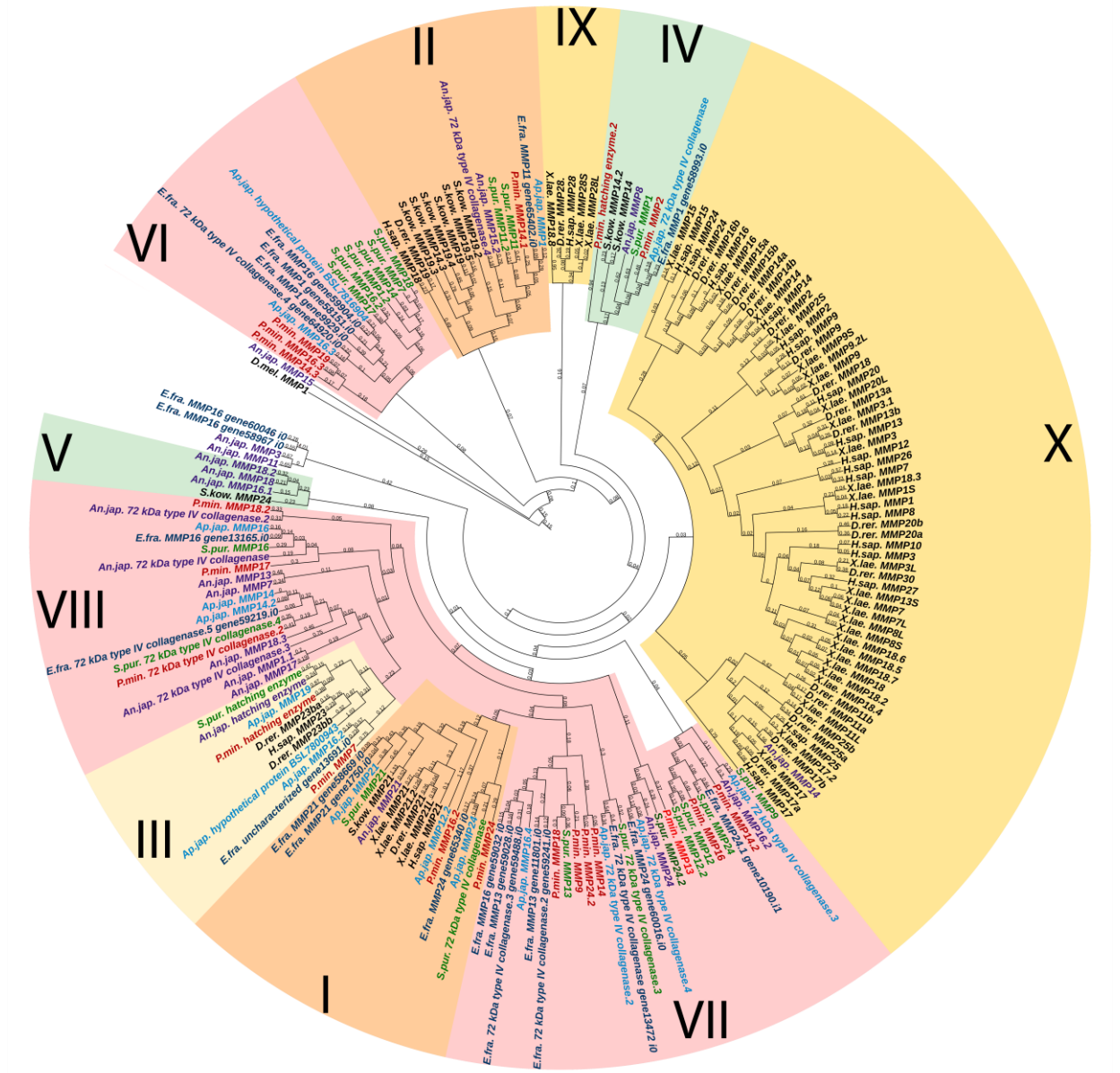

Рисунок 2. Филогенетическое дерево, показывающее взаимоотношения ММР иглокожих, позвоночных и полухордовых (по: Dolmatov et al., 2021, с изменениями). Голотурии (*A. japonicus, E. fraudatrix*) – голубой и синий цвета, соответственно; морские ежи (*S. purpuratus*) – зеленый цвет; морские звезды (*P. miniata*) – красный цвет; морские лилии (*A. japonica*) – фиолетовый цвет; позвоночные (*H. sapiens, X. laevis, D. rerio*) и полухордовые (*S. kowalevskii*) – черный цвет. Значения, указанные на ветвях, отображают их длину. An. jap. – *A. japonica,* Ap. jap. – *A. japonicus,* D. mel. – *D. melanogaster*, D. rer. – *D. rerio,* E. fra. – *E. fraudatrix*, H. sap. – *H. sapiens,* P. min. – *P. miniata,* S. kow. – *S. kowalevskii, S.* pur. – *S. purpuratus,* X. lae. – *X. laevis.*

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

Секвенирование и сборка транскриптома *de novo.* В результате сборки, фильтрации загрязняющих и некодирующих последовательностей и последующей кластеризации для идентификации изоформ было получено 82 244 изоформы транскриптов. При учете только самой

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

Анализ дифференциальной экспрессии генов. В результате анализа дифференциальной экспрессии мы обнаружили только 459 и 144 гена с заметными изменениями уровней экспрессии для образцов 10 спп и 20 спп соответственно по сравнению с интактной ПМЛ (Рисунок 3). Большая часть ДЭГ выявляется при сравнении двух стадий регенерации с интактным образцом. На первой стадии немного преобладает отрицательная регуляция (184 гена против 159), в то время как на второй стадии число генов с положительной регуляцией в 2 раза больше (43 гена против 22). Полученные данные говорят о значительной перестройке работы генома клеток во времени регенерации амбулакра у *E. fraudatrix*. С другой