

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

МАЙОРОВА МАРИЯ АНДРЕЕВНА

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Одинцова Нэлия Адольфовна

Владивосток – 2016

Список принятых сокращений

ББ – блокирующий буфер

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внеклеточный матрикс

СМFSS – искусственный раствор морской воды без Ca^{2+} и Mg^{2+}

ДИК – дифференциально интерференционный контраст

ДМСО – диметил сульфоксид (криопротектор)

ДСNa – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотриэтол

ИБМ – Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского

5НТ – серотонин (нейромедиатор)

L-15 – среда Лейбовича

м.м. – молекулярная масса

НКС – нормальная козья сыворотка

ПВП – поливинилпирролидон (непроникающий криопротектор)

ПФА – параформальдегид

RGD-последовательность – последовательность из трех аминокислот Arg-Gly-Asp

RGDS-пептид – интегрин-блокирующий тетрапептид (Arg-Gly-Asp-Ser)

RGES-пептид – неспецифичный контрольный тетрапептид (Arg-Gly-Glu-Ser)

S-фаза – синтетическая фаза митотического цикла

ТИБОХ – Тихоокеанский институт биоорганической химии

ТР – дисахарид трегалоза (непроникающий криопротектор)

ФБ – фосфатный буфер

Фб-подобные белки – фибронектин-подобные белки

ЭГ – этиленгликоль (криопротектор)

ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота, Ca^{2+} -хелатор

ЭДТА – этанолдиамин тетрауксусная кислота, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелатор

ЭСК – эмбриональная сыворотка коров

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Общая характеристика интегриновых рецепторов	12
1.2. Интегрины беспозвоночных животных.....	19
1.3. Характеристика некоторых адгезионных молекул	22
1.4. Маркеры мышечной и нейрональной дифференцировки у моллюсков	26
1.5. Маркеры пролиферации	28
1.6. Развитие личинок мидии <i>M. trossulus</i>	32
1.7. Клетки гемолимфы моллюсков	35
1.8. Культура клеток личинок мидии.....	35
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Животные.....	42
2.2. Первичные культуры клеток мидии.....	42
2.3. Выделение РНК.....	44
2.4. Секвенирование.....	45
2.5. Сборка транскриптома	46
2.6. Анализ белковых последовательностей β -интегрин-подобных белков различных животных.....	47
2.7. Исследование адгезионных клеток	49
2.8. Характеристика используемых антител	50
2.9. Вестерн-блот анализ	52
2.10. Иммунохимическая окраска клеток <i>in vivo</i>	55
2.11. Иммунохимическая окраска клеток <i>in vitro</i>	55
2.12. Микроскопия и обработка изображений	56
2.13. Статистическая обработка данных.....	57
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	58
3.1. Выявление гомологов β -интегрин-подобных белков у мидии.....	58
3.2. Специфичность используемых антител. Вестерн-блот анализ	67

3.3. Распределение β -интегрин-подобного белка в процессе личиночного развития.....	69
3.4. Динамика экспрессии и распределения фибронектин-подобного белка в процессе развития личинок.....	73
3.5. Распределение β -интегрин-подобного белка, актина и фибронектин-подобного белка в культивируемых гемоцитах мидии.....	76
3.6. Распределение β -интегрин-подобного белка в культивируемых клетках личинок	78
3.7. Типы дифференцировки в культуре клеток личинок мидии.....	82
3.8. Миогенная и нейрональная дифференцировка в культуре клеток.....	82
3.9. Выявление β -интегрин-подобного белка в ресничных эпителиальных клетках личинок мидии	82
3.10.Пролиферация в культуре клеток личинок	84
3.11.Распределение β -интегрин-подобного белка в условиях воздействия факторов, нарушающих адгезию.....	88
ОБСУЖДЕНИЕ	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

ВВЕДЕНИЕ

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 α - и β -субъединиц (Hynes, 1992, 2012). Интегрин $\beta 1$ является наиболее консервативным и, вероятно, может быть общим предком для всех β -субъединиц интегринов позвоночных (Ewan et al., 2005).

Мы сконцентрировали наше внимание именно на β -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 β 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, β -интегрин-подобных белков, в онтогенезе мидии *M. trossulus*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести поиск гомологов β -интегрина в транскриптоме мидии *M. trossulus* и сравнить найденные последовательности с другими известными β -интегринами различных организмов. Оценить количественную экспрессию генов гомологов β -интегринов на разных стадиях развития личинок мидии и в некоторых органах и клетках взрослых мидий.

2. Исследовать экспрессию β -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 β -интегрин-подобный белок, *in vivo* и *in vitro*.

4. Определить возможные лиганды β -интегрин-подобного белка в личинках мидии и в культуре клеток.

5. Проанализировать распределение β -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 β -интегринам, в транскриптом мидии *M. trossulus*. Обнаружено, что клетки личинок мидии, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, появляются по мере развития пищеварительной системы личинок. Представлены доказательства того, что в культуре такие клетки обладают различной избирательностью к субстратам. На ламинине происходит их селективное прикрепление, тогда как на других субстратах селективного взаимодействия β -интегрин-иммунопозитивных клеток с субстратом не обнаружено. Сделано предположение, что развитие эпителиоподобной дифференцировки культивируемых клеток личинок мидии происходит селективно на ламинине с участием β -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 β -интегрин-подобного белка.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты важны для понимания роли рецепторов адгезии в эмбриональном и личиночном развитии беспозвоночных животных. Проведенная оценка количественной экспрессии генов гомологов β -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 ранними стадиями развития, либо с гемоцитами. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей β -интегрин-подобных белков позвоночных и беспозвоночных животных позволил установить родственные связи между гомологами β -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 β -интегрин-подобный белок, может быть полезной при анализе различных патологий у моллюсков, вызываемых факторами, влияющими на адгезию их клеток.

Полученные данные расширяют и углубляют наши представления об участии рецепторов адгезии в эмбриональном и личиночном развитии беспозвоночных животных. Они включены в спецкурс «Биотехнология морских организмов» для студентов биологических специальностей Дальневосточного федерального университета и могут быть рекомендованы для других курсов по клеточной биологии и биологии развития.

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 иммуоцитохимии. 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 ДВО РАН.

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. Специфичность используемых антител для клеток мидии *M. trossulus* для выявления β -интегрин-подобного и фибронектин-подобного белков была показана нами с помощью Вестерн-блот анализа. Установленная специфичность антител для антигенов двустворчатых моллюсков дает возможность использовать протестированные клоны для дальнейшего изучения этих белков. Для того чтобы проследить за формированием нервной и мышечной систем были использованы антитела к маркерам нейрональной (серотонин и FMRF-амид) и миогенной (миозин, парамиозин, актин) дифференцировки, а α -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). Иммуоцитохимические препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) Дальневосточного центра электронной микроскопии при ИБМ ДВО РАН. Полученные изображения преобразовывали в стандартный формат изображения TIFF. На основе серий

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

Степень достоверности результатов. О достоверности результатов проведенных экспериментов свидетельствует их воспроизводимость, использование современных методов исследования, корректный анализ полученных данных, публикации результатов работы в рецензируемых журналах. 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^{-ом} 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. В этих статьях и в материалах конференций представлены основные результаты исследований.

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-И-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-И-6-005 о).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Факторы роста и их рецепторы представляют обширную группу белков, которые обнаружены у всех многоклеточных. Эти молекулы в комплексе с белками ВКМ регулируют основные клеточные процессы, такие как адгезия, миграция, выживаемость, пролиферация и дифференцировка (Menko, Boettiger, 1987; Sastry et al., 1996; Hughes, 2001), внося весомый вклад в эмбриональное развитие организмов и в регуляцию морфогенеза различных тканей. Функцию посредников между клетками и ВКМ при этом на себя берут различные рецепторы адгезии. Один из основных классов таких рецепторов, – интегрины, большое семейство трансмембранных адгезионных белков.

Организация генов семейства интегринов высоко консервативна (Fleming et al., 1993). Данный тип молекул появился на очень ранней стадии развития многоклеточных организмов, т.к. обнаружен у представителей всего царства многоклеточных животных и, вероятно, связан с эволюцией многоклеточности (Burke, 1999). Среди биологических функций этих белков, роль в контроле адгезии и клеточной миграции, по-видимому, является фундаментальной.

1.1. Общая характеристика интегриновых рецепторов

Белки семейства интегринов состоят из двух нековалентно связанных субъединиц – α и β (Humphries, 2000) (рисунок 1). Интегрины присутствуют в клетках всех многоклеточных животных – от наиболее простых и примитивных, таких как губки и кораллы (Burke, 1999; Hughes, 2001), до высших позвоночных. Гомологов интегринов среди прокариот и растений не обнаружено (Whittaker, Hynes, 2002; Sebe-Pedros, Ruiz-Trillo, 2010).

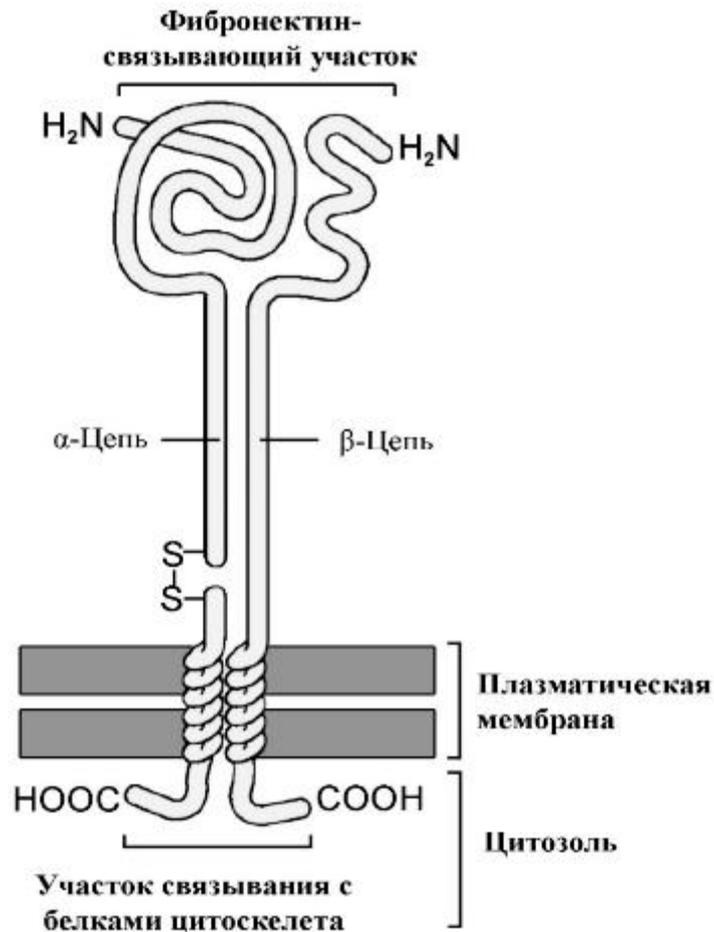


Рисунок 1 - Схема строения интегринового рецептора (Северин, 2004).

Существует два направления передачи сигнала в клетке, в которых задействованы интегрины (Hynes, 2002; Arnaout et al., 2005). При передаче сигнала «изнутри-наружу» происходит изменение конформации интегринов и их активация. Увеличение аффинности интегринов к их лигандам обеспечивает перестройку ВКМ и миграцию клеток. Интегрины также ведут себя как традиционные сигнальные рецепторы в передаче информации "снаружи-внутри". Связывание интегринов с их внеклеточными лигандами изменяет конформацию интегринов и способствует их кластеризации, что «включает» каскад передачи внутриклеточных сигналов. В конечном итоге, эти события вызывают перестройку актинового цитоскелета и приводят к изменению полярности клеток, влияют на экспрессию генов, пролиферацию и дифференцировку клеток (Giancotti, Ruoslahti, 1999; Humphries, 2000; Shattil et al., 2010).

Обе субъединицы, α и β , представляют собой интегральные мембранные гликопротеиды, N-аминокислотные концы которых формируют глобулярные внеклеточные домены, содержащие лиганд-связывающую область (Albelda, Buck, 1990). На долю этих доменов приходится около 80–90% всех аминокислотных последовательностей интегриновых субъединиц (База данных Uniprot). Субъединицы всех интегринов имеют сходные черты. Примерно 35–48% аминокислотных последовательностей гомологичны, но специфические структурные черты сохраняются у различных видов животных (млекопитающих, птиц, амфибий, насекомых) и грибов (Marcantonio, Hynes, 1988; Hemler, 1990).

Внеклеточный домен типичной β -субъединицы содержит четыре богатых цистеином последовательности, так называемый цистеиновый стебель, в состав которого входит 56 консервативных цистеиновых остатков, и большую петлю на N-конце. Кроме того, каждая β -субъединица содержит нитевидный трансмембранный домен и короткий карбоксильный внутриклеточный домен. Хотя α -субъединицы более гетерогенны по своему составу, они также сходны по структуре: большой глобулярный внеклеточный домен, простой трансмембранный и короткий карбоксильный внутрицитоплазматический домены. Внеклеточный домен α -субъединиц содержит семь высоко гомологичных повторов примерно по 60 аминокислотных оснований, которые формируют структуру β -пропеллера. Каждый повтор включает сайт связывания с катионами кальция (Berman et al., 2003).

Во взаимодействии интегринов с цитоскелетом и ВКМ принимают участие обе субъединицы интегринов, но не непосредственно, а через талин (рисунок 2), который образует мостик между цитоплазматическим остатком β -интегрин и актином через винкулин, и/или другие молекулы, связанные с цитоскелетом (Yamada, Geiger, 1997; van derFlier, Sonnenberg, 2001; Bakolitsa et al., 2004). Кроме того, элементы цитоскелета взаимодействуют с ядерным матриксом, регулирующим набор активных генов и синтезируемых белков (Lafrenie, Yamada, 1996; Kim et al., 1998).

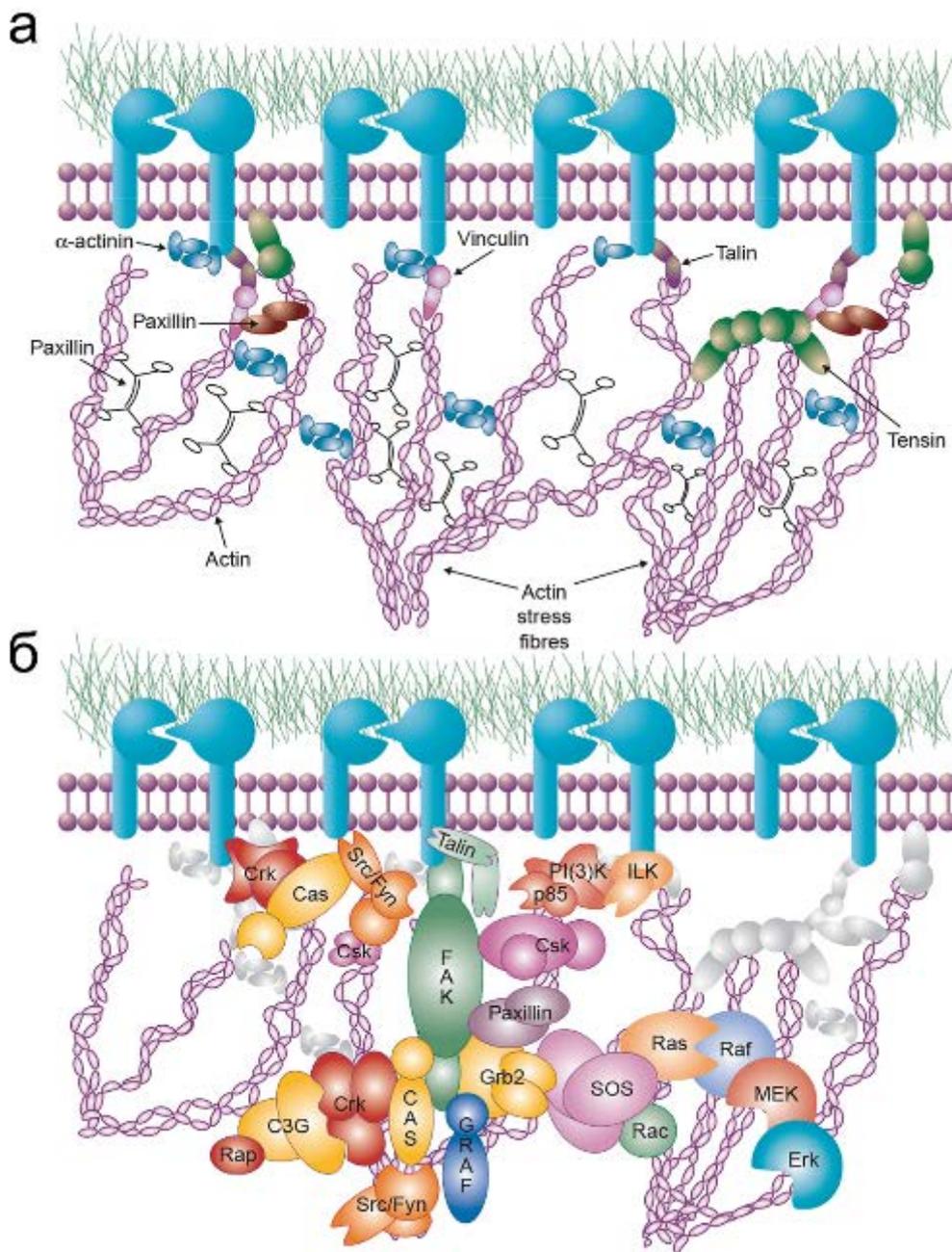


Рисунок 2. Комплекс цитоскелета и сигнальных молекул в области фокальных адгезионных контактов. Сигнальные молекулы формируют комплексную сигнальную сеть, тесно взаимодействующую с цитоскелетом (Miranti, Brugge, 2002). Белки, образующие ассоциации с интегринами, которые были обнаружены первыми (а); сигнальные белки, ассоциированные с интегринами или активируемые интегринами (б).

