

На правах рукописи

**АДОНИН
Леонид Сергеевич**

**ПЛАСТИНКА КОНТАКТА ООЦИТА
СЦИФОМЕДУЗЫ *AURELIA AURITA*:
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И
МОРФОДИНАМИКА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
науки Институт цитологии Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор
Подгорная Ольга Игоревна
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор
Родионов Александр Викентьевич
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Ботанический институт
им. В.Л. Комарова РАН

доктор биологических наук
Скарлато Сергей Орестович
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт цитологии РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биологии моря им.
А.В. Жирмунского ДВО РАН

Защита диссертации состоится «15» февраля 2013 г. в 12 часов на
заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института
цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект,
д.4.

e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru


Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии
РАН

Автореферат разослан «11» января 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Блестящая оболочка, или Zona Pellucida (ZP) – внеклеточная структура, окружающая ооцит высших млекопитающих. У представителей животного царства описано большое разнообразие функциональных аналогов Zona Pellucida млекопитающих: *вителлиновая оболочка* у моллюсков и ракообразных, *вителлиновая мембрана* и *хорион* у некоторых насекомых из отряда Diptera, *вителлиновый слой* у иглокожих, *хорион* у костистых рыб, *Zona Radiata* у амфибий, а также *перивителлиновый слой* у птиц (Anderson, 1968; Breed et al., 1990; Hedrick et al., 1991; Mate, 1998; Tarin & Cano, 2000; Sinowatz et al., 2001; Jovine, 2005).

ZP и ее функциональные аналоги абсолютно необходимы для нормального оплодотворения. Ответственны за это ZP-доменные белки в составе ZP. Однако происхождение ZP в эволюции и развитие не исследованы. Для выбора модельного объекта важно его положение на филогенетическом древе. В последнее время возрастает интерес к объектам из различных систематических групп, внешних по отношению к группе Bilateria. Понимание сложных процессов и молекулярных каскадов при оплодотворении, роль ZP в аттракции и ориентации гамет в группе Bilateria невозможно без описания таковых у предковых форм (Finnerty et al., 2003; Ball et al., 2004; Matus et al., 2006). Хотя после разделения предков форели и мыши прошло около 400 миллионов лет, а также произошел переход от внешнего оплодотворения и развития к внутреннему, белки яйцевых оболочек у форели и мыши имеют значительное структурное сходство как между собой, так и с белками яйцевых оболочек птиц и амфибий (Litscher & Wassarman, 2007). С другой стороны, показано, что у асцидии *Ciona intestinalis* ZP-домен-содержащие белки, экспрессирующиеся ооцитом, значительно варьируют даже у отдельных индивидуумов, не говоря уже о разных видах, но вариации затрагивают внешний, относительно ZP-домена, аминокислотный участок (Kürn et al., 2007a). ZP-доменные белки найдены у беспозвоночных животных сравнительно недавно, например, у моллюсков (Aagaard et al., 2006), у нематоды *Caenorhabditis elegans* (Sapio et al., 2005) и асцидии. С возрастанием количества аннотированных геномов беспозвоночных удается предсказать наличие ZP-доменов содержащих белков, а затем подтвердить их наличие экспериментально (Kürn et al., 2007b). Большинство выявленных экспериментально ZP-доменных белков локализуется именно в специфических структурах, обеспечивающих оплодотворение.

Среди известных и хорошо изученных функциональных аналогов ZP самым древним в эволюционном плане считалась вителлиновая оболочка, описанная у некоторых двустворчатых моллюсков (Tarin & Cano, 2005; Wong & Wessel, 2006).

В настоящей работе приведены данные, позволяющие думать, что пластинка контакта ооцита *Aurelia aurita* является наиболее древним аналогом Zona Pellucida, если брать за основу традиционные эволюционные

схемы. Новизна и актуальность настоящей работы состоит в том, что впервые описана морфодинамика функционального аналога Zona Pellucida у представителя внешней, по отношению к Bilateria, группе Cnidaria, а также проведен начальный молекулярно-биологический анализ компонентов пластинки контакта.

Цели и задачи исследования.

Цель настоящего исследования — описание структурной организации и морфодинамики пластинки контакта на анимальном полюсе ооцита сцифомедузы *Aurelia aurita* на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях, а также определение частичной нуклеотидной последовательности кДНК, кодирующей ZP-доменный белок пластинки контакта.

Для этого решали следующие задачи:

- 1) Сбор материала во время летних сезонов 2009-2012 гг.
- 2) Описание пластинки контакта на светооптическом и электронномикроскопическом уровне.
- 3) Описание морфодинамики пластинки контакта.
- 4) Выявление пластинки контакта на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях с помощью антител против мезоглеина.
- 5) Клонирование последовательности кДНК ZP-доменного белка пластинки контакта (белка Gf_180).
- 6) Проведение *in vitro* оплодотворения для доказательства функциональной вовлеченности в процессы оплодотворения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. На парафиновых срезах гонад самок *A. aurita* классическими методами иммуно- и гистохимии выявляется специфическая структура, локализованная на анимальном полюсе ооцита. Структура названа «пластинка контакта».

2. На основании данных светооптического анализа парафиновых срезов гонад самок *A. aurita*, в оогенезе удается выделить 7 последовательных стадий развития ооцита.

3. Используя метод ультраструктурного анализа, показано, что в периферической цитоплазме растущего ооцита присутствуют гранулы двух типов, материал которых на последних стадиях развития ооцита сливается и образует пластинку контакта — фибриллярную внеклеточную структуру.

4. Показано, что основная функция пластинки контакта, подобно ZP высших многоклеточных животных, — участие в процессах оплодотворения.

5. Полученная в настоящей работе частичная нуклеотидная последовательность гена, кодирующего белок пластинки контакта Gf_180, содержит ZP-домен.

Научная новизна работы.

В настоящей работе впервые описана новая структура – пластинка контакта ооцита медузы *A. aurita*, являющаяся вероятным предшественником ZP, ключевой структуры при оплодотворении у высших позвоночных. Пластинка контакта в ооцитах кишечного *A. aurita* покрывает анимальный полюс и сходна с классической ZP по следующим признакам: (1) привлекает сперматозоиды; (2) материал пластинки контакта синтезируется ооцитом и хранится в гранулах; (3) гранулы и сама пластинка контакта содержат ZP-доменные белки; (4) дефинитивная пластинка контакта является внеклеточной структурой, сформированной фибриллами, сходными по размеру с таковыми классической ZP.

Теоретическое и практическое значение работы.

Ранее в Лаборатории морфологии клетки ИИЦ РАН (группа Некодирующей ДНК) описан новый белок мезоглеи кишечного *A. aurita* – мезоглеин (Matveev et al., 2007). Он относится к обширному семейству ZP-доменных белков, основная функция большинства из которых – участие в процессах оплодотворения и пренатального развития у многоклеточных животных. Именно принадлежность мезоглеина к ZP-доменным белкам заставила обратить внимание на оогенез медузы. Одним из основных инструментов работы является поликлональная сыворотка против мезоглеина (АТ RA47), содержащая пул АТ, проявляющих аффинитет только к ZP-домену, что доказано в настоящей работе.

Результаты настоящей работы представляют собой как количественные данные о подвижности ZP-доменных белков, нуклеотидных последовательностях ZP-домена и генов самих белков, сравнение ZP-доменных белков в базах данных; так и данные классической морфологии. Работы такого типа открывают путь к созданию нового языка описания биологических процессов, где классические термины, такие как «ткань» или «зародышевые листки», дополнены новым содержанием в виде описания конкретных последовательностей генов, уровня их экспрессии, родственных отношений, выясненных по базам данных.

