Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» (ДВФУ)

На правах рукописи

Садриев Константин Александрович

Роль генов *sfrp* при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix*

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
Долматов Игорь Юрьевич

Владивосток – 2025

Оглавление

Список сокращений

АК – аквафарингеальнай комплекс

кДНК – комплементарная ДНК (ДНК полученная путем обратной транскрипции на матрице мРНК)

ММП – матриксные металлопротеиназы

нт – нуклеотиды

ПЦР – полимеразная цепная реакция

спэ – суток после эвисцерации

AP (anterior-posterior) – передне-задняя

BMP (bone morphogenetic protein) – костный морфогенетический белок

CRD (cysteine-rich domain) – цистеин-богатый домен

DV (dorsal-ventral) – дорзо-вентральная

eef1a (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha) – эукариотический фактор элонгации трансляции 1 альфа

FAM – карбоксифлоуресцеин

HS (heparan sulfate) – гепарансульфаты

LRP (lipoprotein-receptor-related proteins) – белки подобные рецептору липротеинов

NTR (netrin-like domain) – нетрин-подобный домен

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

PFA (paraformaldehyde) – параформальдегид

ROR (tyrosine-kinase-like orphan receptors) – тирозинкиназа-подобные орфанные рецепторы

SFRP (secreted Frizzled-related proteins) – секретируемые Frizzled-подобные белки

siRNA (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК

WISH (Whole-mount *in situ* hybridization)

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Многие открытия, касающиеся механизмов регуляции экспрессии генов у человека, появились благодаря более ранним работам, описывающим эти же механизмы в контексте жизнедеятельности более просто устроенных животных. Например, механизм РНК-интерференции, в настоящее время активно используемый в медицине, перед этим был подробно изучен на нематоде *Caenorhabditis elegans*, а целый ряд генетических программ развития, важных для формирования человеческих органов, был впервые обнаружен при изучении жизненного цикла плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Fire et al., 1998; Barresi, Gilbert, 2020; Corydon et al., 2023).

Многочисленные опыты на различных животных подтвердили существование эволюционно-консервативных генетических программ активируемых морфогенами – секретируемыми сигнальными молекулами, градиент концентраций которых определяет, в каких клетках какие гены будут экспрессироваться. Морфогенетические градиенты и запускаемые ими внутриклеточные сигнальные каскады эволюционно возникли и развивались как часть межклеточной коммуникации, посредством которой клетки регулируют и синхронизируют свои функции в составе организма (Alvarado, Tsonis 2006; Ingham et al., 2011; Grall, Tschopp, 2020; Stapornwongkul, Vincent, 2021).

Одними из ключевых морфогенов являются белки семейства Wnt. Это секретируемые в межклеточное пространство паракринные факторы, воздействующие на рецепторы соседних с клеткой-продуцентом клеток. Связывание Wnt с их рецепторами, приводит к активации одноименных внутриклеточных сигнальных путей, влияющих на миграцию, пролиферацию и дифференцировку различных клеток. Нарушения в передаче сигналов Wnt приводят к тяжелым патологиям развития, связанным с неправильным формированием осей тела, а также ассоциированы с различными

заболеваниями, в том числе онкологическими (Steinhart, Angers, 2018; Routledge, Scholpp, 2019; Liu et al., 2022).

Что у позвоночных, что у беспозвоночных животных, на функциональную активность лигандов Wnt оказывают влияние различные белки. Одними из таких модуляторов Wnt являются белки семейства секретируемых Frizzled-подобных белков – secreted Frizzled-related proteins (SFRP), способные напрямую взаимодействовать с Wnt во внеклеточном пространстве и за счет этого ингибировать или усиливать опосредуемые ими эффекты (Bovolenta et al., 2008; Petersen, Reddien, 2009; Cruciat, Niehrs, 2013).

В ходе опытов, выполненных на позвоночных, было выявлено, что SFRP выполняют важные роли во множестве морфогенетических процессов, среди которых закладка осей тела, формирование конечностей, глаз, сердца (2006; Bovolenta et al., 2008; Cruciat, Niehrs, 2013; Sugiyama et al.,2013; Guan et al., 2021).

Однако изучение их функций у позвоночных сопряжено с рядом трудностей, связанных со сложностью регуляции экспрессии генов у этих животных и дупликациями генов *Wnt* и *sfrp* в их геномах. В этой связи, для изучения функций *sfrp* в онтогенезе целесообразно использовать более просто организованные модельные организмы, у которых есть гомологи *sfrp* позвоночных.

Позвоночные относятся к типу Хордовые. Последние совместно с иглокожими и полухордовыми образуют группу вторичноротых животных. В сравнении с позвоночными животными, иглокожие обладают потрясающими способностями к регенерации утраченных частей тела (Долматов, Машанов, 2007; Medina-Feliciano, García-Arrarás, 2021; Perillo et al., 2024). В частности, представители класса Голотурий (Holothuroidea) широко известны благодаря их способности к эвисцерации. В стрессовых условиях животные выбрасывают во внешнюю среду часть своих внутренних органов, а затем восстанавливают

утраченное. Так, голотурия *Eupentacta fraudatrix* эвисцерирует оральный комплекс органов (аквафарингеальный комплекс, АК) и весь пищеварительный тракт, за исключением клоаки. Процесс последующей регенерации занимает примерно месяц, после чего животное возвращается к полноценному питанию (Dolmatov, 1992; Долматов, Машанов, 2007).

Регенерация АК и пищеварительной трубки сопровождается активным синтезом внеклеточного матрикса, а клеточными источниками регенерации являются дифференцированные клетки, которые в период активного гистогенеза массово подвергаются дедифференцировке и трансдифференцировке. В частности, во время регенерации кишки, клетки мезодермального происхождения (целомический эпителий) подвергаются глубокой структурно-функциональной перестройке, в результате которой они могут полноценно замещать утраченные после эвисцерации клетки эндодермального происхождения (энтероциты). Участие стволовых клеток в этом процессе не доказано (Mashanov et al., 2005; Долматов, Машанов, 2007). Это сильно отличается от того, что можно наблюдать при регенерации у планарий или позвоночных животных, где недифференцированные стволовые клетки играют заметную или ведущую роль в регенерации (Alvarado, Tsonis, 2006; Galliot, Ghila 2010; Tanaka, Reddien, 2011; Gemberling et al., 2013).

Голотурии, из-за высокой пластичности их эпителиев, легко проходящих через де/трансдифференцировку, и в целом ярко выраженных способностей к регенерации внутренних органов, являются перспективными объектами для изучения роли *sfrp* в восстановлении органов. До настоящего времени *sfrp* иглокожих изучались лишь в контексте эмбрионального развития (Kawai et al., 2016). Подобная работа также интересна с точки зрения выявления эволюционно-консервативных функций *sfrp* в морфогенезе у вторичноротых животных.

Таким образом, **целью** настоящего исследования является изучение роли генов *sfrp* при регенерации внутренних органов после эвисцерации у голотурии *E. fraudatrix.*

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1) Произвести поиск и филогенетический анализ транскриптов генов *sfrp* в транскриптоме голотурии *E. fraudatrix*;
2) Изучить пространственно-временную экспрессию генов *sfrp* в ходе регенерации кишки и аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix*;
3) Осуществить нокдаун генов *sfrp* у голотурии *E. fraudatrix* с целью выявления их морфогенетических функций во время регенерации.

Научная новизна

Установлено наличие двух транскриптов генов *sfrp* в транскриптоме *E. fraudatrix*. Их последующий филогенетический анализ подтвердил современные представления о том, что в геноме общего предка вторичноротых присутствовало два гена *sfrp*.

Показано, что нокдаун *sfrp* приводит к дефектам формирования соединительнотканного зачатка АК. С учетом имеющихся данных о функциях SFRP у позвоночных, полученные в ходе данного исследования результаты позволяют предположить существование эволюционно-консервативной роли белков SFRP в качестве регуляторов состояния внеклеточного матрикса у вторичноротых.

Выявлено, что в ходе регенерации после эвисцерации у голотурии *E. fraudatrix* закладка соединительнотканных зачатков кишки и АК происходит независимо друг от друга. Подобное наблюдается у голотурий, для которых характерно бесполое размножение. Тем самым, полученные результаты

демонстрируют сходство механизмов регенерации кишки и АК после эвисцерации и бесполом размножении у голотурий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные дополняют имеющиеся представления о морфогенетических функциях SFRP у вторичноротых животных, о механизмах регенерации амбулакральной системы иглокожих.

Использованная в данном исследовании методика нокдауна генов у голотурии *E. fraudatrix,* в дальнейшем, с некоторыми модификациями, может быть использована для изучения функций генов в регенерации или эмбриональном развитии у других иглокожих.

Методология и методы исследования

Результаты данного исследования были получены за счет использования ряда молекулярно-генетических и гистологических методик. Для оценки дифференциальной экспрессии *sfrp* в ходе регенерации использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени и гибридизацию *in situ*. ПЦР в реальном времени, где в качестве матрицы используется кДНК, полученная с помощью реакции обратной транскрипции, позволяет проводить количественные измерения числа транскриптов исследуемых генов. С помощью гибридизации *in situ* мы изучали пространственную локализацию мРНК интересующих генов в регенератах АК и кишки.

Для выявления функций исследуемых генов осуществляли их нокдаун с помощью РНК-интерференции. Такой подход позволяет селективно ингибировать экспрессию интересующих генов за счет разрушения их мРНК. Для оценки морфологических эффектов после нокдауна получали серийные замороженные и полутонкие срезы, по которым оценивали патологические изменения.

Все исследования были выполнены на взрослых особях голотурии *E. fraudatrix* в норме или на различных стадиях регенерации после эвисцерации.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Гены *sfrp* экспрессируются в эпителиальных клетках мезодермального происхождения во время регенерации кишки и АК у голотурии *E. fraudatrix*.
2) Гены *sfrp* вовлечены в ранние этапы формирования соединительнотканного зачатка АК.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса различных методов выполненных с применением повторностей, контролей и статистической обработки. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, прошли рецензирование и были опубликованы.

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, анализировал полученные результаты и подготавливал публикации по теме диссертации.

Апробация результатов исследования

Полученные результаты были представлены на 26 Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2023); на Всероссийской школе-конференции молодых ученых с международным участием, посвященной юбилею академика Б.Л. Астаурова (Москва, 2024).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science и входящих в список изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 83 страницах, состоит из «Списка сокращений», «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также «Заключения», «Выводов» и «Списка литературы», включающего 110 источников. Рукопись содержит 16 рисунков, 2 таблицы и 1 приложение.

Благодарности

Автор выражает благодарность всему коллективу Лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН за разностороннее содействие и дружескую атмосферу. Особую благодарность выражаю своему коллеге и наставнику, Гиричу Александру Сергеевичу, за терпение и всестороннюю поддержку, обучение методам, консультирование и дискуссию по любым вопросам. Благодарю своего научного руководителя Долматова Игоря Юрьевича за помощь и руководство на всем протяжении работы над статьями и диссертацией. Глубокую признательность выражаю коллегам с кафедры клеточной биологии и генетики ДВФУ за их упорный труд по подготовке новых поколений исследователей.

1. Обзор литературы

1.1 Общее представление о морфогенах

Появление и эволюция многоклеточных организмов неразрывно связаны с эволюцией различных способов межклеточной коммуникации, благодаря которым клетки могут правильно интерпретировать свое положение и физиологическую роль в составе организма (Loh et al., 2016; Ros-Rocher et al., 2021).

Среди множества молекул, регулирующих миграцию, дифференцировку и пролиферацию клеток, особая роль принадлежит паракринным факторам – сигнальным молекулам, выделяемым клетками во внеклеточный матрикс (ВКМ), где они, связываясь с рецепторами соседних клеток, обеспечивают коммуникацию клеток на коротких расстояниях (десятки и сотни микрон) (Francis, Palsson, 1997; Handly et al., 2015). Связывание паракринных факторов с рецепторами на поверхности клеток запускает каскад внутриклеточных реакций, приводящих к изменению экспрессии генов и перестройке клеточных фенотипов, что помогает поддерживать тканевой гомеостаз (Steinhart, Angers, 2018; Routledge, Scholpp, 2019; Barresi, Gilbert, 2020).

За последние десятилетия был накоплен большой объем данных, согласно которым среди паракринных факторов существует довольно ограниченный, эволюционно-консервативный набор молекул, согласно градиенту которых происходит определение пути развития клеток-мишеней. Такие молекулы называют морфогенами (Stapornwongkul, Vincent, 2021; Simsek, Özbudak, 2022).

По классическим представлениям, формирование морфогенетического градиента можно представить в виде модели Французского флага, разработанной Льюисом Вольпертом (Lewis Wolpert) в 1960-е годы (**Рисунок 1**). Морфоген распространяется в межклеточном пространстве за счет диффузии. По мере удаления от клетки(ок) секретирующих морфоген, его

концентрация в ВКМ падает, в результате чего создается локальный градиент морфогена, который воспринимается рецепторами соседних клеток.

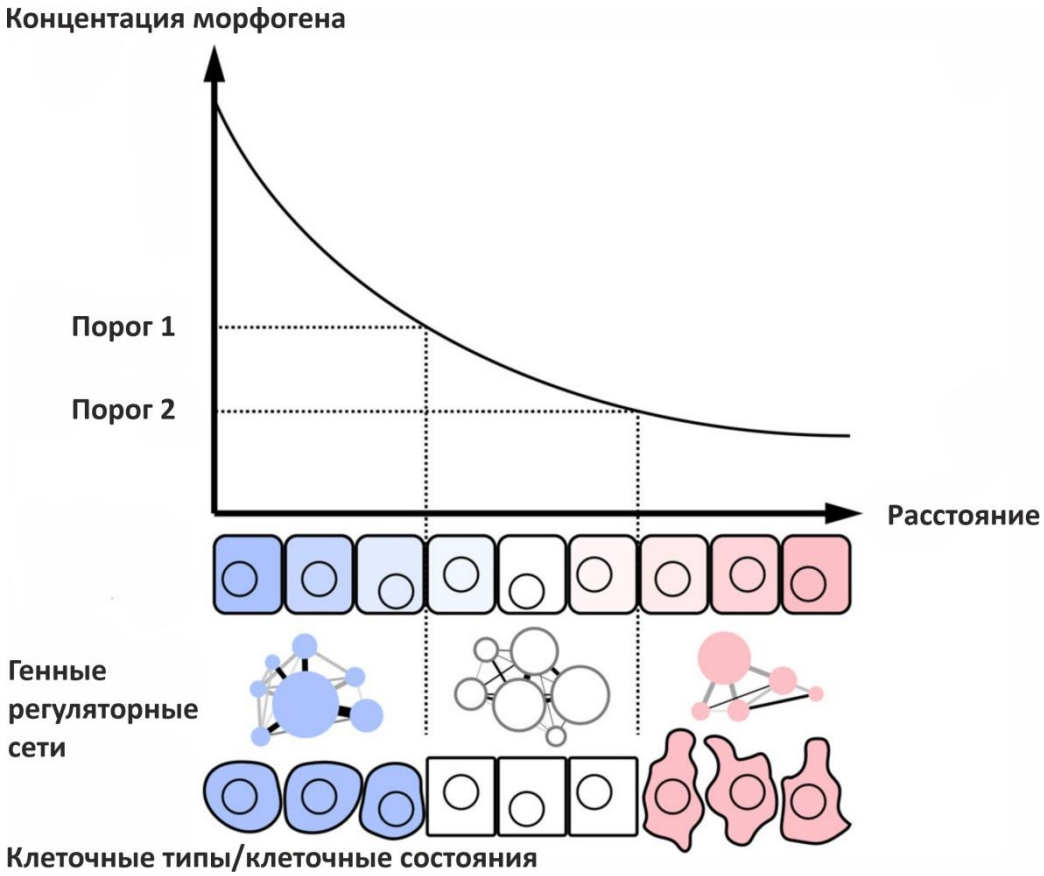


Рисунок 1 – Определение пути развития клеток за счет градиента морфогена. Клетки, находящиеся вблизи источника морфогена и воспринимающие его в концентрации выше порога 1, активируют экспрессию одних генов и становятся «синими»; клетки, находящиеся дальше, активируют другой набор генов и становятся «белыми»; клетки, находящиеся далеко от источника морфогена и воспринимающие его в концентрации ниже порога 2, становятся «красными». В каждой из трех групп клеток происходит не только активация определенных генов, но и ингибирование генов, активных при достижении других пороговых значений (По: Grall, Tschopp, 2020, с изменениями).

В клетках, подвергающихся различным концентрациям морфогена, активируются разные гены. Те, что находящятся ближе всего к источнику морфогена, в зоне его высокой концентрации, перестраивают свой фенотип одним образом, клетки находящиеся дальше, в зоне, где концентрация морфогена находится ниже некого порогового уровня изменяются иначе, совсем отдаленные клетки, воспринимающие морфоген в концентрации ниже

второго порогового уровня, перестраиваются третьим образом (Grall, Tschopp, 2020; Mosby et al., 2024).

Морфогенетические градиенты обладают рядом свойств. В частности, они адаптируются к изменениям размера тканей во время развития. Иначе говоря, при изменении размеров организма происходит сохранение пропорций пространственной разметки тела. Данное явление называют скейлингом (scaling). Морфогенетические градиенты обладают определенной устойчивостью (robustness). Они могут оставаться неизменными при перестройке работы генома и изменениях в окружающей среде. За счет точности (precision) морфогенетические градиенты очень четко очерчивают границы экспрессии генов в ткани, несмотря на высокий уровень шума (вариабельности экспрессии генов в клетках организма и у разных особей в популяции) (Mosby et al., 2024).

Одними из наиболее хорошо изученных морфогенов являются белки семейства Wnt, запускающие одноименные внутриклеточные сигнальные пути. Сигнальные пути Wnt появились вместе с многоклеточными животными (Metazoa). Как древняя и эволюционно-консервативная часть системы межклеточной коммуникации они играют важную роль в онтогенезе всех Metazoa (Petersen, Reddien, 2009; Loh et al., 2016; Holzem et al., 2024).

В частности, канонический сигнальный путь Wnt/β-catenin определяет формирование анатомических осей, таких как дорзо-вентральная (dorsal-ventral, DV) и передне-задняя (anterior-posterior, AP), необходимых для правильного позиционирования и скоординированной миграции клеток. У совершенно разных животных, начиная с губок и книдарий и заканчивая млекопитающими, во время эмбриогенеза или регенерации может наблюдаться удивительно схожая картина разметки AP оси. Белки Wnt и регулируемый ими β-catenin в высокой концентрации маркируют задние, «хвостовые» структуры тела. Градиент Wnt постепенно затухает «от хвоста к голове». Именно он и обеспечивает правильную реализацию программ развития, когда спереди

формируется голова, а сзади хвост. Убедительные доказательства этому были получены в ходе опытов, в которых нарушали градиент компонентов канонического сигнального пути у различных животных, что неизменно приводило к серьезным дефектам формирования AP оси (Gurley et al., 2008; Petersen, Reddien, 2009; Loh et al., 2016; Reddien, 2018; Steinhart, Angers, 2018).

В случае коммуникации между клетками на коротких расстояниях, градиент Wnt будет способствовать поляризации клеток вдоль такого градиента и таким образом клетки-продуценты лиганда будут локальным источником асимметрии в ткани. Помимо влияния на дифференцировку, форму клеток и направление их миграции, сигнальные пути Wnt воздействуют на ориентацию митотического веретена, тем самым регулируя направление деления клеток (Loh et al., 2016). И поскольку белки Wnt одновременно определяют дифференцировку клеток, их форму и направление деления, это позволяет им распределять клетки с разной дифференцировкой вдоль создаваемой ими оси.

Wnt влияют на ассиметричное деление стволовых клеток, и могут влиять на скорость клеточного цикла (Steinhart, Angers, 2018; Rim et al., 2022). Таким образом, паракринным и/или аутокринным образом регулируя пролиферацию, форму, миграцию и дифференцировку клеток белки Wnt могут в полной мере настраивать направление и скорость гистогенеза и как следствие формирование анатомических осей и правильную симметрию всего организма.

К примеру, у планарий гены *Wnt* характеризуются ярко выраженным градиентом экспрессии вдоль AP оси с максимумом концентрации у хвоста. Схожим образом локализован и *β-catenin*. Такая локализация экспрессии данных генов обеспечивает позиционную информацию, необходимую для нормальной регенерации задних частей тела. В случае нарушения градиента *β-catenin* через его сверхэкспрессию животные при регенерации вместо ранее ампутированной головы сформируют второй хвост. При его ингибировании – могут появиться особи, у которых при регенерации на месте ранее

ампутированного хвоста формируется вторая голова (Petersen, Reddien 2008; Petersen, Reddien 2009; Reddien 2018).

1.2 Агонисты и антагонисты морфогенов

Форма морфогенетического градиента и время его действия зависят от особенностей синтеза, транспорта и деградации морфогена (Kicheva, Briscoe, 2023; Mosby et al., 2024).

Такие морфогены, как белки Wnt и Hedgehog, в ходе своего процессинга подвергаются липидным модификациям. Ковалентное присоединение липидов (Lipidation) повышает гидрофобность данных белков и их сродство к клеточным мембранам, но вместе с тем затрудняет их диффузию в межклеточном пространстве (Dessaud et al., 2008; Steinhart, Angers, 2018; Zhang, Beachy, 2023; de Almeida Magalhaes et al., 2024). Одним из способов преодоления данного ограничения является присоединение к таким белкам белков-переносчиков, которые экранируют гидрофобные участки, чем обеспечивают повышение растворимости и дальнодействия паракринных факторов, а также изменяют параметры их взаимодействия с различными молекулами (Bu et al., 2017; Grainger, Willert, 2018; Routledge, Scholpp, 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

Существует множество белков, способных взаимодействовать с одним тем же морфогеном в ВКМ. Условно их можно подразделять на агонистов и антагонистов сигнальных путей. Антагонисты различными способами предотвращают взаимодействие лиганда с его рецептором, чем блокируют сигнальный путь, агонисты самостоятельно или в комплексе с паракринным фактором активируют рецептор и сигнальный путь, многие белки способны совмещать обе эти активности и модулируют сразу несколько сигнальных путей (Cruciat, Niehrs, 2013; Chang, 2016; de Almeida Magalhaes et al., 2024). К примеру, одними из антагонистов белков Wnt являются трансмембранные белки Tiki, осуществляющие их прямую инактивацию путем протеолиза. В то

же время, существует белок secreted Wingless-interacting molecule (Swim), являющийся агонистом Wnt сигналинга, поскольку он способствует распространению градиента Wnt и активации Wnt сигналинга у большего числа клеток. Другим известным агонистом Wnt сигналинга является белок Norrin, функционирующий подобно белкам Wnt (Mulligan et al., 2012; Cruciat, Niehrs, 2013; Steinhart, Angers, 2018; Grainger, Willert, 2018; Holzem et al., 2024).

1.3 Белки семейства SFRP и их роль в морфогенезе

1.3.1 Эволюция SFRP

Белки семейства secreted Frizzled-related proteins (SFRP), образуют небольшое древнее семейство растворимых белков, известных в первую очередь из-за их способности напрямую взаимодействовать с белками Wnt в межклеточном пространстве и играть роль как агонистов так и антагонистов Wnt сигналинга (Cruciat, Niehrs, 2013; Bu et al., 2017; Claudel et al., 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

Белки данного семейства содержат два домена: N-концевой cysteine rich domain (CRD) и C-концевой netrin-like domain (NTR). Последний, иногда также называют netrin-related motif (Bu et al., 2017; de Almeida Magalhaes et al., 2024). Белки с такой доменной организацией, вероятно, появились на ранних этапах становления Metazoa, поскольку они присутствуют уже у таких древних групп животных как Porifera и Placozoa (Mii, Taira, 2011; Leclère, Rentzsch, 2012; Holzem et al., 2024). То же самое можно сказать и о белках Wnt, которые отсутствуют у одноклеточных организмов. Отдельные компоненты сигнальных путей Wnt, такие как рецепторы Frizzled, с CRD доменом которых связываются белки Wnt, появились задолго до Metazoa, они есть у представителей таксонов Amoebozoa и Fungi (Holzem et al., 2024).

По всей видимости, SFRP возникли от рецепторов Frizzled, для этого те должны были потерять свои трансмембранные домены и приобрести NTR домен (Leclère, Rentzsch, 2012). Считается, что SFRP и сигнальные пути Wnt в

современном понимании в качестве модуляторов межклеточной коммуникации появились во время становления Metazoa (Leclère, Rentzsch, 2012; Holzem et al., 2024).

У млекопитающих есть пять белков SFRP, образующих две подгруппы: SFRP1, SFRP2, SFRP5 и SFRP3, SFRP4 (Bovolenta et al., 2008; Cruciat, Niehrs, 2013; Claudel et al., 2019). Кроме филогенетических данных такое разделение подтверждается разным количеством экзонов у соответствующих генов и различиями в их функциях. Известно, что человеческие гены *sfrp1, -2, -5* состоят из трех экзонов и расположены на хромосомах 8p11.21, 4q31.3, 10q24.2, соответственно. Гены *sfrp3, -4* состоят из шести экзонов, расположенных на хромосомах 2q32.1 и 7p14.1 (Bovolenta et al., 2008; Claudel et al., 2019).

У некоторых позвоночных, помимо вышеописанных двух, есть третья подгруппа, состоящая из белков Sizzled, Crescent, и Tlc. Данная подгруппа родственна подгруппе SFRP1/2/5 и отсутствует у млекопитающих. Ее члены присутствуют у других позвоночных, включая рыб, земноводных и птиц (Bovolenta et al., 2008; Leclère, Rentzsch, 2012; Bu et al., 2017).

Считается, что предок вторичноротых животных имел два белка SFRP: SFRP1/2/5 и SFRP3/4. Такое положение сохранилось у иглокожих и полухордовых, у хордовых произошла дополнительная дивергенция, связанная с появлением позвоночных животных (Leclère, Rentzsch, 2012; Yan et al., 2014; Bastin et al., 2015) (**Рисунок 2**).

У первичноротых обнаружены гомологи как SFRP1/2/5, так и SFRP3/4 вторичноротых. Интересным исключением являются некоторые насекомые. Например, сообщается о полном отсутствии гомологов SFRP у *Drosophila melanogaster* (Bastin et al., 2015; Hogvall et al., 2018; Tarazona et al., 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

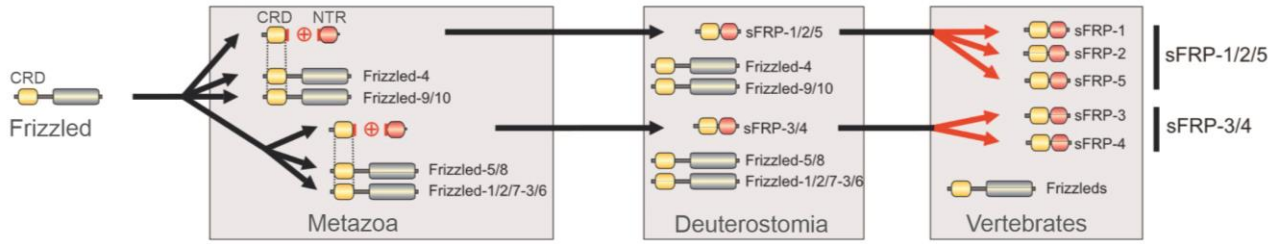


Рисунок 2 – Предполагаемый сценарий эволюции белков SFRP. Вероятно, что SFRP возникли на ранних этапах эволюции многоклеточных животных. В это время независимо, за счет генетической рекомбинации, возникли белки SFRP1/2/5 и SFRP3/4. Дальнейшая дивергенция SFRP происходила в связи с появлением позвоночных (По: Leclère, Rentzsch, 2012, с изменениями).

1.3.2 SFRP способны ингибировать Wnt сигналинг

Высокая степень сходства последовательностей домена CRD SFRP с внеклеточным CRD доменом рецепторов семейства Frizzled подтолкнула исследователей рассматривать SFRP в качестве Wnt-связывающих белков и ингибиторов взаимодействия данных лигандов с рецепторомами Frizzled. Так, известно, что Wnt3A и Wnt5A способны связывать различные SFRP с аффинностью, схожей с таковой для пар Wnt-Frizzled (Bafico et al., 1999; Cruciat, Niehrs, 2013; Bu et al., 2017; Liang et al., 2019).

Кроме того, было установлено, что CRD домены белков Frizzled и SFRP способны к димеризации. Появляются данные о взаимодействии SFRP с другими CRD-содержащими белками, выступающими в качестве корецепторов Frizzled, например tyrosine-kinase-like orphan receptors (ROR) (Rodriguez et al., 2005; Brinkmann et al., 2016; Vincent, Postovit, 2018; Liu et al., 2022).

Таким образом, SFRP способны паракринно и аутокринно взаимодействовать как напрямую с белками Wnt, так и с их рецепторами, и тем самым ингибировать Wnt сигналинг **(Рисунок 3)**.

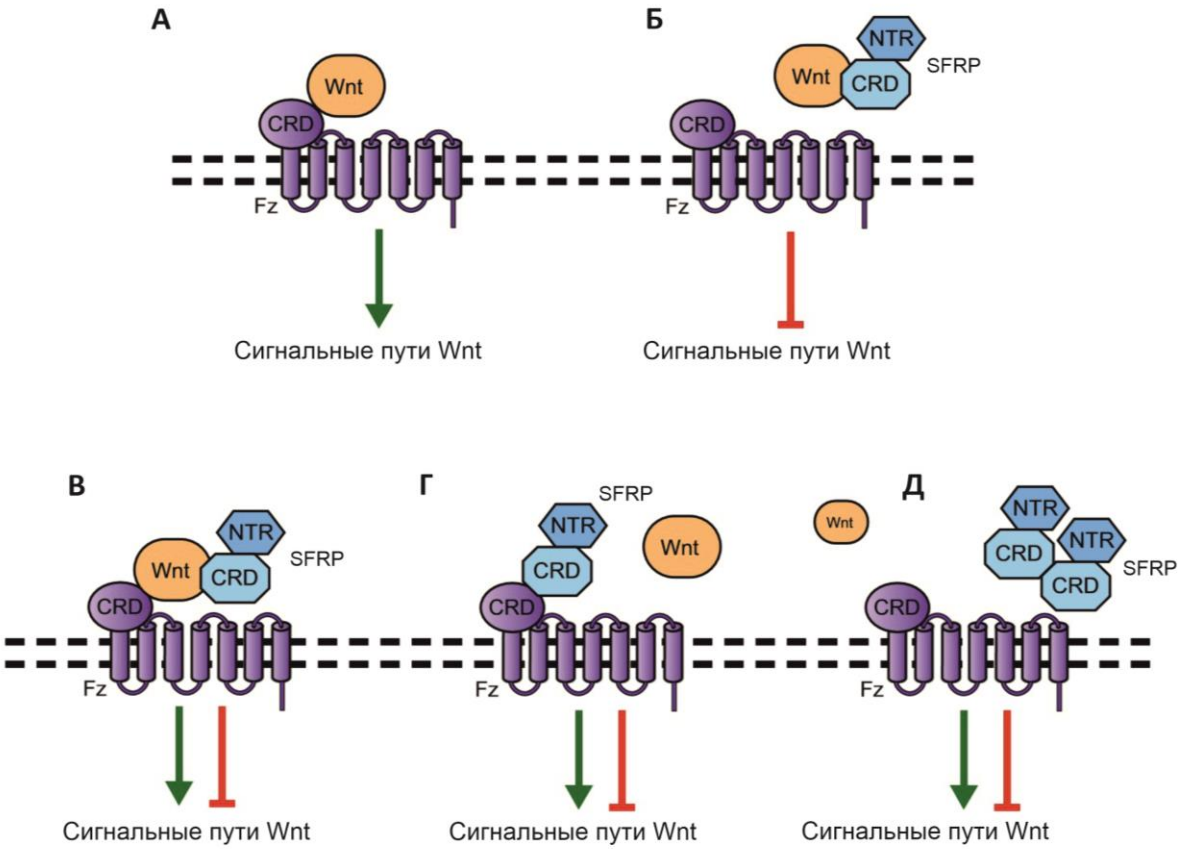


Рисунок 3 – Основные возможные способы модуляции Wnt сигналинга посредством SFRP. **(А)** Без SFRP белки Wnt связываются с рецепторами Frizzled и в зависимости от различных корецепторов (не показаны) происходит активация канонических или неканонических путей Wnt. **(Б)** SFRP связывают и изолируют Wnt во внеклеточном пространстве, чем ингибирует сигнальные пути. **(В)** Комплекс SFRP-Wnt-Frizzled способен как активировать, так и ингибировать Wnt сигналинг. **(Г)** SFRP могут напрямую взаимодействовать с Frizzled и ингибировать или активировать сигнальные пути. **(Д)** SFRP могут взаимодействовать друг с другом во внеклеточном пространстве (По: Vincent, Postovit, 2018, с изменениями).

1.3.3 SFRP способны активировать Wnt сигналинг

SFRP выступают не только в качестве ингибиторов сигнальных путей Wnt, но также и их активаторов. Сообщается, что комплексы SFRP-Wnt-Frizzled, равно как и SFRP сами по себе, способны активировать сигнальные пути Wnt (von Marschall, Fisher 2010; Brinkmann et al., 2016; Vincent, Postovit, 2018; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

В ходе посттрансляционных модификаций к белкам Wnt присоединяют пальмитолеиновую кислоту, в результате чего их способность к диффузии и

формированию морфогенетических градиентов снижается. В связи с чем возникает необходимость обеспечения подходящих условий для их транспорта между клетками. Наряду с другими механизмами транспорта, например посредством экзосом или цитонем, белки-переносчики, такие как SFRP и WNT inhibitory factor 1 (WIF1), обеспечивают контекст-специфическое перемещение белков Wnt (Routledge, Scholpp, 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024). Своими липид-связывающими доменами они экранируют пальмитолеиновую кислоту и в результате образуются прочные растворимые комплексы, способные активировать рецепторы Frizzled (de Almeida Magalhaes et al., 2024).

SFRP также могут служить своеобразными депо для белков Wnt, заякоревая их к компонентам ВКМ, например различным протеогликанам (Chang, 2016; Bu et al., 2017). Можно предположить, что за счет этого SFRP защищают их от налипания на нецелевые компоненты ВКМ, пролонгируют или ограничивают дистанцию их действия, в то же время могут аккумулировать какое-то их количество для отложенного эффекта или деградации. Более того, одна из форм протеогликанов, присоединенные к клеточным мембранам глипиканы, могут функционировать в качестве своеобразных корецепторов, передавая гидрофобный Wnt от белка-носителя на рецептор Frizzled и этим усиливать Wnt сигналинг (Chang, 2016; de Almeida Magalhaes et al., 2024). Считается, что SFRP активно взаимодействуют с протеогликанами посредством своих NTR доменов, имеющих в составе положительно заряженный участок из остатков аргинина и лизина (Bu et al., 2017).

1.3.4 SFRP модулируют Wnt сигналинг посредством NOTUM

Присоединение пальмитолеиновой кислоты к белкам Wnt осуществляет фермент Porcupine. Далее, внутри клетки-продуцента, белок WNTLESS (WLS) защищает ее от цитоплазматического окружения и обеспечивает транспорт Wnt к поверхности клеточной мембраны, где с ним могут связаться различные агонисты и антагонисты, в том числе SFRP. Wnt, лишенные этой липидной модификации, не способны активировать сигнальный путь. За такую

инактивацию в ВКМ отвечает фермент NOTUM, отщепляющий жирную кислоту от лиганда. Сообщается, что все SFRP млекопитающих, за исключением SFRP5, могут способствовать NOTUM-зависимому ингибированию Wnt. SFRP5, наоборот, защищает связанный с ним Wnt от воздействия NOTUM (de Almeida Magalhaes et al., 2024).

1.3.5 SFRP способны напрямую взаимодействовать с β-catenin

Еще одна недавно открытая роль SFRP проявляется в их способности связывать транскрипционный фактор канонического пути Wnt – β-catenin. Было продемонстрировано, что при высокой концентрации SFRP1-5 своими CRD доменами взаимодействуют в ядре с N концевой частью β-catenin, что ведет к репрессии его транскрипционной активности. В то же время при низкой концентрации SFRP3 и SFRP4 наблюдался противоположный эффект – происходит усиление транскрипционной активности β-catenin. Авторы объясняют данный эффект тем, что в данном случае, в низкой концентрации, SFRP3, -4 связываются своими NTR доменами с С концевой частью β-catenin. Механизм проникновения SFRP внутрь клеток остается неясным. Авторы предполагают, что SFRP могут попадать внутрь клеток в составе экзосом (Liang et al., 2019).

Такой двойственный эффект, вызванный связыванием SFRP с различными сайтами β-catenin, несомненно, заслуживает дальнейшего изучения и, вероятно, способствует переосмыслению более ранних работ, рассматривающих SFRP исключительно в качестве ауто/паракринных регуляторов.

1.3.6 Взаимодействия между Wnt и SFRP

Не теряет своей актуальности вопрос о специфичности взаимодействия SFRP с другими белками, в первую очередь – Wnt. Отчасти этот интерес объясняется тем, что существует три ветви сигнального пути Wnt, активация которых по-разному влияет на клетки. Так, WNT3A при связывании с

рецепторами Frizzled и корецепторами lipoprotein-receptor-related proteins (LRP) запускает канонический β-catenin опосредованный сигнальный путь Wnt. WNT5A через другие корецепторы – ROR может активировать неканонические, β-catenin независимые пути, влияющие на внутриклеточную полимеризацию актина, изменение формы клеток и кальциевый метаболизм (Brinkmann et al., 2016; Liang et al., 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

Существует множество работ, посвященных изучению полифункциональности белков Wnt и их роли в различных заболеваниях (Steinhart, Angers, 2018; Vincent, Postovit, 2018; Liu et al., 2022; Grainger, Willert, 2018; de Almeida Magalhaes et al., 2024). Поскольку SFRP могут связывать различные Frizzled, ROR и Wnt, с их помощью может осуществляться переключение между каноническими и неканоническими путями с последующими изменениями клеточной дифференцировки (Brinkmann et al., 2016).

Изучение полного спектра взаимодействий между SFRP и Wnt в контексте запуска канонических и неканонических путей все еще остается далекой перспективой. Потенциально существует большое число взаимодействий между представителями семейств Wnt и SFRP, к тому же белки первого семейства плохорастворимы, что затрудняет их выделение и последующее изучение. В частности, человеческий протеом содержит 19 Wnt, 10 Frizzled и их различные корецепторы, а также 5 SFRP (Bovolenta et al., 2008; Cruciat, Niehrs, 2013; van Loon et al., 2016; Bu et al., 2017).

Как отмечается в ряде статей, уже накопленные данные свидетельствуют о том, что SFRP способны как активировать, так и ингибировать сигнальные пути Wnt в зависимости от свой концентрации и существующего тканевого контекста. Причем оба домена – CRD и NTR, принимают в этом участие (Bu et al., 2017; Claudel et al., 2019).

Наряду с вышеописанными механизмами, на итог взаимодействий между сигнальными путями Wnt и SFRP может влиять наличие у вторых множественных сайтов для связывания Wnt и других компонентов сигналинга, а также различные посттрансляционные модификации, которым подвержены подобные белки, влияющие на аффинность межмолекулярных взаимодействий (Lopez-Rios et al., 2008; Bovolenta et al., 2008; Bu et al., 2017; Liang et al., 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

Общая тенденция такова, что в низкой концентрации SFRP активируют Wnt сигналинг, а в высокой ингибируют. На рецепторном уровне можно попытаться объяснить это тем, что при высокой концентрации между SFRP возникает конкуренция за связывание с Frizzled. Комплекс Wnt-SFRP не активирует Wnt сигналинг при наличии большого количества конкурирующих с ним за связывание свободных SFRP (Claudel et al., 2019; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

1.3.7 SFRP и BMP сигналинг

Спектр действия SFRP не ограничивается только лишь компонентами Wnt сигналинга (Bovolenta et al., 2008; Mii, Taira, 2011; Cruciat, Niehrs, 2013). Другая относительно хорошо изученная их роль проявляется в способности модулировать сигнальный путь BMP (bone morphogenetic protein). За счет взаимодействия с матриксными металлопротеиназами (ММП) семейства Tolloid, и воздействия на их протеолитическую активность, по меньшей мере, Sizzled, Crescent, SFRP2, SFRP5 способны ингибировать сигнальный путь BMP. Tolloid способны инактивировать белок Chordin, который является антагонистом BMP. В случае взаимодействия Tolloid-SFRP, Chordin не подвергается деградации, связывается с BMP и блокирует взаимодействие этих белков с их рецепторами (Alfaro et al., 2010; He et al., 2010; Misra, Matise 2010; Troilo et al., 2016; Chang, 2016).

ММП семейства Tolloid задействованы в процессинге коллагена. Было показано, что SFRP усиливают эту их активность за счет одновременного связывания ими фермента и его субстрата, проколлагена. В результате происходит увеличение накопления коллагена в ВКМ и развитие фиброза (Kobayashi et al., 2009; Nathan, Tzahor 2009; He et al., 2010). В то же время, в высоких концентрациях, SFRP могут выступать и в роли антифиброзных агентов (Kobayashi et al., 2009; Wu et al., 2020).

1.3.8 SFRP, протеогликаны и морфогенез

На эмбрионах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* была впервые продемонстрирована способность SFRP усиливать распространение градиента Wnt. Поскольку комплексы SFRP-Wnt более растворимы, чем сами Wnt, это позволяет таким комплексам обеспечивать диффузию Wnt на бóльшие расстояния. В частности, у этих животных, SFRP3 может расширять морфогенетический градиент Wnt8, а SFRP1 может способствовать распространению Wnt6 в ВКМ. Существенную роль в этом процессе играют различные компоненты ВКМ, в частности протеогликаны, такие как heparan sulfate (HS) (Mii, Taira 2011; Bu et al., 2017; Mii, Takada 2020; Yamamoto et al., 2022).

HS регулируют параметры диффузии различных лигандов, влияют на их доступность для рецепторных взаимодействий и также могут выступать в качестве корецепторов (Chang 2016; Bu et al., 2017). У *X. laevis sfrp1* участвует в определении размеров сердечной мышцы через регуляцию дифференцировки и пролиферации клеток сердечной мезодермы. В период формирования сердечной мышцы SFRP1 преимущественно локализуется на N-acetyl-rich HS, которые упорядоченно локализуется в зачатке перикарда. Таким образом, SFRP1 и HS ограничивают градиент Wnt в довольно узкой зоне и блокируют его воздействие на миокард (Yamamoto et al., 2022). У млекопитающих *sfrp2* также играет важную роль в развитии сердца, в частности, он участвует в дифференцировке кардиомиоцитов. С его помощью происходит инактивация

Wnt3a, в результате чего канонический путь Wnt блокируется и активируется неканонический, способствующий их дифференцировке. Нарушения активности SFRP ассоциированы с рядом сердечно-сосудистых заболеваний, что является темой соответствующих обзоров (Wu et al., 2020; Guan et al., 2021; Hsueh et al., 2021).