Связывание интегринов с их лигандами представляет собой катион-зависимый процесс. Взаимодействие с двухвалентными катионами происходит в районе 135–155-го аминокислотных остатков β -субъединицы с вовлечением α -субъединицы. Тип катиона может влиять на аффинность и специфичность связывания рецептора со своими лигандами через изменение конформации интегринов. Ионы Mn^{2+} и Mg^{2+} обеспечивают соответственно высокий и низкий уровень связывания интегринов с лигандами, а ионы Ca^{2+} вызывают уменьшение аффинности интегринов к лигандам (Mould et al., 1995). $\beta 1$ интегрин является Ca^{2+} и Mg^{2+} -зависимым белком, и культивирование клеток крови человека в присутствии хелатирующих агентов приводит к значительному уменьшению количества $\beta 1$ -иммунопозитивных клеток в культуре (Zhang, Chen, 2012). Как указывают эти авторы, высокая концентрация ионов Ca^{2+} способствует поддержанию интегринов в неактивном состоянии, что имеет большое физиологическое значение для клеток крови.

Интегрины распознают специфическую аминокислотную последовательность в лигандах (RGD-последовательность) и связываются с ней. RGD-последовательность - это трипептид, состоящий из L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты, который выявлен в молекулах ряда матричных белков (фибронектина, фибриногена, тромбоспоидина, витронектина, ламинина и коллагена I типа) у позвоночных животных. RGD-последовательности обнаружены и в составе белков ВКМ различных видов беспозвоночных животных и дрожжеподобных паразитических грибов (Katow, Sofuku, 2001; Santoni et al., 2001).

Однако не все интегрины связываются с лигандами через RGD-содержащие домены. Например, рецептор $\alpha 4\beta 1$ связывается с вариабельной зоной (CS-1) фибронектина, которая не содержит RGD-последовательность (Guan, Hynes, 1990). Один набор интегриновых рецепторов узнает RGD-последовательность, которая нужна для адгезии клеток на фибронектине и витронектине, другие наборы ответственны за адгезию на ламинине или коллагене (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987). Для позвоночных установлено, что фибронектин может взаимодействовать

с клетками как посредством интегрин-зависимого, так и интегрин-независимого механизма адгезии (Potts, Campbell, 1996).

Внеклеточные домены обеих субъединиц интегринов обладают высокой степенью полиморфизма, что обуславливает значительное разнообразие интегринов. У человека 18 α и 8 β интегриновых субъединиц формируют 24 функционально отличных гетеродимера (Hynes, 2002). Из них, по крайней мере, 8 интегриновых рецепторов связываются с фибронектином, 5 с ламинином и т.д. (рисунок 3). Субъединицы интегринов объединены в несколько субсемейств, отражающих их эволюционные отношения и лигандную специфичность. Субъединицы со специфичностью для ламинина или RGD обнаружены у всех многоклеточных животных и являются наиболее древними (Hynes, 2002). Не известно, у всех ли позвоночных представлено такое разнообразие интегриновых рецепторов, но у амфибий и птиц большинство из известных паралогов присутствуют (Burke, 1999).

Часть из различных $\beta 1\alpha$ интегриновых гетеродимеров может распознавать более, чем один лиганд (Hynes, 2002). Несмотря на эту избыточность, генетические исследования показали, что многие интегрины имеют уникальные функции. Однако пока неизвестно, каким образом каждый интегрин передает сигнал, и как сигналы от многих интегринов собираются в одной клетке, приводя к каскаду поведенческих изменений клеток и определенному типу дифференцировки. Некоторые интегрины демонстрируют тканевую специфичность и проявляют свою биологическую активность в определенных тканях и на определенных стадиях эмбриогенеза. Более того, в культуре на активность интегринов влияет способ роста клеток. В условиях суспензионной культуры, поверхностные рецепторы кератиноцитов становились неактивными, а $\beta 1$ -интегрин-содержащие рецепторы вообще исчезали с поверхности клеток (Hotchin et al., 1995). Вероятно, этот эффект специфичен, так как его не наблюдали в суспензионной культуре других типов клеток, и, кроме того, другие типы рецепторов не были вовлечены в данный процесс.

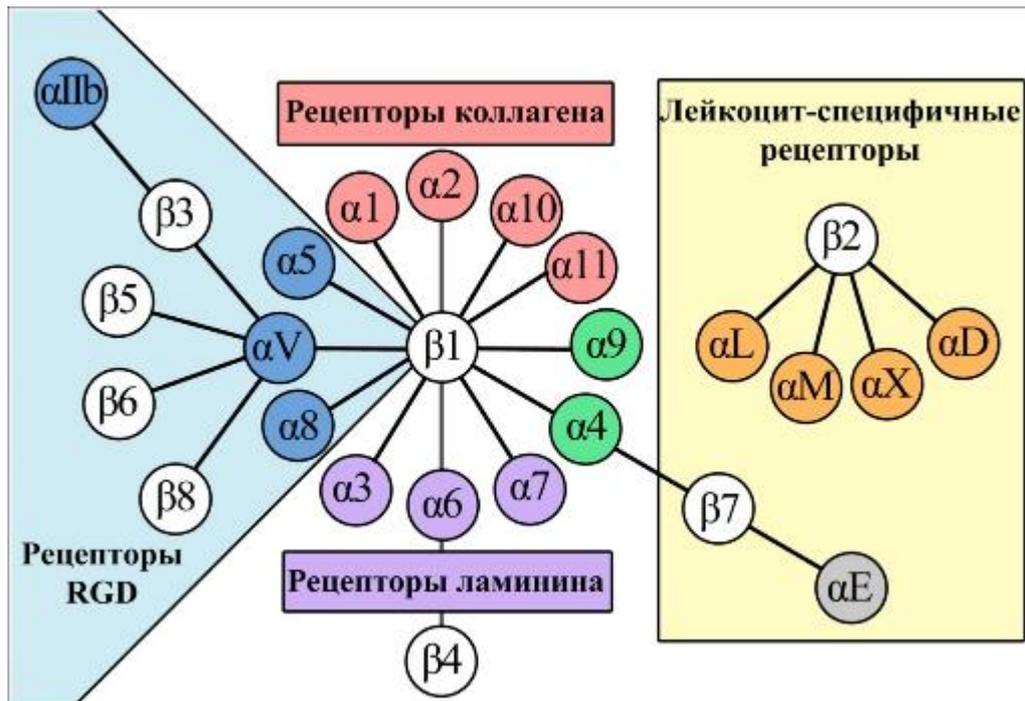


Рисунок 3. Семейство интегриновых рецепторов у человека (Hynes, 2002).

Больше всего сообщений о присутствии интегринов в клетках иммунной системы позвоночных и беспозвоночных животных (Larson, Springer, 1990; Fauvarque, Williams, 2011). Кроме того, у позвоночных животных интегрины играют важную роль в процессах канцерогенеза (Goel, Languino, 2004). Интегриновые рецепторы, содержащие $\beta 1$ -субъединицу, экспрессируются у млекопитающих в клетках различной специализации, в том числе, в нервных и мышечных клетках (Bozyczko, Horwitz, 1986; Bozyczko et al., 1989; Cann et al., 1996), а также в эпителиях (Gilcrease, 2007). Эти молекулы участвуют в регуляции клеточной полярности и морфогенезе эпителиев (Matlin et al., 2003), направляя эпителиальную дифференцировку как слизистой оболочки желудка у человека, так и у эмбрионов мыши (Chenard et al., 2000; Berger et al., 2003; Yeh et al., 2012), регулируют рост нейритов (Ivins et al., 2000) и нейральных стволовых клеток (Campos, 2005). Утрата интегринов, содержащих $\beta 1$ -субъединицу, приводит к нарушениям мышечной дифференцировки (Menko, Boettiger, 1987; Burkin, Kaufman, 1999).

1.2. Интегрины беспозвоночных животных

Интегрины беспозвоночных, как правило, по своей структуре и функциям похожи на интегрины позвоночных животных. Это гетеродимеры, в которых сохраняется объединение различных α -интегрин-подобных субъединиц с несколькими β -интегрин-подобными субъединицами (Burke, 1999). Так же, как это было установлено для позвоночных животных, интегрины беспозвоночных играют важную роль в адгезии и в защитных реакциях (Davids et al., 1999; Garcia et al., 2004; Terahara et al., 2005). Интегрин-положительные гемоциты были обнаружены у брюхоногих и двустворчатых моллюсков (Davids et al., 1999; Plows et al., 2004, 2006; Terahara et al., 2006). Выявлена роль отдельных классов интегриновых рецепторов в процессах фагоцитоза и распластывания клеток гемолимфы моллюсков (Humphries et al., 2001; Plows et al., 2006). На поверхности гемоцитов брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* были идентифицированы $\alpha V\beta 3$ и $\beta 1$ -интегрин-подобные субъединицы. Установлено, что связывание гемоцитов с другими типами клеток через эти интегрины зависит от двухвалентных катионов Ca^{2+}/Mg^{2+} . При взаимодействии интегринов гемоцитов с RGDS-пептидом происходит быстрое увеличение фосфорилирования (в течение 90 мин) белка, подобного киназе фокальной адгезии, что может указывать на его активацию (Plows et al., 2006). Ассоциация интегринов с клетками, такими как гемоциты и целоמוциты, позволяет предположить, что по крайней мере некоторые из множества интегринов иммунной системы позвоночных могут быть найдены у беспозвоночных (Burke, 1999).

Эволюционная история интегринов во многом неясна. У нематоды *Caenorhabditis elegans* появляются одна β субъединица и две α субъединицы, образующие уже два интегрин. Ортологи этих интегринов обнаружены у дрозофилы и у многих позвоночных животных (Hynes, Zhao, 2000). Не исключено, что эволюция интегринов связана с эволюцией двух клеточных слоев и направлена на контроль адгезии клеток для обеспечения асимметричного взаимодействия клеток с базальной мембраной. Многие интегрин-стимулированные сигнальные

пути сходны с сигнальными путями, которые регулируются рецепторами факторов роста.

В филогенетическом дереве β интегринов позвоночных большинство интегринов можно разделить на два основных кластера: семейство $\beta 1$ и семейство $\beta 3$, но ни в одном из этих двух кластеров последовательности интегринов беспозвоночных не представлены (Hughes, 2001). На сегодняшний день консервативные последовательности β интегринов были определены для пяти классов беспозвоночных (Pytela et al., 1994; Heino et al., 2009). Японские исследователи обнаружили две β субъединицы интегринов в гемоцитах асцидии и провели анализ филогении известных β -субъединиц интегринов беспозвоночных (Miyazawa, Nonaka, 2004). Оказалось, что, несмотря на присутствие генов одиннадцати α и пяти β цепей интегринов в геноме асцидии *Ciona intestinalis*, только один из β интегринов асцидий является гомологом $\beta 1$ -интегрина позвоночных, другой – гомолог $\beta 4$ -интегрина, а остальные три – специфичны только для асцидий (Mueller et al., 1989; Ewan et al., 2005).

Некоторые гены, кодирующие субъединицы интегринов морских беспозвоночных, секвенированы (Brower et al., 1997; Davids et al., 1999; Miyazawa et al., 2001; Miyazawa, Nonaka, 2004; Plows et al., 2006; Knack et al., 2008). Хотя только одна β -субъединица интегрина описана у взрослых особей губки *Ophlitospongia tenuis* и коралла *Acropora millepora* (Brower et al., 1997), неожиданное разнообразие интегринов обнаружено во время раннего развития кораллов и морской анемоны (Knack et al., 2008).

У морских ежей β -интегрин-подобные транскрипты имеют 50%-ную степень гомологии с транскриптами $\beta 1$ -интегрина позвоночных. Эти транскрипты присутствуют, в основном, на поздних стадиях эмбрионального развития, поэтому молекула β -интегрин-подобного белка у морских ежей была определена как личиночная форма - βL (Marsden, Burke, 1998). Добавление блокатора интегриновых рецепторов, RGDS-пептида, вызывает нарушение прикрепления и распластывания диссоциированных эмбриональных клеток морских ежей в

культуре, что может указывать на способность интегрин β L распознавать RGD-последовательность. Кроме того, авторы предполагают, что β L-интегрин может участвовать в связывании YIGSR-домена, через который происходит связывание с ламинином (Maeda et al., 1994). Ранее было обнаружено, что ламинин присутствует в базальной мембране поздней гаструлы морского ежа (McCarthy et al., 1987). В личинках морского ежа более поздних стадий развития β -Gi-субъединица интегринов экспрессируется в мезенхиме и на протяжении всего кишечника (Marsden, Burke, 1998). Однако три из четырех идентифицированных β -субъединиц интегринов морского ежа экспрессируются во взрослом состоянии в целомоцитах (Marsden, Burke, 1997). В частности, β -Gi-субъединица экспрессируется на поверхности подвижных целомоцитов, что может быть связано с иммунологическими функциями этой группы целомоцитов морского ежа. Анализ филогении β -субъединиц интегринов Вторичноротых животных показывает, что все β -субъединицы интегринов морского ежа образуют независимый кластер (Burke, 1999).

Наиболее полно охарактеризованы интегрины и их функции у дрозофилы. Согласно данным баз Uniprot и FlyBase, семь генов интегринов, кодирующих пять- и две β -интегриновые субъединицы, закодированы в геноме плодовой мушки (Devenport, Brown, 2004). Установлена возможность гибридизации кДНК β 1-интегрин дрозофилы и цыпленка (DeSimone, Hynes, 1988). В эмбриогенезе дрозофилы экспрессия β 1-интегриновой субъединицы важна для гаструляции и морфогенеза крыла (Vrabant, Brower, 1993). Клетки дрозофилы, экспрессирующие интегрин PS2, связываются с субстратом через RGD-последовательность (Bunch, Brower, 1992).

Многочисленные сообщения о роли интегринов в защитных реакциях моллюсков контрастируют с единичными данными об участии интегринов в процессах их дифференцировки. Роль β -интегрин-подобного белка в развитии моллюсков неизвестна. Размер геномов устриц охватывает около 28–23 тысяч генов (Takeuchi et al., 2012; Zhang et al., 2012), т.е. геном мидии может содержать

такое же или большее количество генов (Gerdol et al., 2015). Тем не менее, до сих пор неизвестно, вовлечены ли взаимодействия β -интегриновой субъединицы с возможным лигандом в развитие двустворчатых моллюсков или нет.

1.3. Характеристика некоторых адгезионных молекул

β 1-интегрин у позвоночных животных узнает белки межклеточного матрикса: коллаген, фибронектины, витронектин и ламинины (Hynes, 2002). В состав внеклеточного матрикса входят несколько основных компонентов, таких как коллаген, протеогликаны и гликопротеины.

Коллаген

Коллагены – семейство белков, содержащих в большом количестве остатки глицина и пролина. Являясь главной структурной опорой почти любого органа животных, коллаген составляет $\sim 1/2 - 1/4$ массы всех белков организма. Идентифицировано более чем 10 генов, кодирующих коллагены (Vuorio, de Crombrughe, 1990). Коллаген образует нерастворимые, очень прочные фибриллы, составляющие основу соединительной ткани организма и обеспечивающие её прочность и эластичность. Коллаген обнаружен у всех многоклеточных животных; но отсутствует у растений, бактерий, вирусов, простейших и грибов (Heino et al., 2009).