стороны, найденное нами число ДЭГ значительно ниже, чем при регенерации кишки у этого же вида (Boyko et al., 2020). По-видимому, такие различия объясняются особенностями морфогенезов кишки и ПМЛ. У *E. fraudatrix* при эвисцерации удаляется вся пищеварительная система и кишечная трубка формируется, фактически, *de novo,* в то время как при перерезке радиуса голотурии сохраняются все ткани поврежденных структур и основой регенерации является частичная дедифференциация оставшихся клеток. Глобальной перестройки работы генома при этом, видимо, не требуется. Во-вторых, низкое число ДЭГ связано, по нашему мнению, с особенностями гомеостаза ПМЛ. По-видимому, в неповрежденной ПМЛ *E. fraudatrix* высока интенсивность миогенеза и физиологического обновления ткани, которая сопоставима с таковой при регенерации этой структуры после повреждения. Репаративная регенерация ПМЛ является продолжением нормального миогенеза и задействует те же клеточные механизмы.

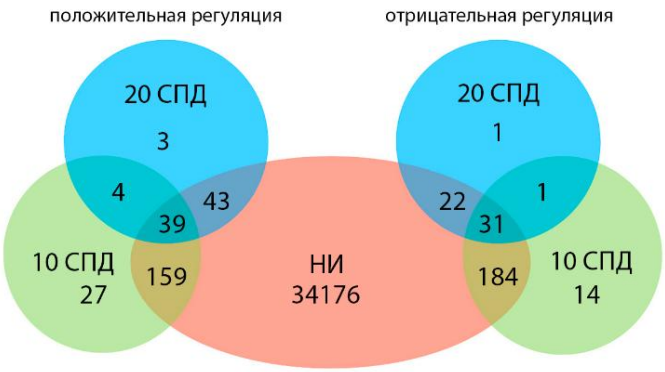

Рисунок 3 – Диаграмма Венна для ДЭГ с положительной и отрицательной регуляцией (по: Nizhnichenko et al., 2022, с изменениями). НИ – набор последовательностей с попаданием в неизбыточную базу данных NCBI.

Аннотация. При аннотации белков человека и морского ежа было идентифицировано 10 600 и 14 221 ортологов соответственно. Далее был осуществлен поиск ТФ и ММР. За них принимались

белки, обозначенные как ТФ и ММР в базах HGNC (*H. sapiens*) и Echinobase (*S. purpuratus*). Поиск гомологов ТФ морского ежа и человека привел к идентификации 174 и 926 ТФ соответственно. Из них 117 гомологов ТФ были обнаружены среди белков как человека, так и морского ежа. В результате поиска гомологов ММР морского ежа и человека у *E. fraudatrix* были идентифированы 17 и 20 ММР, соответственно. 15 гомологов ММР были обнаружены как среди белков морского ежа, так и человека.

