

*На правах рукописи*

МАЙОРОВА

Мария Андреевна

**БЕТА-ИНТЕГРИН-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ В ОНТОГЕНЕЗЕ  
МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения  
Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Одинцова Нэлия Адольфовна**

**Официальные оппоненты:**

**Воротеляк Екатерина Андреевна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, и.о. заведующего лабораторией клеточной биологии

**Аминин Дмитрий Львович**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией биоиспытаний

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «15» ноября 2016 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук:  
<http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/27-majorova-mariya-andreevna>

Автореферат разослан «\_\_\_» августа 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат биологических наук

*Ващенко*

Ващенко Марина  
Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Исследование рецепторов адгезии, интегринов, – одно из важных направлений современной клеточной биологии, поскольку выводит нас к пониманию фундаментальной проблемы становления многоклеточности. Работы последних десятилетий подтверждают участие интегринов в регуляции адгезии, миграции, выживаемости, пролиферации и дифференцировки клеток многих типов животных. У ряда морских беспозвоночных, таких как губки, кишечнополостные, нематоды, членистоногие и иглокожие, обнаружены гомологи интегринов (Burke, 1999), но эволюционная история интегринов во многом неясна. Предки билатеральных животных уже имели, по крайней мере, два интегриновых гетеродимера, состоящих из нековалентно связанных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц (Hynes, 1992, 2012). Вероятно, у беспозвоночных произошла независимая дивергенция  $\beta$ -интегрин-подобных субъединиц от предковой формы в нескольких линиях билатеральных животных (Burke, 1999).

Существует огромное множество различных интегриновых рецепторов у позвоночных, но интегрин  $\beta 1$  является наиболее консервативным и, вероятно, может быть общим предком для всех  $\beta$ -субъединиц интегринов позвоночных (Ewan et al., 2005). Мы сконцентрировали наше внимание именно на  $\beta$ -интегрин-подобном белке, как одном из самых распространенных интегринов, а также на его предполагаемом лиганде, фибронектин-подобном белке, в развитии и в некоторых органах и клетках взрослого моллюска *Mytilus trossulus*. Данные о последовательностях генов интегринов (Davids et al., 1999) и рецептор-лигандных отношениях (Zhang et al., 2012) у моллюсков только начинают появляться, но на настоящий момент отсутствует информация как об участии интегриновых рецепторов в развитии личинок моллюсков, так и о возможных лигандах этих рецепторов.

Как альтернатива исследованиям, которые пока не могут быть выполнены на целых моллюсках, исследования специфической роли интегрин-подобных белков были проведены на отдельных клетках мидии *M. trossulus*. В связи с этим, важным разделом нашей работы стало изучение этого вопроса на культивируемых клетках личинок ранних стадий развития мидии, так как эти малодифференцированные клетки способны к быстрой адаптации в условиях культуры и более чувствительны к различным факторам окружающей среды, чем более специализированные клетки взрослых моллюсков.

**Степень разработанности.** Известно, что  $\beta 1$ -интегрин и его гомологи участвуют в процессах эмбриогенеза многих животных, в том числе и беспозвоночных, таких как *Drosophila melanogaster* (Brabant, Brower, 1993) и морской еж *Strongylocentrotus purpuratus* (Marsden, Burke, 1998). Данные полногеномного секвенирования улитки *Biomphalaria glabrata* и тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* подтверждают присутствие у этих моллюсков генов,

кодирующих некоторые интегрин-подобные белки (Lockyer et al., 2007; Zhang et al., 2012). Кроме того, активная транскрипция генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса (ВКМ), недавно была обнаружена в транскрипционных профилях на различных стадиях развития мидии *Mytilus edulis*, от оплодотворенной яйцеклетки до ювенильных особей (Bassim et al., 2014). Взаимодействие интегриновых рецепторов с ВКМ (в состав которого входят структурные белки типа коллагена, фибронектина, ламинина и др.) играет важную роль в ряду молекулярных событий, регулирующих основные клеточные процессы (Hughes, 2001).

**Цели и задачи исследования.** Цель данной работы – поиск, характеристика и исследование распределения рецепторов адгезии,  $\beta$ -интегрин-подобных белков, в онтогенезе мидии *M. trossulus*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести поиск гомологов  $\beta$ -интегрин в транскриптоме мидии *M. trossulus* и сравнить найденные последовательности с другими известными  $\beta$ -интегрин-подобными белками различных организмов. Оценить количественную экспрессию генов гомологов  $\beta$ -интегринов на разных стадиях развития личинок мидии и в некоторых органах и клетках взрослых мидий.
2. Исследовать экспрессию  $\beta$ -интегрин-подобного белка с последующим определением его локализации при различных типах дифференцировки клеток личинок мидии и в условиях культуры.
3. Оценить способность к пролиферации клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, *in vivo* и *in vitro*.
4. Определить возможные лиганды  $\beta$ -интегрин-подобного белка в личинках мидии и в культуре клеток.
5. Проанализировать распределение  $\beta$ -интегрин-подобного белка в условиях, влияющих на функционирование интегриновых рецепторов (при добавлении RGDS-пептида или хелатирующих агентов, при криоконсервации клеток).

**Научная новизна.** Установлено присутствие четырех полноразмерных транскриптов, кодирующих последовательности, гомологичные  $\beta$ -интегрин-подобным белкам, в транскриптоме мидии *M. trossulus*. Обнаружено, что клетки личинок мидии, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, появляются по мере развития пищеварительной системы личинок. Представлены доказательства того, что такие клетки в культуре обладают различной избирательностью к субстратам. На ламинине происходит их селективное прикрепление, тогда как на других субстратах селективного взаимодействия  $\beta$ -интегрин-иммунопозитивных клеток с субстратом не обнаружено. Сделано предположение, что развитие эпителиоподобной дифференцировки культивируемых клеток личинок мидии происходит селективно на ламинине с участием  $\beta$ -интегрин-подобного белка.

Проведен широкий скрининг факторов, влияющих на адгезию клеток моллюсков. Сравнительный анализ нарушений адгезии клеток, вызванных ингибитором интегриновых рецепторов RGDS-пептидом,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелаторами и

криоконсервацией, показал, что все эти факторы приводят к частичному разрушению взаимодействия интегринов и белков ВКМ в культуре, и, как следствие, к изменениям в распределении  $\beta$ -интегрин-подобного белка.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты важны для понимания роли рецепторов адгезии в эмбриональном и личиночном развитии беспозвоночных животных. Количественная оценка экспрессии генов гомологов  $\beta$ -интегринов на различных стадиях личиночного развития мидии и в некоторых органах и клетках взрослых моллюсков показала, что значительный уровень экспрессии этих транскриптов связан либо с клетками личинок на ранних стадиях развития, либо с гемоцитами. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей  $\beta$ -интегрин-подобных белков позвоночных и беспозвоночных животных позволил установить родственные связи между гомологами  $\beta$ -интегринов. Определена способность клеток личинок мидии к пролиферации и дифференцировке на разных сроках развития и при различных условиях культивирования. По результатам проведенной работы созданы теоретические предпосылки для разработки новых молекулярно-биологических подходов к исследованию различных типов дифференцировки клеток у двустворчатых моллюсков. Бета-интегрин-подобный белок может быть использован в качестве маркера при дальнейшем изучении развития пищеварительной системы личинок мидии. Оценка распределения клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, может быть полезной при анализе различных патологий у моллюсков, вызываемых факторами, влияющими на адгезию их клеток.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В данной работе были применены молекулярно-биологические методы и методы биоинформатики, методы культивирования эмбрионов и личинок, методы культуры клеток, биохимические методы выделения и анализа белков, а также методы иммуноцитохимии. Были секвенированы библиотеки кДНК, полученные из личинок различных стадий развития и из некоторых органов и клеток взрослых моллюсков на секвенаторах следующего поколения Miseq и Hiseq (Illumina, США) Центра исследований геномики морских организмов Института науки и технологии (OIST), Окинава, Япония. Этапы биоинформатического анализа, требующие высоких вычислительных мощностей, производили на кластере Вычислительного центра Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Для определения состава белковых смесей, полученных из разных тканей и клеток взрослых особей мидии, яйцеклеток, эмбрионов и личинок на различных стадиях развития использовали электрофорез в полиакриламидном геле и Вестерн-блот анализ. Иммуноцитохимические препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) Дальневосточного центра электронной микроскопии при ИБМ ДВО РАН. Такой комплексный подход для исследования локализации интегриновых рецепторов в клетках личинок ранних стадий развития моллюсков был применен впервые.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Экспрессия  $\beta$ -интегрин-подобного белка связана с развитием пищеварительной системы личинок мидии, но не с развитием нервной и мышечной систем. Пространственно-временные паттерны экспрессии  $\beta$ -интегрин-подобного белка и его предполагаемых лигандов, фибронектин-подобных белков, не совпадают ни в личинках, ни в гемоцитах взрослых мидий.
2. Эпителиальные клетки, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, сохраняют способность к митотическому делению как *in vivo*, так и *in vitro*.
3. Распределение  $\beta$ -интегрин-подобного белка зависит от факторов, влияющих на адгезию клеток.

