

УДК 577.218:591.16:593.96

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ И БЕСПОЛОМ РАЗМНОЖЕНИИ У ГОЛОТУРИЙ

А.С. Гирич¹, И.Ю. Долматов^{1,2}¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),² Дальневосточный федеральный университет (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)**Ключевые слова:** гены WNT, сигнальные пути, морфогенез, иглокожие.

GENES EXPRESSION OF WNT SIGNALING PATHWAY DURING REGENERATIVE PROCESS AND ASEQUAL REPRODUCTION IN HOLOTHURIANS

A.S. Girich¹, I.Yu. Dolmatov^{1,2}¹ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy, FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation),² Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Background. Wnt proteins are the key factors in many morphogenetic processes including the regenerative process. Mammals compared with invertebrates are definitely limited in the ability to regenerate the damaged organs although they have the same conservative molecules of Wnt signaling pathways. To activate regenerative process using Wnt proteins it is essential to study the recovery process in model organisms - echinoderms.

Methods. Holothurians were taken from Peter the Great Bay, Sea of Japan as well as from the Gulf of Nha Trang, South China Sea. Evisceration of the holothurians *Eupentacta fraudatrix* was induced by the injection of distilled water into the coelomic cavity. On the 3rd, 5th and 7th day after evisceration the aqua pharyngeal complex rudiments and anterior area of recovering intestine were prosected. Holothurian *Cladolabes schmeltzii* was dissected in the middle part of the body into two fragments. The recovering intestine was prosected on the 14th and 24th day. In addition there were also the organisms engaged in the process of asexual reproduction (for the gene activity analysis the tissues from the fission spot have been studied). With the sequencing of the transcripts in holothurians the presence of genes WNT1, WNT2, WNT4, WNT6, WNT7, WNT9, WNT10, WNT16 has been determined during regenerative process and asexual reproduction.

Results. In *E. fraudatrix* the genes expression WNT4, WNT6 occurred only at the late phases of regenerative process. In *C. schmeltzii* WNT2, WNT10, WNT16 activated at the early phases of recovery, WNT1, WNT2, WNT3, WNT4 and WNT7 – at the late phases. With asexual reproduction of *C. schmeltzii* the transcripts WNT1, WNT2, WNT4, WNT7, WNT10 have been revealed. The other members of Wnt signaling pathway have also been found: β -catenin, frizzled, dishevelled.

Conclusions. The differences in the spectrum of Wnt signaling molecules in various species of holothurians obviously reflect different morphogenesis mechanisms in their anterior and back body structures. Identified WNT genes sequences have only 45–67% of the similarity level with homologous genes of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*, which is explained by a large evolutionary gap between the sea urchins and holothurians. Perhaps in the studied processes WNT genes make a concentration gradient, thereby determining the organs' rudiment areas or they directly control the regenerative process, making the cells to migrate and form the organs.

Keywords: WNT genes, signaling pathways, morphogenesis, echinoderms.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 1, p. 31–33.

Основными активаторами молекулярных процессов в клетках являются сигнальные молекулы, запускающие цепь внутриклеточных реакций и активирующие целевые гены. Примером таких сигнальных молекул

могут служить белки семейства Wnt, которые участвуют в регуляции многих биологических процессов: формировании оси тела в эмбриогенезе, развитии ряда органов, регенерации и канцерогенезе.

Существуют три различных сигнальных пути, которые активируют белки Wnt: канонический (передача сигнала в ядро с помощью β -catenin), неканонический (без участия β -catenin), а также Wnt/ Ca^{2+} -путь (изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+}).

Сигнальный путь Wnt играет важную роль в различных морфогенезах. В эмбриогенезе млекопитающих, как и других позвоночных, гены WNT участвуют в формировании переднезадней оси тела [7]. Также белки Wnt способны активировать миграцию опухолевых клеток, тем самым приводя к образованию метастазов [15]. У взрослых животных лиганды Wnt присутствуют при регенерации кожного эпителия, регенерации сетчатки глаза, а также кончиков пальцев [5, 12, 14].