Поиск ТФ и ММР, потенциально участвующих в регенерации ПМЛ. Среди найденных ТФ и ММР были отобраны те, у которых среднее значение LogFC больше 0,5 на первой и второй стадиях регенерации, по сравнению с нормой и значение p-value меньше 0,05. Было выявлено шесть генов ТФ, которые показывали изменение экспрессии на одной или обеих стадиях регенерации (Рисунок 4).

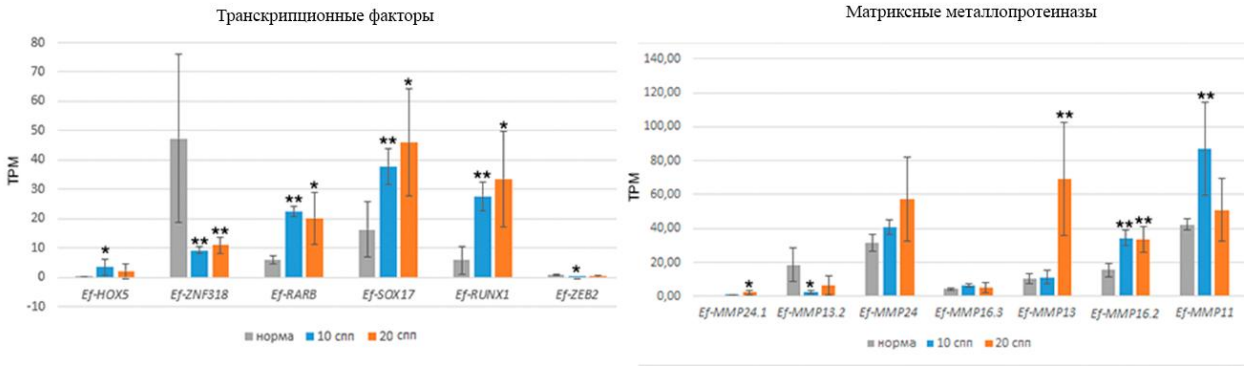

Рисунок 4 – Значения TPM (transcript per million) ДЭГ ТФ и MMG при регенерации ПМЛ (по: Nizhnichenko et al., 2022, с изменениями). * - значение p <0.05, при сравнении стадии регенерации с нормой. ** - значение p <0.01, при сравнении стадии регенерации с нормой.

Выявленные гены кодируют белки, которые относятся к 5 классам ТФ: факторы с гомеодоменом (Ef-HOX5, Ef-ZEB), ядерные рецепторы с цинковыми пальцами C4 (Ef-RARB), факторы с доменом runt (Ef-RUNX1), факторы с доменом high-mobility group (Ef-SOX17), факторы с цинковыми пальцами C2H2 (Ef-ZNF 318). Семь генов ММР из двадцати обнаруженных показали значительное изменение экспрессии на одной или обеих стадиях регенерации ПМЛ (Рисунок 4).

Сеть сверхпредставленных биологических процессов и путей. Путем построения сети были получены 570 биологических процессов и путей, объединяющих 5199 гомологов белков человека. Мы не можем буквально интерпретировать процессы, отраженные в сети, поскольку основу онтологии генов составляют процессы, описанные у человека и других млекопитающих. Тем не менее, набор блоков сети достаточно хорошо согласуется с процессами, происходящими при регенерации амбулакра. Помимо ПМЛ были повреждены и другие его структуры, такие как амбулакральный канал, радиальный нервный тяж и стенка тела. Блоки, связанные с регенерацией этих структур, четко проявляются в реконструированной сети. Сеть содержит семь блоков тесно

взаимосвязанных узлов, отражающих биологические процессы и пути (Таблица 2). Почти все процессы, за несколькими исключениями, активны во время регенерации ПМЛ.

Каждый из блоков карты биологических процессов содержит ортологи выявленных дифференциально экспрессирующихся генов ТФ и ММР, за исключением блока 1, в котором ММР отсутствуют. Их предположительные функции с точки зрения карты биологических процессов и путей описаны в разделе «Анализ временно́й и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов».