**Степень достоверности результатов.** О достоверности результатов проведенных экспериментов свидетельствует их воспроизводимость и использование современных методов исследования. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2013), 5 Международном симпозиуме Европейского общества эволюционной биологии развития «EvoDevo» (Вена, Австрия, 2014), Международной конференции «Культуры клеток морских и пресноводных животных» («Cell cultures of marine and fresh-water animals», Владивосток, Россия, 2015), ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2013, 2014, 2016).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 3 статьи в зарубежных журналах из списка, рекомендованного ВАК.

**Личный вклад соискателя.** Автором в полном объеме выполнена экспериментальная часть исследования. Соискатель непосредственно участвовал в анализе и интерпретации данных, в представлении результатов на конференциях и подготовке публикаций по результатам исследований.

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 129 страницах, состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также «Заключения», «Выводов» и «Списка литературы», включающего 217 ссылок, из них 204 на иностранных языках. Рукопись содержит 38 рисунков и 3 таблицы.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Нэлии Адольфовне Одинцовой и всем сотрудникам лаборатории клеточных технологий ИБМ ДВО РАН за постоянную помощь на всех этапах исследования и обсуждение полученных результатов, а также признательность инженерам Центра коллективного пользования ИБМ ДВО РАН Фомину Д.В. и Шефер К.А. Автор искренне благодарит профессора Н. Сато и его коллег за

предоставленную возможность провести секвенирование кДНК мидии в Центре исследований геномики морских организмов Института науки и технологии (OIST, Окинава, Япония). Отдельная благодарность к.б.н. В.А. Дячуку (ИБМ ДВО РАН) за помощь в сборе материала, освоении новых методик и обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 12-I-П6-07), Российского научного фонда (гранты № 14-14-00035, № 14-50-00034) и Программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения Российской академии наук «Дальний Восток» (проект № 15-I-6-005 о).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе «Обзор литературы» приведены литературные данные о распространении интегринов среди различных типов животных, их строении и взаимодействии с белками ВКМ, а также о возможных функциях.

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы яйцеклетки, эмбрионы, личинки, взрослые особи мидии *M. trossulus*, а также их клетки в условиях культуры. Для получения культур клеток личинок растили до стадии средней трохофоры (22 ч после оплодотворения при 17°C). Диссоциацию личинок проводили с помощью коллагеназы из гепатопанкреаса краба *Paralithodes camtschatica* (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток; 1,25 мг/мл), в течение 1–2 ч при 16–17°C. Для культивирования клеток использовали модифицированную среду Лейбовича L-15 (Sigma, США) с осмотичностью, которая соответствовала осмотичности морской воды (1100 мОсмоль) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки коров, инсулина (2 мг/л), гентамицина (40 мг/л) и витамина Е (1,75 мг/л). Гемоциты культивировали в течение 24 ч. При инициации культуры жизнеспособность клеток составляла 94–99%. Жизнеспособность клеток определяли методом прямого подсчета в камере Горяева после инкубации с трипановым синим (Serva, Германия).

Для получения тотальной РНК использовали суспензии эмбрионов или личинок, или ткани и клетки взрослых моллюсков, которые гомогенизировали в 15–20-кратном объеме тризола согласно протоколам фирмы-производителя (Thermo Fisher Scientific, США). На основе тотальной мРНК готовили библиотеки кДНК с помощью набора TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, США). Полученные библиотеки секвенировали на секвенаторах следующего поколения Miseq и HiSeq (Illumina, США) Центра исследований геномики морских организмов (OIST, Япония). Сборку транскриптома *de novo* производили с использованием программы Trinity. Количественную экспрессию генов интегрин-подобных белков анализировали с помощью алгоритма RSEM. В качестве гена «домашнего хозяйства», по уровню экспрессии которого нормализовали

полученные показатели количественной экспрессии транскриптов  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии, использовали ген фактора элонгации EF1 $\alpha$ . Поиск гомологов  $\beta$ -интегринов осуществляли с помощью алгоритмов BLASTp и BLASTx в базах данных NCBI ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ) и Swissprot ( <http://www.uniprot.org/> ). Для сравнения аминокислотные последовательности предполагаемых  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии были выровнены с известными последовательностями  $\beta$ -интегринов некоторых других организмов из разных таксономических групп с использованием алгоритма ClustalW, а затем выравнивание было вручную откорректировано по положениям 56 консервативных цистеиновых остатков. На основе полученного выравнивания был проведен филогенетический анализ последовательностей с использованием метода максимального правдоподобия (ML) и метода ближайших соседей (NJ) в программе Mega 7. В результате поиска наилучшей модели для исследуемого набора данных была выбрана модель WAG. На ветвях деревьев указаны значения бутстреп-индексов, превышающие 50 %.

Для выявления  $\beta$ -интегрин-подобного белка были тестированы несколько клонов коммерческих антител к  $\beta$ 1-интегриновой субъединице человека, распознающих консервативный участок внеклеточного домена. Специфичность используемых антител для клеток мидии *M. trossulus* была показана нами с помощью Вестерн-блот анализа только для одного клона антител мыши к  $\beta$ 1-интегриновой субъединице человека (клон LM534, Chemicon). Кроме того, в наших экспериментах была показана специфичность антител кролика к фибронектину плазмы крови человека (клон F-3648, Sigma) для клеток мидии. Для того чтобы проследить за формированием нервной и мышечной систем у личинок, были использованы антитела к маркерам нейрональной (серотонин и FMRF-амид) и миогенной (миозин и парамиозин, фаллоидин для детекции актина) дифференцировки, а  $\alpha$ -ацетилированный тубулин был использован для идентификации ресничных клеток. Для определения способности клеток личинок мидии, в частности, интегрин-позитивных клеток, к пролиферации и для выявления ядер делящихся клеток были использованы антитела к ядерному антигену, связанному с репликацией ДНК в клетках, находящихся в синтетическом периоде митотического цикла (proliferative cell nuclear antigen, PCNA), и фосфорилированному H3-гистону (маркер митотических клеток).

Анализ иммуноцитохимических препаратов был проведен на микроскопе Axiovert 200-M и лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss). Для каждого анализа и каждой окраски было использовано около 200–300 личинок. Подсчет клеток проводили в двух параллельных образцах в каждом эксперименте на десяти случайно выбранных микроскопических полях, с анализом 1000–4000 DAPI-окрашенных клеток на микроскопе Axiovert 200-M.



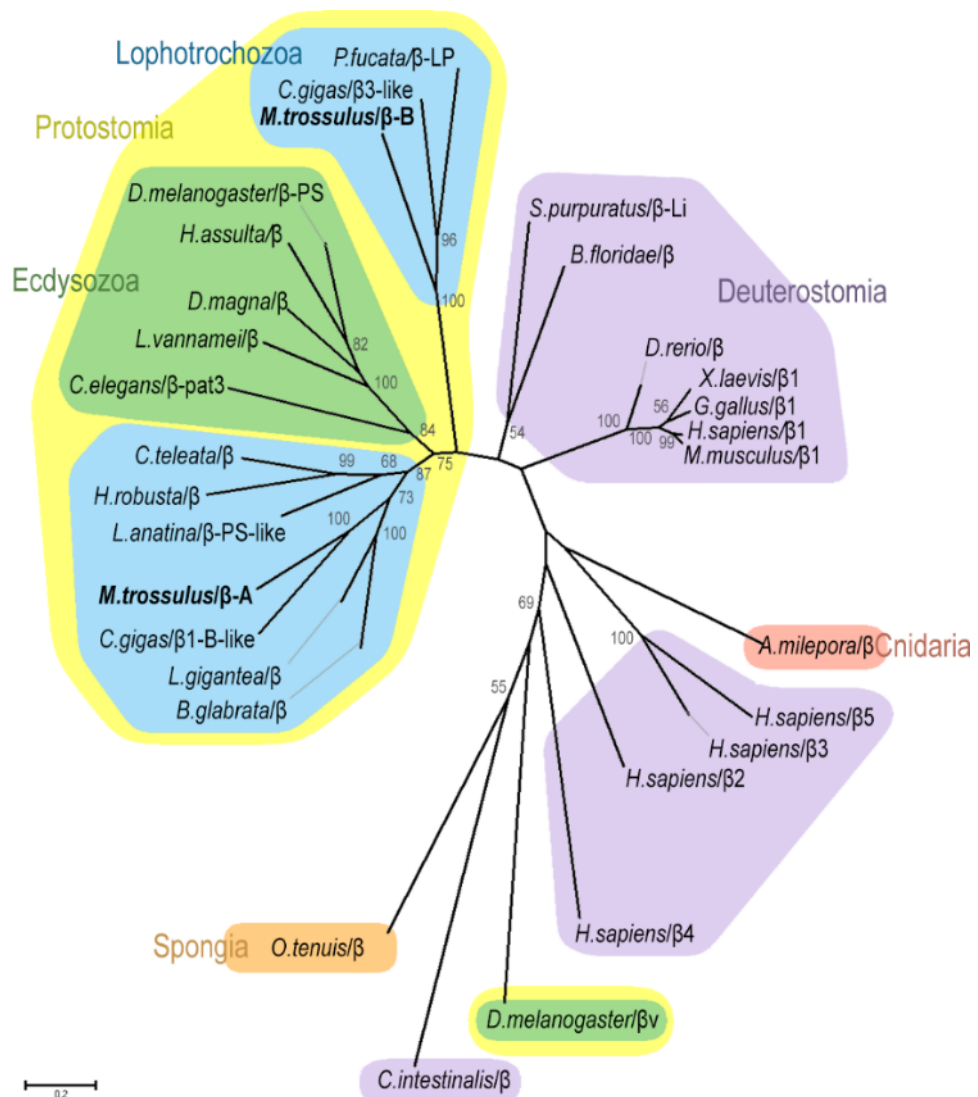
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ транскриптома мидии

В транскриптоме мидии обнаружено четыре  $\beta$ -интегрин-подобных транскрипта (2834, 2858, 3534 и 3649 н.п.), являющиеся изоформами двух генов  $\beta$ -А и  $\beta$ -В. Изоформы  $\beta$ -А<sub>i1</sub> и  $\beta$ -А<sub>i2</sub> отличаются на одну вставку длиной в 24 н.п. в белок-кодирующей области. Вероятно, эти две изоформы представляют собой продукты альтернативного сплайсинга одного гена. Второй ген ( $\beta$ -В) представлен тоже двумя изоформами ( $\beta$ -В<sub>i1</sub> и  $\beta$ -В<sub>i2</sub>), но отличающимися небольшими вставками в белок-некодирующей области. Не исключено, что существование этих двух изоформ является следствием аллельного разнообразия гена  $\beta$ -В. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей  $\beta$ -интегрин-подобных-белков мидии и основных известных  $\beta$ -интегринов других животных, построенное с использованием метода максимального правдоподобия, представлено на рис. 1. Ранее этот метод был использован для анализа филогении известных интегринов (Knack et al., 2008).

По нашим оценкам, размер генома мидии охватывает около 25 тысяч генов, что очень близко к размеру генома устрицы – 23–28 тысяч генов (Takeuchi et al., 2012). Наибольший уровень сходства выявлен для интегрин-подобного белка  $\beta$ -А мидии и  $\beta$ 1-интегрин-подобного белка устрицы *C. gigas* (70% сходства), тогда как интегрин-подобный белок  $\beta$ -В мидии имеет 62% сходства с  $\beta$ 3-интегрин-подобным белком устрицы *C. gigas*. Сходство последовательностей  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии  $\beta$ -А и  $\beta$ -В с последовательностью  $\beta$ 1-интегрин человека составило 61 и 53% соответственно (Табл.1).

На рис. 2 представлены результаты оценки количественной экспрессии (в ФРКМ) генов  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии в личинках, в органах и клетках взрослых моллюсков. Для транскрипта  $\beta$ -А<sub>i1</sub> характерен высокий уровень экспрессии в личинках мидии на всех стадиях развития до стадии трохофоры, но позже, на стадии велигера, уровень экспрессии этого транскрипта значительно снижается, оставаясь на низком уровне во всех тестируемых органах взрослых моллюсков, но относительно высокий уровень экспрессии этого транскрипта был обнаружен в гемоцитах. Другой транскрипт,  $\beta$ -А<sub>i2</sub>, экспрессируется только со стадии трохофоры 17 ч до стадии велигера 55 ч, однако уровень его экспрессии значительно ниже, чем уровень  $\beta$ -А<sub>i1</sub>. В отличие от транскриптов гена  $\beta$ -А, обе изоформы транскрипта  $\beta$ -В имеют очень низкий уровень экспрессии в личинках мидии, но высокий уровень экспрессии в гемоцитах взрослых мидий.



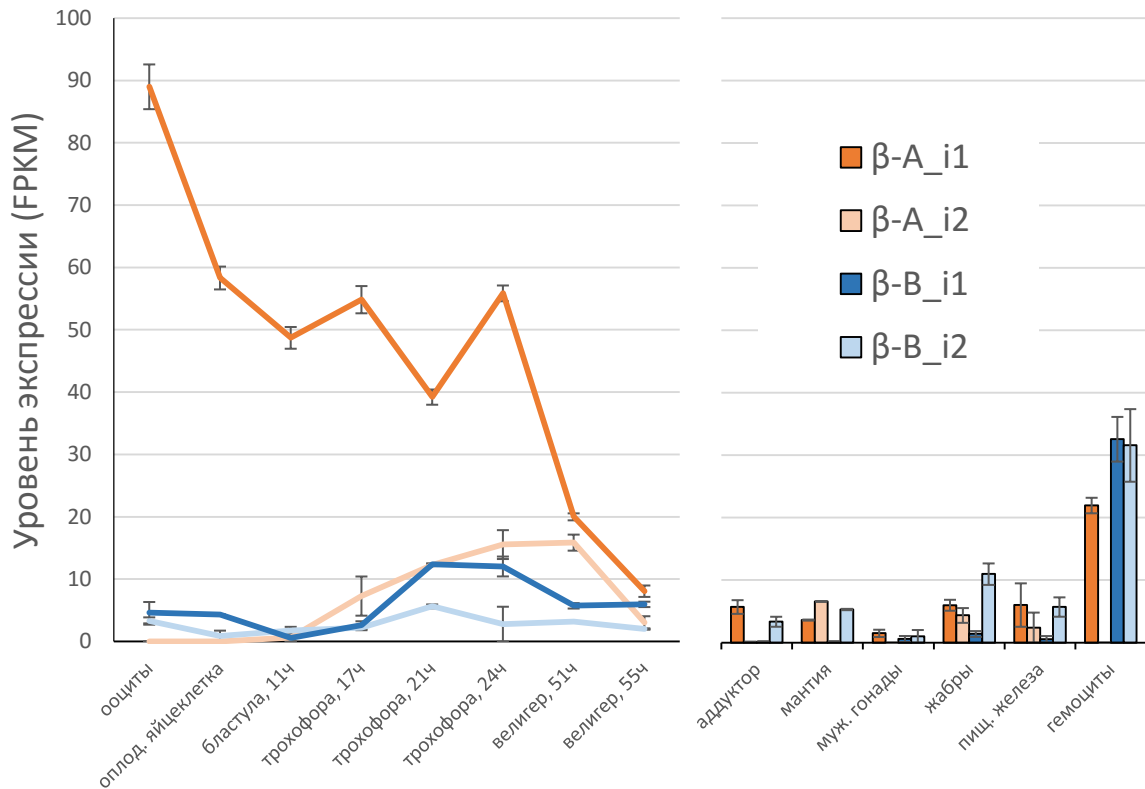
**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, показывающее отношения сходства между последовательностями β-интегрин-подобных белков у различных животных, реконструированное с помощью метода ML по данным GenBank: *C. gigas*/ β3-like (XP\_011453738.1), β1-B-like (XP\_011419533.1), *Lingula anatina*/β-PS-like (XP\_013415842.1), *Homo sapiens*/ β5 (NP\_002204.2); SwissProt: *Xenopus laevis*/ β1 (P12606|ITB1A\_XENLA), *Gallus gallus*/ β1 (P07228|ITB1\_CHICK), *Homo sapiens*/ β1 (P05556|ITB1\_HUMAN), β3 (P05106|ITB3\_HUMAN), β2 (P05107|ITB2\_HUMAN), β4 (P16144|ITB4\_HUMAN), *Mus musculus*/ β1 (P09055|ITB1\_MOUSE), *Drosophila melanogaster*/ βv (Q27591|ITBN\_DROME), β-PS (P11584|ITBX\_DROME), *Caenorhabditis elegans*/ β-pat3 (Q27874|PAT3\_CAEEL); и TrEMBL: *Strongylocentrotus purpuratus*/ β-Li (W4YJP5\_STRPU), *Branchiostoma floridae*/ β (C3Y4C2\_BRAFL), *Danio rerio*/ β (Q3YAA0\_DANRE), *Acropora millepora*/ β (O17494\_ACRMI), *Ciona intestinalis*/ β (F6XBP2\_CIOIN), *Ophlitaspongia tenuis*/ β (O18482\_9METZ), *Biomphalaria glabrata*/ β (O96444\_BIOGL), *Lottia gigantea*/ β (V4AU86\_LOTGI), *Helobdella robusta*/ β (T1E1Y7\_HELRO), *Capitella teleata*/ β (X2BBV3\_CAPTE), *Litopena eusvannamei*/ β (D1MCA9\_LITVA), *Daphnia magna*/ β (A0A0P5IU01\_9CRUS), *Helicoverpa assulta*/ β (A0A023UG44\_HELAU), *Pinctada fucata*/ β-LP (G9JKY4\_PINFU).

**Таблица 1.** Результаты сравнения аминокислотных последовательностей гомологов  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии *M. trossulus* и других животных. Определение % сходства (верхнее число) и % идентичности (нижнее число).

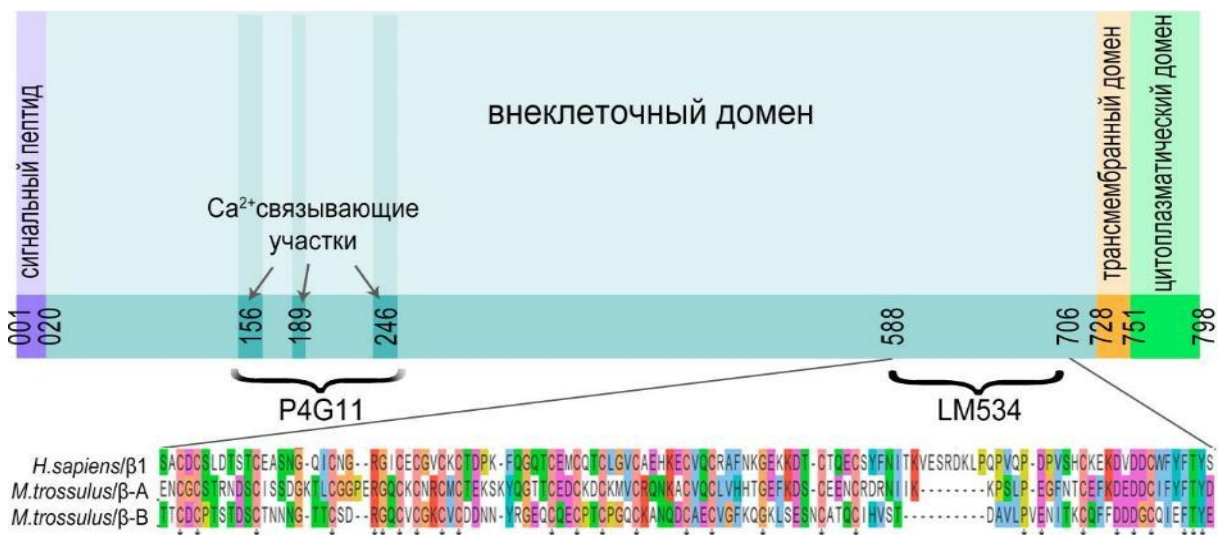
<i>Mytilus trossulus</i>	<i>Crassostrea gigas</i> / $\beta 1$	<i>Crassostrea gigas</i> / $\beta 3$	<i>Biomphalaria glabrata</i> / $\beta$	<i>Caenorhabditis elegans</i> / $\beta$ -Pat3	<i>Drosophila melanogaster</i> / $\beta$ -PS	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> / $\beta$ -Gi	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> / $\beta$ -Li	<i>Lingula anatina</i> / $\beta$ -PS-like	<i>Branchiostoma floridae</i> / $\beta$	<i>Homo sapiens</i> / $\beta 1$
$\beta$ -A	70	52	64	61	67	61	58	68	60	61
	54	33	50	44	50	44	40	52	41	45
$\beta$ -B	54	62	52	52	54	53	51	57	52	53
	38	46	35	36	34	36	34	39	35	36

### Специфичность используемых антител. Вестерн-блот анализ

Для выяснения локализации интегринов были использованы два клона моноклональных антител мыши к внеклеточному домену субъединицы  $\beta 1$ -интегрина человека – P4G11 и LM534, которые распознают два различных эпитопа внеклеточного домена этого интегрин (рис. 3). В отличие от консервативных цитоплазматических и трансмембранных доменов, последовательность внеклеточных доменов  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии, на долю которой приходится 80–90% молекулы, совпадает только в нескольких консервативных участках. Сходство между последовательностью, распознаваемой антителами, и соответствующими участками  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии составляет всего 58 и 52% для  $\beta$ -A и  $\beta$ -B соответственно. Несмотря на это, специфическое связывание с антителами, вероятно, осуществляется за счет определенной вторичной структуры участков, которые содержат 18 цистеиновых остатков. Однако мы не можем с уверенностью сказать, с продуктом какого транскрипта связываются антитела.



**Рис. 2.** Количественная экспрессия генов  $\beta$ -интегрин-подобных транскриптов мидии в личинках, а также в органах и клетках взрослых мидий. Результаты нормализованы относительно уровня экспрессии гена фактора элонгации EF1 $\alpha$ . Представлены усредненные значения для данных, полученных на секвенаторах MiSeq и HiSeq,  $\pm$  отклонение от среднего.



**Рис. 3.** Топография белковой цепи  $\beta 1$ -субъединицы интегрина человека. Цифрами обозначены положения аминокислотных остатков. Отмечены участки, распознаваемые клоном P4G11 и LM534 (Chemicon) (схема нарисована на основе данных сайта: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05556>). Под схемой: выравнивание участка  $\beta 1$ -интегрина человека, распознаваемого клоном антител LM534, и гомологичных участков  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии.

Специфичность клона антител LM534 была показана с помощью вестерн-блот анализа (рис. 4): антитела выявляли на мембранах полосу, соответствующую белку с молекулярным весом около 110 кДа в лизатах гемоцитов, пищеварительной железы и велигеров, 56 ч.

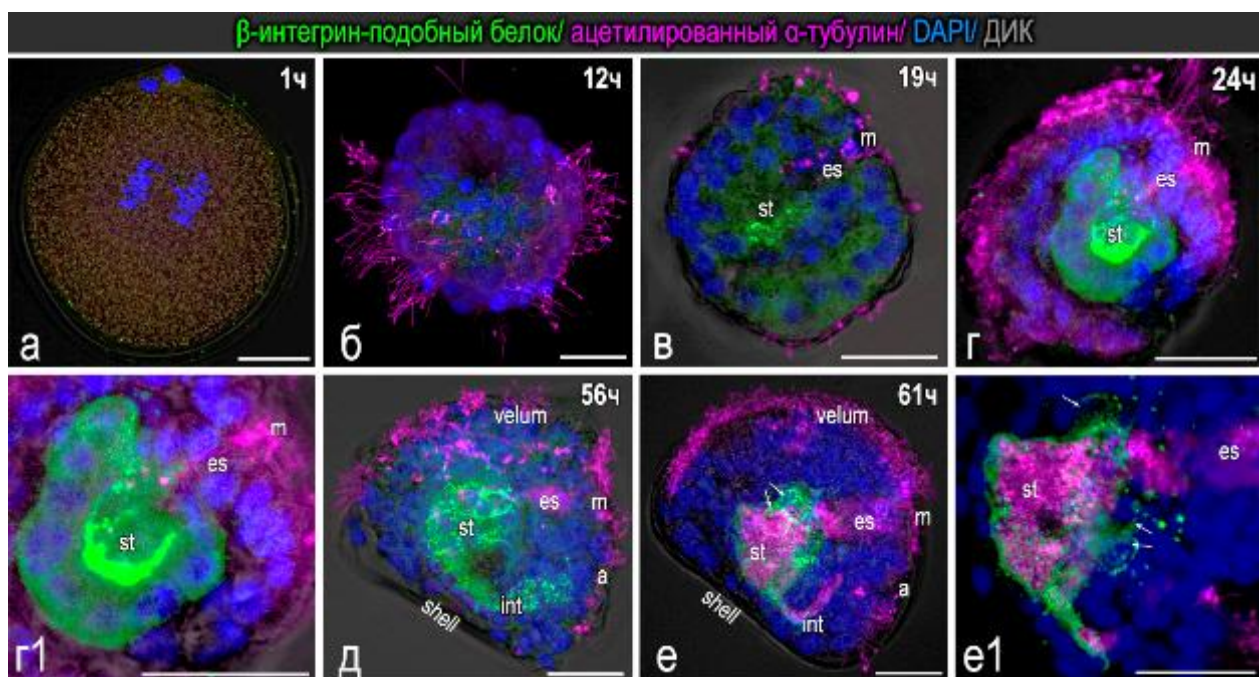


**Рис. 4.** Вестерн-блот анализ тотальных лизатов оплодотворенных яйцеклеток и личинок мидии *M. trossulus* (а), а также органов и клеток взрослых моллюсков (б) с использованием моноклональных антител к  $\beta 1$  интегрину человека (клон LM534) (верхняя панель). Актин (клон С4/МАВ 1501) использован как контроль нагрузки по белку в препаратах (нижняя панель).

#### Распределение $\beta$ -интегрин-подобного белка в процессе личиночного развития и в культуре клеток

Чтобы проанализировать распределение  $\beta$ -интегрин-подобного белка в процессе развития мидии, мы исследовали его появление от стадии зиготы до стадии позднего велигера. Первые клетки, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, появлялись в зачатке пищеварительного тракта только на стадии ранней трохофоры примерно в 5–10% исследованных личинок (19 ч, рис. 5 б). На стадии средней трохофоры (24 ч)  $\beta$ -интегрин-подобный белок встречается в эпителиальных клетках образующегося желудка у примерно 20–30% личинок из тестируемой культуры и образует цветок-подобную структуру в просвете желудка (рис. 5 г, вставка на большем увеличении г1). В ходе дальнейшего развития количество клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, увеличивалось, и на стадии поздней трохофоры такие клетки были расположены в один слой, формируя внутреннюю выстилку желудка. На стадии велигера окраска на интегрин становится особенно заметной в стенках желудка (рис. 5 д) и имеет поляризованное распределение с максимальной интенсивностью в апикальной части клеток пищеварительного тракта. Просвет желудка личинки покрыт мерцательным эпителием с многочисленными микроворсинками и ресничками (рис. 5 е1).

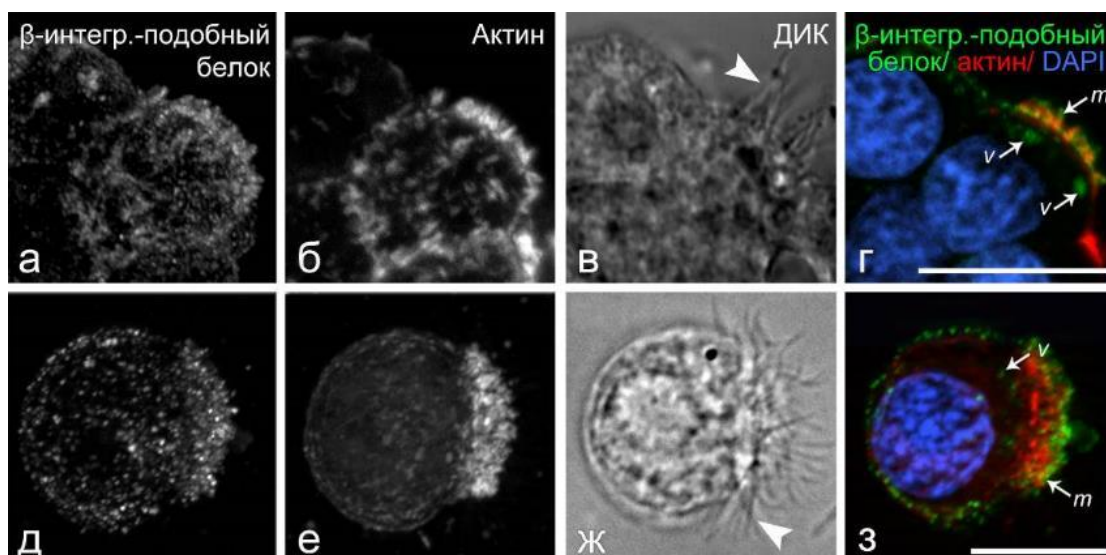




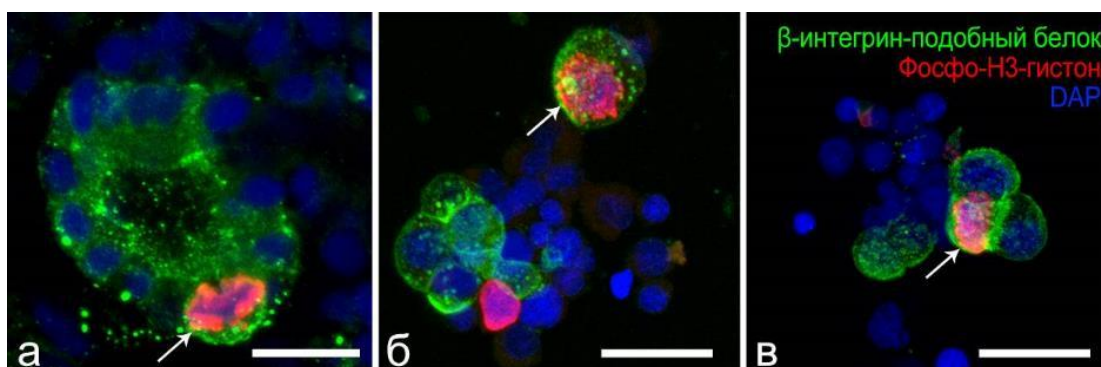
**Рис. 5.** Появление  $\beta$ -интегрин-подобного белка в раннем развитии личинок мидии *M. trossulus*. Иммунодетекция  $\beta$ -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и ресничек (маджента). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стадии развития: зигота (а), бластула (б), ранняя трохофора 19 ч (в), средняя трохофора 24 ч (г, г1), средний велигер 56 ч (д) и поздний велигер 61 ч (е, е1). Обозначения: *es* – пищевод, *m* – рот, *shell* – раковина, *st* – желудок, *velum* – вельюм, *int* – кишечник, *a* – анальное отверстие. Масштабная линейка 20 мкм (а–е), 10 мкм (г1, е1).

В первичной культуре клеток личинок мидии  $\beta$ -интегрин-подобный белок был обнаружен в мембранах эпителиоцитов (рис. 6). Во многих случаях характерно полярное распределение  $\beta$ -интегрин-подобного белка, совпадающее с распределением филаментного актина цитоскелета и с положением ресничного полюса в этих клетках (рис. 6 д–з).

Чтобы оценить способность клеток личинок мидии, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, к пролиферации, была использована окраска антителами к фосфо-Н3-гистону и  $\beta$ 1-интегрину (рис. 7). В некоторых случаях клетки пищеварительной системы, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, были способны к митотическому делению (рис. 7 а, отмечены стрелками). Эти данные указывают на факт пролиферации клеток пищеварительной системы личинок мидии, а также на способность клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, к пролиферации. Более того,  $\beta$ -интегрин-позитивные клетки мидии были способны к пролиферации и в культуре. Делящиеся клетки были обнаружены на различных субстратах в первые три дня культивирования, однако клетки, в которых одновременно присутствовала окраска на интегрин и фосфо-Н3-гистон, встречались довольно редко – это были единичные клетки (рис. 7 б, в).

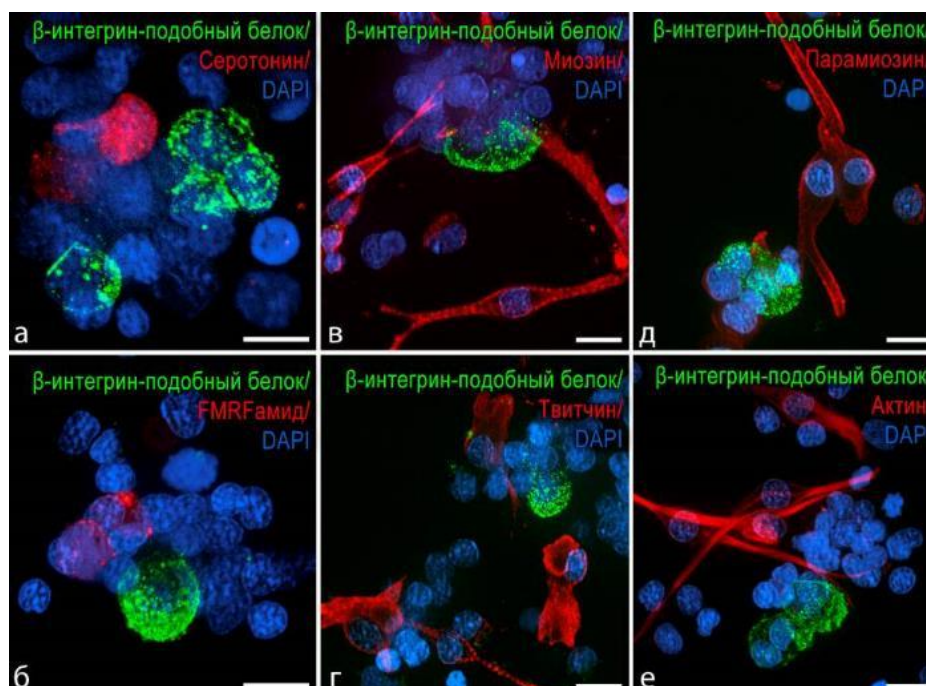


**Рис. 6.** Иммунодетекция  $\beta$ -интегрин-подобного белка (а, д) и филаментного актина (б, е) в клетках личинок мидии *M. trossulus*, культивированных 24 ч на фибронектине (а–г) и на ламинине (д–з). Визуализация клеток методом ДИК (в, ж) – стрелками обозначены реснички; совмещенные изображения отдельных оптических срезов (г, з). Ядра окрашены DAPI. Обозначения: *v* – вакуоли, *m* – микроворсинки. Масштабная линейка 10 мкм.



**Рис. 7.** Иммунодетекция клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, (зеленый цвет) и митотических (фосфо-Н3-гистон-позитивных) клеток (красный цвет) в формирующейся пищеварительной системе личинок мидии *M. trossulus* (а, оптический срез желудка велигера) и в культуре клеток личинок мидии, культивированных на ламинине (б) и фибронектине (в) в течение 24 ч. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стрелками обозначены делящиеся клетки, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок. Масштабная линейка 10 мкм.

Так же, как и в экспериментах *in vivo*, в условиях культуры не было выявлено со-локализации  $\beta$ -интегрин-подобного белка с маркерами нейрональной или мышечной дифференцировки. Ни нейрональные (серотонин-позитивные) (рис. 8 а, б), ни мышечные (миозин-позитивные) (рис. 8 в–е) клетки не экспрессировали  $\beta$ -интегрин-подобный белок.



**Рис. 8.** Одновременное выявление  $\beta$ -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и маркеров нейрональной (а, б) или миогенной дифференцировки (в–е) (красный цвет) в культуре клеток личинок мидии *M. trossulus*. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 10 мкм.

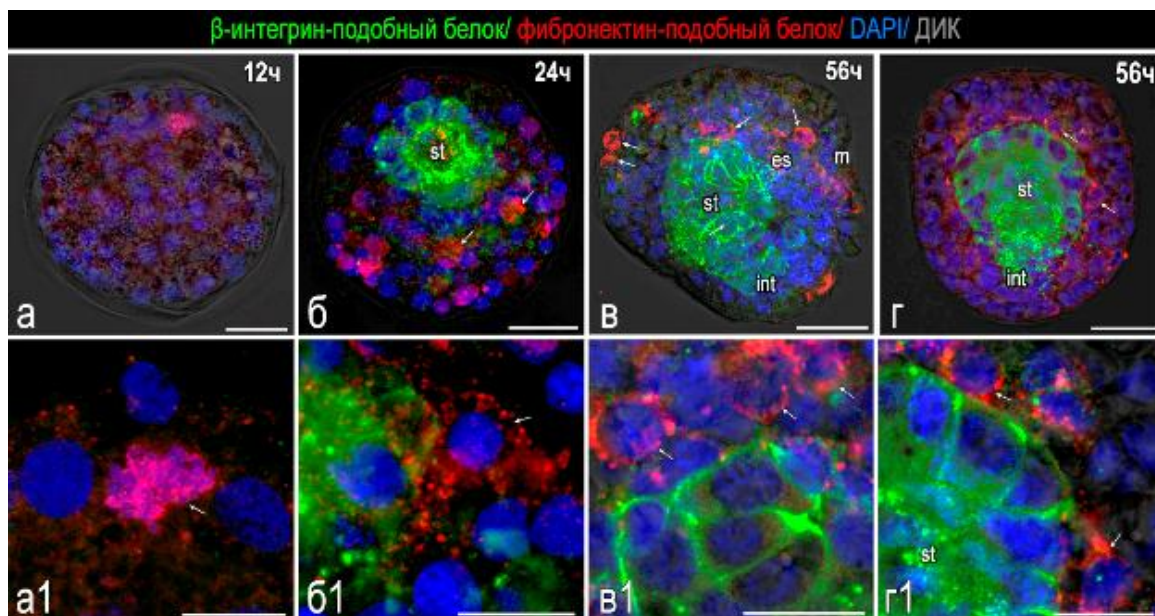
### Исследование лигандной специфичности $\beta$ -интегрин-подобного белка в процессе развития личинок и в культивируемых гемоцитах мидии *M. trossulus*

У позвоночных одним из лигандов  $\beta 1$ -интегринов является фибронектин. В процессе развития личинок мидии *M. trossulus* пространственно-временные паттерны экспрессии  $\beta$ -интегрин-подобного белка и его предполагаемых лигандов, фибронектин-подобных белков, не совпадают (рис. 9). Первые фибронектин-позитивные клетки появились на стадии бластулы, хотя они были видны только в одной из 25–30 проверенных личинок. Позже фибронектин-позитивные клетки были обнаружены во всех личинках на стадии трохофоры, где они были хаотически разбросаны в личинке. На стадии велигера их расположение заметно отличалось от расположения клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок.

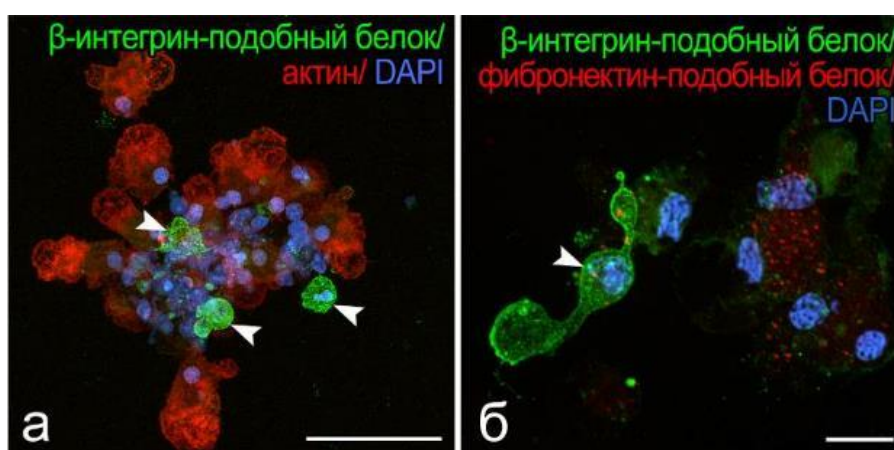
В гемолимфе двустворчатых моллюсков представлено несколько типов гемоцитов, которые выполняют разнообразные функции (Carballal et al., 1997; Beninger et al., 2003). Для того чтобы выяснить, существуют ли популяции гемоцитов мидий, в которых одновременно экспрессируется  $\beta$ -интегрин-подобный белок и фибронектин-подобный белок, мы провели ряд дополнительных экспериментов по двойному иммуноокрашиванию изолированных и культивированных в течение суток гемоцитов. Присутствие различных популяций гемоцитов подтверждают как одновременная окраска гемоцитов антителами к  $\beta 1$ -интегрину (стрелки) и фаллоидином для детекции актина (рис. 10 а), так и



одновременная окраска гемоцитов антителами к  $\beta$ 1-интегрину и фибронектину (рис. 10 б): в одних популяциях гемоцитов экспрессируется  $\beta$ -интегрин-подобный белок, а в других – только фибронектин-подобный белок. Не исключено отсутствие взаимодействия между этими белками на определенных стадиях онтогенеза мидии, в отличие от сходных белков у млекопитающих.

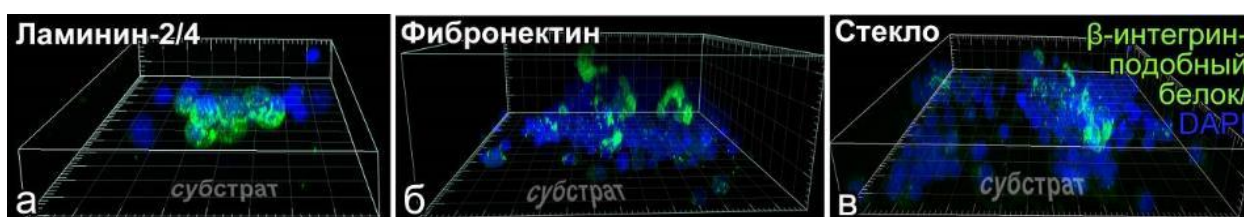


**Рис. 9.** Иммунодетекция  $\beta$ -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и фибронектин-подобного белка (красный цвет) в процессе развития личинок мидии *M. trossulus*. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стадии развития: бластула 12 ч (а, а1), трохофора 24 ч (б, б1), велигер 56 ч (в, в1 – сагитальный вид, г, г1 – отдельный оптический). Обозначения: *es* – пищевод, *m* – рот, *shell* – раковина, *st* – желудок, стрелки – фибронектин-позитивные клетки. Масштабная линейка 20 мкм (а–г), 10 мкм (а1, б1, в1, г1).



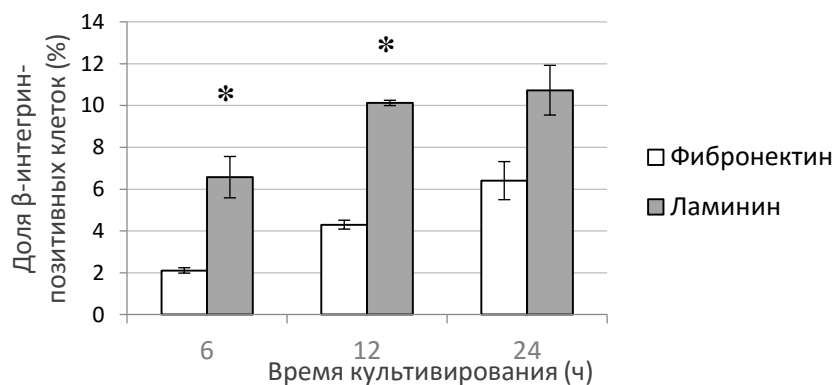
**Рис. 10.** Выявление  $\beta$ -интегрин-подобного белка (а, б, стрелки), фибриллярного актина (а) и фибронектин-подобного белка (б) в гемоцитах мидии *M. trossulus*, культивированных в течение 24 ч на: а – коллагене, б – стекле. Масштабная линейка 20 мкм (а), 10 мкм (б).

Для исследования лигандной специфичности  $\beta$ -интегрин-подобного белка в условиях *in vitro* клетки культивировали на покровных стеклах, покрытых различными субстратами. Трехмерная реконструкция подтвердила, что только на ламинине клетки, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, образовывали небольшие однослойные группы, находящиеся непосредственно на поверхности субстрата (рис. 11 а). На других субстратах эти клетки были близко расположены друг другу, но прямо не прикреплялись к субстрату (рис. 11 б, в), что может указывать на отсутствие взаимодействия между клетками, экспрессирующими  $\beta$ -интегрин-подобный белок, и субстратом.



**Рис. 11.** Трехмерная реконструкция агрегатов клеток личинок мидии *M. trossulus*, культивируемых на ламинине 2/4 (а), фибронектине (б) и стекле (в) в течение 24 ч. Детекция  $\beta$ -интегрин-подобного белка (зеленый цвет), ядра окрашены DAPI (синий цвет). Нижняя сетка примерно соответствует плоскости субстрата.

Количество клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, постепенно возрастало в процессе культивирования (рис. 12). На ламинине оно практически удваивалось в период с 6 ч культивирования до 24 ч (до 10–11%) и оставалось на одном и том же уровне в течение недели (данные не показаны).



**Рис. 12.** Динамика появления клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, в культуре клеток личинок мидии *M. trossulus*, культивируемых на фибронектине и ламинине-2/4. Представлены средние значения  $\pm$  величины стандартных отклонений; звездочкой отмечен уровень значимости отличий ( $p < 0,05$ ) относительно количества  $\beta$ -интегрин-позитивных клеток, культивируемых на фибронектине.

На фибронектине количество этих клеток было примерно в два раза меньше. Ламинин является одним из ключевых компонентов базальных мембран эпителиев. У дрозофилы бета-PS-интегрин-позитивные клетки эпителия кишечника личинок формировали эпителиоподобные кластеры именно на ламинине, а не на фибронектине (Gullberg et al., 1994).

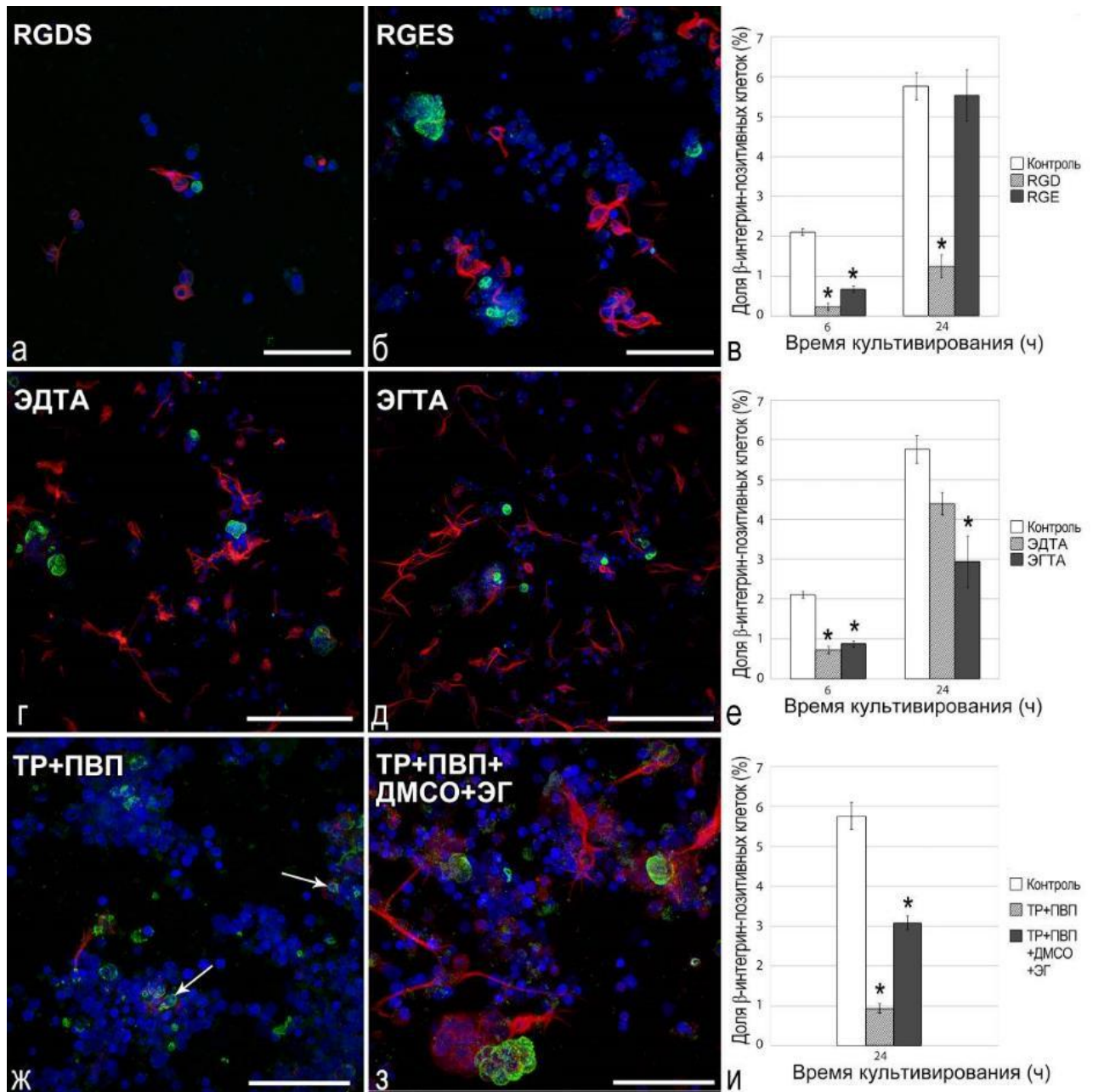
### **Распределение $\beta$ -интегрин-подобного белка в условиях воздействия факторов, нарушающих адгезию**

Нарушения адгезии, происходящие в клетках морских беспозвоночных, связаны с действием многих факторов. Мы провели несколько тестов, сравнивая нарушения, вызванные факторами, влияющими на адгезию клеток личинок мидии: интегрин-блокирующего RGDS-пептида, хелатирующих агентов ЭДТА и ЭГТА, и криоконсервации (рис. 13).

В первой группе экспериментов по клеточной адгезии были использованы интегрин-блокирующий RGDS-пептид и неспецифичный RGE8-пептид (рис. 13 а–в). Количество клеток мидии, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, при культивировании в присутствии RGDS-пептида уменьшалось в 4–6 раз (в зависимости от времени культивирования).

Во второй серии экспериментов мы анализировали воздействие  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелаторов (рис. 13 г–е). После их воздействия (5 мМ) количество  $\beta$ -интегрин-положительных клеток также уменьшалось – через 6 ч оно было более чем в 2 раза меньше количества таких клеток в контрольной культуре. Наибольший ингибирующий эффект был зарегистрирован для ЭГТА. Анализ нарушений клеточной адгезии показал, что культивирование в присутствии ЭДТА и ЭГТА не приводило ни к изменению формы культивируемых клеток, ни к изменению степени их распластывания.

В третьей серии экспериментов мы протестировали изменения цитоскелета и связанных с ним белков в клетках личинок мидии до и после замораживания в жидком азоте (рис. 13 ж–и). Количество клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, было максимальным в контрольных (незамороженных) культурах, тогда как количество таких клеток в экспериментальных культурах значительно зависело от используемых криопротекторов. Многочисленные распластанные (вероятно, мышечные) клетки и округлые клетки, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, были обнаружены в контрольных культурах и в культурах, замороженных в присутствии смеси проникающих (диметилсульфоксид, ДМСО, и этиленгликоль, ЭГ) и непроникающих (трегалоза, ТР, и поливинилпироллидон, ПВП) криопротекторов. В противоположность этому, в культурах, замороженных только в присутствии непроникающих криопротекторов, после оттаивания было характерно почти полное отсутствие распластанных клеток.



**Рис. 13.** Распределение  $\beta$ -интегрин-подобного белка в условиях воздействия факторов, нарушающих адгезию: после культивирования с RGDS-пептидом (RGES-пептид использован в качестве контроля) (а–в), с  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелаторами (5 мМ) (г–е), после криоконсервации (ж–и). Клетки были мечены антителами к  $\beta 1$ -интегрину (зеленый цвет) и фаллоидином для детекции актина (красный). Ядра (синие) окрашены DAPI. Масштабная линейка 50 мкм. На графиках представлены средние значения  $\pm$  величины стандартных отклонений; звездочкой отмечен уровень значимости отличий ( $p < 0,05$ ) относительно количества  $\beta$ -интегрин-позитивных клеток в контрольной культуре.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы идентифицировали в транскриптоме мидии *M. trossulus* четыре полноразмерных транскрипта, кодирующих последовательности, гомологичные  $\beta$ -интегринам, и определили экспрессию генов этих белков на различных стадиях личиночного развития и в некоторых органах и клетках взрослых моллюсков. Установлена высокая степень сходства  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии с их гомологами среди интегринов устрицы. Все 56 цистеиновых остатков, присутствие которых характерно для внеклеточных доменов  $\beta$ -субъединиц интегринов позвоночных, присутствуют во внеклеточных доменах  $\beta$ -интегрин-подобных белков мидии. Наличие аннотированных геномов позволит в будущем провести комплексную оценку транскриптома мидий, для которых установлены и альтернативный сплайсинг, и аллельное разнообразие, и присутствие паралогов (Mosquera et al., 2003).

В этом исследовании мы использовали антитела к  $\beta 1$ -интегрину и фибронектину человека, но показали специфичность используемых клонов антител. В наших экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* обнаружено, что  $\beta$ -интегрин-подобный белок отсутствует в нервных и мышечных клетках мидии (в отличие от подобных клеток позвоночных), но появляется в формирующейся пищеварительной системе личинок. Учитывая, что  $\beta$ -интегрин-подобный белок обнаружен в пищеварительном эпителии личинок после стадии трохофоры, мы предполагаем, что этот белок может участвовать в организации эпителиальных клеточных слоев в процессе образования органов. Главный результат настоящего исследования – доказательство того, что  $\beta$ -интегрин-подобный белок появляется одновременно с развитием пищеварительной системы личинок мидии и, возможно, может быть использован как потенциальный маркер клеток пищеварительного тракта личинок двустворчатых моллюсков, в частности, мидии. Некоторые клетки пищеварительной системы, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, содержат многочисленные реснички и образуют эпителиоподобные структуры в культуре. Способность  $\beta$ -интегрин-позитивных клеток к пролиферации в составе однослойного мерцательного эпителия желудка личинок и в культуре клеток указывает на их возможное участие в росте и регенерации пищеварительного эпителия мидии. В процессе развития личинок мидии установлено появление фибронектин-подобных белков на стадии бластулы, тогда как  $\beta$ -интегрин-подобный белок появляется позже, на стадии велигера, когда все личинки начинают питаться.

При стрессовых ситуациях происходит уменьшение доли клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок, и также изменяется распределение интегрин-подобных молекул. Оценка этих изменений может быть использована как критерий состояния клеток после внешних воздействий.

Эти результаты помогут выяснить возможные функции  $\beta$ -интегрин-подобного белка у моллюсков и могут стать основой для сравнительного анализа функций интегриновых рецепторов у позвоночных и беспозвоночных животных.

## ВЫВОДЫ

1. В транскриптоме мидии *Mytilus trossulus* обнаружено четыре полноразмерных транскрипта  $\beta$ -интегрин-подобных белков, которые являются изоформами двух генов. Установлена высокая степень их сходства с интегринами различных видов моллюсков. Экспрессия одного из этих генов ( $\beta$ -А) связана с ранними стадиями развития, а экспрессия второго гена ( $\beta$ -В), в основном, характерна для гемоцитов.
2. В развитии мидии  $\beta$ -интегрин-подобный белок появляется на стадии ранней трохофоры, и его появление связано с развитием пищеварительной системы личинок, но не коррелирует с развитием нервной и мышечной систем. Некоторые эпителиоциты, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, содержат многочисленные реснички и сохраняют способность к митотическому делению как в личинках, так и в культуре клеток.
3. Пространственно-временные паттерны экспрессии  $\beta$ -интегрин-подобного белка и его предполагаемых лигандов, фибронектин-подобных белков, не совпадают: фибронектин-подобные белки появляются намного раньше в развитии мидии и экспрессируются в других типах клеток личинок мидии, также, как и в других типах гемоцитов, отличных от гемоцитов, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок.
4. Клетки личинок мидии, экспрессирующие  $\beta$ -интегрин-подобный белок, обладают различной избирательностью к субстратам. На ламинине происходит селективное прикрепление этих клеток; прямого связывания с другими компонентами внеклеточного матрикса не обнаружено.
5. Нарушения адгезии клеток моллюсков, вызванные специфическими и неспецифическими агентами, приводят к изменениям в количестве и распределении клеток, экспрессирующих  $\beta$ -интегрин-подобный белок.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*****Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:***

1. Maiorova M.A., Odintsova N.A.  $\beta$  integrin-like protein-mediated adhesion and its disturbances during cell cultivation of the mussel *Mytilus trossulus* // Cell Tissue Research. 2015. V. 361, № 2. P. 581–592.
2. Dyachuk V.A., Maiorova M.A., Odintsova N.A. Identification of  $\beta$  integrin-like- and fibronectin-like proteins in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus* // Development, Growth and Differentiation. 2015. V. 57, № 7. P. 515–528.
3. Maiorova M.A., Odintsova N.A. Proliferative potential of larval cells of the mussel *Mytilus trossulus* and their capacity to differentiate into myogenic cells in culture // Russian Journal of Marine Biology. 2016. V. 42, № 3. P. 281–285.

***Работы в сборниках трудов и материалах конференций:***

4. Майорова М.А., Одинцова Н.А. Роль некоторых классов интегриновых рецепторов и связанных с ними белков внеклеточного матрикса в регуляции дифференцировки и пролиферации клеток личинок моллюсков в культуре // Материалы Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург, 21–25 октября 2013 г. Цитология, 2013. Т. 55, № 9. С. 647.
5. Maiorova M.A., Dyachuk V.A., Odintsova N.A. Localization of  $\beta 1$  integrin and fibronectin during mussel development // Abstracts of the 5th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology (EED), July 22–25, 2014, Vienna, Austria. P. 337–338.
6. Maiorova M.A., Odintsova N.A. Proliferative potential and the capacity to myogenic differentiation of larval cells of the mussel *Mytilus trossulus* in culture // Abstracts of the International Conference «Cell cultures of marine and fresh-water animals», 2015, September 8–10, Marine Biological Station «Vostok», Vladivostok, Russia. P. 16.

Майорова Мария Андреевна

**БЕТА-ИНТЕГРИН-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ В ОНТОГЕНЕЗЕ  
МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук