

УДК 575.113

ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ НИЗШИХ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ НА ПРИМЕРЕ СТРЕКАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Обзор

© 2022 Т.В. Ерофеева^{1,2}, А.П. Григоренко^{1,2*}, Ф.Е. Гусев^{1,2},
И.А. Косевич^{1,3}, Е.И. Рогаев^{1,2,3,4}

¹ Научный центр генетики и наук о жизни, направление генетика, АНО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», 354349 Краснодарский край, Сочи, Россия; электронная почта: anast1998@mail.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

⁴ Медицинская школа Чен Массачусетского университета, департамент психиатрии, 01545 Шрусбери, США

Поступила в редакцию 28.10.2021

После доработки 13.12.2021

Принята к публикации 17.01.2022

Исключительный набор особенностей и характеристик представителей типа Cnidaria (Стрекающие) делает их модельным объектом для широкого круга исследований. Особый научный интерес представляют пластичность жизненного цикла и связанные с ним процессы клеточной дифференцировки и развития целостного многоклеточного организма. Новый уровень развития молекулярно-генетических методов, в том числе использование методов широкомасштабного секвенирования геномов, транскриптомов и эпигеномов, как на уровне целого организма, так и на уровне отдельных клеток, делает возможным получение детальной картины развития этих животных. В представленном обзоре рассматриваются современные подходы и достижения с использованием методов широкомасштабного секвенирования в реконструкции процессов онтогенеза Cnidaria путём изучения регуляторных путей клеточной трансдукции и их взаимодействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Cnidaria, развитие, методы секвенирования, геномика, сигнальные каскады.

DOI: 10.31857/S0320972522020075

ВВЕДЕНИЕ

Многоклеточные организмы, содержащие различные дифференцированные типы клеток, подразделяются на низшие и высшие. К «низшим многоклеточным» относят пластинчатых (Placozoa), губок (Porifera), гребневиков (Stenophora) и стрекающих (Cnidaria), в то время как к «высшим» относят всех трехслойных билатерально-симметричных многоклеточных жи-

вотных (Bilateria) [1]. Cnidaria, являясь двухслойными (Diploblastica) по организации животными, обладают отличительной морфологической характеристикой – наличием специализированных стрекательных клеток, «книдоцитов», которые используются для захвата добычи, защиты и передвижения [2]. Разнообразные представители Cnidaria – коралловые полипы, актинии, сцифо- и гидромедузы, жгучие сифонофоры типа Португальского кораблика и морские осы из группы кубомедуз представляют собой заметную и важную часть экосистем океанов и морей. Отдельную немаловажную роль играют представители актиний и кораллов и их эндосимбионты – одноклеточные водоросли. Успешный симбиоз обуславливает рост и выживание рифовых кораллов в неблагоприятных условиях с обеднённым содержанием питательных веществ [3]. В свою очередь, кораллы вступают в симбиоз с макроорганизмами, обеспечивая безопасную среду обитания для большого количества морс-

Принятые сокращения: ATAC-seq – анализ доступного для транспозазы хроматина с использованием секвенирования (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing); ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing); MARS-Seq – массивное параллельное секвенирование транскриптомов единичных клеток (Massively parallel single cell RNA-Seq); scRNA-seq – секвенирование транскриптомов единичных клеток (single cell RNA-sequencing); UMI – уникальный молекулярный идентификатор (Unique molecular identifier).

* Адресат для корреспонденции.

ких животных (рыбы, двустворчатые моллюски, ракообразные) [4]. Согласно систематике международной базы данных WoRMS, сложная филогенетическая организация Cnidaria в настоящее время характеризуется делением на следующие классы: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Mухozoa, Scyphozoa и Staurozoa [5].

Стрекающие являются объектом активного научного изучения. Относительная простота организации, высокая способность к регенерации, пластичность жизненного цикла и сложная филогенетическая структура делают Cnidaria уникальными представителями мировой фауны. Исследования, связанные с изучением транскриптомов и эпигеномов, позволяющие охарактеризовать как целый организм, так и его клеточное строение, демонстрируют сложную организацию представителей Cnidaria со специфичными особенностями строения и онтогенеза.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТИПА СТРЕКАЮЩИХ

Тип Стрекающие (Cnidaria) объединяет разнообразных представителей водной среды обитания с преобладанием внешней радиальной симметрии, рассматриваемый как сестринская группа билатерально-симметричных животных. Стрекающие – это двухслойные животные, находящиеся на уровне эпителиальной организации [6]. Их тело построено двумя эпителиями – эпидермой и гастродермой, которые разделены межклеточным матриксом или мезоглеей. У Стрекающих отсутствуют органы. Пищеварительная система представлена ротовым отверстием, которое ведёт в единую замкнутую гастральную полость. Гастральная полость может быть представлена сложно-разветвлённой системой каналов и называется гастроваскулярной системой [7]. Ротовое отверстие – единственное отверстие пищеварительной системы, используемое как для заглатывания пищи, так и для выброса непереваренных остатков. Самым важным отличительным признаком Стрекающих является наличие стрекательных клеток или книдоцитов со специализированными органеллами, которые представляют собой капсулы с выстреливающими нитями, использующимися для охоты, защиты и прикрепления [2]. Книдоциты вместе с сенсорными клетками, которые имеют чувствительные реснички на апикальных частях, выходящих на поверхность эпителиев, и сеть ганглиозных клеток формируют нервную систему Стрекающих, которая различается по строению в зависимости от жизненной формы организма [8, 9]. У свободноплавающих медуз по краю колокола имеются нервные кольца,

состоящие из нейритов (отростков нейронов), кроме того, у многих медуз есть специализированные органы чувств – светочувствительные глазки и органы равновесия [10, 11]. У прикрепленных полипов нервная система организована как сеть из нейронов, располагающаяся в основании эпителиев по всему телу, с некоторой концентрацией нейронов в оральной и аборальной областях [10, 11]. Определённая регионализация нервной системы, связанная с формированием мезентериальных нервных тяжёй (располагающихся вдоль энтодермальных септ-мезентерий), как у полипов Anthozoa [12], и нервных колец, как у некоторых *Hydra* и медуз, наблюдается у Стрекающих, что, однако, не нарушает основной принцип организации нервной системы для этого типа [13]. Движение представителей Стрекающих обеспечивается наличием эпителиально-мышечных клеток с сократительными отростками в базальной части. Эти клетки составляют основу обоих эпителиев. Сократительные отростки эпителиально-мышечных клеток эпидермы и гастродермы полипов относятся преимущественно к гладкому типу. У медуз на внутренней стороне колокола сократительные отростки эпителиально-мышечных клеток относятся к поперечнополосатому типу [14]. Существуют вариации строения мышечной системы у Стрекающих, подробно описанные в обзоре Leclère и Röttinger [14]. Здесь следует упомянуть несколько особенностей строения в разных группах Стрекающих. У многих Hydrozoa в щупальцах энтодермальные эпителиальные клетки не содержат миофиламентов, а у многих полипов Medusozoa имеются мощные продольные сократительные пучки эктодермального происхождения, миоциты которых полностью располагаются в мезоглее и не связаны ни с одним из эпителиев стенки тела. [14]. У Scyphozoa, как правило, отсутствуют миофибриллы во внешнем слое колокола (эксумбрелле) [15]. У большинства Anthozoa, в отличие от Medusozoa, хорошо развиты эпителиально-мышечные клетки энтодермы, составляющие круговую мускулатуру стенки тела, продольные париетальные мышцы у основания септ и ретракторные мышцы на одной стороне каждой септы. А эктодермальные мышцы большинства Anthozoa развиты лишь в зоне щупалец и ротового отверстия. Кроме того, на примере *Nematostella vectensis* было показано наличие в щупальцах мышечных клеток, обособленных от эпителия в отдельный слой клеток, не несущий эпителиальной функции [16]. У паразитических Endocnidozoa отсутствуют эпителиально-мышечные клетки: миоциты (гладкомышечного типа) расположены отдельно от эпителия в мезоглее [17].

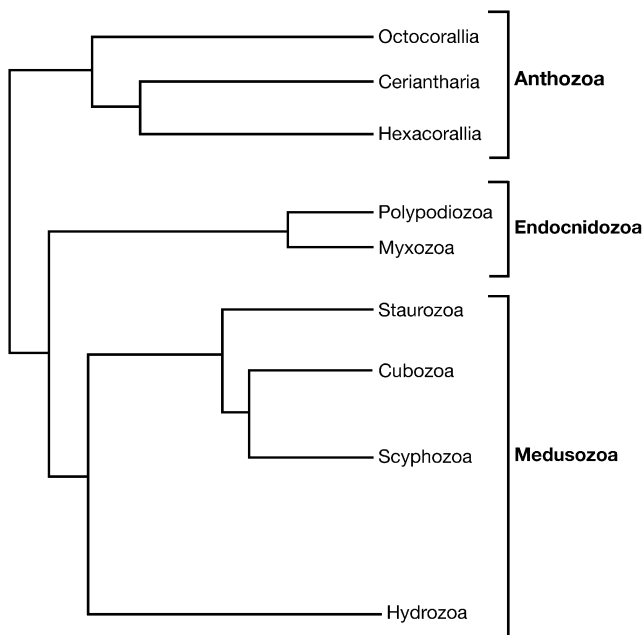


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отображающее топологию основных классов Стрекающих, построенное на основании последних опубликованных данных полногеномного секвенирования [18, 19, 21]

Тип Стрекающие представлен следующими классами: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Muxozoa, Scyphozoa, Staurozoa [5]. Филогенетическая структура Cnidaria является предметом дискуссий, но, по последним данным, она описывается делением на 3 монофилетические группы – Anthozoa (шести- и восьмилучевые кораллы, актинии), Medusozoa, объединяющая классы Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa и Staurozoa, и Endocnidozoa, объединяющая паразитических Muxozoa и Polypodiozoa (рис. 1) [18–21].

Стрекающие демонстрируют большое разнообразие жизненных циклов, отличающихся у разных групп. У Anthozoa полипоидная стадия формирует гаметы, и жизненный цикл включает стадии зародыша → личинки (планулы) → репродуктивного полипа. Медузоидная стадия в жизненном цикле Anthozoa отсутствует. У представителей Medusozoa жизненный цикл осуществляется по схеме: полипоидная стадия (которая размножается только вегетативным путём) → медузоидная стадия (формирующая половые продукты) → гаметы → зародыш → планула → полип. Исключение составляет *Hydra*, у которой отсутствуют стадии медузы и планулы, и которая размножается преимущественно вегетативным путём (почкованием), а половое размножение реализуется по схеме: гаметы (развивающиеся в основании эпидермы) → зародыш → новый полип [22]. Существуют

и отклонения от общей схемы жизненного цикла. Например, у Hydrozoa могут быть редуцированы стадии полипа или медузы. Так, у подкласса Trachylina полипы либо очень маленького размера, либо отсутствуют [23]. В то же время у представителей подкласса Hydroidolina может отсутствовать стадия медузы (например, у некоторых Leptothecata [24]). У ряда представителей семейств Bougainvillidae, Hydractiniidae и Rathkeidae вегетативное размножение может происходить не только на стадии полипа, но и на стадии медузы [25]. У некоторых сцифоидных медуз в жизненном цикле также отсутствует стадия полипа, например, у *Pelagia* [26]. Паразитические Endocnidozoa включают животных с разнообразными жизненными циклами. Мухозоа – это микроскопические эндопаразиты, колонизирующие беспозвоночных и позвоночных, жизненный цикл которых реализуется с участием двух хозяев. Polypodiozoa проходят в жизненном цикле через свободноживущую стадию и паразитических личинок осетровых рыб, соответственно, имеют одного хозяина в жизненном цикле [17].

Отдельного рассмотрения заслуживает онтогенез представителей Medusozoa. Помимо описанного выше классического жизненного цикла, у них было обнаружено уникальное явление «обратного развития», которое заключается в переходе организма определённой стадии жизненного цикла не в следующую, а в предыдущую стадию («возврат к предыдущей стадии»). Считается, что данный процесс вызывается стрессовыми ситуациями, например голоданием или изменением условий среды обитания. «Обратное развитие» было зафиксировано у нескольких представителей Hydrozoa на медузоидной стадии [25]. Одним из самых известных исследований является эксперимент с гидромедузами *Turritopsis* spp. (Hydrozoa), в котором в результате воздействия факторов, вызывающих стресс, таких как резкое повышение температуры, изменение солёности воды или механическое повреждение колокола медузы, организм половозрелой медузы регрессировал и образовывал шарообразное скопление клеток (цисту), из которого впоследствии формировался новый полип [27]. Недавно подобное явление «обратного развития» было описано и для сцифомедуз (Scyphozoa) *Aurelia aurita* [28].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫЕ В ПРОЦЕССАХ РАЗВИТИЯ У СТРЕКАЮЩИХ

Закладка орально-аборальной оси, формирование разных типов тканей и органов, про-

цессы регенерации, бесполое и половое размножение регулируются клеточными молекулярными каскадами, среди которых ряд сигнальных путей, являющихся эволюционно консервативными для Стрекающих и билатерально-симметричных животных (Bilateria). Рядом исследований было показано, что у Стрекающих присутствуют сигнальные пути, которые также регулируют раннее эмбриональное развитие у Bilateria. К таким ключевым сигнальным клеточным путям относятся: Wnt-, Hedgehog-, Notch-, TGF- β - и RTK-путь [29]. В данном разделе будут рассмотрены молекулярно-генетические характеристики структуры сигнальных путей и их роль в развитии различных представителей Стрекающих.

Большое количество научных исследований, связанных с изучением молекулярных сигнальных каскадов в онтогенезе Стрекающих, демонстрирует эволюционную консервативность этих путей у Cnidaria и высших Metazoa. Данные по секвенированию геномов, транскриптомов и функциональные исследования роли путей клеточной трансдукции в развитии Стрекающих показывают, что основные компоненты перечисленных выше сигнальных путей открыты практически в каждом классе Cnidaria. Здесь нужно отметить, что наибольшее количество исследований структуры молекулярных каскадов проведено на активно использующихся в научных экспериментах моделях Anthozoa и Hydrozoa. В геномах *Hydra* и *N. vectensis* были найдены все вышеперечисленные сигнальные пути [30, 31]. В базе данных генов и геномов KEGG, объединяющей геномную и системную функциональную информацию о разных организмах, можно найти подробные схемы сигнальных путей Wnt, Notch и TGF- β у *Hydra* и *N. vectensis* [32]. У Scyphozoa молекулярная структура различных каскадов детектируется наличием отдельных компонентов путей на геномном уровне [33, 34], при этом в работе Brekhman et al. [35] предложена модель пути Wnt/ β -catenin у *A. aurita*. Меньше всего информации о структуре сигнальных путей имеется по представителям Cubozoa и Staurozoa [33, 36, 37]. В геномах паразитических стрекающих Мухозоа, в отличие от других классов Cnidaria и паразитических Polypodiozoa (сестринский таксон Мухозоа с типичным для свободноживущих Стрекающих строением тела), отсутствуют полноценные сигнальные каскады, связанные с процессами дифференцировки, развития и межклеточных коммуникаций [18]. Среди компонентов Wnt-пути у них обнаружены только некоторые эффекторные белки, а также некоторые элементы сигнальных путей Hedgehog и

TGF- β (таблица). У обоих классов (Мухозоа и Polypodiozoa) присутствуют ключевые составляющие пути передачи сигналов Notch [18]. Авторы предполагают, что основной причиной отсутствия полноценных сигнальных путей развития является уменьшение размера генома в связи с переходом к паразитизму. Экспериментальные данные по функциям вышеупомянутых сигнальных каскадов у паразитических Cnidaria отсутствуют. Имеющиеся данные демонстрируют эволюционную консервативность сигнальных каскадов, задействованных в развитии Cnidaria.

Системы сигнальных каскадов играют важную роль в процессах клеточной дифференцировки и развития живого организма. Далее будет рассмотрена функциональная роль каждого молекулярного пути в ключевых биологических процессах развития разных Стрекающих.

Формирование осевого паттерна вдоль орально-аборальной оси и образование вторичной оси. Среди Стрекающих обнаруживаются как животные с радиальной симметрией, имеющие одну ось полярности (большая часть Hydrozoa и Medusozoa), так и организмы с элементами билатеральной симметрии (кораллы и актинии Anthozoa) с направляющей осью симметрии, перпендикулярной орально-аборальной оси тела. Например, у *N. vectensis* вторичная ось тела определяется щелевидной формой глотки и ассиметричным расположением ретракторных мышц на септах [38]. Однако вопрос о гомологичности данного варианта билатеральной симметрии таковому у Bilateria остаётся открытым [39–43]. Эволюционно консервативной сигнальной системой, определяющей общность развития Стрекающих и высших Metazoa, является молекулярный путь Wnt, который опосредует формирование осевого паттерна вдоль орально-аборальной оси тела в раннем эмбриогенезе [43–47]. Впервые это было показано на примере *Hydra*: после выделения ортологов основных компонентов канонического сигнального пути Wnt/ β -catenin с помощью гибридизации *in situ* определили участки локальной экспрессии ортологов лиганда Wnt3 и эффекторного транскрипционного фактора Tcf/Lef в апикальных частях у взрослых полипов и у вновь образующихся в процессе почкования. Экспрессия гена β -catenin была повышенной в зоне образования будущей почки – месте закладки вторичной оси тела, а ортологов белка Dishevelled и киназы гликогенсинтазы-3 (GSK3) – конститутивно на низком уровне по всему телу *Hydra*. Формирование апикальной части *Hydra* сопровождалось экспрессией Wnt и Tcf/Lef и в процессе регенерации головы, и в

Сигнальные пути и гомологи белков, задействованные в процессах развития у различных представителей Cnidaria

| Сигнальный путь/Класс (представители) | Hydrozoa | | Scyphozoa (<i>Aurelia</i> , <i>Nemopilema</i>) | Anthozoa (<i>Nematostella vectensis</i>) | Cubozoa (<i>Morbakka virulenta</i>) | Мухозоа (<i>Kudoa iwatai</i> , <i>Myxobolus cerebrealis</i>) | Polypodiozoa (<i>Polypodium hydriforme</i>) |
|---------------------------------------|--|--|---|--|---------------------------------------|--|---|
| | <i>Hydra</i> sp. | Medusozoa (<i>Hydractinia</i> , <i>Clytia hemisphaerica</i> , <i>Cladonema pacificum</i> , <i>Podocoryne carnea</i> , <i>Dynamena pumila</i> , <i>Ectopleura larynx</i>) | | | | | |
| Wnt | [30, 47–53, 79, 83, 110–115, 118, 131, 169, 181] | [45, 46, 67, 68, 78, 87, 89, 123, 124, 135, 138, 139, 144, 188] | [45, 46, 67, 68, 78, 87, 89, 123, 124, 135, 138, 139, 144, 188] | [33–35, 100] | [33] | лиганды и рецепторы пути утрачены, но есть экспрессия эффекторных белков канонического и неканонического путей | [18] |
| Hedgehog | [30, 119] | [89] | [89] | [100] | нет данных | [18] | [18] |
| Notch | [30, 54, 84, 117] | [99, 188] | [99, 188] | нет данных | нет данных | [18] | [18] |
| TGF- β | [30, 85, 118, 131, 181] | [89, 188] | [89, 188] | [33, 100] | [36] | [18] | [18] |
| RTK | [30, 86, 106, 118, 131, 181, 191] | [125, 137] | [125, 137] | нет данных | нет данных | нет данных | нет данных |

Примечание. Таблица составлена по данным экспрессии, геномным и функциональным данным и базе данных KEGG [32].