В контексте изучения миогенеза интересен Блок 3, который содержит термины GO, связанные с морфогенезом структур сократительной системы. Большинство процессов в нем имеют отрицательную регуляцию. Вероятно, это можно объяснить высоким уровнем обновления мышечной ткани в норме. В случае повреждения эти процессы либо замедляются, либо прекращаются. Наличие Ef-RUNX1 и Ef-RARB в блоке процессов, связанных с развитием сократительной системы, подтверждает их участие в регенерации ПМЛ.

Таблица 2 – Блоки сети сверхпредставленных биологических процессов и путей

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

3.4. Анализ временно́й и пространственной динамики экспрессии генов-кандидатов

Мы показали, что данные, полученные РНК-секвенированем и кПЦР (Рисунок 5), имеют среднюю корреляцию, что говорит о расхождениях в количественной оценке уровней экспрессии этими двумя методами. В то же время, уровни корреляций повторов внутри каждого из методов оценки - выше. Различные гены могут отличаться вариабельностью экспрессии и, соответственно влиять на общую картину корреляции. Так, *Ef-HOX5* и *Ef-ZEB2* имеют отрицательную корреляцию между оценками разными методами и сильно влияют на общий коэффициент. Видимо это вызвано низким числом транскриптов этих генов. Уровень корреляций количественных оценок РНК-секвенирования и кПЦР по остальным изученным генам средний или выше среднего.

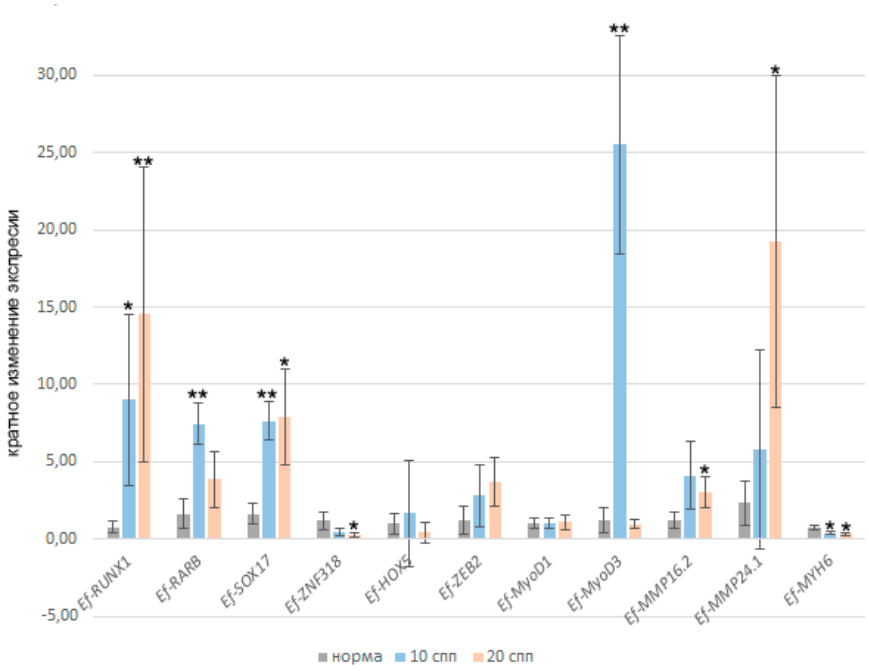

Рисунок 5 – Полученные методом кПЦР значения оценки экспрессии генов ТФ, ММР и мышечного миозина через 10 и 20 спп. * - значение p <0.05, при сравнении стадии регенерации с нормой. ** - значение p <0.01, при сравнении стадии регенерации с нормой.