Помимо этого, на эмбрионах *X. laevis* и клеточных культурах было продемонстрировано, что SFRP1 и SFRP2 влияют на экзосомопосредованную ресекрецию Wnt. Так, SFRP2 стимулирует экзосомопосредованную ресекрецию Wnt3a. В эмбрионах Wnt3a и SFRP2 колокализуются на углеродных цепях HS. Предложен механизм, согласно которому SFRP2 усиливает связывание Wnt с HS на клеточных мембранах, что приводит к повышенному эндоцитозу белков Wnt и их последующей ресекреции в составе экзосом. (Tran et al., 2024). В данном случае SFRP2 стимулирует, а не ингибирует Wnt сигналинг и градиент Wnt3a распространяется на большие расстояния по тканям эмбриона.

Упорядоченная локализация HS характерна и для морфогенеза хрусталика мыши. Более того, разные типы клеток связаны с разными HS. При двойном нокауте *sfrp1* и *sfrp2* отмечалось снижение активности канонического пути Wnt в эпителиальных клетках хрусталика, уменьшение их числа и формирование уменьшенного хрусталика (Sugiyama et al., 2013; Wishart, Lovicu 2023). Возможно, что распределение HS, SFRP, Wnt и формирование градиента последних, реализуется по механизмам схожим с теми, что были описаны для *X. laevis*.

1.3.9 SFRP и формирование AP оси

Известно, что SFRP в качестве модуляторов Wnt сигналинга участвуют в определении первичных осей тела (Cruciat, Niehrs, 2013; Bastin et al., 2015). В случае разметки AP оси у билатеральных животных белки Wnt и β-catenin как правило маркируют задние отделы тела, в то время как их потенциальные ингибиторы (антагонисты) SFRP и NOTUM, накапливаются в передних

отделах. За счет активности данных ингибиторов происходит разграничение градиента Wnt и сохраняются правильные пропорции передних частей тела по отношению к задним (Petersen, Reddien, 2009; Loh et al., 2016; Reddien, 2018).

В основном данное утверждение подтверждается данными полученными при изучении паттернов их экспрессии во время эмбрионального развития. Но также существуют и функциональные эксперименты, где в ходе опытов по ингибированию или сверхэкспрессии SFRP было продемонстрировано, что нарушение их функций связано с серьезными пороками развития. В опытах на эмбрионах полухордовых было продемонстрировано, что *sfrp* активно экспрессируются в передних отделах тела во время раннего эмбриогенеза, а инъекция мРНК *sfrp1/5* приводит к серьезным дефектам формирования АР оси (Darras et al., 2018; Fritzenwanker et al., 2019) **(Рисунок 4)**.

Двойной нокаут *sfrp1* и *sfrp2* является летальным для эмбрионов мышей, из-за укорочения у них АР оси и нарушения сомитогенеза, обусловленных нарушением конвергентного удлинения (convergent extension). Данный эффект усиливается в случае тройного нокаута *sfrp1, -2, -5*. Поскольку данного эффекта не было показано в случае нокаута отдельных генов, можно в некоторой степени считать, что функции этих генов в эмбриогенезе млекопитающих по отдельности избыточны. Об этом говорит также то, что экспрессия отдельных *sfrp* часто перекрывается, и они экспрессируются в одних и тех же структурах, среди которых особо можно отметить нервную систему (включая нервную трубку и мозг), глаза, почки и конечности (Leimeister et al., 1998; Satoh et al., 2006; Satoh et al., 2008; Witte et al., 2009; Cruciat, Niehrs, 2013). Гены *sfrp1, -2, -3* экспрессируются уже на стадии бластоцисты, далее во время гаструляции и органогенеза экспрессируются уже все sfrp (Leimeister et al., 1998; Kemp et al., 2005).

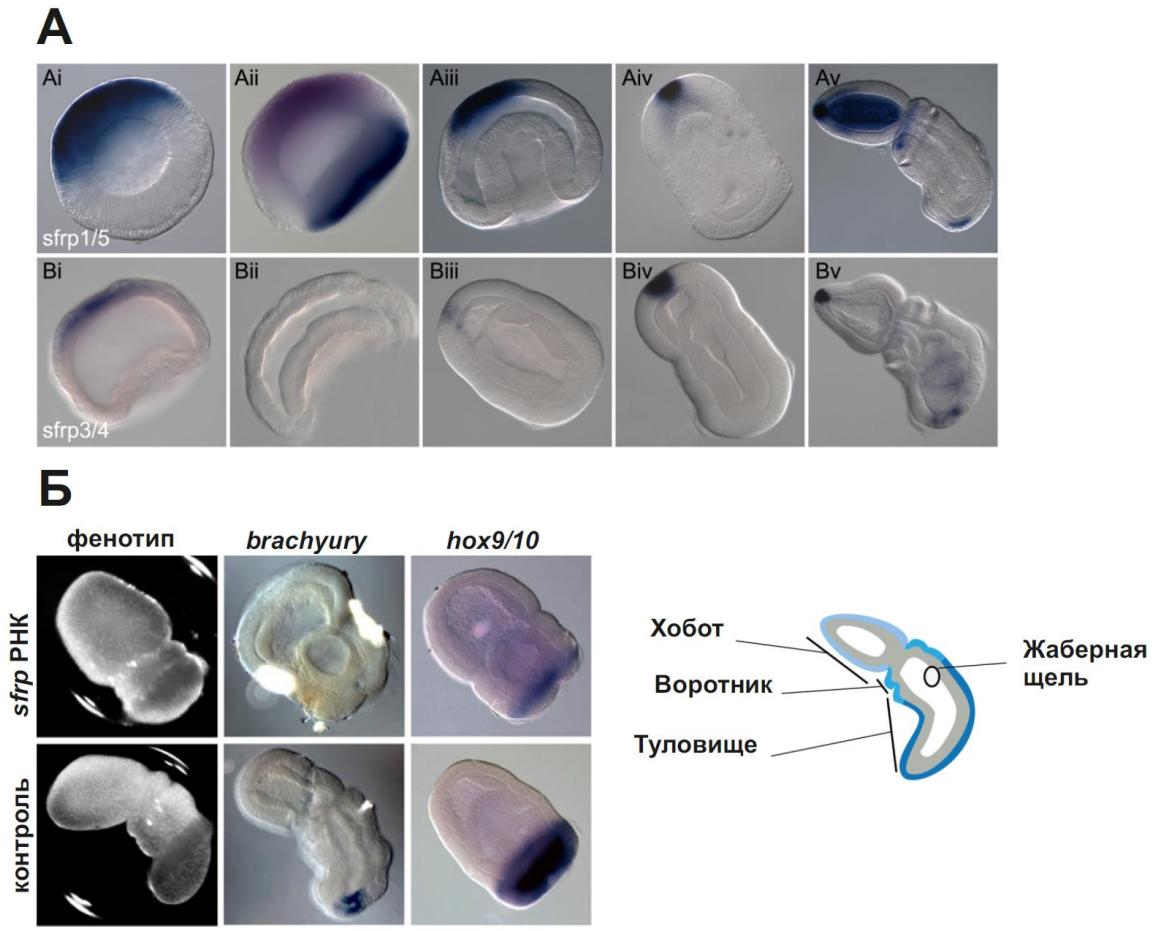


Рисунок 4 – Паттерны экспрессии и роль генов *sfrp* в развитии полухордового *Saccoglossus kowalevskii*. **(А)** Экспрессия *sfrp*. Показаны стадии развития с момента образования бластулы до 72 часов после оплодотворения. **(Б)** Последствия сверхэкспрессии *sfrp1/5* (По: Darras et al., 2018; Fritzenwanker et al., 2019, с изменениями).

1.2.10 SFRP и формирование DV оси

Белки семейства SFRP играют определенную роль и в установлении DV оси. Известно, что у позвоночных β-catenin участвует в формировании организатора Шпемана-Мангольд, группы клеток, индуцирующих формирование первичных осей тела. С помощью пересадки этих клеток или изменения уровня β-catenin в вентральных бластомерах можно добиться формирования второй дорсальной оси. Так, инъекция мРНК факторов, усиливающих активность β-catenin в будущие вентральные бластомеры, приводит к дупликации дорзальной оси и появлению двухголовых лягушек *X. laevis* (Steinhart, Angers, 2018; Shi, 2024).

Такой дорсальный организатор секретирует внеклеточные ингибиторы сигнальных путей Wnt и BMP и тем самым ингибирует развитие вентральной оси. Однако долгое время не было понятно, каким образом регулируется размер организатора. На *Danio rerio* была проведена интересная работа, показывающая каким образом посредством SFRP регулируется размер организатора и осуществляться коммуникация между различными ветвями сигнальных путей Wnt. Wnt/β-catenin сигналинг стимулирует транскрипцию неканонического лиганда Wnt5b, который через ряд посредников стимулирует транскрипцию *frzb* (*sfrp3*), тем самым ограничивая Wnt/β-catenin активную зону и размер органайзера. В результате такой отрицательной петли обратной связи посредством SFRP3 регулируется экспрессия β-catenin в дорсальных бластомерах (Zou et al., 2023).

У *D. rerio*, различные *sfrp* активно экспрессируются в различных частях эмбриона, во всех трех зародышевых листках. Профили их экспрессии отличаются, за исключением *sfrp1a* и *sfrp5* активно экспрессирующихся в развивающемся мозге похожими паттернами. После нокдауна или сверхэкспрессии *sfrp5* проявлялись дефекты формирования как AP, так и DV осей, в первом случае из-за нарушения канонических и неканонических путей Wnt, а во втором случае из-за нарушения BMP сигналинга, по тому же Chordin-зависимому механизму, что известен для Sizzled (Tendeng, Houart 2006; Stuckenholz et al., 2013). Гены *sfrp1a* и *sfrp1b* у *D. rerio* вероятно появились из-за полногеномной дупликации, специфичной для костистых рыб. Всего в геноме данного вида было обнаружено семь *sfrp* (Tendeng and Houart 2006).

Дорсальная локализация SFRP наблюдается и при формировании конечностей, где SFRP регулирует активность сигнальных путей Wnt и BMP и, соответственно, формирование DV оси. По всей видимости, это древняя функции *sfrp*, поскольку профили их экспрессии при морфогенезе конечностей схожи у позвоночных, членистоногих, головоногих моллюсков (Hogvall et al., 2018; Tarazona et al., 2019). Помимо SFRP, экспрессия целого ряда

компонентов сигнальных путей, таких как Wnt, Hedgehog, BMP в ходе формирования конечностей у этих животных также носит упорядоченно-консервативный характер. С учетом того, что данные структуры не являются гомологичными, это может свидетельствовать о древнем происхождении клеточных механизмов и сигнальных путей вовлеченных в формировании придатков тела билатеральных животных (Tarazona et al., 2019).

Похожим с *sfrp1/2/5* образом в конечностях моллюсков экспрессируется и *notum* (Tarazona et al., 2019). Можно предположить, что в данном случае может происходить NOTUM-опосредованная инактивация Wnt с участием SFRP, описанная ранее. Вероятно, что взаимосвязь этих двух модуляторов Wnt сигналинга при формировании осей тела является эволюционно древней. В опытах на планариях было продемонстрировано, что профили экспрессии *sfrp* и *notum* схожи и оба они экспрессируются в передней части тела планарий. После нокдауна *notum* исчезала экспрессия *sfrp*, зато на этом месте начинали экспрессироваться *Wnt* и *Frizzled* (Petersen, Reddien 2011; Reddien 2018).

1.4 Регенерация у голотурий

Голотурии, или морские огурцы – морские беспозвоночные, представители типа иглокожих (Echinodermata). Это животные с вытянутым червеобразным телом и пентарадиальной симметрией. Их тело разделено на 5 радиусов, или амбулакров и 5 интеррадиусов **(Рисунок 5)**. На поверхности амбулакров находятся амбулакральные ножки, с помощью которых животное передвигается. Амбулакральные ножки отходят от радиальных каналов амбулакральной системы, залегающих в амбулакрах стенки тела. В состав каждого амбулакра входят: радиальный амбулакральный канал, радиальный нервный тяж, радиальный гемальный сосуд и продольная мышечная лента (Долматов, Машанов, 2007; Dolmatov, 2021).

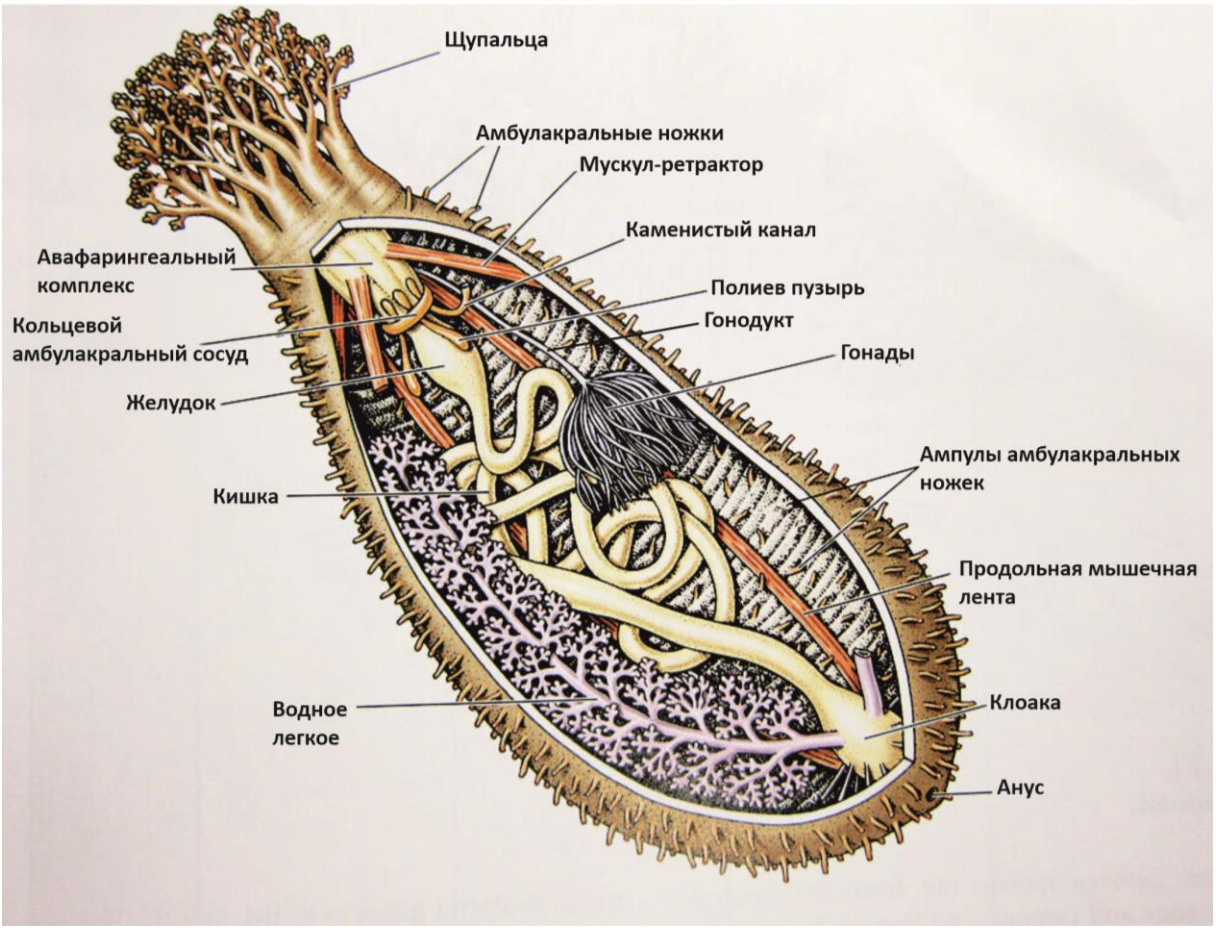


Рисунок 5 – Анатомия голотурий (https://tr.pinterest.com/pin/sea-cucumber-anatomy--459367230712738365/?utm_medium=organic&utm).

В переднем конце тела животного амбулакры сходятся вместе и образуют аквафарингеальный комплекс (АК). Спереди АК оканчивается венчиком щупалец, в основании которых лежит нервное кольцо, а сзади ограничивается кольцевым амбулакральным каналом и гемальным кольцом. У представителей отряда Dendrochirotida способных втягивать свои щупальца в полость тела, к АК прикреплены мускулы-ретракторы (Долматов, Машанов, 2007).

Отличительной чертой голотурий является их способность к одной из форм аутотомии – эвисцерации. Наиболее известным примером аутотомии в природе является отбрасывание хвоста ящерицами. Разные же виды голотурий способны выбрасывать свои внутренние органы через анальное или ротовое отверстие (Dolmatov 1992; Medina-Feliciano, García-Arrarás, 2021; Perillo et al., 2024).

Морфологические и некоторые молекулярно-генетические аспекты регенерации после эвисцерации у голотурий исследованы достаточно подробно у *Eupentacta fraudatrix, Apostichopus japonicus* (дальневосточный трепанг) и *Holothuria glaberrima* (Mashanov, Garcia-Arraras, 2011; Dolmatov, 2021). У двух последних видов изучение регенерации после эвисцерации ограничивается изучением восстановления кишки (часть которой они удаляют через анальное отверстие), поскольку они не способны к эвисцерации АК.

Находящиеся в стрессовых условиях голотурии *E. fraudatrix* запускают процесс эвисцерации, в ходе которого «выплевывают» АК и кишку, а затем примерно в течение месяца восстанавливает утраченное и возвращаются к полноценной жизнедеятельности **(Рисунок 6)**.

После удаления внутренностей в течение 1-2 сут происходит закрытие раны на переднем конце. Через 2-3 сут после эвисцерации (спэ) начинается регенерация АК. Он формируется в виде соединительнотканного утолщения в передней части животного. Затем в него постепенно врастают радиальные структуры стенки тела голотурий.

Через 3 спэ на концах амбулакров начинается дедифференцировка и миграция клеток. За счет активной пролиферации и миграции клеток через 5 спэ радиальные амбулакральные каналы и радиальные нервные тяжи постепенно растут по зачатку АК назад. Через 7 спэ образуется амбулакральное кольцо вокруг АК. За счет перестройки концов нервных тяжей развивается нервное кольцо. Мышцы-ретракторы АК формируются из клеток целомического эпителия.

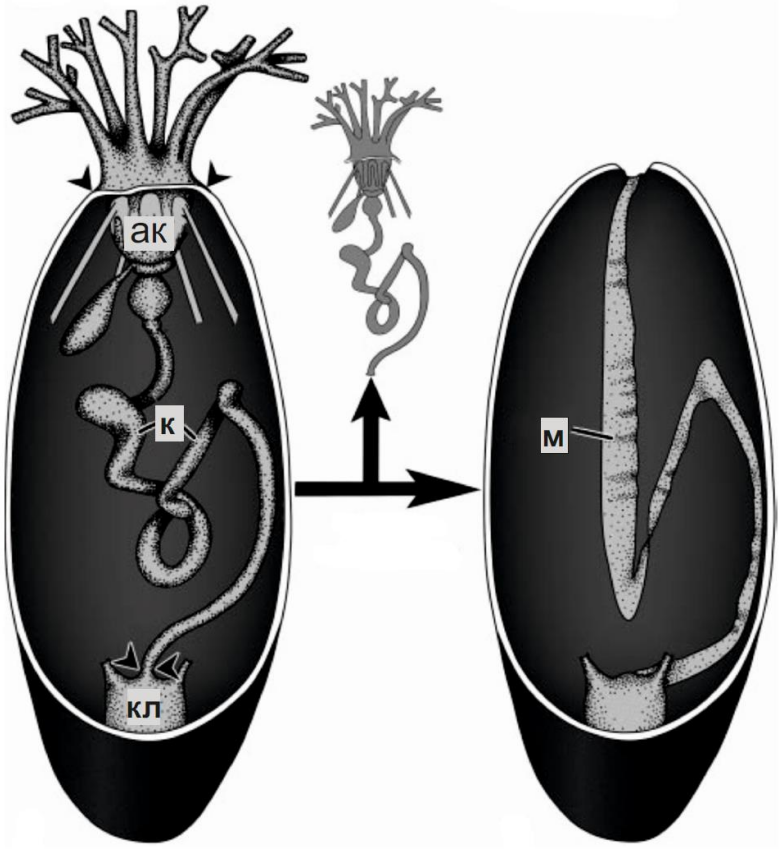


Рисунок 6 – Эвисцерация у голотурии *E. fraudatrix*. Стрелки указывают на места разрыва тканей. Условные обозначения: ак – аквафарингеальный комплекс, к – кишка, кл – клоака, м – кишечный мезентерий (По: Mashanov, García-Arrarás, 2011, с изменениями).

Кишка формируется в виде двух соединительнотканных утолщений по свободному краю мезентерия. Переднее утолщение (зачаток) развивается сразу за АК уже через 3-5 спэ. Задний зачаток отрастает от клоаки несколько позже, через 7-9 спэ. В дальнейшем оба зачатка растут по краю мезентерия навстречу друг другу **(Рисунок 7)**. Через 5-7 спэ в переднем зачатке происходит погружение целомического эпителия в соединительную ткань, в результате чего закладывается кишечный эпителий (Долматов, Машанов, 2007).