Регенеративные способности млекопитающих несравнимы с таковыми беспозвоночных, которые могут восстанавливать не только отдельные ткани и части органов, но и даже все тело из небольшого фрагмента. Все компоненты сигнальных путей Wnt представлены консервативными белками, которые присутствуют у большинства Metazoa – от гидры до человека, поэтому предпринимались попытки запустить Wnt-сигналинг с целью активации регенерации у различных животных [8].

Удобными модельными объектами для изучения различных аспектов регенерации являются голотурии. Это класс морских беспозвоночных, относящийся к типу иглокожих. Голотурии способны в ответ на внешние раздражители эвисцерировать (выбрасывать) внутренние органы и затем полностью их восстанавливать [1, 12]. Также эти животные могут восстанавливать утраченную часть тела после поперечного разрезания. При этом полностью регенерируют органы пищеварительной, нервной и дыхательной систем. У некоторых видов голотурий имеется бесполое размножение в виде поперечного деления [2, 3].

Разные виды голотурий обладают различным восстановительным потенциалом. В частности, голотурия *Eupentacta fraudatrix* из семейства Sclerodactylidae, обитающая в Японском море, может эвисцерировать передний комплекс органов – аквафарингеальный комплекс (АК), в состав которого входят щупальца, нервное кольцо и ряд других структур. Кроме АК при эвисцерации удаляется вся пищеварительная система и часть гонад [1]. Закладка основных структур АК и кишки

Долматов Игорь Юрьевич – д-р биол. наук, заведующий лабораторией сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН; тел.: +7 (423) 231-11-78; e-mail: idolmatov@mail.ru

при регенерации происходит в течение 7 суток после повреждения. Однако при поперечном разрезании особей *E. fraudatrix* выживает и восстанавливает утраченные части только задний фрагмент, передний погибает. Другой вид голотурий из того же семейства, *Cladolabes schmeltzii*, способен к бесполому размножению, но не может эвисцерировать АК [2, 3]. В то же время *C. schmeltzii* хорошо восстанавливает не только передние, но и задние структуры после поперечного разрезания.

К настоящему времени у иглокожих обнаружено 11 генов *WNT*, при этом большинство исследований были проведены на морских ежах *Strongylocentrotus purpuratus* и *Paracentrotus lividus* и морской звезде *Patiria miniata*. В единственном исследовании *Wnt*-сигналинга у голотурий был определен ген *WNT16*, а также, обнаружено, что ген *WNT9* участвует в регенерации у *Holothuria glaberrima* [9]. В этой связи интересно сравнить участие генов *WNT* в различных процессах регенерации у *E. fraudatrix* и *C. schmeltzii*. Также, кроме основного лиганда *Wnt*, мы анализировали и его рецепторы *Frizzled*, а также другие внутриклеточные белки, участвующие в передаче сигнала – β -catenin и *dishevelled*.

Материал и методы. Голотурий *E. fraudatrix* собирали в заливе Петра Великого Японского моря и помещали в аквариумы с аэрируемой морской водой. Эвисцерацию вызывали инъекцией в целомическую полость дистиллированной воды. На 3-и, 5-е и 7-е сутки после эвисцерации препарировали зачатки АК и передние отделы регенерирующей кишки.

Голотурий *C. schmeltzii* собирали в заливе Нячанг Южно-Китайского моря. Животных разрезали в средней части тела на два фрагмента. Исследования проводились на особях, восстанавливающих задний конец. Для этого препарировали регенерирующую кишку на 14-е и 24-е сутки после поперечного разрезания. Кроме того, были взяты животные, находившиеся в процессе бесполого размножения. У них для анализа активности генов исследованы ткани из места деления.