По данным SISH транскрипты *Ef-HOX5* в ПМЛ наблюдаются через 10 спп (Рисунок 6). В ходе регенерации в мышцу погружаются дедифференцированные клетки целомического эпителия для последующей миогенной трансформации. На клетках мышей было показано, что при повышении экспрессии этого гена ингибируется дедифференциация гладкомышечных клеток в синтетический фенотип, который отвечает за накопление межклеточного вещества в бляшке при атеросклерозе (Jing et al., 2021). В наших экспериментах тоже прослеживается связь *Ef-HOX5* с процессами в соединительной ткани. Согласно карте биологических процессов данный ТФ функционирует только в блоке 7, который связан с ее развитием. Процессы, связанные с преобразованием соединительной ткани, играют ключевую роль в восстановлении ПМЛ у голотурий (Долматов, Машанов, 2007). Спустя 10 спп после повреждения амбулакра, на концах поврежденной мышцы происходит

накопление ВКМ и появление соединительнотканных зачатков, которые начинают рост во встречном направлении. С учетов вышесказанного, вероятно, *Ef-HOX5* участвует в регуляции дифференциации погружающихся в соединительную ткань клеток, а также синтеза молекул ВКМ.

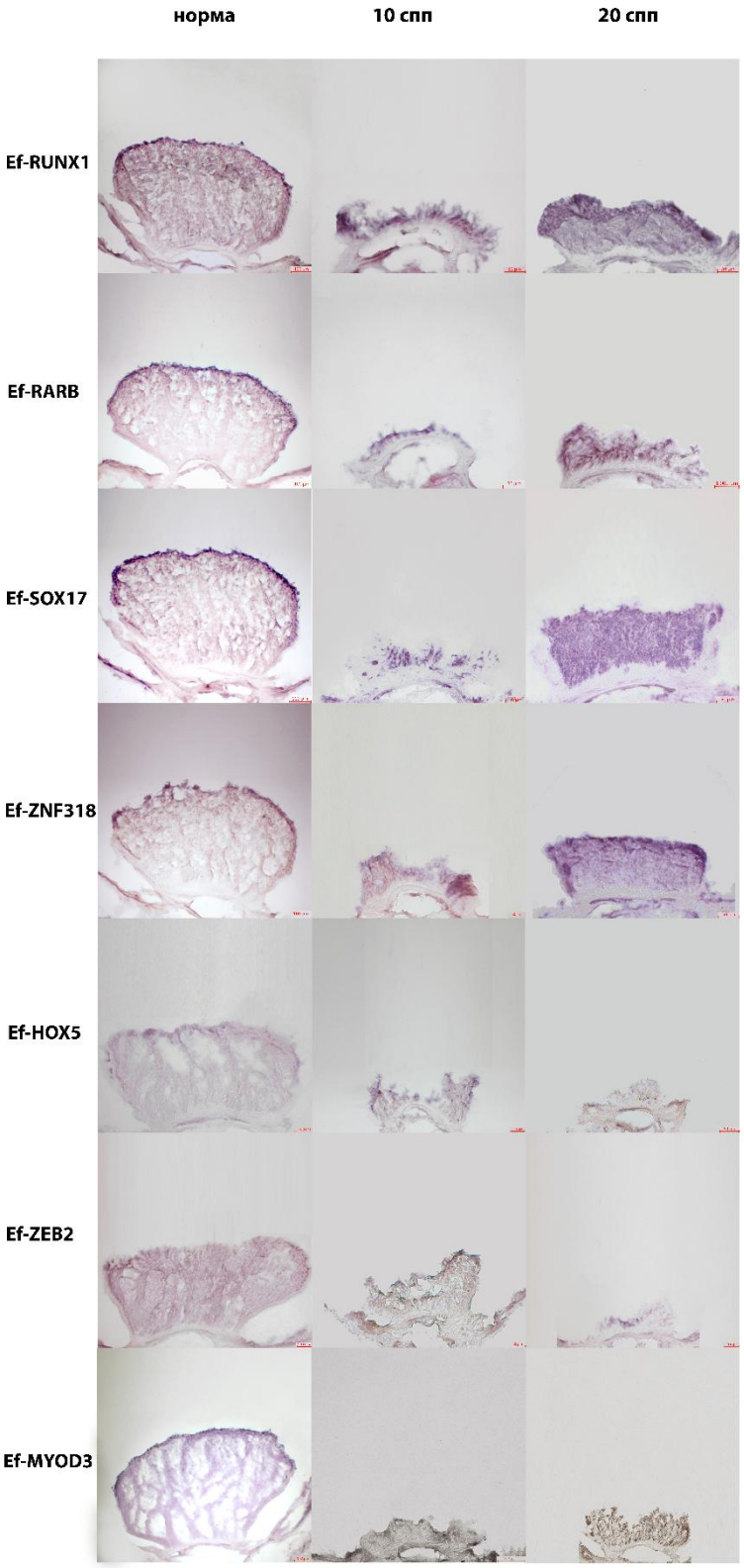

Рисунок 6 – Локализация транскриптов генов транскрипционных факторов в регенерирующей ПМЛ.

