


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

На правах рукописи

МАТВЕЕВ
Иван Владимирович



Экспрессия гена мезоглеина в различных типах
клеток медузы *Aurelia aurita*.

03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2007

Работа выполнена в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Пинаев Георгий Петрович
Институт цитологии РАН
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Воробьев Владимир Иосифович
Институт цитологии РАН
Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор
Перевозчиков Андрей Петрович
ГУНИИ экспериментальной медицины РАМН
Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Зоологический институт РАН
Санкт-Петербург

Защита состоится 19 января 2007 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН
по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, дом 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан 18 декабря 2006 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

кандидат биологических наук
Е.В. Каминская



2007А
1960

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Внеклеточный матрикс (ВКМ) имеется у всех многоклеточных животных и может составлять значительную часть объема их тканей (Албертс и др., 1994). ВКМ активно участвует в регуляции множества процессов, происходящих в организме, начиная с самых первых шагов эмбрионального развития. Он определяет форму контактирующих с ним клеток, их миграцию, пролиферацию, дифференцировку. В защитных реакциях простых в эволюционном отношении организмов ВКМ и клетки, его синтезирующие, играют ключевую роль. Молекулярный состав ВКМ сложен и активно изучается. Основная масса исследований, посвященных ВКМ, проводится на позвоночных животных, преимущественно млекопитающих, традиционных объектах лабораторных исследований. Результаты исследований ВКМ позвоночных непосредственно используются в медицине для создания новых способов лечения ран, лечебной косметики и т.д..

Одна из сложностей в изучении взаимодействий клеток и ВКМ у млекопитающих состоит в разнообразии клеточного состава их тканей. Взаимодействия клеток с ВКМ трудно отличить от взаимодействий между клетками различных типов. Кишечнополостные могут быть хорошей моделью для изучения взаимодействия клеток и ВКМ, т.к. они относительно просты по строению и клеточному составу.

В последнее время клонировано значительное количество консервативных генов различных видов животных из класса Кишечнополостных. На основании анализа их последовательностей исследователи приходят к выводу, что гены, отвечающие за регуляцию экспрессии, контроль трансляции, проведение внутриклеточных сигналов, апоптоз, передачу внеклеточных сигналов, спецификацию миеогенной дифференцировки клеток и взаимодействие между клетками и ВКМ, удивительно сходны с генами млекопитающих. Некоторые гены Кишечнополостных, такие как *mesoderm specification factor Twist*, оказались значительно ближе к генам позвоночных, чем родственные гены дрозофилы или нематод (Galliot, Schmid, 2002).

Объектом настоящей работы была выбрана сцифоидная медуза

Aurelia aurita (Eukaryota; Metazoa; Cnidaria; Scyphozoa; Semaestomeae; Ulmaridae; Aurelia.).

Жизненный цикл *A. aurita* состоит из четырех стадий: личинки - планулы, полипоидной стадии, эфирии и медузы. Медуза достигает диаметра 30 см. Она охотится на мелкий планктон с помощью стрекательных клеток эпителия, покрывающего верхнюю поверхность зонтика. Жгутиковые клетки эпителия перемещают добычу к краю зонтика, откуда медуза, с помощью щупалец, перемещает добычу в рот.

Тело представителей этого вида, как и у других кишечнополостных, образовано двумя эпителиальными пластами, эпидермой и гастродермой, между которыми находится мезоглея. У взрослых медуз толщина мезоглеи составляет несколько сантиметров. Мезоглея выполняет функцию скелета, придавая определенную форму телу животного; она участвует также в транспорте и запасании питательных веществ (Charman, 1966; Bouillon and Coppo, 1977; Weber and Schmid, 1985). Усилие, производимое мышечной системой зонтика, обеспечивает сокращение диаметра внешней части зонтика, тогда как эластичность мезоглеи обеспечивает медузе возврат к первоначальной форме после каждого мышечного сокращения (Bouillon and Coppo, 1977). Мезоглея участвует в регулировании плавучести медузы (Denton, 1963; Mackay, 1969). Мезоглея играет ключевую роль в контроле миграции клеток и морфогенезе (Schmid, 1992; Kleinman et al., 2003). Основную массу мезоглеи составляет внеклеточный матрикс (ВКМ), который у многих кишечнополостных не содержит клеток.

У медузы *A. aurita* и ряда других представителей классов Scyphozoa и Anthozoa мезоглея заселена свободными подвижными клетками (Charman, 1966). У таких кишечнополостных мезоглея приобретает внешнее сходство с соединительными тканями других животных (Заварзин, 1945; Charman D.M., 1974). Наличие у медузы *A. aurita* толстого слоя мезоглеи, заселенной почти исключительно клетками одного типа, предоставляет исключительные возможности для изучения влияния ВКМ на клетки и наоборот. Происхождение мезоглеальных клеток (Мк) в онтогенезе слабо изучено. Одни авторы полагают, что Мк имеют эктодермальное происхождение (Hutman, 1940; Werner, 1984), другие - что источником их развития служит гастродерма (Заварзин, 1945; Young, 1974). Принято считать, что выселение происходит в ходе позднего эм-

брионального развития или, скорее, постоянно у взрослых организмов (Заварзин, 1945; Knight, 1971). Показано что пролиферативная активность Мк достаточна для самоподдержания этой популяции, без подсева клеткам из эпителиальных пластов. Следовательно, популяция Мк способна самообновляться (Чага, 1996), но это не исключает возможности постоянного выселения Мк из эпителиев. Показано, что мезоглея или экстракт мезоглеи сцифоидной медузы *Rhopilema nomadica* является оптимальной подложкой для переживающих культур клеток пяти видов морских кишечноротовых группы anthozoa (*Aiptasia sp.*, *Anemonia sulcata*, *Stylophora pistillata*, *Heterozenia fuscescence*, *Nephthea sp.*) (Frank, Rinkevich, 1999). Возможно, изучение состава мезоглеи медузы поможет решить проблему культивирования постоянных клеточных линий беспозвоночных.

Полагают, что ВКМ мезоглеи синтезируется клетками эпителиев (Hausman, 1973; Singer, 1974). Участие Мк в регуляции состава ВКМ мезоглеи не очевидно, однако ранее мы показали, что они являются активно синтезирующими (Shaposhnikova et al., 2005) и это позволяет предполагать, что Мк участвуют в формировании ВКМ мезоглеи. С помощью электрофоретического анализа белкового состава мезоглеи зрелых медуз *A. aurita* мы показали наличие в ней нескольких мажорных белков. Одним из них является белок с молекулярной массой 45/47 кДа. Мы получили поликлональные антитела против белков фракции 45/47 кДа и подтвердили их специфичность с помощью иммуноблота. Проведенный нами иммуногистохимический анализ срезов *A. aurita* показал, что антиген 45/47 кДа локализуется в гранулах Мк и в апикальной части клеток эпидермы, а у зрелых медуз он выявляется также в составе эластических волокон. Следовательно, Мк *A. aurita* (наряду с эпидермальными клетками) определенно участвуют в процессах формирования межклеточного вещества мезоглеи (Shaposhnikova et al., 2005).

Получение нуклеотидных последовательности генов, экспрессирующихся в Мк позволит приблизиться к пониманию функций этих клеток. Выявление генов специфически экспрессирующихся в Мк, позволит судить о том, насколько специализированной является эта группа клеток. Такие гены можно будет, также, использовать как маркеры дифференцировки Мк, что позволит проследить их происхождение в онтогенезе.

Мы клонировали и секвенировали мРНК мажорного белка мезоглеи

A. aurita с молекулярной массой около 45 кДа и назвали его мезоглеин, а также показали, что у взрослых медуз этот белок экспрессируется только в Мк.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы был поиск генов специфически экспрессирующихся в Мк.

Были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить транскрипты Мк с транскриптами клеток эпидермы и гастродермы с помощью метода дифференциального дисплея (ДД).
2. Определить нуклеотидную последовательности мРНК мажорного белка мезоглеи *A. aurita* с молекулярной массой около 45/47 кДа.
3. Проверить предположение о том, что ген мажорного белка мезоглеи с молекулярной массой 45/47 кДа специфически экспрессируется в Мк.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Клонирована и секвенирована мРНК мажорного белка ВКМ мезоглеи *A. aurita* - мезоглеина.
2. На основании нуклеотидной последовательности клонированной мРНК сделан вывод что мезоглеин содержит домены ZP и DSL, что характерно для экстраклеточных белков.
3. Мезоглеин синтезируют и экскретируют мезоглеальные клетки.

Научная новизна. Ранее предполагалось, что Мк принимают участие в регуляции состава ВКМ мезоглеи. В данной работе показано, что Мк синтезируют один из белков ВКМ мезоглеи. Клонирована и секвенирована мРНК мезоглеина - белка синтезируемого и экскретируемого Мк. Анализ последовательности мезоглеина позволяет делать предположения о функциях этого белка и Мк.

Теоретическое и практическое значение работы. Доказательство того, что мезоглеальные клетки *A. aurita* являются активно синтезирующими, определение нуклеотидной последовательности мРНК мезоглеина, за синтез которого они ответственны, требует пересмотра общепринятого взгляда об инертной природе этой клеточной популяции. Анализ последовательности мРНК мезоглеина позволило отнести его к семейству ZP содержащих белков. Полученный сиквенс может быть использован для сравнительно эволюционных исследований. Среди известных обладателей ZP содержащих белков, *A. aurita* является самым

низшим представителем в современной зоологической классификации. Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров Биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета и могут быть использованы в общих и специальных курсах лекций биологических факультетов других университетов.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ (из них 3 статьи). Основные положения представлены и обсуждены на XIV Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (2002), 10th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (2006), Всероссийском симпозиуме "Биология клетки в культуре" (2006), на научных семинарах Отдела клеточных культур Института цитологии РАН.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей методы и результаты исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 82 публикаций. Работа изложена на 75 страницах машинописного текста и иллюстрирована 9 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала. Объект исследования - представители вида *Aurelia aurita* (L) (сем. Ulmaridae, отр. Semaestomae, кл. Scyphozoa). Животных отлавливали в июле-августе в Чупинской губе Белого моря. В работе использовали взрослых животных с диаметром зонтика не менее 10 см. Медуз собирали сачком на глубине до 2 м.

Животных препарировали, отделяя с помощью пинцета и скальпеля эпидерму, мезоглею, очищенную от эпидермы и гастральных каналов, и мезоглею, содержащую гастральные каналы.

Выделение РНК. Для выделения РНК использовали набор реагентов Trizol (Invitrogen) согласно рекомендациям изготовителя или протокол с использованием гуанидинтиоцианата (Chomczynski, Sacchi, 1987).

РНК разделяли с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромистого этидия в ТАЕ буфере (Sambrook et

al., 1989). Чистоту выделения и сохранность РНК оценивали по четкости полос 18S и 28S рибосомных РНК, наблюдаемых в УФ свете. Количество РНК измеряли спектрофотометрически по поглощению УФ света с длиной волны 260 нм (Sambrook et al., 1989).

ДНК удаляли из препарата РНК, обрабатывая препарат ДНКазой, свободной от РНКазы. Каждая реакционная смесь, объемом 40 мкл, содержала около 12 мкг РНК, 1 ед ДНКазы (RNase-free; Roche-Boehringer-Mannheim). Реакцию проводили при комнатной температуре в течении 30 мин. Реакционную смесь депротеинизировали фенол-хлороформом, РНК осаждали этанолом (Sambrook et al., 1989).

Дифференциальный дисплей (ДД). Использовали опубликованный протокол (Liang, Pardee, 1992). Метод состоит из трех этапов: (1) синтез кДНК, комплементарной мРНК; (2) ПЦР амплификация фрагментов кДНК (ДДПЦР); (3) визуализация амплифицированных фрагментов с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).

Синтез кДНК. Обратную транскрипцию (ОТ) проводили в соответствии с рекомендациями фирмы производителя обратной транскриптазы MMuLV (Fermentas, Литва) с заякоренным праймером ANK1 (AAGCTTTTТТТТТТТТТС). В каждую реакционную смесь объемом 20 мкл брали около 0.3 мкг тотальной РНК и 20 ед Ribonuclease Inhibitor (Fermentas, Литва).

ДДПЦР. Использовали заякоренный ANK1 праймер и произвольный RAPD5 (AACGCGCAAC) праймер. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала стандартный буфер для Taq ДНК полимеразы, 1.5 mM MgCl₂, 0.02 mM каждого dNTP, 1 МБк [α -P³³] dATP, 2 ед Taq, 10 пМ каждого праймера и 1 мкл продуктов ОТ, разведенных в 4 раза. Реакцию проводили по программе 95°C 1 мин, 36°C 1 мин, 72°C 1 мин, 2 цикла; 95°C 1 мин, 39°C 1 мин, 72°C 1 мин, 40 циклов.

Денатурирующий электрофорез. Продукты ДДПЦР разделяли при помощи электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле толщиной 0.4 мм в TBE буфере при денатурирующих условиях (8 М мочевины, 55°C, 2 Вт/см) (Sambrook et al., 1989). Гель помещали на фильтровальную бумагу Wattmann 1MM и высушивали. Высушенный гель экспонировали с рентгеновской пленкой в течении ночи.

Клонирование и секвенирование. На радиавтографе, представляю-

щем результат ДД (рис. 1), выбрали те зоны, которые присутствуют на дорожках, соответствующих мезоглее, и отсутствуют на дорожках, соответствующих эпидерме и гастродеме. Такие зоны содержат фрагменты кДНК генов, возможно, специфически экспрессирующихся в мезоглее. На рис. 1 три такие зоны обозначены стрелкой. Радиоавтограф совмещали с гелем и отмечали иголкой на геле местоположение интересующих зон. Гель, содержащий отмеченные зоны, вырезали, отмывали от мочевины в 20 мкл деионизованной воды в течение 20 мин и помещали в реакционную смесь для ПЦР. Содержащуюся в вырезанных зонах ДНК реамплифицировали с теми же праймерами, с которыми проводился ДДПЦР, и по той же программе в течение 30 циклов. Продукты реамплификации клонировали с помощью набора TOPO TA Cloning Kit фирмы Invitrogen. Клетки *E. coli* DH5 α трансформировали продуктами лигазной реакции с помощью набора TransformAid (Fermentas).

Вставки полученных плазмид секвенировали с помощью набора фирмы Медиген (Новосибирск) и в фирме Хеликс (С.Петербург). В результате секвенирования получили несколько десятков нуклеотидных последовательностей, из которых для дальнейшей работы выбрали последовательности *aupr1*, *aupr52*, *aupr54* и *aupr7*.

Выделение тотальной ДНК A. aurita. Препарированные гонады половозрелых самцов *A. aurita* резорбировали множественным иссечением и встряхиванием. Для получения суспензии сперматозоидов резорбированную массу фильтровали через мельничный газ. Сперматозоиды осаждали центрифугированием 10 мин при 8000 g. Осадок ресуспендировали в 50 мл CMFSS (0.3 M NaCl, 20 mM KCl, 15 mM EDTA, 10-50 mM Tris-HCl pH 7.6) и повторно центрифугировали 10 мин при 8000 g. Из промытого осадка сперматозоидов выделяли ДНК в системе фенол:хлороформ (1:1) и осаждали этанолом (Sambrook et al., 1989).

ПЦР на тотальной ДНК A. aurita. Реакционные смеси, каждая объемом 30 мкл, содержали стандартный Taq-буфер, а также 1.5 mM MgCl₂, 0.02 mM каждого dNTP, 2 ед Taq и 15 пМ каждого из двух праймеров к секвенированным фрагментам. Реакции проводили по программе 95°C 30 сек, 55-59°C (в зависимости от температуры плавления праймеров) 30 сек, 72°C 30 сек, 30 циклов. Использовали пары праймеров:

К фрагменту *aupr1* 5'-TGCGGATGAATCAGATGCTGT-3' и 5'-CCGAATATGCGAAGGCTGAA-3';

к фрагменту aурp52 5'-CAAACACGGTCTAGGAATGTТААТ-3' и 5'-TTCACCTCATТААААТCACTGCT-3';

к фрагменту aурp54 5'-TTTGTCTGAAATTTGCCACAGC-3' и 5'-TCAAGGCCAAGGCAGTCAAG-3';

к фрагменту aурp7 5'-TTCTCTGCATТАТGGCAACСААА-3' и 5'-GGATGATATAGGTGTTGGCACAG-3'.

Обратнотранскриптазная ПЦР (ОТПЦР). Обратную транскрипцию производили, как описано ранее. Реакционные смеси для ПЦР объемом 30 мкл содержали стандартный Taq-буфер, dNTP, Taq и праймеры в количествах, описанных для ПЦР на тотальной ДНК *A. aurita*. Реакционные смеси также содержали 1 мкл продуктов ОТ, разведенных в четыре раза. Реакции проводили по программе описанной выше для ПЦР на тотальной ДНК *A. aurita*.

Электрофорез продуктов ПЦР и ОТПЦР. Продукты ПЦР и ОТПЦР разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромистого этидия в TAE буфере, и фотографировали в УФ свете (Sambrook et al., 1989).

Приготовление проб мезоглеина для MALDI (Pappin et al., 1993) и белкового секвенирования по Эдману (Edman degradation). Гомогенат мезоглеи разделяли методом диск-электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970). Из геля вырезали зону, соответствующую 45/47 кДа, и использовали этот фрагмент геля для MALDI и белкового секвенирования.

MALDI анализ был проведен фирмой ПИННИ (Москва). Белковое секвенирование было проведено Protein Resource Center of The Rockefeller University (USA).

Кислый-мочевинный электрофорез проводился, как описано в публикациях (Panyim, Chalkley, 1969; Podgornaya, Shaposhikova, 1998).

Клонирование мРНК мезоглеина. Для клонирования мРНК мезоглеина использовали протокол, основанный на опубликованном (Matz et al., 1999).

Синтез κДНК. Для удаления ДНК из проб тотальной РНК пробы обрабатывали ДНКазой (RNase free DNase; Roche). ДНКазу удаляли фенол-хлороформом. Для обратной транскрипции использовали около 1 мкг тотальной РНК, праймер m13rt12v (5'-

CAGGAAACAGCTATGACaagcttttttttttv), специфический к поли-А последовательности мРНК, с адаптерной последовательностью и обратную транскриптазу SuperScriptII (Invitrogen). Реакцию проводили при условиях рекомендованных производителями обратной транскриптазы. Продукты обратной транскрипции разводили в 5 раз и хранили при -20°C.

3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3'RACE ПЦР) с вырожденными праймерами проводили с помощью двух последовательных ПЦР реакций. В реакциях использовали гнездовые (nested) праймеры, специфические к пептиду YTFIENR праймеры (DGSP1, DGSP2) и STEP-OUT (Matz et al., 1999) праймеры (m13r-heel, heel), специфические к адаптерной последовательности праймера, использовавшегося для обратной транскрипции.

Нуклеотидную последовательность частично вырожденных гнездовых праймеров, специфических к пептиду, генерировали с помощью программы CodeHope (Rose et al., 2003). К 5' концу генерированных CodeHope последовательностей добавили короткие произвольные последовательности, чтобы получить праймеры, имеющие температуру плавления около 60°C.

Первая 3'RACE ПЦР реакция содержала 1 мкл кДНК, праймеры DGSP1 (5'-accggataatacgcTAyacntty) и STEP-OUT праймер m13r-heel (5'-gtaatacagactcactatagggccaggaacaagctatgac), Taq буфер (Fermentas), 2 ед. Taq (Хеликон, Москва), 0.2 mM каждого dNTP и 1.5 mM MgCl₂. ПЦР проводили по программе, состоящей из одного цикла с температурой отжига 45°C, 10 циклов touchdown ПЦР (Don et al., 1991) с температурой отжига, снижающейся с 70°C до 60°C, и 20 циклов с температурой отжига 60°C.

Вторая 3'RACE ПЦР реакция содержала 1 мкл продукта первой реакции, разведенного в 100 раз, праймеры DGSP2 (5'-aagaggccacaTATACATTTathgaraaymg) и STEP-OUT праймер heel (5'-gtaatacagactcactatagggc), остальные компоненты смеси - как в первой 3'RACE ПЦР реакции. ПЦР проводили по программе, состоящей из одного цикла с температурой отжига 55°C, 10 циклов touchdown ПЦР с температурой отжига, снижающейся с 70°C до 60°C, и 25 циклов с температурой отжига 60°C.

Полученный ПЦР продукт лигировали в вектор pCRII с помощью на-

бора TOPO TA (Invitrogen). Лигазной смесью трансформировали *E. coli* линии DH5 α , как описано выше. Вставки выделенных из бактерий плазмид секвенировали в фирмах Омникс (С.Петербург), Силекс (Москва), ПИННИ (Москва).

Полученную в результате секвенирования нуклеотидную последовательность использовали для конструирования последовательностей трех гнездовых праймеров для 5'RACE ПЦР.

5'RACE ПЦР. 3' конец ранее полученной кДНК полиаденилировали с помощью фермента TdT (Fermentas) в соответствии с рекомендациями производителя фермента. 5'RACE ПЦР проводили в с помощью трех последовательных ПЦР реакций, использующих гнездовые (nested), специфические к полученному в результате 3'RACE фрагменту нуклеотидной последовательности кДНК мезоглеина праймеры (5GSP1, 5GSP2, 5GSP3) и STEP-OUT праймеры (m13rt12v, m13r-heel, heel), специфические к олиго(дА) последовательности, добавленной к 3' концу кДНК.

Первая 5'RACE ПЦР реакция содержала полиаденилированную кДНК, праймеры 5GSP1 (5'-tcantttcgcttcgattgggt) и m13rt12v, Taq буфер (Fermentas), смесь Taq (Хеликон, Москва):Vent (NEB) 20:1, 0.2 mM каждого dNTP и 1.5 mM MgCl₂. ПЦР проводили по программе, состоящей из одного цикла с температурой отжига 38°C, и повторенных 2 раза 10 циклов touchdown ПЦР с температурой отжига, снижающейся с 60°C до 50°C.

Вторая 5'RACE ПЦР реакция содержала 1 мкл продукта первой реакции, разведенного в 100 раз, праймеры 5GSP2 (5'-gcggttgagtanctgctgtctg) и m13r-heel, остальные компоненты смеси, как в первой 5'RACE ПЦР реакции. ПЦР проводили по программе, состоящей из повторенных 2 раза 10 циклов touchdown ПЦР с температурой отжига, снижающейся с 62°C до 52°C.

Третья 5'RACE ПЦР реакция содержала 1 мкл продукта второй реакции, разведенного в 100 раз, праймеры 5GSP3 (5'-actggaatgcgcsaaatcc) и heel, остальные компоненты смеси, как в первой 5'RACE ПЦР реакции. ПЦР проводили по программе, состоящей из повторенных два раза 10 циклов touchdown ПЦР с температурой отжига, снижающейся с 62°C до 52°C и 3 циклов с температурой отжига 57°C.

Полученный ПЦР продукт клонировали и секвенировали, как описа-

но выше.

Анализ экспрессии мезоглеина в эпидермисе, мезоглее и гастродерме методом ОТЩР. кДНК тотальной РНК из эпидермы, гастродермы и мезоглеи, полученную как описано для Дифференциального Дисплея, использовали как матрицу для ОТЩР. ПЩР реакция содержала праймеры, специфические к кДНК мезоглеина 5'-gtttccttcgcaccactcg и 5'-tggatttggcgcatccag, остальные компоненты реакции, как описано для 3'RACE ПЩР. Реакцию проводили по программе, состоящей из 40 циклов с температурой отжига 57°C.

Программное обеспечение. Для конструирования частично вырожденных праймеров на основе аминокислотной последовательности пептида использовали WWW сервис CodeHop (Rose et al., 2003). Для конструирования всех остальных праймеров использовали программу FastPCR (Kalendar, 2006).

Для вычисления молекулярной массы, теоретической кривой титрования и pI мезоглеина по его аминокислотной последовательности использовали программы pI/Mw (Gasteiger et al., 2005), ProtParam (Gasteiger et al., 2005) EMBOSS (Rice et al., 2000).

Для предсказания сайтов O-гликозилирования использовали NetOglyc и NetNglyc (Julenius et al., 2005).

Для предсказания того, является ли мезоглеин GPI-anchored белком, использовали big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 2000).

Для поиска известных доменов и мотивов в аминокислотной последовательности мезоглеина использовали NCBI Conserved Domain Search online service (Marchler-Bauer, Bryant, 2004) и SMART (Letunic et al., 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Поиск генов, дифференциально экспрессирующихся в мезоглее методом Дифференциального Дисплея. Для выявления генов, специфически экспрессирующихся в клетках эпидермы, мезоглеи и гастродермы, каждую особь *A. aurita* разделяли на 3 соответствующие части как описано в разделе "Материалы и методы". Из каждого



Рис. 1: Радиоавтограф электрофореза продуктов ДДПЦР реакций на РНК трех особей *A. aurita* (I-III) с праймерами ANK1 и RAPD2. Продукты ДДПЦР с РНК из клеток эпидермы (Е), мезоглеи (М), гастродермы (G). Стрелками обозначены дифференциальные зоны.

препарата выделяли тотальную РНК и сравнили эти РНК при помощи дифференциального дисплея (рис. 1). Чтобы исключить из анализа дифференциальные зоны, специфические для отдельных особей *A. aurita*, ДД повторен на РНК трех особей медуз. Продукты ДДПЦР на РНК из одинаковых тканей разных медуз нанесены в соседние карманы геля. На рис. 1 стрелками отмечены зоны, которые есть в мезоглее, но отсутствуют в эпидерме или гастродерме, и повторяющиеся в пробах РНК разных медуз. Это мезоглеальные дифференциальные зоны. Они содержат фрагменты кДНК, которые могут быть фрагментами дифференциально экспрессирующихся транскриптов.

Для того, чтобы добиться повторяемости наборов зон на РНК разных особей медузы и наблюдать при этом дифференциальные зоны, поставили около 100 ДДПЦР с различными произвольными праймерами и условиями реакций. Праймеры и условия ДДПЦР, с применением которых получили лучший результат, описаны в разделе ДДПЦР "Материалы и методы".

Участки геля, содержащие дифференциальные зоны (рис. 1), вырезали и использовали для реамплификации содержащихся в них фраг-

```

>aurp1
GTGCTGCAGC CTTAGTTCAA AACAAATGCGG ATGAATCAGA TGCTGTTAAT CCTTCCGTAT
TAATGACTAG AATGTGTCAG CCTTCGCATA TTCGCCAAGA ATCAGAAGAT TTACACACTC
CTGATACGAA TGAARTTCTT ATTGTAAC TAAGAAAACCG CAAAATATCT ACTGATCCGC
ACGATCCGGA T

>aurp52
CAAACACGGT CTAGGAATGT TAATGTAAGG AAAGCTATAT CAAAGTATGA AGAATTAAC
TCGTATATTA ACTTGTTTTA AGAATATGCT TTCAAACCAT ATTAGCAGTG ATTTTAAATG
AGGTGAATAA TTTAATG

>aurp54
CCACAACTTT GATTCCTTT GTCTGAAAT TGCCACAGCT TGAAGTGCCT GGCCTTGATT
TTGTGTCTT CAACTTCATG

>aurp7
GTAGGAGAGT AAACGGTTAT GAAGATTTTA TCCTCAGTAG GTAAGTAGAG СТААGAGAGG
ТААТАССGTT GGTTTTATA СТААGAGAA CGGTTTGTTT ТААССGТССС ТАТСААТАТ

```

Рис. 2: Нуклеотидные последовательности, полученные методом ДДПЦР.

ментов ДНК. Каждая вырезанная дифференциальная зона обычно содержит смесь фрагментов ДНК одинаковой длины. ДНК, реамплифицированная из вырезанных участков геля, была клонирована и секвенирована.

Секвенировано 10 фрагментов кДНК, полученных при помощи ДДПЦР. При их сравнении с известными генами в базах данных GenBank и EMBL при помощи программы BLAST (Altschul et al., 1997) 4 фрагмента показали высокую степень гомологии (87-100%) с различными генами бактерий. Поскольку РНК для ДДПЦР была получена из медуз, пойманных в природе, и контаминация бактериальной РНК весьма вероятна, такие фрагменты были исключены из дальнейшего анализа.

Один из фрагментов на 99% гомологичен гену AY033611.1 *Homo sapiens* placenta immunoregulatory factor PLIF mRNA. ПЦР на матрице тотальной ДНК *A. aurita* с праймерами к данному фрагменту не подтвердила его принадлежность медузе. При обработке тотальной РНК и при обратной транскрипции был использован ингибитор РНКазы, полученный из плаценты человека (Fermentas), и ОТПЦР показал наличие этого фрагмента только в препаратах кДНК, полученных с использованием этого ингибитора. Поэтому данный фрагмент также был исключен из дальнейшего анализа.

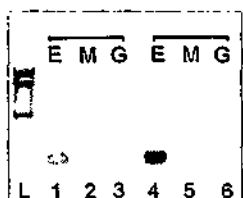


Рис. 3: Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов ОТПЦР, полученных с РНК из клеток эпидермы(Е), мезоглеи(М) и гастродермы(Г) двух особей *Aurelia aurita* (I, II), с праймерами к фрагменту *aupr7*.

Фрагмент *aupr54* (рис. 2) на 98% гомологичен с гену AF161446 *Nematostella vectensis* HSPC328. Фрагменты *aupr1*, *aupr7*, *aupr52* (рис. 2) не показали достоверной гомологии с известными генами содержащимися, в базах данных GenBank и EMBL.

Для того, чтобы проверить принадлежность секвенированных фрагментов *A. aurita*, провели ПЦР тотальной ДНК медузы с праймерами к этим фрагментам. Такая проверка позволила подтвердить принадлежность фрагментов *aupr7*, *aupr52* и *aupr54* медузе, но не фрагмента *aupr1*. ОТПЦР РНК нескольких особей *A. aurita* с праймерами к этому фрагменту дал продукт ожидаемого размера. На основании результатов ОТПЦР можно заключить, что *aupr1* принадлежит *A. aurita*.

Тканеспецифичная экспрессия генов фрагментами которых являются последовательности *aupr1*, *aupr7*, *aupr52*, *aupr54*, была проверена ОТПЦР на РНК из клеток эпидермы, мезоглеи и гастродермы. Для этого РНК из соответствующих клеток была обработана ДНКазой и проведена обратная транскрипция (ОТ) с праймером ANK1, комплементарным поли-А концу иРНК. Полученная кДНК была использована для ПЦР с праймерами к секвенированным фрагментам. С помощью ОТПЦР с праймерами к фрагментам *aupr1*, *aupr52*, *aupr54* было показано, что они не тканеспецифичны.

Результат ОТПЦР с праймерами к фрагменту *aupr7* представлен на рис. 3. На дорожках, содержащих продукты ОТПЦР на РНК из клеток эпидермы разных особей *A. aurita* (дорожки 1,4), видны зоны, представляющие продукты ОТПЦР. Продукты реакции на остальных дорожках отсутствуют (слабые зоны на них - праймеры). Таким образом, ОТПЦР показала, что фрагмент *aupr7* специфичен для эпидермы.

Секвенировано 4 фрагмента неизвестных генов *A. aurita*. Из них 1 дифференциально экспрессируется в эпидерме медузы. Генов, специфично экспрессирующихся в Мк, с помощью метода дифференциаль-

ного дисплея, обнаружить не удалось.

Молекулярное клонирование мРНК мезоглеина. С помощью электрофоретического анализа белкового состава мезоглеи зрелых медуз *A. aurita* были обнаружены нескольких мажорных белков. Анти-тела к одному из них, белку массой 45/47 кДа, окрашивают белковые гранулы в цитоплазме мезоглеальных клеток; у зрелых медуз они также окрашивают волокна в ВКМ мезоглеи и апикальную часть клеток эпидермы (Shaposhnikova et al., 2005). На основании этих данных можно заключить, что Мк *A. aurita* участвуют в процессах формирования ВКМ мезоглеи, наряду с эпидермальными клетками.

Масс-спектрометрический анализ набора пептидов (MALDI), полученных из белка массой 45/47 кДа трипсинолизом, не позволил обнаружить в базах данных аминокислотной последовательности данного белка.

Попытка получить N-концевой фрагмент аминокислотной последовательности интересующего белка методом белкового секвенирования по Эдману (Edman degradation) не дала результата. Возможно, N-конец белка 45/47 кДа блокирован.

Белковое секвенирование по Эдману пептидов, полученных из белка 45/47 кДа трипсинолизом, дало 4 аминокислотных последовательности (DDAQGHYTCNADE; DSXYSNAH; YTFIENR; CTSGCEGNNI). Сравнение полученных последовательностей с белками в базах данных показало, что пептиды не принадлежат ни одному из известных белков.

Молекулярное клонирование мРНК этого белка дало нуклеотидную последовательность длиной 1421 нп. Последовательность содержит открытую рамку считывания длиной 1249 нп и вариант сигнала полиаденилирования (ATTAAA) на 18 нп выше поли-А последовательности на 3'конце (рис. 4).

Теоретическая транскрипция открытой рамки считывания дает гипотетический белок длиной 416 аминокислотных остатков (aa) и расчетной молекулярной массой 47223 Да (ProtParam).

Все 4 аминокислотных последовательности пептидов содержатся в последовательности гипотетического белка (рис. 4).

Сравнение последовательности гипотетического белка с последовательностями белков содержащимися в базах данных показало, что это новый белок. Мы назвали его мезоглеин.

Нуклеотидная последовательность мРНК мезоглеина размещена в GenBank (Accession Number DQ467654). Была клонирована, также, мРНК мезоглеина, отличающаяся от приведенной на 22 нп. Она размещена в GenBank (Accession Number EF093532).

Отсутствие 5' нетранслируемого района и отсутствие метионина на N-конце гипотетической последовательности белка указывает на то, что полученная нуклеотидная последовательность является частичной последовательностью мРНК мезоглеина. То, что масса мезоглеина, определенная с помощью диск-электрофореза, близка к массе, рассчитанной по гипотетической аминокислотной последовательности, позволяет предположить, что клонированная последовательность лишь ненамного короче полной последовательности мРНК мезоглеина.

В результате поиска известных доменов в гипотетической аминокислотной последовательности мезоглеина были обнаружены домены Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) и Zona Pelucida (ZP), а также 3 сайта узнавания протеазы фурина (furin), 2 возможных сайта N-гликозилирования и 1 возможный сайт O-гликозилирования. Расположение доменов и сайтов показано на рис. 4.

Домен Zona Pelucida (ZP) встречается в большом количестве различных экстраклеточных белков. В настоящее время известно около 680 белков, содержащих этот домен. Функции ZP-содержащих белков разнообразны - от структурных компонентов в оболочке яйца или в "слизистых домиках" аппендикулярий до компонентов, передающих механическую нагрузку (mechanotransducers) в крыле дрозофилы, или рецепторов у млекопитающих и других позвоночных (Jovine et al., 2005).

ZP-содержащие белки могут подвергаться посттрансляционному расщеплению фурино-подобными эндопептидазами (furin-like endopeptidases), как это было показано для белков млекопитающих ZP2 и ZP3 (Litscher et al., 1999). Мезоглеин содержит три возможных сайта узнавания протеазы фурина (рис. 4): первый RRRR - перед доменом DSL (позиции 4-7 aa), второй RDSR - между DSL и ZP доменами (позиции 86-89 aa), третий RKER - ниже домена ZP (позиции 370-373 aa).

У многих ZP-содержащих белков есть трансмембранный домен, или GPI-anchor, прикрепляющий эти белки к клеточной мембране. Такие белки экскретируются после того, как фурино-подобная протеаза разрезает белок между ZP-доменом и местом крепления белка к клеточ-

1 CTTGTCTGGCCGACCGAAGACACAAGAGGCCCCCTGGTGCAGAAAAGTTAACTGGTAC
L S W R R R R Q K R P L V Q K R L T G T 20
61 AGAAGGCATCAAARTGAAGTTTTTGTCTCCATCGTTTTCTTGCTGCATCTTTTGAGGA
E G I K M K F F V S I V F L L A S F E E 40
121 GATGTCCTTCAACAGATCTCGAGCCATCATCCCATGGCTCGAGATGATGCACA
M S L Q O I S D A I I P C V A R D D A Q 60
181 GGGCATTATACATGTAATGCTGATGAAGCAAAAAGTGTATGGCAGGCTGGTCAGACC
G H Y T C N A D E S K K C M A G W S D P 80
241 AAGCAACAATGTTTACGAGATCAAGATCGGAAGTATCATGTGGGATAAACCTCATGAG
S N N C L R D S R S E V S C G I N F M R 100
301 GATTGAGATCGACAGAAAGTACTTCCGACCCCTGCTAAAATATCCCGCATCAGCTTGAAGGA
I E I D R K Y F D P A K Y S R I S L K D 120
361 CGAAGGCTGTAATCTACTCTCAAAGACGAAAATCGTCTGGATTGACGCCACAGAA
E G C K S T L S K T K Y V L D S A P Q N 140
421 TTGTGATCAACAAGVTGAAACGAGAATACATCATCTCAAAAACAGAGGTTTTTAT
C G S T K V E N E N Y I I Y Q N E V F M 160
481 GAAAGCTATCCCACTGGTAAATCGTAACAAGGGAACATGACCTCAAGTTTACGTTTTC
K A I P E G K I V T R E H D V K V T F S 180
541 ATGTTCATACAACAATCTGGAAATGGTCAGCATGGAAGCTTCAATCCAATTACCATTT
C S Y E K S G M V S I E A E N P I T I V 200
601 TGAATGCAAGAAGATGGATTGGCGCATTCAGTTTCATTTCAAATGTATACAGACAG
D V K E D G F G A E Q F H F K M Y T D S 220
661 CAGTACTCCAACGCATTCGAAATACCCAATCGAAGCGAAANTGACTGACAACTGTGA
X Y S N A H S K Y P I E A K X T D N L Y 240
721 CTTTGAAGCAACACCACCTGCAAGTGATAATGATTTGGNGATTCGATCGATCAGTGTTA
F E A N T T A S D N D L X I L I D O C Y 260
781 TGCACACCTTACCATGGAAACGCAACAAATGCACTCAAATACACTTTTATCGAGATGATG
A T P T M E R N N A L K Y T F I E N R C 280
841 TGCTTTGGAAGATAATGTGAAATTCGTGAAAGCAGAACCGCAAGAGCAAAGTTTACAGAT
A L E D N V K F V K A E R K K Q R F S M 300
901 GCAAGCATTTACATTCATCAAAAGATTTCACTGCTACAGTTTCACTGCGTCTGATTCAT
Q A F T F I O K I S T V Y V H C V V F M 320
961 GTGCAGAAAATCCGCAAAAACAGGACAGTGTACGAGTGGGTGGGAAGCAACAATATCAA
C R K S A K T G Q C T S G C E G N N I N 340
021 CGGAGCTCGTAGGACTTTCAAGCTACGCTGGCGGTGATAAAAAATCCATTTCCAAATA
G A R R D L S S Y A G G D K K S Y S K Y 360
081 CAACCTGTTGGATATTGGACCACTTTACGGAAAGAAAGCTAGCATTGGAAGTAAAAAAA
N L L D I G P L Y R K E R S I G T E K K 380
141 GAGTACCCCAACACACTTTACAACGATCGGTTTGGTTCGCTGGAGTCTGCAGTCTTATGTT
S H P T H F T T I G L V A G V C S L M F 400
201 TGGTGAATGCAGGAGTGGTCTCAAATGAGAAGATCCAGACGTGGAATAATATCCAA
G D C R S G S Q N E K I Q T W K * 416
261 TGAATGAAGTCATTGCTGAGCCACAAGAAAAATGTGATAATGAAAATCTTCTTAATCAA
321 GAGACCAATCATTATTAATCACCATAAAGCAATGATTTATGATTAATCAAGAGACATTA
381 TAAACAATTAAATGTTATTTCCATAACCTCAAAAAAAA

Рис. 4: Нуклеотидная последовательность мРНК мезоглеппа и его теоретическая аминокислотная последовательность. Домен DSL отмечен пунктирным подчеркиванием. Домен ZP отмечен подчеркиванием. Предполагаемые сайты расщепления протеазой (фуриин (furin) отмечены рамкой. Пептиды, полученные методом белкового секвенирования по Эдману, отмечены жирным курсивом. Сайт сигнала поднадежирования отмечен серым и рамкой. Стоп код обозначен звездочкой. Возможные сайты N-гликозилирования и O-гликозилирования отмечены серым.

ной мембране. У мезоглеина не обнаружено ни трансмембранного домена, ни GPI-anchor. Известны другие ZP-содержащие белки, не имеющие трансмембранного домена и GPI-anchor, например белки семейства oikosins (Jovine et al., 2005).

Домен DSL встречается в экстраклеточных белках или в экстраклеточной части мембранных и трансмембранных белков. Этот домен необходим для активации рецепторов - членов семейства Lin-12/Notch. Домен DSL может служить связующим звеном при олигомеризации DSL-содержащих белков, в результате которой образуется активный лиганд, взаимодействующий с экстраклеточной частью Lin-12/Notch белков (Fitzgerald, Greenwald, 1995; Yuan et al., 2001).

Белки семейства Lin-12/Notch являются трансмембранными белками, пересекающими клеточную мембрану один раз. Они участвуют в различных процессах, определяющих направление дифференцировки клеток у беспозвоночных и позвоночных (Kiyota, Kinoshita 2002).

Кроме мезоглеина существуют другие белки, содержащие ZP и DSL домены, например *Strongylocentrotus purpuratus* predicted protein UniProt Accession No. UPI0000583FF7 similar to Neurogenic locus Notch protein precursor.

Гистохимические данные (Naraga et al., 1996a) позволяют предположить, что мезоглеин имеет положительный заряд. Для того чтобы проверить это предположение, гомогенат мезоглеина был разделен с помощью кислого электрофореза в присутствии мочевины (Panym and Chalkley, 1969) (рис. 5). В результате такого разделения выявили 5 зон, соответствующих положительно заряженным белкам. С помощью иммуноблота обнаружили, что одна из полученных зон окрашивается антителами против мезоглеина.

Соответствие молекулярной массы белка, содержащегося в данной зоне массе мезоглеина, подтвердили с помощью диск-электрофореза и иммуноблота (рис. 5, II).

Теоретическая кривая титрования, построенная на основании аминокислотной последовательности, имеет изоэлектрическую точку 9.03, что подтверждает предположение о положительном заряде мезоглеина. Сильный позитивный заряд не характерен для ZP-содержащих белков. Только 12.5% белков этого семейства имеют теоретическую изоэлектрическую точку выше pI 8. Средняя теоретическая изоэлектрическая точ-

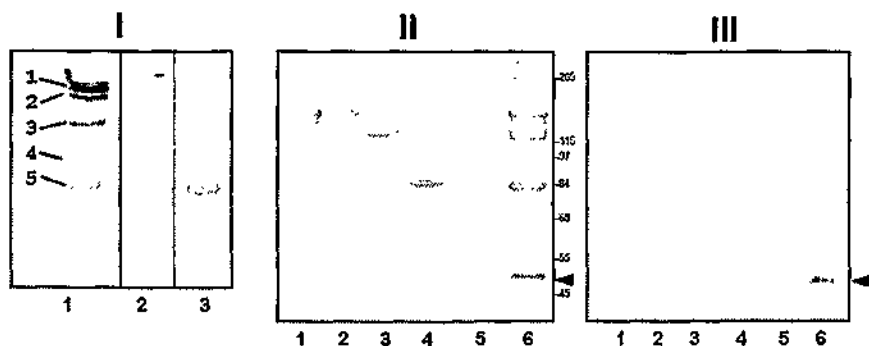


Рис. 5: I - Кислый-мочевинный гель-электрофорез мезоглеин, окрашенный кумасси (1). Иммуноблот электрофореза окрашенный преимунной сывороткой (2) и антителами против мезоглеина (3). II Диск-электрофорез зон вырезанных из геля кислого-мочевинного электрофореза (1-5) и гомогената мезоглеин (6). Номера дорожек соответствуют номерам зон на I(1). Справа приведены молекулярные массы маркерных белков. III - Иммуноблот диск электрофореза, окрашенный антителами против мезоглеина. Стрелки указывают на зоны, соответствующие мезоглеину.

ка ZP-содержащих белков pI 6.3 а средняя изоэлектрическая точка ZP доменов pI 6.2.

Чтобы выяснить, при каких условиях мезоглеин экстрагируется из мезоглеин, применяли экстрагирующие растворы с различными pH и ионной силой. Оказалось, что мезоглеин хорошо экстрагируется при pH ниже pH 3, а ионная сила раствора почти не имеет значения.

На основании того, что изоэлектрическая точка мезоглеина сдвинута в щелочную область, можно сделать вывод, что при нейтральном pH мезоглеин заряжен положительно. Положительный заряд белка должен способствовать его хорошей растворимости, однако в ходе экспериментов по экстракции мезоглеина из мезоглеин, было показано что белок хорошо экстрагируется только при кислом pH. Эти данные позволяют предположить, что мезоглеин прочно связан с ВКМ.

В результате анализа экспрессии мезоглеина в эпидерме, гастродерме и мезоглее методом ОТЩР (рис. 6) было показано, что ЩР продукт ожидаемого размера наблюдается только в реакциях с РНК из мезоглеин.

Есть расхождение между результатами окраски антителами и

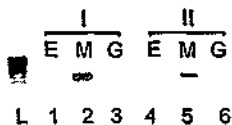


Рис. 6: Электрофорез в 1%-ном агарозном геле продуктов ОТПЦР, полученных с РНК из клеток эпидермы(Е), мезоглеи(М) и гастродермы(Г) двух особей *Aurelia aurita*, с праймерами комплиментарными мРНК мезоглеяна.

ОТПЦР. При окраске антителами к мезоглеину иммуноблотов диск-электрофореза мезоглеи, Мк, эпидермы и гастродермы, кроме зоны соответствующей мезоглеину, окрашиваются также зоны 80 кДа и 120 кДа на дорожках, соответствующих Мк и эпидерме. Возможно, мезоглеин синтезируется в виде белка-предшественника, который подвергается пострасляционному расщеплению. При окраске срезов медузы антитела к мезоглеину окрашивают Мк, волокна в ВКМ мезоглеи и клетки эпидермы. Возможно, в клетках эпидермы есть мезоглеин, но экспрессия его гена у взрослых медуз в клетках эпидермы шла на более ранних стадиях онтогенеза. Аминокислотная последовательность мезоглеина составляет около 416 аа из них больше половины занимает домен ZP (246 аа), поэтому одно из объяснений расхождения результатов состоит в том, что, возможно, антитела узнают домен ZP других ZP содержащих белков в клетках эпидермы. Результаты ОТПЦР представляются достовернее окраски антителами, т.к. праймеры обеспечивают большую специфичность, чем поликлональные антитела. Таким образом, мезоглеин дифференциально экспрессируется в Мк взрослых медуз.

На основании полученных данных можно предположить, что мезоглеин является структурным элементом ВКМ мезоглеи.

Поскольку показано, что ZP-содержащие белки могут выполнять роль элементов, передающих механическую нагрузку (Jovine et al., 2005), можно предположить, что мезоглеин модифицирует механические свойства ВКМ мезоглеи, делая ее более прочной. Это подтверждается субъективным наблюдением, что тело медуз, достигших максимальных размеров, более жесткое, чем у молодых медуз.

Наличие в мезоглеине домена DSL позволяет предположить, что мезоглеин может направлять дифференцировку какого-то типа клеток. Возможно DSL мезоглеина является сигналом для клеток, выселившихся из эпителия в мезоглею, направляющим их дифференцировку в Мк.

На основании данных о том, что у взрослых медуз мезоглеин экс-

прессуруется исключительно в Мк и эти клетки содержат крупные гранулы окрашиваемые антителами к мезоглеину, можно предположить, что Мк являются специализированной группой клеток, обогащающей ВКМ мезоглеином.

ВЫВОДЫ

1. Нуклеотидная последовательность мРНК мезоглеина - мажорного белка мезоглеи *A. aurita* с молекулярной массой около 45/47 кДа составляет 1421 нуклеотидных пар.
2. Мезоглеин содержит ZP и DSL домены, а также предполагаемые сайты протеазы фурина, что характерно для экстраклеточных белков.
3. Мезоглеин дифференциально экспрессируется в мезоглеальных клетках и экскретируется во внеклеточный матрикс мезоглеи.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Матвеев И.В. 2002. Применение метода дифференциального дисплея для изучения экспрессии генов в мезоглеальных клетках медузы *Aurelia aurita*. Цитология. 44(9): 891.

Матвеев И.В. 2002. Применение метода дифференциального дисплея для изучения экспрессии генов в мезоглеальных клетках *A. aurita*. Вестник СПбГУ. 4(27): 108-113.

Матвеев И. В. 2005. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов в различных группах клеток медузы *Aurelia aurita*. Цитология. 47(5): 431-435.

Shaposhnikova T., Matveev I., Napara T., Podgornaya O. 2005. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres. Cell Biol Int. 29(11): 952-958.

Матвеев И.В. 2006. Мезоглеин - белок синтезируемый мезоглеальными клетками медузы *Aurelia aurita*. Цитология. 48: 9.

Shaposhnikova T., Matveev I., Podgornaya O. 2006. Mesoglein - a mesogleal protein of the jellyfish *Aurelia aurita* - is an early metazoan

member of ZP-domain-containing protein family. 10th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles, abstracts p.18.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Заварзин А.А. 1915. Очерк зоологической микробиологии протист и соединительной ткани. Медгиз, Москва.
- Чан О.Ю., Бессе К., Панафа Т.О. 1996. Протозоофагическая активность и постинфузорный клеточный метаболит в симбиотической системе *Aurelia aurita*. 2. Морфологические аспекты симбиоза. Цитология. 35(1): с.22-27
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bouillon J, Coppois G. 1977. Etude comparative de la mesoglee des emoules. *Calais: Biol. Marine* 13: 339-368.
- Chapman D.H. 1971. Cnidarian histology. *Coeelenterate biology. Reviews and new perspectives*. Eds. Muskratine L., Leuboff H. Acad. Press. NY - SP - London. pp. 1-33.
- Chapman G. 1966. The structure and function of the mesoglea. *Cnidaria and their evolution*. ed. Boes. Symp. Soc. London. V.16. P. 147-163.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): 156-159.
- Denton EJ. 1963. The buoyancy mechanism of sea creatures. *Eukaryotes* 22: 85-87.
- Eisenhaber B., Bork P., Yuan Y., Loeffler G., Eisenhaber F. 2000. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *Caelegans*. *TIBS* 25(7): 310-311.
- Fitzgerald K., Greenwood I. 1995. Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development*. 121: 4275-4282.
- Frank U., Rinkewich B. 1999. Scyphozoan jellyfish's mesoglea supports attachment, spreading and migration of autozoous' cells in vitro. *Cell Biol. Intern.* 23(4): 307-311.
- Galloni B., Schmid V. 2002. Cnidarians as a Model System for Understanding Evolution and Regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 39-48.
- Chomczynski P., Hoogland C., Gostliker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bahrck A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (in) ed. John M. Walker: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press.
- Hausman R. 1973. The mesoglea. *Biology of Hydra*. Eds. Burnett A. London: Acad. Press N.-Y., P.393-453.
- Hyman L.H. 1910. *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora*. Graw-Hill Book Company N.-Y.-London. 726 p.
- Kalendar R. 2006. FastPCR, PCR primer design, DNA and protein tools, repeats and own database searches program. www.bioeenter.felsinkki.fi/bi/programs/fastpcr.htm
- Kiyota T., Kinoshita T. 2002. Cysteine-rich region of X-Serrate-1 is required for activation of Notch signaling in *Xenopus* primary neurogenesis. *Int J Dev Biol.* 46(8): 1057-1060.
- Julkunen K., Molkgaard A., Gupta R., Brimak S. 2005. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*. 15: 153-164.
- Kloman HK, Philip D, Hoffman MP. 2003. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 14: 526-532.
- Knight D. P. 1971. Sclerotization of the Calyptoblastic hydroki *Laurencia flexuosa*. 2. Histochemical demonstration of phenol oxidase and attempted demonstration of peroxidase. *Tiss. and Cell.* 3(1): 57-64.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 4: 680-682.
- Letinic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. 2008. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D257-260.
- Liang P., Pardee A.B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science*. 257: 967-971.
- Litscher E.S., Qi H., Wassarman P.M. 1999. Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry*. 38: 12280-12287.
- Jovine L., Coste C., Darie, Eveline S. Litscher, and Paul M. Wassarman. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 83-111.
- Mackay NC. 1969. Sulphate regulation in jellyfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 30: 481-488.
- Murcler-Haner A., Bryant SH. 2001. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32: 327-331
- Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Djatschenko L., Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and stop-out PCR. 1999. *Nucleic Acids Res.* 27(6): 1553-1560.
- Panyin S., Chalkley R. 1969. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Biochemistry*. 8:3972-3979.
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3: 327-332.
- Podgornaya O.I., Shaposhnikova T.G. 1998. Antibodies with the cell-type specificity to the morula cells from haemolymph of ascidian *Styela pectinata*. *Cell Structure and Function*. 24: 319-355.
- RH Don, PT Cox, BJ Wainwright, K Baker, and JS Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 1008.
- Rose TA, Henikoff JG, Henikoff S. *Nucleic Acids Res.* 2003. CODEHOP (COncensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. 31(13): 3763-3766.

- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2nd Edition). New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmid V. 1992. Transdifferentiation in medusae. *Int Rev Cytol* 112: 213-261.
- Shaposhnikova T., Matveev I., Napara T., Podgornaya O. 2005. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres. *Cell Biol Int.* 29(11): 952-958.
- Singer J. 1971. Electron microscopic and autoradiographic study of mesogleal organization and collagen synthesis in sea anemone *Alphea daphana*. *Cell. Tiss. Res.* 119: 537-551.
- Weber C., Schmid V. 1985. The fibrous system in the extracellular matrix of hydromedusae. *Tissue and Cell* 17: 811-822.
- Werner B. 1981. Stamm Cnidaria, Nesseltiere. *Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Jena. G. Verlag Fischer.* Bd 1, T. 2. S.11-105.
- Young J. A. 1971. The nature of tissue regeneration after wounding in the sea anemone *Calliactis parasitica* (Conch). *Mar. Biol. Ass. U. K.* 51(3): 559-617.
- Yumi Z. R., Okuniwa M., Nagata I., Tazawa Y., Ito M., Kawarazaki H., Inomata Y., Okano S., Yoshida T., Kohyashi N., Katsuka T. 2001. The DSL domain in mutant JAG1 ligand is essential for the severity of the liver defect in Alagille syndrome. *Clin. Genet.* 59: 330-337.

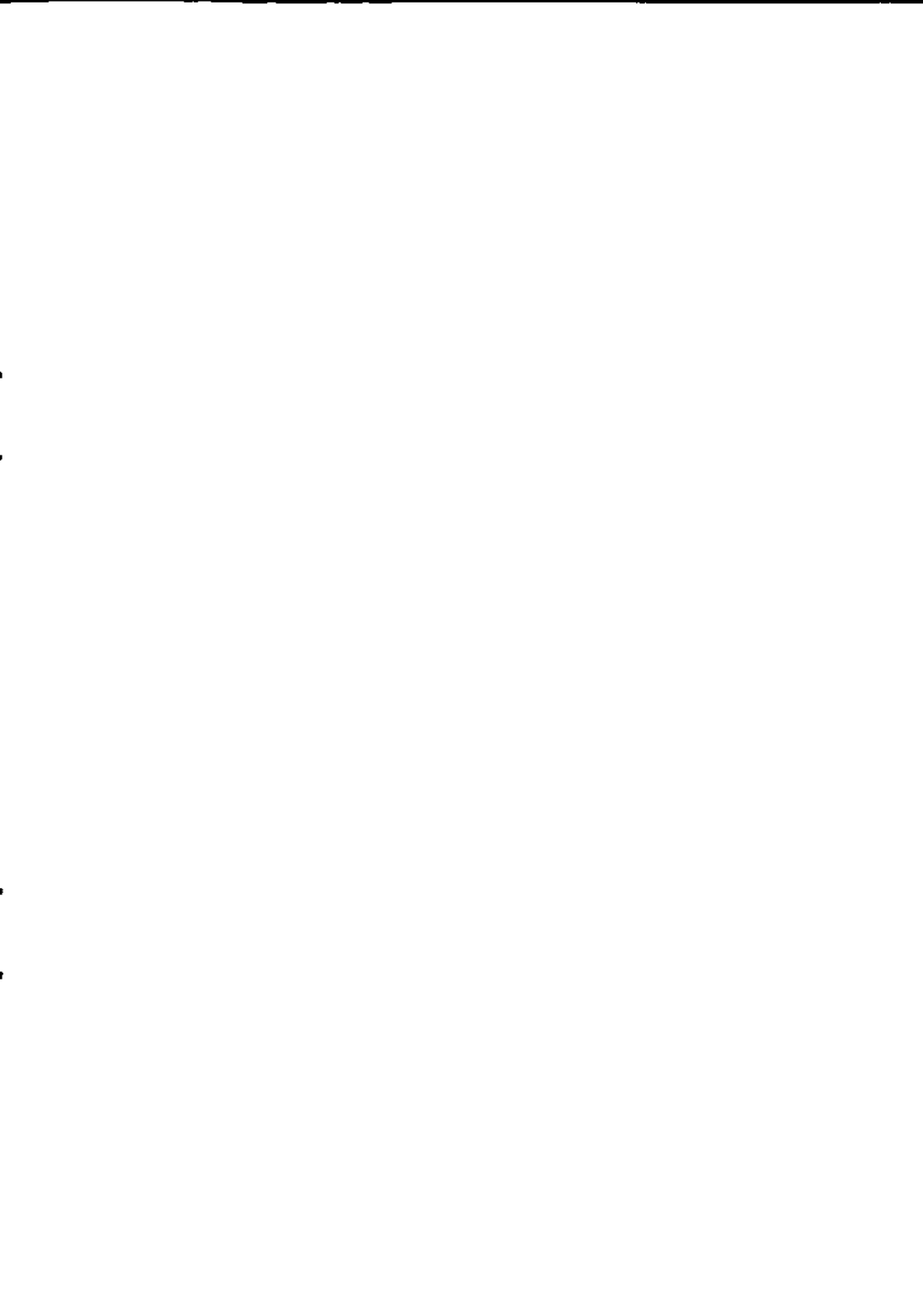
Лицензия ЛР №020593 от 07.08.97

Подписано в печать 13.12.2006. Формат 60x84/16. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100. Заказ 1079б.

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного автором,
в Цифровом типографском центре Издательства Политехнического университета.
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.

Тел.: 550-40-14

Тел./факс: 297-57-76



2007A
1960

R-1960