Материал хранили в RNAlater solution (Ambion) при -20°C . С помощью фенол-хлороформенной экстракции с TRI reagent (MRC) по стандартной методике выделяли тотальную РНК, которую хранили при -70°C . В работе использовали центрифугу Eppendorf centrifuge 5417R (Eppendorf). Концентрацию РНК определяли на Smart Spec Plus Spectrophotometer (BioRad).

ЗАО «Евроген» проводился синтез двухцепочной кДНК и секвенирование транскриптома зачатков АК голотурий *E. fraudatrix*, а также регенерирующей кишки и места поперечного деления *C. schmeltzii*. Использовался секвенатор Illumina HiSeq (Illumina). Результаты анализировали с помощью ресурсов www.ncbi.nlm.nih.gov и программ Blast, Mega 4, Mega 5 и Gene Runner.

Результаты исследования. Секвенированные транскриптомы зачатков АК *E. fraudatrix* разных стадий регенерации содержали приблизительно 2 млн нуклеотидных последовательностей, средняя длина – 150 нуклеотидов. Транскриптомы *C. schmeltzii* содержали 1,7 млн последовательностей средней длиной 360 нуклеотидов.

Анализ транскриптомов *E. fraudatrix* показал, что экспрессия генов сигнального пути *Wnt* зависела от стадии регенерации. Продукты генов семейства *WNT* обнаруживались только на 5-е и 7-е сутки. Всего была идентифицирована 21 последовательность. Все они были гомологичны генам *WNT4* и *WNT6* морского ежа *S. purpuratus*. Транскрипты гена *WNT4* обнаружались на 5-е и 7-е сутки, транскрипты гена *WNT6* – только на 5-е сутки. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что гены *WNT4* и *WNT6* *E. fraudatrix* имеют только 45–55%-ную гомологию с соответствующими генами *S. purpuratus*.

На всех стадиях регенерации обнаружены транскрипты генов *dishevelled* и *frizzled*. Активность гена β -catenin наблюдалась лишь на ранних этапах процесса (3-и и 5-е сутки). У *C. schmeltzii* обнаружено 28 последовательностей, гомологичных генам семейства *WNT*. В процессе поперечного деления экспрессировались гены *WNT1*, *WNT2*, *WNT4* и *WNT7*. Они имели 54–57%-ное сходство с гомологичными генами *S. purpuratus*. На ранней стадии регенерации задних структур (14-е сутки после разрезания), в период формирования зачатка кишки активировались гены *WNT2*, *WNT10* и *WNT16*. Они также имели достаточно низкую гомологию с соответствующими генами морских ежей.

В период роста кишки (24-е сутки) отмечена наибольшая активность генов семейства *WNT*. На этой стадии в зачатках были выявлены транскрипты *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT4*, *WNT6* и *WNT7*. Как и остальные гены *WNT* голотурий, транскрипты генов *WNT3*, *WNT4* и *WNT6* имели 50–67%-ную гомологию с соответствующими генами *S. purpuratus*. Транскрипты β -catenin обнаружены на поздних этапах регенерации и при делении, *dishevelled* – только на поздних сроках регенерации. Гены рецептора *frizzled* экспрессировались на всем протяжении регенерации, а также при делении.

Обсуждение полученных данных. Ранее у голотурий были найдены транскрипты только одного гена семейства *WNT* – *WNT9* [10, 13]. Нами были впервые идентифицированы гены *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT4*, *WNT6* и *WNT10*. Кроме того, выявлено, что эти гены принимают участие не только в регенерации после различных повреждений, но и в бесполом размножении.

Сравнительный анализ разных систем регенерации показал, что имеется различие в спектре сигнальных молекул *Wnt* у данных видов голотурий. Эти различия, очевидно, отражают разные механизмы морфогенеза передних и задних структур. У *E. fraudatrix* восстановление АК и передних отделов кишки регулируется только двумя генами – *WNT4* и *WNT6*. У *C. schmeltzii* при регенерации задних отделов кишки экспрессируются *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT4*, *WNT6*, *WNT7*, *WNT10* и *WNT16*.