Протеогликаны

Протеогликаны - особый тип гликопротеинов, у которых масса углеводных остатков значительно превосходит массу белка, и углеводы представлены линейными цепями повторяющихся дисахаридов. Обычно один из сахаров дисахарида имеет аминогруппу, поэтому повторяющуюся единицу называют гликозаминогликаном.

Гликопротеины

Это большая группа адгезивных белков, которая включает ламинин, эластин, фибронектин, витронектин и т.д. Среди компонентов внеклеточного матрикса

позвоночных *ламینیны* играют важную роль в стимуляции роста и дифференцировки различных клеток, в том числе нейронов, способствуя их миграции и адгезии, участвуя в структуризации базальной мембраны и поляризации клеток эпителиального слоя. Ламинин-1 был обнаружен и описан первым. Он представляет собой большой (900 кДа) белок базальной мембраны, образованный тремя различными полипептидными цепями: α (400 кДа), β (220 кДа) и γ (200 кДа). Ламинины взаимодействуют с рядом клеточных рецепторов, которые можно подразделить на три основных класса: интегрины; сульфатидные полисахариды и гликолипиды; неинтегриновые мембранные белки. Молекула ламинина состоит из трех больших полипептидных цепей, обозначаемых В1, В2 и А (Cooper et al., 1981), которые образуют многочисленные меж- и внутрицепочечные дисульфидные связи, формируя уникальную крестообразную структуру, которая может связываться с мембранами клеток и молекулами ВКМ (Haralson et al., 1996). У позвоночных интегрин $\alpha 7 \beta 1$ является рецептором для трех типов ламининов (Miosge et al., 1999).

Другой важный компонент ВКМ позвоночных животных - *фибронектин*. Фибронектин служит общей адгезивной молекулой, связывая клетки с различными субстратами, такими как коллаген и протеогликаны (Hynes, 2002). Фибронектин участвует в миграции клеток при развитии. Это гликопротеиновый димер с молекулярной массой около 460 кДа, синтезируемый фибробластами, хондроцитами, эндотелиальными клетками, макрофагами и некоторыми эпителиальными клетками. Тетрапептид RGDS, располагающийся на расстоянии 3/4 длины от N-конца фибронектина, является сайтом связывания клеток с данным субстратом. Кроме того, на молекуле фибронектина расположен "высокоафинный сайт", узнаваемый некоторыми клетками и располагающийся на расстоянии в 300 аминокислотных остатков от N-конца. Оба сайта необходимы для адгезии клеток на ВКМ.

Витронектин - многофункциональный гликопротеин, компонент крови и ВКМ позвоночных животных, но который не обнаружен в ВКМ беспозвоночных.

Этот белок взаимодействует с гликозаминогликанами, коллагеном, плазминогеном, рецептором урокиназы; стабилизирует конформацию ингибитора активации плазминогена 1, регулируя деградацию матрикса. Кроме того, он взаимодействует с комплементом, гепарином и комплексами тромбин-антитромбин III, что указывает на его возможное участие в иммунном ответе и регуляции свертывания крови. Полипептидная цепь витронектина (75 кДа) содержит RGD-последовательность, которая обеспечивает его взаимодействие с $\alpha V\beta 3$ -интегриновым рецептором и участие в прикреплении, распластывании и перемещении клеток (Preissner, 1991; Tomasini, Mosher, 1991).

Полилизин - гидрофильный искусственный полимер, представляющий собой катионный полипептид. За счет избыточного положительного заряда полилизина клетки хорошо прикрепляются к нему, но адгезия носит неспецифический характер.

Некоторые адгезионные белки позвоночных могут не только поддерживать, но и блокировать рост клеток морских беспозвоночных в культуре: фибронектин и ламинин блокировали рост эмбриональных клеток брюхоногого моллюска *Haliotis rufescens* (Naganuma et al., 1994; Sugni et al., 2014); коллаген (I) замедлял рост эмбриональных клеток морского ежа (Matranga et al., 1991) и блокировал рост клеток постоянной линии колониальной асцидии (Kawamura, Fujiwara, 1995).

Белки ВКМ у беспозвоночных

Белки ВКМ с гомологией к компонентам ВКМ позвоночных обнаружены у многих беспозвоночных животных. Основным компонентом ВКМ беспозвоночных животных, также как и у других многоклеточных, является коллаген (Har-el, Tanzer, 1993). Коллаген-подобные молекулы, сходные с коллагенами типов I, IV, V, и VI, присутствуют в губках, гидре, нематодах, морских ежах и двустворчатых моллюсках (Shimizu et al., 1990; Sarras et al., 1991; Cox, 1992; Corbetta et al., 2002; Sugni et al., 2014). В мезоглее медузы присутствует цистеин-содержащий коллаген,

необходимый для прикрепления мышечных и энодермальных клеток медузы (Schmid, Bally, 1988). Однако между коллагенами морских беспозвоночных и коллагенами позвоночных животных существуют значительные структурные различия, а также различия в растворимости. Ламинин-подобные молекулы были обнаружены в гидре, пиявках, дрозофиле и морских ежах (McCarthy et al., 1987; Masuda-Nakagawa et al., 1988; Fessler, Fessler, 1989; Sarras et al., 1991), и повсеместно распространены в базальных мембранах клеток у моллюсков (Corbetta et al., 2002). Фибронектин-подобные (Фб-подобные) полипептиды были предсказаны в геноме морских ежей (Iwata, Nakano, 1983; DeSimone et al., 1985), насекомых (Gratecos et al., 1988), двустворчатых моллюсков (Suzuki, Funakoshi, 1992; Dirosa et al., 1994; Panara et al., 1996), медуз (Schlage, 1988) и губок (Muller, 1997). Использование моноклональных антител к высокоочищенному фибронектину человека и его различным структурным и функциональным остаткам позволило обнаружить Фб-подобные полипептиды с помощью Вестерн-блота в женских гонадах гребешка *Pecten maximus* (Paz et al., 2002). Несмотря на это, фибронектины с правильной мозаичной структурой обнаружены только у представителей Хордовых (Whittaker et al., 2006), а предсказанные Фб-подобные полипептиды беспозвоночных имеют структуру, отличную от структуры «правильных» фибронектинов.

Мотонейроны моллюсков способны связывать различные белки ВКМ, в том числе фибронектин (Wildering et al., 2002), при этом механизмы адгезии на разных субстратах могут быть, как и у позвоночных, реализованы по RGD-зависимому, или по RGD-независимому пути (Wildering et al., 1998).

1.4. Маркеры мышечной и нейрональной дифференцировки у моллюсков

Маркеры мышечной дифференцировки

Опосредованные через интегрины сигналы необходимы для реализации того или иного типа дифференцировки клеток. Для развития миогенной дифференцировки клеток позвоночных животных необходимо прикрепление клеток к твердому субстрату и развитие всего комплекса структур немышечного цитоскелета (Исаева, 1994). Контакт клетки с ВКМ является обязательным условием для нормального хода миогенеза (Hauschka, Konigsberg, 1966; Melo et al., 1996). В этом процессе принимают участие различные типы интегринов. В скелетных мышцах и кардиомиоцитах позвоночных экспрессируется, главным образом, интегрин $\alpha7\beta1$ (Miosge et al., 1999).

Особенно зависимым от белков ВКМ являются терминальные этапы миогенной дифференцировки – синтез мышечных белков, сборка белков в упорядоченные структуры и, в результате, развитие клетками сократительной активности. Устройство мышц и формирование миофибрилл имеет ряд специфических особенностей у различных организмов (Sanger et al., 2005). Мышечные белки, такие как миозин и актин, участвуют в формировании мышечных систем всех видов животных, тогда как парамиозин обнаружен только в мышцах беспозвоночных (Winkelman, 1976; Royuela et al., 1997). Маркеры, разработанные для определения типов мышц позвоночных, нельзя использовать в аналогичных экспериментах для мышц беспозвоночных животных. Прежде всего, это связано с различиями в структурной организации типов мышц позвоночных и беспозвоночных животных, а во-вторых, с отсутствием кросс-реактивности антител к мышечным белкам позвоночных к аналогичным белкам беспозвоночных. Кроме того, вариации белкового состава мышц, наличие уникальных мышечных белков, встречающихся только в единичных таксонах беспозвоночных, осложняют поиск универсальных маркеров мышц. Так, филогения, основанная на появлении

актиновых структур, не может быть приемлема в связи с повсеместным распространением актина и неясным различием между цитоскелетными и мышечными формами актина у беспозвоночных животных (Carlini et al., 2000; Khaitlina, 2001). Наиболее подходящим маркером для всех типов мышц беспозвоночных может быть парамиозин (Odintsova et al., 2010). Тем не менее, он не подходит в качестве универсального маркера мышечных клеток для оболочников и дрозодилы, поскольку найден в неммышечных клетках этих животных (Holland, 1996).

Маркеры нейрональной дифференцировки

К наиболее часто применяемым маркерам нейрональной дифференцировки относятся ядерный белок нервных клеток NeuN, β -тубулин, ассоциированный с микротрубочками белок MAP2, белки нейрофиламентов, нейрон-специфическая енолаза, синаптофизин и связанная с полисиаловой кислотой молекула адгезии нервных клеток (PSA-NCAM), а также нейромедиаторы: серотонин (5HT), ацетилхолин (АХ) и нейропептид Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFамид).

Пептид FMRFамид был изначально идентифицирован как возбудитель сердечных сокращений у моллюсков (Price, Greenberg, 1977). Позже этот нейрогормон был обнаружен в центральной нервной системе и кишечнике моллюсков, гидры и ряда позвоночных животных (Grimmelikhuijzen et al., 1982; Hernadi et al., 1998). Установлено, что в запирающих мышцах двустворчатых моллюсков FMRFамид стимулирует тонические сокращения без увеличения концентрации цАМФ (Painter, 1982). В нейронах брюхоногого моллюска *Helix aspersa* этот нейрогормон вызывает гиперполяризацию мембраны с увеличением K⁺-проводимости, либо Na⁺-зависимую деполяризацию по цАМФ-зависимому пути (Painter, 1982).

Функция серотонина, как передатчика нервных импульсов, и влияние этого медиатора на поведение моллюсков впервые были установлены у хищного морского брюхоногого моллюска *Clione limacina* (Сахаров, Каботянский, 1986). В

настоящее время доказано участие в нервно-мышечной передаче у двустворчатых моллюсков двух нейромедиаторов – ацетилхолина и серотонина. Возбуждающие нервы, вызывающие тоническое сокращение запирающей мышцы мидии, выделяют АХ. Несмотря на низкий уровень ионов Ca^{2+} после прекращения стимула, мышца остается в сокращенном состоянии (catch-состоянии) (Rüegg, 1971; Twarog, 1976; Cohen, 1982). Действие АХ сопровождается увеличением концентрации цГМФ в 40 раз и может быть заблокировано атропином и митолоном. Расслабление гладких мышц мидии инициируют серотонин и дофамин, которые выделяются из нервных волокон переднего ретрактора. Нейромедиатор дофамин вызывает небольшое увеличение уровня цАМФ, тогда как серотонин вызывает значительное повышение концентрации цАМФ и падение уровня цГМФ, вызванное АХ. Серотонин вызывает увеличение концентрации цАМФ, активирующего протеинкиназу А (Twarog, 1976). Одним из субстратов этой киназы является твитчин, от уровня фосфорилирования которого зависит запирающий тонус (Vibert et al., 1993; Siegman et al., 1998). Кроме того, цАМФ, активируемый дофамином и серотонином, может участвовать и в регуляции цилиарной активности моллюсков (Malanga, Poll, 1979). Для идентификации нейрональных элементов у моллюсков предложено использовать антитела к двум нейромедиаторам, серотонину и FMRFамиду (Mathieu, Van Minnen, 1989; Favrel et al., 1994). Ранее установлено, что нейрогенез у мидии начинается на стадии трохофоры с появления FMRFамид- и серотонин-положительных клеток в районе апикального органа (Voronezhskaya et al., 2008).

1.5. Маркеры пролиферации

Моллюски – это животные с очень ранним типом детерминации всех зародышевых листков. После появления первого квартета микромеров на анимальном полюсе происходит индукция вегетативно-расположенных стволовых клеток мезодермы (3D макромера). Индукция мезодермы происходит на 24-

клеточной стадии, когда на апикальном конце устанавливается тесный контакт между 3D макромером и рядом микромеров, которые при следующем делении становятся мезодермальными стволовыми клетками (de Laat et al., 1980). При такой ранней детерминации очень трудно получить делящиеся клетки, тем не менее, митозы были обнаружены в длительно-переживающих культурах (до 5–6 месяцев) клеток моллюсков, полученных из эмбриональных клеток гребешка *Mizuchopecten yessoensis* (Odintsova, Khomenko, 1991) (рисунок 4) и из сердца двустворчатого моллюска *Meretrix lusoria* (Chen, Wang, 1999).

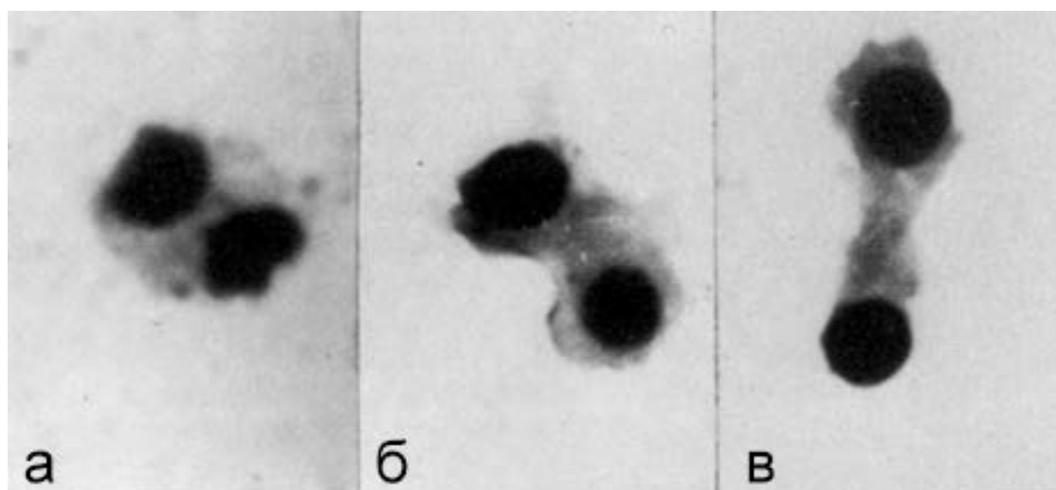


Рисунок 4. Митотические клетки на разных стадиях митоза (а – поздняя анафаза, б – телофаза, в – цитокинез) в первичной культуре клеток личинок гребешка *M. yessoensis* (эозин-гематоксилин х800) (Odintsova, Khomenko, 1991).

Для тканей морских беспозвоночных в культуре характерна низкая митотическая активность (Rinkevich, 2011). Во всех случаях, даже в клетках бластемы регенерирующей руки морской лилии (Holland, 1994), митотический индекс не превышал 1–3%, в то время как в эмбриональных тканях позвоночных животных митотическая активность может достигать 3–8% (Заварзин, 1982). Недавно установлена первая постоянная клеточная линия из злокачественных

гемоцитов двустворчатого моллюска *Mya arenaria* (Walker et al., 2009), клетки которой удваиваются менее, чем за два дня (1,8 суток).

Существуют различные подходы для определения пролиферативной активности клеток. Одним из первых было использование нуклеозидов: автордиография с ^3H -тимидином, инкубация клеток с мечеными предшественниками, такими как тимидин или аналог тимидина, бромдезоксисуридин (БДУ). БДУ встраивается в новую цепь ДНК при репликации клеток в S-периоде. Методы иммуногистохимии с использованием моноклональных или поликлональных антител позволяют выявлять БДУ, а, следовательно, и клетки, активно участвующие в синтезе ДНК, не только в тканях позвоночных, но и беспозвоночных животных (Zaldibar et al., 2004).

На рисунке 5 представлены результаты выявления делящихся клеток среди культивируемых клеток мидии.