Описание пластинки контакта проясняет происхождение Zona Pellucida и может привести в разработке новых практических методов лечения определенных типов бесплодия у человека и животных.

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 25 печатных работ, из них 5 — статьи. Основные положения представлены и обсуждены на VII, VIII, IX, X, XI и XII Научных сессиях Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета (2006–2011); Международной конференции Морской биологической станции Зоологического института РАН (2007); II Съезде Общества клеточной биологии и Юбилейной конференции, посвященной 50-летию ИНЦ РАН (2007); Международном молодежном научном форуме "Ломоносов" (2008); 12 и 16-й международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых «Биология — наука XXI века» (2008, 2012); XV Школе «Актуальные проблемы биологии развития» (2008); XIII, XIV и XV Санкт-Петербургских ассамблеях молодых ученых и специалистов (2008–2010); Международной конференции «Хромосома 2012» (2012); 12th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (2008); Modern Microscopy Techniques in Biology and Medicine (2009); 2nd international symposium «Anchialine ecosystems» (2012).

Вклад автора.

Результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей методы и результаты исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 144 публикаций. Работа изложена на 120 страницах и иллюстрирована 12 рисунками и 1 таблицей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты мол_а 12-04-31240, №05-04-49156-а, №05-04-49828-а, №11-04-01700-а), Президиума РАН (грант "Молекулярная и клеточная биология"), Стипендии президента (№ СП-468.2012.4).

МАТЕРИАЛ и МЕТОДЫ

Сбор материала.

Объектом исследования являлись взрослые медузы *Aurelia aurita* (кл. Scyphozoa, отр. Semaestomeae, сем. Ulmaridae) с диаметром зонтика не менее 10–15 см. Материал собран в двух территориально удаленных популяциях вида: акватории ББС ЗИН РАН Картеш (Белое море, пос. Чупа) и МБС ДВО РАН Восток (Японское море, г. Владивосток) в период июнь – октябрь 2008-2012.

Кариологический анализ особей из этих популяций показал: кариотип *A. aurita* из Белого моря представлен 8 парами субметацентрических и 11 парами акроцентрических хромосом ($2n=38$), в то время как кариотип медуз

из Японского моря представлен только 3 парами субметацентрических и 14 парами акроцентрических хромосом ($2n=34$). Согласно данным Доусона (Dawson & Jacobs, 2001) медузам рода *Aurelia* из акватории Японского моря присвоено название *Aurelia sp1*. В кариотипе *A. sp1* по сравнению с *A. aurita* утрачены довольно крупные хромосомы №№ 12 и 14, короткие плечи хромосом №№ 6, 7, 8, 9, 12, а также дистальные участки обоих плеч хромосомы № 1 (из-за этого она в кариотипе *A. sp1* стала короче, чем хромосома № 2 *A. aurita*) и длинного плеча хромосом №№ 10 и 11 (Адонин и др., 2012в). Видовые названия идентичны таковым в статье Дусона и Якобса (Dawson & Jacobs, 2001).

После кариотипирования объектов принято решение остановиться в работе только на материале, собранном в Белом море.

Парафиновые срезы.

Кусочки гонад самок *A. aurita* с прилежащей мезоглеей и эпителием гастроваскулярной полости фиксировали в двух вариантах фиксатора: 1-й – 4%-ный раствор ПФА на PBS (800–850 мОсм/л); 2-й готовили на фильтрованной морской воде с тем же количеством ПФА. Время фиксации составляло от 2 до 6 ч. Затем образцы отмывали в четырех сменах PBS (800–850 мОсм/л), время каждой отмывки 1 ч. На хранение материал оставляли в 70%-ном этаноле, до которого доводили материал через ряд возрастающих концентраций этанола (30, 50, 70%).

Фиксированный материал обезвоживали и заключали в парафин по следующей схеме: 70, 85, 96%-ный этанол; 96%-ный этанол/изобутанол (1:1); изобутанол; изобутанол/хлороформ (1:1); хлороформ; хлороформ/парафин (1:1); и финальные 2 смены парафина. Время каждой стадии от 20 до 30 мин, пропитка парафином – 2 ч.

Серийные срезы (до 5 мкм толщиной) получали на микротоме Leica SM 2000 R. Срезы депарафинировали по стандартной методике (*o*-ксилол; *o*-ксилол/изобутанол; изобутанол; изобутанол/96%-ный этанол; 96% и 70%-ный этанол; дистиллированная вода), затем производили окрашивание гистологическими красителями. Окрашенный препарат обезвоживали и заключали под покровное стекло в Dammar resin. В работе использованы классические гистологические методики окрашивания: гематоксилином-эозином; альциановым синим; толуидиновым синим; паральдегид-фуксином, а также метод трехцветной окраски по Маллори (Пирс, 1962).

Иммуногистохимия.

Кусочки мезоглеи и гонады фиксировали, как описано в разделе «Парафиновые срезы». После депарафинирования срезы споласкивали в дистиллированной воде и двух сменах TBS-Tween. Обработку первыми и вторыми АТ проводили по описанной методике (Shaposhnikova et al., 2005). Использовали первичные АТ RA47 (1:5000); вторичные АТ: GAR-FITC, GAR-Rhodamin (Sigma, США). Все операции проводили при комнатной температуре (до 25°C). Окрашенные срезы заключали в антифейд или глицерин (50%) и наблюдали в микроскоп (Leica DM 6000 B).

Полутонкие срезы.

Кусочки гонады самок *A. aurita* фиксировали в растворе ГА (0.5%) и ПФА (2%) на какодилатном буфере, постфиксация раствором OsO₄ (1%). Фиксированный материал заливали в Эпон по методике производителя (Sigma, США). Полутонкие срезы изготавливали на ультратоме Leica EM UK6. Окрашивали в растворе кислого фуксина (0.1%) на этаноле (30%) (до 2 мин при постоянном подогреве). Наблюдение и фотосъемку проводили на микроскопе Leica DM 6000 B.

Измерения.

При наблюдении парафиновых срезов (с гистологической и иммунофлуоресцентной окрасками, а также полутонких срезов) измерения проводили при помощи объект-микрометра с ценой деления 0.01 мм (ГОСТ 7513-75).

Ультратонкие срезы.

Фиксацию материала производили как описано выше. Ультратонкие срезы (толщиной до 70 нм) получены на ультратоме Leica EM UK6. Контрастирование срезов проведено по классической методике: водным раствором уранилацетата (2%) и раствором цитрата свинца (Гайер, 1974).

Иммунологический метод окрашивания золотом (Immunogold).

Кусочки гонады самок *A. aurita* фиксировали в растворе ПФА (2%) на какодилатном буфере. Фиксированный материал заливали LRWhite по методике, предложенной производителем (Fluka). Тонкие срезы изготавливали на ультратоме Leica EM UK6. Метод выявления локализации антигена — классический с некоторыми модификациями (Shaposhnikova et al., 2005). Используются первичные АТ RA47 (1:1000); вторичные АТ: GAR-Gold (10 нм) (Sigma, США). Все операции проводили при комнатной температуре (до 25°C).

***In vitro* оплодотворение.**

Для *in vitro* оплодотворения из слоя зачаткового эпителия с помощью пипетирования через широкое пропускное отверстие полиэтиленовой пипетки выделяли ооциты, находящиеся на последних стадиях развития. Ооциты собирали в стерильную чашку Петри и добавляли заранее профильтрованные (через сито с ячейкой 20 мкм) сперматозоиды (500 тыс. кл./мл). После этого проводили перемешивание и через каждые 30 мин фиксировали (2%-ным ПФА). Опыт повторен 5 раз. Наблюдение и фотосъемку проводили на микроскопе Leica DM 6000B.

Электрофоретическое разделение белков в условиях SDS-электрофореза по Лэммли.

Белковый состав мезоглеи и гонад самок сравнивали, разделяя гомогенаты соответствующих образцов с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по стандартной методике (Laemmli, 1970) с некоторыми модификациями (Shaposhnikova et al., 2005). Концентрация акриламида в гелях составляла в разных вариантах от 7 до 12%.

Электрофоретическое разделение белков в условиях кислого электрофореза по Чокли.

Разделение белков гонад самок и мезоглеи проводили в полиакриламидном геле в присутствии уксусной кислоты (5.4%) и мочевины (3M) (Panyim & Chalkley, 1969). Концентрация акриламида в гелях составляла в разных вариантах от 5 до 13%.

Имуноблот (Вестернблот).

Процедура основана на опубликованной ранее (Towbin et al., 1979). Использованы первичные АТ RA47 (1:5000); вторичные АТ: GAR-AP (Sigma, США). Все операции проводили при комнатной температуре (до 25°C). Выявление щелочной фосфатазы проводили в системе BCIP (0.02%-ный раствор на 10%-ном диметилформамиде) и NBT (0.03%-ный водный раствор). Получение и определение специфичности антител RA47 описано ранее (Shaposhnikova et al., 2005).

Выделение РНК.

Для выделения тотальной фракции РНК использован набор реагентов Trizol (Invitrogen) согласно рекомендациям изготовителя или модифицированный протокол с использованием гуанидинтиоцианата (Chomczynski, Sacchi, 1987). Чистоту выделения и сохранность РНК оценили по четкости полос 18S и 28S рибосомных РНК в УФ свете. Количество РНК измеряли спекрофотометрически по поглощению УФ света с длиной волны 260 нм (Sambrook et al., 1989). Для очистки РНК от примеси тотальной ДНК использовали препарат ДНКазы, свободной от РНКаз (RNase free DNase; Roche).

Обратная транскрипция.

Синтез первой цепи кДНК или обратную транскрипцию проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя обратной транскриптазы MMuLV (Fermentas) с праймером M13rT12v (5' CAGGAAACAGCTATGACAAGCTTTTTTTTTTTTTT) (Matveev et al., 2007).

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ПЦР.

Мы предполагали, что в гонадах есть собственный ZP-содержащий белок (Gf_180), поскольку на иммуноблоте после SDS-электрофореза одна из зон связывает антитела RA47, полученные против ZP-домен-содержащего белка мезоглеина (вероятно, что сыворотка RA47 содержит большой пул антител именно против иммуногенного участка белка мезоглеина – ZP-домена). Для проверки этого предположения применили метод RACE PCR, осуществленный с помощью набора для быстрой амплификации концевых фрагментов кДНК "Mint RACE cDNA amplification set" (Invitrogen). Гнездовые праймеры к ZP-домену мезоглеина использовали как генспецифические. В результате амплифицированы 2 фрагмента кДНК интересующего нас гена от ZP-домена в направлении 5' и 3'-концов кДНК. Полученные продукты ПЦР лигированы в вектор pTZ57R/T с помощью набора TOPO TA (Invitrogen). Лигазной смесью трансформировали *E. coli* линии DH5 α . Вставки выделенных из бактерий плазмид секвенировали в

фирме Синтол (Москва). Полученные нуклеотидные последовательности сравнили с последовательностью мезоглеина, что позволило сделать вывод о степени сходства ZP-содержащих белков медузы как между собой, так и с другими описанными ZP-доменными белками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание пластинки контакта на светооптическом уровне.

При окрашивании гематоксилином-эозином парафиновых срезов гонад самок *A. aurita* в месте прикрепления ооцита к зачатковому эпителию выявлена эозинофильная структура. Её морфологические особенности различаются на разных этапах созревания ооцита. Детальные наблюдения проводили на полутонких срезах (рис. 1). Для удобства описания мы выделяем семь последовательных стадий оогенеза (одним из основных критериев разделения на стадии служил диаметр растущего ооцита): от 10 мкм (I стадия) до 150–170 мкм на последних стадиях созревания (стадия VII).

На I стадии размеры ооцита не превышают 10 мкм. В его периферической цитоплазме на границе с соседними эпителиальными клетками отмечено появление отдельных оптически менее плотных гранул (рис. 1, a).

Диаметр ооцита к III стадии увеличивается до 40 мкм и ооцит погружается в прилежащую мезоглею. Начиная с этой стадии гранулы скапливаются в области анимального полюса, где ооцит сохраняет связь с зачатковым эпителием (рис. 1, b).

По мере увеличения объема ооцита (стадия IV, диаметр ооцита 50–70 мкм) ядро смещается к анимальному полюсу, а материал в области контакта между ооцитом и зачатковым эпителием начинает приобретать зернистую структуру (рис. 1, c). На стадии V (диаметр ооцита 80–100 мкм) еще можно различить отдельные гранулы, но большая их часть уже слилась в линейно расположенную гомогенную массу в месте контакта ооцита и эпителиального слоя, т.е. формируется пластинка контакта. На последних стадиях созревания диаметр ооцита увеличивается до 150 мкм на стадии VI и достигает максимального размера на стадии VII (150–170 мкм) (Adonin et al., 2012a).

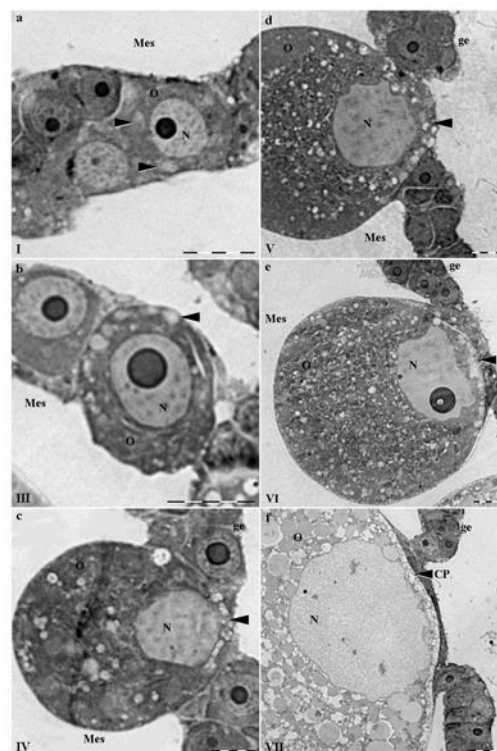


Рис. 1. Полутонкие срезы гонад самок *A. aurita*, окрашенные кислым фуксином. I, III, IV, V, VI, VII — стадии развития ооцита; Mes — мезоглея, O — ооцит, N — ядро ооцита, ge — зачатковый эпителий. Гранулы и пластинка контакта отмечены стрелками.

Масштабная линейка — 10 мкм.

В цитоплазме ооцита содержатся многочисленные гранулы желтка размером до 5–7 мкм (рис. 1, f). Зачатковый эпителий в месте прикрепления ооцита представлен тонким слоем клеток (рис. 1, f) (Адонин и др., 2009).

Гистохимический анализ.

При помощи трехцветной окраски по Маллори на парафиновых срезах выявлено, что материал специфических гранул и пластинки контакта содержит гликопротеины.

Дальнейший анализ парафиновых срезов гонад самок *A. aurita* проводили с использованием гистохимических методик, направленных на исследование углеводного компонента гликопротеинов: окрашивание альциановым синим, толуидиновым синим, паральдегид-фуксином и ШИК-реакция. Результаты их применения позволяют говорить о том, что полисахариды, входящие в состав гликопротеинов, имеют кислую природу: при окрашивании 0.5%-ным раствором альцианового синего (при pH 2.8-3.0) наблюдали интенсивное связывание с материалом специфических гранул и пластинки контакта. Кислый характер углеводного компонента, вероятно, связан с присутствием большого количества SO_3H^- и CO_2H^- групп.

Другие красители (паральдегид-фуксин, толуидиновый синий, ШИК-реакция) не реагировали ни со структурой, ни с материалом специфических гранул развивающихся ооцитов.

Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов тканей гонад самок *A. aurita*.

В качестве основного инструмента использована поликлональная сыворотка AT RA47. Показано, что на начальных стадиях созревания ооцита специфические гранулы в периферической цитоплазме связывают AT (рис. 2). Начиная с III стадии, гранулы, связывающие AT, скапливаются на анимальном полюсе. На последних же стадиях, когда происходит формирование пластинки контакта, ее материал также связывает AT (рис. 2, VII, B). Иммуноокраска материала пластинки контакта остается дискретной, вероятно, из-за неполного слияния гранул (Adonin et al., 2012a).

В качестве положительного контроля использованы срезы участков тела медузы, где в мезоглее присутствуют развитые «эластические» волокна и мезоглеальные клетки. AT взаимодействуют с компонентами волокон и мезоглеальных клеток, как показано ранее (Shaposnikova et al., 2005)

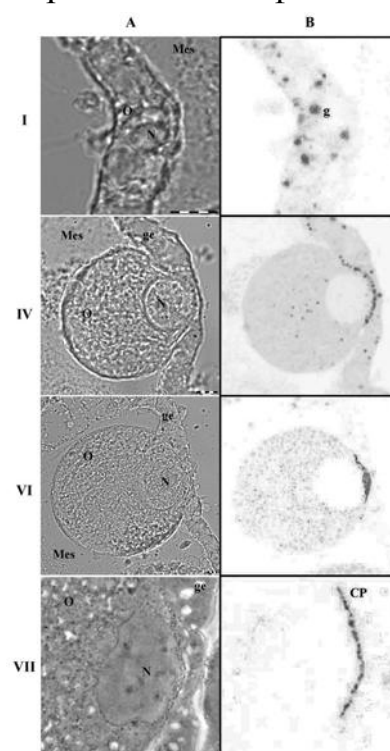


Рис. 2. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание на парафиновых срезах гонад медузы. I, IV, VI, VII — стадии развития ооцита. А — фазовый контраст; В — иммунофлуоресценция. Mes — мезоглея, О — ооцит, N — ядро ооцита, g — гранулы, CP — пластинка контакта. (RA47 1:2000; GAR**Rhodamine* 1:200 (Sigma)). Масштабная линейка — 10 мкм.

Ультраструктурная организация.

На ультраструктурном уровне отмечаются следующие особенности организации ооцита *A. aurita*: на начальных стадиях развития (I стадия) в центре клетки находится крупное ядро, в котором выявляется одиночное плотное фибриллярное образование, вероятно, ядрышко. Хроматин диспергирован и равномерно распределен по всему объему ядра. Вокруг ядра в периферической цитоплазме располагается большое количество митохондрий. Здесь же, в цитоплазме, отмечается появление немногочисленных гранул (окруженные мембраной цитоплазматические пузырьки размером до 3 мкм).

На ультраструктурном уровне наблюдаются гранулы двух типов. Гранулы 1-го типа – округлые мембранные пузырьки диаметром от 1.5 до 3 мкм, заполненные электронно-плотным гомогенным содержимым; гранулы 2-го типа представляют собой сферические образования (диаметр 2–3 мкм), окруженные мембраной, внутри которых находится рыхлый неоформленный материал, формирующий толстые переплетающиеся тяжи.

Начиная с III стадии по мере увеличения объема ооцита происходит его выталкивание в прилежащую к зачатковому эпителию мезоглею, связь ооцита с герминативным эпителием сохраняется только на анимальном полюсе, где отмечается скопление гранул обоих типов. При этом в остальной цитоплазме гранулы 1 и 2-го типа отсутствуют.

На IV стадии развития по мере роста ооцита (диаметр 30–40 мкм) объем ядра продолжает увеличиваться, оно еще больше смещается к анимальному полюсу. Здесь же выявляются гранулы двух типов, и общее количество гранул в области ядра увеличивается.

Диаметр ооцита к VII стадии увеличивается до 170 мкм (диаметр ядра 70 мкм). Ядро находится в непосредственной близости к анимальному полюсу клетки. Количество специфических гранул, расположенных на анимальном полюсе ооцита, значительно увеличивается на завершающих стадиях роста, они заполняют практически все узкое пространство между ядром и цитоплазматической мембраной. На последней стадии происходит слияние гранул 1 и 2-го типов. В некоторых участках цитоплазмы можно наблюдать подготовку гранул к экзоцитозу.

Полностью сформированная пластинка контакта представляет собой внеклеточную фибриллярную структуру, локализованную на анимальном полюсе. Толщина структуры в самом широком месте достигает 5-7 мкм (Adonin et al., 2012a).

Иммунологический метод окрашивания золотом (Immunogold).

Для уточнения локализации антигенов, связывающих AT RA47, применен метод иммуноголд на ультратонких срезах. Показано, что материал гранул обоих типов (1 и 2-го), а также материал пластинки контакта проявляет иммунореактивность и связывает антитела (Adonin et al., 2012a, b).

В качестве положительного контроля использованы срезы участков тела медузы, где в мезоглее присутствуют развитые «эластические» волокна и мезоглеальные клетки. АТ взаимодействуют с компонентами волокон и мезоглеальных клеток.

ZP-доменные белки гонад и соматических клеток.

После разделения белкового гомогената гонад самок *A. aurita* в условиях SDS-электрофореза и проведения иммуноблотинга с АТ RA47 в пробе обнаружены две белковые полосы, связывающие RA47. Их относительные молекулярные массы составляют 180 и 210 кДа (рис. 3, I). На рисунке положение зоны мезоглеина в пробе мезоглеи отмечено звездочкой и очевидно, что полипептиды гонад имеют большую молекулярную массу. Их иммунореактивность говорит о том, что в их составе есть ZP-домен, но, вероятно, они могут содержать и другие функциональные домены.

Для сравнения заряда полипептидов провели разделение гомогената гонад самок в условиях кислого электрофореза по Чокли с последующим иммуноблотингом. Показано, что среди положительно заряженных белков гонад самок имеются два белка, связывающих АТ RA47 против мезоглеина (рис. 3, II). При кислом электрофорезе зоны ZP-домен содержащих белков гонад также расположены выше мезоглеина. Это может быть связано как с их большей молекулярной массой, так и с более низким зарядом по сравнению с мезоглеином. Однако оба белка входят с гелем и разрешаются при кислом электрофорезе. Это свидетельствует об их родстве с мезоглеином (Adonin et al., 2012a, b).

Белку гонад с молекулярной массой 180 кДа присвоено название Gf_180 (от **G**onad of **f**emale) и предпринята попытка частичного клонирования его кДНК.

ZP-домен есть в кДНК гонад

Результаты иммуноблота как после денатурирующего электрофореза по Лэммли, так и после кислого электрофореза в присутствии мочевины дают основание полагать, что белковые детерминанты Gf_180, связывающие АТ RA47, вероятно, содержат в своей аминокислотной последовательности ZP-домен. Для доказательства использовали ПЦР после обратной транскрипции с подобранными специфическими праймерами (рис. 4).

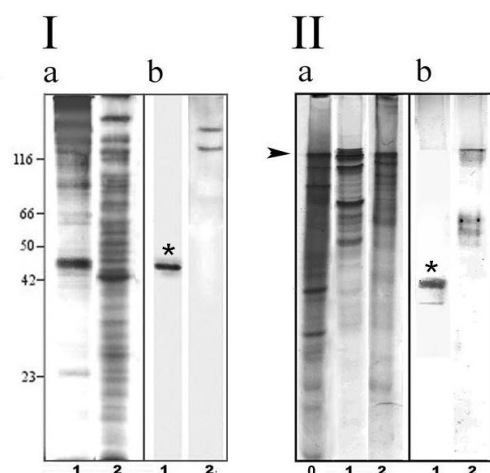


Рис. 3. Электрофореграмма и иммуноблот мезоглеи и гонад самок *A. aurita*.

I — SDS-ЭФ (а) и иммуноблот (б): 1 — мезоглея взрослых *A. aurita*; 2 — гонады. Значения молекулярной массы маркерных белков в кДа указаны слева.

II — AU-PAGE (а) и иммуноблот (б): 1 — мезоглея взрослых *A. aurita*; 2 — гонады. Стрелка — начало разделяющего геля; звездочка — мезоглеин (RA47 1:5000; GAR*AP 1:20000 (Sigma)).

Праймеры подобраны на основе нуклеотидной последовательности мезоглеина (GenBank: DQ467654.1) таким образом, что часть из них специфична к участкам ZP-домена, часть – к внешним, отличным от ZP-домена, участкам белка. В качестве матрицы для проведения ПЦР использованы кДНК библиотеки, полученные с poly(A)RNA мезоглеальных клеток и с poly(A)RNA тканей гонад самок *A. aurita*. Результаты эксперимента представлены в таблице: в эксперименте, где в качестве матрицы выбрана кДНК мезоглеальных клеток, амплифицируется продукт расчетной массы во всех комбинациях праймеров; в эксперименте, где в качестве матрицы выступает кДНК гонад самок, амплифицируются продукты, только если два праймера попадают в рамку ZP-домена, в других же случаях продукта не образуется (см. таблица).

Таким образом, подтверждается наличие ZP-домена в последовательности белка гонад самок *A. aurita* Gf_180 (Adonin et al., 2012b).

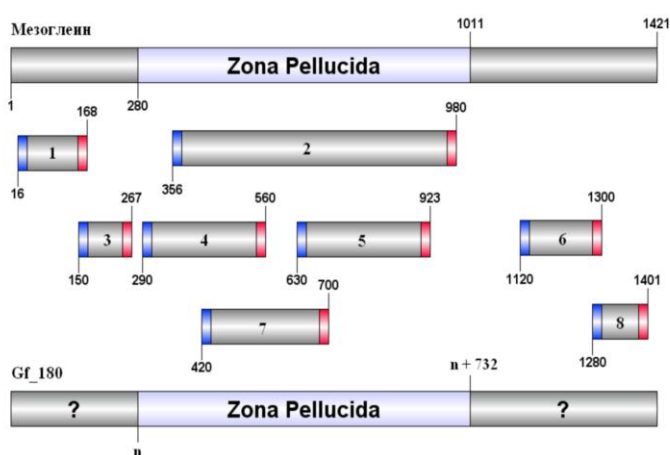


Рис. 4. Схематическое изображение нуклеотидной последовательности мезоглеина, белка гонад самок *A. aurita* Gf_180 и пар специфических праймеров (синие и красные фланкирующие участки расчетных фрагментов – праймеры).

Таблица. Результаты ПЦР-анализа.

Используемые транскриптомы	№ пары праймеров							
	1	2	3	4	5	6	7	8
кДНК мезоглеальных клеток <i>A. aurita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
кДНК гонад самок <i>A. aurita</i>	-	+	-	+	+	-	+	-

+ – наличие продукта ПЦР;

- – отсутствие продукта ПЦР.

Клонирование неполной последовательности кДНК Gf_180

Следующий шаг – определение частичной нуклеотидной последовательности белка гонад самок *A. aurita* с помощью RACE-ПЦР. Для этого подобрали вложенные (nested) праймеры, специфичные к ZP-домену мезоглеина, направленные на «чтение» нуклеотидной последовательности к 5' и 3'-концам. В результате получена последовательность, состоящая из 1167 (открытая рамка считывания), которая кодирует белок из 389 аминокислот. При доменном анализе аминокислотной последовательности белка Gf_180 был обнаружен только ZP-домен, идентичный ZP-домену мезоглеина; других доменных структур обнаружено не было. Таким образом, Gf_180 не содержит DSL-домена, характерного для мезоглеина, но до завершения полного клонирования гена белка Gf_180 невозможно определить наличие других функциональных доменов.

In vitro оплодотворение.

На последних стадиях развития ооцит очень слабо «закреплен» в зачатковом эпителии гонад, поэтому ооциты легко можно «вытрясти» из эпителия. In vitro оплодотворение проведено в морской воде с добавленными туда спермиями.

Видно, что сперматозоиды аккумулируются только в области пластинки контакта (рис. 5). Это подтверждает тот факт, что пластинка контакта вовлечена в процесс оплодотворения.

Белки, родственные ZP-доменным белкам *A. aurita*, в компьютерных базах данных.

Прочитано и аннотировано большое количество геномов как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Провели поиск наиболее схожих с мезоглеином ZP-доменных белков беспозвоночных. Все, кроме

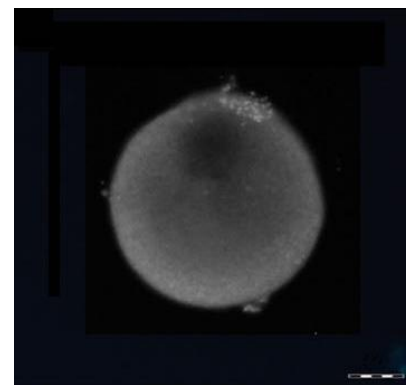


Рис. 5. In vitro оплодотворение созревших ооцитов *A. aurita*. Окраска DAPI, переведено в черно-белый цвет.

Масштабная линейка 50 мкм.

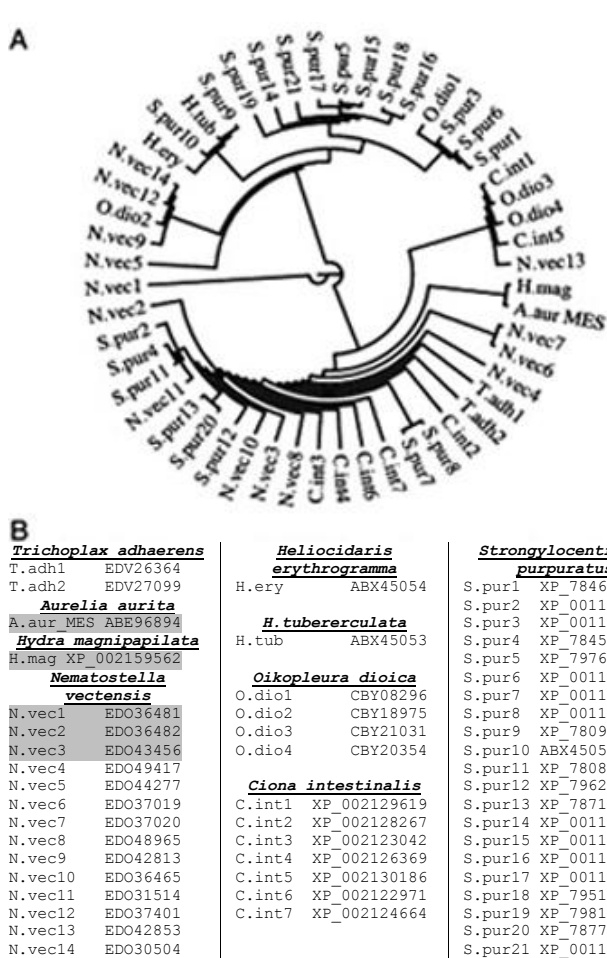


Рис. 6. А. Неукорененная кладограмма ZP-домен содержащих белков беспозвоночных животных (e-Value меньше e^{-10}). В. Список 52 белков, вошедших в анализ, с номерами NCBI.

Мезоглеин и 4 наиболее схожие с ним белка выделены серым цветом.

доменов кроме ZP.

мезоглеина, оказались предсказанными как ORF (open reading frame) и информация об их вовлеченности в те или иные структуры в организме отсутствует.

Для поиска схожих с мезоглеином белков использовали базу NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>) и ряд стандартных программ (Blast, ClustalX; Philyp-3,69, GSview 4,6); при начальном поиске были отображены только ZP-домен содержащие белки (SMART), а также введен фильтр ($e\text{-Value} < e^{-10}$) для того, чтобы отрезать ложно позитивные результаты. После обработки набора секвенированных последовательностей построена неукорененная кладограмма, включающая 52 белка (рис. 6). Близким родственником мезоглеина оказался белок *Hydra* такой же длины и не содержащий никаких других функциональных

Три белка *Nematostella* показывают самые низкие значения e-Value (EDO36481-2e 36, 385 AA; EDO36482-4e 36, 849 AA; EDO43456-9e 33, 1063 AA), то есть наибольшее сходство. Все они содержат C-концевой трансмембранный домен, и два из них обладают N-концевым сигнальным пептидом, который обеспечивает внеклеточную локализацию (Chamoу et al., 2000). Их предсказанное сходство с мезоглеином может быть предметом экспериментальной проверки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Блестящая оболочка (*Zona Pellucida*), окружающая ооцит высших позвоночных животных (мышь, корова, кролик), состоит из 3 гликопротеинов, содержащих ZP-домен (Wassarman et al., 2001). Ооцит человека экспрессирует 4 ZP-доменных гликопротеина (ZPA, ZPB1, ZPB2 и ZPC), локализация которых в блестящей оболочке подтверждена экспериментально (Tarin & Cano, 2000). Описано большое разнообразие функциональных аналогов *Zona Pellucida* млекопитающих и у других животных (Tarin & Cano, 2000), основными компонентами которых являются ZP-доменные гликопротеины. Однако до сих пор у низших многоклеточных животных, в частности кишечнополостных, подобные структуры или белки описаны не были.

В настоящей работе впервые описана структура, являющаяся функциональным аналогом блестящей оболочки, но радикально отличающаяся по морфологическим критериям от подобных структур в животном царстве. Видно, что пластинка – структура, которая локализована на одном из полюсов ооцита (анимальном) и не покрывает весь ооцит в отличие от других описанных типов яйцевых оболочек. Аналогично данным о синтезе и формировании яйцевых оболочек (Tarin & Cano, 2000; Wassarman, 2009) оказалось, что пластинка контакта является внеклеточной структурой, но синтез ее компонентов идет в цитоплазме ооцита. Об этом свидетельствует цитоплазматическая локализация гранул на ранних стадиях развития ооцита (рис. 1) и подготовка гранул к экзоцитозу на последней стадии. Внеклеточная локализация структуры доказана при описании ультраструктурной морфологии (Adonin et al., 2012a).

В области контакта ооцита с герминативным эпителием самок сцифомедузы *A. aurita* структуру, которую мы определяем как пластинку контакта, описывали ранее (Eckelbarger & Larson, 1988). Авторы предполагали, что это определенным образом организованный желток. Они описали клетки герминативного эпителия, находящиеся в месте прикрепления ооцита, и дали им название “трофоциты”. Согласно гипотезе авторов именно эти клетки являются источником желтка, поступающего в ооцит. Подобные клетки ранее были названы “клетками-няньками” (Widersten, 1965). Однако, по нашим наблюдениям, синтетический аппарат “трофоцитов” развит недостаточно для выполнения трофической функции. Сделанное позже авторарадиографическое исследование трофических функций “клеток-нянек” не подтвердило их участия в процессах передачи

питательных веществ и желтка ооциту (Avian et al., 1987). Гистохимические данные с использованием дифференциального окрашивания свидетельствуют о том, что химический состав пластинки и гранул отличен от окружающего их желтка (Адонин и др., 2009). Отсутствие трофических функций у “клеток-нянек” также свидетельствует в пользу синтеза материала пластинки самим ооцитом. Преобразование гранул 2-го типа (укрупнение, вакуолизация), а также объединение гранул 1 и 2-го типов, вероятно, приводит к образованию видимой на парафиновых и полутонких срезах (рис. 1, f) структуры – пластинки контакта.

АТ RA47 получена против мезоглеина (Shaposhnikova et al., 2005), в аминокислотной последовательности которого обнаружен ZP-домен, составляющий более половины всего белка (Matveev et al., 2007). Вероятно, сыворотка содержит значительное количество антител именно против ZP-домена. Для проверки этого предположения проведен частичный трипсинолиз мезоглеина с последующим разделением белковых фрагментов с помощью SDS-электрофореза по Лэммли. Результаты иммуноблотинга показывают: антитела связываются с протеолитическим фрагментом с молекулярной массой около 30 кДа, соответствующей расчетной массе ZP-домена мезоглеина ($250 \text{ aa} \times 110 \text{ Da} = 27500 \text{ Da}$, погрешность в пределах разрешающей способности метода) (Адонин и др., 2012a). Таким образом, частичный трипсинолиз вырезает из мезоглеина фрагмент с молекулярной массой, соответствующей ZP-домену, и как раз этот фрагмент связывает АТ RA47. Совпадение молекулярных масс триптического фрагмента и ZP-домена не является абсолютным доказательством направленности АТ RA47 против ZP-домена, но повышает вероятность этого. В дальнейшем предполагаем провести белковое секвенирование иммунореактивного фрагмента. Дополнительным доказательством аффинитета к участкам ZP-домена, проявляемого АТ RA47, является их связывание с одним из белков внеклеточного матрикса гидры, который не имеет в своем составе иных доменных структур, кроме ZP (Shaposhnikova et al., 2005; Matveev et al., 2012). Аминокислотная последовательность белка предсказана на основании аннотированного генома гидры, доменный анализ проведен с помощью программы SMART.

На иммуноблоте после SDS-электрофореза гомогената гонад самок *A. aurita* антитела RA47 связываются двумя иммунореактивными белковыми зонами. Их относительные молекулярные массы составляют 180 и 210 кДа (Адонин и др., 2009), т.е. больше, чем мезоглеина (47 кДа) (рис. 3, I, B). По-видимому, белки именно из этих зон входят в состав специфических гранул ооцита и пластинки контакта. Вероятно, в пластинке контакта и гранулах-предшественниках присутствуют белки, в состав которых входит ZP-домен, но, в соответствии с их молекулярной массой, они могут содержать и другие функциональные домены.

Возможны два объяснения различий в молекулярных массах мезоглеина и белков гонад. Во-первых, для ZP-белков характерны различные посттрансляционные модификации (Jovine et al., 2005). Мезоглеин подвергается

модификациям при включении в мезоглею (Shaposhnikova et al., 2005). Второе возможное объяснение состоит в том, что белки гонад могут оказаться другими представителями ZP-семейства. Геномы большинства животных, представленных в базах данных, содержат более одного гена ZP-доменного белка (Рис. 6). Наличие в гонадах ZP-белков, специализированных для участия в оплодотворении, кажется более вероятным. На настоящий момент анализ доменного состава аминокислотной последовательности белка Gf_180 не выявил иных доменов кроме ZP. Вероятно, при определении полной последовательности кДНК гена Gf_180, будут описаны уже известные функциональные домены, или же, что вероятнее, это приведет к открытию (описанию) новых доменных структур, направленных на связывание сперматозоида. В неполной последовательности открытая рамка считывания кДНК Gf_180 содержит 1167 нп, в которые входит ZP-домен, идентичный домену мезоглеина.

При оплодотворении у представителей класса Scyphozoa, как и у большинства Cnidaria, сперматозоид контактирует с яйцеклеткой только на одном полюсе (Arai, 1997). Оплодотворение происходит в гонаде, а личинки растут в выводковых камерах на щупальцах медузы. Процессу оплодотворения у *A. aurita* предшествует уплощение клеток зачаткового эпителия в месте прикрепления ооцита (рис. 1). В месте контакта ооцита с зачатковым эпителием уплощенные клетки образуют воронкообразные углубления. Мы наблюдали в них *in vivo* скопления сперматозоидов, что согласуется с описаниями (Иванова-Казас, 1975). Соответственно, способ прикрепления яйцеклетки к эпителию и находящиеся в этом месте структуры имеют принципиальное значение для процесса оплодотворения. Ооцит ориентирован таким образом, что пластинка контакта экспонирована в сторону предполагаемого контакта со сперматозоидом.

Роль ZP-доменных белков в оплодотворении у млекопитающих изучена сравнительно хорошо. Они (в частности, ZP3 мыши) отвечают за первичное прикрепление сперматозоида и инициацию акросомной реакции (Jungnickel et al., 2003). Обнаруженный в составе пластинки ZP-домен содержащий белок, вероятно, играет ключевую роль в процессе контакта сперматозоида и ооцита. Пластинка маркирует и сужает область контакта; ядро находится в непосредственной близости к пластинке, которая ориентирована в просвет желудочного кармана, где происходит активация сперматозоидов. И, как видно из экспериментов по *in vitro* оплодотворению (рис. 5), сперматозоиды скапливаются только в месте локализации пластинки контакта, что и обеспечивает успешное оплодотворение.

ВЫВОДЫ

1. На начальных стадиях развития ооцита сцифомедузы *Aurelia aurita* в его периферической цитоплазме появляются эозинофильные гранулы, которые затем собираются на анимальном полюсе ооцита и формируют внеклеточную структуру – пластинку контакта.

2. Методом непрямой иммунофлуоресценции показано, что материал гранул и пластинки контакта связывает поликлональные АТ против мезоглеина.

3. На основании ультраструктурного анализа, гранулы в периферической цитоплазме можно разделить на два типа по их морфологическим особенностям. Материал обоих типов гранул и сама пластинка связывает поликлональные антитела RA47; полностью сформированная пластинка контакта имеет фибриллярное строение.

4. Оплодотворение *in vitro* показало, что сперматозоиды скапливаются только около пластинки контакта.

5. Частичная последовательность кДНК, кодирующей белок пластинки контакта Gf_180, имеет открытую рамку считывания 1167 нп (389 аа) и содержит в своем составе ZP-домен, идентичный ZP-домену мезоглеина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

Matveev I.V., Adonin L.S., Shaposhnikova T.G., Podgornaya O.I. 2012. *Aurelia aurita* – Cnidarian with a prominent medusoid stage // J Exp Zool B Mol Dev Evol. Vol. 15. №318(1). P.1–12.

Adonin L.S., Shaposhnikova T.G., Podgornaya O.I. 2012a. *Aurelia aurita* (Cnidaria) oocytes' contact plate structure and development. PLoS ONE 7(11):e46542. doi:10.1371/journal.pone.0046542.

Adonin L., Podgornaya O. 2012b. Contact plate of *Aurelia aurita* is a functional analogue of mammalian Zona Pellucida // 2nd international symposium Anchialine ecosystems. Natura Croatica, Vol. 21, № suppl.1. P.3–6.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2008. Есть ли аналог Zona Pellucida у сцифоидной медузы *Aurelia aurita*? // Научный вестник «Ломоносов». Серия Естественные науки. Выпуск I. М.: «Макс-Пресс.

Адонин Л.С., Подгорная О.И., Матвеев И.В., Шапошникова Т.Г. 2009. Пластинка в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием у сцифомедузы *Aurelia aurita* имеет иммунологическое сходство с ZP-домен-содержащим белком мезоглеином // Цитология. Т.51 (№5). С.435–441. (Adonin L.S., Podgornaya O.I., Matveev I.V., Shaposhnikova T.G.. 2009. Plate in the zona of oocyte and germinal epithelium contact in scyphojellyfish *Aurelia aurita* binds antibodies to ZP-domain protein mesoglein // Cell and Tissue Biology. №3. P.283–288).

Адонин Л.С., Подгорная О.И., Шапошникова Т.Г. 2012a. Морфологическая структура пластинки в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием у сцифоидной медузы *Aurelia aurita* (Cnidaria: Semaestomae) // Онтогенез. Т.43 (№1).С.20-27.

Тезисы:

Шапошникова Т.Г., Адонин Л.С., Матвеев И.В., Подгорная О.И. 2006. Определение заряда мажорного белка p45/47 в мезоглее сцифомедузы *Aurelia aurita* (Cnidaria) // VII Научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. – Санкт-Петербург. С.78.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г., Матвеев И.В., Подгорная О.И. 2007. Синтез предшественников мезоглеина в мезоглеальных и эпидермальных клетках сцифомедузы *Aurelia aurita* // VIII Научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. – Санкт-Петербург. С.56.

Шапошникова Т.Г., Адонин Л.С., Матвеев И.В., Подгорная О.И. 2007. Мезоглеин - белок внеклеточного матрикса сцифомедузы *Aurelia aurita* - древнейший представитель суперсемейства ZP-домен-содержащих белков // Экологическое исследование морских организмов. Материалы 2-ой международной конференции Морской биологической станции Зоологического института РАН. – Санкт-Петербург. С.146–147.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2007. Присоединение ооцита сцифомедузы *Aurelia aurita* (Cnidaria) к эктодерме обеспечивается структурой, содержащей мезоглеин // Тезисы докладов и сообщений II Съезда Общества клеточной биологии и Юбилейная конференция, посвященная 50-летию Института цитологии Российской академии наук. Цитология. – Санкт-Петербург. С.709.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2008. Структура анимального полюса ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita* // IX научная сессия Морской Биологической Станции Санкт-Петербургского Государственного Университета. – Санкт-Петербург. С.71–72.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2008. Есть ли аналог Zona Pellucida у сцифоидной медузы *Aurelia aurita*? // Международный молодежный научный форум "Ломоносов". Москва. С.95–96.

Adonin L.S., Shaposhnikova T.G. 2008. Is there an analog of mammalian Zona Pellucida in moon jelly *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria)? // 12th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles. Marseille. P.56–57.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2008. Обнаружен самый древний аналог Zona Pellucida у сцифоидной медузы *Aurelia aurita* // 12 международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» – Пушино. С.6.

Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2008. Что может объединять высших многоклеточных и кишечнополостных кроме многоклеточности? // XV Школа «Актуальные проблемы биологии развития». – Звенигород. С.2–4.

Адонин Л.С. 2009. Как устроен функциональный аналог Zona Pellucida у сцифоидной медузы *Aurelia aurita* (Cnidaria)? // XIII Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. – Санкт-Петербург. С.28–29.

Шапошникова Т.Г., Матвеев И.В., Адонин Л.С., Лазарева А.В., Подгорная О.И. 2009. Мезоглеин и родственные ему белки из тканей сцифомедузы *Aurelia aurita* - наиболее древние представители ZP-домен-содержащего семейства белков внеклеточного матрикса // X Научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. – Санкт-Петербург. С.68–69.

Adonin L.S., Shaposhnikova T.G., Matveev I.V., Podgornaya O.I. 2009. The plate in the zone of oocyte and germinal epithelium contact in scyphomedusa *Aurelia aurita* binds antibodies to zp-domain-containing protein mesoglein // Modern microscopy techniques in biology and medicine. – Saint-Petersburg. P.3.

Адонин Л.С. 2009. Ультраструктурное исследование пластинки в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием, функционального аналога Zona Pellucida, у сцифоидной медузы *Aurelia aurita* (Cnidaria) // XIV Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. – Санкт-Петербург. С.69.

Мушников Н.В., Адонин Л.С., Шапошникова Т.Г. 2010. Сравнение структур, связывающих антитела к мезоглеину, в гонадах двух представителей *Lucernaria quadricornis* и *Aurelia aurita* (Cnidaria) // XI научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. С.62.

Адонин Л.С., Мушников Н.В., Подгорная О.И., Шапошникова Т.Г. 2010. Ультраструктурная организация области контакта ооцита с зачатковым эпителием (пластинки контакта) у сцифомедузы *Aurelia aurita* // XI всероссийская конференция с международным участием «Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря». – Санкт-Петербург, ЗИН РАН. С.9–10.

Адонин Л.С. 2010. Пластинка контакта ооцита сцифомедузы *Aurelia aurita* (тип Cnidaria): 1. Ультраструктурная иммуноцитохимия; 2. Характеристика белков пластинки контакта // XV Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. – Санкт-Петербург. С.74.

Адонин Л.С., Найден А.В., Матвеев И.В., Подгорная О.И., Шапошникова Т.Г. 2011. Иммуноцитохимическое исследование пластинки контакта ооцита *Aurelia aurita* (Cnidaria) // XII Научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. – Санкт-Петербург. С.72–73.

Адонин Л.С., Котова А.В., Матвеев И.В., Подгорная О.И. 2012б. ZP-домен содержащие белки, входящие в состав пластинки контакта ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita* // 16 международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». – Пушино. С.87.

Адонин Л.С., Найден А.В., Котова А.В., Подгорная О.И., Демин С.Ю. 2012в. Кариологический анализ *Aurelia aurita* из акватории Белого моря и ее криптовида (*Aurelia sp1*) из Японского моря // Хромосома 2012. – Новосибирск. С.28.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Гайер Г. 1974. Электронная гистохимия. М., Мир. С.488.
- Иванова-Казас О.М. 1975. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск, Наука, С.372
- Пирс Э. Гистохимия. 1962. М., Издательство иностранной литературы. С.964.
- Агаард J.E., Yi X., MacCoss M.J., Swanson W.J. 2006. Rapidly evolving zona pellucida domain proteins are a major component of the vitelline envelope of abalone eggs. Proc Natl Acad Sci USA. 103(46):17302–17307.
- Arai M.N. 1997. A functional biology of Scyphozoa. Chapman and Hall. P.28–206.
- Avian M., Micali F., Sciancalepore M. 1987. Vitellogenesis in *Pelagia noctiluca* primi risultati di di euctyepy autoradiografishe. Atti della Accademia delle Scinze dell'Istituto di Bologna Classe di Scienze Fisiche Rendiconti. V.3. P.139–146. In Italian; English abstract.
- Ball E.E., Hayward D.C., Saint R., Miller D.J. 2004. A simple plan - Cnidarians and the origin of developmental mechanisms. Nat. Rev. Genet. 5: 567–577.

- Chamoy L., Nicolai M., Quenedey B., Gaill F., Delachambre J. 2000. Characterization of a cDNA encoding RP43, a CUB-domain-containing protein from the tube of *Riftia pachyptila* (Vestimentifera), and distribution of its transcript. *Biochem J* 2:421–427.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): 156–159.
- Dawson M.N, Jacobs D.K. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biol Bull.* 200(1): 92–96.
- Eckelbarger K.J., Larson R.J. 1988. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semaestomeae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan. *Mar. Biol.* V.100. P.103–115.
- Finnerty J.R., Paulson D., Burton P., Pang K., Martindale M.Q. 2003. Early evolution of a homeobox gene: the parahox gene *Gsx* in the Cnidaria and the Bilateria. *Evol Dev* 5:331–345.
- Jovine L., Darie C.C., Litscher E.S., Wassarman P.M.. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 83–114.
- Jungnickel M.K., Sutton K.A., Florman H.M. 2003. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms. *Cell* 114:401–404.
- Kürn U., Sommer F., Hemmrich G., Bosch T.C., Khalturin K. 2007a. Allorecognition in urochordates: identification of a highly variable complement receptor-like protein expressed in follicle cells of *Ciona*. *Dev Comp Immunol* 31:360–371.
- Kürn U., Sommer F., Bosch T.C., Khalturin K. 2007b. In the urochordate *Ciona intestinalis* Zona Pellucida domain proteins vary among individuals. *Dev Comp Immunol* 31:1242–1254.
- Panyim S., Chalkley R. 1969. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Biochemistry*, 8:3972–3979.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 4: 680–682.
- 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.
- Litscher E.S., Wassarman P.M. 2007. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol*, 22:337–347
- Matus D.Q., Pang K., Marlow H., Dunn C.W., Thomsen G.H., Martindale M.Q. 2006. Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *PNAS* 103:11195–11200.
- Matveev I.V., Shaposhnikova T.G., Podgornaya O.I. 2007. A novel *Aurelia aurita* protein mesoglein contains DSL and ZP domains. *Gene.* V.399. P.20–25.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual* (2nd Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sapio M.R., Hilliard M.A., Cermola M., Favre R., Bazzicalupo P. 2005. The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 282:231–245.
- 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.* V.29. N.11. P.952–958.
- Tarin J.J., Cano A. 2000. *Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals*. Springer. P.355.
- Towbin H., Staechelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 76: 4350–4354.
- Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 3:E59–E64.
- Wong J.L., Wessel G.M. 2006. Defending the Zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. *Current Topics in Development Biology* 72:1–115.

*Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам
Лаборатории морфологии клетки, в особенности коллегам из Группы
Некодирующей ДНК Института цитологии РАН, а также всем
сотрудникам кафедры цитологии и гистологии Санкт-Петербургского
государственного университета, сотрудникам Беломорской биологической
станции Картеш Зоологического института РАН за радушный прием и
помощь в работе.*

*Отдельная благодарность научному руководителю Подгорной Ольге
Игоревне за помощь в работе, понимание и поддержку.*