Экспрессия генов *WNT* определяется стадией регенерации. Одни гены (*WNT10*, *WNT16*) экспрессируются лишь на ранних, другие (*WNT1*, *WNT3*, *WNT4*, *WNT6*, *WNT7*) на поздних стадиях процесса, третьи (*WNT2*) выявляются в течение всей регенерации. Возможно, причиной такой дифференциальной экспрессии является различие в механизмах морфогенеза.

Выявлено, что транскрипты генов *WNT* участвуют в процессе бесполого размножения у *C. schmeltzii*. В него вовлечены гены *WNT1*, *WNT2*, *WNT4* и *WNT7*. При этом соответствующие белки Wnt активируют как канонический, так и неканонический пути передачи сигнала, в то время как при бесполом размножении гидры выявлено участие лишь канонического сигнального пути Wnt [6, 10]. Большое число генов *WNT*, участвующих в регенерации *C. schmeltzii*, возможно связано с тем, что у данного вида происходит формирование части тела. Белки Wnt создают градиент, определяющий переднезаднюю ось и регионализацию восстанавливающейся задней части тела, как это происходит в эмбриогенезе [4]. Все гены *WNT*, выявленные при бесполом размножении *C. schmeltzii*, присутствуют и при ее регенерации после поперечного разрезания. Это, возможно, означает, что подготовка к восстановлению начинается задолго до повреждения, еще в процессе деления особи.

Идентифицированные последовательности генов имеют лишь 45–67%-ный уровень сходства с гомологичными генами *S. purpuratus*, что объясняется большой эволюционной дистанцией между морскими ежами и голотуриями. Из этого следует, что для определения какого-либо гена у голотурий необходимы методы комплексного исследования экспрессии генов или анализа последовательности ДНК [13], так как подобранные на основе животных из других классов (морские ежи, офиуры) праймеры, с большой вероятностью не будут работать на голотуриях.

Динамика экспрессии других компонентов сигнального пути Wnt (β -catenin, dishevelled, frizzled) также меняется в зависимости от процесса и стадии регенерации. Это указывает на сложность регуляции морфогенеза. По имеющимся данным, механизм действия Wnt определяется сочетанием лиганда, рецептора, корецептора а также других факторов [4].

Благодарности. Авторы выражают благодарность директору Института океанографии ВАНТ Буи Хон Лонгу и сотрудникам Департамента живых биоресурсов за возможность работать в ИО ВАНТ, а также Т.Н. Даутовой и М.П. Исаевой за помощь в работе. Исследование выполнено при поддержке грантов Правительства России (№ 11.G34.31.0010), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-00239) и Президиума ДВО РАН (№14-III-B-06-067).

References:

1. Dolmatov I.Yu., Mashanov V.S. Regeneration in sea cucumbers. Vladivostok: Dalnauka. 2007. 212 p.
2. Dolmatov I.Yu., Nguyen An Khan, Kamenev Ya.I. Features of asexual reproduction, evisceration and regeneration in sea cucumbers (Holotheuroidea) from Nha Trang Bay of South China Sea // Marine Biology. 2012. Vol. 38, No. 3. P. 227–236.
3. Kamenev Ya.I. Ultrastructure of the internal organs, asexual reproduction and regeneration in the holothurian *Cladolabes schmeltzii*: abstract of dis. by cand. biol. sciences. Vladivostok, 2013. 24 p.
4. Kulikova K.V., Kibardin A.V., Gnuchev N.V. [et al.]. Signal Wnt pathway and its importance for the development of melanoma // Modern medical technologies. 2012. Vol. 3. P. 107–112.
5. Fathke C., Wilson L., Shah K. et al. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing // BMC Cell Biol. 2006. Vol. 7, No. 4. URL% <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388211> (application date: 10.12.2013).