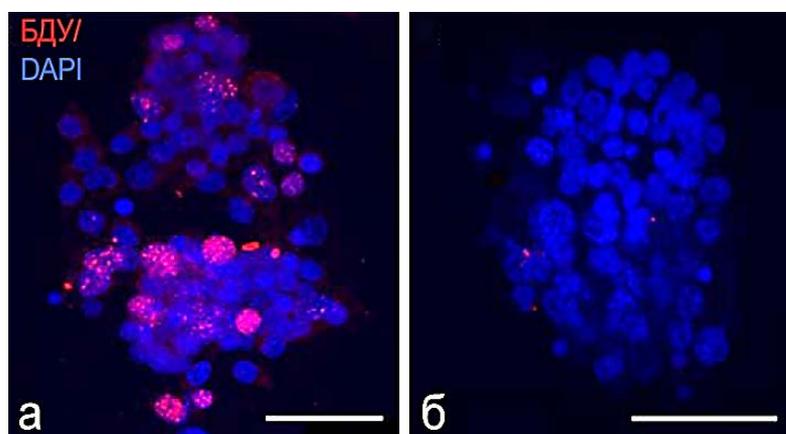


Рисунок 5. Детекция включения БДУ (красный) в культивируемых клетках личинок мидии через 7 дней (а) и 14 дней (б) после инициации первичной культуры. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 20 мкм (Odintsova et al., 2010).

БДУ-позитивные клетки были обнаружены в культуре клеток личинок мидии после 7 суток, однако, после 14 суток культивирования такие клетки отсутствовали.

Отрицательные моменты при использовании этого метода: для успешного включения БДУ в ДНК необходима денатурация ДНК (например, соляной кислотой или нагреванием), поэтому данный метод вызывает денатурацию практически всех белков клетки (например, мышечных) и не может быть комбинирован с иммунодетекцией любого другого маркера. Следовательно, при использовании БДУ нельзя определить принадлежность делящейся клетки к тому или иному клеточному типу.

Помимо меченых нуклеозидов, в качестве маркеров пролиферации может быть использован ряд белков, участвующих в регуляции клеточного цикла. К таким белкам относится консервативный белок, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), который имеется у всех животных и растений. В наибольшей концентрации этот белок можно обнаружить в ядрах клеток, проходящих S-период интерфазы (Maga, Hubscher, 2003). Кроме того, один из наиболее часто используемых маркеров пролиферации – белок Ki-67, который присутствует в ядрах в период G1, S, G2 и во время митоза (Seigneurin, Guillaud, 1991). Особенностью выявления этого антигена является необходимость проведения процедуры его теплового демаскирования. Недавно в практику выявления высокоспецифичных маркеров пролиферирующих клеток введен фосфорилированный гистон H3, который детектирует наличие митотических клеток: в результате проведения иммуноцитохимического выявления происходит селективное окрашивание конденсированных хромосом в клетках (Hirata et al., 2004). Именно посттрансляционная модификация (фосфорилирование) N-конца этого гистона отвечает за уровень конденсации и деконденсации хроматина. Все эти методы имеют свои достоинства и недостатки (Кирик и др., 2009). Маркеры пролиферации, такие как БДУ или Ki-67, показывают одинаковый уровень мечения, но требуют предварительной инкубации с живыми клетками (Bromley et al., 1996). Применение автордиографии также связано с необходимостью предварительной инкубации живых клеток с радиоактивными предшественниками азотистых оснований.

Функциональная активность генов, контролирующих митотический цикл в различных типах клеток, может быть связана с интегрин-зависимыми изменениями адгезии клеток (Assoian, 1997; Howe et al., 1998).

1.6. Развитие личинок мидии *M. trossulus*

Мидии вымётывают ооциты на стадии метафазы I. После оплодотворения они округляются, оболочка отступает от поверхности цитоплазмы. Первое деление дробления начинается спустя 1 ч после выделения второго полярного тельца с выпячивания на вегетативном полюсе яйцеклетки выроста прозрачной цитоплазмы – так называемой «первой полярной лопасти», которая позже сливается с одним из двух бластомеров зародыша. Второе и третье деления дробления также сопровождаются формированием полярных лопастей. Важнейшая особенность дробления у видов, развивающихся с формированием полярных лопастей, заключается в отделении второго квартета микромеров, что происходит с нарушением типичного для спирального дробления порядка. Примерно через 4,5 ч после оплодотворения наступает стадия бластулы. Первую личиночную стадию, называемую стерробластулой, можно наблюдать через 10 ч после оплодотворения. На этой стадии личинки становятся подвижными за счет биения трех рядов ресничек и ресничек теменного султанчика (Малахов, Медведева, 1985). У плавающих личинок продолжается деление клеток, и протекают морфогенетические процессы, главными из которых являются гастрюляция и формирование зачатка раковинной железы.

Гастрюляция (14–15 ч после оплодотворения) протекает как инвагинация и сопровождается формированием бороздки, тянущейся от вегетативного полюса на брюшную сторону. В передней части образующейся бороздки располагается отверстие архентерона. Архентерон представляет собой узкую трубку, связанную с внешней средой небольшим отверстием на брюшной стороне зародыша. Раковинная железа расположена на противоположной от отверстия архентерона

стороне и представляет собой впячивание. На этой стадии личинку с двумя впячиваниями называют конхостомой (Малахов, Медведева, 1985).

На следующей личиночной стадии, трохофоре, образуются ресничный пояс (прототрох), теменной султанчик ресничек, теменная пластинка, и формируется апикальный орган. Первые нервные клетки (серотонин- и FMRFамид-иммунопозитивные) можно наблюдать через 30 ч после оплодотворения, тогда как первые мышечные клетки появляются на 2 ч позднее, постепенно формируя поперечно-полосатое мышечное кольцо на анимальном полюсе личинки (Dyachuk, Odintsova, 2009). У личинки происходит образование пищеварительной системы и увеличивается объем полости тела. Позже, после выворачивания раковинной железы, вся область вегетативного полушария личинки сдвигается на брюшную сторону, то есть происходит процесс «искривления» первичной анимально-вегетативной оси, свойственный в той или иной степени всем Spiralia (Иванова-Казас, 1974). Кишечник изменяет свое положение внутри личинки и соединяется с эктодермой заднего конца тела.

На стадии трохофоры начинает закладываться раковина, и через 48–55 ч после оплодотворения трохофора превращается в характерную для многих моллюсков личинку – велигер D-формы. Кальцификация раковины происходит за счет отложения отдельных гранул минерального вещества (арагонита) в узком промежутке между органической пластинкой зачаточной раковины и цитоплазматической мембраной клеток раковинной железы. Раковина закладывается на спине трохофоры сначала в виде целой пластинки, которая лишь позднее перегибается по срединной линии и становится двустворчатой, причем место перегиба сохраняется в виде лигамента. Верхняя часть личинки преобразуется в покрытый длинными ресничками диск – парус (велюм), служащий для плавания. В центре этого диска находится теменная пластинка с султаном чувствительных ресничек. На заднем конце в течение некоторого времени сохраняется каудальный пучок ресничек (Малахов, Медведева, 1985).

Двустворчатая раковина велигера хорошо развита и покрывает все тело личинки; при плавании велюм выступает над раковиной.

На стадии раннего велигера появляются мышцы-ретракторы паруса, зачаток непарного переднего аддуктора и продольные мышцы, идущие вдоль спинного края раковины (Bayne, 1976; Cragg, 1985; Cragg, Crisp, 1991; Флячинская, Кулаковский, 1991). С развитием пищеварительной системы, личинки начинают питаться (52–54 ч после оплодотворения), при этом кишечник дифференцируется на воронкообразный пищевод, желудок, в верхней части которого обособляется зачаток пищеварительной железы, и тонкую заднюю кишку. На желудке имеется слепой вырост — зачаток железы кристаллического стебелька. Желудок и пищевод выстланы ресничным эпителием.

Анатомическое строение велигера очень близко к строению взрослого моллюска. Имеются мантия, ганглии нервной системы, желудок, печень, но органами выделения еще остаются протонефридии (Холодов и др., 2010). Велигер обладает развитым мышечным сократительным аппаратом. Первыми дифференцируются три пары ларвальных ретракторов, представляющих собой мышечные пучки, прикрепленные к середине спинного края раковины и расходящиеся к переднему, среднему и заднему краям створок. Одновременно с ними, вблизи переднего края раковины, появляется передний аддуктор. На стадии педивелигера начинает формироваться задний аддуктор, который располагается позади висцеральных ганглиев и проходит под задней кишкой, зачаток ноги, жабры, и личинка оседает на дно.

У педивелигеров закладывается пара мышц – ретракторов ноги. При метаморфозе ларвальные ретракторы и мышцы, втягивающие велюм, редуцируются, происходит смена исчерченного типа мускулатуры на гладкий (Dyachuk, Odintsova, 2009). Передний и задний аддукторы и мышцы – ретракторы ноги дают начало мышцам молодого моллюска.

1.7. Клетки гемолимфы моллюсков

В гемолимфе двустворчатых моллюсков представлено несколько типов гемоцитов, которые выполняют разнообразные функции, принимая участие в иммунном ответе, регенерации тканей и раковины, транспорте и пищеварении, отчасти в выделении, вынося захваченные из гемолимфы инородные частицы за пределы тела (Carballal et al., 1997; Beninger et al., 2003). Согласно морфологической классификации все гемоциты делятся на гранулоциты и гиалиновые клетки (Cheng, 1996) либо на круглые клетки и амебоциты (Sminia et al., 1981; Negaret et al., 2003). Согласно функциональной классификации, выделяют стволовые клетки, фагоциты, гемостатически активные клетки, которые ответственны за поддержание гемостаза, и трофические клетки (Glinski, Jarosz, 1997). В основе многих функций гемоцитов лежат интегрин-зависимые механизмы (Terahara et al., 2003, 2005; Terahara et al., 2006). Недавно было обнаружено, что гены, кодирующие интегрины, активно экспрессируются в гемоцитах тихоокеанской устрицы *C. gigas*. Более того, гемоциты участвовали в образовании фибронектин-подобных фибрилл в матриксе раковины (Zhang et al., 2012).

1.8. Культура клеток личинок мидии *M. trossulus*

Изучение дифференцировки у высших эукариот представляет собой чрезвычайно сложную проблему, однако в настоящий момент активно исследуются клеточные системы, способные к дифференцировке *in vitro*. После стимула к дифференцировке, клетки претерпевают определенные изменения, которые можно легко выявить в культуре и оценить количественно. Эти изменения могут быть связаны с синтезом новых белков или со сложными структурными перестройками клеток. При культивировании специализированных клеток всегда есть опасность утраты клетками некоторых характерных свойств, присущих им *in*

vivo. Разнообразие и оригинальность роста и метаморфоза клеток беспозвоночных в культуре обеспечивают высокий интерес к ним со стороны исследователей.

Существует резкий контраст между существованием более чем 500 клеточных линий насекомых (Lynn, 2007), и всего двумя клеточными линиями, полученными из моллюсков; в частности, эмбриональной клеточной линии (Bge) брюхоного моллюска *B. glabrata* (Hansen, 1976) и линии злокачественных гемоцитов двустворчатого моллюска *Mya arenaria* (Walker et al., 2009).

Тем не менее, уже сейчас первичные культуры клеток моллюсков вносят значительный вклад в наше понимание основных сложных физиологических процессов у этих животных (Le Marrec-Croq et al., 1999; Rinkevich, 2011). Такие культуры могут использоваться для биомониторинга окружающей среды и как «упрощенные» модели для технологий генного переноса (Boulo et al., 2000; Yoshino et al., 2013), а также для фундаментальных исследований процессов дифференцировки клеток, исследования врожденного иммунитета и эволюции противоопухолевого иммунитета (Walker et al., 2009; Odintsova et al., 2011).

Миогенная и нейрональная дифференцировка в культуре клеток моллюсков

Впервые миогенная дифференцировка в культуре клеток морских беспозвоночных была описана для личиночных клеток брюхоного моллюска *H. rufescens* (Naganuma et al., 1994). Организация миофибриллогенеза в культуре, в основном, соответствовала гладкомышечному развитию *in vivo*, хотя появление поперечно-полосатых саркомеров наблюдали только в культуре личиночных клеток. Поперечно-полосатые мышечные клетки у личинок этого моллюска *in vivo* были обнаружены позже (Degnan et al., 1997). В целом, скорость миогенной дифференцировки в культуре *in vitro* соответствовала нормальному развитию *in vivo* и была похожа на те процессы, которые происходят при миогенезе в интактной личинке (Naganuma et al., 1994). У взрослых особей гребешка в условиях культуры структура клеток сердца соответствовала гладко-мышечному типу (Le Marrec-Croq et al., 1999).

Клетки личинок двустворчатых моллюсков (мидии *M. trossulus*) могут одновременно дифференцироваться в культуре как в мышечные клетки, производные мезодермы (Plotnikov et al., 2003; Odintsova et al., 2010), так и в нейрональные клетки, производные эктодермы (Одинцова, 2009; Odintsova et al., 2010; Odintsova, Maiorova, 2012). Возможно, в дифференцировке некоторых типов нейрональных клеток у двустворчатых моллюсков принимает участие $\alpha\upsilon\beta3$ -интегрин (Odintsova, Maiorova, 2012). У позвоночных животных интегрин $\alpha\upsilon\beta3$ способен узнавать множественные RGD-содержащие лиганды (Charo et al., 1990), и, наряду с другими интегринами, ответственен за взаимодействие между клеткой и фибронектином, а также между клеткой и витронектином (Wayner et al., 1991; Hynes, 2002). Более того, субъединица $\alpha\upsilon$ преимущественно локализована в нервной ткани, и является критическим компонентом в миогенезе млекопитающих (Enomoto et al., 1993; Hirsch et al., 1994).

Также как для клеток позвоночных животных, принципиальным для мышечной дифференцировки клеток мидии в культуре является выбор субстрата. На коллагене эмбриональные клетки моллюсков имели высокий пролиферативный потенциал (Odintsova, Khomenko, 1991), но коллагеновый субстрат препятствовал распластыванию клеток (рисунок 6), и, как следствие, терминальным стадиям миогенеза, однако, мышечные белки в некоторых клетках синтезировались (Odintsova et al., 2010).

Разработанный комплекс условий для направленной миогенной дифференцировки эмбриональных клеток моллюсков позволяет получать мышечные клетки и в бессывороточных средах, но в присутствии повышенных концентраций инсулина (10 мкг/мл). Отсутствие сыворотки не лимитирует развитие миогенной дифференцировки, но задерживает этот процесс (Одинцова, 2001).

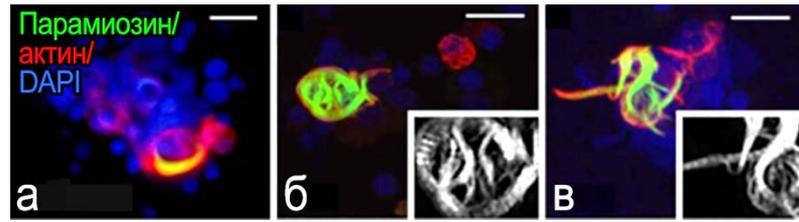


Рисунок 6. Клетки личинок мидии, культивированные на коллагене в течение 6 ч (а), 2 и 20 суток (б и в, соответственно) (Odintsova et al., 2010).

Ингибитор интегриновых рецепторов, RGDS-пептид блокировал миогенную дифференцировку в культуре клеток, тогда как инкубация с контрольным RGEK-пептидом не влияла на развитие миогенной дифференцировки. Результаты экспериментов показывают, что в дифференцировке мышечных клеток мидии *M. trossulus in vitro* задействован интегрин-зависимый механизм, однако, тип интегринов, участвующих в дифференциации мышечных клеток, не был установлен (Odintsova et al., 2010).

На ранних этапах миогенной дифференцировки мидии была обнаружена поперечная исчерченность клеток в культуре (Дячук, 2008), которая характерна для мышц ранних стадий личиночного развития мидии - велигера (Одинцова и др., 2007). В отличие от позвоночных, для которых характерна многоядерность мышечных волокон, образующихся в результате слияния миобластов (Kelly, 1969; Pavlath, 2010), мышечные клетки моллюсков на всех этапах остаются одноядерными (Le Marrec-Croq et al., 1999; Sanger et al., 2005; Odintsova et al., 2010). На поздних стадиях культивирования поперечно-полосатая исчерченность была утрачена, и формировались функционально полноценные гладкомышечные клетки, обладающие тем же набором основных мышечных белков и спектром двигательной активности, что и гладкомышечные клетки мидии, дифференцировавшиеся *in vivo* (Plotnikov et al., 2003; Odintsova et al., 2010).

С помощью полученных антител к мышечным белкам толстых филаментов мидии (миозина, параамиозина или твитчина) и коммерческих антител к нейромедиаторам, серотонину и FMRF-амиду, установлено, что на начальных

этапах культивирования мышечные и нейрональные элементы располагаются хаотично, но на более поздних стадиях происходит ассоциация клеток в колонии (Дячук, 2008), в центре которых располагаются нейрональные (FMRF- и 5HT-иммунопозитивные) клетки, а по периферии мышечные (миозин-, параамиозин- или твитчин-иммунопозитивные) клетки. Такие агрегаты объединялись с другими группами мышечных клеток, формируя сокращающуюся сеть (Дячук, 2008; Odintsova et al., 2010).

Адгезия клеток в культуре

Состав субстратов определяет адгезивное поведение клеток, влияя на состояние рецепторов адгезии. Адекватные субстраты важны как для увеличения метаболической активности клеток, так и для их роста. Прикрепление клеток в культуре и их пролиферацию можно существенно изменить, используя различные адгезивные вещества для покрытия поверхностей культуральных сосудов (Одинцова, 2001). Так, при использовании различных субстратов было зафиксировано изменение синтеза РНК в первичных культурах клеток двустворчатых моллюсков от 2 до 18 раз (Odintsova et al., 1994). Оптимальным субстратом для обеспечения высокого уровня синтеза РНК в клетках мидии являются коллаген (Odintsova et al., 1994; Одинцова, 2001). Наиболее выражен эффект у личиночных клеток (рисунок 7).

В культивируемых клетках моллюсков распластывание не является определяющим фактором для восстановления синтеза РНК (Одинцова, 2001), тогда как для клеток млекопитающих даже прикрепление достаточно для восстановления синтеза белков (Исаева, 1994). Направление и скорость дифференцировки может определяться контактом клетки с субстратом.

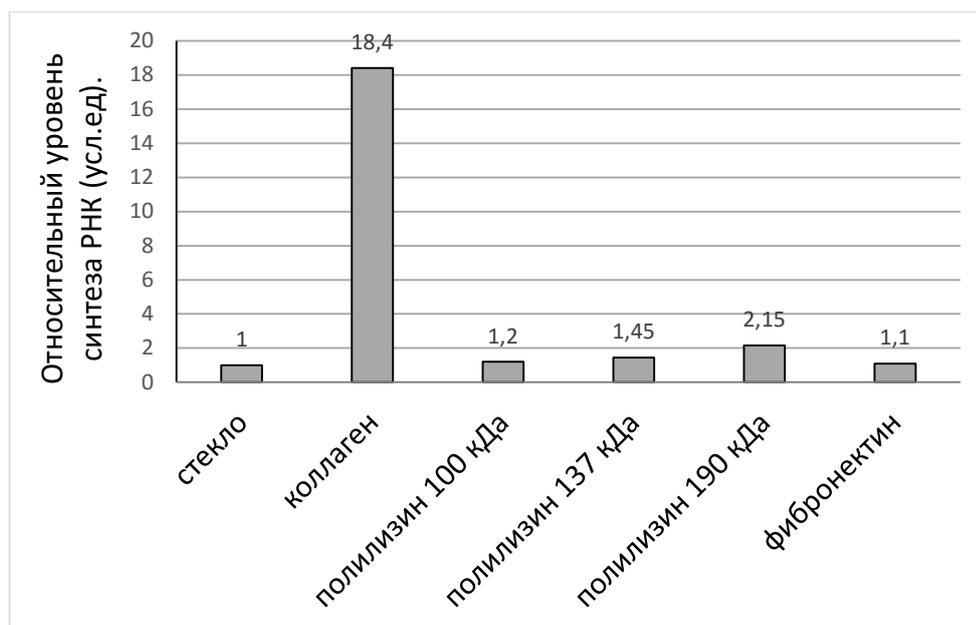


Рисунок 7. Относительный уровень синтеза РНК в культивируемых клетках личинок мидии в зависимости от используемых субстратов. Уровень синтеза РНК клетками на стекле принят за единицу (Odintsova et al., 1994).

*Нарушения адгезии клеток личинок мидии *M. trossulus**

Нарушения адгезии клеток можно обнаружить только в культуре клеток. *In vivo* связывание интегринов с лигандами сопровождается образованием мостиков между матриксом, актиновым цитоскелетом и интегринными, которые концентрируются в кластерах фокальной адгезии (van der Flier, Sonnenberg, 2001). Образование кластеров адгезии – интегрин-зависимый процесс. Например, прикрепление фибробластов к фибронектину индуцирует образование фокальной адгезии, тогда как этот эффект отсутствует при адгезии на конконавалине, который не взаимодействует с интегринными (Mueller et al., 1989). Кластеры фокальной адгезии могут образоваться не только на матриксных белках, но и на других субстратах, которые связывают интегрин, например, иммобилизованных анти-интегриновых антител. Такой подход часто используют для специфической активации индивидуальных рецепторов (Kozlova et al., 2001).

Известно, что у позвоночных животных в присутствии таких агентов, как ингибитор интегриновых рецепторов, RGDS-пептид, и хелатирующие агенты, связывающие двухвалентные катионы (ЭДТА и ЭГТА), а также в результате замораживания-оттаивания происходят изменения в адгезии клеток и белках цитоскелета (Yamada, Kennedy, 1987; Owens et al., 1991; Hynes, 1992; Liu, McGrath, 2005; Terry et al., 2007).

Установлено, что добавление RGDS-пептида и хелатирующих агентов и стрессовое влияние низких температур приводит к нарушениям адгезии в культурах клеток моллюсков, и, как результат, к частичному разрушению взаимодействий рецепторов адгезии (интегринов) с белками межклеточного матрикса (Odintsova, Maiorova, 2012; Maiorova, Odintsova, 2015).

Механизмы регуляции процессов роста и дифференцировки клеток определяются связыванием клеточных поверхностных рецепторов (в том числе, интегриновых рецепторов) с молекулами факторов роста и компонентами ВКМ. Как показано ранее для устрицы, так и наши данные (на примере мидии) демонстрируют некоторое сходство (около 60%) β -интегрин-подобных белков двустворчатых моллюсков с их гомологами среди интегринов позвоночных. Поскольку структура и функции интегринов у беспозвоночных напоминают структуру и функции интегринов позвоночных, эти исследования могут внести существенный вклад в наше понимание данной группы рецепторов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Животные

В качестве объектов исследования были использованы эмбрионы, личинки, взрослые особи мидии *M. trossulus*, а также их клетки в условиях культуры. Взрослые животные были собраны в заливе Восток Японского моря (морская биологическая станция “Восток”), помещены в ванны с проточной морской водой при температуре 11–15°C и перед началом эксперимента промыты два-три раза фильтрованной морской водой, обработанной ультрафиолетом. Нерест индуцировали термическим шоком: животных сначала помещали на 8–10 ч в охлажденную до 10°C морскую воду, а затем переносили в морскую воду, нагретую до 20°C. Эмбриональный материал получали путем искусственного оплодотворения, смешивая яйцеклетки и сперматозоиды из расчета 1–2 спермия на одну яйцеклетку. Интервал между индукцией нереста и моментом оплодотворения не превышал 50 мин. В дальнейшем эмбрионы и личинки были культивированы в аквариумах (5 л) – при 16–17°C в термостате и собраны на газ (диаметр ячеи 30 мкм) со следующих стадий: бластула (11–12 ч после оплодотворения), трохофора (19, 24 ч) и велигер (48–61 ч). Для получения культур клеток личинок растили до стадии средней трохофоры (22 ч после оплодотворения, при 17°C). Состояние личинок было проверено с помощью визуального контроля на инвертированном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия).

2.2. Первичные культуры клеток мидии

Первичные культуры гемоцитов

Неразбавленную гемолимфу, содержащую гемоциты, набирали из заднего аддуктора мидии в 1-мл стерильный шприц, и по 100 мкл гемолимфы наносили на покровные стекла (18x18x0,17 мм; Menzel, Германия). Клетки прикреплялись в

течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Гемоциты после 24 ч культивирования промывали 3 раза стерильной морской водой, фиксировали 4% параформальдегидом (ПФА, Sigma, США) на фосфатном буфере (ФБ) в течение 10 мин, и трижды промывали холодным ФБ. Препараты хранили в ФБ с 0,05% NaN_3 при 4°C до окраски.

Культура клеток личинок

Личинки были собраны на стерильный нейлоновый газ с размером ячеек в 30 мкм. Первичные культуры клеток мидии *M. trossulus* получали по методу Одинцовой (Одинцова, 2001). 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. Все растворы для промывок (морская вода и искусственный раствор морской воды без Ca^{2+} и Mg^{2+} (CMFSS)) содержали антибиотики: гентамицин (40 мг/л), пенициллин (G, 100 единиц/мл) и стрептомицин (0,1 мг/мл). Полученную суспензию клеток фильтровали через стерильный газ (диаметр ячеек 20 мкм) для освобождения от крупных агрегатов клеток, дважды промывая стерильным раствором CMFSS. Концентрация клеток при посадке на субстраты во всех экспериментах составляла 3×10^6 клеток/мл. Для культивирования клеток использовали модифицированную (Odintsova et al., 1994) среду Лейбовича L-15 (Sigma) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК, Sigma), инсулина (2 мг/л, Sigma), гентамицина (40 мг/л) и витамина Е (1,75 мг/л). Осмотичность модифицированной среды соответствовала осмотичности морской воды (1100 мОсмоль).

Клетки личинок культивировали на покровных стеклах (Menzel) в чашках Петри (Lux, Швеция) или в 24-луночных плато (Nunc, Дания) при 17°C. На покровные стекла предварительно были нанесены растворы адгезивных молекул в течение ночи при 4°C: коллаген I типа (0,1 мг/мл, Sigma), поли-D-лизин с м. м. 190 кДа (10 мг/мл, Sigma), фибронектин из плазмы человека (0,01 мг/мл, Sigma) или ламинин 2/4 человека (0,1 мг/мл, любезно предоставлен к.б.н. И.В. Воронкиной

(Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург)). Перед посадкой клеток стекла с субстратами были трижды промыты стерильной морской водой при комнатной температуре.

Жизнеспособность клеток определяли методом прямого подсчета в камере Горяева после инкубации с трипановым синим (Serva, Германия). При инициации культуры жизнеспособность клеток составляла 94–99%. Первую полную смену среды проводили через одни сутки после посадки клеток. Последующие смены среды (50% объема) проводили в зависимости от состояния первичной культуры клеток через 3–5 суток.

2.3. Выделение РНК

Все этапы выделения проводили при комнатной температуре. Суспензии эмбрионов или личинок (0,05–0,1 мл), или ткани и клетки взрослых моллюсков (50–100 мг) гомогенизировали в 15–20 кратном объеме тризола (Thermo Fisher Scientific, США), после инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре гомогенат переносили в новые пробирки для центрифугирования (10 мин при 13000 об/мин, центрифуга ТОМУ MX-300, Япония). Супернатант опять переносили в новые пробирки, добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали и инкубировали в течение 2 мин. Затем смесь центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин, и водную фазу, содержащую РНК, переносили в новые пробирки, добавив равный объем 100% этилового спирта. РНК очищали от примесей на колонке, используя набор RNeasy Mini (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. На одном из этапов очистки РНК производили инкубацию с ДНКазой I (Fermentas, США) непосредственно на фильтре колонки. Очищенную РНК элюировали в 30 мкл воды, свободной от РНКаз. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific, США) при длине волны 260 нм. Качество выделенной РНК оценивали с помощью микрофлюидной системы Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) с использованием

чипов Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano или RNA 6000 Pico в соответствии с инструкциями производителя. Водный раствор РНК хранили при -80°C .

2.4. Секвенирование

Подготовка библиотек для высокопроизводительного (NGS) секвенирования

Библиотеки готовили на основе набора TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. Очищенную на магнитных частицах (RNA Purification Beads, Illumina) мРНК (5 мкг) фрагментировали, а затем синтезировали первую и вторую цепи кДНК; фрагменты кДНК аденилировали по 3' концу, амплифицировали и очищали от компонентов реакционной смеси на магнитных частицах Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Полученные фрагменты кДНК каждой библиотеки лигировали с соответствующими специфичными адаптерными последовательностями.

Оценку качества библиотек проводили с помощью микрофлюидной системы Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) с использованием чипа Agilent Bioanalyzer DNA High Sensitivity chip. Библиотеку считали качественной, если размер фрагментов ДНК был в диапазоне длин от 150 до 500 пар нуклеотидов. Количественную оценку библиотек проводили с помощью ПЦР в реальном времени на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Пробоподготовку осуществляли с помощью набора KAPA Library Quantification Kit Illumina platform (Kapa Biosystems, США); готовили 4000 и 8000-кратные разведения очищенных библиотек и серию разведений стандартов.

Секвенирование проводили на секвенаторах следующего поколения Miseq и HiSeq (Illumina, США) (Центр исследований геномики морских организмов Института науки и технологии (OIST), Окинава, Япония). Фрагменты

секвенировали с двух концов по 280–300 нуклеотидов в соответствии с инструкциями производителя.

Удаление адаптерных последовательностей, слишком коротких фрагментов и участков с низкими индексами качества секвенирования (Phred) осуществляли с помощью программы Trimmomatic (Bolger et al., 2014), при этом данные для сборки транскриптома были обработаны с использованием параметров: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36, а данные для подсчета количественной экспрессии были обработаны с использованием более «строгих» параметров: LEADING:3 TRAILING:3 HEADCROP:6 MAXINFO:100:1 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36. Качество отсеквенированных фрагментов до и после обработки Trimmomatic оценивали с помощью программы FastQC (Andrews S. FastQC. <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Характеристика библиотек и количественная оценка данных, полученных на секвенаторах MiSeq и HiSeq для каждой библиотеки, представлены в Таблице 1.

2.5. Сборка транскриптома

Сборку транскриптома *de novo* и все этапы биоинформатического анализа, требующие высоких вычислительных мощностей, производили на кластере Вычислительного центра ДВО РАН с использованием программы Trinity (версия r20140413p1) (Haas et al., 2013). Анализ качества транскриптомной сборки осуществляли с помощью программы QUAST (Gurevich et al., 2013) и с помощью скрипта TrinityStats.pl (входит в пакет Trinity). Чтобы оценить уровень экспрессии генов в данных массового параллельного секвенирования, использовали выравнивание прочтений (фрагментов) на полученные транскрипты с помощью алгоритма RSEM (интегрирован в Trinity), а затем анализировали значения FPKM (количество картированных на транскрипт фрагментов в пересчете на 1000 нуклеотидов длины транскрипта и на 10^6 картированных фрагментов от их общего

числа). В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ген фактора элонгации EF1 α , по уровню которого нормализовали полученные показатели количественной экспрессии транскриптов β -интегрин-подобных белков мидии,

2.6. Анализ белковых последовательностей β -интегрин-подобных белков различных животных

В полученных транскриптах были предсказаны открытые рамки трансляции с помощью программы Transdecoder (<http://transdecoder.sf.net>) с использованием установленных по умолчанию параметров. Поиск гомологов β -интегринов осуществляли с помощью алгоритмов BLASTp и BLASTx против баз данных NCBI Nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Swissprot (<http://www.uniprot.org/>).

Аминокислотные последовательности предполагаемых β -интегрин-подобных белков мидии и известные последовательности β -интегринов некоторых других организмов из разных таксономических групп были выровнены с использованием алгоритма ClustalW, при этом выравнивание было вручную откорректировано по положениям 56 консервативных цистеиновых остатков. Визуализация выравнивания проведена с помощью программы JalView. 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. Эволюционные расстояния были рассчитаны на основе JTT-матрицы; длины ветвей деревьев пропорциональны количеству аминокислотных замен на каждый сайт. В обоих случаях статистический бутстрэп включал генерацию 500 повторов.

Таблица 1. Концентрации и значения средних длин фрагментов кДНК библиотек. Количественная оценка данных, полученных на секвенаторах MiSeq и HiSeq.

Образец	Концентрация библиотеки, нМ	Средняя длина фрагментов, н.п.	Количество прочтений		Доля прочтений, использованных для сборки транскриптома, %	Доля прочтений, использованных для анализа количественной экспрессии, %		Доля прочтений, успешно картированных на транскриптом, %	
			MiSeq	HiSeq	MiSeq	MiSeq	HiSeq	MiSeq	HiSeq
Ооциты	270,80	447	3088489	24463500	79,5	79,3	90,5	58,6	58,5
Оплодотворенная яйцеклетка	35,10	409	2869307	27053170	77,4	77,3	90,0	62,2	62,2
Дробление, 2 ч	350,82	485	4267044	25170927	91,0	90,8	89,5	57,6	56,6
Бластула, 11 ч	110,42	410	2692405	25734753	78,0	78,0	90,3	62,7	62,7
Трохофора, 17 ч	94,17	417	2289399	23263384	78,0	78,0	89,8	62,2	62,1
Трохофора, 21 ч	64,94	426	2929434	32987911	76,4	76,3	89,6	62,9	62,7
Трохофора, 23 ч	432,93	463	4371898	18494295	89,8	89,6	88,9	61,6	61,0
Трохофора, 24 ч	343,86	490	2853912	20215770	79,6	79,5	92,4	59,9	59,7
Велигер, 51 ч	82,80	445	3793360	17114374	77,6	77,6	93,3	62,4	62,2
Велигер, 55 ч	440,75	481	5644674	30675844	81,7	81,5	92,6	61,9	62,1
Аддуктор	57,01	480	1062211	25895022	84,9	84,9	92,0	73,4	72,9
Жабры	60,23	487	1082172	18020820	84,1	84,1	91,8	64,7	62,3
Гонады (мужские)	77,07	464	847069	42820964	85,7	85,7	93,4	56,1	55,0
Пищеварительная железа	46,91	404	802017	19894536	85,5	85,5	93,9	66,2	64,6
Мантия	28,41	436	989591	28220848	83,0	83,0	93,1	72,9	70,8
Гемоциты	34,44	401	793843	15570065	85,9	85,8	94,5	62,6	61,1

2.7. Исследование адгезии клеток

Для исследования механизмов функционирования β -интегрин-подобного белка в контрольных экспериментах по клеточной адгезии были использованы интегрин-блокирующий тетрапептид Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) и неспецифичный Arg-Gly-Glu-Ser (RGES) пептид как контроль (оба из Sigma). Концентрированные растворы пептидов (20 мМ) на ФБ, pH 7,8, хранились при -20°C до экспериментов; перед посадкой клеток пептиды были добавлены в среду до конечной концентрации 2 мМ. В другой серии экспериментов, хелатирующие агенты, связывающие двухвалентные катионы (ЭДТА или ЭГТА; Molecular Probes, США), были добавлены (в концентрации 1 мМ и 5 мМ) к среде во время посадки клеток. После инкубации в течение 24 ч, клетки были фиксированы для иммунохимического анализа.

Нарушения адгезии после замораживания-оттаивания

Чтобы определить изменения в цитоскелетных структурах и распределение β -интегрин-подобного белка после криоконсервации в клетках личинок мидии, клетки замораживали до температуры жидкого азота (-196°C) в присутствии проникающих криопротекторов (диметилсульфоксида (ДМСО) и этиленгликоля (ЭГ), при их конечной концентрации 5–10% (объемная доля)) и непроникающих криопротекторов (трегалозы (ТР) и поливинилпирролидона (ПВП), при их конечной концентрации 10–15 мг/мл). Криозащитную смесь готовили на основе стерильной морской воды (с соленостью 32‰). Суспензию клеток (0,6 мл, $5\text{--}6 \times 10^6$ клеток/мл) переносили в криопробирки (TRP, Швейцария) объемом 2 мл и постепенно (в течение 5–7 мин) добавляли 1,2 мл криозащитной смеси. Образцы выдерживали на ледяной бане в течение 10 минут.

Чтобы снизить количество тестируемых вариантов, использовали трехступенчатое замораживание, как описано в (Odintsova et al., 2015). Через 1–100 суток хранения в жидком азоте криопробирки размораживали на водяной бане при 30°C с постоянным перемешиванием (скорость оттаивания $42\text{--}45^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Сразу

после оттаивания содержимое криопробирок переносили в стерильные пробирки, постепенно разбавляя в 10 раз стерильной морской водой (в течение 3–5 минут) при 0°C. Клетки осаждали с помощью центрифуги Allegra X-22R (Beckman-Coulter, США) при скорости 1000 g в течение 10 минут. После повторной промывки осадка стерильной морской водой, к нему добавляли 0,6 мл модифицированной питательной среды L-15 с 2% ЭСК, пенициллином и стрептомицином, отбирали аликвоты для определения концентрации клеток и их жизнеспособности. В качестве положительного контроля использовали незамороженные клетки. Каждый эксперимент повторяли трижды.

2.8. Характеристика используемых антител

Для иммунохимического маркирования мышечных клеток использовали полученные в нашей лаборатории поликлональные антитела кролика к: парамиозину в разведении 1:800; миозину в разведении 1:800 и твитчину в разведении 1:800. Их специфичность для моллюсков была проверена ранее (Odintsova et al., 2006). Для маркирования нейрональных элементов были использованы поликлональные антитела кролика к серотонину или FMRF-амиду (Immunostar, США), в разведении 1:2000. Специфичность используемых в работе антител к нейромедиаторам была ранее показана на личинках мидии *M. trossulus* (Voronezhskaya et al., 2008).

Детекцию пролиферирующих клеток проводили с помощью моноклональных антител крысы к гистону H3, фосфорилированного по серину (клон HTA28, Abcam, США; разведение 1:500). Специфичность этого клона антител к фосфорилированному гистону H3 была показана на многих типах клеток позвоночных и беспозвоночных животных (Кирик и др., 2009). Для выявления клеток S-фазы использовали моноклональные антитела мыши к PCNA (клон PC10, Abcam, США) в разведении 1:2000. Специфичность этого клона антител была ранее показана на тканях моллюсков (Marigomez et al., 1999; Hanselmann, Smolowitz,

2000). Для визуализации ресничных клеток использовали моноклональные антитела мыши к ацетилированному α -тубулину (Sigma; разведение 1:500), специфичность которых для моллюсков была показана ранее (Voronezhskaya et al., 2008).

Для выяснения локализации интегринов были использованы два клона моноклональных антител мыши к внеклеточному домену субъединицы β 1 интегрина человека - P4G11 и LM534 (клоны МАВ 1951 и МАВ 1981, Chemicon, Германия, соответственно; разведение 1:1000 – 1:500), которые распознают два различных эпитопа внеклеточного домена интегрина (рисунок 8).

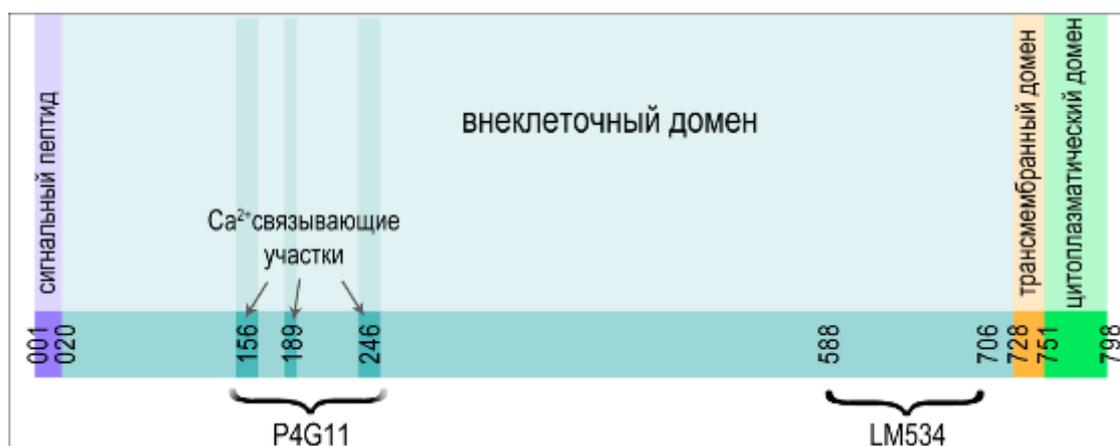


Рисунок 8. Топография белковой цепи β 1-субъединицы интегрина человека. Цифрами обозначены положения аминокислотных остатков. Отмечены участки, распознаваемые клонами P4G11 и LM534 (Chemicon) (схема нарисована на основе данных сайта: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05556>).

Для выявления фибронектин-подобных белков в личинках, органах и клетках мидии использовали поликлональные антитела кролика к фибронектину из плазмы крови человека (клон F-3648, Sigma; разведение 1:500).

В качестве вторичных антител использовали антитела козы к антителам мыши (GAM), кролика (GAR) или крысы (GARat), конъюгированные с различными флуорохромами: GAM Alexa Fluor 488, GAM Alexa Fluor 546, GAM Alexa Fluor 633, GAR Alexa Fluor 488, GAR Alexa Fluor 546 или GARat Alexa Fluor 568 (Molecular

Probes, США; разведение 1:1000). Растворы вторичных антител были приготовлены на ФБ. Стандартные контроли включали материал, инкубированный только с вторичными антителами.

Для одновременного выявления локализации β -интегрин-подобного белка и ресничных элементов препараты инкубировали последовательно сначала с первичными антителами к β 1-интегрину и соответствующими вторичными антителами GAM Alexa Fluor 488 IgG, а затем после отмывок, инкубировали с первичными антителами к ацетилированному α -тубулину и вторичными антителами GAM Alexa Fluor 633 IgG. Для одновременного выявления фибронектин-подобного белка и элементов мышечной системы личинок мидии препараты инкубировали последовательно сначала с первичными антителами к фибронектину и соответствующими вторичными антителами GAR Alexa Fluor 488 IgG, а затем после отмывок, инкубировали с первичными антителами к миозину и вторичными антителами GAR Alexa Fluor 546 IgG.

2.9. Вестерн-блот анализ

С целью проверки специфичности работы нескольких клонов антител к β 1-интегрину человека и фибронектину плазмы крови человека на материале моллюсков использовали электрофоретическое разделение белков лизатов личинок и некоторых тканей и клеток взрослых мидий с последующим иммуноблотингом, как описано ранее (Towbin et al., 1979).

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСNa

Разделение белков проводили в 10% (для идентификации β -интегрин-подобного белка) и в 4–10% градиентном (для идентификации Фб-подобных белков) полиакриламидном геле в присутствии 0,1% ДСNa. Разделяющий гель был приготовлен на основе 1,5 М трис-НСl буфера (рН 8,8) и акриламида (10% или 5–10% градиент), содержащего 1/30 часть метилен-бис-актиламида. Смесь

дегазировали, создавая пониженное давление. Полимеризация геля проходила в течение 40 мин. Для формирования ровной границы геля использовали насыщенный водой бутанол. После полимеризации разделяющего геля и промывки его верхней границы, заливали концентрирующий гель, приготовленный на основе 0,5 М трис-НСl буфера (рН 6,8) и акриламида (3,5% или 5%), содержащего 1/30 часть метилен-бис-актиламида, 0,01% ТЕМЕДа и 1% персульфата аммония. Полимеризация геля проходила в течение 20 мин.

Электродный буфер содержал 0,2 М трис-глицинового буфера (рН 8,8) и 0,1% ДСNa. Белковые препараты наносили в лунки по 15 мкл. Предварительный электрофорез проводили при плотности тока 20 мА в течение 15–20 мин до вхождения белков в концентрирующий гель, а затем плотность тока при электрофорезе поддерживали на уровне 45 мА на пластину.

Приготовление проб для электрофореза

Осажденные суспензии яйцеклеток или личинок *M. trossulus* (на стадии бластулы (12 ч), трохофоры (19 ч и 26 ч) или велигера (56 ч) хранили в сосудах Дьюара с жидким азотом до использования. Оттаянные образцы гомогенизировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 100 мМ ДТТ, 2% ДСNa, 10% глицерин и 0,001% бромфеноловый синий), затем кипятили 5 мин при 95°C, и центрифугировали для удаления нерастворимых компонентов 10 мин при 13000 об/мин, центрифуга Eppendorff, Германия), а супернатант переносили в новые пробирки и использовали в качестве проб для электрофореза. Кроме того, аналогичным образом были приготовлены тотальные белковые экстракты из свежесыведенных тканей взрослых мидий *M. trossulus* и *Graenomytilus grayanus*: мышечной ткани заднего аддуктора и тканей пищеварительной железы. Для этого кусочки ткани (около 50 мг образца) дважды промывали стерильной морской водой и измельчали тefлоновым пестиком в пробирках типа Эппендорф перед добавлением лизирующего буфера. Гемоциты осаждали центрифугированием гемолимфы при 200 g в течение 10 мин при +4 °C, а осадок лизировали так же, как

описано для личинок и тканей. В качестве маркеров молекулярного веса использовали препарат маркеров молекулярного веса широкого диапазона от 6500 до 200000 Да (Sigma).

Перенос на мембраны

Материал переносили на нитроцеллюлезные (Millipore, Германия) или PVDF мембраны (Bio-Rad, США), для идентификации β -интегрин-подобного белка и Фб-подобных белков, соответственно, в трис-глицин/метанольном буфере (pH 8,3) с добавлением ДСNa (0,1%) в камере для «мокрого» переноса (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя при напряженности поля 0,9 мА/см², в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Для проверки качества переноса белков на мембрану использовали краситель Понсо (Ponceau S, Sigma). Мембрану отмывали Т-ТБ (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20, pH 7,5) и для предотвращения неспецифического связывания инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 5% сухого обезжиренного молока (Sigma), приготовленного на Т-ТБ, в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с первичными моноклональными антителами мыши или кролика проводили в течение 12 ч при +4°C на шейкере. Раствор первичных антител был приготовлен на Т-ТБ и содержал 1% сухого молока. Последующие отмывки проводили в Т-ТБ.

В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с щелочной фосфатазой антитела козы к иммуноглобулинам мыши или кролика (Sigma; разведение 1:5000). Мембрану инкубировали с вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре с последующими отмывками Т-ТБ, далее ее помещали в раствор для проявления активности фосфатазы, содержащий субстраты BCIP (5-бromo-4-хлоро-3 индолилфосфат, 100 мкг/мл) и NBT (нитроголубой тетразолиум, 200 мкг/мл) (Sigma) на 30 сек и отмывали Т-ТБ. После проявления цветной реакции мембрану отмывали дистиллированной водой и высушивали. Для контроля нагрузки по белку в наносимом образце, ту же самую мембрану инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши к актину (клон С4/МАВ 1501,

Sigma; разведение 1:5000), затем с вторичными антителами GAM и проявляли по методике, описанной выше.

2.10. Иммунохимическая окраска клеток *M. trossulus in vivo*

Для выявления специфических маркеров в клетках *M. trossulus* использовали метод непрямого иммуоцитохимического окрашивания. Эмбрионы и личинки мидии фиксировали 4%-ным раствором ПФА при +4°C в течение 6 ч. Затем препараты три раза промывали ФБ и хранили в ФБ с 0,03% NaN₃ до окрашивания при +4°C. Для предотвращения неспецифического связывания антител материал инкубировали в блокирующем буфере (ББ), содержащем 10% нормальной козьей сыворотки (НКС), 0,25% бычьего сывороточного альбумина (БСА), Тритон X-100 (1%), и 0,03% NaN₃ в ФБ 12 ч при +4°C. Затем материал инкубировали в смеси первичных антител, приготовленных на ББ, в течение не менее 48 ч. После отмывок ФБ (3 раза по 10 мин), к препаратам были добавлены вторичные антитела, конъюгированные с различными флуорохромами, на 24 ч при +4°. Ядра клеток личинок окрашивали, используя флуоресцентный маркер ДНК - DAPI (Molecular Probes; концентрация 0,1 мкг/мл) в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого материал трижды отмывали ФБ и заключали в Mowiol 4-88 (Calbiochem, Германия), содержащий 2,5% DABCO (Sigma), препятствующий выгоранию флуорохрома. Для выявления фибриллярного актина использовали фаллоидин, меченый TRITC (Molecular Probes; разведение 1:100), который добавляли к препаратам на этапе инкубации с вторичными антителами.

2.11. Иммунохимическая окраска клеток *M. trossulus in vitro*

Диссоциированные клетки личинок мидии через различные интервалы времени после посадки (2–32 ч, 3–15 сут), и гемоциты после 24 ч культивирования промывали два раза стерильной морской водой и фиксировали 4%-ным раствором

ПФА 7–10 мин при комнатной температуре. Затем клетки три раза промывали ФБ и хранили в ФБ с 0,03% NaN_3 до окрашивания при $+4^\circ\text{C}$.

Для предотвращения неспецифического связывания антител клетки инкубировали в ББ, содержащем 10% НКС, 0,25% БСА, 0,1% Тритон X-100, и 0,03% NaN_3 в ФБ 1 ч, а затем в первичных антителах 2 ч при комнатной температуре или ночь при $+4^\circ\text{C}$ во влажных камерах. Все первичные антитела были приготовлены на основе ББ. После отмывок ФБ (3 раза по 10 мин), к препаратам были добавлены вторичные антитела и фаллоидин, меченые разными флуорохромами, на 1 ч при комнатной температуре. Далее материал отмывали трижды от красителя и заключали в среду Vectashield (Vector, США), содержащую DAPI.

2.12. Микроскопия и обработка изображений

Морфологический анализ клеточных культур был проведен при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 с 100×масляным иммерсионным объективом. Часть препаратов культивируемых клеток мидии была снята при помощи флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного приставкой ApoTome (Carl Zeiss, Германия), позволяющей получать оптические срезы, с использованием CCD камеры ApotomeCam (Carl Zeiss) и объектива Plan-Neofluar 100x/1,30 Oil.

Основной анализ и съемку эмбрионов и личинок мидии, а также гемоцитов и препаратов культивированных клеток, производили с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss), оснащенного аргоновым и тремя диодными лазерами, Центра коллективного пользования «Дальневосточный центр электронной микроскопии» ИБМ ДВО РАН. Изображения получали при следующих параметрах сканирования: шаг между анализируемыми слоями 0,3 – 0,8 мкм, размер сканируемой области около 100x100x30 мкм, разрешение получаемого изображения от 1024x1024 до 2048x2048 пикселей, глубина цвета 8

бит. Были использованы иммерсионные объективы EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil, Plan Achromat 63x/1,40 Oil, alpha Plan Achromat 100x/1,46 Oil.

На основе серий изображений строили трехмерные реконструкции, используя программы ImageJ (National Institutes of Health, США) и Imaris 6.3.1 (Bitplane AG, Швейцария). Измерения объектов и дальнейшую обработку изображений производили соответственно с помощью программ AxioVision 4,8 (Carl Zeiss) и Adobe Photoshop CS5 Extended 12,0,1 (Adobe Systems, США).

2.13. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов выполнена с применением программ Excel 2013 (Microsoft, США). Каждый эксперимент был выполнен не менее трех раз. Подсчет клеток проводили в двух параллельных образцах в каждом эксперименте на десяти случайно выбранных микроскопических полях, с анализом 1000–4000 DAPI-окрашенных клеток. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Полученные данные оценивали по спаренному *t*-критерию Стьюдента. Уровень значимости 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Выявление гомологов β -интегрин-подобных белков у мидии *M. trossulus*

В общей сложности собрано 200079 контигов со средней длиной 728 н.п. и медианной длиной 392 н.п. В Таблице 2 представлены данные, характеризующие собранный транскриптом.

Таблица 2. Общая характеристика собранного транскриптома

Количество контигов	200079
Количество «генов» без учета изоформ	155959
Количество контигов (>1000н.п.)	35270
Количество контигов (>5000н.п.)	1709
Количество контигов (>10000н.п.)	114
Количество контигов (>25000н.п.)	1
Общая длина контигов	145656866 н.п.
Общая длина контигов (>500н.п.)	104471164 н.п.
Средняя длина контига	728 н.п.
Медианная длина контига	392 н.п.
Самый длинный контиг	31400 н.п.
Средняя степень покрытия транскриптома	130 крат
GC(%)	34,03
N50	1126
N50 (с учетом только контигов >500 н.п.)	1804
L50 (с учетом только контигов >500 н.п.)	16377

Анализ транскриптома мидии показал, что он содержит четыре β -интегрин-подобных транскрипта (2834, 2858, 3534 и 3649 н.п.), являющиеся изоформами двух генов β -А и β -В. Изоформы β -А_{i1} и β -А_{i2} отличаются на одну вставку длиной в 24 н.п. в белок-кодирующем участке и наличием дополнительного фрагмента, имеющего длину 434 н.п., с 3'-конца последовательности у β -А_{i2}. Изоформы β -В_{i1} и β -В_{i2} не имеют отличий в белок-кодирующем участке, но отличаются по составу в нетранслируемом районе: β -В_{i2} имеет две небольшие вставки (3 и 12 н.п.) и дополнительные 99 н.п. с 3'-конца последовательности. Открытые рамки считывания в найденных транскриптах кодируют полноразмерные аминокислотные последовательности, имеющие выраженные домены, свойственные β -интегринам: цистеин-богатый стебель внеклеточного домена, трансмембранный и цитоплазматический домены. Три предполагаемые аминокислотные последовательности β -интегрин-подобных белков мидии имеют длину 793 а.о. для β -А_{i1}, 801 а.о. для β -А_{i2} и 805 а.о. для β -В_{i1} и β -В_{i2}. Во внеклеточном домене у всех трех предполагаемых белков 56 цистеиновых остатков формируют специфический для β -интегринов паттерн (Brower et al., 1997) (рисунок 9, рисунок 10).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей β -интегрин-подобных-белков мидии и основных известных β -интегринов других животных был проведен с использованием двух методов: метода ML (рисунок 11) и метода NJ (рисунок 12). Метод ML был ранее использован для анализа филогении известных интегринов (Knack et al., 2008). Вне зависимости от используемого метода, отличия в топологии филогенетических деревьев были минимальны. Основное отличие между деревьями связано с положением β v-интегрин дрозифилы. Трудность с определением филогенетического положения этого интегрин β v при использовании алгоритма RAUP была отмечена и другими авторами (Brower et al., 1997).

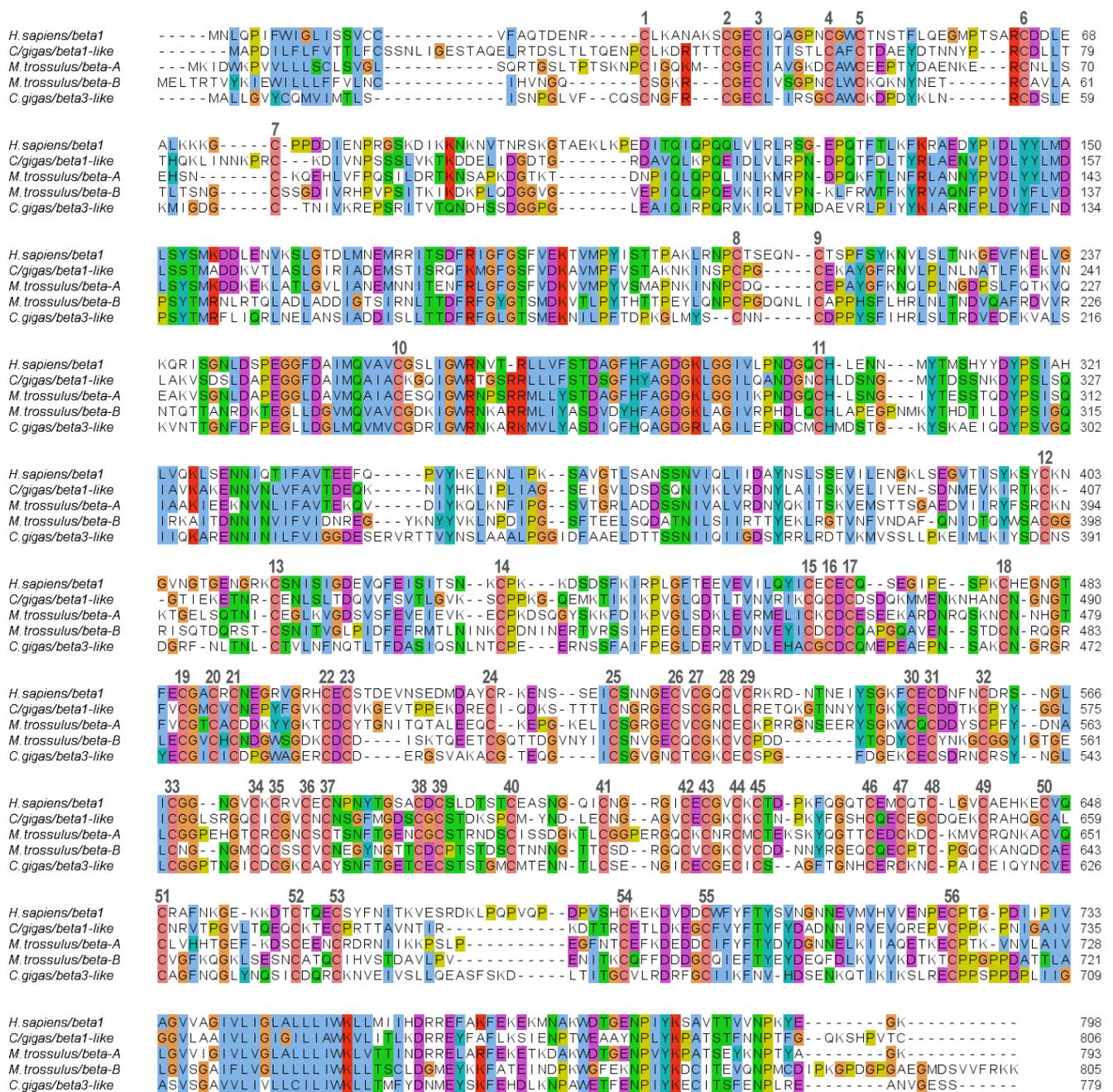


Рисунок 9. Выравнивание аминокислотных последовательностей β -интегрин-подобных белков мидии, устрицы и $\beta 1$ -интегрина человека. Аминокислотные остатки цистеина пронумерованы.

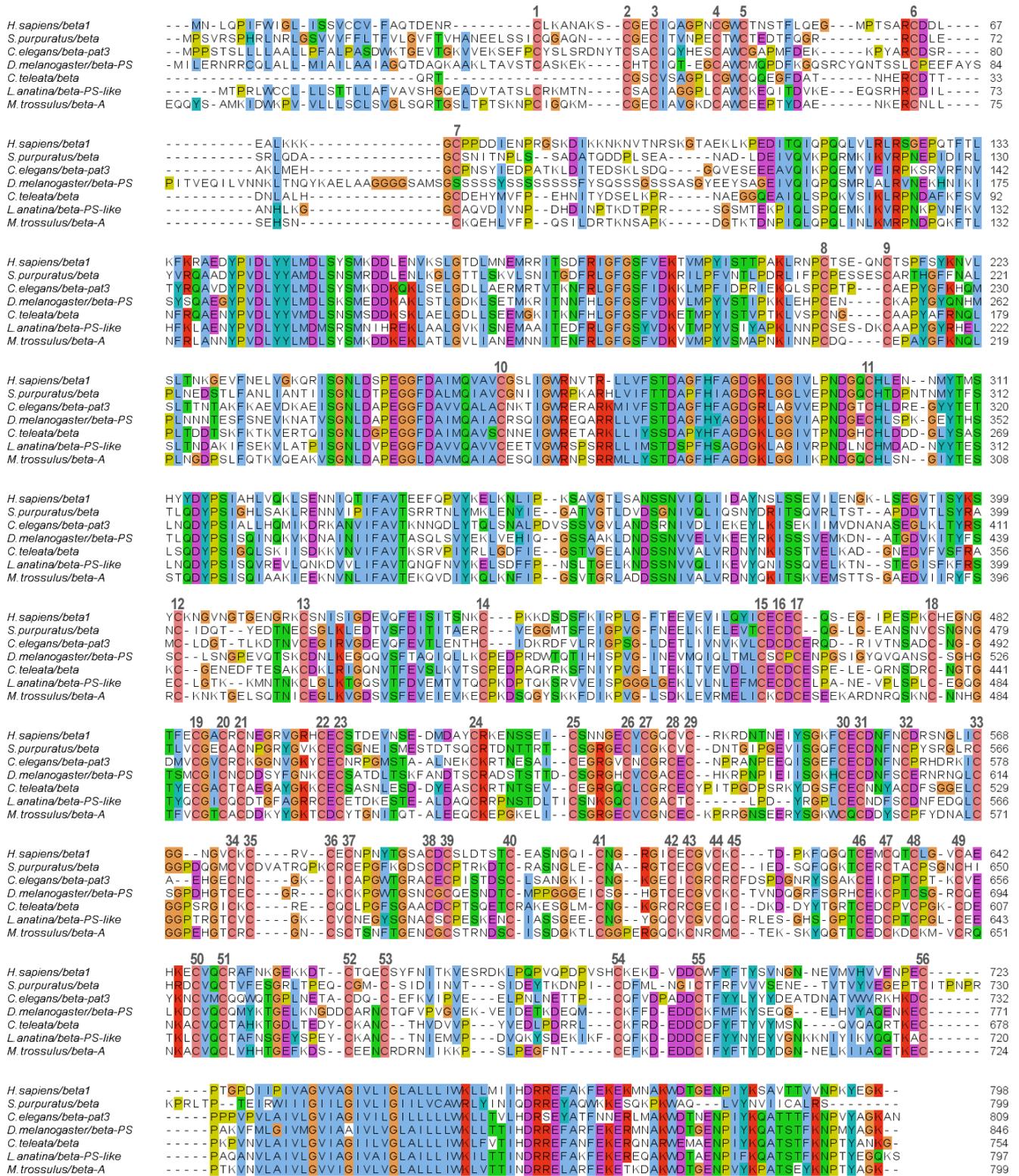


Рисунок 10. Выравненные аминокислотные последовательности β -интегрин-подобного белка мидии (β -A) и β -интегрин-подобных белков некоторых представителей позвоночных и беспозвоночных животных. Аминокислотные остатки цистеина пронумерованы.

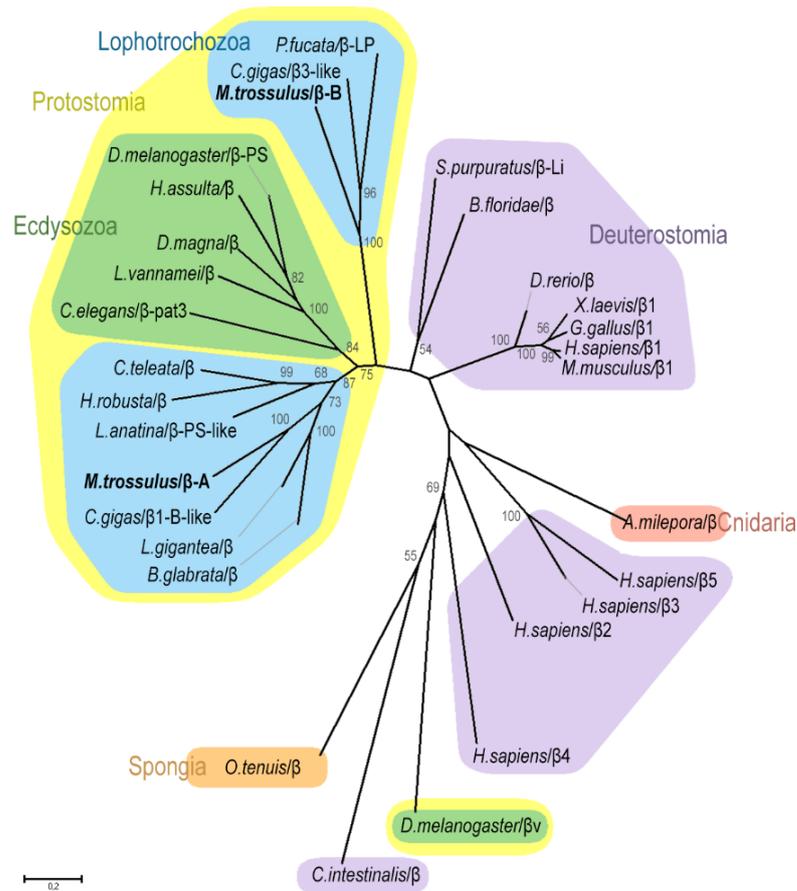


Рисунок 11. Филогенетическое дерево, показывающее отношения сходства между последовательностями β-интегрин-подобных белков у различных животных, реконструированное с помощью метода ML (на ветвях деревьев указаны значения бутстрэп-индексов, превышающие 50%). По данным GenBank: *C. gigas*/ β3-like (XP_011453738.1), β1-B-like (XP_011419533.1), *Lingula anatina*/β-PS-like (XP_013415842.1), и UniProt (SwissProt и TrEMBL): *Xenopus laevis*/ β1 (sp|P07228|ITB1_CHICK), *Gallus gallus*/ β1 (sp|P07228|ITB1_CHICK), *Homo sapiens*/ β1 (sp|P05556|ITB1_HUMAN), β3 (sp|P05106|ITB3_HUMAN), β5 (NP_002204.2), β2 (sp|P05107|ITB2_HUMAN), β4 (sp|P16144|ITB4_HUMAN), *Mus musculus*/ β1 (sp|P09055|ITB1_MOUSE), *Drosophila melanogaster*/ βv (sp|Q27591|ITBN_DROME), β-PS (sp|P11584|ITBX_DROME), *Caenorhabditis elegans*/ β-pat3 (sp|Q27874|PAT3_CAEEL), *Strongylocentrotus purpuratus*/ β-Li (tr|W4YJP5|W4YJP5_STRPU), *Branchiostoma floridae*/ β (tr|C3Y4C2|C3Y4C2_BRAFL), *Danio rerio*/ β (tr|Q3YAA0|Q3YAA0_DANRE), *Acropora millepora*/ β (tr|O17494|O17494_ACRMI), *Ciona intestinalis*/ β (tr|F6XBP2|F6XBP2_CIOIN), *Ophlitaspongia tenuis*/ β (tr|O18482|O18482_9METZ), *Biomphalaria glabrata*/ β (tr|O96444|O96444_BIOGL), *Lottia gigantea*/ β (tr|V4AU86|V4AU86_LOTGI), *Helobdella robusta*/ β (tr|T1EIY7|T1EIY7_HELRO), *Capitella teleata*/ β (tr|X2BBV3|X2BBV3_CAPTE), *Litopena eusvannameii*/ β (tr|D1MCA9|D1MCA9_LITVA), *Daphnia magna*/ β (tr|A0A0P5IU01|A0A0P5IU01_9CRUS), *Helicoverpa assulta*/ β (tr|A0A023UG44|A0A023UG44_HELAU), *Pinctada fucata*/ β-LP (tr|G9JKY4|G9JKY4_PINFU).