процессе *de novo* образования головной части в клеточных агрегатах из диссоциированной клеточной суспензии [47]. Дальнейшие функциональные исследования на *Hydra* определили ключевую роль пути Wnt в процессе формирования орально-аборальной оси тела с определением апикальной части организма – головного организатора и вторичной оси тела, предшествующей эвагинации почек [48–53]. Кроме того, в процессе организации головной части *Hydra*, участвующей в формировании оси тела, также может быть задействован сигнальный путь Notch, регулирующий работу генов лигандов (*Wnt7*) и транскрипционных факторов-мишеней пути Wnt (*Sp5* и *Tcf*) [54]. Анализ дифференциальной экспрессии генов по всему геному *Hydra* после фармакологического ингибирования каскада Notch выявил снижение экспрессии *Wnt7*, *Tcf* и *Sp5* с последующим восстановлением до нормального уровня после удаления ингибитора Notch [54].

Исследования формирования орально-аборальной оси тела на других моделях Стрекающих также демонстрируют важную роль молекулярного каскада Wnt. Изучение эмбриогенеза

представителя Anthozoa *N. vectensis* выявило определённые закономерности формирования первичной оси тела, схожие с *Hydra*, но со своими особенностями: большое разнообразие ортологов лигандов Wnt (подсемейства генов *WntA* и *Wnt1–11*) экспрессировалось вдоль оси планулы с ограничением экспрессии около бластопора в процессе гастрюляции и в зоне ротового участка у полипов. Экспрессия лигандов Wnt была ограничена одним слоем ткани (эктодермой или энтодермой) [55]. Дальнейшие исследования определили, что лиганды Wnt, Dsh а также β -catenin, являются основными регуляторами развития осевого паттерна *N. vectensis* в раннем эмбриогенезе и в регенеративных процессах [43, 44, 56–59]. β -Catenin, локализующийся в ядрах клеток бластомеров, демонстрирует первый молекулярный сайт осевой асимметрии на стадии бластулы [56]. Dsh, стабилизирующий β -catenin, локализуется в анимальном полюсе ооцита, дающем начало закладки орального полюса взрослого организма, и затем в бластомерах [57]. В установлении осевого паттерна у *N. vectensis* на стадии планулы также включается консервативная система генов гомео-

боксовых транскрипционных факторов *Hox*, важных регуляторов позиционной идентичности вдоль передне-задней оси билатерий [44]. Филогенетически среди *Hox*-генов *N. vectensis* представлены передние (*NvAx6*, *NvAx6a*, *NvAx7* и *NvAx8*) и центральные-задние (*NvAx1*, *NvAx1a*) гены [44]. *NvAx6* и *NvAx1* экспрессируются в оральной и аборальной областях соответственно, в процессе эмбрионального развития *N. vectensis*, что, возможно, опосредует регуляцию формирования основной оси тела с участием передачи сигнала Wnt [44]. *NvAx1a*, *NvAx6a*, *NvAx7*, *NvAx8* и *NvAx8a*, а также *Gbx* (ген подкласса *Hox-like*) экспрессируются вдоль направительной оси [42, 60] с задействованием каскада BMP в регуляции паттерна направительной оси [61]. Показано, что, помимо Wnt-пути, в формировании осевого паттерна в процессе развития *N. vectensis* задействованы сигнальные каскады FGF, TGF- β и Hedgehog [62]. TGF- β -каскад через передачу сигнала BMP задействован и в формировании направляющей оси тела *N. vectensis* [59, 61, 63, 64], зависящей также от работы Wnt-каскада до установления направляющей оси [59, 65].

Отдельные компоненты пути Wnt определяют развитие осевого паттерна в раннем эмбриогенезе и поддержание осевой идентичности в процессе онтогенеза у представителей гидроидных медуз (лиганды Wnt, рецептор Frizzled, Tcf) [45, 66–68]. Для представителей сцифоидных медуз рода *Aurelia* была показана неоднородная экспрессия лигандов Wnt на разных стадиях жизненного цикла: со спецификой для стадии полипа и тканеспецифичной экспрессией лигандов на стадии медузы, что демонстрирует консервативный механизм определения передне-задней оси тела и тканевой идентичности [33].

Регуляция сегрегации зародышевых листков. Процесс образования зародышевых листков, являющийся ключевым этапом эмбриогенеза для всех Metazoa, ассоциирован с гастрულიей. У Стрекающих гастрულიей опосредует образование двух слоёв клеток тела – эктодермы и энтодермы. В общем случае инициация формирования зародышевого слоя начинается с определения эмбрионального участка начала сегрегации и определения тканевой идентичности листка (определение клеточной судьбы), сопровождающегося морфогенетическими движениями энтодермы (участка, отделённого от эктодермы и недифференцированного в энто- или мезодерму) [69]. С подробным описанием механизмов гастрულიей у разных Стрекающих можно ознакомиться в обзорах Technau [69], а также Kraus и Markov [70]. В данном подразделе будет

рассмотрена роль сигнальных каскадов в регуляции гастрულიей.

Из всех изучаемых Стрекающих больше всего исследований молекулярной регуляции гастрულიей посвящено Anthozoa. Подробные функциональные исследования *N. vectensis* выявили, что в процессе гастрულიей активно работает сигнальный каскад Wnt, который также детерминирует формирование первичной оси у планулы, что связано с экспрессией множества Wnt-лигандов в зоне бластопора (эктодерме или энтодерме после завершения гастрულიей) [55]. Разные компоненты канонического и неканонического сигнальных путей Wnt опосредуют процессы спецификации энтодермы [57], формирования паттерна будущих энтодермальных и эктодермальных клеток с участием сигнальных каскадов BMP, FGF [71] и Hedgehog [72], образования архентерона и определения клеточной судьбы во время гастрულიей [73], а также формирования паттерна орального полюса [58, 65]. Ингибирование канонического пути Wnt за счёт прямого отключения трансляции β -catenin полностью блокировало гастрულიей [56, 74], однако нокдаун гена, кодирующего транскрипционный фактор Tcf, не влиял на прохождение гастрულიей, но предотвращал образование нормальной глотки [71]. Важным моментом является то, что образование архентерона, регулирующееся путём Wnt/PCP, может происходить независимо от энтодермальной спецификации судьбы клеток, регулирующейся каскадом Wnt/ β -catenin, что говорит о независимой эволюции этих двух процессов [75].

У гидроидных распространены различные пути гастрულიей, однако даже в случае аполярного пути, характеризующегося отсутствием выраженной морфологической полярности эмбриона [70], на уровне гастрულიей формируется паттерн орально-аборальной оси, детерминирующийся градиентом сигнального каскада Wnt [46]. В то же время у некоторых гидроидных морфогенетические процессы гастрულიей и спецификации клеточной судьбы не связаны с молекулярной осью, опосредованной передачей сигнала Wnt [76, 77]. Удлиненная форма планулы у гидроидной медузы *Clytia* образуется во время гастрულიей и опосредуется Wnt/PCP-каскадом [78]. Функциональная роль Wnt-пути в эмбриогенезе *Hydra*, в отличие от взрослого полипа, пока не установлена, однако показана экспрессия ортологов *Frizzled*, β -catenin и *Tcf*, но не лиганда Wnt, транскрипты которого детектируются после завершения гастрულიей. β -Catenin и *Tcf* экспрессируются равномерно по всему эмбриону [79].

Регуляция образования половых клеток. Стрекающие демонстрируют большое разнообразие жизненных циклов и связанных с ними репродуктивных систем [80]. Различные сигнальные каскады задействованы в процессе образования половых клеток. У *Hydra* гаметогенез начинается в субпопуляции интерстициальных стволовых клеток в эктодерме. В процессе оогенеза после нескольких этапов делений интерстициальных клеток с образованием кластеров, а затем единого клеточного агрегата определяется единственный ооцит. Оставшиеся клетки дифференцируются во вспомогательные (эндоциты), которые после апоптоза фагоцитируются растущим ооцитом [81, 82]. На ранних этапах оогенеза, ещё в процессе формирования кластеров интерстициальных клеток, увеличивается экспрессия киназы GSK-3 β , негативного регулятора пути Wnt, которая снижается к моменту установления ооцита. В то же время в процессе сперматогенеза увеличение экспрессии GSK-3 β было зафиксировано лишь на поздней стадии в базальной части сперматогония [83]. Функциональные исследования показали, что GSK-3 β необходима для инициации апоптоза в эндоцитах в процессе оогенеза [83]. Кроме того, в ооците была показана экспрессия генов *Frizzled*, *β -catenin* и *Tcf*, но не *Wnt* [79]. Сигнальный каскад Notch также играет важную роль в оогенезе у *Hydra*: нарушение пути передачи сигнала приводит к ингибированию дифференциации интерстициальных клеток-предшественников ооцита, что приводит к образованию обширных клеточных кластеров [84]. Определены гены-мишени пути Notch в эндоцитах *Hydra* [54]. Путь клеточной трансдукции TGF- β /Smad также может быть задействован в оогенезе, но не в сперматогенезе *Hydra*: высокая экспрессия ортолога Smad1 была детектирована у предшественников ооцита, а также на разных стадиях оогенеза, включая агрегацию и фагоцитоз [85]. Новая рецепторная тирозинкиназа Lemon была открыта у *Hydra* в процессе изучения гаметогенеза, что может свидетельствовать о включении пути RTK: увеличение экспрессии наблюдалось в агрегированных интерстициальных клетках до формирования мужской и женской гамет [86].

У Medusozoa гаметогенез происходит в гонозооидах — прикреплённых полипах с мужскими и женскими выростами-гонофорами или же в гонадах у плавающих медуз [80]. У гидроидных медуз каскад Wnt задействован в формировании полярности ооцита — анимально-вегетативной оси: экспрессия *Frizzled1* локализуется в зоне анимального полюса около ядра ооцита в процессе роста. Во время созревания ооцита *Frizzled3* аккумулируется в зоне кортекса на ве-

гетативном полюсе, *Wnt3* — в зоне анимального полюса [87]. Функциональные исследования демонстрируют изменения полярности ооцита при нарушении пути передачи сигнала Wnt (подробно описано в обзоре Houliston et al. [88]). У *Hydractinia symbiolongicarpus* оогенез начинается в геминальной зоне тела гонозооида и продолжается в гонофоре. Сперматогенез полностью проходит в мужском гонофоре. В процессе гаметогенеза включается путь Hedgehog, гомологи лигандов которого экспрессируются в гастродермисе мужских и женских гонофоров [89]. Кроме того, может быть задействован сигнальный каскад TGF- β через BMP: экспрессия предполагаемого рецептора BMP (*Bmpr_54452*) и белка *Capicua* (репрессора таргетных генов пути) была детектирована в развивающихся ооцитах женских гонофоров и гастродермисе мужских гонофоров [89].

Гаметогенез Anthozoa происходит в энтодерме мезентериев. В процессе роста и созревания ооциты постепенно выпячиваются в мезоглею, сохраняя контакт с гастродермой через трофонеми, сформированную специализированными соматическими клетками гастродермы, трофоцитами. Мужские половые клетки в процессе сперматогенеза агрегируются с образованием фолликула, окружённого слоем мезоглеи. В дальнейшем половые продукты попадают в гастральную полость через разрывы эпителия мезентериев и выводятся наружу через рот [90, 91]. Wnt-каскад регулирует образование и поддержание анимально-вегетативной оси ооцита за счёт аккумуляции белка Dishevelled на анимальном полюсе и возможной деградации на вегетативном [57]. Молекулярный путь Hedgehog необходим для формирования кластеров первичных половых клеток у *N. vectensis*, которые локализируются в мезентериях в зоне между экспрессией лиганда Hedgehog1 и доменами рецептора Patched [72]. В результате световой индукции высвобождения ооцитов у *N. vectensis* была охарактеризована целая сеть молекулярных каскадов, по данным транскриптомов, включающая увеличение экспрессии компонентов пути Wnt и RTK [92]. У склерактиниевого коралла *Euphyllia ancora* была обнаружена активная экспрессия гомолога *Notch* — сигнального Notch-каскада, опосредующего межклеточные взаимодействия в незрелых и зрелых ооцитах [93].

Регуляция нейрогенеза. Сенсорные клетки эктодермы с апикальной ресничкой, ганглиозные клетки базальной части эктодермы и нематоциты (книдоциты) составляют массив нервных клеток Стрекающих. У Hydrozoa нейрогенез начинается в интерстициальных стволовых клетках эктодермы, как у *Hydra*, или в энтодер-

ме (гидроидные медузы) с миграцией в эктодерму. У *Hydra* клетки-предшественники нейронов и нематоцитов мигрируют к одному из полюсов тела (оральному или аборальному) и затем дифференцируются в разные типы клеток в зависимости от положения вдоль главной оси тела. При этом существуют вариации клеточного нейрогенеза у *Hydra* и других гидроидных [94]. У *N. vectensis* нейрогенез начинается с нейральных клеток-предшественников в бластуле. Дифференциация клеток происходит в клетках эктодермы во время гастрюляции, а затем в энтодерме [95, 96]. У сцифоидных медуз дифференцирующиеся нервные клетки обнаруживаются в эктодерме на стадии планулы [97]. Обе группы гидроидных и сцифоидных медуз проходят этап метаморфоза в жизненном цикле, при котором происходит дегенерация части зародышевых нейронов и новый этап дифференциации и миграции нервных клеток [9]. Нейрогенез у взрослых медуз протекает в манубриуме и бульбусах щупалец [98]. Молекулярная регуляция нейрогенеза Стрекающих консервативна и включает работу упомянутых выше сигнальных каскадов (Wnt, Notch, TGF- β , FGF, Hedgehog) [94]. Подробная характеристика компонентов молекулярных каскадов описана в обзорах Galliot и Quiquand [9], Rentzsch et al. [94] и Galliot et al. [98], по данным которых и по последним научным исследованиям можно выделить ряд закономерностей молекулярной регуляции нейрогенеза у Стрекающих.

- Каскад Notch регулирует дифференцировку предшественников нематоцитов в зрелые нематоциты у *Hydra* [54, 84] и др. Hydrozoa (*Hydractinia echinata* [99]), количество эпителиальных предшественников нервных клеток и книдогенез у Anthozoa (*N. vectensis*).
- Экспрессия компонентов пути Hedgehog наблюдается у *N. vectensis* в клетках предполагаемых нервных предшественников [62], у *A. aurita* (Scyphozoa) – в ропалиях развивающейся эфиры [100].
- Молекулярный каскад Wnt/ β -catenin участвует в формировании паттерна нервной системы у *N. vectensis* в апикальной части (так называемой оральной нервной сети): путь регулирует экспрессию нейрогенных транскрипционных факторов на стадии бластулы и необходим для определения клеточной судьбы нейральных предшественников нервных клеток в апикальной части тела [101]. У гидроидной медузы *H. echinata* путь передачи сигнала Wnt может включаться в процессе дифференцировки нейронов и нематоцитов [102].
- Сигнальный путь RTK через FGF задействован в развитии сенсорного апикального реснич-

ного органа у планулы *N. vectensis* [103, 104] а молекулярный каскад MAPK, опосредующий путь RTK, стимулирует нейрогенез за счёт регуляции экспрессии нейрогенных факторов транскрипции [105]. Пути передачи сигналов VEGF и FGF, проходящие через MAPK, регулируются каскадом Wnt/ β -catenin и могут участвовать в развитии нервной системы у *Hydra*, однако необходимы более подробные функциональные исследования [106].

- Эфффекторы сигнального пути TGF- β /Smad – белки Smad – задействованы у *Hydra* в процессах дифференцировки нематоцитов. У *N. vectensis* TGF- β -каскад через BMP, индуцирующийся путём Wnt/ β -catenin, необходим для поддержания паттерна сети нейронов в зоне рта вдоль орально-аборальной и направляющей осей [101].

Регуляция процессов регенерации и морфологических особенностей строения Стрекающих. Стрекающие обладают широким регенеративным потенциалом, в связи с чем их активно используют в качестве моделей для изучения регенерации животных. Механизмы регенерации и их молекулярная структура подробно описаны в различных обзорах [107–109]. В данном подразделе будет обобщена информация по молекулярной регуляции с помощью сигнальных каскадов (Wnt, Notch, Hedgehog, RTK, TGF- β) процессов регенерации и роста организменных особенностей строения тела Стрекающих.

Путь передачи сигнала Wnt является самым консервативным и распространённым каскадом, опосредующим регенеративные процессы Стрекающих. У *Hydra* путь Wnt включается в разных моделях регенерации:

- при установлении главной оси тела в процессе регенерации тканей в экспериментах с трансплантацией разных частей тела полипа [53];
- при регенерации участка оральной области тела путём активации Wnt3 в интерстициальных клетках участка регенерации [110] и последующей активации пула лигандов Wnt [50] с формированием петли обратной связи [50];
- роль β -catenin в регенерации головной части полипа также была продемонстрирована в экспериментах с ингибированием и оверэкспрессией β -catenin [111];
- при регенерации тканей подошвы, что было показано в экспериментах с ингибированием и оверэкспрессией β -catenin [111];
- при регенерации частей тела *de novo* в клеточных агрегатах – организатора головной части за счёт Wnt3 [47, 112], в том числе в малых кластерах клеток [113], при механическом растяжении ткани *Hydra* в сфероидах из клеток, где

Wnt3 активируется в процессе регенерации головной части за счёт зависимой от растяжения транскрипционной активации его гена [114].

Помимо регенеративных процессов, у *Hydra* сигнальный каскад Wnt/PCP при активации канонического пути задействован в процессах дифференциации эпителиальных стволовых клеток в зоне образования щупалец и почек [49]. Кроме пути передачи сигнала Wnt, у *Hydra* в процессах регенерации включаются и другие молекулярные пути. Сигнальный каскад MAPK, активирующийся при заживлении раны, модулирует Wnt при рассечении *Hydra* пополам с возможным механизмом транскрипционной активации лигандов Wnt, необходимых для формирования регенеративного процесса [115], а также активирует процесс апоптоза, необходимого для регенерации головной части *Hydra* [116]. Путь Notch необходим для восстановления центра организации головной части в процессе регенерации и модуляции паттерна закладки щупалец [117], а передача сигналов через VEGF и FGF играет важную роль в регенерации гипостомы и щупалец [106]. Каскад BMP, регулируемый канонический путём Wnt, задействован в базальной регенерации тела *Hydra* [118]. Путь Hedgehog может участвовать в регенерации апикальной и базальной частей тела *Hydra* при рассечении: ортолог лиганда Hedgehog дифференциально экспрессировался в эндодермальных клетках гипостомы и базальной части тела *Hydra*, в зоне подошвы в интактных животных и при рассечении тела поперек — в экто- и энтодерме апикальной и базальной зон с усилением экспрессии в верхней части тела [119].

Регенеративные процессы представителей Medusozoa также связаны с включением каскада Wnt. У гидроидной медузы *Hydractinia* каскад функционально задействован в регенерации апикальной части полипа с образованием бластемы и одновременным ингибированием роста столона [67]. Регенерация столона требует, в свою очередь, ингибирования каскада Wnt [120]. У гидроидной медузы *Clytia* путь Wnt активируется в процессе ремоделирования тканей купола медузы, установления бластемы и регенерации манубриума [121]. Каскад Wnt в том числе опосредует морфологические особенности строения отдельных Medusozoa. Так, у колониальных гидроидов сигнальный каскад Wnt задействован в регуляции структуры колоний, связанной с положением зачатков полипов в колонии, специфической для столонных экспрессией отдельных компонентов каскада в пределах одной колонии, что подробно описано в обзоре Cartwright et al. [122], и с морфогенезом ветвления коло-

ний [123]. Помимо Wnt, в разных по морфологии и функциям полипах единой колонии экспрессируются лиганд каскада Hedgehog (гомолог *Hedgehog*) — в гастродермисе мужских и женских гонофоров, рецептор BMP (*BmpR_54452*) — в ооцитах и гастродермисе мужских гонофорах, что может быть связано с гаметогенезом [89]. В пределах одного организма *Hydractinia* путь Wnt регулирует количество и положение щупалец на полипе [124]. Морфогенез щупалец у *Hydractinia* в процессе регенерации апикальной части тела и в процессе метаморфоза планулы опосредуется сигнальным каскадом Notch [99]. Ветвление щупалец *Cladonema pacificum*, связанное с агрегацией интерстициальных клеток в области формирования ветви, регулируемой каскадом MAPK, опосредуется молекулярным путём RTK, задействованным в удлинении ветвей [125].

Подробное описание механизмов регуляции регенерации и функциональное значение каждого каскада у представителей Anthozoa описано в обзоре Röttinger [108]. Здесь следует выделить важные моменты. Путь передачи сигнала Notch и каскад MAPK у *N. vectensis* включаются в процессе регенерации глотки полипа при её ампутации, при этом после нанесения раневого повреждения проколом эпителия в заживлении раны также участвует MAPK, что сопровождается активацией апоптоза в области повреждения [126]. Каскад Wnt регулирует определение, формирование и поддержание ротового паттерна полипа [58]. Путь FGF, по данным экспрессии, активируется через 20 часов при регенерации отсечённого от ротового отверстия до подошвы куска тела у актинии *Calliactis polypus*, что может свидетельствовать о начале нейрогенеза, по аналогии с экспрессией компонентов FGF при нейрогенезе у планулы *N. vectensis* [103, 127]. При регенерации полипов колониальных склерактиниевых кораллов из недифференцированных кусочков ткани включаются каскады Wnt и FGF по данным экспрессии разных компонентов каждого пути на разных этапах регенеративного процесса, что свидетельствует о возможном перекрёстном взаимодействии двух каскадов. При этом у данных кораллов сохранялась тенденция регенерации головной части, подобно *Hydra* при поперечном иссечении и *N. vectensis* при повреждении, а также активация апоптотических процессов с последующей активацией канонического пути Wnt [128]. С подробным описанием механизмов молекулярной регуляции регенерации у немодельных представителей Anthozoa можно ознакомиться в обзоре van der Burg и Prentis [129].

Регуляция жизненного цикла Стрекающих.

Стрекающие демонстрируют большое разнообразие жизненных циклов, включающее подвижные и прикрепленные стадии, наличие вегетативного и полового процессов с вариациями пола (гонохоризм, гермафродитизм) [80]. Ансамбль молекулярных каскадов участвует в регуляции перехода из стадии в стадию.

У *Hydra* вегетативное размножение происходит за счёт процесса почкования: эвагинация почки из стенки тела, сопровождающаяся пролиферацией и тканевыми перестройками в соответствии орально-аборальной оси нового организма, приводит к образованию дочернего полипа, который впоследствии отделяется и становится автономным. Сигнальные каскады FGFR и Notch функционально задействованы в формировании границы между родительским полипом и дочерним зачатком почки с возможным включением пути Wnt (экспрессия *Tcf* и β -*catenin* показана в зоне начала эвагинации почки), что подробно описано в обзоре Böttger и Hassel [130]. Размеры тела *Hydra* контролируются как Wnt-, так и TGF- β -каскадами, притом Wnt-путь непосредственно влияет на экспрессию компонентов TGF- β -пути. TGF- β сигнальный путь контролирует, в свою очередь, образование почки при вегетативном размножении, что формирует определённый переключатель развития между фазой роста и репродуктивной фазой, определяющий количество клеток организма *Hydra* [131].

У представителей класса Hydrozoa группы Medusozoa отдельные молекулярные каскады задействованы в процессах развития половой (медуза) и бесполой (полип) стадий жизненного цикла. Медуза развивается из группы пролиферирующих клеток, называемой энтокодомом, который образуется путём инвагинации участка эктодермы к энтодерме с формированием полости [132]. Полип развивается из планулы путём метаморфоза или морфологической перестройки, сопровождающейся апоптозом и редифференциацией отдельных типов клеток [133, 134]. В процессе метаморфоза планулы включается каскад Wnt. У *Clytia* и *Hydractinia* в зоне орального полюса эктодермы планулы экспрессируется *Wnt3*, при этом у *Hydractinia* такая экспрессия связана с предотвращением апоптоза [135], что, предположительно, может быть и у *Clytia* [136]. Кроме того, у *Hydractinia* в процессе метаморфоза путь Wnt/Tcf опосредует формирование и поддержание орального паттерна с редукцией развития столонов при ectopической активации сигнального каскада [67]. Путь Notch не задействован функционально в формировании нервной системы *Hydractinia* в

процессе метаморфоза [99]. Лиганд VEGF, путь передачи которого опосредуется RTK-каскадом, но не рецептор пути VEGFR, активно экспрессируется в процессе метаморфоза планулы в клетках энтодермы *Podocoryne carnea*. Также лиганд и рецептор экспрессируются в энтодерме развивающейся медузы *P. carnea* на стадии почки – выроста тела полипа, затем в развивающихся радиальных каналах, клетках поперечнополосатых мышц и бульбусах щупалец. При этом экспрессия VEGFR в этих областях медузы низкая [137].

На примере *P. carnea* была показана активация дифференциальной экспрессии генов канонического пути Wnt на стадии репродуктивного полипа (*Wnt*, *Frizzled*, *LRP5/6*, *Dishevelled*, *CK2*, *APC*, *Tcf/Lef*), что может быть связано с дальнейшим развитием медуз на гонофорах [138]. Также была детектирована коэкспрессия генов лиганда Wnt3 и мембранных рецепторов Frizzled (1 и 3) на дистальном и оральном концах осей последовательного развития медуз и полипов [138], что демонстрирует универсальную роль сигнального каскада Wnt в процессе развития разных стадий жизненного цикла. У представителя Стрекающих с отсутствующей стадией личинки-планулы в жизненном цикле (Aplanulata) *Ectopleura larynx* Wnt-путь опосредует развитие как полипов, так и ранних мужских и женских гонофоров, представляющих собой недоразвитых медуз, прикрепленных к полипам. При этом экспрессия компонентов Wnt-пути коррелирует с половым диморфизмом гонофоров *E. larynx*, связанным с образованием зачатков щупалец в оральной зоне женского гонофора и шарообразной структуры, не разделённой на щупальца, в оральной зоне мужского гонофора [139]. Кроме того, авторы исследования предполагают, что ингибирование экспрессии элементов пути Wnt может быть вовлечено в процессы нарушения полноценного развития медузы *E. larynx* [139].

У сцифоидных медузы развиваются из апикальной части полипа в процессе стробилиации (сегментации), а полип, в свою очередь, – из планулы в результате метаморфоза, связанного с элиминацией энтодермы планулы и образованием вторичной энтодермы из клеток эктодермы планулы с последующим развитием щупалец полипа [140]. У *Aurelia* дифференциальная экспрессия разных компонентов каскада Wnt, специфическая главным образом для стадии личинки-планулы, и несколько лигандов со специфической экспрессией для медузы и стробилы были детектированы на разных стадиях жизненного цикла [35]. В процессе стробилиации *Aurelia* включается несколько молекулярных

каскадов. *Wnt11a* экспрессируются в эктодерме оральной части каждого развивающегося сегмента – будущей эфиды, что сопровождается экспрессией *Bmp5/8* в энтодерме развивающейся гастральной полости [33]. Гиперактивация пути *Wnt* приводит к нарушению стробилиации, связанной с отсутствием границ между сегментами [33]. Компоненты сигнального пути *Hedgehog* экспрессируются на стадии стробилы в сегментах и развивающейся эфиды (рецептор *Patched* и лиганды *SHH1*, *SHH2*) *Aurelia*. Ингибирование этого каскада приводит к нарушению процесса сегментации полипа в процессе стробилиации [100].

У *N. vectensis* в результате метаморфоза планулы теряется подвижность с оседанием на дно, формируется ротовое отверстие, окружённое зачатками щупалец, и развиваются первые мезентерии [96]. Несколько генов-лигандов каскада TGF- β (*Bmp2/4* и *Gdf5-like*) начинают экспрессироваться на стадии бластулы и далее в мезентериях *N. vectensis* в процессе метаморфоза [40, 61, 63, 141]. Сигнальный путь FGF играет важную роль в процессе состояния компетентности, то есть способности планулы задерживать метаморфоз до обнаружения определённых сигналов среды обитания, и метаморфоза планулы рифового коралла *Acropora millepora*, что было показано с помощью ингибирования рецептора пути FGFR1 в личинках в состоянии компетентности [142].

Данных по изучению молекулярных каскадов, задействованных в процессах развития у представителей Cnidaria, почти нет. Известно, что в геноме *Morbakka virulenta* было найдено 14 генов семейства *Wnt* [33], однако отсутствует информация по функциональной составляющей *Wnt*-пути.

Процессы развития Cnidaria опосредуются теми же ключевыми молекулярными путями, что и у высших Metazoa: *Wnt*, *Hedgehog*, *Notch*, TGF- β и RTK. Функциональная составляющая каждого сигнального каскада индивидуальна для отдельных классов Cnidaria, однако можно выделить закономерности включения определённых сигнальных путей, определяющих одни и те же процессы развития у представителей Стрекающих разных классов. Так, *Wnt*-путь опосредует формирование орально-аборальной оси у всех Cnidaria, а путь *Notch* задействован в квидогенезе у *Hydra*, *Nematostella* и *Hydractinia*. Помимо описанных выше классических сигнальных путей, в процессах развития Cnidaria задействовано большое разнообразие молекулярных каскадов, специфичных именно для Стрекающих. Данные сигнальные пути более подробно описаны в литературе [92, 100, 143].

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ РАЗВИТИЯ СТРЕКАЮЩИХ

Использование новейших молекулярно-генетических методов, применяемых для изучения процессов развития, позволяет проводить детальные исследования не только молекулярной структуры и локализации включения регуляторных сигнальных каскадов в пределах организма, но и их функциональной значимости в отдельных процессах онтогенеза. Изучение функций путей клеточной трансдукции, рассмотренных в предыдущем разделе, осуществляется с помощью спектра методов, связанных с геномной манипуляцией, к которым в настоящий момент относятся фармакологические методы модулирования активности молекулярных каскадов и методы обратной генетики (RNAi-, морфолино-опосредованный нокаут, CRISPR/Cas9, TALEN/FokI-опосредованный нокаут, гиперэкспрессия мРНК, использование индуцибельных промоторов, активируемых тепловым шоком). Подробное описание методик изучения процессов развития на известных моделях Стрекающих рассмотрено в обзорах [22, 96, 108]. В данном разделе будут рассмотрены последние данные по использованию методов широкомасштабного секвенирования при изучении процессов развития Стрекающих.

Применение методов широкомасштабного секвенирования геномов для изучения механизмов развития и распространения Стрекающих. Технологии полногеномного секвенирования активно используются для изучения разнообразных аспектов развития и распространения Cnidaria [30, 31, 33, 34, 37, 144, 145]. Последние исследования геномов Стрекающих выявляют интересные особенности этого типа в плане развития и адаптации к условиям окружающей среды. Так, учёные определили геномные характеристики коралловых полипов *Acropora* (Anthozoa) и генетические детерминанты их приспособленности к изменению условий окружающей среды [146]. Молекулярное датирование позволило определить эволюционную историю развития *Acropora*, выявив, что их предки возникли около 55,8 млн лет назад и пережили поэтапное повышение и понижение глобальной температуры. Возможно, это привело к увеличению видового разнообразия *Acropora* [146]. Кроме того, была установлена предполагаемая причина высокой чувствительности кораллов *Acropora*, приводящая к обесцвечиванию, связанная с нарушением у них синтеза цистеина, ведущего к зависимости от симбиотических водорослей. Также, по геномным данным, были определены основные механизмы адапта-

ции кораллов к стрессовым условиям окружающей среды, унаследованные от далеких предков *Acropora*. Это специфичный механизм высокоскоростной кальцификации кораллов, специфическая тандемная дупликация генов ответа на стресс (например гены, кодирующие малые цистеин-богатые пептиды и коралловые каспазы), увеличение количества генов диметилсульфопропионат лиазы (фермента цикла серы в океане, который опосредует обратную связь между атмосферой и океаном и может влиять на регулирование местного климата), произошедшее ещё у предков *Acropora* в результате горизонтального переноса генов от симбиотических водорослей, и положительный отбор генов, кодирующих антимикробные пептиды, и генов симбиоза [146]. Секвенирование генома гигантской медузы *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa) выявило индивидуальные генетические особенности этого вида, связанные с мобильностью и активным хищничеством, которые опосредуются увеличением числа генов, кодирующих миозины II типа, нейротрансмиттеры и белки ядов [34].

Применение широкомасштабного секвенирования для исследования процессов прямого и обратного развития Стрекающих. Молекулярно-генетические детерминанты особенностей жизненного цикла существенно важны для исследования процессов развития Стрекающих. Как было описано ранее, некоторые представители Medusozoa обладают возможностью направлять своё развитие в обратную сторону (по сравнению с типичным жизненным циклом) с переходом на более раннюю стадию развития. Описание этапов классического пути жизненного цикла и переключение на «обратное развитие» на уровне клеточных процессов представляет особый научный интерес в области биологии развития.

Больше всего молекулярно-генетических исследований проводится в отношении прямого развития Cnidaria. Так, у Scyphozoa на примере *A. aurita* был охарактеризован процесс перехода от стадии полипа к медузе и проведён анализ регуляции жизненного цикла. Исследователи разделили процесс перехода на 3 этапа: индукция метаморфоза понижением температуры, стробилиция (сегментирование тела полипа с апикальной части и по направлению к проксимальной) и развитие новых медуз из отделившихся в процессе стробилиции сегментов-эфир [147]. Было установлено, что в процессе стробилиции происходит выработка молекулярных веществ-индукторов метаморфоза, которые концентрируются в сегментированной части стробилы и отсутствуют у полипов и эфир. По данным транскриптомного секвенирования стадий полипа, медузы и эфиры, исследователи определили,

что процесс стробилиции инициирует сигнальный путь ретиноевой кислоты, запускающийся при добавлении ретинола в среду. Также были определены индуктор стробилиции – 5-метокси-2-метилиндол (индуцировал стробилицию через 48 часов инкубации) – и гормон естественной стробилиции, специфичный для *A. aurita* [147]. С помощью транскриптомного профилирования полного жизненного цикла *A. aurita* были более подробно охарактеризованы основные сигнальные каскады, опосредующие специфические для разных стадий процессы [35, 100], и специфические для каждого этапа жизненного цикла транскрипционные факторы [35], что было также продемонстрировано на представителе Scyphozoa *Rhopilema esculentum* [148]. На стадии планулы у аурелии экспрессировались основные компоненты пути Wnt (*Wnt2*, *-3*, *-5b*, *-8* и *-16a*), *Frizzled*, *GSK-3 β* и *Axin*. В то же время на других стадиях экспрессировалась лишь часть лигандов: *Wnt9/10*, *Wnt11a* и *Wnt3* – на стадии медузы, *Wnt16b* – на стадии стробилы [35]. Подобная дифференциальная экспрессия демонстрирует активное включение каскада Wnt в раннем эмбриональном развитии аурелии. В исследовании развития Hydrozoa, проведённом Leclère et al. [144], была охарактеризована молекулярная структура жизненного цикла *Clytia hemisphaerica* с определением специфических маркерных генов и транскрипционных факторов для каждой стадии, а также проведён сравнительный анализ процессов развития у Hydrozoa, Scyphozoa и Anthozoa. Сборка транскриптома *de novo* и последующий биоинформатический анализ позволили сформировать новую высококачественную базу транскриптомных данных представителя Cubozoa *Tripedalia cystophora*, которая была использована для идентификации специфических для Стрекающих нейропептидов, что расширило современные представления о нейроанатомии представителей Cubozoa [149]. Молекулярные пути и механизмы, лежащие в основе полового размножения, были подробно описаны с использованием транскриптомных данных у представителя Anthozoa *N. vectensis* [92]. Авторы определили ключевые процессы, активирующиеся при высвобождении ооцитов в результате световой и тепловой индукции, к которым относятся световосприятие (экспрессия фоторецепторов), организация внеклеточного матрикса, регуляция актинового цитоскелета и компоненты циркадных ритмов. При этом экспрессия компонентов метаболических путей, таких как липидный метаболизм, и компонентов клеточного цикла была подавлена. Половое размножение у исследуемых актиний более чувствительно к температур-

ным сдвигам, чем к световым изменениям [92]. Таким образом, высокопроизводительное секвенирование транскриптомов Стрекающих позволяет подробно описать молекулярно-генетическую структуру развития, а также определить механизмы развития и влияние условий окружающей среды на жизненный цикл.