Транскрипты *Ef-ZEB2* наблюдаются на краю ПМЛ (Рисунок 6). Известно, что два ортолога *Ef-ZEB2* позвоночных выполняют противоположные функции: *ZEB1* является ингибитором дифференциации мышц (Postigo, Dean, 1997) а *ZEB2*, наоборот, способствует дифференциации (Di Filippo et al., 2020). Таким образом, мы предполагаем, *Ef-ZEB2* может быть вовлечен в процесс миогенной трансформации дедифференцированных клеток целомического эпителия при их погружении в соединительнотканный зачаток.

Экспрессия гена *Ef-RARB* через 10 спп превышает значение нормы, а его транскрипты обнаружены в ПМЛ, что указывает на связь с регенерацией мышцы (Рисунок 5, Рисунок 6). Более того, на карте биологических процессов *RARB* присутствует в блоке миогенеза и ассоциирован с процессом дифференциации мышечных клеток. У голотурии *H. glaberrima* его гомолог участвует в дедифференциации миоэпителиальных клеток (Viera-Vera, García-Arrarás, 2019). Однако эксперименты на клеточных линиях мышей показали, что ретиноевый сигналинг через сходный белок RARA запускает процесс миогенной дифференциации в миобластах (Zhu et al., 2009). Таким образом, можно предположить, что *Ef-RARB* принимает активное участие в регенерации ПМЛ и может выполнять противоположные функции: обеспечивать как дедифференциацию миоэпителиальных клеток, так и регулировать процесс миогенной трансформации дедифференцированных клеток. Судя по карте биологических процессов *Ef-RARB,* кроме миогенеза, также вовлечен в ряд других процессов. *RARB* присутствует в узлах блока 7, связанных с развитием соединительной ткани. Ретиноевая кислота способна влиять на экспрессию целого ряда белков ВКМ, включая коллагены, ламинины и протеогликаны (Fernández et al., 2014). Возможно, *Ef-RARB* может регулировать и перестройку соединительной ткани при регенерации ПМЛ.

Ef-RUNX1 имеет высокие показатели изменения экспрессии относительно нормы на протяжении всего процесса восстановления (Рисунок 5). У позвоночных RUNX1 активно участвует в регенерации мышц при повреждении (Bao et al., 2018), а у морского ежа *S. purpuratus* RUNX1 контролирует пролиферацию, выживание и дифференциацию клеток на эмбриональной и личиночной стадиях развития (Coffman et al., 2004). Метод SISH показывает наличие транскриптов *Ef-RUNX1* как в интактной, так и регенерирующей ПМЛ, что указывает на его возможную роль в миогенной дифференциации клеток целомического эпителия (Рисунок 6). Это предположение согласуется с данными анализа сверхпредставленности биологических процессов: ортолог *RUNX1* присутствует в узлах, связанных с развитием сердечных мышц. Наличие экспрессии *Ef-RUNX1* только во внешней части ПМЛ говорит о том, что этот ген может быть вовлечен в механизмы переключения эпителиального фенотипа на мышечный на ранних этапах миогенной дифференциации.

Данный ген обнаруживается и в других блоках на карте биологических процессов. Большой интерес представляет его присутствие в положительно регулируемых узлах блока 2, связанных с активацией ММР, катаболизма коллагена и разрушением ВКМ. Известно, что RUNX1 способен при патологиях влиять на уровень фиброза, а в норме участвовать в развитии и гомеостазе

соединительной ткани. Судя по всему, *Ef-RUNX1*, как и *Ef-RARB* может быть вовлечен в ремоделирование соединительной ткани в ходе восстановления ПМЛ.

При регенерации в ПМЛ отмечается наличие транскриптов *Ef-SOX17* (Рисунок 6). *SOX17,* ортолог *Ef-SOX17* у позвоночных, во время регенерации мышц влияет на самообновление и ингибирует дифференциацию миосателлитных клеток (Alonso-Martin et al., 2018). У *E. fraudatrix Ef-SOX17* экспрессируется в дедифференцированных клетках целомического эпителия регенерирующего кишечника (Dolmatov et al., 2021). Транскрипты *Ef-SOX17* локализованы в целомическом эпителии поверхности ПМЛ и внутри нее в норме и при регенерации, а также в целомическом эпителии интеррадиусов в норме. Мы предполагаем, что *Ef-SOX17* активно вовлечен в регенерацию ПМЛ и, возможно, необходим для поддержания клеток целомического эпителия в дедифференцированном состоянии, с целью защиты от преждевременной дифференциации во время их погружения в соединительнотканный зачаток ПМЛ.

Ef-ZNF318 является ортологом *ZNF318* позвоночных. Информация о функциях этого гена отсутствует. Это объясняет почему *ZNF318* не обнаруживается ни в одном из узлов карты биологических процессов. Однако факт его локализации в ПМЛ указывает на участие в восстановлении этой структуры у *E. fraudatrix*.

Также мы показали различия в экспрессии генов семейства MRF у *E. fraudatrix*. При регенерации мышц экспрессия *Ef-MYOD3* увеличивается значительно, в то время как число транскриптов *Ef-MYOD1* не меняется (Рисунок 5). Это может указывать на особую роль *Ef-MYOD3* в регенерации ПМЛ, а также на различия в миогенезе у позвоночных и иглокожих. Сложно говорить о конкретных функциях данного гена, поскольку он не имеет ортологов за пределами типа Echinodermata. По данным SISH, транскрипты *Ef-MYOD3* локализованы на поверхности интактной и регенерирующей ПМЛ и показывают повышенную активность через 10 спп (Рисунок 6). Вероятно, *Ef-MYOD3* является одним из регуляторов миогенеза у *E. fraudatrix*.

Ортологи ММР человека для шести из семи ММР *E. fraudatrix*, экспрессия которых меняется после повреждения, находятся в блоке процессов ВКМ. Это ожидаемо, поскольку ММР в основном участвуют в реорганизации соединительной ткани. Для *Ef-MMP16.2* и *Ef-MMP24.1* была произведена оценка пространственно-временной экспрессии, результаты которой подтверждают предположение о вовлеченности данных протеаз в регенерацию (Рисунок 5, Рисунок 7).

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

большинства генов, связанных с миогенезом не увеличивается в ходе регенерации, потому что в норме в продольной мышце *E. fraudatrix* и так идет интенсивный миогенез.

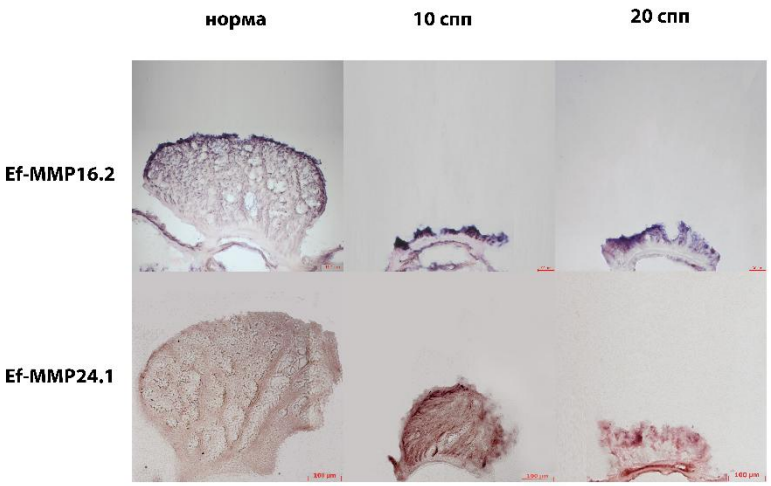

Рисунок 7 – Локализация транскриптов генов ММР в регенерирующей ПМЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Анализ данных РНК-секвенирования регенерирующих ПМЛ у *E. fraudatrix* позволил установить семь генов ТФ и ММР, потенциально связанных с миогенезом. Это *Ef-HOX5, Ef-ZNF318, Ef-RARB, Ef-SOX17, Ef-RUNX1, Ef-ZEB2, Ef-MYOD3,* а также *Ef-MMP24.1, Ef-MMP16.2*. Полученные результаты коррелируют с данными SISH по локализации транскриптов этих генов в ПМЛ. Были выдвинуты предположения о роли ряда генов в восстановлении ПМЛ у *E. fraudatrix*. Так, вероятно, *Ef-SOX17* защищает клетки целомического эпителия от преждевременной дифференциации во время их погружения в соединительнотканный зачаток, а *Ef-RUNX1,* наоборот, отвечает за дифференциацию клеток целомического эпителия в миоциты; *Ef-RARB* может участвовать как в дифференциации, так и в дедифференциации; *Ef-MMP16.2,* возможно, обеспечивает процесс погружения клеток целомического эпителия в соединительную ткань за счет разрушения ВКМ. Сложно предполагать конкретные роли в миогенезе ПМЛ для *Ef-ZNF318* и *Ef-MYOD3* ввиду того, что функции первого не изучались, а второй не имеет ортологов среди других животных. Однако, очень интересно, что по данным кПЦР и SISH, именно *Ef-MYOD3*, но не *Ef-MYOD1* в ходе регенерации показывает изменение уровня экспрессии и локализации в транскриптов в ПМЛ. Такая разница не просто говорит о потенциальном участии этого гена в регуляции процесса восстановления ПМЛ у *E. fraudatrix*, но также указывает на различия в миогенезе у позвоночных и иглокожих. Это предположение находит отражение в результатах анализа сети сверхпредставленных биологических процессов и путей, в которой большинство узлов, ассоциированных с миогенезом позвоночных, регулируется отрицательно. С другой стороны, отсутствие увеличения активности мышечных процессов в сети может объясняться интенсивным миогенезом в интактной ПМЛ (а уменьшение – гибелью миоцитов в результате некроза после повреждения). Репаративная регенерация ПМЛ является продолжением нормального миогенеза и задействует те же клеточные механизмы. Весьма показательно, что в случае

эвисцерации кишки у *E. fraudatrix,* когда удаляются все ткани энтодермального происхождения и происходит трансдифференциация мезодермальных клеток, восстановление сопровождается более интенсивными перестройками работы генома. Дополнительно, наглядное подтверждение идеи активного миогенеза в норме мы получили методом SISH, который показал, что большинство изученных нами генов экспрессируется в целомическом эпителии интактной ПМЛ и под ним.

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

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Nizhnichenko V.A., Boyko A.V., Ginanova T.T., Dolmatov I.Y. Muscle regeneration in holothurians without the upregulation of muscle genes // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, № 24. Article No. 16037. https://doi.org/10.3390/ijms232416037

2. Нижниченко В.А., Долматов И.Ю. Ортологи генов семейства миогенных регуляторных факторов (MRF) и их возможные функции *у* иглокожих // Биология моря. 2022. Т. 48, № 3. С. 201–211.

3. Dolmatov I.Y., Nizhnichenko V.A., Dolmatova L.S. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in echinoderms: structure and possible functions // Cells. 2021. Vol. 10, № 9. Article No. 2331. https://doi.org/10.3390/cells10092331

Работы, опубликованные в материалах региональных и международных научных конференций:

1. Нижниченко В.А., Бойко А.В., Долматов И.Ю. Поиск потенциальных генетических регуляторов регенерации продольной мышечной ленты у голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov, Baranova & sSvel'eva, 1958) // Третья Всероссийская конференция по иглокожим «От прошлого к настоящему» посвященная памяти А.Н. Соловьёва и Ю.А. Арендта. Сборник тезисов. Москва: Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, 2023. С. 50.

2. Нижниченко В.А., Бойко А.В. Поиск и изучение локализации экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих регенерацию продольной мышечной ленты у голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov, Baranova & Savel'eva, 1958) // Всероссийская конференция «Морская биология в 21 веке: биология развития, молекулярная и клеточная биология, биотехнология морских организмов» (памяти академика Владимира Леонидовича Касьянова). Сборник тезисов. Владивосток: ННЦМБ ДВО РАН, 2023. С. 20.

Нижниченко Владимир Анатольевич

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

1.5.23. Биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук