

ГЕНЫ *WNT* И *FRIZZLED* У ИГЛОКОЖИХ

© 2019 г. А. С. Гирич¹, *, А. В. Бойко¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: astromoon@mail.ru

Поступила в редакцию 19.06.2018 г.

После доработки 27.12.2018 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

С помощью методов молекулярной биологии и биоинформатики изучены гены *wnt* и *frizzled* у 17 видов иглокожих. Показано, что у иглокожих имеется от 11 до 13 генов *wnt* и 4 гена *frizzled*. В целом для типа Echinodermata характерна утрата отдельных генов семейства Wnt. В частности, у представителей всех классов, кроме Asterozoa, отсутствует ген *wnt11*, а у исследованных представителей Echinozoa утрачен и ген *wnt2*. Гены *wnt* являются консервативными, однако аминокислотные последовательности соответствующих белков лишь на 49–73% идентичны таковым гомологичных белков у разных классов иглокожих. В то же время семейство Frizzled характеризуется большей степенью сходства – 63–76%. В данной работе также проведен анализ филогении генных семейств Wnt и Frizzled.

Ключевые слова: Wnt сигналинг, *wnt*, *frizzled*, иглокожие, транскриптом

DOI: 10.1134/S0134347519050127

Wnt сигналинг является одним из наиболее важных механизмов, с помощью которого осуществляется дистанционное межклеточное взаимодействие (Huelsen, Behrens, 2002; Mo, Cui, 2012). Он необходим как при формировании организма в эмбриогенезе (Logan, Nusse, 2004; Reya, Clevers, 2005; Козин и др., 2019), так и для поддержания жизнедеятельности взрослого животного (Almuedo-Castillo et al., 2012). Данный сигнальный путь также принимает участие в регуляции регенерации, а нарушение этого механизма может приводить к формированию опухолей или к смерти (Reya, Clevers, 2005; Poustka et al., 2007). Вероятно, Wnt сигналинг появляется у наиболее примитивных многоклеточных, поскольку у Stenophora и Placozoa уже имеется 2–3 лиганда Wnt и 1–2 рецептора Frizzled (Adamska et al., 2007; Srivastava et al., 2008; Lapebie et al., 2009; Pang et al., 2010). Причем на этом этапе эволюции количество лигандов больше, чем рецепторов. Смысл такого “неравноправия” до сих пор не ясен, так как в результате взаимодействий лиганда и рецептора активируется один из трех сигнальных путей Wnt (Комия, Nabas, 2008). Возможно, разные лиганды связываются с рецептором с разной эффективностью, что приводит к конкуренции между ними, вследствие чего осуществляется регуляция процессов (Kestler, Köhl, 2008; Grumolato et al., 2010).

Одним из интереснейших процессов, в котором принимает участие Wnt сигналинг, является реге-

нерация. Исследования последних лет показывают, что белки семейств Wnt и Frizzled не только контролируют заживление ран, но и координируют формирование утраченной конечности (Kawakami et al., 2006; Yokoyama et al., 2011; Takeo et al., 2013). Среди беспозвоночных хорошие восстановительные способности выявлены у иглокожих. Эти животные могут регенерировать после значительных повреждений, причем восстановление утраченных органов происходит без участия стволовых клеток за счет дедифференцировки сохранившихся дифференцированных клеток (Mladenov et al., 1989; García-Arrarás et al., 1998; Dolmatov, Ginanova, 2001; Долматов, Машанов, 2007; Mashanov et al., 2008; García-Arrarás, Dolmatov, 2010). Недавно было показано, что при регенерации у иглокожих активируется сигнальный путь Wnt (Sun et al., 2011; Mashanov et al., 2012; Girich et al., 2017; Li et al., 2017).

Иглокожие являются удобными модельными объектами для изучения генных механизмов развития (Poustka et al., 2007; Robert et al., 2014) и регенерации (Sun et al., 2011; Mashanov et al., 2012), однако полноценные данные о генах *wnt* и *frizzled* ограничены исследованиями на морских ежах *Strongylocentrotus purpuratus* и *Paracentrotus lividus* (Croce et al., 2006; Robert et al., 2014), а также на морских звездах *Patiria miniata* и *P. pectinifera* (McCauley et al., 2013; Kawai et al., 2016). Для голотурий имеются сведения лишь об отдельных генах *wnt* (Mashanov et al., 2012; Sun et al., 2013; Li et al., 2017),

а данные для офиур и морских лилий отсутствуют. Кроме морских ежей, для других классов иглокожих общее число генов *wnt* и *frizzled* неизвестно. Поэтому интересно выяснить, является ли отсутствие гена *wnt2* у морского ежа *S. purpuratus* уникальным или оно характерно для всего класса Echinoidea. В этой связи определены цели настоящего исследования: поиск на собственном материале и в базах данных последовательностей транскриптов *wnt* и *frizzled*, а также анализ филогении этих генных семейств у иглокожих.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для анализа использованы особи голотурии *Eupentacta fraudatrix*, собранные в зал. Петра Великого Японского моря, а также морской лилии *Himerometra robustipinna* и голотурии *Cladolabes schmeltzii* из зал. Нячанг Южно-Китайского моря. Из животных была выделена РНК с помощью TRI reagent (MRC). Синтез кДНК, секвенирование транскриптома (Illumina HiSeq) и последующая сборка контигов осуществлены компанией Евроген (ЗАО Евроген). Параметры секвенированных транскриптомов для *E. fraudatrix*: N 50 = 830, программа сборки Trinity 2.1.11, объем контигов 827 Mb; для *C. schmeltzii*: N 50 = 771, программа сборки Trinity 2.4.0, объем контигов 100 Mb; для *H. robustipinna*: N 50 = 800, программа сборки Trinity 2.4.0, объем контигов 148 Mb. Полные последовательности транскриптов были получены методом RACE.

Дополнительно проведен поиск транскриптов генов *wnt* и *frizzled* иглокожих с помощью базы данных SPbase (<http://www.echinobase.org/Echinobase>) и NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) по алгоритмам tblastx и blastn. Базы данных транскриптомов были загружены и переведены в аминокислотные последовательности (по 6 аминокислотных последовательностей на одну нуклеотидную) с помощью mEMBOSS (так как аминокислотные последовательности имеют большую гомологию). Подобный алгоритм действий применяли и к собственным транскриптомам. Далее, используя алгоритм blastp в программе Ugene, проводили поиск последовательностей искомым генов. Были обнаружены последовательности искомым генов у голотурий *Apostichopus japonicus*, *Parastichopus parvimensis*, *Sclerodactyla briareus*, *E. fraudatrix* и *C. schmeltzii*, у морских ежей *Eucidaris tribuloides*, *Lytechinus variegatus* и *Sphaerichinus granulatus*, у морских звезд *P. miniata*, *P. pectinifera*, *Henricia* sp. и *Leptasterias* sp., у офиуры *Ophiothrix spiculata* и у морской лилии *H. robustipinna*. Транскрипты искомым генов не были найдены лишь у морской лилии *Anneissia japonica*.

Окончательную сборку контигов и выравнивание последовательностей производили в программе Mega 5.1 с дальнейшей корректировкой вручную по консервативным остаткам цистеина у белков Wnt и по консервативным доменам у

белков Frizzled. Последовательности, использованные для выравнивания, доступны по ссылке (<https://docs.google.com/document/d/e/2PACX-1vRnd-ofrU8A1U7WG7fgKCY1ySoNLKJvrMJoXvroZZJXZ-bhP7XyP-UWAvtRzmLbUzooe7BbOs2keDNQ/pub>). Использовали также программу GeneRunner для определения рамок считывания. Полученные последовательности загружены в базу данных NCBI.

Сравнение предполагаемых аминокислотных последовательностей белков проводили через онлайн сервис Align Sequences Protein BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=blasttab).

Для построения филогенетических деревьев нуклеотидные и аминокислотные последовательности генов *wnt*, *frizzled* и соответствующих им белков анализировали с помощью Partitionfinder 2.1.1 (Lanfear et al., 2016); аминокислотные последовательности анализировали также в программе Gblocks_0.91b. После выявления консервативных блоков были созданы выравнивания с удаленными участками малой схожести, которые также использовали для построения филогенетических деревьев.

Деревья, отражающие эволюцию генов *wnt* и *frizzled*, были построены с помощью трех алгоритмов: MrBayes с 1 500 000 генерациями (Guindon et al., 2010), Maximum Likelihood и онлайн сервиса CIPRES (<http://www.phylo.org>), а также с помощью Neighbor-Joining и программы MegaX. Для этого были использованы полные кодирующие последовательности транскриптов, аминокислотные последовательности и выравнивание с удаленными участками малой схожести от всех пяти классов иглокожих: голотурии (*A. japonicus*), морские ежи (*S. purpuratus*), морские звезды (*P. miniata*), морские лилии (*H. robustipinna*) и офиуры (*O. spiculata*). Идентичным методом было построено филогенетическое дерево генов *wnt* с добавлением последовательностей книдарий (*Nematostella vectensis* и *Acropora digitifera*), полухордовых (*Saccoglossus kowalevskii*), рыб (*Danio rerio*), амфибий (*Xenopus laevis*) и млекопитающих (*Mus musculus*).

Полученные деревья загружены в базу данных <https://www.treebase.org> и доступны по ссылке <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S23695?x-access-code=86605374091d2e5f83bbe12abab19577&format=html>

РЕЗУЛЬТАТЫ

Почти во всех транскриптомах иглокожих были обнаружены транскрипты генов *wnt* и *frizzled*. Наиболее полный набор генов *wnt* выявлен у морской звезды *P. miniata* (табл. 1). У данного вида обнаружен также ген *wnt11*, который отсутствовал у всех других изученных нами представителей иглокожих. У морской звезды *Leptasterias* sp. найдены транскрипты четырех генов *wnt*: *wnt1*, *wnt5*, *wnt7* и

Таблица 1. Гены *wnt* у представителей разных классов иглокожих

Класс	Вид	<i>wntA</i>	<i>wnt1</i>	<i>wnt2</i>	<i>wnt3</i>	<i>wnt4</i>	<i>wnt5</i>	<i>wnt6</i>	<i>wnt7</i>	<i>wnt8</i>	<i>wnt9</i>	<i>wnt10</i>	<i>wnt11</i>	<i>wnt16</i>
Морские звезды	<i>P. miniata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>P. pectinifera</i>	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+
	<i>Henricia</i> sp.	+	–	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	+
	<i>Leptasterias</i> sp.	+	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–
Морские ежи	<i>E. tribuloides</i>	–	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	–	+
	<i>L. variegatus</i>	–	–	–	+	–	+	+	–	+	+	–	–	+
	<i>S. granulatus</i>	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
	<i>S. purpuratus</i> *	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Голотурии	<i>P. lividus</i> *	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
	<i>A. japonicus</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
	<i>P. parvimensis</i>	+	+	–	+	+	+	+	–	–	–	+	–	–
	<i>S. briareus</i>	+	+	–	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–
	<i>E. fraudatrix</i>	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+
Морские лилии	<i>C. schmeltzii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
	<i>H. robustipinna</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Офиуры	<i>A. japonica</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	<i>O. spiculata</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+

*Геном секвенирован.

wntA, а у морской звезды *Henricia* sp. – пяти: *wnt4*, *wnt5*, *wnt8*, *wnt16* и *wntA*. В геноме офиуры *O. spiculata* обнаружены гены *wntA*, *wnt1–10* и *wnt16*. У морских ежей *E. tribuloides*, *L. variegatus* и *S. granulatus* найдены разные наборы *wnt* (табл. 1). У этих видов так же, как у *S. purpuratus* и *P. lividus*, отсутствовали гены *wnt2* и *wnt11*.

Анализ транскриптомов голотурий *E. fraudatrix* и *C. schmeltzii* показал, что у данных видов экспрессируется немного различающийся набор генов *wnt*. У *E. fraudatrix* мы не обнаружили транскрипты генов *wnt1* и *wnt11*, а у *C. schmeltzii* – *wnt8*, *wnt9* и *wnt11* (табл. 1). Среди голотурий у *A. japonicus* обнаружено наибольшее число генов семейства Wnt, однако и у этого вида отсутствовал ген *wnt11*. У остальных голотурий выявлены разные наборы генов семейства Wnt, при этом транскрипты *wnt11* также не обнаружены. Набор *wnt* в транскриптоме морской лилии *H. robustipinna* был сходен с таковым у *A. japonicus*. У *H. robustipinna* обнаружены транскрипты *wnt1–10*, *wnt16* и *wntA*. У морской лилии *A. japonica* транскрипты генов *wnt* не найдены.

Построенные филогенетические деревья генов *wnt* показали, что *wnt10* и *wnt9* располагаются у основания дерева (рис. 1, 2). В большинстве деревьев близко к основанию также расположены группы *wnt1–wnt6* и *wntA–wnt8*. Кроме этого формируется группа генов *wnt2–wnt4–wnt11* (рис. 2), расположенная на удалении от основания дерева. Достоверность таких пар достаточно высокая и составляет 97–100%. Исходя из построенного дерева, невозможно судить об эволюции иг-

локожих, так как наиболее древними классами оказываются то морские лилии, то голотурии или морские звезды. Подобный результат получен, вероятно, из-за большой изменчивости генов *wnt*. Группа *wnt2–wnt4–wnt11* наиболее изменчива у иглокожих. У представителей всех классов, кроме морских звезд, отсутствовал ген *wnt11*, а у морских ежей – и *wnt2*. Для подтверждения правильности построения деревьев были использованы три разных метода и три разные программы (рис. 2). Хотя порядок ветвления у большинства деревьев различался, все же большая часть филогенетических деревьев показала формирование сходных групп.

Интересные результаты были получены при сравнении аминокислотных последовательностей белков Wnt у разных классов иглокожих (рис. 3). Гомология основной части белков Wnt у разных классов иглокожих составляла 60–65%. Wnt9 характеризовался наименьшей гомологией – 49%, а белки Wnt2 и Wnt4 наибольшей – 71–73%. Гомология между отдельными белками Wnt у одного животного составляла 30–46%. Следовательно, Wnt9 показал наибольшую изменчивость у разных классов иглокожих, приблизительно такую же, как изменчивость разных белков Wnt в пределах одного вида.

Кроме лигандов Wnt у всех 17 изученных видов иглокожих обнаружены транскрипты генов *frizzled1/2/7* и *frizzled5/8*. Транскрипты *frizzled4* не были найдены у *S. briareus* и *L. variegatus*, транскрипты *frizzled9/10* – у *L. variegatus*, *S. granulatus* и *Leptasterias* sp. (табл. 2). Анализ филогении генов *frizzled* пока-



Рис. 1. Филогенетическое дерево дивергенции генов *wnt*, построенное на основе полных кодирующих последовательностей транскриптов генов *wnt*, всех пяти классов иглокожих, а также *S. kowalevskii*, *M. musculus*, *X. laevis*, *D. rerio*, *N. vectensis* и *A. digitifera*. Дерево сгенерировано с помощью метода MrBayes.

зал, что ближе к основанию филогенетического дерева располагался *frizzled1/2/7* (рис. 4). Далее располагались паралоги *frizzled5/8*, *frizzled4* и *frizzled9/10*.

Выполненное сравнение аминокислотных последовательностей белков Frizzled показало, что максимальную гомологию среди иглокожих имели Frizzled5/8 и Frizzled4 (74–76%), а минимальную – Frizzled9/10 и Frizzled1/2/7 (63–66%) (рис. 5). Изменчивость последовательностей белков рецепторов Frizzled была меньше, чем таковая у лигандов Wnt.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что у всех иглокожих имеется от 11 до 13 генов лигандов Wnt и 4 гена рецептора Frizzled. Максимальное количество генов *wnt* обнаружено у морских звезд, у которых выявлен уникальный среди иглокожих ген *wnt11* (Kawai et al., 2016). То, что *wnt11* не обнаружен у представителей других классов иглокожих, в том числе и у более эволюционно древних морских лилий, можно объяснить несколькими причинами. Наиболее простая причина – отсутствие аннотированных геномов.

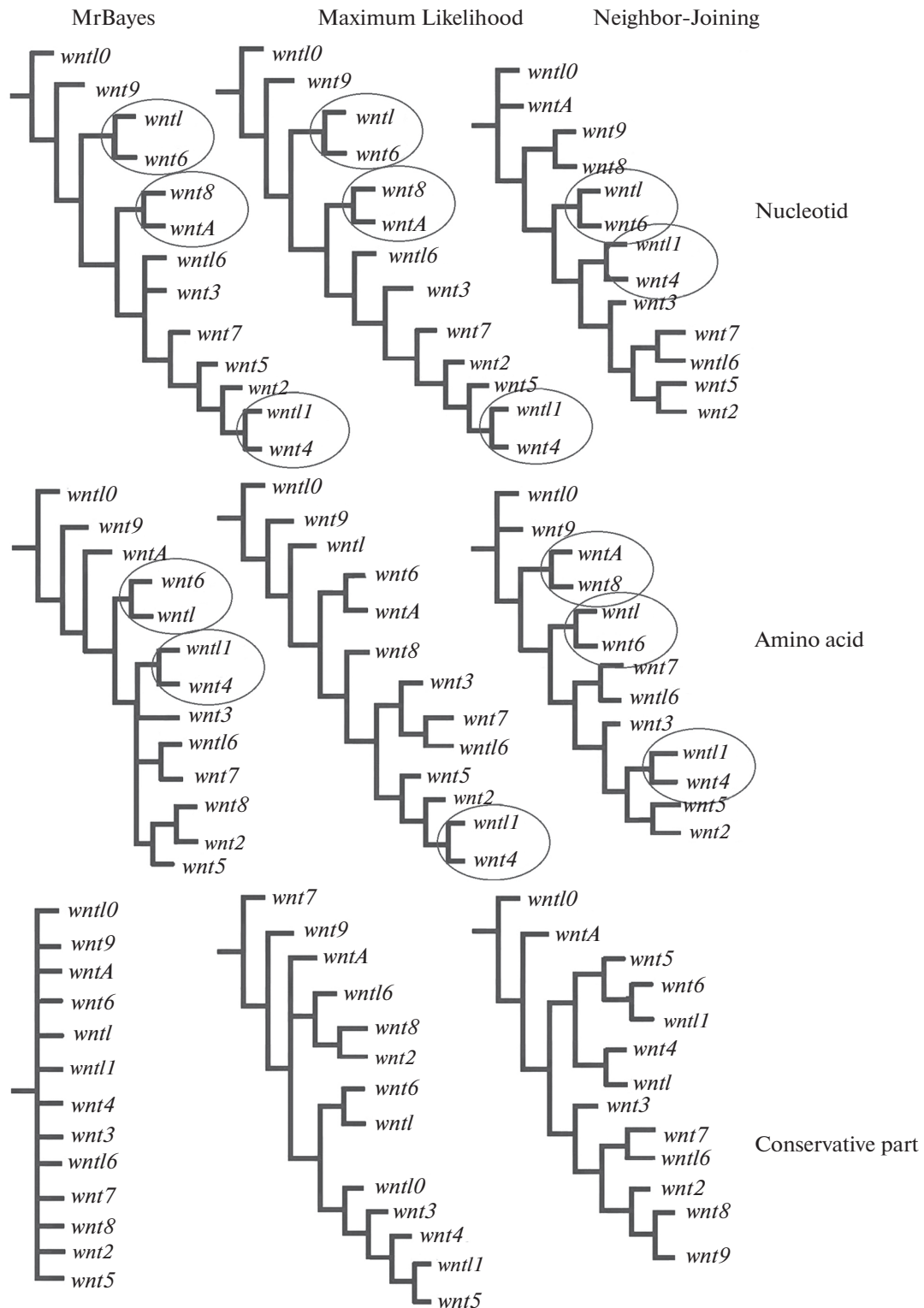


Рис. 2. Схемы филогенетических деревьев дивергенции генов *wnt*, построенные на основе полных кодирующих последовательностей транскриптов генов *wnt*, иглокожих, губок, кишечнополостных, полухордовых, рыб, амфибий и млекопитающих. Деревья сгенерированы с помощью метода MrBayes, Maximum Likelihood и Neighbor-Joining; использованы нуклеотидные последовательности транскриптов (Nucleotid), аминокислотные последовательности белков (Amino acid) и консервативные области аминокислотных последовательностей (Conservative part). Обведены группы генов, формирующиеся в большинстве построенных деревьев.

Сравниваемые классы	WntA	Wnt1	Wnt2	Wnt3	Wnt4	Wnt5	Wnt6	Wnt7	Wnt8	Wnt9	Wnt10	Wnt16
Морские лилии—голотурии	55	59	66	59	67	63	55	56	55	44	63	50
Морские лилии-морские ежи	57	61	-	56	69	66	58	61	57	46	65	50
Морские лилии-морские звезды	52	58	70	54	72	69	54	64	62	48	58	62
Морские лилии-офиуры	52	54	72	59	71	70	56	65	50	49	61	59
Голотурии-морские ежи	61	65	-	63	70	68	62	64	47	54	58	48
Голотурии-морские звезды	55	59	75	60	71	67	63	64	56	45	58	50
Голотурии-офиуры	59	59	73	62	73	66	63	61	53	47	58	48
Морские ежи-морские звезды	54	66	-	61	74	73	65	74	50	54	63	55
Морские ежи-офиуры	58	63	-	64	72	75	63	75	48	53	63	51
Морские звезды-офиуры	56	63	82	63	75	75	67	78	59	53	54	65
Средняя гомология	56	61	73	60	71	69	61	66	54	49	60	54
Голотурии-полухордовые	47	60	69	59	67	61	64	61	57	45	50	43
Голотурии-амфибии	-	59	63	54	67	60	56	58	47	43	42	39
Голотурии-млекопитающие	-	58	63	55	66	60	50	59	46	41	42	40

Рис. 3. Гомология предполагаемых аминокислотных последовательностей белков Wnt разных классов иглокожих, полухордовых, амфибий и млекопитающих (в %).

Анализ на основе транскриптомов может дать отрицательный результат из-за низкого уровня экспрессии или ошибок секвенирования. Другой причиной может быть неоднократная и независимая утрата этого гена в разных группах иглокожих. Возможно, в эволюции иглокожих происходило уменьшение функциональной значимости гена *wnt11*, что сопровождалось/вызывалось сни-

жением его активности. Сходную функцию мог выполнять другой ген данного семейства. Это могло стать причиной полной утраты гена *wnt11*, поскольку без его экспрессии животное могло полноценно развиваться и давать потомство. С этой гипотезой согласуются сведения о том, что ген *wnt11* не экспрессируется в эмбриогенезе морской звезды *Patiria pectinifera* (Kawai et al., 2016).

Таблица 2. Гены *frizzled* у представителей разных классов иглокожих

Класс	Вид	<i>frizzled1/2/7</i>	<i>frizzled4</i>	<i>frizzled5/8</i>	<i>frizzled9/10</i>
Морские звезды	<i>P. miniata</i>	+	+	+	+
	<i>P. pectinifera</i>	+	+	+	+
	<i>Henricia</i> sp.	+	+	+	+
	<i>Leptasterias</i> sp.	+	+	+	-
Морские ежи	<i>E. tribuloides</i>	+	+	+	+
	<i>L. variegatus</i>	+	+	-	-
	<i>S. granulatus</i>	+	+	+	-
	<i>S. purpuratus</i> *	+	+	+	+
	<i>P. lividus</i> *	+	+	+	+
Голотурии	<i>A. japonicus</i> *	+	+	+	+
	<i>P. parvimensis</i>	+	+	+	+
	<i>S. briareus</i>	+	+	-	+
	<i>E. fraudatrix</i>	+	+	+	+
	<i>C. schmeltzii</i>	+	+	+	+
Морские лилии	<i>H. robustipinna</i>	+	+	+	+
	<i>A. japonica</i>	+	+	+	+
Офиуры	<i>O. spiculata</i> *	+	+	+	+

*Геном секвенирован.

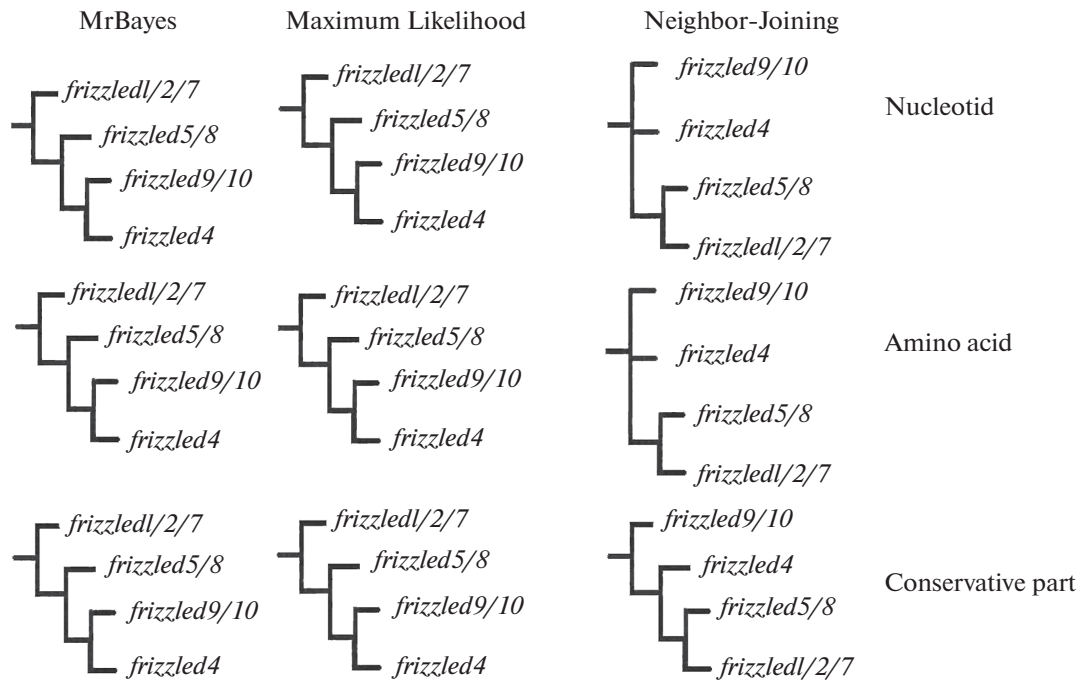


Рис. 4. Схемы филогенетических деревьев дивергенции генов *frizzled*, построенные на основе полных кодирующих последовательностей транскриптов генов *frizzled*, иглокожих, губок, кишечнорастных, полухордовых, рыб, амфибий и млекопитающих. Деревья сгенерированы с помощью метода MrBayes, Maximum Likelihood и Neighbor-Joining; использованы нуклеотидные последовательности транскриптов (Nucleotid), аминокислотные последовательности белков (Amino acid) и консервативные области аминокислотных последовательностей (Conservative part). Обведены группы генов, формирующиеся в большинстве построенных деревьев.

Существует небольшая путаница в названиях генов *wnt* у иглокожих, вызванная неточным определением того или иного гена. Вероятно, это связано с низкой гомологией данных генов. В частности, у морского ежа *S. purpuratus* ген *wnt4* сначала был определен как *wnt4*, а ген *wnt2* у офиуры *Ophiocoma wendtii* загружен в базу данных как *wnt8* (Vaughn et al., 2012). Поэтому для правильного определения последовательности необходимо опираться не только на данные Blast, но и на филогенетические деревья.

Наш анализ показал, что морские звезды имеют полный набор из 13 генов *wnt*, морские лилии, офиуры и голотурии имеют 12 генов *wnt*, а морские ежи – 11, поскольку у них отсутствует не только *wnt11*, но и *wnt2* (Croce et al., 2006). Возможно, по аналогии с геном *wnt11*, ген *wnt2* не имел какой-либо жизненно важной функции и его утрата не стала фатальной для предков морских ежей. У других иглокожих данный ген, вероятно, имеет большое значение в регуляции морфогенезов, поскольку экспрессируется при регенерации нервной системы у *Holothuria glaberrima* (Mashanov et al., 2014) и в эмбриогенезе морских звезд (McCauley et al., 2013; Kawai et al., 2016).

Таким образом, у иглокожих наблюдается тенденция к утрате генов семейства Wnt. Если *wnt11* отсутствует у Crinoidea, Ophiuroidea, Echinoidea и Holothuroidea, можно предположить, что утрата

этого гена в эволюции Echinodermata происходила как минимум дважды. Вероятно, вначале он был потерян общим предком всех современных морских лилий, но сохранился у представителей Eleutherozoa. Если предположить, что верна гипотеза “Cryptosyringida” (Smith, 1984), то вторая утрата *wnt11* произошла у общего предка офиур, морских ежей и голотурий. Если же верна гипотеза “Asterozoa–Echinozoa” (Reich et al., 2015), то следует предположить, что утрата *wnt11* происходила независимо у офиур и Echinozoa. Для выяснения данного вопроса необходимы дополнительные исследования. В настоящее время четкого понимания эволюции генного семейства Wnt нет. В работах исследователи используют либо полные последовательности генов *wnt*, но тогда они сильно ограничены выбором животных (Croce et al., 2006; Pang et al., 2010), либо консервативные области транскриптов, транслируя их в аминокислотные последовательности (Prud’homme et al., 2002; Janssen et al., 2010). При этом исследователи получают разные результаты, когда наиболее древними признаются разные гены семейства Wnt: *wnt11* и *wnt4* (Croce et al., 2006), *wnt3* (Cho et al., 2010), *wnt16*, *wnt2* и *wnt7* (Pang et al., 2010), *wnt4* и *wnt6* (Riddiford, Olson, 2011). Правильно было бы изучать разнообразие генов *wnt* у губок как у самых простых многоклеточных, однако современные данные показывают, что гены *wnt* губок уни-

Сравниваемые классы	Frizzled 1/2/7	Frizzled4	Frizzled5/8	Frizzled9/10
Морские лилии-голотурии	63	73	81	63
Морские лилии-морские ежи	63	75	76	61
Морские лилии-морские звезды	64	77	77	63
Морские лилии-офиуры	64	70	75	48
Голотурии-морские ежи	66	72	72	58
Голотурии-морские звезды	69	71	75	53
Голотурии-офиуры	65	71	74	66
Морские ежи-морские звезды	69	73	76	66
Морские ежи-офиуры	66	73	73	65
Морские звезды-офиуры	70	83	81	72
Средняя гомология	66	74	76	62
Голотурии-полухордовые	60	65	71	57
Голотурии-амфибии	57	61	66	51
Голотурии-млекопитающие	57	59	67	52

Рис. 5. Гомология предполагаемых аминокислотных последовательностей белков Frizzled разных классов иглокожих, полухордовых, амфибий и млекопитающих (в %).

кальны и не имеют ортологов у вторичноротых (Borisenko et al., 2016).

Для нашего анализа были выбраны полные последовательности кодирующих участков транскриптов генов *wnt*, так как только они несут смысловую нагрузку и преимущественно подвержены действию естественного отбора. Отдельные классы иглокожих разошлись примерно 550–450 млн лет назад (Wada, Satoh, 1994) и имеют достаточно много различий. В этой связи 5 монофилетичных групп служат хорошей моделью для оценки эволюции генного семейства Wnt. Для сравнения нами построено филогенетическое дерево генов *wnt* с учетом последовательностей транскриптов *wnt* млекопитающих, земноводных, рыб, полухордовых и кишечнополостных. Для семейства Wnt построение филогении, основанной только на консервативных областях, не дало значимых результатов (рис. 2). Вероятно, это связано с тем, что аминокислотные последовательности Wnt невелики (300–350 аминокислот), а консервативные области имеют длину около 123 аминокислот, что недостаточно для корректного анализа. Наилучший результат получен при использовании полных нуклеотидных последовательностей транскриптов. Построенные на их основе филогенетические деревья генов *wnt* имеют много общих свойств.

Мы предполагаем, что наиболее древним геном семейства является *wnt10*. Гомология аминокислотных последовательностей Wnt10 иглокожих варьирует в достаточно широких пределах в зависимости от вида. Это может говорить о том, что у разных животных функции данного белка могут

сильно различаться. Однако у иглокожих этот ген исследован слабо. В эмбриогенезе морских звезд экспрессия *wnt10* незначительна и наблюдается лишь на поздних стадиях развития (Kawai et al., 2016). У человека описано участие Wnt10 в таких процессах, как фиброз тканей, рост опухоли и регенерация (Kuma et al., 2014).

К предковым генам следует также отнести ген *wnt9*. Различие аминокислотной последовательности белка Wnt9 у разных классов иглокожих составляет 44–54% (рис. 3). Такой низкий процент гомологии больше характерен для паралогов у одного животного, чем для ортологичных генов. В то же время гомология последовательностей белков Wnt морского ежа с ортологами позвоночных составляет 50–70%, что иногда превышает гомологию с ортологичными белками других иглокожих (Ferkowicz, Raff, 2001). Это говорит о том, что функции Wnt9 могут кардинально различаться в разных классах иглокожих. Например, при развитии морского ежа *P. lividus* ген *wnt9* экспрессируется в клетках будущей энтодермы еще на стадии бластулы (Robert et al., 2014), в то время как при развитии морских звезд *P. pectinifera* и *P. miniata* экспрессия *wnt9* не была обнаружена (McCauley et al., 2013; Kawai et al., 2016). Экспрессию этого гена исследовали также при регенерации голотурии *H. glaberrima* (Mashanov, García-Aggarás, 2011). Остальные гены *wnt* сформировали отдельные группы, однако старшинство данных групп достоверно определить не удалось (Kuma et al., 2014).

Отдельную группу на филогенетических деревьях формировали гены *wnt1* и *wnt6* (рис. 2). Они находятся на одной хромосоме друг за другом (Holstein, 2012) и с большой вероятностью появились в результате дупликации (Cho et al., 2010). Кроме этого данные гены имеют сходные паттерны экспрессии при регенерации внутренних органов голотурии (Girich et al., 2017) и развитии морского ежа (Robert et al., 2014), а также при развитии насекомых (Hogvall et al., 2014). Сходство происхождения и экспрессии говорит о сходных функциях, которые должны выполнять эти гены. Так, оба гена задействованы при формировании органов нервной и мышечной систем у млекопитающих (Quinlan et al., 2009; Hitchins et al., 2013). У иглокожих исследование гена *wnt6* проводилось на эмбрионах морских ежей и звезд (Croce et al., 2006; McCauley et al., 2013; Robert et al., 2014; Kawai et al., 2016), а также при регенерации *A. japonicus* (Sun et al., 2013).

Группа родственных генов *wnt2*, *wnt4* и *wnt11* имеет наибольшую гомологию по аминокислотному составу среди иглокожих, а значит, и наиболее сходные функции. В то же время эта группа наиболее изменчива и склонна к утрате генов. По-видимому, если функции данных генов взаимозамещаемы, то при утрате одного гена его функцию выполняет ближайший “родственник” (Long et al., 2013). Какой-либо зависимости положения генов *wnt* на дереве от гомологии последовательностей соответствующих им белков не выявлено.

Для генов *frizzled* анализ филогении по консервативным областям белков показал более стабильные результаты, вероятно, из-за относительно большой длины используемых доменов (около 325 аминокислот). Построение филогении семейства Frizzled с помощью метода Neighbor-Joining показало большой разброс значений и не дало корректных результатов. Остальные методы дали сходный результат: имеется предковый *frizzled1/2/7*, от которого дивергировал *frizzled5/8*, а в дальнейшем образовались *frizzled4* и *frizzled9/10*. Почти во всех исследованных транскриптомах были обнаружены все 4 гена рецептора *frizzled*, что говорит о важности их экспрессии. У иглокожих гомология белковых последовательностей Frizzled больше, чем таковая у Wnt, и составляет 63–76%. В эмбриональном развитии морских звезд и морских ежей паттерны экспрессии генов *frizzled* схожи, что не отмечено у большинства генов *wnt*. Так, *frizzled1/2/7* экспрессируется по средней линии зародыша, захватывая эктодерму и крышу архентерона; *frizzled4* экспрессируется в небольшом количестве клеток вокруг бластопора, транскрипты *frizzled5/8*, имеющего максимальную гомологию последовательности среди иглокожих, обнаружены на анимальном полюсе, а также на кончике архентерона; *frizzled9/10* экспрессируется в клетках формирующейся энтодермы и эктодермы вегетативного полюса на ста-

дии гастролы (McCauley et al., 2013; Robert et al., 2014; Kawai et al., 2016). Таким образом, экспрессия генов *frizzled* имеет более выраженные паттерны, чем у генов *wnt*, что, по-видимому, необходимо для формирования тканевых линий зародыша.

Эволюция сигнальных путей происходит за счет генных дупликаций либо в результате изменения белковых взаимодействий (Tsuda, Kawata, 2010). При этом иглокожие за 400 млн лет отдельной эволюции не обрели новых членов семейств Wnt и Frizzled, как, например, губки или позвоночные (Holsten, 2012; Borisenko et al., 2016), и проявляют тенденцию к утрате генов *wnt*, что не вписывается в общую тенденцию эволюции данных генов у животных. При этом все гены *frizzled*, имеющиеся у предка иглокожих, присутствуют у представителей каждого класса, что еще раз доказывает необходимость работы именно рецепторов Frizzled, так как количество лигандов Wnt избыточно и утрата одного из членов семейства не оказывается летальной.

Таким образом, гены *wnt* и *frizzled* у иглокожих участвуют в процессах жизнедеятельности, контролируют эмбриогенез и регенерацию. Наиболее важными являются гены рецепторов Frizzled, так как у разных классов иглокожих они экспрессируются в эмбриогенезе и локализация экспрессии четко детерминирована. Предполагаемые аминокислотные последовательности белков Frizzled очень консервативны; их гомология составляет 63–76% в отличие от большинства белков Wnt (49–73%). Гены *wnt* зачастую не имеют четко определенной локализации экспрессии. Количество этих генов больше; наблюдается утрата одного или двух членов семейства Wnt, что, вероятно, связано со схожими функциями генов общего происхождения. Интересно, что гомология аминокислотных последовательностей белков Wnt и Frizzled примерно одинакова при сравнении как ортологов иглокожих, так и ортологов иглокожих с позвоночными и полухордовыми (рис. 3, 5). Очевидно, это указывает на то, что расхождение классов иглокожих произошло на ранних этапах формирования Echinodermata, а эволюционное расстояние между классами Echinoidea и Asteroidea может быть сопоставимо с расстоянием между морскими ежами и позвоночными. Вся изменчивость последовательностей Wnt и Frizzled происходит преимущественно за счет аминокислотных замен в варибельных участках, что не затрагивает основных функций Wnt как лиганда, однако может иметь значение для регуляции его активности.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность С.В. Туранову за помощь в работе с программами для построения филогенетических деревьев.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00170.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука. 2007. 212 с.
- Козин В.В., Борисенко И.Е., Костюченко Р.П. Участие канонического сигнального пути Wnt в определении полярности тела и клеточной идентичности у Metazoa: Новые данные о развитии губок и аннелид // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 1. С. 1–12.
- Adamska M., Degnan S.M., Green K.M. et al. Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning // PLoS One. 2007. V. 2. № 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001031>
- Almuedo-Castillo M., Sureda-Gómez M., Adell T. Wnt signaling in planarians: new answers to old questions // Int. J. Dev. Biol. 2012. V. 56. P. 53–65. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113451ma>
- Borisenko I., Adamaski M., Ereskovsky A., Adamaska M. Surprisingly rich repertoire of Wnt genes in the demosponge *Halisarca dujardini* // BMC Evol. Biol. 2016. V. 123. № 16. P. 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0700-6>
- Cho S., Vallès Y., Giani V.C. Jr et al. Evolutionary dynamics of the wnt gene family: a lophotrochozoan perspective // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 1645–1658.
- Croce J.C., Wu S.Y., Byrum C. et al. A genome-wide survey of the evolutionarily conserved Wnt pathways in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Dev. Biol. 2006. V. 300. P. 121–131.
- Dolmatov I.Y., Ginanova T.T. Regeneration in holothurians // Microsc. Res. Tech. 2001. V. 55. P. 452–463.
- Ferkowicz M.J., Raff R.A. Wnt gene expression in sea urchin development: heterochronies associated with the evolution of developmental mode // Evol. Dev. 2001. V. 3. № 1. P. 24–33.
- García-Arrarás J.E., Estrada-Rodgers L., Santiago R. et al. Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata) // J. Exp. Zool. 1998. V. 281. № 4. P. 288–304.
- García-Arrarás J.E., Dolmatov I.Yu. Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration // Cur. Pharm. Des. 2010. V. 16. P. 942–955.
- Girich A.S., Isaeva M.P., Dolmatov I.Yu. Wnt and frizzled expression during regeneration of internal organs in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Wound Repair Regen. 2017. V. 25. P. 828–835.
- Grumolato L., Liu G., Mong P. et al. Canonical and non-canonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors // Genes Dev. 2010. V. 24. P. 2517–2530.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // Syst. Biol. 2010. V. 59. № 3. P. 307–321.
- Hitchins L., Fletcher F., Allen S., Dhoot G.K. Role of SulflA in Wnt1- and Wnt6-induced growth regulation and myoblast hyperelongation // FEBS Open Bio. 2013. V. 3. P. 30–34.
- Hogvall M., Schönauer A., Budd G. et al. Analysis of the Wnt gene repertoire in an onychophoran provides new insights into the evolution of segmentation // EvoDevo. 2014. V. 5. № 14. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-14>
- Holstein T.W. The evolution of Wnt pathway // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012. V. 4. № 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007922>
- Huelsken J., Behrens J. The Wnt signaling pathway // J. Cell Sci. 2002. V. 115. P. 3977–3978.
- Janssen R., Gouar M.L., Pechmann M. et al. Conservation, loss, and redeployment of Wnt ligands in protostomes: implication for understanding the evolution of segment formation // Evol. Biol. 2010. V. 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-374>
- Kawai N., Kuraishi R., Kaneko H. Wnt, Frizzled, and sFRP gene expression patterns during gastrulation in the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera* // Gene Expr. Patterns. 2016. V. 21. P. 19–27.
- Kawakami Y., Esteban C.R., Raya M. et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration // Genes Dev. 2006. V. 20. P. 3232–3237.
- Kestler H.A., Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2008. V. 363. P. 1333–1347.
- Komiya Y., Habas R. Wnt signal transduction pathways // Organogenesis. 2008. V. 4. № 2. P. 68–75.
- Kuma A., Yamada S., Wang K. et al. Role of WNT10A-expressing kidney fibroblasts in acute interstitial nephritis // PLoS One. 2014. V. 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103240>
- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M. et al. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 34. № 3. P. 772–773. [dx.doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msw260](https://doi.org/10.1093/molbev/msw260)
- Lapebie P., Gazave E., Ereskovsky A. et al. WNT/beta-catenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge *Oscarella* // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005823>
- Li X., Sun L., Yang H. et al. Identification and expression characterization of WntA during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Comp. Biochem. Physiol., Part B. 2017. V. 210. P. 55–63.
- Long M., VanKuren N.W., Chen S., Vibranovski M.D. New gene evolution: little did we know // Annu. Rev. Genet. 2013. V. 47. P. 307–333.
- Logan C.Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2004. V. 20. P. 781–810.
- Mashanov V.S., Zueva O.R., Heinzeller T. Regeneration of the radial nerve cord in a holothurian: a promising new model system for studying post-traumatic recovery in

- the adult nervous system // *Tissue Cell*. 2008. V. 40. P. 351–372.
- Mashanov V.S., García-Arrarás J.E. Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments // *Biol. Bull.* 2011. V. 221. P. 93–109.
- Mashanov V.S., Zueva O.R., García-Arrarás J.E. Expression of *wnt9*, *tctp*, and *bmp1/tii* in sea cucumber visceral regeneration // *Gene Expr. Patterns*. 2012. V. 12. P. 24–35.
- Mashanov V.S., Zueva O.R., García-Arrarás J.E. Transcriptional changes during regeneration of the central nervous system in an echinoderm // *BMC. Genomics*. 2014. V. 15. P. 357. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-357>
- McCauley B.S., Akyar E., Filliger L., Hinman V.F. Expression of *wnt* and *frizzled* genes during early sea star development // *Gene Expr. Patterns*. 2013. V. 13. P. 437–444.
- Mladenov P.V., Bisgrove B., Asotra S., Burke R.D. Mechanisms of arm tip regeneration in the sea star *Leptasterias hexactis* // *Roux Arch. Dev. Biol.* 1989. V. 198. № 1. P. 19–28.
- Mo S., Cui Z. Regulation of canonical *wnt* signaling during development and diseases // *Embryogenesis*. Dr. Ken-ichi Sato (Ed.). 2012. ISBN: 978-953-51-0466-7, In-Tech. 652 p.
- Pang K., Ryan J.F., Mulliken J.C. et al. Genomic insights into *Wnt* signaling in an early diverging metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* // *EvoDevo*. 2010. V. 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-1-10>
- Poustka A.J., Kuhn A., Groth D. et al. A global view of gene expression in lithium and zinc treated sea urchin embryos: new components of gene regulatory networks // *Genome Biol.* 2007. V. 8. № 5. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r85>
- Quinlan R., Graf M., Mason I. et al. Complex and dynamic patterns of *Wnt* pathway gene expression in the developing chick forebrain // *Neural Devel.* 2009. 4:35. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-35>
- Prud'homme B., Lartillot N., Balavoine G. et al. Phylogenetic analysis of the *Wnt* gene family: Insights from Lophotrochozoan members // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. P. 1395–1400.
- Reich A., Dunn C., Akasaka K., Wessel G. Phylogenomic analyses of Echinodermata support the sister group of Asterozoa and Echinozoa // *PloS One*. 2015. V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119627>
- Reya T., Clevers H. *Wnt* signaling in stem cells and cancer // *Nature*. 2005. V. 434. P. 843–850.
- Riddiford N., Olson P. *Wnt* genes loss in flatworms // *Dev. Genes Evol.* 2011. V. 221. P. 187–197.
- Robert N., Lhomond G., Schubert M., Croce J.C. A comprehensive survey of *wnt* and *frizzled* expression in the sea urchin *Paracentrotus lividus* // *Genesis*. 2014. V. 52. P. 235–250.
- Smith A.B. Classification of the Echinodermata // *Paleontology*. 1984. V. 27. P. 431–459.
- Srivastava M., Begovic E., Chapman J. et al. The Trichoplax genome and the nature of placozoans // *Nature*. 2008. V. 454. P. 955–960.
- Sun L., Chen M., Yang H. et al. Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Comp. Biochem. Physiol. Part D*. 2011. V. 6. P. 195–205.
- Sun L.N., Yang H.S., Chen M.Y., Hu D.X. Cloning and expression analysis of *Wnt6* and *Hox6* during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Genet. Mol. Res.* 2013. V. 12. № 4. P. 5321–5334.
- Takeo M., Chou W.C., Sun Q. et al. *Wnt* activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration // *Nature*. 2013. V. 499. P. 228–232.
- Tsuda M.E., Kawata M. Evolution of gene regulatory Networks by fluctuating selection and intrinsic constraints // *PloS Comput. Biol.* 2010. V. 6. № 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000873>
- Vaughn R., Garnhart N., Garey J.R. et al. Sequencing and analysis of the gastrula transcriptome of the brittle star *Ophiocoma wendtii* // *EvoDevo*. 2012. V. 3. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-3-19>
- Wada H., Satoh M. Phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with relationships deduced from the fossil record // *J. Mol. Evol.* 1994. V. 38. P. 41–49.
- Yokoyama H., Maruoka T., Ochi H. et al. Different requirement for *Wnt*/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus* // *PloS One*. 2011. V. 6. P. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021721>

Wnt and *Frizzled* Genes in Echinoderms

A. S. Girich^a and A. V. Boiko^a

^aNational Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

Wnt and *frizzled* genes of 17 echinoderm species were studied by molecular and bioinformatics methods. As a result, it has been found that echinoderms have 11–13 *wnt* genes and four *frizzled* genes. The phylum Echinodermata is generally characterized by the loss of some of the *Wnt* family genes. In particular, members of all classes, except for Asterozoa, lack the *wnt11* gene, while the studied Echinozoa lost also the *wnt2* gene. *Wnt* genes are conservative, but the amino acid sequences of the corresponding proteins have only 49–73% similarity to homologous proteins in different echinoderm classes. The *Frizzled* proteins show a higher degree of similarity, 63–76%. A phylogenetic analysis of the *Wnt* and *Frizzled* gene families has also been carried out in the present study.

Keywords: *Wnt* signaling, *wnt*, *frizzled*, echinoderms, transcriptome