Через 10 спэ появляется полость кишки, выстланная дедифференцированным клетками, которые в дальнейшем постепенно превращаются в энтероциты (Долматов, Машанов, 2007; Dolmatov, 2021). В данном случае формирование кишечного эпителия происходит за счет

трансдифференцировки клеток целомического эпителия (Dolmatov, 2021). В передней части тела после эвисцерации не остается никаких энтодермальных тканей, и в ходе регенерации клетки мезодермального происхождения замещают утраченные клетки энтодермального происхождения. Процесс восстановления кишечного эпителия заднего зачатка кишка осуществляется за счет дедифференцировки и пролиферации оставшихся в клоаке энтероцитов (Mashanov et al., 2005; Долматов, Машанов, 2007; Dolmatov, 2021).

Через 16-18 спэ зачатки кишки соединяются и образуют единую кишечную трубку. Полное восстановление утраченных органов происходит через 28-30 спэ, с это времени животное полноценно питается. В целом, формирование пищеварительной системы и АК происходит за счет преобразования клеток оставшихся после эвисцерации органов. Основой регенерации является эпителиальный морфогенез (Долматов, Машанов, 2007; Dolmatov, 2021).

***

Таким образом, известно, что гены *sfrp* имеют древнее происхождение и выполняют важные функции в развитии разнообразных животных. Тем не менее, роль этих генов в регенерации у взрослых животных остается слабо изученной. У хорошо регенерирующих животных, таких как планарии, представления о функциях *sfrp* ограничиваются данными об их экспрессии в ходе восстановления и отсутствуют функциональные эксперименты по их нокдауну. Голотурии, чьи хорошие регенераторные способности объясняются легкостью дедифференцировки эпителиальных клеток, также являются перспективными объектами для изучения роли *sfrp* в регенерации. К настоящему времени отсутствуют какие-либо исследования экспрессии и функций генов *sfrp* у голотурий.

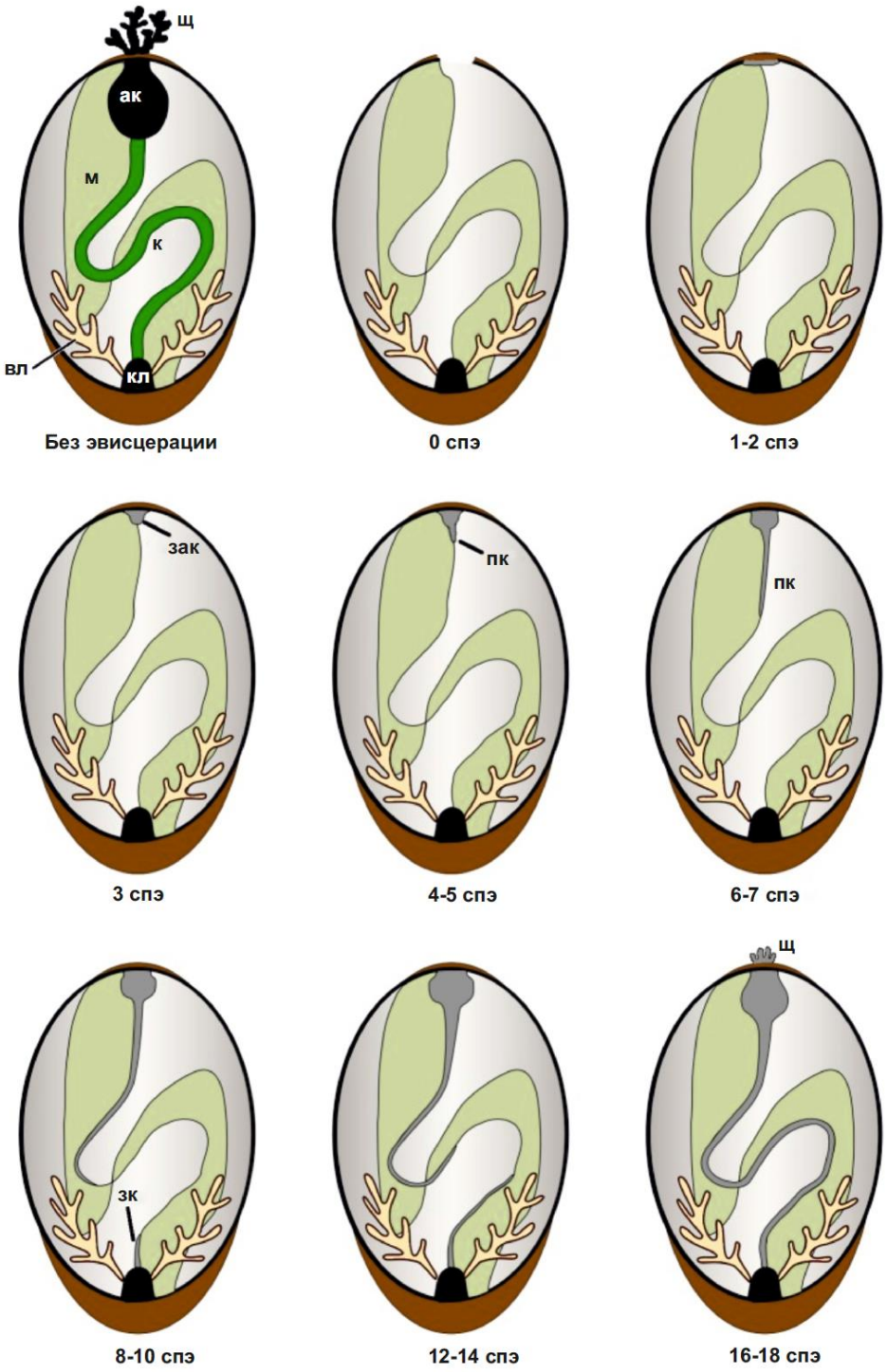


Рисунок 7 – Стадии регенерации внутренних органов после эвисцерации у голотурии *E. fraudatrix*. Условные обозначения: ак – аквафарингеальный комплекс, вл – водные легкие, зак – зачаток ак, зк – задний зачаток кишки, к – кишка, кл – клоака, м – кишечный мезентерий, пк – передний зачаток кишки, щ – щупальца (По: Lamash, Dolmatov, 2013, с изменениями).

2. Материалы и методы

2.1 Животные

Исследования проводились на взрослых особях голотурии *E. fraudatrix*. Сбор материала осуществлялся в заливе Петра Великого Японского моря сотрудниками водолазной службы ННЦМБ ДВО РАН. Отловленных животных помещали в аквариумы с аэрируемой морской водой. Эвисцерацию у голотурий вызывали инъекцией в полость тела 1% раствора KCl на дистиллированной воде. Для получения РНК, животных вскрывали вдоль правого вентрального радиуса, вырезали зачатки органов (АК и кишка) под бинокуляром (Leica ES2) и сразу же приступали к выделению РНК. Для гистологических экспериментов, животным предварительно делали инъекцию в полость тела соответствующего фиксатора, после чего препарировали под бинокуляром и помещали нужные органы в фиксатор.

2.2 Анализ транскриптома

В секвенированном ранее транскриптоме *E. fraudatrix* (Boyko et al., 2020) был проведен поиск транскриптов генов *sfrp* с помощью программы Ugene и алгоритмов tblastn, tblastx. Множественное выравнивание найденных последовательностей и их гомологов, найденных в базах данных NCBI, производили с помощью алгоритма MUSCLE. На основе выравнивания открытых рамок считывания производили построение филогенетических деревьев с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Оценку степени поддержки узлов осуществляли с помощью bootstrap анализа с 1000 репликами, модель эволюции – JTT, в программе Mega 6. Поиск белковых доменов осуществляли с помощью инструмента Conserved Domain NCBI (Conserved Domain Database, CCD).

2.3 Выделение РНК, синтез кДНК

Тотальное выделение РНК из АК и кишки проводили с помощью набора ExtractRNA (Евроген) в соответствии с протоколом производителя. Для гомогенизации материала использовали аппарат Tissue Lyser LT (Qiagen).

Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре BioSpec-nano (Shimadzu). Качество получаемой РНК проверяли с помощью горизонтального гель-электрофореза. Далее РНК обрабатывали ДНКазой I (ThermoScientific) с добавлением ингибитора РНКаз RiboLock (ThermoScientific). Очищенную с помощью магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter) РНК хранили при -70°С.

Синтез кДНК проводился с помощью набора MMLV RT kit (Евроген), с использованием 1мкг РНК и олиго(dT) праймеров по протоколу производителя. Реакция проходила при 37 ºС в амплификаторе C1000 Thermal Cycler (Bio Rad). После чего полученная кДНК хранилась при -20°С.

2.4 Электрофорез

Для горизонтального электрофореза использовали 1% агарозный гель. Электрофорез проходил в трис-ацетатном буфере при напряжении 4 В/см. В качестве маркера длин ДНК использовали Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Гель окрашивали в растворе бромистого этидия (Biotium) (0,5 мкг/мл) в течение 15 минут. Затем производили анализ геля с помощью трансиллюминатора ChemiDoc XRS+ (BioRad) и пакета программ ImageLab.

2.5 ПЦР в реальном времени

Для оценки экспрессии генов использовали кДНК полученную из АК и кишки в норме и из регенератов этих органов через 3, 5, 7, 10, 14 и 20 спэ. ПЦР осуществляли с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Для каждого срока регенерации использовали кДНК из 5 животных в 3 технических повторах.

Амплификация проходила в амплификаторе C1000 Thermal Cycler с CFX RT-System (Bio Rad) по следующему температурному профилю: этап 1 - 3 мин при 95ºC, этап 2 - 15 сек при 95ºC, этап 3 - 30 сек при 63ºC, этап 4 - 10 сек при 72ºC (снятие флуоресценции происходило на этапе элонгации). Этапы 2-4 повторяли 40 циклов, после чего строили кривую плавления продукта, увеличивая температуру денатурации с 60ºC до 95ºC с шагом в 0,5ºC. Результаты обрабатывались с помощью программ Bio-Rad CFX Manager 2.1 и Microsoft Excel. Данные анализировали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$.

В качестве референсных генов были использованы *tubulin, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha* (*eef1α*), и *actin*. Последовательности используемых в работе праймеров приведены в таблице 1. Для проверки достоверности изменения уровня экспрессии использовали статистический метод ANOVA с дальнейшим post hoc тестом Dunnet в программе Chris Rorden's ezANOVA v 0.98. На графиках данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD).

2.6 Гибридизация *in situ*

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) осуществляли как ранее было описано (Girich, 2023). Вкратце, амплифицированные кДНК фрагменты генов *sfrp* были клонированы в вектор Pal2T (Evrogen). В дальнейшем, линеаризованные с помощью ПЦР с M13 и геноспецифическими праймерами фрагменты были использованы в качестве матрицы для синтеза digoxigenin-labeled РНК зондов с использованием набора DIG dNTP RNA labeling mix (Roche) и SP6/T7 РНК полимераз (New England Biolabs).

Через 3, 5, 7, 10, 20 спэ животных фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA). Для каждого срока регенерации брали по 3 животных. Зачатки регенерирующих органов вырезали под бинокуляром Leica ES2. Далее их переводили в метанол и хранили при -20°C.

Таблица 1. Используемые в работе праймеры.

Ген	5’-3’ последовательность
Праймеры для ПЦР в реальном времени	
sfrp1/2/5	F: ACGGATAACGAAGCCGACAT R: AGCGAAGAGAGAACAGAGGAAG
sfrp3/4	F: GCTTGTCGGGACCAACTGTA R: GTTCATCACGGGCTCGCACC
Actin	F: CAGTCCGTGTCATGAAGGAA R: TTGCCGATGGTGATAACCTG
eef1a	F: ACATCAACATTGTGGTCATCGG R: ACGCTCAGCCTTCAGTTTGTCT
Tubulin	F: TCACCGCTATGTTCCGTCG R: ATTCCCCACCCTCATCCTC
Праймеры для ПЦР	
sfrp1/2/5	F: GCTTGTCGGGACCAACTGTA R: TTCCTGCGTTTTCTCTCAT
sfrp3/4	F: ACGGATAACGAAGCCGACAT R: CCTCTTTCGTTAGTCGTCGG
M13	F: CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG R: AGCGGATAACAATTTCACACA

После регидратации и обработки протеиназой К (Евроген), зачатки инкубировали с РНК-зондами при 55°C в течение ночи. На следующий день, производили блокировку с использованием 10% овечьей сыворотки и инкубировали с alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibodies (Roche) в течение ночи. На 3 день отмывали избыток антител и добавляли субстрат для щелочной фосфатазы. Окрашенные ткани хранили в 4% PFA при 4°C. Для изготовления замороженных срезов окрашенные зачатки отмывали PBS, затем

помещали в среду для заморозки NEG 50 (Thermo Scientific). Срезы толщиной 50 мкм получали на криостате Cryo Star HM 560 MV (Thermo Scientific) и заключали в глицерин. Для фотофиксации результатов гибридизации использовали стерео микроскоп SteREO Discovery.V12 (Carl Zeiss) и микроскоп Axio imager A2 (Carl Zeiss).

2.7 Дизайн siRNA

С помощью программы siDirect2 был осуществлен подбор small interfering RNA (siRNA) к последовательностям транскриптов *sfrp*, а также *eef1a*. Последний является геном домашнего хозяйства и в связи с этим его нокдаун служил положительным контролем в опытах. Дополнительно были сгенерированы неспецифические последовательности siRNA меченные с 5’ конца флуоресцентным красителем 6-карбоксифлуоресцеином (FAM), которые в дальнейшем использовали для оценки эффективности электропорации. Синтез siRNA осуществлялся компанией Синтол (Syntol LLC). Последовательности используемых в работе siRNA приведены в Таблице 2. Полученные олигонуклеотидные последовательности были разведены в Duplex Buffer (30 мМ HEPES, 100 мМ ацетат калия, pH 7.5). Для получения двухцепочечной siRNA был проведен отжиг комплементарных последовательностей: нагрев до 94°C на 2 мин и охлаждение при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученную siRNA хранили при -20°C.

Таблица 2. Используемые в работе siRNA.

Мишень	5’-3’ последовательность
Неспецифический зонд	ACGUGACACGUUCGGAGAAUU UUCUCCGAACGUGUCACGUUU
Неспецифический флюоресцентно-меченый зонд	(FAM)-ACGUGACACGUUCGGAGAATT (FAM)-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
sfrp1/2/5	Guide: AGUUCAAUUUCUUUAGAUCCU Passenger: GAUCUAAAGAAAUUGAACUUC
sfrp3/4	Guide: UUGUUAUAUGGUAAUGAGCUA Passenger: GCUCAUUACCAUAUAACAAGA
eef1a	Guide: UUCACAUUAGCAUAGUUACCU Passenger: GUAACUAUGCUAAUGUGAACU

2.8 Трансфекция siRNA электропорацией

Электропорацию siRNA для каждого гена проводили дважды – через 3 и 4 спэ. Через 3 сут после последней трансфекции (7 спэ) животных фиксировали для гистологического анализа. Перед электропорацией, siRNA зонд разводили в 100 раз в буфере для электропорации (180 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.8 мМ $CaCl_2$, и 5 мМ HEPES, pH 7.2) до концентрации 1 мкМ. В полость тела голотурии вводили 500 мкл полученной смеси, после чего осуществляли трансфекцию с помощью электропоратора BTX ECM 830 (Harvard Apparatus). Использовали электроды BTX Genetrodes Model 508 (Harvard Apparatus). Сразу после инъекции раствора siRNA вводили электроды в переднюю часть животного, так, чтобы один из электродов оказался в области регенерирующего АК, а второй под ним, расстояние между электродами устанавливали 5 мм.

Использовали следующие параметры тока: напряжение – 15 V; 7 импульсов длительностью 45 мс; интервал между импульсами 950 мс. Группе негативного контроля вводили буфер, содержащий неспецифическую siRNA,

группе положительного контроля инъецировали siRNA для нокдауна *eef1a* и также подвергали электропорации.

2.9 Фиксация и микроскопия

Фиксацию животных после нокдауна проводили в 4% PFA, в течение суток при 4 °C, после чего материал хранили в PBS. Фиксированные образцы помещали в среду NEG 50 (RichardAllan Scientific) на 1 сут, после чего изготавливали срезы толщиной 18 мкм с помощью криостата CryoStar HM 560MV. Ткани докрашивали метиленовым синим, после чего фотографировали с помощью микроскопа Axio imager A2 (Carl Zeiss). Для конфокальной микроскопии ядра окрашивали флуоресцентным красителем DAPI. Изучение и фотографирование препаратов проводили на конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss).

Для получения полутонких срезов материал фиксировали в 4% глутаральдегиде, обезвоживали в этаноле и ацетоне и заливали в смесь аралдита М и эпона 812 по стандартной методике. Срезы толщиной 1 мкм изготавливали на ультрамикротоме LKB, и докрашивали 1% раствором метиленового синего, после чего фотографировали с помощью микроскопа Leica DM 4500. Для построения 3D модели регенератов нервов использовали программы Slicer и ImageJ, анализируя серийно полученные замороженные срезы. Анализ полученных в ходе экспериментов фотографий проводили в программах Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss), Adobe Photoshop и Image Composite Editor.

Всего в экспериментах, нацеленных на изучение фенотипических эффектов после нокдауна *sfrp*, было задействовано 4 группы животных (нокдаун *sfrp1/2/5, sfrp3/4* и 2 контрольных), каждая из которых состояла из 8 животных. Из этих 8, для получения замороженных срезов использовали материал, полученный из 5 животных, для полутонких – из 3.

3. Результаты

3.1 Филогения

В ходе анализа транскриптома голотурии *E. fraudatrix* были найдены транскрипты двух генов семейства *sfrp*. В результате построения филогенетического дерева для кодируемых ими аминокислотных последовательностей, была выявлена их кластеризация с гомологами других вторичноротых **(Рисунок 8А)**. При этом один из генов *sfrp* группируется с генами *sfrp1*, *sfrp2* и *sfrp5* млекопитающих. В этой связи его можно определить как *sfrp1/2/5* (OL345590). Второй ген кластеризуется с генами *sfrp3* и *sfrp4* млекопитающих и может быть определен как *sfrp3/4* (OL345591). Выявленные транскрипты содержат полную кодирующую последовательность: 1176 нт для *sfrp1/2/5*, и 1038 нт для *sfrp3/4*.

Предполагаемые белки SFRP1/2/5 и SFRP3/4 состоят из 392 и 346 аминокислот соответственно. Согласно blastp, их уровень аминокислотной идентичности ортологичным последовательностям морской звезды *Patiria pectinifera* составляет 46-47% **(Рисунок 8Б)**.

3.2 Анализ экспрессии генов при регенерации

По данным ПЦР в реальном времени, исследуемые гены экспрессируются на всех сроках регенерации, как в кишке, так и в АК, однако их уровни экспрессии несколько отличаются (**Рисунок 9**).

Так, при регенерации АК, экспрессия *sfrp3/4* увеличивается через 3 спэ и достигает максимальных значений через 5 спэ (в 3,5 раза выше нормы). В дальнейшем экспрессия этого гена резко снижается и не отличается от нормы вплоть до 20 спэ. Количество транскриптов *sfrp1/2/5* через 3 спэ увеличивается в 4 раза, и держится выше нормы до конца эксперимента, уменьшаясь через 7 спэ и снова увеличиваясь через 14 спэ.

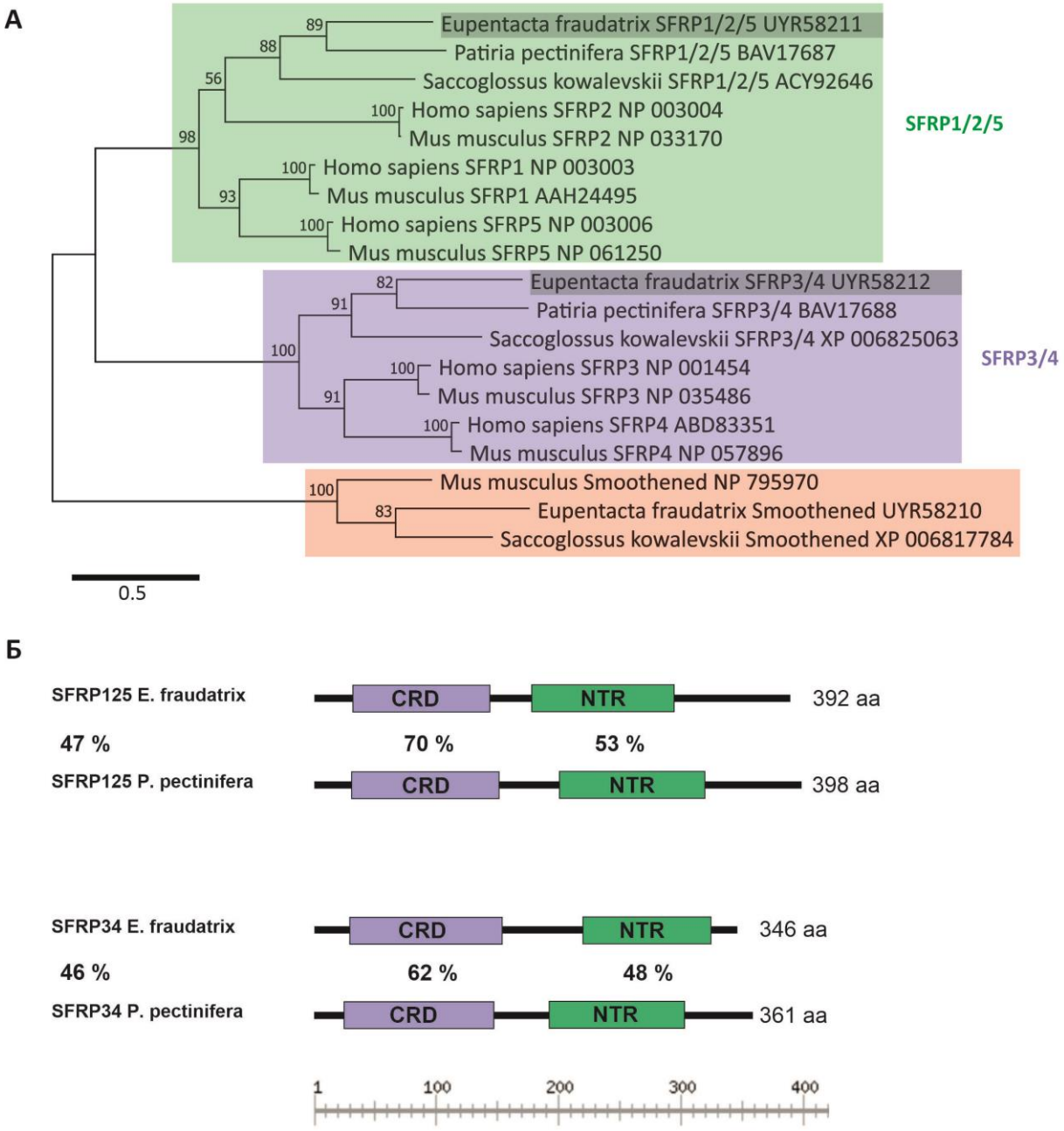


Рисунок 8 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей SFRP вторичноротых и предполагаемая доменная организация SFRP *E. fraudatrix* и *P. pectinifera*. **(А)** Дендрограмма, построенная по методу максимального правдоподобия (Maximum likelihood). Для каждой последовательности приведен ID из NCBI. Серым выделены последовательности *E. fraudatrix.* Цифрами показана оценка статистической достоверности узла на основе bootstrap-анализа, > 50%. Шкала в количестве замен на позицию. Последовательности белков Smoothened использованы в качестве внешней группы. **(Б)** Схематическое выравнивание доменов. Процентами показан общий процент идентичных аминокислот в белках, а также по отдельным доменам.

Через 3 спэ в зачатке кишки происходит возрастание количества транскриптов исследуемых генов. Количество транскриптов *sfrp3/4* резко

увеличивается, (в 19 раз относительно нормы) и сохраняется на высоком уровне на всем протяжении регенераторного процесса. Ген *sfrp1/2/5* в этот период увеличивают экспрессию в 3-4 раза, а затем, через 5 спэ экспрессия возвращается к уровню нормы и сохраняет подобные значения в течение всего эксперимента.

В целом, полученные данные о дифференциальной экспрессии свидетельствуют, что *sfrp* принимают участие в регенераторных процессах.

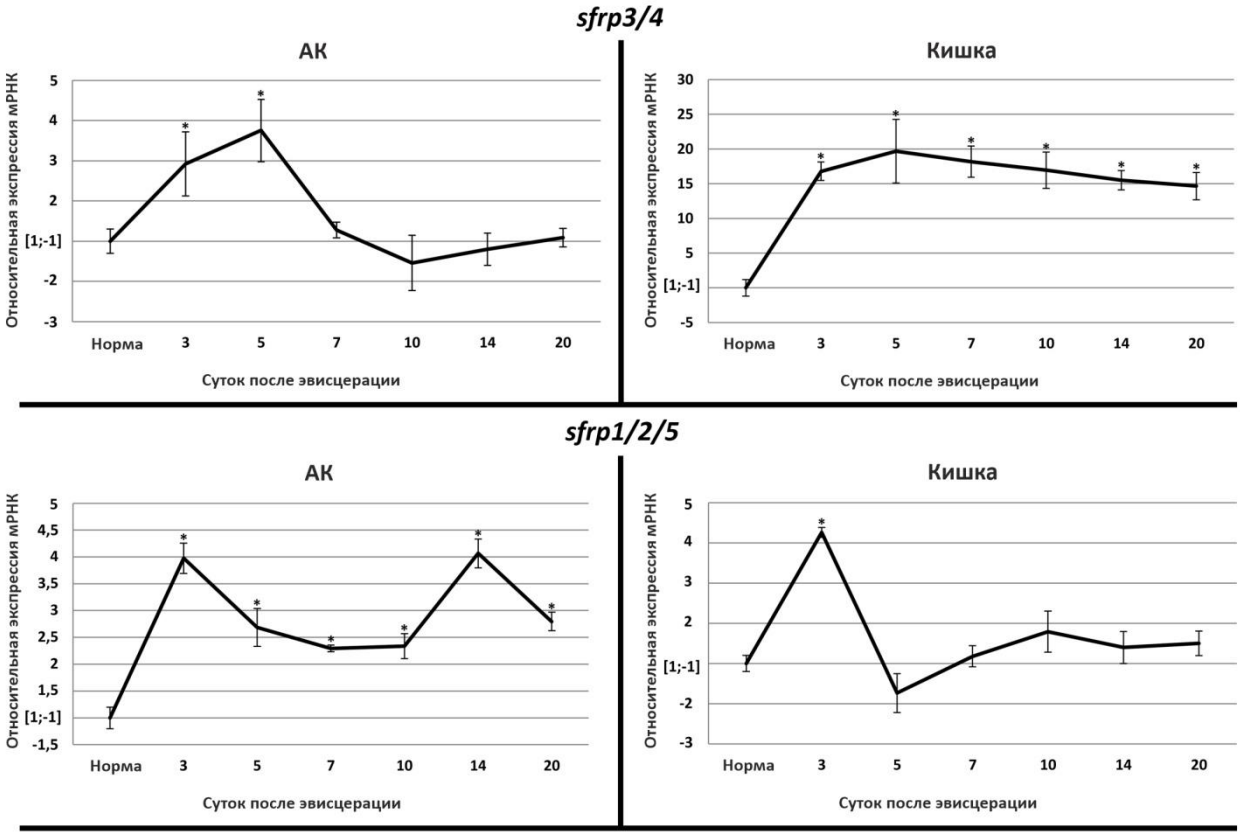


Рисунок 9 – Динамика экспрессии генов *sfpr3/4* и *sfrp1/2/5* при регенерации кишки и АК у *E. fraudatrix*. Значения нормализованы относительно среднего значения экспрессии в норме. В качестве референсных генов использовали *tubulin* и *eef1a*. Данные представлены как среднее ± SD (n = 5). *p < 0.05 (ANOVA, post hoc тест Dunnet) (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

Для того чтобы получить более полное представление о функциях этих генов мы также изучили пространственную локализацию их транскриптов во время регенерации с помощью WISH. Согласно данным гибридизации, *sfrp3/4* экспрессируется в клетках целомического эпителия мезентерия через 5 спэ и в дальнейшем детектируется там вплоть до 20 спэ (**Рисунок 10**). При

регенерации АК, через 5 спэ экспрессия отмечается во внутреннем (амбулакральном) эпителии раздвоенных концов радиальных амбулакральных каналов, на этих сроках регенерации постепенно растущих навстречу друг к другу. Через 7 спэ транскрипты *sfrp3/4* маркируют полностью замкнувшийся амбулакральный кольцевой канал, а через 10 спэ они детектируются в зачатках полиевых пузырей. Кроме того, транскрипты *sfrp3/4* присутствуют в клетках целомического эпителия мезентерия и интеррадиальных участков АК. Через 20 спэ экспрессия сохраняется только в целомическом эпителии АК и мезентерия.

Транскрипты *sfrp1/2/5* через 3 спэ локализуются в целомическом эпителии кишечного мезентерия и интеррадиусов зачатка АК. При этом в передней части АК, где клетки целомического эпителия еще не дедифференцировались, продукты *sfrp1/2/5* выявляются как в перитонеальных, так и миоэпителиальных клетках. Об этом свидетельствуют 2 зоны экспрессии, различимые на замороженных срезах. Целомический эпителий голотурий является однослойным многорядным, его базальная часть представлена в основном миоэпителиальными клетками, а апикальная часть перитонеоцитами (Mashanov et al., 2005; Dolmatov, 2021). Соответственно нижняя зона экспрессии соответствует цитоплазме миоэпителиальных клеток, верхняя – цитоплазме перитонеоцитов. Через 5-7 спэ *sfrp1/2/5* экспрессируется в клетках, которые маркируют широкую полосу в районе развития амбулакрального кольцевого канала. Через 10 спэ, транскрипты *sfrp1/2/5* находятся в целомическом эпителии всей задней части зачатка АК и переднего зачатка кишки. Кроме того, продукты этого гена также обнаруживаются в радиальных амбулакральных каналах зачатка АК, переходящих на стенку тела.

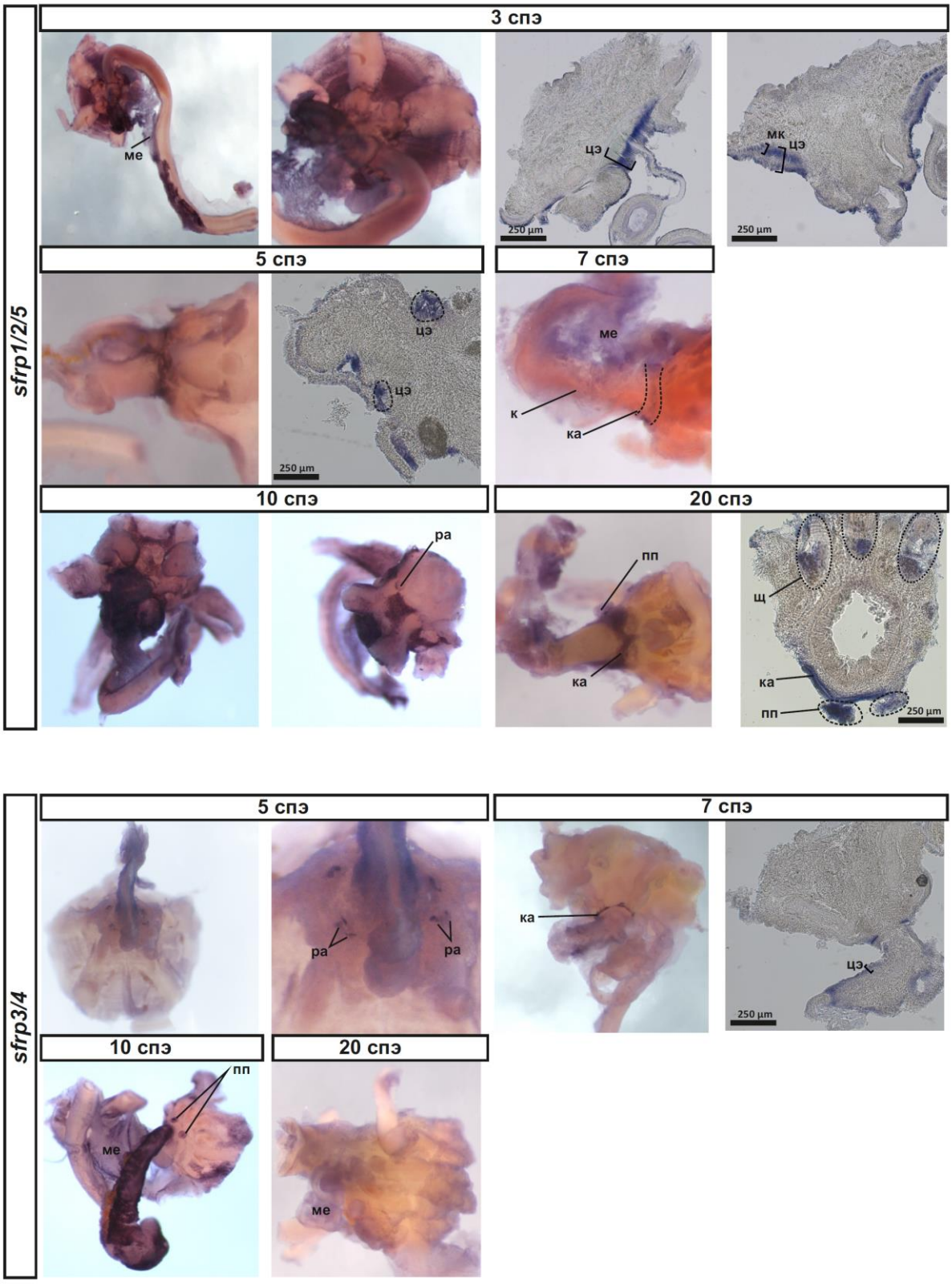


Рисунок 10 – Паттерны экспрессии *sfrp* при регенерации кишки и АК у *E. fraudatrix*. Условные обозначения: ка – кольцевой амбулакральный канал, мк – миоэпителиальные клетки пп – полиев пузырь, ра – радиальный амбулакральный канал, цэ – целомический эпителий; щ – щупальцевый канал. Для замороженных срезов приведен масштаб, 250 мкм (По: Sadriev, 2025, с изменениями).

Через 20 спэ транскрипты *sfrp1/2/5* обнаруживаются в амбулакральном и целомическом эпителиях амбулакрального кольца и его производных – полиевых пузырях. Еще этот ген экспрессируется в концевых участках радиальных амбулакральных каналов и отходящих от них щупальцевых каналах. Также экспрессия сохраняются в целомическом эпителии кишки, особенно в месте прикрепления мезентерия.

Стоит отметить, что согласно данным WISH, в норме в кишке и АК отсутствуют явные паттерны экспрессии *sfrp,* что может свидетельствовать о том, что возможно данные гены не вовлечены в физиологическую регенерацию данных органов **(Приложение 1)**.

3.3 Нокдаун генов

В результате экспериментов с флюоресцентно-меченным FAM-зондом были подобраны оптимальные условия для электропорации, которые, с одной стороны, обеспечивали трансфекцию большого числа клеток, а с другой, не вызывали значимых нарушений регенерационного процесса. Так, выявлено, что при воздействии небольшого напряжения (15V), и электропорации FAM зонда, либо неспецифической siRNA, размер и морфология АК через 7 спэ соответствуют нормальной регенерации (**Рисунок 11А, Б**). Видна формирующаяся амбулакральная система АК с кольцевым амбулакральным каналом и щупальцевыми каналами (**Рисунок 11А, Б, В**). Строение АК типично для данной стадии регенерации (**Рисунок 11В**), его длина составляет около 4,6 мм. Радиальные мышцы формируют мускулы-ретракторы АК. Кишка также развивается нормально (**Рисунок 11Г**) и соединяется с АК.

При выбранных параметрах электропорации (см. гл. 2.8) зонд с FAM меткой обнаруживался в клетках целомического эпителия, гиподерме стенки тела и соединительной ткани регенерирующих органов (**Рисунок 11Д, Е**).

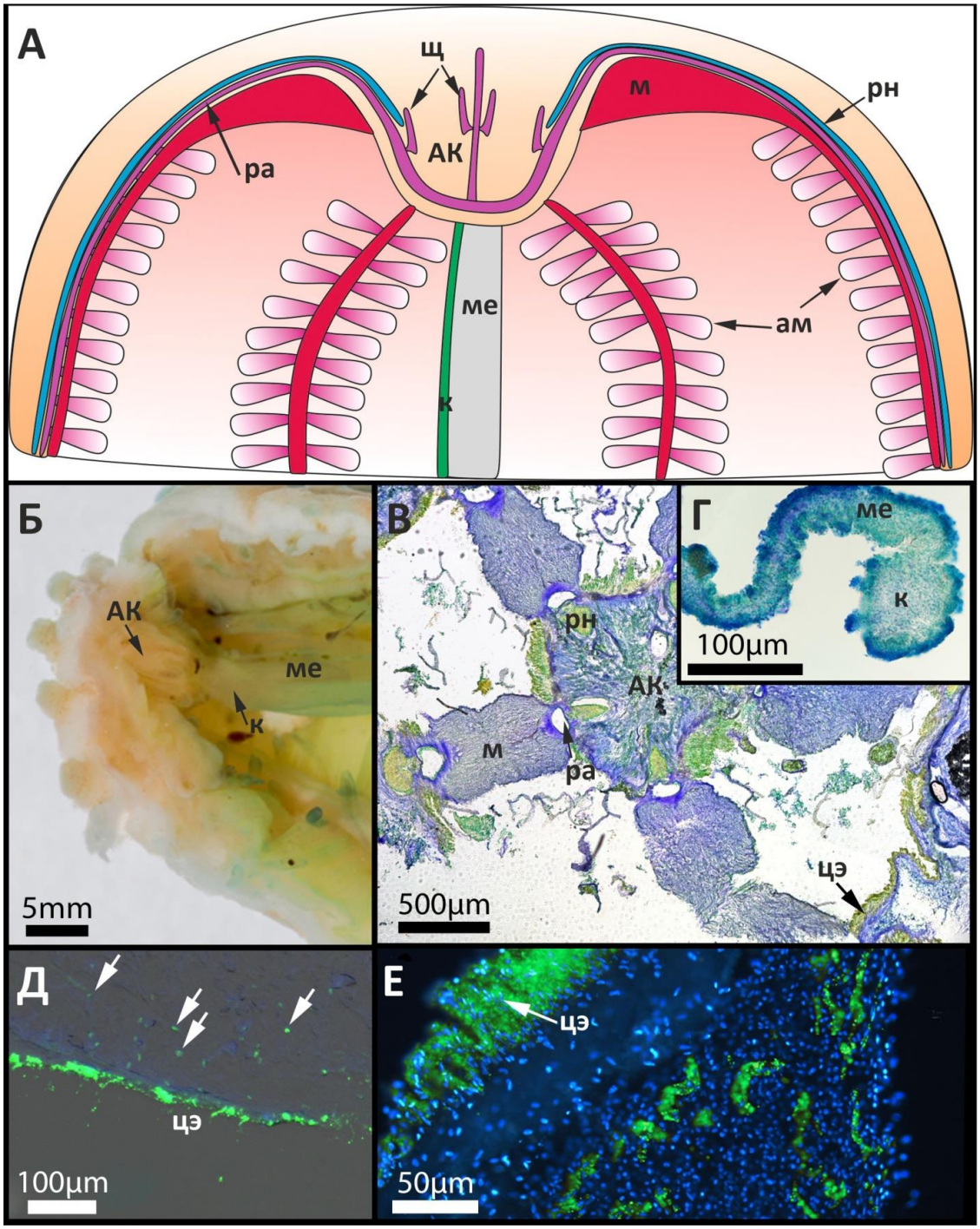


Рисунок 11 – Строение регенерирующих АК и кишки после электропорации с контрольной неспецифической siRNA **(А-Г)** и FAM зондом **(Д-Е)** через 7 спэ. **(А)** Схема регенерата АК и кишки. **(Б)** Общий вид регенерата, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки, окраска метиленовым синим. **(Д)** FAM зонд в клетках целомического эпителия и одиночных клетках в АК (указаны стрелкой). **(Е)** FAM зонд в клетках целомического эпителия и соединительной ткани стенки тела. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв, цэ – целомический эпителий, щ – щупальцевые каналы. **В-Е** – замороженные срезы (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

По данным ПЦР в реальном времени, после трансфекции специфических siRNA происходит снижение экспрессии исследуемых генов в зачатке АК. У *sfrp1/2/5* количество транскриптов уменьшилось более чем в 6 раз. В то же время экспрессия *sfrp3/4* снизилась лишь в 1,8 раза (**Рисунок 12)**.

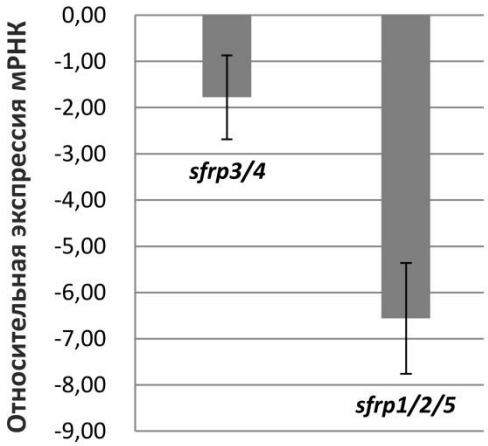


Рисунок 12 – Изменение относительного уровня экспрессии генов *sfrp3/4* и *sfrp1/2/5* после нокдауна в регенерирующем АК на 7 спэ. Значения были нормализованы по референсным генам *tubulin* и *actin*. Значения уровня экспрессии после трансфекции неспецифической siRNA приняты за ноль. Данные представлены как среднее ± SD (n = 3) (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

Нокдаун eef1a

После трансфекции siRNA к *eef1a*, через 7 спэ у голотурий не был сформирован зачаток АК **(Рисунок 13А, В)**. На переднем конце тела амбулакры соединяются и частично вворачиваются вовнутрь, образуя небольшое утолщение, длиной около 0,4 мм (**Рисунок 13Б**). На конце утолщения видны разрушенные ткани и аморфные клеточные скопления **(Рисунок 13Д)**. При этом целомический эпителий и в большей степени нервы и мышцы сохраняют целостность структуры. На свободном крае мезентерия формируется зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения **(Рисунок 13Г)**.

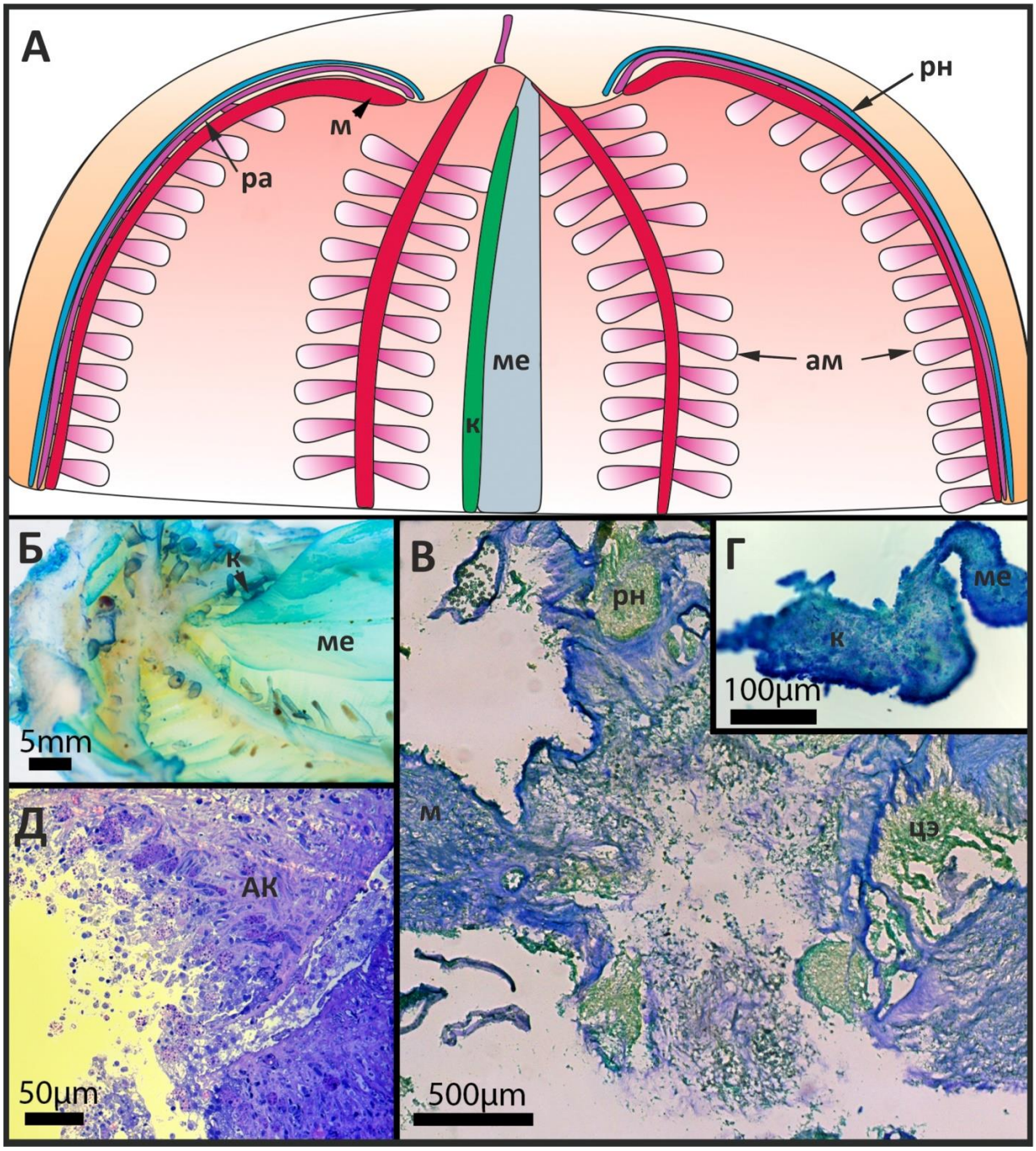


Рисунок 13 – Нарушения регенерации после нокдауна *eef1a*. **(А)** Схема зачатка АК после нокдауна. **(Б)** Общий вид зачатков АК и кишки, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки, окраска метиленовым синим. **(Д)** Разрозненные клетки в зачатке АК, окраска метиленовым синим. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв. **В**, **Г** – замороженные срезы, **Д** – полутонкий срез (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

Нокдаун sfrp3/4

При нокдауне *sfrp3/4* зачаток АК не сформирован **(Рисунок 14А-В)**, однако присутствует зачаток кишки в виде соединительно-тканного утолщения по краю мезентерия **(Рисунок 14Г)**. В концевых отделах амбулакров сохраняются только целомический эпителий, амбулакральный канал и радиальный нервный тяж, а соединительная ткань разрушается и местами отсутствует **(Рисунок 14В)**. Размер такого аберрантного образования не превышает 0,5 мм. У некоторых голотурий (3 из 5) наблюдается асимметрия формирующегося регенерата АК. Построенная 3D модель радиальных нервов показывает, что зачаток АК закладывается, загибаясь к вентральной стороне животного **(Рисунок 14Д)**. Нервы и мышцы рядом с мезентерием укорочены. Такого эффекта не наблюдается при нокдауне других генов.

Нокдаун sfrp1/2/5

При нокдауне *sfrp1/2/5* формируется соединительнотканный зачаток АК, однако, с отставанием от нормального развития **(Рисунок 15А)**. Его длина в два раза короче таковой у контрольных животных и составляет примерно 2 мм **(Рисунок 15Б)**. В формирующемся АК отсутствуют зачатки органов амбулакральной и нервной систем – каналы щупалец, кольцевой амбулакральный канал, нервное кольцо **(Рисунок 15 А, В)**. По краю мезентерия развивается зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения **(Рисунок 15Г)**. В центральной части регенерата обнаружена область плотной соединительной ткани **(Рисунок 15Д)**.

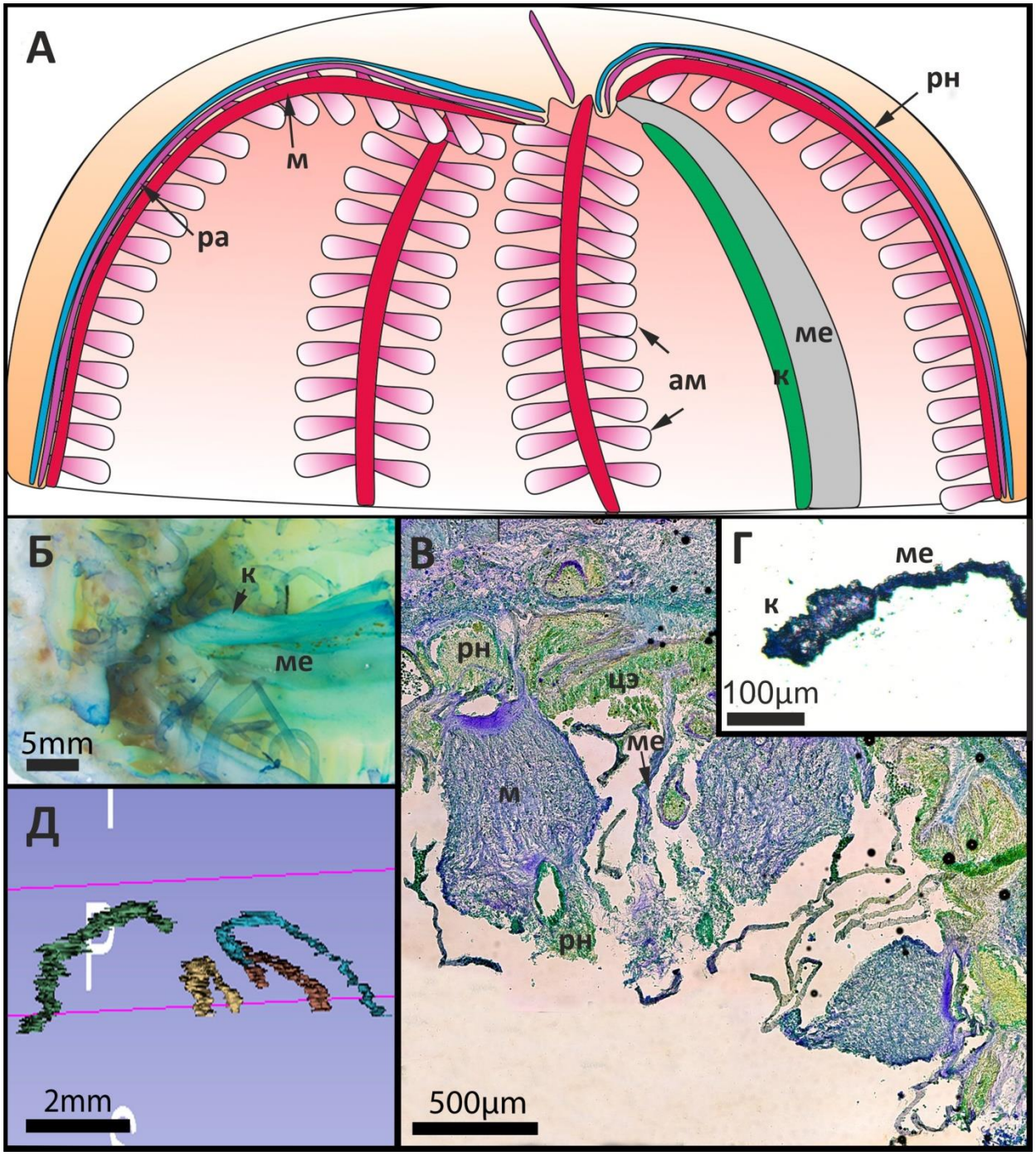


Рисунок 14 – Нарушения регенерации после нокдауна *sfrp3/4*. **(А)** Схема зачатка АК после нокдауна. **(Б)** Общий вид зачатков АК и кишки, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки, окраска метиленовым синим. **(Д)** 3D модель радиальных нервов, переходящих со стенки тела на зачаток АК. Условные обозначения: ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв, цэ – целомический эпителий. **В**, **Г** – замороженные срезы (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

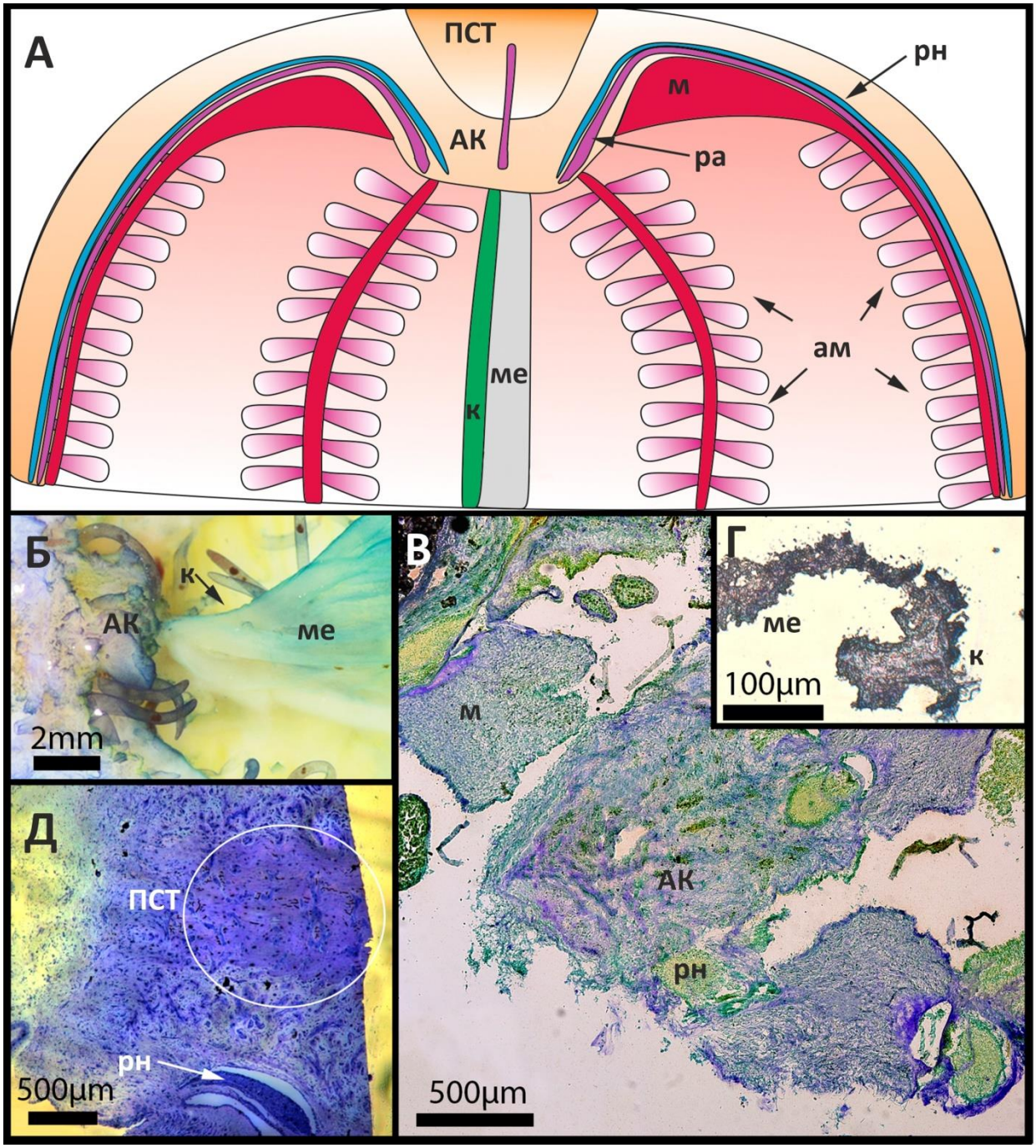


Рисунок 15 – Нарушения регенерации после нокдауна *sfrp1/2/5*. **(А)** Схема зачатка АК после нокдауна. **(Б)** Общий вид зачатков АК и кишки, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки. **(Д)** Срез зачатка АК с плотным соединительнотканным образованием, окраска метиленовым синим. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв, ПСТ – плотная соединительная ткань. **В**, **Г** – замороженные срезы, **Д** – полутонкий срез (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

4. Обсуждение

Наше исследование показало, что у *E. fraudatrix* имеется 2 представителя семейства *sfrp: sfrp3/4* и *sfrp1/2/5*, что, по-видимому, характерно для иглокожих (Leclère, Rentzsch, 2012; Yan et al., 2014; Kawai et al., 2016). Кодируемые данными генами белки SFRP имеют типичную для членов данного семейства доменную организацию – состоят из 2 доменов: CRD и NTR.

Изменения уровня экспрессии исследуемых генов показывают, что они вовлечены в процессы регенерации. Оба этих гена увеличивают экспрессию в регенерирующем АК через 3-5 спэ. В это время у голотурий идет активная дедифференцировка и миграция клеток целомического эпителия стенки тела и структур амбулакра (Dolmatov, 1992). Кроме того, в этот период начинает закладываться зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения.

По данным WISH, во время регенерации у *E. fraudatrix* *sfrp* экспрессируются исключительно в мезодермальных производных, в первую очередь в целомическом эпителии **(Рисунок 16)**. При регенерации кишки оба *sfrp* экспрессируются в покрывающем ее целомическом эпителии. При регенерации АК паттерны их экспрессии уже существенно отличаются, в отличие от *sfrp3/4*, *sfrp1/2/5* транскрибируется в еще дифференцированных через 3 спэ миоэпителиальных клетках целомического эпителия АК, а через 20 спэ в клетках щупальцевых каналов и полиевых пузырей. В целом, при регенерации амбулакральной системы, зоны экспрессии *sfrp1/2/5* несколько шире, чем у *sfrp3/4*. Экспрессия последнего отчетливо ассоциирована с местами бифуркации амбулакральной системы – его транскрипты через 5 спэ маркируют места раздвоения амбулакральных каналов и места ответвления полиевых пузырей от кольцевого амбулакрального канала через 10 спэ.

Потенциально, SFRP могут участвовать в регуляции пролиферации, миграции и дифференцировке и/или дедифференцировке клеток целомического и амбулакрального эпителиев через переключение сигнальных путей Wnt.

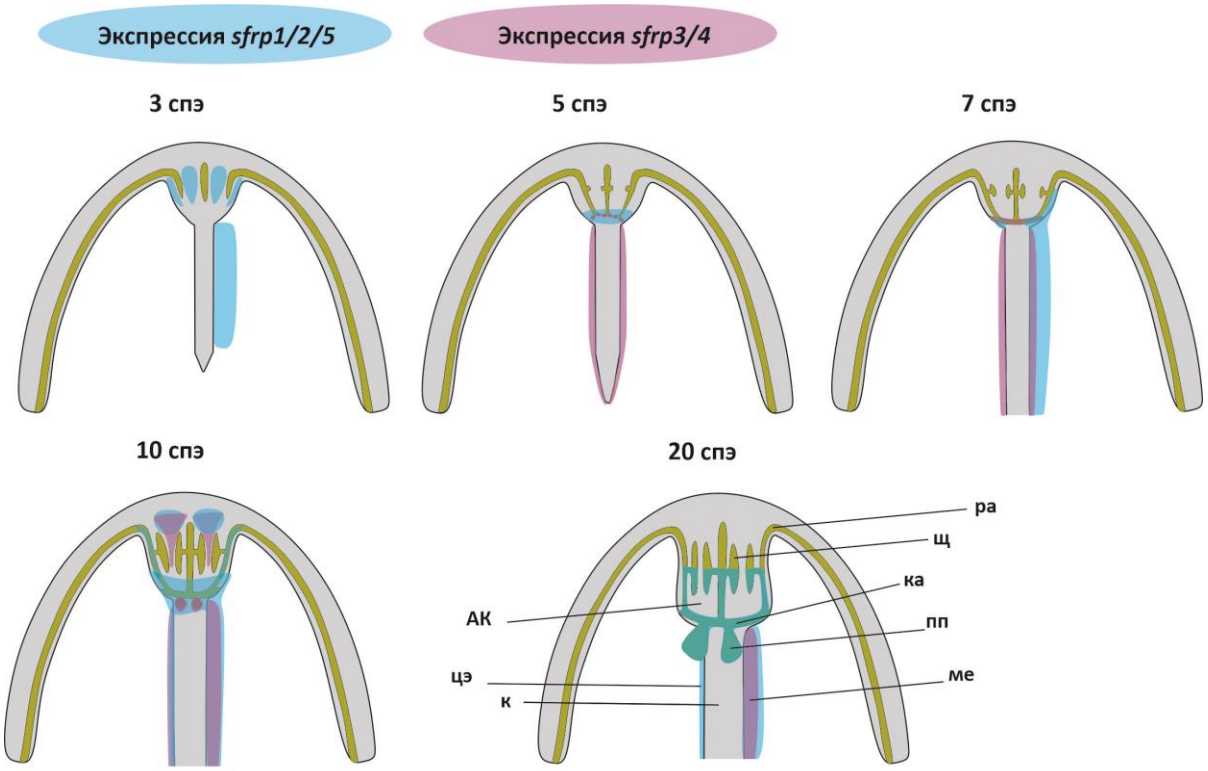


Рисунок 16 – Схема паттернов экспрессии *sfrp*. Транскрипты обоих генов присутствуют в клетках целомического и амбулакрального эпителиев. Целомический эпителий выстилает поверхность кишки, АК и мезентерия. Амбулакральный эпителий выстилает внутреннюю поверхность кольцевого амбулакрального канала, полиевых пузырей и радиального амбулакрального канала, который переходит в щупальцевые каналы. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, к – кишка, ка – кольцевой амбулакральный канал, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, пп – полиев пузырь, цэ – целомический эпителий, щ – щупальцевый канал (По: Sadriev, 2025, с изменениями).

Целомический эпителий играет ключевую роль в регенерации у иглокожих, поскольку является источником множества клеточных популяций (Dolmatov, 2021), в некоторых работах его считают источником мультипотентных клеток (Guatelli et al., 2022). Данный эпителий у голотурий представлен миоэпителиальными, перитонеальными и вакуолярными клетками, среди которых встречаются нейроны со своими отростками, формируя базиэпителиальный нервный плексус (Долматов, Машанов 2007).

То, что посредством SFRP может происходить переключение между каноническим Wnt/β-catenin и неканоническими путями Wnt/Ca2+ или planar

cell polarity (PCP) путями было продемонстрировано в ходе опытов на различных позвоночных (Brinkmann et al., 2016; Hsueh et al., 2021).

Согласно данными компьютерного моделирования, все человеческие белки SFRP сильно отличаются друг от друга по аффинности в отношении белков Wnt (Agostino, Pohl, 2019). Различные SFRP у человека и других позвоночных могут иметь противоположные функции, блокируя либо канонический Wnt сигналинг, либо неканонический (Bovolenta et al., 2008; Cruciat, Niehrs, 2013). Важнейшей функцией неконического пути Wnt/PCP является регуляция клеточной миграции через реорганизацию актинового цитоскелета и формирование ламеллоподий и филоподий. SFRP в качестве модуляров этого пути участвуют в данном процессе (Dufourcq et al., 2008; Guan et al.,2021).

Во время регенерации после эвисцерации дедифференцированные клетки целомического эпителия мигрируют со стенки тела на зачатки АК и кишки. В результате восстанавливается целомическая выстилка этих внутренних органов. (Долматов, Машанов 2007). Дедифференцировка клеток целомического сопровождается существенной перестройкой цитоскелета клеток – миоэпителиальные клетки теряют свои миофиламенты, а перитонеоциты разрушают промежуточные филаменты. Только после такой перестройки клетки целомического эпителия приобретают способность к миграции (Mashanov, García-Arrarás, 2011; Dolmatov, 2021).

Можно предположить, что сигнальный путь Wnt/β-catenin регулирует дифференцировку и пролиферацию клеток целомического эпителия, оставшихся после эвисцерации, а с помощью SFRP происходит выключение канонического пути и активируется путь Wnt/PCP, в результате чего эпителиальные клетки дедифференцируются и обретают способность к миграции. Достигнув «места назначения» клетки посредством SFRP ингибируют путь Wnt/PCP и снова активируют путь Wnt/β-catenin, начинают процесс пролиферации или дифференцировки, теряют способность к миграции и образуют постоянные механические и гуморальные контакты с элементами

тканевого окружения. Ранее, в опытах с эксплантами кишки голотурии *H. glaberrima* было продемонстрировано, что канонический Wnt сигналинг регулирует пролиферацию клеток экспланта (Alicea-Delgado, García-Arrarás, 2021; Medina-Feliciano, García-Arrarás, 2021).

Для проверки данного предположения необходимы дальнейшие исследования, выполненные на более поздних сроках регенерации, поскольку к 7 спэ целомический эпителий кишки все еще остается в значительный степени недифференцированным и сложно судить, как нокдаун *sfrp* сказался на фенотипе миоэпителиальных и перитонеальных клеток, основных компонентов целомического эпителия. В этот период регенерации кишки у голотурий основным процессом является накопление внеклеточного матрикса по краю мезентерия. Формирование кишечного эпителия через 7 спэ только начинается (Долматов, Машанов 2007).

Начальные этапы формирования кишки и АК у *E. fraudatrix* во многом сходны (Dolmatov, 1992; Leibson, 1992; Долматов, Машанов 2007). Основу морфогенеза составляют дедифференцировка клеток целомического эпителия и синтез внеклеточного вещества, в результате чего образуется соединительно-тканная основа органов – соединительнотканное утолщение по краю мезентерия (кишка) и скопление внеклеточного матрикса между концами амбулакров (АК) (Долматов, Машанов 2007). Поскольку согласно данным гибридизации, *sfrp* не экспрессируются в кишечном эпителии через 10 или 20 спэ, а нокдаун не повлиял на формирование соединительнотканного зачатка кишки, можно предположить, что при регенерации кишки *sfrp* не принимают значимого участия в ремоделировании ВКМ и формировании кишечного эпителия.

В наших экспериментах нокдаун генов *eef1a, sfrp3/4* и *sfrp1/2/5* не влиял на ранние этапы развития пищеварительной системы. Вне зависимости от того, какой ген отключался, зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения формировался по краю мезентерия. Ранее считалось, что поскольку зачаток кишки берет начало от растущего АК то, соответственно, его

восстановление зависит от АК (Dolmatov 1992; Mashanov et al., 2004; Mashanov, Garcia-Arraras, 2011). Однако образование зачатка кишки при нарушении развития АК говорит о том, что механизмы формирования соединительнотканных зачатков кишки и АК достаточно независимы и, возможно, запускаются разными индукторами. Вероятно, это связано с происхождением и эволюцией механизмов регенерации внутренних органов у голотурий (Dolmatov, 2020). У голотурий с бесполым размножением, после разделения пополам в заднем фрагменте голотурий АК и передняя часть кишки регенерируют независимо друг от друга (Dolmatov, 2014; Kamenev, Dolmatov, 2017; Dolmatov, 2020).

В ходе данного исследования впервые для голотурии *E. fraudatrix* была осуществлена трансфекция siRNA с помощью электропорации. До этого, подобное было осуществлено для голотурии *H. glaberrima* (Mashanov et al., 2015; Alicea-Delgado, García-Arrarás, 2021). Но в отличие от работ, в которых трансфекция предназначалась лишь для отдельных анатомических структур, например радиального нерва, в нашей работе продемонстрированы более широкие возможности данного подхода.

Из двух генов *sfrp* наиболее существенные нарушения морфогенеза отмечаются при нокдауне *sfrp3/4.* Вероятно, при регенерации АК *sfrp3/4* участвует в ремоделинге ВКМ. Эффект от нокдауна *sfrp3/4* распространяется исключительно на соединительную ткань. Поскольку при регенерации АК *sfrp3/4* экспрессируется в целомическом и амбулакральном эпителиях, можно ожидать, что эти ткани секретируют факторы, приводящие к наблюдаемым нарушениям. Ранее было показано, что важную роль в регенерации и ремоделировании соединительной ткани у голотурий играют различные ММП, которые секретируются эпителиями восстанавливающихся органов (Lamash, Dolmatov, 2013; Dolmatov et al., 2019).

Известно, что у позвоночных SFRP могут влиять на активность ММП секретируемых эпителиальными клетками. Считается, что SFRP способны взаимодействовать с ММП семейства Tolloid, которые играют важную роль в

ремоделировании ВКМ, и в частности, в процессинге коллагена. Отмечается, что в зависимости от своей концентрации и существующего тканевого контекста SFRP могут проявлять как профиброзную так и антифиброзную активность (Chang, 2016; Wu et al., 2020).

Возможно, что сайленсинг *sfrp3/4* приводит к сверхэкспрессии и/или гиперактивации ММП секретируемых эпителием. Это, в свою очередь, приводит к разрушению соединительной ткани на переднем конце животного, а также нарушению взаимодействия клеток с ВКМ. Кроме того, *sfrp3/4* через 5 спэ маркирует места раздвоения амбулакральных каналов, где как раз должен происходить активный ремоделинг ВКМ **(Рисунок 16)**, для того чтобы концы амбулакральных каналов могли расти навстречу друг другу и формировать единый амбулакральный кольцевой канал.

В какой-то степени процесс формирования амбулакральный системы можно сравнить с процессами формирования кровеносных сосудов у позвоночных. В обоих случаях происходит образование трубчатых структур, по которым будут циркулировать жидкости организма. Известно, что SFRP играют важную роль в процессах ангиогенеза. Они стимулируют рост сосудов и миграцию эндотелиальных клеток, а также способны ингибировать их пролиферацию. Сверхэкспрессия SFRP2 стимулировала экспрессию проангиогенных и анти-апоптозных генов в эндотелиальных клетках (Claudel et al., 2019; Guan et al., 2021).

Отличительной чертой эпительных морфогенезов, таких как ангиогенез является то, что на переднем конце растущего сосуда находятся «leader cells», не связанные с базальной мембраной. Данные клетки воспринимают различные внешние проангиогенные сигналы, а также активно секретируют ММП. За счет этого они способны обеспечивать направленный рост сосудов сквозь соединительную ткань (Michaelis, 2014). Возможно, похожие процессы происходят и при формировании амбулакральной системы у голотурий.

Таким образом, эффект от нокдауна *sfrp3/4* можно попытаться объяснить гиперактивацией ММП секретируемых целомическим и амбулакральным

эпителиями, в результате чего в концевых отделах амбулакров соединительная ткань практически полностью отсутствует и не формируется кольцевой амбулакральный канал.

Еще одним эффектом от нокдауна *sfrp3/4* стало нарушение симметрии формирования зачатка АК. Ввернутые амбулакры прижимаются в вентральной стороне, ближе к мезентерию. Такой эффект вполне ожидаем, так как Wnt сигналинг регулируют симметричность гистогенеза как при эмбриональном развитии, так и при регенерации (Moon et al., 1997; Petersen, Reddien, 2009; Reddien, 2018 Steinhart, Angers, 2018).

Эффект от нокдауна *sfrp1/2/5* напоминает частичную блокировку металлопротеиназ с помощью 1,10-phenanthroline у голотурий (Lamash, Dolmatov, 2013). Зачаток АК формируется, однако с отставанием от развития АК у контрольных животных в группе негативного контроля, в результате чего через 7 спэ в нем еще не сформировались кольцевой амбулакральный канал и щупальцевые каналы. При нормальной регенерации АК в его центральной части происходит увеличение количества внеклеточного матрикса, состоящего из большого числа волокон коллагена (Долматов, Машанов, 2007). В дальнейшем он разрыхляется под действием ММП, выделяемых растущими амбулакральными каналами (Dolmatov 1992; Lamash, Dolmatov 2013). При блокировке ММП внеклеточный матрикс не разрыхляется и развитие амбулакральной системы замедляется (Dolmatov 1992; Lamash, Dolmatov 2013). Возможно, что при нокдауне *sfrp1/2/5* именно благодаря уплотненной соединительной ткани не все клетки успевают мигрировать в место повреждения, что и тормозит формирование АК.

Существуют данные, что SFRP2 млекопитающих, ортолог SFRP1/2/5 голотурий, способен дозозависимым образом препятствовать накоплению коллагена I типа в инфарктных тканях. Инъекция SFRP2 в сердце крыс, пораженное инфарктом миокарда, оказывала антифиброзной эффект, что приводило к уменьшению зоны инфаркта (He et al., 2010). Возможно, что у голотурий *sfrp1/2/5*, подобно своему ортологу, оказывает антифиброзный

эффект, который снимается после нокдауна этого гена, что приводит к избыточному накоплению коллагена в ВКМ.

Таким образом, уменьшение экспрессии исследуемых генов влекло за собой существенные нарушения регенерации АК. На основании полученных нами данных можно предположить, что *sfrp3/4* регулирует симметрию формирующихся органов, а также, совместно с *sfrp1/2/5*, играет важную роль в поддержании структуры ВКМ и регенерации амбулакральной системы. Различия в паттернах экспрессии *sfrp1/2/5* и *sfrp3/4* и эффектах от их нокдауна можно объяснить тем, что они в разное время в разных эпителиальных клетках могут регулировать различные сигнальные пути и влиять на активность различных ММП.

В этой связи, логичным продолжением работы было бы выяснение взаимодействий между белками семейств SFRP, Wnt и ММП в контексте эпителиального морфогенеза и ремоделирования ВКМ у голотурий.

По-видимому, в модификации ВКМ АК и кишечной трубки задействованы разные металлопротеиназы, гены которых контролируются сигнальными путями, запускаемыми разными лигандами. Например, у *E. fraudatrix* в регенерации мышц и пищеварительной системы задействованы разные ММП (Lamash, Dolmatov, 2013; Shulga, Lamash, 2020; Dolmatov et al., 2021).

Известно, что при регенерации у голотурий экспрессия генов *wnt* носит весьма динамичный характер (Girich et al., 2017; Auger et al., 2023). К сожалению, данные о пространственной локализации транскриптов или белков Wnt в ходе регенерации у голотурий довольно скудны. У *E. fraudatrix wnt4* экспрессируется в миоэпительных клетках целомического эпителия и эпителии амбулакральных каналов (Girich, 2024). Соответственно, он вполне вероятно может взаимодействовать с SFRP.

В сравнительном плане, интересной задачей было бы изучение и последующее сравнение морфогенетических процессов целомического эпителия голотурий с процессами в целомическом эпителии млекопитающих

(мезотелии), который также играет важную роль в регенерации различных органов (Mutsaers et al., 2015; Ariza et al., 2016; Zwicky et al., 2021).

Заключение

Белки семейства SFRP представляют собой небольшое древнее семейство внеклеточных агонистов и антагонистов сигнальных путей. Являясь частью системы межклеточной коммуникации, они регулируют такие важные для развития животных сигнальные пути как Wnt и BMP. Подобно другим внеклеточным агонистам и антагонистам сигнальных путей SFRP регулируют секрецию, диффузию, деградацию и аффинность к различным молекулам своих целевых белков (Bovolenta et al., 2008; Cruciat, Niehrs, 2013; Chang, 2016; de Almeida Magalhaes et al., 2024).

С учетом того, что SFRP, Wnt и BMP сигналинги имеют древнее происхождение и консервативные функции во время морфогенеза у разнообразных животных, изучение их функций у относительно просто устроенных организмов позволяет легче выявлять и изучать новые молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза, лучше понимать патогенез различных заболеваний и находить новые подходы к лечению различных патологий в ветеринарии и медицине.

В данном исследовании мы попытались выявить функции *sfrp* в регенерации кишки и АК у голотурии *E. fraudatrix.* Нам удалось идентифицировать в ее транскриптоме продукты двух генов *sfrp,* являющихся ортологами *sfrp1, -2, -5* и *sfrp3, -4* млекопитающих. Полученные данные согласуются с другими работами, в которых установлено наличие в геноме общего передка вторичноротых двух генов *sfrp*: *sfrp1/2/5* и *sfrp3/4* (Leclère, Rentzsch, 2012; Yan et al., 2014).

Мы также изучили пространственно-временную динамику экспрессии *sfrp,* в результате удалось продемонстрировать, что *sfrp* дифференциально экспрессируются в целомическом и амбулакральном эпителиях, а значит, потенциально могут быть вовлечены в регенерацию внутренних органов у голотурий. Для проверки данного предположения мы адаптировали методику нокдауна генов с помощью РНК-интерференции для *E. fraudatrix* и применили ее в отношении *sfrp*.

Основным результатом нокдауна *sfrp1/2/5* стало формирование участка плотной соединительной ткани в регенерате АК через 7 спэ. По данным, полученным в ходе анализа серийных замороженных срезов, было продемонстрировано, что вследствие нокдауна не формируется кольцевой амбулакральный канал.

Из-за нокдауна *sfrp3/4* также не формируется кольцевой амбулакральный канал, наблюдаются дефекты формирования соединительной ткани. Только по отношению к сайленсингу *sfrp1/2/5* изменения в соединительной ткани носят прямо противоположный характер. Соединительнотканный зачаток АК практически отсутствует. Еще одним результатом нокдауна данного гена стало нарушение симметрии регенерации АК.

С учетом имеющихся данных о способности SFRP регулировать фиброз и активность ММП в тканях позвоночных и тем, что эффект от нокдауна *sfrp1/2/5* схож с эффектом от применения ингибиторов металлопротеиназ, мы предполагаем, что при регенерации АК целомический и амбулакральный эпителии в которых экспрессируются *sfrp* с их помощью регулируют состояние ВКМ регенерирующего АК.

Поскольку нокдаун *sfrp* был произведен на ранних сроках регенерации, когда идут активные морфогенетические процессы в АК, а кишка только начинает формироваться, нам не удалось достоверно выявить функции SFRP при регенерации кишки, для этого необходимо изучать более поздние стадии регенерации.

Тем не менее, неожиданным результатом опытов с нокдауном стало то, что, несмотря на отсутствие в некоторых случаях соединительнотканного утолщения – регенерата АК, соединительнотканное утолщение по краю мезентерия – регенерат кишки, все же формировалось. Это свидетельствует о том, что закладка АК и кишки у *E. fraudatrix* происходит независимо, подобно тому, что можно наблюдать у голотурий размножающихся бесполым путем (Kamenev, Dolmatov, 2017).

С учетом того, что к настоящему времени полностью отсутствуют какие-либо сведения о функциях *sfrp* при регенерации у взрослых иглокожих или полухордовых, данное исследование предоставляет несомненный интерес в контексте изучения регенерации у вторичноротых.

В этой связи, вопросом, требующим изучения, является установление степени эволюционной консервативности процессов регулирующих состояние ВКМ у вторичноротых. Возможно, что SFRP являются универсальными регуляторами состояния ВКМ для этой группы животных.

С другой стороны, в ходе данного исследования было продемонстрировано, что *sfrp* вовлечены в регенерацию амбулакральной системы, уникальной для иглокожих. О молекулярных механизмах ее формирования практически ничего не известно, в этой связи интересно, как именно данные гены адаптировали свои функции под эту систему органов.

Выводы

1. В транскриптоме голотурии *E. fraudatrix* присутвуют транскрипты двух генов *sfrp*: *sfrp3/4* и *sfrp1/2/5*, которые являются ортологами генов *sfrp3*, *sfrp4* и *sfrp1*, *sfrp2*, *sfrp5* млекопитающих соответственно.

2. При регенерации кишки и аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix* гены *sfrp3/4* и *sfrp1/2/5* экспрессируются в клетках целомического и амбулакрального эпителиев.

3. Нокдаун гена *sfrp3/4* приводит к разрушению соединительной ткани зачатка аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix*. Кроме того, снижение его экспрессии ведет к нарушению симметрии формирования зачатка и отсутствию восстановления кольцевого амбулакрального канала и щупальцевых каналов.

4. Нокдаун гена *sfrp1/2/5* ведет к формированию плотной соединительной ткани в зачатке аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix*, что препятствует развитию его внутренних структур – кольцевого амбулакрального канала и щупальцевых каналов.

5. При отсутствии регенерата аквафарингеального комплекса, соединительнотканный зачаток кишки все же формируется, что указывает на независимые механизмы закладки этих структур у голотурии *E. fraudatrix*.

Список литературы

1. Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука, 2007. 212 с.
2. Agostino M., Pohl S.Ö.G. Wnt binding affinity prediction for putative Frizzled-type cysteine-rich domains // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol. 20, № 17. Article no. 4268. DOI: 10.3390/ijms20174268.
3. Alfaro M.P., Vincent A., Saraswati S., Thorne C.A., Hong C.C., Lee E., Young P.P. sFRP2 suppression of bone morphogenic protein (BMP) and Wnt signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285, № 46. P. 35645–35653. DOI: 10.1074/jbc.M110.135335.
4. Alicea-Delgado M., García-Arrarás J.E. Wnt/β-catenin signaling pathway regulates cell proliferation but not muscle dedifferentiation nor apoptosis during sea cucumber intestinal regeneration // Developmental Biology. 2021. Vol. 480. P. 105–113. DOI: 10.1016/j.ydbio.2021.08.011.
5. Alvarado A.S., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models // Nature Reviews Genetics. 2006. Vol. 7, № 11. P. 873–884. DOI: 10.1038/nrg1923.
6. Ariza L., Carmona R., Cañete A., Cano E., Muñoz-Chápuli R. Coelomic epithelium-derived cells in visceral morphogenesis // Developmental Dynamics. 2016. Vol. 245, № 3. P. 307–322. DOI: 10.1002/dvdy.24373.
7. Auger N.A., Medina-Feliciano J.G., Quispe-Parra D.J., Colón-Marrero S., Ortiz-Zuazaga H., García-Arrarás J.E. Characterization and expression of holothurian Wnt signaling genes during adult intestinal organogenesis // Genes. Vol. 14, № 2. Article no. 309. DOI: 10.3390/genes14020309.
8. Bafico A., Gazit A., Pramila T., Finch P.W., Yaniv A., Aaronson S.A. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling

// Journal of Biological Chemistry. 1999. Vol. 274, № 23. P. 16180–16187. DOI: 10.1074/jbc.274.23.16180.

9. Barresi M.J.F., Gilbert S.F. Developmental biology. 12th ed. Oxford: Oxford University Press, 2020. 792 p.
10. Bastin B.R., Chou H.C., Pruitt M.M., Schneider S.Q. Structure, phylogeny, and expression of the frizzled-related gene family in the lophotrochozoan annelid *Platynereis dumerilii* // EvoDevo. 2015. Vol. 6. Article no. 37. DOI: 10.1186/s13227-015-0031-5.
11. Bovolenta P., Esteve P., Ruiz J.M., Cisneros E., Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease // Journal of Cell Science. 2008. Vol. 121, № 6. P. 737–746. DOI: 10.1242/jcs.026096.
12. Brinkmann E.M., Mattes B., Kumar R., Hagemann A.I., Gradl D., Scholpp S., Steinbeisser H., Kaufmann L.T., Özbek S. Secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2) redirects non-canonical Wnt signaling from Fz7 to Ror2 during vertebrate gastrulation // Journal of Biological Chemistry. 2016. Vol. 291, № 26. P. 13730–13742. DOI: 10.1074/jbc.M116.733766.
13. Bu Q., Li Z., Zhang J., Xu F., Liu J., Liu H. The crystal structure of full-length Sizzled from *Xenopus laevis* yields insights into Wnt-antagonistic function of secreted Frizzled-related proteins // Journal of Biological Chemistry. 2017. Vol. 292, № 39. P. 16055–16069. DOI: 10.1074/jbc.M117.791756.
14. Chang C. Agonists and antagonists of TGF-β family ligands // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2016. Vol. 8, № 8. Article no. a021923. DOI: 10.1101/cshperspect.a021923.
15. Claudel M., Jouzeau J.Y., Cailotto F. Secreted Frizzled-related proteins (sFRPs) in osteo-articular diseases: much more than simple antagonists of Wnt signaling? // FEBS Journal. 2019. Vol. 286, № 24. P. 4832–4851. DOI: 10.1111/febs.15119.

16. Corydon I.J., Fabian-Jessing B.K., Jakobsen T.S., Jørgensen A.C., Jensen E. G., Askou A.L., Aagaard L., Corydon, T.J. 25 years of maturation: A systematic review of RNAi in the clinic // Molecular Therapy: Nucleic Acids. 2023. Vol. 33. P. 469–482. DOI: 10.1016/j.omtn.2023.07.018.
17. Cruciat C.M., Niehrs C. Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013. Vol. 5, № 3. Article no. a015081. DOI: 10.1101/cshperspect.a015081.
18. Darras S., Fritzenwanker J.H., Uhlinger K.R., Farrelly E., Pani A.M., Hurley I.A., Norris R.P., Osovitz M., Terasaki M., Wu M., Aronowicz J., Kirschner M., Gerhart J.C., Lowe C.J. Anteroposterior axis patterning by early canonical Wnt signaling during hemichordate development // PLoS Biology. 2018. Vol. 16, № 1. Article no. e2003698. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003698.
19. de Almeida Magalhaes T., Liu J., Chan C., Borges K.S., Zhang J., Kane A.J., Wierbowski B.M., Ge Y., Liu Z., Mannam P., Zeve D., Weiss R., Breault D.T., Huang P., Salic A. Extracellular carriers control lipid-dependent secretion, delivery, and activity of WNT morphogens // Developmental Cell. 2024. Vol. 59, № 2. P. 244–261. DOI: 10.1016/j.devcel.2023.11.027.
20. Dessaud E., McMahon A.P., Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network // Development. 2008. Vol. 135, № 15. P. 2489–2503. DOI: 10.1242/dev.009324.
21. Dolmatov I.Y. Asexual reproduction in holothurians // The Scientific World Journal. 2014. Vol. 2014. Article no. 527234. DOI: 10.1155/2014/527234.
22. Dolmatov I.Y. Variability of regeneration mechanisms in echinoderms // Russian Journal of Marine Biology. 2020. Vol. 46. P. 391–404. DOI: 10.1134/S106307402006005X.
23. Dolmatov I.Y. Molecular aspects of regeneration mechanisms in holothurians // Genes. 2021. Vol. 12, № 2. Article no. 250. DOI: 10.3390/genes12020250.

24. Dolmatov I.Y. Regeneration of the aquapharyngeal complex in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) // Monographs in Developmental Biology. 1992. Vol. 23. P. 40–50.

25. 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 (Basel). 2021. Vol. 12, № 8. Article no. 1292. DOI: 10.3390/genes12081292.

26. Dolmatov I.Y., Shulga A.P., Ginanova T.T., Eliseikina M.G., Lamash N.E. Metalloproteinase inhibitor GM6001 delays regeneration in holothurians // Tissue and Cell. 2019. Vol. 59. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.tice.2019.05.006.

27. Dufourcq P., Leroux L., Ezan J., Descamps B., Lamazière J.M., Costet P., Basoni C., Moreau C., Deutsch U., Couffinhal T., Duplàa C. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation // American Journal of Pathology. 2008. Vol. 172, № 1. P. 37–49. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070130.

28. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. 1998. Vol. 391. P. 806–811. DOI: 10.1038/35888.

29. Francis K., Palsson B.O. Effective intercellular communication distances are determined by the relative time constants for cyto/chemokine secretion and diffusion // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997. Vol. 94, № 23. P. 12258–12262. DOI: 10.1073/pnas.94.23.12258.

30. Fritzenwanker J.H., Uhlinger K.R., Gerhart J., Silva E., Lowe C.J. Untangling posterior growth and segmentation by analyzing mechanisms of axis elongation in hemichordates // Proceedings of the National Academy of

Sciences. 2019. Vol. 116, № 17. P. 8403–8408. DOI: 10.1073/pnas.1817496116.

31. Galliot B., Ghila L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration // Molecular Reproduction and Development. 2010. Vol. 77, № 10. P. 837–855. DOI: 10.1002/mrd.21206.
32. 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. DOI: 10.2174/138161210790883426.
33. Gemberling M., Bailey T.J., Hyde D.R., Poss K.D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration // Trends in Genetics. 2013. Vol. 29, № 11. P. 611–620. DOI: 10.1016/j.tig.2013.07.003.
34. Girich A., Sadriev K., Frolova L., Dolmatov I. Role of *smoothened* and *sfrp* genes in *Eupentacta fraudatrix* regeneration // Wound Repair and Regeneration. 2023. Vol. 31, №. 4, P. 464–474. DOI: 10.1111/wrr.13097.
35. Girich A.S. WntA and Wnt4 during the regeneration of internal organs in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Genesis. 2024. Vol. 62, № 1. Article no. e23562. DOI: 10.1002/dvg.23562.
36. Girich A.S., Isaeva M.P., Dolmatov I.Y. *Wnt* and *frizzled* expression during regeneration of internal organs in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Wound Repair and Regeneration. 2017. Vol. 25, № 5. P. 828–835. DOI: 10.1111/wrr.12591.
37. Grainger S., Willert K. Mechanisms of Wnt signaling and control // Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. 2018. Vol. 10, № 5. Article no. e1422. DOI: 10.1002/wsbm.1422.
38. Grall E., Tschopp P. A sense of place, many times over: pattern formation and evolution of repetitive morphological structures // Developmental Dynamics. 2020. Vol. 249, № 3. P. 313–327. DOI: 10.1002/dvdy.131.
39. Guan H., Zhang J., Luan J., Xu H., Huang Z., Yu Q., Gou X., Xu L. Secreted frizzled related proteins in cardiovascular and metabolic diseases // Frontiers in

Endocrinology. 2021. Vol. 12. Article no. 712217. DOI: 10.3389/fendo.2021.712217.

40. Guatelli S., Ferrario C., Bonasoro F., Anjo S.I., Manadas B., Candia Carnevali M.D., Varela Coelho A., Sugni M. More than a simple epithelial layer: multifunctional role of echinoderm coelomic epithelium // Cell and Tissue Research. 2022. Vol. 390. P. 207–227. DOI: 10.1007/s00441-022-03678-x.
41. Gurley K.A., Rink J.C., Sánchez Alvarado A. β-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis // Science. – 2008. – Vol. 319, № 5861. P. 323–327. DOI: 10.1126/science.1150029.
42. Handly L.N., Pilko A., Wollman R. Paracrine communication maximizes cellular response fidelity in wound signaling // ELife. 2015. Vol. 4. Article no. e09652. DOI: 10.7554/eLife.09652.
43. He W., Zhang L., Ni A., Zhang Z., Mirotsou M., Mao L., Pratt R.E., Dzau V.J. Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 107, № 49. P. 21110–21115. DOI: 10.1073/pnas.1004708107.
44. Hogvall M., Budd G. E., Janssen R. Gene expression analysis of potential morphogen signalling modifying factors in Panarthropoda // EvoDevo. 2018. Vol. 9. Article no. 20. DOI: 10.1186/s13227-018-0107-0.
45. Holzem M., Boutros M., Holstein T.W. The origin and evolution of Wnt signalling // Nature Reviews Genetics. 2024. Vol. 25, № 7. P. 500–512. DOI: 10.1038/s41576-024-00699-w.
46. Hsueh Y.C., Hodgkinson C.P., Gomez J.A. The role of Sfrp and DKK proteins in cardiomyocyte development // Physiological Reports. 2021. Vol. 9, № 3. Article no. e14678. DOI: 10.14814/phy2.14678.
47. Ingham P.W., Nakano Y., Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa // Nature Reviews Genetics. 2011. Vol. 12, № 6. P. 393–406. DOI: 10.1038/nrg2984.

48. Kamenev Y.O., Dolmatov I.Y. Anterior regeneration after fission in the holothurian *Cladolabes schmeltzii* (Dendrochirotida: Holothuroidea) // Microscopy Research and Technique. 2017. Vol. 80, № 2. P. 183–194. DOI: 10.1002/jemt.22786.

49. Kawai N., Kuraishi R., Kaneko H. *Wnt, frizzled,* and *sFRP* gene expression patterns during gastrulation in the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera* // Gene Expression Patterns. 2016. Vol. 21, № 1. P. 19–27. DOI: 10.1016/j.gep.2016.06.003.

50. Kemp C., Willems E., Abdo S., Lambiv L., Leyns L. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development // Developmental Dynamics. 2005. Vol. 233, № 3. P. 1064– 1075. DOI: 10.1002/dvdy.20408.

51. Kicheva A., Briscoe J. Control of Tissue Development by Morphogens // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2023. Vol. 39. P. 91–121. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-020823-011522.

52. Kobayashi K., Luo M., Zhang Y., Wilkes D.C., Ge G., Grieskamp T., Yamada C., Liu T.C., Huang G., Basson C.T., Kispert, A., Greenspan D.S., Sato T.N. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction // Nature Cell Biology. 2009. Vol. 11, № 1. P. 46–55. DOI: 10.1038/ncb1811.

53. Lamash N.E., Dolmatov I.Y. Proteases from the regenerating gut of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 3. Article no. e58433. DOI: 10.1371/journal.pone.0058433.

54. Leclère L., Rentzsch F. Repeated evolution of identical domain architecture in metazoan netrin domain-containing proteins // Genome Biology and Evolution. 2012. Vol. 4, № 9. P. 883–899. DOI: 10.1093/gbe/evs061.

55. Leibson N.L. Regeneration of digestive tube in holothurians *Stichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix* // Monographs in Developmental Biology. 1992. Vol. 23. P. 51–61.

56. Leimeister C., Bach A., Gessler M. Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family // Mechanisms of Development. 1998. Vol. 75, № 1–2. P. 29–42. DOI: 10.1016/s0925-4773(98)00072-0.

57. Liang C.J., Wang Z.W., Chang Y.W., Lee K.C., Lin W.H., Lee J.L. SFRPs are biphasic modulators of Wnt-signaling-elicited cancer stem cell properties beyond extracellular control // Cell Reports. 2019. Vol. 28, № 6. P. 1511–1525. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.023.

58. Liu J., Xiao Q., Xiao J., Niu C., Li Y., Zhang X., Zhou Z., Shu G., Yin G. Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2022. Vol. 7. Article no. 3. DOI: 10.1038/s41392-021-00762-6.

59. Loh K.M., van Amerongen R., Nusse R. Generating cellular diversity and spatial form: Wnt signaling and the evolution of multicellular animals // Developmental Cell. 2016. Vol. 38, № 6. P. 643–655. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.08.011.

60. Lopez-Rios J., Esteve P., Ruiz J.M., Bovolenta P. The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate // Neural Development. 2008. Vol. 3. Article no. 19. DOI: 10.1186/1749-8104-3-19.

61. Mashanov V.S., Dolmatov I.Y., Heinzeller T. Transdifferentiation in holothurian gut regeneration // Biological Bulletin. 2005. Vol. 209, № 3. P. 184–193. DOI: 10.2307/3593108.

62. Mashanov V.S., Frolova L.T., Dolmatov I.Y. Structure of the digestive tube in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) // Russian Journal of Marine Biology. 2004. Vol. 30, № 5. P. 314–322. DOI: 10.1023/B:RUMB.0000046550.23343.b4.

63. Mashanov V.S., García-Arrarás J.E. Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments // Biological Bulletin. 2011. Vol. 221, № 1. P. 93–109. DOI: 10.1086/BBLv221n1p93.

64. Mashanov V.S., Zueva O.R. Radial glia in echinoderms // Developmental Neurobiology. 2019. Vol. 79, № 4. P. 396–405. DOI: 10.1002/dneu.22659.

65. Mashanov V.S., Zueva O.R., García-Arrarás J.E. Myc regulates programmed cell death and radial glia dedifferentiation after neural injury in an echinoderm // BMC Developmental Biology. 2015. Vol. 15. Article no. 24. DOI: 10.1186/s12861-015-0071-z.

66. Medina-Feliciano J.G., García-Arrarás J.E. Regeneration in echinoderms: molecular advancements // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. Vol. 9. Article no. 768641. DOI: 10.3389/fcell.2021.768641.

67. Michaelis U.R. Mechanisms of endothelial cell migration // Cellular and Molecular Life Sciences. 2014. Vol. 71, № 21. P. 4131–4148. DOI: 10.1007/s00018-014-1678-0.

68. Mii Y., Taira M. Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins // Development, Growth & Differentiation. 2011. Vol. 53, № 8. P. 911–923. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01299.x.

69. Mii Y., Takada S. Heparan sulfate proteoglycan clustering in Wnt signaling and dispersal // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020. Vol. 8. Article no. 631. DOI: 10.3389/fcell.2020.00631.

70. Misra K., Matise M.P. A critical role for sFRP proteins in maintaining caudal neural tube closure in mice via inhibition of BMP signaling // Developmental Biology. 2010. Vol. 337, № 1. P. 74–83. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.10.015.

71. Moon R.T., Brown J.D., Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development // Trends in Genetics. 1997. Vol. 13, № 4. P. 157–162. DOI: 10.1016/s0168-9525(97)01093-7.

72. Mosby L.S., Bowen A.E., Hadjivasiliou Z. Morphogens in the evolution of size, shape and patterning // Development. 2024. Vol. 151, №. 18. Article no. dev202412. DOI: 10.1242/dev.202412.

73. Mulligan K.A., Fuerer C., Ching W., Fish M., Willert K., Nusse R. Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by

maintaining Wingless solubility // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. Vol. 109, № 2. P. 370–377. DOI: 10.1073/pnas.1119197109.

74. Mutsaers S.E., Birnie K., Lansley S., Herrick S.E., Lim C.B., Prêle C.M. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis // Frontiers in Pharmacology. 2015. Vol. 6. Article no. 113. DOI: 10.3389/fphar.2015.00113.
75. Nathan E., Tzahor E. sFRPs: a declaration of (Wnt) independence // Nature Cell Biology. 2009. Vol. 11, № 1. P. 13–14. DOI: 10.1038/ncb0109-13.
76. Perillo M., Sepe R.M., Paganos P., Toscano A., Annunziata R. Sea cucumbers: an emerging system in evo-devo // EvoDevo. 2024. Vol. 15. Article no. 3. DOI: 10.1186/s13227-023-00220-0.
77. Petersen C.P., Reddien P.W. Smed-βcatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration // Science. 2008. Vol. 319, № 5861. P. 327–330. DOI: 10.1126/science.1149943.
78. Petersen C.P., Reddien P.W. Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration // Science. 2011. Vol. 332, № 6031. P. 852–855. DOI: 10.1126/science.1202143.
79. Petersen C.P., Reddien P.W. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis // Cell. 2009. Vol. 139, № 6. P. 1056–1068. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.035.
80. Reddien P.W. The cellular and molecular basis for planarian regeneration // Cell. 2018. Vol. 175, № 2. P. 327–345. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.021.
81. Rim E.Y., Clevers H., Nusse R. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators // Annual Review of Biochemistry. 2022. Vol. 91. P. 571–598. DOI: 10.1146/annurev-biochem-040320-103615.
82. Rodriguez J., Esteve P., Weinl C., Ruiz J.M., Fermin Y., Trousse F., Dwivedy A., Holt C., Bovolenta P. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor // Nature Neuroscience. 2005. Vol. 8, № 10. P. 1301–1309. DOI: 10.1038/nn1547.

83. Ros-Rocher N., Pérez-Posada A., Leger M.M., Ruiz-Trillo I. The origin of animals: an ancestral reconstruction of the unicellular-to-multicellular transition // Open Biology. 2021. Vol. 11, № 2. Article no. 200359. DOI: 10.1098/rsob.200359.

84. Routledge D., Scholpp S. Mechanisms of intercellular Wnt transport // Development. 2019. Vol. 146, № 10. Article no. dev176073. DOI: 10.1242/dev.176073.

85. Sadriev K. Expression patterns of *sfrp* genes during regeneration in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Genesis. 2025. Vol. 63, №. 4. Article no. e70023. DOI: 10.1002/dvg.70023.

86. Satoh W., Gotoh T., Tsunematsu Y., Aizawa S., Shimono A. Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis // Development. 2006. Vol. 133, № 5. P. 989–999. DOI: 10.1242/dev.02274.

87. Satoh W., Matsuyama M., Takemura H., Aizawa S., Shimono A. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/β-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse // Genesis. 2008. Vol. 46, № 2. P. 92–103. DOI: 10.1002/dvg.20369.

88. Shi D.L. Canonical and non-canonical Wnt signaling generates molecular and cellular asymmetries to establish embryonic axes // Journal of Developmental Biology. 2024. Vol. 12, № 3. Article no. 20. DOI: 10.3390/jdb12030020.

89. Shulga A.P., Lamash N.E. Proteinases with gelatinase activity and their role in ambulacrum regeneration in holothurians *Eupentacta fraudatrix* and *Cucumaria japonica* // Russian Journal of Marine Biology. 2020. Vol. 46. P. 461–471. DOI: 10.1134/S1063074020060097.

90. Simsek M.F., Özbudak E.M. Patterning principles of morphogen gradients // Open Biology. 2022. Vol. 12. Article no. 220224. DOI: 10.1098/rsob.220224.

91. Stapornwongkul K.S., Vincent J.P. Generation of extracellular morphogen gradients: the case for diffusion // Nature Reviews Genetics. 2021. Vol. 22, № 6. P. 393–411. DOI: 10.1038/s41576-021-00342-y.

92. Steinhart Z., Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis // Development. 2018. Vol. 145, № 11. Article no. dev146589. DOI: 10.1242/dev.146589.

93. Stuckenholz C., Lu L., Thakur P.C., Choi T.Y., Shin D., Bahary N. Sfrp5 modulates both Wnt and BMP signaling and regulates gastrointestinal organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio* // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 4. Article no. e62470. DOI: 10.1371/journal.pone.0062470.

94. Sugiyama Y., Shelley E.J., Wen L., Stump R.J., Shimono A., Lovicu F.J., McAvoy J.W. Sfrp1 and Sfrp2 are not involved in Wnt/β-catenin signal silencing during lens induction but are required for maintenance of Wnt/β-catenin signaling in lens epithelial cells // Developmental Biology. 2013. Vol. 384, № 2. P. 181–193. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.10.008.

95. Tanaka E.M., Reddien P.W. The cellular basis for animal regeneration // Developmental Cell. 2011. Vol. 21, № 1. P. 172–185. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.06.016.

96. Tarazona O.A., Lopez D.H., Slota L.A., Cohn M.J. Evolution of limb development in cephalopod mollusks // ELife. 2019. Vol. 8. Article no. e43828. DOI: 10.7554/eLife.43828.

97. Tendeng C., Houart C. Cloning and embryonic expression of five distinct *sfrp* genes in the zebrafish *Danio rerio* // Gene Expression Patterns. 2006. Vol. 6, № 8. P. 761–771. DOI: 10.1016/j.modgep.2006.01.006.

98. Tran T.H.N., Takada R., Krayukhina E., Maruno T., Mii Y., Uchiyama S., Takada S. Soluble Frizzled-related proteins promote exosome-mediated Wnt re-secretion // Communications Biology. 2024. Vol. 7. Article no. 254. DOI: 10.1038/s42003-024-05881-8.

99. Troilo H., Bayley C.P., Barrett A.L., Lockhart-Cairns M.P., Jowitt T.A., Baldock C. Mammalian tolloid proteinases: role in growth factor signalling //

FEBS Letters. 2016. Vol. 590, № 15. P. 2398–2407. DOI: 10.1002/1873-3468.12287.

100. van Loon K., Huijbers E.J., Griffioen A.W. Secreted frizzled-related protein 2: a key player in noncanonical Wnt signaling and tumor angiogenesis // Cancer and Metastasis Reviews. 2021. Vol. 40. № 1. P. 191–203. DOI: 10.1007/s10555-020-09941-3.

101. Vincent K.M., Postovit L.M. Matricellular proteins in cancer: a focus on secreted Frizzled-related proteins // Journal of Cell Communication and Signaling. 2018. Vol. 12, № 1. P. 103–112. DOI: 10.1007/s12079-017-0398-2.

102. von Marschall Z., Fisher L.W. Secreted Frizzled-related protein-2 (sFRP2) augments canonical Wnt3a-induced signaling // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010. Vol. 400, № 3. P. 299–304. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.043.

103. Wishart T.F., Lovicu F.J. Spatiotemporal localisation of heparan sulphate proteoglycans throughout mouse lens morphogenesis // Cells. 2023. Vol. 12, № 10. Article no. 1364. DOI: 10.3390/cells12101364.

104. Witte F., Dokas J., Neuendorf F., Mundlos S., Stricker S. Comprehensive expression analysis of all *Wnt* genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation // Gene Expression Patterns. 2009. Vol. 9, № 4. P. 215–223. DOI: 10.1016/j.gep.2008.12.009.

105. Wu Y., Liu X., Zheng H., Zhu H., Mai W., Huang X., Huang Y. Multiple roles of sFRP2 in cardiac development and cardiovascular disease // International Journal of Biological Sciences. 2020. Vol. 16, № 5. P. 730–738. DOI: 10.7150/ijbs.40923.

106. Yamamoto T., Kambayashi Y., Otsuka Y., Afouda B.A., Giuraniuc C., Michiue T., Hoppler S. Positive feedback regulation of frizzled-7 expression robustly shapes a steep Wnt gradient in *Xenopus* heart development, together with sFRP1 and heparan sulfate // ELife. 2022. Vol. 11. Article no. e73818. DOI: 10.7554/eLife.73818.

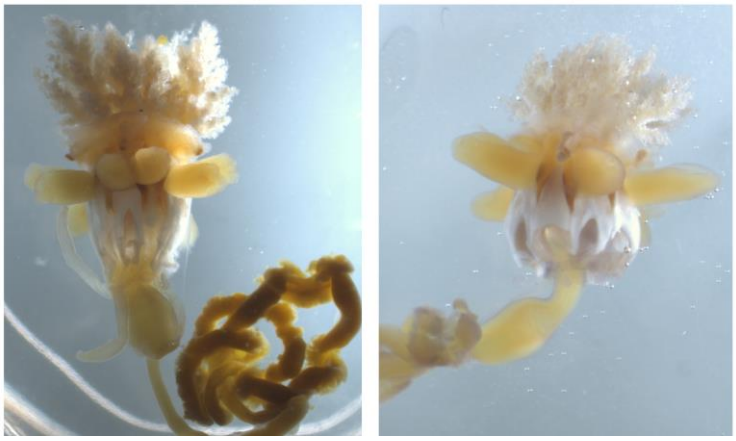
107. Yan J., Jia H., Ma Z., Ye H., Zhou M., Su L., Liu J., Guo A.Y. The evolutionary analysis reveals domain fusion of proteins with Frizzled-like CRD domain // Gene. 2014. Vol. 533, № 1. P. 229–239. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.083.

108. Zhang Y., Beachy P.A. Cellular and molecular mechanisms of Hedgehog signalling // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2023. Vol. 24, № 10. P. 668–687. DOI: 10.1038/s41580-023-00591-1.

109. Zou J., Anai S., Ota S., Ishitani S., Oginuma M., Ishitani T. Determining zebrafish dorsal organizer size by a negative feedback loop between canonical/non-canonical Wnts and Tlr4/NFκB // Nature Communications. 2023. Vol. 14. Article no. 7194. DOI: 10.1038/s41467-023-42963-3.

110. Zwicky S.N., Stroka D., Zindel J. Sterile injury repair and adhesion formation at serosal surfaces // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. Article no. 684967. DOI: 10.3389/fimmu.2021.684967.

Приложение 1



sfrp 1/2/5 ***sfrp 3/4***

Рисунок П1 – Экспрессия *sfrp* в норме.