Эпигенетические подходы к изучению развития Стрекающих. Применение методов высокопроизводительного секвенирования для изучения процессов развития Стрекающих позволяет проводить более детальные исследования, касающиеся структуры генома и генной экспрессии с функциональной аннотацией. Помимо активно используемых методов секвенирования тотальных геномов и транскриптомов, нужно выделить эпигенетические исследования, используемые для изучения генетических модификаций, не связанных с изменениями в первичной последовательности ДНК, и применение технологии секвенирования геномов, транскриптомов и эпигеномов единичных клеток в исследуемом образце для структурного и функционального описания различных типов клеток одного организма.

Эпигенетические изменения являются вариантом реакции генома живого организма на переменные условия окружающей среды [150]. В настоящее время изучение эпигенетических модификаций ограничено доступными методами, такими как анализ ДНК-метилирования, исследования открытых участков хроматина, ДНК-белковых взаимодействий и различных модификаций гистонов.

Механизм ДНК-метилирования, заключающийся в переносе метильной группы в положение С5 на цитозине с образованием 5-метилцитозина, регулирует экспрессию генов путём привлечения белков-репрессоров или путём ингибирования связывания транскрипционных факторов с ДНК [151]. Существует несколько вариантов метилирования в зависимости от положения цитозина, которые можно разделить на 2 группы. К первой группе относится самый распространённый вариант метилирования, возникающий на цитозинах, предшествующих гуаниновым нуклеотидам (СрG-сайты) [151]. Ко второй группе относятся редко встречающиеся варианты метилирования не по СрG-сайтам, а на цитозинах, предшествующих другим типам нуклеотидов (А, Т, С), что было детектировано у растений [152]. В геномах беспозвоночных метилирование ДНК относительно редко встречается в нуклеотидном контексте СG, однако оно часто детектируется в активно транскрибируемых генах [153]. В процессе развития живого организма уровень метилирования ДНК в геноме постоян-

но меняется, что является важной характеристикой для изучения регуляторных функций генома [151]. Одним из полногеномных методов изучения метилирования ДНК является бисульфитное секвенирование, объединяющее разные подходы к изучению метилирования, большая часть из которых основана на бисульфитной конверсии ДНК для обнаружения неметилированных цитозинов (рис. 2). В процессе подготовки библиотеки инкубация с бисульфитом приводит к химической конверсии всех неметилированных цитозинов на урацил, который в процессе секвенирования идентифицируется как тимин. При последующей обработке высчитывают процент метилированных цитозинов по данным прочтений после секвенирования [154, 155].

Данных по исследованию ДНК-метилирования у Стрекающих не так много, однако они демонстрируют важную роль метилирования в процессах регуляции развития. На примере симбиотического модельного организма *Aiptasia* (Anthozoa) было показано существование генов с повышенным уровнем метилирования ДНК по СрG-сайтам в кодирующей области гена и понижением уровня метилирования ДНК в областях начала и конца транскрипции [157]. Исследователи предполагают, что такое специфическое метилирование играет важную роль для повышения точности транскрипции у *Aiptasia* и поддержания транскрипционного гомеостаза, отвечающего за симбиоз [157]. В то же время нанопоровое секвенирование полногеномного профиля ДНК-метилирования у симбиотического коралла *Anthopleura elegantissima* (Anthozoa), который может существовать и как aposимбионт, продемонстрировало схожие профили метилирования у симбиотической водоросли *Elliptochloris marina* и у aposимбиотического *A. elegantissima*, что может быть обусловлено особенностями симбиоза конкретных организмов [158]. У разных представителей Anthozoa СрG-метилирование в кодирующей области генов связано с пластичностью генной экспрессии в разных средах и популяциях [159], а также с акклиматизацией [160], адаптацией к низким уровням рН [160] и эволюцией кодонов [161]. Данные по метилированию ДНК у *Hydra* ещё нуждаются в функциональной оценке, однако есть некоторые исследования по тотальному уровню метилирования ДНК в целом организме. В геноме *Hydra* показано низкое содержание GC [162], поэтому уровень метилирования в СрG-сайтах значительно ниже, чем в других областях генома. Авторы данного обзора предполагают, что метилирование аденозина в положении N6 (m⁶dA) может способствовать началу транскрипции, необходимой в непрерывно делящихся и дифференцирующихся клетках тела *Hydra*, а

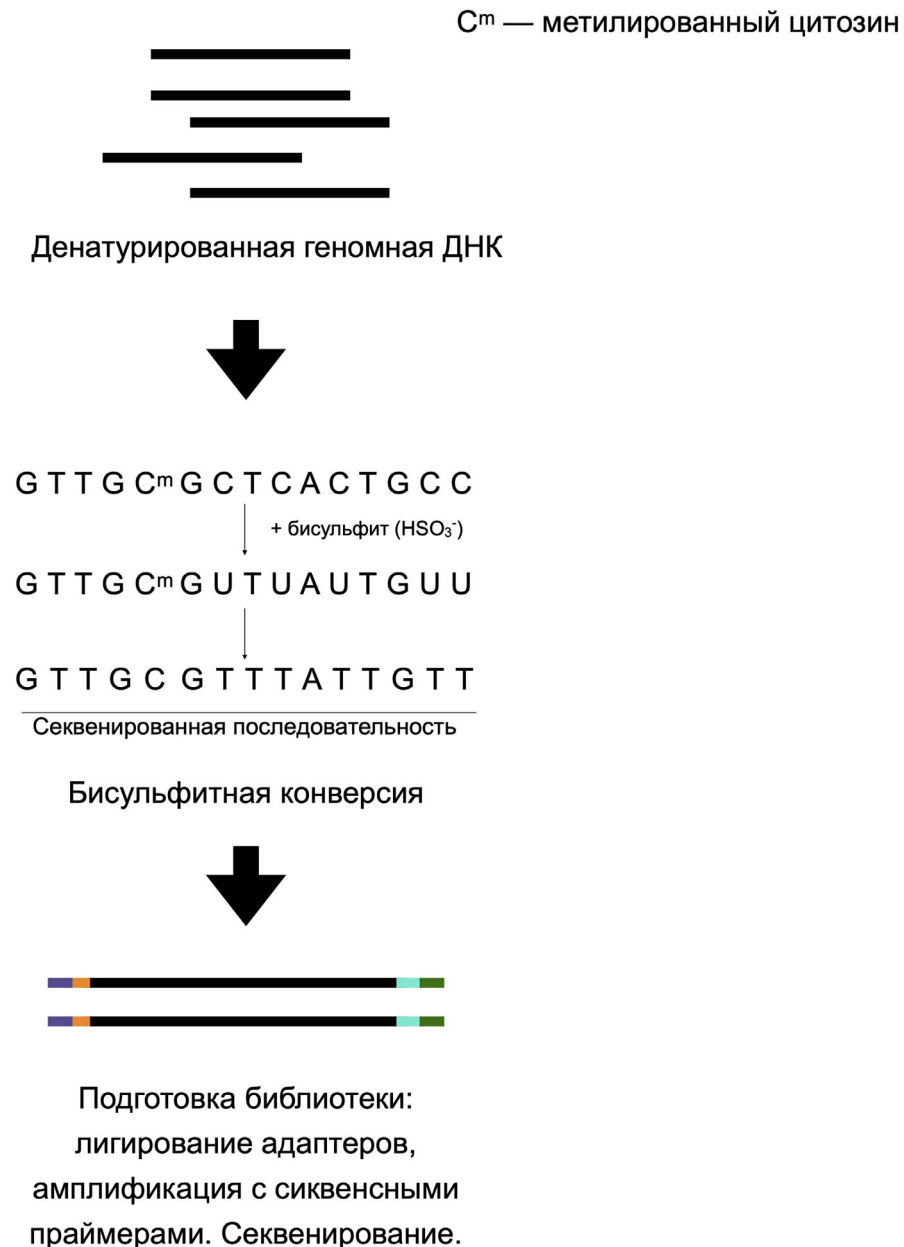


Рис. 2. Принцип полногеномного бисульфитного секвенирования. Обработка образца ДНК бисульфитом приводит к химическому преобразованию неметилированных цитозинов в урацилы, которые при проведении амплификации определяются как тиминовые основания. Бисульфит-конвертированная ДНК используется для подготовки библиотеки секвенирования, которая заключается в лигировании адаптеров, сиквенсных праймеров и амплификации библиотеки. По полученным данным секвенирования проводится анализ сайтов гипер- и гипометилирования по всему геному. Схема – на основе протокола бисульфитной конверсии набора EZ DNA Methylation-Gold™ Kit («Zymo Research», США). Описание к рисунку составлено на основе источников [154, 156]

метилирование цитозина в положении C5 может динамически регулироваться в процессе дифференцировки ооцитов [163]. У представителей эндопаразитов группы Мухо-sporoa (Мухозоа), по данным бисульфитного секвенирования, полностью отсутствует метилирование ДНК по цитозину, что, по мнению авторов, может быть связано с малым размером генома [164].

Следующим важным методом эпигенетических исследований является изучение доступности хроматина в геноме по непосредственной детекции открытых областей, чувствительных к нуклеазам, а также областей, в которых наблюдается низкая плотность нуклеосом или же они отсутствуют. Открытый хроматин называют ещё «активным» по способности к экспрессии ге-

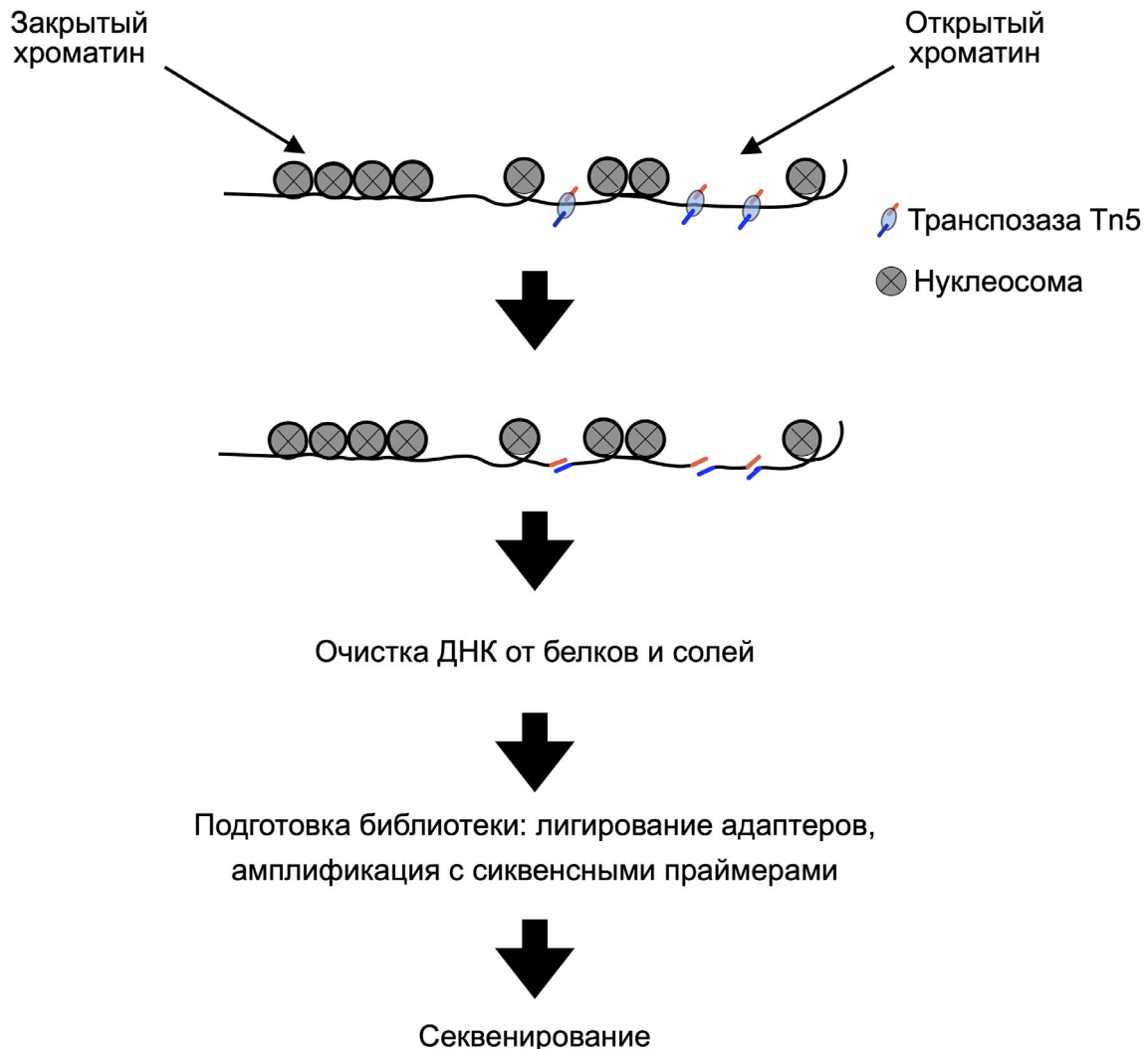


Рис. 3. Принцип метода ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing). Гиперактивная транспозаза Tn5 инкорпорирует специфические адаптеры в области открытого хроматина в месте разреза ДНК. Очищенная фрагментированная по открытым участкам ДНК используется для подготовки библиотеки секвенирования. По полученным данным секвенирования проводят анализ открытых участков генома, детектируют положение нуклеосом и закономерности расположения транскрипционных факторов [165]

нов. Одним из часто используемых эпигенетических подходов является анализ доступного для транспозазы хроматина с помощью секвенирования или ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) [165]. Принцип метода заключается в использовании высокоактивного фермента транспозазы Tn5, которая фрагментирует ДНК по открытым участкам, одновременно интегрируя праймеры для секвенирования (рис. 3) [165].

Секвенирование библиотеки проводится на стандартных платформах, например, на платформе «Illumina», США. Анализ данных позволяет идентифицировать открытые участки хроматина в геноме, а также использовать эти данные для изучения регуляции экспрессии генов.

Исследования с использованием ATAC-seq на *N. vectensis* продемонстрировали взаимосвязь открытых участков хроматина и транскрипции генов циркадного ритма, изменяющейся в зависимости от режима светового культивирования. По результатам исследования показано, что более половины промоторов известных циркадных генов находились в участках открытого хроматина. Кроме того, в работе были идентифицированы активные энхансеры, специфичные для разных режимов светового культивирования [166]. Эксперименты с тепловым воздействием (37 °C) на *N. vectensis*, выращенную в лабораторных условиях и собранную в полевых условиях, показали, что разные условия выращивания влияют на эпигеном *N. vectensis*, демонстрируя участие

различных транскрипционных факторов и отличный для разных условий транскрипционный ответ на повышение температуры. Функциональный анализ состава дифференциально экспрессируемых генов позволил определить, что в ответ на тепловое воздействие включаются разные сигнальные клеточные пути, зависящие от условий культивирования: в полевых условиях — пути, относящиеся к контрольным точкам клеточного цикла, репликации, репарации ДНК и структурированию гомеостаза, а в лабораторных условиях — пути, связанные с метаболическими процессами (метаболизмом аминокислот, амидов), везикулярным транспортом и стабилизацией белков. Таким образом, данное исследование демонстрирует прямое воздействие условий окружающей среды на эпигенетическую регуляцию ответа на стрессовые условия [167]. Разная эпигеномная регуляция в ответ на тепловой стресс была показана у вышеупомянутого симбиотического анемона *Aiptasia* [168]. Описана эпигенетическая регуляция в процессе регенерации оральной части с щупальцами у *Hydra*. По данным ATAC-seq, у *Hydra* в верхней части тела на стадии регенерации идентифицировали более 20 000 открытых хроматиновых участков. В сопоставлении с другим эпигенетическим методом ChIP-seq (описанным ниже) удалось установить положение доступных участков хроматина: более 3000 из них находились в межгенных областях, более 800 открытых регионов перекрывались с интронами и более 200 участков — с экзонами. Таким образом, впервые был представлен анализ элементов открытого хроматина в геноме Стрекающих в контексте процесса развития [169].

Анализ ДНК-белковых взаимодействий является важнейшим из эпигенетических методов, позволяющим довольно точно детектировать регуляторные элементы генома. Одним из распространённых методов считается ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing) или иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием [170]. Принцип заключается в использовании специфических антител, которые при инкубации иммунопреципитируют ДНК-связанные белки, затем ДНК осаждается, очищается от белков и секвенируется (рис. 4). Этот метод позволяет детектировать области активных промоторов, сайты связывания транскрипционных факторов и других регуляторных элементов по всему геному, а также в сочетании с РНК-секвенированием и ДНК-метилированием устанавливать регуляторные сети генов [170, 171].

Кроме того, данный метод используется для анализа модификаций гистонов, определяющих

состояние транскрипции генов локального участка генома. К основным хорошо известным типам модификаций относятся: ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и убиквитинирование. Существуют также и другие недавно открытые типы модификаций, например, деиминация или пролиновая изомеризация [174]. В настоящее время известно большое количество данных по модификациям гистонов и их функциям в хроматине [175], однако к основным гистоновым меткам, широко используемым в эпигенетических исследованиях, относятся: монометилирование по четвёртому остатку лизина гистона H3 (H3K4me1) и ацетилирование гистона H3 по лизину 27 (H3K27ac), связанные с энхансерными областями; метка промоторных регионов — триметилирование гистона H3 по четвёртому остатку лизина (H3K4me3); триметилирование гистона H3 по лизину 36 (H3K36me3) — метка транскрибируемых участков в теле генов; триметилирование гистона H3 по лизину 27 (H3K27me3) — метка транскрипционного репрессорного комплекса Polycomb; триметилирование гистона H3 по лизину 9 (H3K9me3) — метка гетерохроматина [173].

Данные ChIP-seq расширили понимание эпигеномной регуляции регенерации частей тела *Hydra*. Как было упомянуто выше, комбинирование с данными ATAC-seq позволило определить положение доступных участков хроматина, а также идентифицировать кандидаты активных проксимальных промоторов, энхансерных регионов и транскрипционных факторов [169]. В процессе регенерации тканей апикальной части тела *Hydra* было отмечено динамическое ремоделирование регуляторных элементов, большинство которых теряло свою доступность при регенерации. При этом определённые энхансерные и промоторные области активировались, например, один промоторный и два регуляторных сайта гена *Wnt3*, который, как известно, задействован в организации апикальной части *Hydra* в процессе регенерации [169]. При эктопической активации пути Wnt были детектированы межгенные участки — потенциальные энхансеры рядом с генами ключевых транскрипционных факторов (*Brachyury1*, *Cngsc*, *Pitx1*) и лигандов Wnt-пути (*Wnt5a*, *Wnt11*), регулирующих развитие головной части *Hydra* [176].

В геноме *N. vectensis* было идентифицировано более 5000 энхансерных областей, подтверждённых также в экспериментах *in vivo* [177]. Также у *N. vectensis* была определена ассоциация транскрипционного кофактора p300 с энхансерами и показана их активация непосредственно в процессе гастрюляции и на стадии планулы. Функциональная характеристика генов, распо-

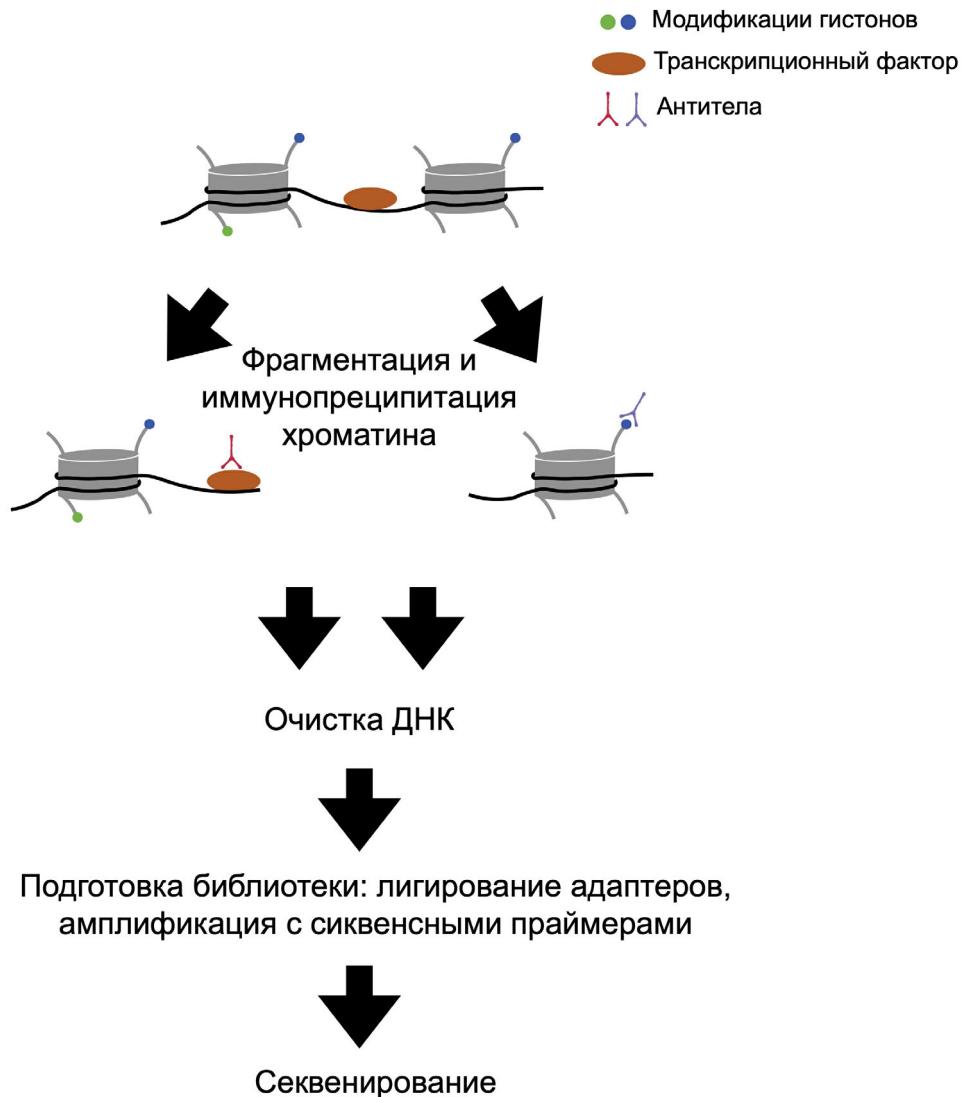


Рис. 4. Принцип метода ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing). Фиксация хроматина, связанная с обработкой клеток формальдегидом, *in vivo* приводит к перекрёстному сшиванию ДНК и целевых белков. При изучении нативного хроматина этот шаг опускается. Далее хроматин фрагментируется ферментативно или ультразвуковой обработкой. Последующая преципитация целевых ДНК-связывающих белков осуществляется путём использования специфичных антител к данным белкам. Очистка ДНК заключается в длительном нагреве и ферментативной обработке протеиназами и рибонуклеазами с последующей очисткой на мембранных колонках или путём фенол-хлороформной экстракции. Готовая ДНК используется для подготовки библиотеки. По полученным данным секвенирования проводят анализ открытых участков генома, положения транскрипционных факторов и сайтов модификаций гистонов [171–173]

ложенных вблизи энхансерных областей, выявила превалирование генов регуляции транскрипции, сигнальных клеточных путей и процессов развития у *N. vectensis*. При этом гены, кодирующие транскрипционные факторы, были связаны с несколькими энхансерами чаще, чем гены домашнего хозяйства [177].

Изучение развития Стрекающих на уровне единичных клеток. Методы секвенирования геномов, транскриптомов и эпигеномов отдельных клеток положили начало новой эре молекулярно-генетических исследований процессов разви-

тия живых организмов, что позволило проводить более детальные исследования разных типов клеток в пределах одного организма и изучать точную дифференциацию на разных этапах жизненного цикла. В данном подразделе будут описаны исследования на Стрекающих с использованием секвенирования единичных клеток.

Первым и фундаментальным научным исследованием по секвенированию отдельных клеток Стрекающих является работа научных групп Marlow и Tanay [178]. В качестве модельного объекта использовали представителя акти-

ний *N. vectensis*, на котором были проведены эксперименты по секвенированию транскриптомов единичных клеток (по-другому называют single cell RNA-sequencing или scRNA-seq) и открытого хроматина методом ATAC-seq. Для секвенирования транскриптомов использовали метод массовного параллельного секвенирования единичных клеток (MARS-Seq), который заключается в сортировке клеток с помощью проточного сортирующего цитофлуориметра (FACS) и их иммобилизации на луночном планшете (каждая клетка в отдельной лунке). После лизиса клетки на полиА-последовательность мРНК отжигается олиго(dT)-праймер с уникальным молекулярным олигонуклеотидным идентификатором (UMI), индивидуальным для каждого праймера и лунки, одинаковым для всех праймеров в каждой лунке клеточным баркодом, адаптером «Illumina» и промотором T7. С олиго(dT)-праймера начинается обратная транскрипция с образованием первой цепи комплементарной ДНК (кДНК). После этого все клеточные лизаты смешиваются, образуя единую группу для дальнейшей амплификации. Синтезируется вторая цепь кДНК с последующей транскрипцией. Полученная РНК фрагментируется, и к ней лигируют адаптер «Illumina» для секвенирования с дополнительным баркодом клеточной смеси (группы амплификации). После обратной транскрипции готовая баркодированная кДНК используется для подготовки библиотеки для секвенирования (рис. 5) [179, 180].

Комбинируя транскриптомные и эпигеномные данные единичных клеток, исследователям удалось создать целый атлас различных типов клеток у взрослого организма *N. vectensis*: были идентифицированы кластеры разных клеток и гены со специфической для каждого кластера экспрессией, то есть маркерные гены для каждого типа клеток. Например, было показано, что в книдоцитах экспрессируются белки капсулы (миниколлагены, нематогалектины) и ядов (NEP). Также исследователи охарактеризовали разные типы клеток у стадии планулы, отметив при этом два плануло-специфических кластера клеток — нейроны и клетки апикального органа. Сравнительный анализ репертуаров генов, специфичных для разных типов клеток, показал, что высоко консервативные гены имеют низкую специфичность к типу клеток, а гены, кодирующие специфичные белки Стрекающих, демонстрируют высокую тканевую специфичность. Кроме того, сравнение кластеров клеток актинии и модельной нематоды *Caenorhabditis elegans* выявило 3 типа клеток *N. vectensis*, схожих по специфической генной экспрессии с разными типами клеток у *C. ele-*

gans: ретракторные мышцы и гастродермис *N. vectensis* соответствуют мышцам кишечника и стенки тела *C. elegans*; недифференцированные клетки-предшественники *N. vectensis* — клеткам зародышевой линии и клеткам-предшественникам у *C. elegans* со специфической экспрессией генов хромосомной организации, ассоциированной с митозом, репликацией и клеточной пролиферацией; нейроны *N. vectensis* — нейронам *C. elegans*. Дополнительно исследователи установили модули транскрипционных факторов, регулирующие разнообразие клеток у *N. vectensis*, а также тканеспецифичные регуляторные элементы в геноме *N. vectensis* [178]. Таким образом, данное исследование демонстрирует новые знания об эволюции типов клеток животных и тканеспецифичской геномной регуляции.

Исследование на стволовых клетках *Hydra* с применением секвенирования транскриптомов единичных клеток позволило описать разнообразные типы клеточных линий и их изменения в процессе дифференцировки [181]. Ученые применили другую технологию секвенирования, которая называется «полногеномное профилирование экспрессии отдельных клеток с использованием нанолитровых капель» или Drop-seq (Droplet-sequencing) (рис. 6) [182].

Принцип метода заключается в генерации за счёт тонкой микрофлюидики одноклеточной эмульсии, состоящей из водно-масляной капли, шариков из смолы с баркодированными праймерами и клеток исследуемого образца, таким образом, что все фрагменты от одной клетки имеют общий баркод. Полученная эмульсия используется в дальнейшем для создания стандартных библиотек с короткими фрагментами для секвенирования на распространённых приборах фирмы «Illumina». Подготовка библиотеки включает этап тагментации — фрагментации ДНК транспосомами с одновременным лигированием адаптерных последовательностей для последующей амплификации с сиквенсными праймерами «Illumina». После секвенирования специальное программное обеспечение использует идентификационные баркоды для сопоставления прочтений и их количества с их ядром или клеткой [182]. Исследователи отсеквенировали около 25 000 транскриптомов единичных клеток. По результатам анализа все клетки были разделены на 3 кластера, представляющие отдельные клеточные линии: эктодерму, эндодерму и интерстициальные клетки. В каждом кластере были определены свои популяции клеток в широком диапазоне состояний дифференцировки. Так, например кластеры дифференцированных эпителиальных клеток головы и подошвы связаны с соответствующими кластерами

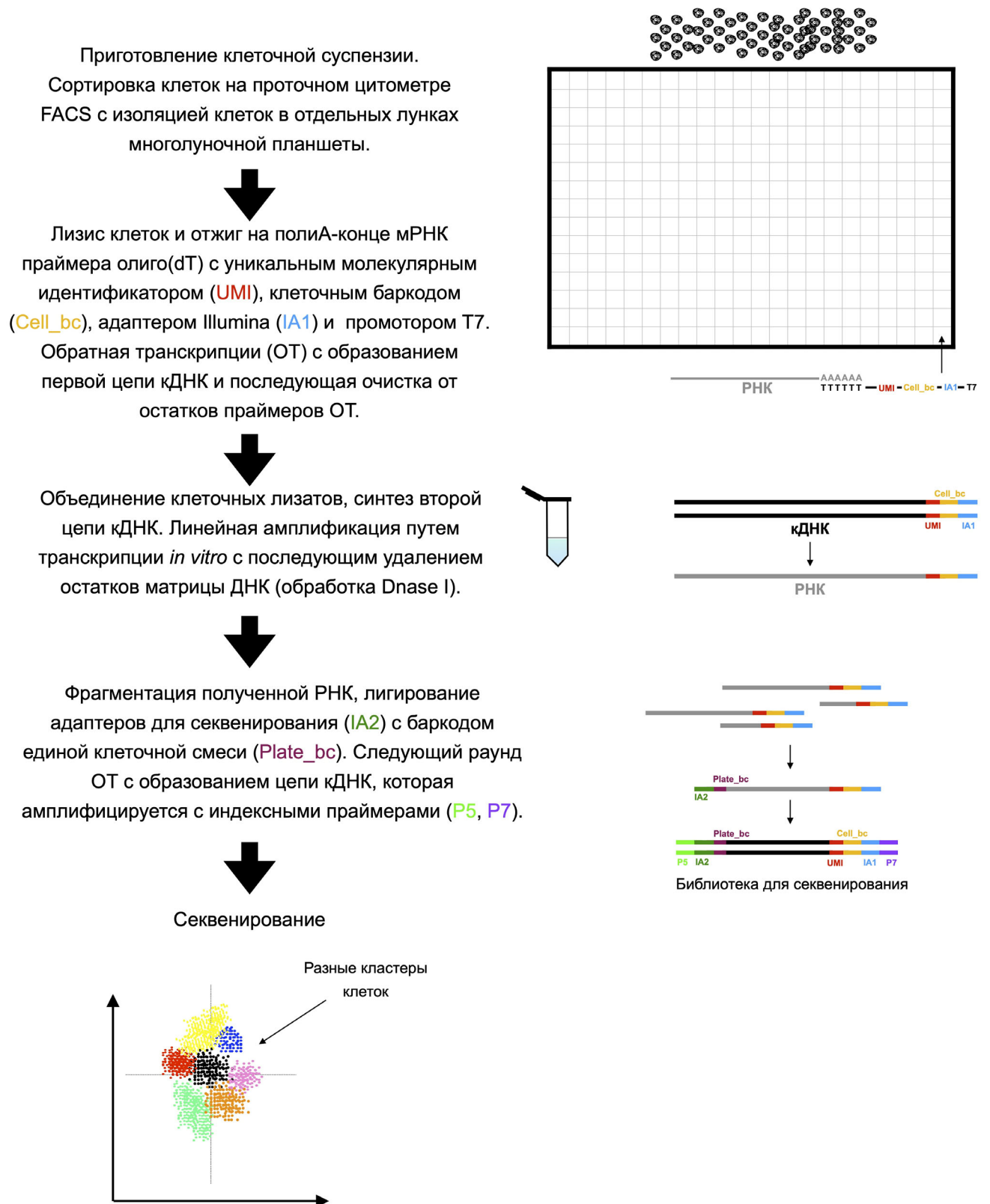


Рис. 5. Принцип метода MARS-seq (Massively parallel single cell RNA-Seq). Особенностью метода является возможность использования трёхуровневого баркодирования: молекулярной метки (UMI), клеточной метки и метки клеточной смеси для более точного анализа количества молекул. Метод позволяет учитывать только 3'-транскрипты мРНК с индивидуальными баркодами. По полученным данным секвенирования анализируют спектр активной мРНК во множестве отдельных клеток. Описание к рисунку составлено на основе источников [179, 180]

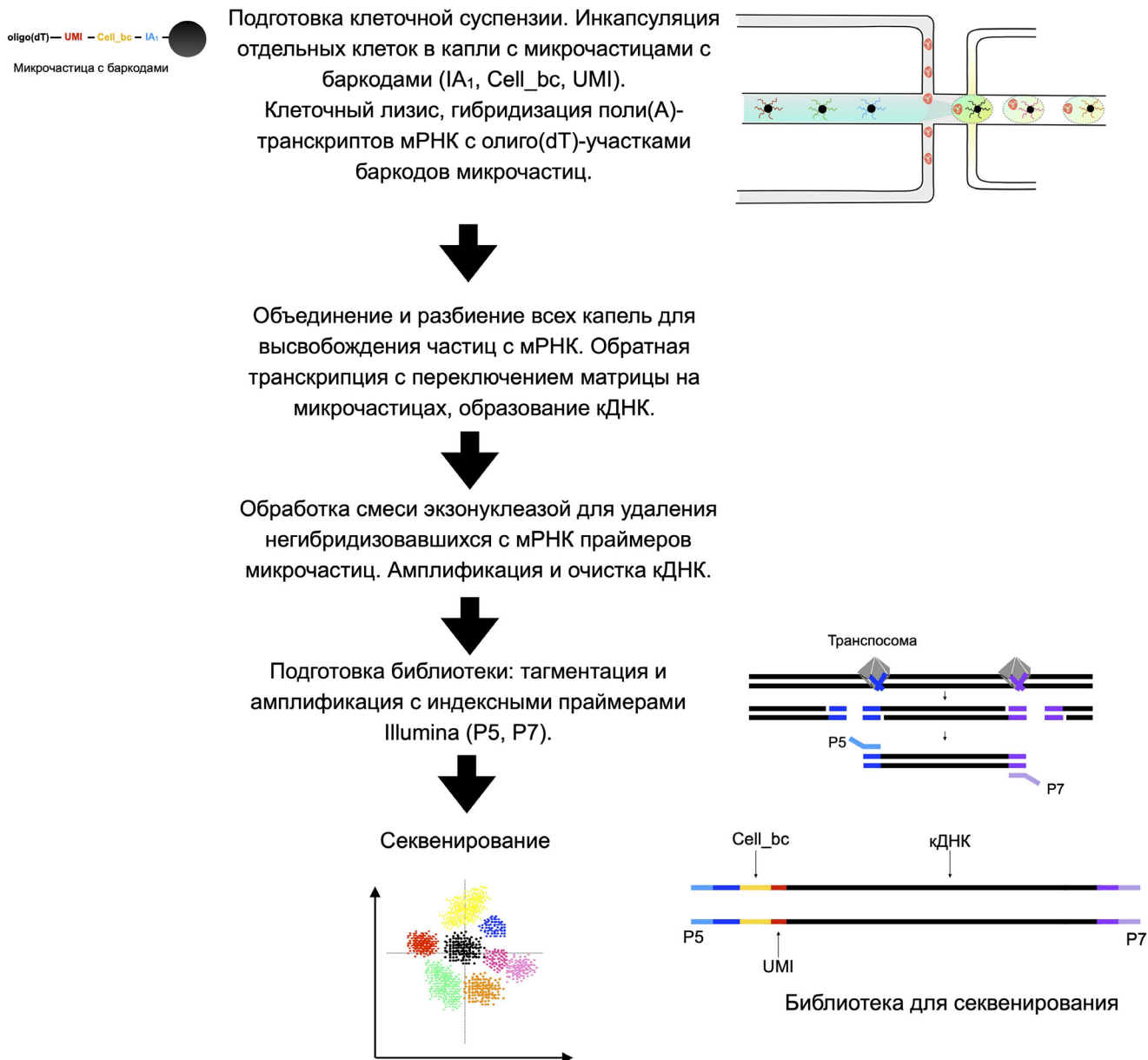


Рис. 6. Принцип метода Drop-seq (Droplets). Формат баркодирования схож с таковым у MARS-seq. Разница заключается в том, что баркоды прикреплены к микрочастицам (шарикам). Каждая микрочастица содержит множество олиго(dT)-праймеров с одним и тем же клеточным баркодом (Cell_bc), адаптером «Illumina» (IA₁) и разными UMI для цифрового подсчёта молекул мРНК. Как и в случае MARS-seq, при обработке данных учитываются только 3'-транскрипты. По полученным данным секвенирования анализируют транскрипты мРНК во множестве отдельных клеток. Схема — на основе работы Macosko et al. [182] с дополнениями на основе протокола Vageritz и Raddi [183] и протокола подготовки библиотек Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide («Illumina, Inc.»)

стволовых клеток тела полипа, а кластеры интерстициальных стволовых клеток связаны как с предшественниками нейронов, так и с нематоцитами. Кроме того, были определены кластеры дифференцированных нейронов, железистых клеток, нематоцитов и половых клеток, принадлежащих интерстициальной линии [181]. Анализ дифференциальной экспрессии на уровне единичных клеток позволил идентифицировать

пространственную экспрессию эпителиальных генов вдоль орально-анальной оси тела *Hydra* с определением ранее неохарактеризованных генов, кодирующих компоненты сигнальных путей развития (Wnt, BMP и FGF). С помощью детальных исследований интерстициальной линии клеток исследователи идентифицировали популяцию мультипотентных интерстициальных стволовых клеток, установив у них низкий уро-

вень или отсутствие экспрессии генов дифференцировки. Этот кластер клеток использовали для определения траектории развития интерстициальной линии, что выявило дифференцировку нейронов и железистых клеток через единое общее клеточное состояние, отличное от пути дифференцировки нематоцитов [181]. Применение метода ATAC-seq и его комбинирование с scRNA-seq позволило определить экспрессию транскрипционных факторов, специфичную для разных типов клеток и на разных этапах дифференцировки. Так, например, было показано, что гомеобоксный транскрипционный фактор RX задействован в развитии базального диска, а фактор транскрипции RFX функционирует в спецификации железистых клеток. Используя флуоресцентную гибридизацию *in situ*, научная группа сконструировала подробную молекулярную карту нервной системы *Hydra*, определив 12 различных подтипов нейронов [181].

Интересное исследование с использованием секвенирования транскриптомов единичных клеток демонстрирует молекулярно-генетическую структуру эндосимбиоза между восьмилучевым кораллом *Xenia* (Anthozoa) и одноклеточными динофлагеллятами [184]. Учёные использовали технологию scRNA-seq на платформе компании «10X Genomics Ins.», США. Технология секвенирования схожа с описанным выше Drop-seq. Исследователи определили 16 кластеров клеток с генами-маркерами для каждого кластера. Отдельное внимание было уделено идентификации клеток, задействованных в эндосимбиозе. Для этого с помощью цитометра были отсортированы клетки с водорослями и клетки без них. На данных клетках провели тотальное транскриптомное секвенирование, и затем полученные данные комбинировали с данными scRNA-seq. Дополнительное применение гибридизации *in situ* (метода RNAscope) и микроскопии криоконсервированных срезов тканей позволили, предположительно, установить кластер клеток гастродермиса, участвующий в эндосимбиозе [184]. Исследование процесса регенерации эндосимбиотической линии *Xenia* после физического удаления щупалец с использованием вычислительных методов для установления псевдвремени (меры того, как далеко продвинулась клетка в ходе биологического прогресса) [185] и динамики экспрессии (ожидаемого изменения экспрессии генов в ближайшем будущем) [186] показало, что эндосимбиотические клетки существуют в пяти динамических состояниях между гомеостатическими условиями и процессом регенерации: состояние 1 – преэндосимбиотический предшественник, который через промежуточное состояние 2 переходит в со-

стояние 3 (зрелые клетки с водорослями), а затем через промежуточное состояние 4 – в состояние 5 (постэндосимбиотические клетки). В образцах, проходящих регенерацию, обнаружен более высокий процент клеток в состояниях 1 и 2, в отличие от не регенерирующих вариантов, где оказалось больше клеток в состояниях 3–5. Показано, что пре-эндосимбиотические клетки экспрессируют лиганды молекулярного каскада Wnt (Wnt7b, Wnt11), которые могут быть задействованы в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников [184]. Данное исследование демонстрирует новую характеристику эндосимбиоза у кораллов, а также его необходимость в процессе регенерации.

Новые данные по секвенированию единичных клеток у представителя Hydrozoa *C. hemisphaerica* показывают пластичность разных типов клеток в условиях голодания [187]. С использованием технологии «10X Genomics Ins.» было определено 36 клеточных популяций, составляющих 8 основных кластеров клеток *C. hemisphaerica*, соответствующих эпидермису, гастродермису и производным мультипотентных интерстициальных стволовых клеток (ISC). Функциональная аннотация кластеров клеток с использованием уже опубликованных данных scRNA-seq и экспериментальных данных гибридизации *in situ* генов в целом организме позволила выявить новые типы клеток – биолюминесцентные клетки щупалец, экспрессирующие специфические эндогенные зелёные флуоресцентные белки (GFP), а также эпителиально-мышечные клетки гладкого и поперечнополосатого типа, выстилающие нижний слой колокола и велум, 6 подтипов пищеварительных клеток в гастродерме, соответствующие пищеварительным участкам в гастроваскулярной системе (желудок, гонады и бульбусы щупалец), предполагаемые механосенсорные клетки с экспрессией гомологов компонентов механосенсорного аппарата, характерного для волосковых клеток позвоночных. Особенностью медузы *C. hemisphaerica* является возможность постоянной генерации разных типов клеток, особенно нейронов и нематоцитов, из пулов ISC эпидермиса бульбусов щупалец. Анализ траекторий дифференцировки клеток интерстициальной линии с изучением генной экспрессии выявил потенциально специфичные для *C. hemisphaerica* маркерные гены. Эксперимент с реакцией на стрессовые условия в виде голодания показал, что организм не генерирует новые типы клеток в ответ на голодание, а формирует ответ за счёт изменения состояния существующих клеток. Эффект голодания был вариабельным для разных типов клеток, однако наибольшие изменения происходили в клетках

гастроваскулярной системы. Исследователи составили целую систему из кластеров клеток, в которых была детектирована дифференциальная экспрессия генов в процессе голодания, например генов ферментов оксидоредуктаз, диоксигеназ или генов лизосомального транспорта (*Npc2-like*), что позволило определить процессы, на которые влияет голодание, как, например метаболизм жирных кислот в клетках гастродермиса. Кроме того, высокая экспрессия генов голодания была зафиксирована в ранних ооцитах. Таким образом, голодание вызвало реорганизацию гастродермы и популяции клеток ооцитов. При этом изменения в организации гастродермы и профилей транскрипции, вызванные голоданием, опосредовали процессы самопереваривания тканей и мобилизацию гастродермальных клеток из гонад [187].

Технология секвенирования транскриптомов и эпигеномов отдельных клеток является мощным инструментом для изучения процессов развития живых организмов. Метод позволяет не только качественно охарактеризовывать разные типы клеток и конструировать карты регуляторных элементов геномов (на примере актинии *N. vectensis*), но и моделировать траектории развития отдельных клеточных линий (например, интерстициальных клеток у Hydrozoa). Кроме того, разрешение секвенирования на уровне единичных клеток позволяет более детально рассмотреть роль симбиотических отношений между разными организмами в процессах развития и регенерации (на примере коралла *Xenia*), а также установить клеточные и регуляторные механизмы процессов, происходящих в отдельных организмах в ответ на стрессовые условия (на примере гидромедузы *C. hemisphaerica*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стрекающие представляют собой уникальную группу животных с особенными характеристиками, связанными со строением, эволюцией, жизненными циклами, регенеративными способностями и процессами развития. Данные особенности обуславливают научный интерес к

этим животным, которые активно используются в качестве различных модельных объектов. Огромное количество исследований посвящено изучению процессов раннего развития разнообразных представителей Cnidaria. Использование технологий широкомасштабного высокопроизводительного секвенирования способствовало выявлению эволюционно консервативных механизмов молекулярно-генетического контроля этапов раннего развития Стрекающих и возможности их сопоставления с эмбриональным развитием высших Metazoa. Развитие технологий секвенирования нового поколения в области геномики, транскриптомики и эпигеномики как на уровне тканей, так и единичных клеток позволило проводить более глубокие исследования структуры и регуляторных функций генома, особенностей экспрессии определённых генов и разных типов клеток в пределах одного организма. Использование методов широкомасштабного секвенирования вывело научные знания в области характеристики особенностей приспособленности Стрекающих к стрессовым условиям окружающей среды, изучения жизненных циклов (в частности, уникального обратного развития), исследования стволовых клеток и механизмов развития на новый уровень. Эти данные несут в себе важную информацию не только с точки зрения фундаментального научного интереса, но и с точки зрения развития активно используемых в прикладных областях технологий широкомасштабного секвенирования.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке НТУ «Сириус» и Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-51015. Гусев Ф.Е. (описание эпигенетических подходов) был поддержан Научно-технологическим университетом «Сириус».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schierwater, B., Eitel, M., Jakob, W., Osigus, H.-J., Hadrys, H., et al. (2009) Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern “urmetazoan” hypothesis, *PLoS Biol.*, **7**, e20-e20, doi: 10.1371/journal.pbio.1000020.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., and Holstein, T. W. (2009) Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge, *Toxicon*, **54**, 1038-1045, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.03.006.
- Davy, S. K., Allemand, D., and Weis, V. M. (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 229-261, doi: 10.1128/MMBR.05014-11.
- Goulet, T. L., and Goulet, D. (2021) Climate change leads to a reduction in symbiotic derived cnidarian biodiversity

- on coral reefs, *Front. Ecol. Evol.*, **9**, doi: 10.3389/fevo.2021.636279.
5. Horton, T., Kroh, A., Ah Yong, S., Bailly, N., Bieler, R., et al. (2021) *World Register of Marine Species (WoRMS)*, WoRMS Editorial Board.
 6. Diller, W. F. (1940) The Invertebrates: *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora* (Hyman, L. B., ed.) 726 pp. McGraw-Hill Publications in the Zoological Sciences. A. Franklin Shull, consulting editor, *Science*, **92**, 219-220, doi: 10.1126/science.92.2384.219.b.
 7. Folino-Rorem, N. C. (2015) Chapter 9 – Phylum Cnidaria. in *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition)* (Thorp, J. H., and Rogers, D. C., eds.) Academic Press, Boston, pp. 159-179.
 8. Grimmelikhuijzen, C. J., and Westfall, J. A. (1995) The nervous systems of cnidarians, *EXS*, **72**, 7-24, doi: 10.1007/978-3-0348-9219-3_2.
 9. Galliot, B., and Quiquand, M. (2011) A two-step process in the emergence of neurogenesis, *Eur. J. Neurosci.*, **34**, 847-862, doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07829.x.
 10. Khabibulina, V. R., and Starunov, V. V. (2020) FMRamide immunoreactive nervous system in the adult *Cassiopeia xamachana* scyphopolyp and at the early stages of planuloid formation, *Invertebr. Zool.*, **17**, 371-384, doi: 10.15298/invertzool.17.4.03.
 11. Rentsch, F., Juliano, C., and Galliot, B. (2019) Modern genomic tools reveal the structural and cellular diversity of cnidarian nervous systems, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **56**, 87-96, doi: 10.1016/j.conb.2018.12.004.
 12. Tournière, O., Dolan, D., Richards, G. S., Sunagar, K., Columbus-Shenkar, Y. Y., et al. (2020) NvPOU4/Brain3 Functions as a terminal selector gene in the nervous system of the cnidarian *Nematostella vectensis*, *Cell Rep.*, **30**, 4473-4489.e4475, doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.031.
 13. Watanabe, H., Fujisawa, T., and Holstein, T. W. (2009) Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system, *Dev. Growth Differ.*, **51**, 167-183, doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01103.x.
 14. Leclère, L., and Röttinger, E. (2016) Diversity of cnidarian muscles: Function, anatomy, development and regeneration, *Front. Cell Dev. Biol.*, **4**, 157, doi: 10.3389/fcell.2016.00157.
 15. Berzins, I. K., Yanong, R. P. E., LaDouceur, E. E. B., and Peters, E. C. (2021) Cnidaria, in *Invertebrate Histology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 55-86.
 16. Cole, A. G., Kaul, S., Jahnel, S. M., Steger, J., Zimmerman, B., et al. (2020) Muscle cell type diversification facilitated by extensive gene duplications, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.19.210658.
 17. Okamura, B., and Gruhl, A. (2021) Evolution, Origins and Diversification of Parasitic Cnidarians, in *The Evolution and Fossil Record of Parasitism: Identification and Macroevolution of Parasites* (De Baets, K., and Huntley, J. W., eds.) Springer International Publishing, Cham, pp. 109-152.
 18. Chang, E. S., Neuhof, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., et al. (2015) Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 14912-14917, doi: 10.1073/pnas.1511468112.
 19. Kayal, E., Bentlage, B., Sabrina Pankey, M., Ohdera, A. H., Medina, M., et al. (2018) Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits, *BMC Evol. Biol.*, **18**, 68, doi: 10.1186/s12862-018-1142-0.
 20. Kayal, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, A. G., and Lavrov, D. V. (2013) Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics, *BMC Evol. Biol.*, **13**, 5, doi: 10.1186/1471-2148-13-5.
 21. Zapata, F., Goetz, F. E., Smith, S. A., Howison, M., Siebert, S., et al. (2015) Phylogenomic analyses support traditional relationships within Cnidaria, *PLoS One*, **10**, e0139068, doi: 10.1371/journal.pone.0139068.
 22. Technau, U., and Steele, R. E. (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria, *Development*, **138**, 1447-1458, doi: 10.1242/dev.048959.
 23. Osadchenko, B. V., and Kraus, Y. A. (2018) Trachylina: The group that remains enigmatic despite 150 years of investigations, *Russ. J. Dev. Biol.*, **49**, 134-145, doi: 10.1134/S1062360418030074.
 24. Maronna, M. M., Miranda, T. P., Peña Cantero, Á. L., Barbeitos, M. S., and Marques, A. C. (2016) Towards a phylogenetic classification of Leptothezata (Cnidaria, Hydrozoa), *Sci. Rep.*, **6**, 18075, doi: 10.1038/srep18075.
 25. Piraino, S., Vito, D. D., Schmich, J. R., Bouillon, J. P., and Boero, F. (2004) Reverse development in Cnidaria, *Can. J. Zool.*, **82**, 1748-1754, doi: 10.1139/z04-174.
 26. Ballesteros, A., Östman, C., Santín, A., Marambio, M., Narda, M., et al. (2021) Cnidome and morphological features of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa) throughout the different life cycle stages, *Front. Mar. Sci.*, **8**, 1059, doi: 10.3389/fmars.2021.714503.
 27. Piraino, S., Boero, F., Aeschbach, B., and Schmid, V. (1996) Reversing the life cycle: Medusae transforming into polyps and cell transdifferentiation in *Turritopsis nutricula* (Cnidaria, Hydrozoa), *Biol. Bull.*, **190**, 302-312, doi: 10.2307/1543022.
 28. He, J., Zheng, L., Zhang, W., and Lin, Y. (2015) Life Cycle Reversal in *Aurelia* sp. 1 (Cnidaria, Scyphozoa), *PLoS One*, **10**, e0145314, doi: 10.1371/journal.pone.0145314.
 29. Babonis, L. S., and Martindale, M. Q. (2017) Phylogenetic evidence for the modular evolution of metazoan signalling pathways, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **372**, 20150477, doi: 10.1098/rstb.2015.0477.
 30. Chapman, J. A., Kirkness, E. F., Simakov, O., Hampson, S. E., Mitros, T., et al. (2010) The dynamic genome of *Hydra*, *Nature*, **464**, 592-596, doi: 10.1038/nature08830.
 31. Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., et al. (2007) Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization, *Science*, **317**, 86-94, doi: 10.1126/science.1139158.
 32. Kanehisa, M., and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 27-30, doi: 10.1093/nar/28.1.27.
 33. Khalturin, K., Shinzato, C., Khalturina, M., Hamada, M., Fujie, M., et al. (2019) Medusozoan genomes inform the evolution of the jellyfish body plan, *Nat. Ecol. Evol.*, **3**, 811-822, doi: 10.1038/s41559-019-0853-y.
 34. Kim, H. M., Weber, J. A., Lee, N., Park, S. G., Cho, Y. S., et al. (2019) The genome of the giant Nomura's jellyfish sheds light on the early evolution of active predation, *BMC Biol.*, **17**, 28, doi: 10.1186/s12915-019-0643-7.
 35. Brekhan, V., Malik, A., Haas, B., Sher, N., and Lotan, T. (2015) Transcriptome profiling of the dynamic life cycle of the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita*, *BMC Genom.*, **16**, 74, doi: 10.1186/s12864-015-1320-z.
 36. Avila Soria, G. (2009) *Molecular characterization of Carukia barnesi and Malo kingi, Cnidaria; Cubozoa; Carybdeidae*. PhD thesis, James Cook University.
 37. Ohdera, A., Ames, C. L., Dikow, R. B., Kayal, E., Chiudin, M., et al. (2019) Box, stalked, and upside-down? Draft genomes from diverse jellyfish (Cnidaria, Acraspeda) lineages: *Alatina alata* (Cubozoa), *Calvadosia cruxmelitensis* (Staurozoa), and *Cassiopea xamachana* (Scyphozoa), *Gigascience*, **8**, giz069, doi: 10.1093/gigascience/giz069.
 38. Martindale, M. Q., Finnerty, J. R., and Henry, J. Q. (2002) The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **24**, 358-365, doi: 10.1016/S1055-7903(02)00208-7.
 39. Arendt, D., Tosches, M. A., and Marlow, H. (2016) From nerve net to nerve ring, nerve cord and brain – evolution of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 61-72, doi: 10.1038/nrn.2015.15.
 40. Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D., and Martindale, M. Q. (2004) Origins of bilateral symmetry:

- Hox* and *Dpp* expression in a sea anemone, *Science*, **304**, 1335-1337, doi: doi:10.1126/science.1091946.
41. Genikhovich, G., and Technau, U. (2017) On the evolution of bilaterality, *Development*, **144**, 3392-3404, doi: 10.1242/dev.141507.
 42. He, S., Del Viso, F., Chen, C. Y., Ikmi, A., Kroesen, A. E., et al. (2018) An axial *Hox* code controls tissue segmentation and body patterning in *Nematostella vectensis*, *Science*, **361**, 1377-1380, doi: 10.1126/science.aar8384.
 43. Lebedeva, T., Aman, A. J., Graf, T., Niedermoser, I., Zimmermann, B., et al. (2021) Cnidarian-bilaterian comparison reveals the ancestral regulatory logic of the beta-catenin dependent axial patterning, *Nat. Commun.*, **12**, 4032, doi: 10.1038/s41467-021-24346-8.
 44. DuBuc, T. Q., Stephenson, T. B., Rock, A. Q., and Martindale, M. Q. (2018) *Hox* and *Wnt* pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation, *Nat. Commun.*, **9**, 2007, doi: 10.1038/s41467-018-04184-x.
 45. Momose, T., Derelle, R., and Houliston, E. (2008) A maternally localised *Wnt* ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*, *Development*, **135**, 2105-2113, doi: 10.1242/dev.021543.
 46. Plickert, G., Jacoby, V., Frank, U., Muller, W. A., and Mokady, O. (2006) *Wnt* signaling in hydroid development: formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning, *Dev. Biol.*, **298**, 368-378, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.043.
 47. Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., et al. (2000) *WNT* signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*, *Nature*, **407**, 186-189, doi: 10.1038/35025063.
 48. Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., and Bode, H. R. (2005) Formation of the head organizer in *hydra* involves the canonical *Wnt* pathway, *Development*, **132**, 2907-2916, doi: 10.1242/dev.01848.
 49. Philipp, I., Aufschnaiter, R., Ozbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., et al. (2009) *Wnt*/beta-catenin and non-canonical *Wnt* signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan *Hydra*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4290-4295, doi: 10.1073/pnas.0812847106.
 50. Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., et al. (2009) Multiple *Wnts* are involved in *Hydra* organizer formation and regeneration, *Dev. Biol.*, **330**, 186-199, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.02.004.
 51. Nakamura, Y., Tsiairis, C. D., Özbek, S., and Holstein, T. W. (2011) Autoregulatory and repressive inputs localize *Hydra Wnt3* to the head organizer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9137-9142, doi: 10.1073/pnas.1018109108.
 52. Reddy, P. C., Gungi, A., Ubhe, S., Pradhan, S. J., Kolte, A., et al. (2019) Molecular signature of an ancient organizer regulated by *Wnt*/β-catenin signalling during primary body axis patterning in *Hydra*, *Commun. Biol.*, **2**, 1-11, doi: 10.1038/s42003-019-0680-3.
 53. Wang, R., Steele, R. E., and Collins, E.-M. S. (2020) *Wnt* signaling determines body axis polarity in regenerating *Hydra* tissue fragments, *Dev. Biol.*, **467**, 88-94, doi: 10.1016/j.ydbio.2020.08.012.
 54. Moneer, J., Siebert, S., Krebs, S., Cazet, J., Prexl, A., et al. (2021) Differential gene regulation in DAPT-treated *Hydra* reveals candidate direct Notch signalling targets, *J. Cell Sci.*, **134**, jcs258768, doi: 10.1242/jcs.258768.
 55. Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., et al. (2005) Unexpected complexity of the *Wnt* gene family in a sea anemone, *Nature*, **433**, 156-160, doi: 10.1038/nature03158.
 56. Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., et al. (2003) An ancient role for nuclear β-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation, *Nature*, **426**, 446-450, doi: 10.1038/nature02113.
 57. Lee, P. N., Kumburegama, S., Marlow, H. Q., Martindale, M. Q., and Wikramanayake, A. H. (2007) Asymmetric developmental potential along the animal-vegetal axis in the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled, *Dev. Biol.*, **310**, 169-186, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.040.
 58. Trevino, M., Stefanik, D. J., Rodriguez, R., Harmon, S., and Burton, P. M. (2011) Induction of canonical *Wnt* signaling by alsterpaullone is sufficient for oral tissue fate during regeneration and embryogenesis in *Nematostella vectensis*, *Dev. Dyn.*, **240**, 2673-2679, doi: 10.1002/dvdy.22774.
 59. Kirillova, A., Genikhovich, G., Pukhlyakova, E., Demilly, A., Kraus, Y., et al. (2018) Germ-layer commitment and axis formation in sea anemone embryonic cell aggregates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 1813-1818, doi: 10.1073/pnas.1711516115.
 60. Ryan, J. F., Mazza, M. E., Pang, K., Matus, D. Q., Baxevasis, A. D., et al. (2007) Pre-bilaterian origins of the *Hox* cluster and the *Hox* code: Evidence from the sea anemone, *Nematostella vectensis*, *PLoS One*, **2**, e153, doi: 10.1371/journal.pone.0000153.
 61. Genikhovich, G., Fried, P., Prünster, M. M., Schinko, J. B., Gilles, A. F., et al. (2015) Axis patterning by BMPs: Cnidarian network reveals evolutionary constraints, *Cell Rep.*, **10**, 1646-1654, doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.035.
 62. Matus, D. Q., Magie, C. R., Pang, K., Martindale, M. Q., and Thomsen, G. H. (2008) The Hedgehog gene family of the cnidarian, *Nematostella vectensis*, and implications for understanding metazoan Hedgehog pathway evolution, *Dev. Biol.*, **313**, 501-518, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.032.
 63. Saina, M., Genikhovich, G., Renfer, E., and Technau, U. (2009) BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18592-18597, doi: 10.1073/pnas.0900151106.
 64. Leclère, L., and Rentzsch, F. (2014) RGM regulates BMP-mediated secondary axis formation in the sea anemone *Nematostella vectensis*, *Cell Rep.*, **9**, 1921-1930, doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.009.
 65. Kraus, Y., Aman, A., Technau, U., and Genikhovich, G. (2016) Pre-bilaterian origin of the blastoporal axial organizer, *Nat. Commun.*, **7**, 11694, doi: 10.1038/ncomms11694.
 66. Momose, T., and Schmid, V. (2006) Animal pole determinants define oral-aboral axis polarity and endodermal cell fate in hydrozoan jellyfish *Podocoryne carnea*, *Dev. Biol.*, **292**, 371-380, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.012.
 67. Duffy, D. J., Plickert, G., Kuenzel, T., Tilmann, W., and Frank, U. (2010) *Wnt* signaling promotes oral but suppresses aboral structures in *Hydractinia* metamorphosis and regeneration, *Development*, **137**, 3057-3066, doi: 10.1242/dev.046631.
 68. Momose, T., and Houliston, E. (2007) Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo, *PLoS Biol.*, **5**, e70, doi: 10.1371/journal.pbio.0050070.
 69. Technau, U. (2020) Gastrulation and germ layer formation in the sea anemone *Nematostella vectensis* and other cnidarians, *Mech. Dev.*, **163**, 103628, doi: 10.1016/j.mod.2020.103628.
 70. Kraus, Y. A., and Markov, A. V. (2017) Gastrulation in Cnidaria: The key to an understanding of phylogeny or the chaos of secondary modifications? *Biol. Bull. Rev.*, **7**, 7-25, doi: 10.1134/S2079086417010029.
 71. Röttinger, E., Dahlin, P., and Martindale, M. Q. (2012) A framework for the establishment of a cnidarian gene regulatory network for "endomesoderm" specification: The inputs of β-catenin/TCF signaling, *PLoS Genet.*, **8**, e1003164, doi: 10.1371/journal.pgen.1003164.
 72. Chen, C. Y., McKinney, S. A., Ellington, L. R., and Gibson, M. C. (2020) Hedgehog signaling is required for endomesodermal patterning and germ cell development in the sea anemone *Nematostella vectensis*, *Elife*, **9**, e54573, doi: 10.7554/eLife.54573.
 73. Wijesena, N. M. (2012) *Wnt Signaling in the Cnidarian Nematostella vectensis: Insights into the Evolution of*

- Gastrulation*. PhD thesis, University of Miami, Coral Gables.
74. Leclère, L., Bause, M., Sinigaglia, C., Steger, J., and Rentsch, F. (2016) Development of the aboral domain in *Nematostella* requires β -catenin and the opposing activities of Six3/6 and Frizzled5/8, *Development*, **143**, 1766-1777, doi: 10.1242/dev.120931.
 75. Wijesena, N., Sun, H., Kumburegama, S., and Wikramanayake, A. H. (2021) Distinct Frizzled receptors independently mediate endomesoderm specification and primary arch on invagination during gastrulation in *Nematostella*, *Dev. Biol.*, **481**, 215-225, doi: 10.1016/j.ydbio.2021.11.002.
 76. Vetrova, A. A., Lebedeva, T. S., Saidova, A. A., Kupaeva, D. M., Kraus, Y. A., et al. (2021) From apolar gastrula to polarized larva: Embryonic development of a marine hydroid, *Dynamena pumila*, *Dev. Dyn.*, **1-31**, doi: 10.1002/dvdy.439.
 77. Kraus, Y., Flici, H., Hensel, K., Plickert, G., Leitz, T., and Frank, U. (2014) The embryonic development of the cnidarian *Hydractinia echinata*, *Evol Dev*, **16**, 323-338, doi: 10.1111/ede.12100.
 78. Momose, T., Kraus, Y., and Houlston, E. (2012) A conserved function for Strabismus in establishing planar cell polarity in the ciliated ectoderm during cnidarian larval development, *Development*, **139**, 4374-4382, doi: 10.1242/dev.084251.
 79. Fröblius, A. C., Genikhovich, G., Kürn, U., Anton-Erxleben, F., and Bosch, T. C. G. (2003) Expression of developmental genes during early embryogenesis of *Hydra*, *Dev. Genes Evol.*, **213**, 445-455, doi: 10.1007/s00427-003-0344-6.
 80. Siebert, S., and Juliano, C. E. (2017) Sex, polyps, and medusae: Determination and maintenance of sex in cnidarians, *Mol. Reprod. Dev.*, **84**, 105-119, doi: 10.1002/mrd.22690.
 81. Technau, U., Miller, M. A., Bridge, D., and Steele, R. E. (2003) Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis, *Dev. Biol.*, **260**, 191-206, doi: 10.1016/S0012-1606(03)00241-0.
 82. Айзенштадт Т. Б. (1980) Исследование оогенеза у гидры. IV. Фагоцитарная активность ооцитов, *Онтогенез*, **11**, 31-38.
 83. Rentsch, F., Hobmayer, B., and Holstein, T. W. (2005) Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in *Hydra* gametogenesis, *Dev. Biol.*, **278**, 1-12, doi: 10.1016/j.ydbio.2004.10.007.
 84. Kasbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C. N., Dall'armi, E., et al. (2007) The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*, *Dev. Biol.*, **303**, 376-390, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.022.
 85. Hobmayer, B., Rentsch, F., and Holstein, T. W. (2001) Identification and expression of HySmad1, a member of the R-Smad family of TGFbeta signal transducers, in the diploblastic metazoan *Hydra*, *Dev. Genes Evol.*, **211**, 597-602, doi: 10.1007/s00427-001-0198-8.
 86. Miller, M. A., and Steele, R. E. (2000) Lemon encodes an unusual receptor protein-tyrosine kinase expressed during gametogenesis in *Hydra*, *Dev. Biol.*, **224**, 286-298, doi: 10.1006/dbio.2000.9786.
 87. Amiel, A., and Houlston, E. (2009) Three distinct RNA localization mechanisms contribute to oocyte polarity establishment in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*, *Dev. Biol.*, **327**, 191-203, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.12.007.
 88. Houlston, E., Leclère, L., Munro, C., Copley, R., and Momose, T. (2021) Past, present and future of *Clytia hemisphaerica* as a laboratory jellyfish, hal-03346217.
 89. Sanders, S. M., Shcheglovitova, M., and Cartwright, P. (2014) Differential gene expression between functionally specialized polyps of the colonial hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* (Phylum Cnidaria), *BMC Genomics*, **15**, 406, doi: 10.1186/1471-2164-15-406.
 90. Eckelbarger, K. J., Hand, C., and Uhlinger, K. R. (2008) Ultrastructural features of the trophonema and oogenesis in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis* (Edwardsiidae), *Invertebrate Biol.*, **127**, 381-395, doi: 10.1111/j.1744-7410.2008.00146.x.
 91. Бочарова Е. С., Косевич И. А. (2011) Варианты размножения актиний (CNIDARIA, ANTHOZOA), *Зоологический журнал*, **90**, 1283-1295.
 92. Reuven, S., Rinsky, M., Brekhan, V., Malik, A., Levy, O., et al. (2021) Cellular pathways during spawning induction in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, *Sci. Rep.*, **11**, 15451, doi: 10.1038/s41598-021-95033-3.
 93. Chiu, Y.-L., Shikina, S., Yoshioka, Y., Shinzato, C., and Chang, C.-F. (2020) *De novo* transcriptome assembly from the gonads of a scleractinian coral, *Euphyllia ancora*: molecular mechanisms underlying scleractinian gametogenesis, *BMC Genomics*, **21**, 732, doi: 10.1186/s12864-020-07113-9.
 94. Rentsch, F., Layden, M., and Manuel, M. (2017) The cellular and molecular basis of cnidarian neurogenesis, *WIREs Dev. Biol.*, **6**, e257, doi: 10.1002/wdev.257.
 95. Nakanishi, N., Renfer, E., Technau, U., and Rentsch, F. (2012) Nervous systems of the sea anemone *Nematostella vectensis* are generated by ectoderm and endoderm and shaped by distinct mechanisms, *Development*, **139**, 347-357, doi: 10.1242/dev.071902.
 96. Al-Shaer, L., Havrilak, J., and Layden, M. (2021) *Nematostella vectensis* as a Model System. in *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology*, CRC Press, Boca Raton, pp. 107-128.
 97. Yuan, D., Nakanishi, N., Jacobs, D. K., and Hartenstein, V. (2008) Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia*, *Dev. Genes Evol.*, **218**, 525-539, doi: 10.1007/s00427-008-0254-8.
 98. Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., et al. (2009) Origins of neurogenesis, a cnidarian view, *Dev. Biol.*, **332**, 2-24, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.563.
 99. Gahan, J. M., Schnitzler, C. E., DuBuc, T. Q., Doonan, L. B., Kanska, J., et al. (2017) Functional studies on the role of Notch signaling in *Hydractinia* development, *Dev. Biol.*, **428**, 224-231, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.06.006.
 100. Wang, W. (2013) *Regulation of metamorphosis and the evolution of life cycles: insights from the common moon jelly A. aurita*. PhD thesis, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
 101. Watanabe, H., Kuhn, A., Fushiki, M., Agata, K., Özbek, S., et al. (2014) Sequential actions of β -catenin and Bmp pattern the oral nerve net in *Nematostella vectensis*, *Nat. Commun.*, **5**, 5536, doi: 10.1038/ncomms6536.
 102. Duffy, D. J., and Frank, U. (2011) Modulation of COUP-TF expression in a cnidarian by ectopic Wnt signalling and alleorecognition, *PLoS One*, **6**, e19443, doi: 10.1371/journal.pone.0019443.
 103. Matus, D. Q., Thomsen, G. H., and Martindale, M. Q. (2007) FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian, *Dev. Genes Evol.*, **217**, 137-148, doi: 10.1007/s00427-006-0122-3.
 104. Rentsch, F., Fritzenwanker, J. H., Scholz, C. B., and Technau, U. (2008) FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*, *Development*, **135**, 1761-1769, doi: 10.1242/dev.020784.
 105. Layden, M. J., Johnston, H., Amiel, A. R., Havrilak, J., Steinworth, B., et al. (2016) MAPK signaling is necessary for neurogenesis in *Nematostella vectensis*, *BMC Biol.*, **14**, 61, doi: 10.1186/s12915-016-0282-1.
 106. Turwankar, A., and Ghaskadbi, S. (2019) VEGF and FGF signaling during head regeneration in hydra, *Gene*, **717**, 144047, doi: 10.1016/j.gene.2019.144047.
 107. Fujita, S., Kuranaga, E., and Nakajima, Y.-I. (2021) Regeneration potential of jellyfish: Cellular mechanisms

- and molecular insights, *Genes*, **12**, 758, doi: 10.3390/genes12050758.
108. Röttinger, E. (2021) *Nematostella vectensis*, an emerging model for deciphering the molecular and cellular mechanisms underlying whole-body regeneration, *Cells*, **10**, 2692, doi: 10.3390/cells10102692.
 109. Vogg, M. C., Buzgariu, W., Suknovic, N. S., and Galliot, B. (2021) Cellular, metabolic, and developmental dimensions of whole-body regeneration in *Hydra*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **13**, doi: 10.1101/cshperspect.a040725.
 110. Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., et al. (2009) Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration, *Dev. Cell*, **17**, 279–289, doi: 10.1016/j.devcel.2009.07.014.
 111. Gufler, S., Artes, B., Bielen, H., Krainer, I., Eder, M. K., et al. (2018) β -Catenin acts in a position-independent regeneration response in the simple eumetazoan *Hydra*, *Dev. Biol.*, **433**, 310–323, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.005.
 112. Vogg, M. C., Beccari, L., Iglesias Ollé, L., Rampon, C., Vriz, S., et al. (2019) An evolutionarily-conserved Wnt3/ β -catenin/Sp5 feedback loop restricts head organizer activity in *Hydra*, *Nat. Commun.*, **10**, 312, doi: 10.1038/s41467-018-08242-2.
 113. Technau, U., Cramer von Laue, C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., et al. (2000) Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12127–12131, doi: 10.1073/pnas.97.22.12127.
 114. Ferenc, J., Papasaikas, P., Ferralli, J., Nakamura, Y., Smallwood, S., et al. (2020) Wnt3 expression as a readout of tissue stretching during *Hydra* regeneration, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.22.423911.
 115. Tursch, A., Bartsch, N., and Holstein, T. W. (2020) MAPK signaling links the injury response to Wnt-regulated patterning in *Hydra* regeneration, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.06.189795.
 116. Chera, S., Ghila, L., Wenger, Y., and Galliot, B. (2011) Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration, *Dev. Growth Differ.*, **53**, 186–201, doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01250.x.
 117. Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., et al. (2013) Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*, *Dev. Biol.*, **383**, 146–157, doi: 10.1016/j.ydbio.2013.08.022.
 118. Wenger, Y., Buzgariu, W., Perruchoud, C., Loichot, G., and Galliot, B. (2019) Generic and context-dependent gene modulations during *Hydra* whole body regeneration, *bioRxiv*, doi: 10.1101/587147.
 119. Kaloulis, K. (2001) *Molecular Basis of Morphogenetic Events in Hydra: Study of the CREB and Hedgehog Pathways during Budding and Regeneration*. PhD thesis, Université de Genève, Genève.
 120. Bradshaw, B., Thompson, K., and Frank, U. (2015) Distinct mechanisms underlie oral vs aboral regeneration in the cnidarian *Hydractinia echinata*, *eLife*, **4**, e05506, doi: 10.7554/eLife.05506.
 121. Sinigaglia, C., Peron, S., Eichelbrenner, J., Chevalier, S., Steger, J., et al. (2020) Pattern regulation in a regenerating jellyfish, *Elife*, **9**, e54868, doi: 10.7554/eLife.54868.
 122. Cartwright, P., Travers, M. K., and Sanders, S. M. (2021) The evolution and development of coloniality in hydrozoans, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **336**, 293–299, doi: 10.1002/jez.b.22996.
 123. Bagaeva, T. S., Kupaeva, D. M., Vetrova, A. A., Kosevich, I. A., Kraus, Y. A., et al. (2019) cWnt signaling modulation results in a change of the colony architecture in a hydrozoan, *Dev. Biol.*, **456**, 145–153, doi: 10.1016/j.ydbio.2019.08.019.
 124. Muller, W., Frank, U., Teo, R., Mokady, O., Guette, C., et al. (2007) Wnt signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3 β inhibitors, *Int. J. Dev. Biol.*, **51**, 211–220, doi: 10.1387/ijdb.62247wm.
 125. Hou, S., Zhu, J., Shibata, S., Nakamoto, A., and Kumano, G. (2021) Repetitive accumulation of interstitial cells generates the branched structure of *Cladonema* medusa tentacles, *Development*, **148**, doi: 10.1242/dev.199544.
 126. DuBuc, T. Q., Traylor-Knowles, N., and Martindale, M. Q. (2014) Initiating a regenerative response; cellular and molecular features of wound healing in the cnidarian *Nematostella vectensis*, *BMC Biol.*, **12**, 24, doi: 10.1186/1741-7007-12-24.
 127. Stewart, Z. K., Pavasovic, A., Hock, D. H., and Prentis, P. J. (2017) Transcriptomic investigation of wound healing and regeneration in the cnidarian *Calliactis polypus*, *Sci. Rep.*, **7**, 41458, doi: 10.1038/srep41458.
 128. Luz, B. L. P., Miller, D. J., and Kitahara, M. V. (2021) High regenerative capacity is a general feature within colonial dendrophylliid corals (Anthozoa, Scleractinia), *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **336**, 281–292, doi: 10.1002/jez.b.23021.
 129. Van der Burg, C. A., and Prentis, P. J. (2021) The Tentacular Spectacular: Evolution of regeneration in sea anemones, *Genes*, **12**, 1072, doi: 10.3390/genes12071072.
 130. Böttger, A., and Hassel, M. (2012) *Hydra*, a model system to trace the emergence of boundaries in developing eumetazoans, *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, 583–591, doi: 10.1387/ijdb.113454ab.
 131. Mortzfeld, B. M., Taubenheim, J., Klimovich, A. V., Fraune, S., Rosenstiel, P., et al. (2019) Temperature and insulin signaling regulate body size in *Hydra* by the Wnt and TGF- β pathways, *Nat. Commun.*, **10**, 3257, doi: 10.1038/s41467-019-11136-6.
 132. Seipel, K., and Schmid, V. (2006) Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae, *Int. J. Dev. Biol.*, **50**, 589–599, doi: 10.1387/ijdb.062150ks.
 133. Pennati, R., Dell'Anna, A., Pagliara, P., Scari, G., Piraino, S., et al. (2013) Neural system reorganization during metamorphosis in the planula larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria), *Zoomorphology*, **132**, 227–237, doi: 10.1007/s00435-013-0188-1.
 134. Seipp, S., Schmich, J., Will, B., Schetter, E., Plickert, G., et al. (2010) Neuronal cell death during metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa), *Invertebrate Neurosci.*, **10**, 77–91, doi: 10.1007/s10158-010-0109-7.
 135. Stumpf, M., Will, B., Wittig, K., Kasper, J., Fischer, B., et al. (2010) An organizing region in metamorphosing hydrozoan planula larvae – stimulation of axis formation in both larval and in adult tissue, *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 795–802, doi: 10.1387/ijdb.082738ms.
 136. Krasovec, G., Pottin, K., Rosello, M., Quéinnec, É., and Chambon, J.-P. (2021) Apoptosis and cell proliferation during metamorphosis of the planula larva of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria), *Dev. Dyn.*, **250**, 1739–1758, doi: 10.1002/dvdy.376.
 137. Seipel, K., Eberhardt, M., Müller, P., Pescia, E., Yanze, N., et al. (2004) Homologs of vascular endothelial growth factor and receptor, VEGF and VEGFR, in the jellyfish *Podocoryne carnea*, *Dev. Dyn.*, **231**, 303–312, doi: 10.1002/dvdy.20139.
 138. Sanders, S. M., and Cartwright, P. (2015) Patterns of Wnt signaling in the life cycle of *Podocoryna carnea* and its implications for medusae evolution in Hydrozoa (Cnidaria), *Evol. Dev.*, **17**, 325–336, doi: 10.1111/ede.12165.
 139. Nawrocki, A. M., and Cartwright, P. (2013) Expression of Wnt pathway genes in polyps and medusa-like structures of *Ectopleura larynx* (Cnidaria: Hydrozoa), *Evol. Dev.*, **15**, 373–384, doi: 10.1111/ede.12045.
 140. Gold, D. A., Nakanishi, N., Hensley, N. M., Hartenstein, V., and Jacobs, D. K. (2016) Cell tracking supports secondary gastrulation in the moon jellyfish *Aurelia*, *Dev. Genes Evol.*, **226**, 383–387, doi: 10.1007/s00427-016-0559-y.

141. Rentzsch, F., Anton, R., Saina, M., Hammerschmidt, M., Holstein, T. W., et al. (2006) Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: Implications for the evolution of axial patterning. *Dev. Biol.*, **296**, 375-387, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.003.
142. Strader, M. E., Aglyamova, G. V., and Matz, M. V. (2018) Molecular characterization of larval development from fertilization to metamorphosis in a reef-building coral. *BMC Genom.*, **19**, 17, doi: 10.1186/s12864-017-4392-0.
143. Steele, R. E. (2002) Developmental signaling in *Hydra*: What does it take to build a “simple” animal? *Dev. Biol.*, **248**, 199-219, doi: doi.org/10.1006/dbio.2002.0744.
144. Leclère, L., Horin, C., Chevalier, S., Lapebie, P., Dru, P., et al. (2019) The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle. *Nat. Ecol. Evol.*, **3**, 801-810, doi: 10.1038/s41559-019-0833-2.
145. Lisenkova, A. A., Grigorenko, A. P., Tyazhelova, T. V., Andreeva, T. V., Gusev, F. E., et al. (2017) Complete mitochondrial genome and evolutionary analysis of *Turritopsis dohrnii*, the “immortal” jellyfish with a reversible life-cycle. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **107**, 232-238, doi: 10.1016/j.ympev.2016.11.007.
146. Shinzato, C., Khalturin, K., Inoue, J., Zayas, Y., Kanda, M., et al. (2020) Eighteen coral genomes reveal the evolutionary origin of acropora strategies to accommodate environmental changes. *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 16-30, doi: 10.1093/molbev/msaa216.
147. Fuchs, B., Wang, W., Graspeuntner, S., Li, Y., Insua, S., et al. (2014) Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*. *Curr. Biol.*, **24**, 263-273, doi: 10.1016/j.cub.2013.12.003.
148. Ge, J., Liu, C., Tan, J., Bian, L., and Chen, S. (2018) Transcriptome analysis of scyphozoan jellyfish *Rhopilema esculentum* from polyp to medusa identifies potential genes regulating strobilation. *Dev. Genes Evol.*, **228**, 243-254, doi: 10.1007/s00427-018-0621-z.
149. Nielsen, S. K. D., Koch, T. L., Hauser, F., Garm, A., and Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2019) *De novo* transcriptome assembly of the cubomedusa *Tripedalia cystophora*, including the analysis of a set of genes involved in peptidergic neurotransmission. *BMC Genomics*, **20**, 175, doi: 10.1186/s12864-019-5514-7.
150. Duncan, E. J., Gluckman, P. D., and Dearden, P. K. (2014) Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **322**, 208-220, doi: 10.1002/jez.b.22571.
151. Moore, L. D., Le, T., and Fan, G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 23-38, doi: 10.1038/npp.2012.112.
152. Henderson, I. R., and Jacobsen, S. E. (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, **447**, 418-424, doi: 10.1038/nature05917.
153. Sarda, S., Zeng, J., Hunt, B. G., and Yi, S. V. (2012) The evolution of invertebrate gene body methylation. *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 1907-1916, doi: 10.1093/molbev/mss062.
154. Illumina. Methylation Sequencing, URL: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/methylation-sequencing.html>, Accessed 25.10.2021.
155. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., et al. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1827-1831, doi: 10.1073/pnas.89.5.1827.
156. Masser, D. R., Hadad, N., Porter, H., Stout, M. B., Unnikrishnan, A., et al. (2018) Analysis of DNA modifications in aging research. *Geroscience*, **40**, 11-29, doi: 10.1007/s11357-018-0005-3.
157. Li, Y., Liew, Y. J., Cui, G., Cziesielski, M. J., Zahran, N., et al. (2018) DNA methylation regulates transcriptional homeostasis of algal endosymbiosis in the coral model *Aiptasia*. *Sci. Adv.*, **4**, eaat2142, doi: 10.1126/sciadv.aat2142.
158. Dimond, J. L., Nguyen, N., and Roberts, S. B. (2021) DNA methylation profiling of a cnidarian-algal symbiosis using nanopore sequencing. *G3 (Bethesda)*, **11**, jkab148, doi: 10.1093/g3journal/jkab148.
159. Dixon, G. B., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2014) Bimodal signatures of germline methylation are linked with gene expression plasticity in the coral *Acropora millepora*. *BMC Genomics*, **15**, 1109, doi: 10.1186/1471-2164-15-1109.
160. Dixon, G., Liao, Y., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2018) Role of gene body methylation in acclimatization and adaptation in a basal metazoan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 13342-13346, doi: 10.1073/pnas.1813749115.
161. Dixon, G. B., Bay, L. K., and Matz, M. V. (2016) Evolutionary consequences of DNA methylation in a basal metazoan. *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 2285-2293, doi: 10.1093/molbev/msw100.
162. Hassel, M., Cornelius, M. G., Vom Brocke, J., and Schmeiser, H. H. (2010) Total nucleotide analysis of *Hydra* DNA and RNA by MEKC with LIF detection and ³²P-postlabeling. *Electrophoresis*, **31**, 299-302, doi: 10.1002/elps.200900458.
163. Pillai, A., Gungi, A., Reddy, P. C., and Galande, S. (2021) Epigenetic regulation in *Hydra*: Conserved and divergent roles. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 663208, doi: 10.3389/fcell.2021.663208.
164. Kyger, R., Luzuriaga-Neira, A., Layman, T., Milkewitz Sandberg, T. O., Singh, D., et al. (2021) Myxosporea (Myxozoa, Cnidaria) lack DNA cytosine methylation. *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 393-404, doi: 10.1093/molbev/msaa214.
165. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., and Greenleaf, W. J. (2013) Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods*, **10**, 1213-1218, doi: 10.1038/nmeth.2688.
166. Weizman, E. N., Tannenbaum, M., Tarrant, A. M., Hakim, O., and Levy, O. (2019) Chromatin dynamics enable transcriptional rhythms in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *PLoS Genet.*, **15**, e1008397, doi: 10.1371/journal.pgen.1008397.
167. Weizman, E., Rinsky, M., Simon-Blecher, N., Lampert-Karako, S., Yaron, O., et al. (2021) Chromatin dynamics and gene expression response to heat exposure in field-conditioned versus laboratory-cultured *Nematostella vectensis*. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7454, doi: 10.3390/ijms22147454.
168. Weizman, E., and Levy, O. (2019) The role of chromatin dynamics under global warming response in the symbiotic coral model *Aiptasia*. *Commun. Biol.*, **2**, 282, doi: 10.1038/s42003-019-0543-y.
169. Murad, R., Macias-Muñoz, A., Wong, A., Ma, X., and Mortazavi, A. (2021) Coordinated gene expression and chromatin regulation during hydra head regeneration. *Genome Biol. Evol.*, **13**, doi: 10.1093/gbe/evab221.
170. Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., et al. (2007) Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat. Methods*, **4**, 651-657, doi: 10.1038/nmeth1068.
171. Illumina. Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq), URL: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/chip-seq.html>, Accessed 25.10.2021.
172. Park, P. J. (2009) ChIP-seq: Advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 669-680, doi: 10.1038/nrg2641.
173. Nakato, R., and Sakata, T. (2021) Methods for ChIP-seq analysis: a practical workflow and advanced applications. *Methods*, **187**, 44-53, doi: 10.1016/j.ymeth.2020.03.005.
174. Abcam plc. Histone modifications, URL: <https://www.abcam.com/epigenetics/histone-modifications>, Accessed 03.12.2021.
175. Cell Signaling Technology, I. Histone Modification Table, URL: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/>

- reference-tables/histone-modification-table, Accessed 03.12.2021.
176. Reddy, P. C., Gungi, A., Ubhe, S., and Galande, S. (2020) Epigenomic landscape of enhancer elements during *Hydra* head organizer formation, *Epigenet. Chromatin*, **13**, 43, doi: 10.1186/s13072-020-00364-6.
 177. Schwaiger, M., Schonauer, A., Rendeiro, A. F., Pribitzer, C., Schauer, A., et al. (2014) Evolutionary conservation of the eumetazoan gene regulatory landscape, *Genome Res.*, **24**, 639-650, doi: 10.1101/gr.162529.113.
 178. Sebe-Pedros, A., Saudemont, B., Chomsky, E., Plessier, F., Mailhe, M. P., et al. (2018) Cnidarian cell type diversity and regulation revealed by whole-organism single-cell RNA-Seq, *Cell*, **173**, 1520-1534.e1520, doi: 10.1016/j.cell.2018.05.019.
 179. Jaitin, D. A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., et al. (2014) Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types, *Science*, **343**, 776-779, doi: 10.1126/science.1247651.
 180. Keren-Shaul, H., Kenigsberg, E., Jaitin, D. A., David, E., Paul, F., et al. (2019) MARS-seq2.0: An experimental and analytical pipeline for indexed sorting combined with single-cell RNA sequencing, *Nat. Protoc.*, **14**, 1841-1862, doi: 10.1038/s41596-019-0164-4.
 181. Siebert, S., Farrell, J. A., Cazet, J. F., Abeykoon, Y., Primack, A. S., et al. (2019) Stem cell differentiation trajectories in *Hydra* resolved at single-cell resolution, *Science*, **365**, eaav9314, doi: 10.1126/science.aav9314.
 182. Macosko, E. Z., Basu, A., Satija, R., Nemes, J., Shekhar, K., et al. (2015) Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets, *Cell*, **161**, 1202-1214, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.002.
 183. Bageritz, J., and Raddi, G. (2019) *Single-Cell RNA Sequencing with Drop-Seq*. in *Single Cell Methods: Sequencing and Proteomics* (Proserpio, V. ed.) Springer New York, New York, pp. 73-85.
 184. Hu, M., Zheng, X., Fan, C. M., and Zheng, Y. (2020) Lineage dynamics of the endosymbiotic cell type in the soft coral *Xenia*, *Nature*, **582**, 534-538, doi: 10.1038/s41586-020-2385-7.
 185. Qiu, X., Mao, Q., Tang, Y., Wang, L., Chawla, R., et al. (2017) Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories, *Nat. Methods*, **14**, 979-982, doi: 10.1038/nmeth.4402.
 186. La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., et al. (2018) RNA velocity of single cells, *Nature*, **560**, 494-498, doi: 10.1038/s41586-018-0414-6.
 187. Chari, T., Weissbourd, B., Gehring, J., Ferraioli, A., Leclère, L., et al. (2021) Whole animal multiplexed single-cell RNA-Seq reveals plasticity of *Clytia* medusa cell types, bioRxiv, doi: 10.1101/2021.01.22.427844.
 188. Lapebie, P., Ruggiero, A., Barreau, C., Chevalier, S., Chang, P., et al. (2014) Differential responses to Wnt and PCP disruption predict expression and developmental function of conserved and novel genes in a cnidarian, *PLoS Genet.*, **10**, e1004590, doi: 10.1371/journal.pgen.1004590.
 189. Marlow, H., Roettinger, E., Boekhout, M., and Martindale, M. Q. (2012) Functional roles of Notch signaling in the cnidarian *Nematostella vectensis*, *Dev. Biol.*, **362**, 295-308, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.11.012.
 190. Matus, D. Q., Thomsen, G. H., and Martindale, M. Q. (2006) Dorsal/ventral genes are asymmetrically expressed and involved in germ-layer demarcation during cnidarian gastrulation, *Curr. Biol.*, **16**, 499-505, doi: 10.1016/j.cub.2006.01.052.
 191. Suryawanshi, A., Schaefer, K., Holz, O., Apel, D., Lange, E., et al. (2020) What lies beneath: *Hydra* provides cnidarian perspectives into the evolution of FGFR docking proteins, *Dev. Genes Evol.*, **230**, 227-238, doi: 10.1007/s00427-020-00659-4.

STUDYING OF MOLECULAR REGULATION OF DEVELOPMENTAL PROCESSES OF LOWER METAZOANS EXEMPLIFIED BY Cnidaria USING HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING

Review

T. V. Erofeeva^{1,2}, A. P. Grigorenko^{1,2*}, F. E. Gusev^{1,2},
I. A. Kosevich^{1,3}, and E. I. Rogaev^{1,2,3,4}

¹ Department Research Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, 354349 Sochi, Krasnodar Region, Russia; e-mail: anast1998@mail.ru

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Shrewsbury, MA 01545, USA

A unique set of features and characteristics of species of the Cnidaria phylum is the one reason that makes them a model for a various studies. The plasticity of a life cycle and the processes of cell differentiation and development of an integral multicellular organism associated with it are of a specific scientific interest. A new stage of development of molecular genetic methods, including methods for deep genome, transcriptome, and epigenome sequencing, both at the level of the whole organism and at the level of individual cells, makes it possible to obtain a detailed picture of the development of these animals. This review examines some modern approaches and advances in the reconstruction of the processes of ontogenesis of Cnidaria by studying the regulatory signal transduction pathways and their interactions.

Keywords: Cnidaria, development, sequencing technologies, genomics, signaling pathways