6. Flatt T., Heyland A. Mechanisms of life history evolution. Oxford university press, 2011. 478 p.
7. Fu J., Jiang M., Mirando A.J., Yu H.M., Hsu W. Reciprocal regulation of Wnt and Gpr177/mouse Wntless is required for embryonic axis formation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. Vol. 106, No. 44. P. 18598–18603.
8. Kawakami Y., Esteban C.R., Raya M. [et al.]. Wnt/betacatenin signaling regulates vertebrate limb regeneration // Genes & Development. 2006. Vol. 20. P. 3232–3237.
9. Mashanov V.S., Zueva O.R., Garcia-Ararras E.J. Expression of Wnt9, TCTP, and Bmp1/Tll in sea cucumber visceral regeneration // Gene Expression Patterns. 2012. Vol. 12, No. 1–2. P. 24–35.
10. Millera M.F., Cohenb E.D., Baggs J.E. [et al.]. Wnt ligands signal in a cooperative manner to promote foregut organogenesis // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2012. Vol. 109, No. 38. P. 15348–15353.
11. Ortiz-Pineda P.A., Ramírez-Gómez F., Pérez-Ortiz J. [et al.]. Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber // BMC Genomics. 2009. Vol. 10. 262 p.
12. Singhl R., MacDonald B.A., Thomas M.L., Lawton P. Patterns of seasonal and tidal feeding activity in the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holotheuroidea) in the Bay of Fundy, Canada // Marine ecology progress series. 1999. Vol. 187. P. 133–145.
13. Sodergreen E., Weinstock G.M., Davidson E.H. [et al.]. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Science. 2006. Vol. 314, No. 5801. P. 941–952.
14. Takeo M., Chou W.C., Sun Q. [et al.]. Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration // Nature. 2013. Vol. 499. P. 228–232.
15. Wu B., Crampton S.P., Hughes C.C. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration // Immunity. 2007. Vol. 26. P. 227–239.

Received 2013.12.12.

Экспрессия генов сигнального пути Wnt при регенерации и бесполом размножении у голотурий

А.С. Гирич¹ И.Ю. Долматов^{1,2}

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), ² Дальневосточный федеральный университет (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

Резюме. Белки Wnt являются ключевыми факторами многих морфогенетических процессов, в том числе и регенерации. Млекопитающие в сравнении с беспозвоночными сильно ограничены в способности восстанавливать поврежденные органы, хотя и имеют одни и те же консервативные молекулы сигнальных путей Wnt. Для того, чтобы активировать регенерацию с помощью белков Wnt, необходимо изучить процесс восстановления на модельных организмах – иглокожих. С помощью метода секвенирования транскриптомов, определено наличие генов *WNT1*, *WNT2*, *WNT4*, *WNT6*, *WNT7*, *WNT9*, *WNT10* и *WNT16* у голотурий *Eupentacta fraudatrix* и *Cladolabes schmeltzii*. Выявлено участие этих генов в процессе регенерации аквафарингеального комплекса и кишки после эвисцерации у *E. fraudatrix*, а также при регенерации задней части после поперечного разрезания и бесполом размножении у *C. schmeltzii*. Кроме того, обнаружены и другие участники сигнального пути Wnt: β -catenin, frizzled, dishevelled. У *E. fraudatrix* экспрессия генов *WNT4*, *WNT6* происходила только на поздних стадиях регенерации. У *C. schmeltzii* на ранних этапах восстановления активировались *WNT2*, *WNT10*, *WNT16*, на поздних – *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT4* и *WNT7*. При бесполом размножении *C. schmeltzii* обнаружены транскрипты *WNT1*, *WNT2*, *WNT4*, *WNT7*, *WNT10*. Возможно, в исследуемых процессах гены *WNT* создают градиент концентрации, тем самым определяя места закладки органов, либо они непосредственно управляют регенерацией, заставляя клетки мигрировать и формировать органы.

Ключевые слова: гены *WNT*, сигнальные пути, морфогенез, иглокожие.