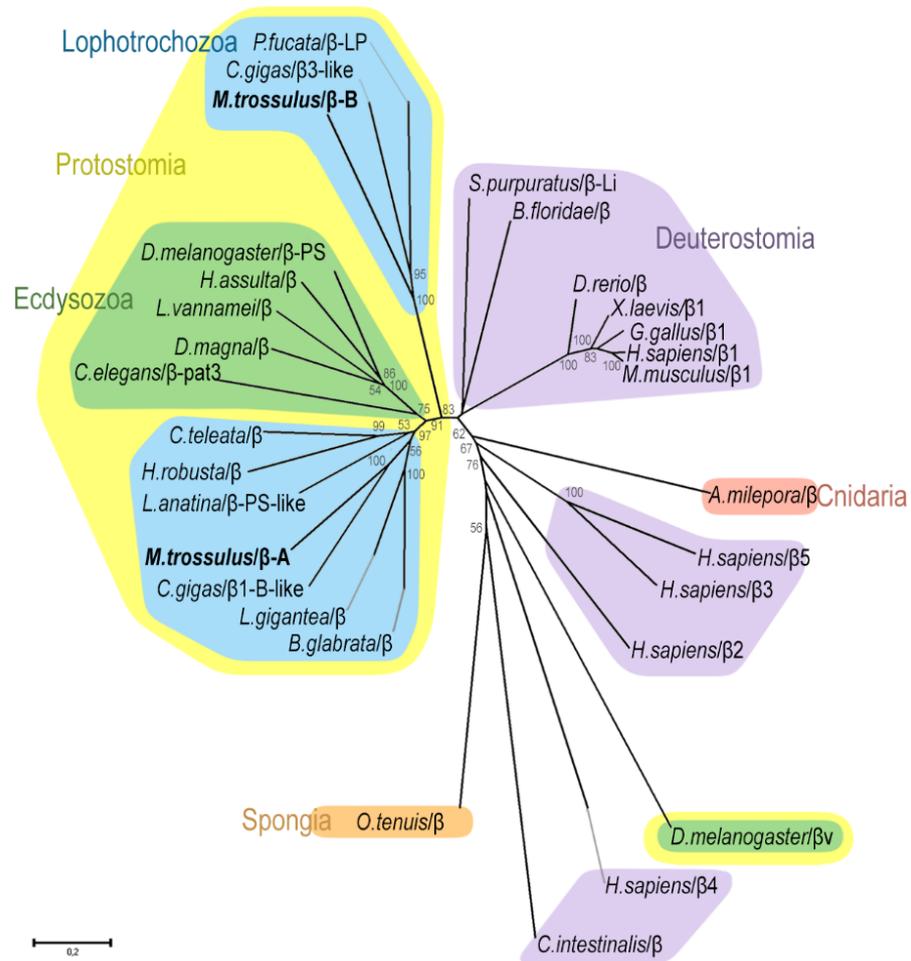


Рисунок 12. Филогенетическое дерево, показывающее отношения сходства между последовательностями β-интегрин-подобных белков у различных животных, реконструированное с помощью метода NJ (на ветвях деревьев указаны значения бутстрэп-индексов, превышающие 50%). По данным GenBank: *C. gigas*/β1-B-like (XP_011419533.1), β3-like (XP_011453738.1), *L. anatina*/β-PS-like (XP_013415842.1), и UniProt (SwissProt и TrEMBL): *X. laevis*/β1 (sp|P07228|ITB1_CHICK), *G. gallus*/β1 (sp|P07228|ITB1_CHICK), *H. sapiens*/β1 (sp|P05556|ITB1_HUMAN), β3 (sp|P05106|ITB3_HUMAN), β5 (NP_002204.2), β2 (sp|P05107|ITB2_HUMAN), β4 (sp|P16144|ITB4_HUMAN), *M. musculus*/β1 (sp|P09055|ITB1_MOUSE), *D. melanogaster*/βv (sp|Q27591|ITBN_DROME), β-PS (sp|P11584|ITBX_DROME), *C. elegans*/β-pat3 (sp|Q27874|PAT3_CAEL), *S. purpuratus*/β-Li (tr|W4YJP5|W4YJP5_STRPU), *B. floridae*/β (tr|C3Y4C2|C3Y4C2_BRAFL), *D. rerio*/β (tr|Q3YAA0|Q3YAA0_DANRE), *A. millepora*/β (tr|O17494|O17494_ACRMI), *C. intestinalis*/β (tr|F6XBP2|F6XBP2_CIOIN), *O. tenuis*/β (tr|O18482|O18482_9METZ), *B. glabrata*/β (tr|O96444|O96444_BIOGL), *L. gigantea*/β (tr|V4AU86|V4AU86_LOTGI), *H. robusta*/β (tr|T1E1Y7|T1E1Y7_HELRO), *C. teleata*/β (tr|X2BBV3|X2BBV3_CAPTE), *L. vannamei*/β (tr|D1MCA9|D1MCA9_LITVA), *D. magna*/β (tr|A0A0P5IU01|A0A0P5IU01_9CRUS), *H. assulta*/β (tr|A0A023UG44|A0A023UG44_HELAU), *P. fucata*/β-LP (tr|G9JKY4|G9JKY4_PINFU).

β -интегрины Первичноротых животных достоверно кластеризуются в одну группу, в которой можно выделить три подгруппы. β -интегрин-подобные белки мидии относятся к разным подгруппам: последовательность β -А с высоким уровнем поддержки образует подгруппу с β 1-интегрин-подобным белком устрицы *C. gigas*, а также с β -интегрин-подобными белками брюхоногих моллюсков *Lottia gigantean* и *B. glabrata*. Также к одной подгруппе относятся известные β -интегрин-подобные белки других представителей Lophotrochozoa: *Lingula anatina*, *Capitella teleata* и *Helobdella robusta*. Последовательность β -В с высоким уровнем поддержки образует подгруппу с β 3-интегрин-подобным белком устрицы *C. gigas* и β -интегрин-подобным белком жемчужницы *Pinctada fucata*.

Наибольший уровень сходства выявлен для интегрин-подобного белка β -А мидии и β 1-интегрин-подобного белка устрицы *C. gigas* (70% сходства), тогда как интегрин-подобный белок β -В мидии имеет 62% сходства с β 3-интегрин-подобным белком устрицы *C. gigas*. Сходство последовательностей β -интегрин-подобных белков мидии β -А и β -В с последовательностью β 1-интегрин человека составило 61% и 53%, соответственно (Таблица 3).

На рисунке 13 представлены результаты оценки количественной экспрессии генов β -интегрин-подобных белков мидии в личинках, в органах и клетках взрослых мидий (а). Результаты нормализованы относительно уровня экспрессии фактора элонгации EF1 α (б). Для транскрипта β -А_{i1} 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 β -А_{i2} экспрессируется только со стадии трохофоры 17 ч до стадии велигера 55 ч, однако уровень его экспрессии значительно ниже, чем у β -А_{i1}. Обе изоформы транскрипта β -В имеют очень низкий уровень экспрессии в личинках мидии, но высокий уровень экспрессии в

гемоцитах взрослых мидий (этот уровень в два раза превышал уровень экспрессии транскрипта β -A_i1).

Скорее всего, обнаруженные транскрипты - это главные интегрин-подобные белки, характерные для всех тканей и органов двустворчатых моллюсков, хотя существуют значительные различия в последовательностях транскриптов β -интегрин-подобных белков мидии и интегринов позвоночных животных.

Таблица 3. Результаты сравнения аминокислотных последовательностей гомологов β -интегрин-подобных белков мидии *M. trossulus* и других животных. Определение % сходства (верхнее число) и % идентичности (нижнее число).

<i>Mytilus trossulus</i>	<i>Crassostrea gigas/ β1</i>	<i>Crassostrea gigas/ β3</i>	<i>Biomphalaria glabrata/ β</i>	<i>Caenorhabditis elegans/ β-Pat3</i>	<i>Drosophila melanogaster/ β-PS</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus/ β-Gi</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus/ β-Li</i>	<i>Lingula anatina/ β-PS-like</i>	<i>Branchiostoma floridae/ β</i>	<i>Homo sapiens/ β1</i>
β-A	70	52	64	61	67	61	58	68	60	61
	54	33	50	44	50	44	40	52	41	45
β-B	54	62	52	52	54	53	51	57	52	53
	38	46	35	36	34	36	34	39	35	36

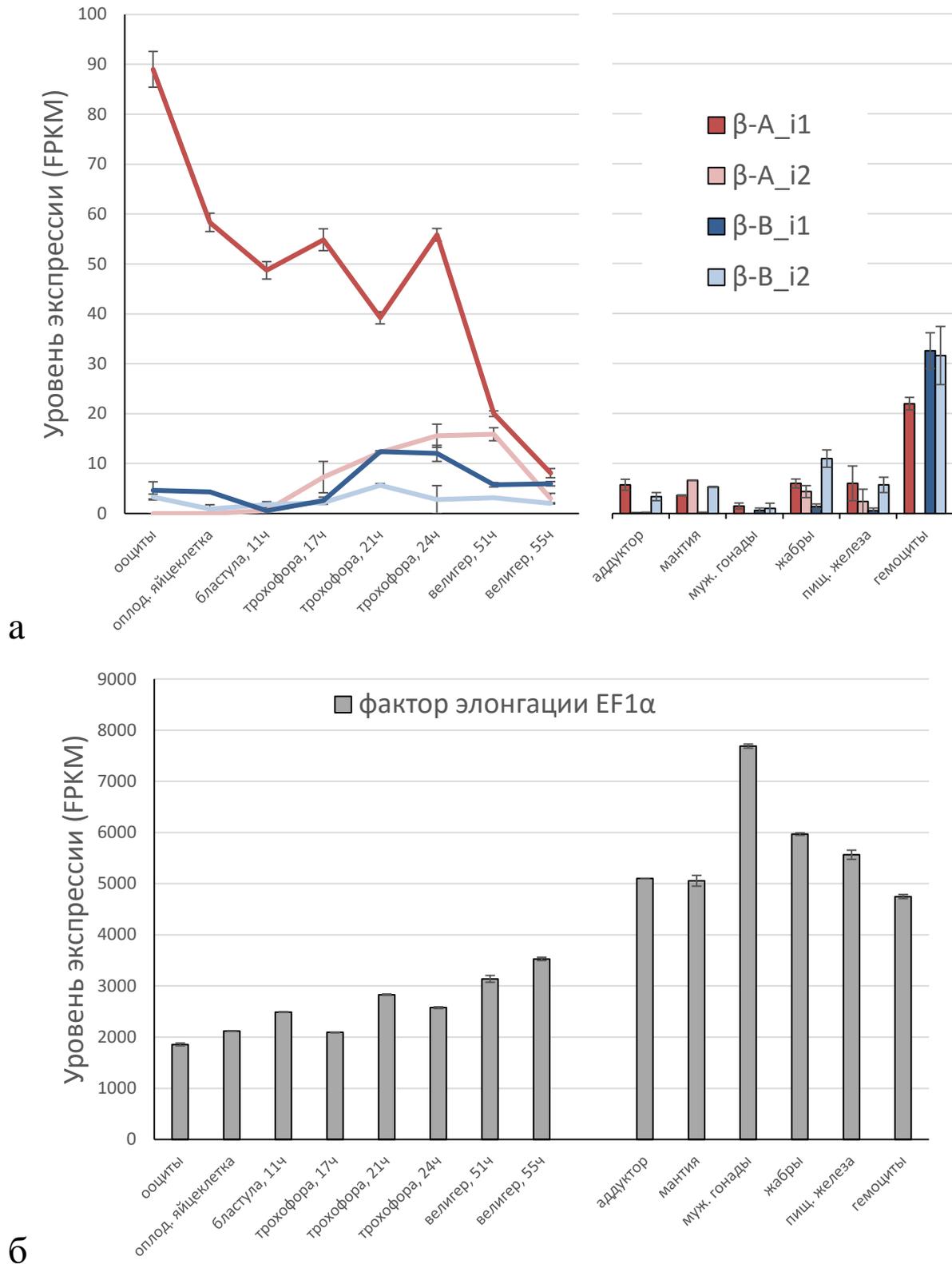


Рисунок 13. Количественная экспрессия генов β -интегрин-подобных транскриптов мидии в личинках, а также в органах и клетках взрослых мидий (а). Результаты нормализованы относительно уровня экспрессии гена фактора элонгации EF1 α (б). Представлены усредненные значения для данных, полученных на секвенаторах MiSeq и HiSeq, \pm отклонение от среднего.

3.2. Специфичность используемых антител. Вестерн-блот анализ

Необходимо было получить подтверждение специфичности антител к некоторым антигенам человека (β 1-интегрин и фибронектин) для клеток моллюсков. Для этого мы использовали метод Вестерн-иммуоблоттинга. Как видно из рисунка 14, антитела к β 1-интегрину выявили одну специфически окрашенную полосу, соответствующую белку с молекулярной массой примерно 110 кДа, которая совпадает с подвижностью β 1-интегрин позвоночных. Эта полоса присутствовала в лизатах, полученных из личинок мидии на стадии велигера (56 ч) (рисунок 14, а) и в лизатах гемоцитов и пищеварительной железы взрослых моллюсков (рисунок 14, б). В препаратах оплодотворенных яйцеклеток и личинок *M. trossulus* более ранних стадий развития (трохофора 19 ч и 26 ч), а также заднего аддуктора мидии *G. grayanus* специфическое окрашивание выявлено не было.

Правильность нанесения порций белка на дорожки контролировали при помощи визуализации актина на мембране. Для всех лизатов была выявлена специфическая полоса актина, соответствующая белку с молекулярной массой 42 кДа (рисунок 14, а, б). Несмотря на то, что проба мышечной ткани мидии по актину была перегружена, полоса, соответствующая β 1-интегрину, отсутствовала.

Антитела к фибронектину человека окрашивали одну полосу (220 кДа) в контрольной пробе фибронектина плазмы человека (рисунок 15, а, б). Слабая полоса в районе 220 кДа появлялась в личинках мидии уже на стадии бластулы и становилась отчетливой после стадии ранней трохиферы (19 ч после оплодотворения) (рисунок 15 а). На стадии велигера, также как в тестируемых органах и клетках взрослой мидии, можно было различить две полосы (200 и 180 кДа), соответствующие фибронектин-подобным белкам (рисунок 15 б). Кроме того, значительно выше уровня 220 кДа была обнаружена дополнительная полоса, вероятно, связанная с образованием агрегатов или димеров фибронектин-

подобного белка, имеющих большую молекулярную массу, в образцах аддуктора и в личинках поздних стадий развития.



Рисунок 14. Вестерн-блот анализ тотальных лизатов оплодотворенных яйцеклеток и личинок мидии (а), а также тканей и клеток взрослых моллюсков (б) с использованием моноклональных антител к β 1-интегрину человека (клон LM534) (верхняя панель). Актин (клон С4/МАВ 1501) использован как контроль нагрузки по белку в препаратах (нижняя панель).

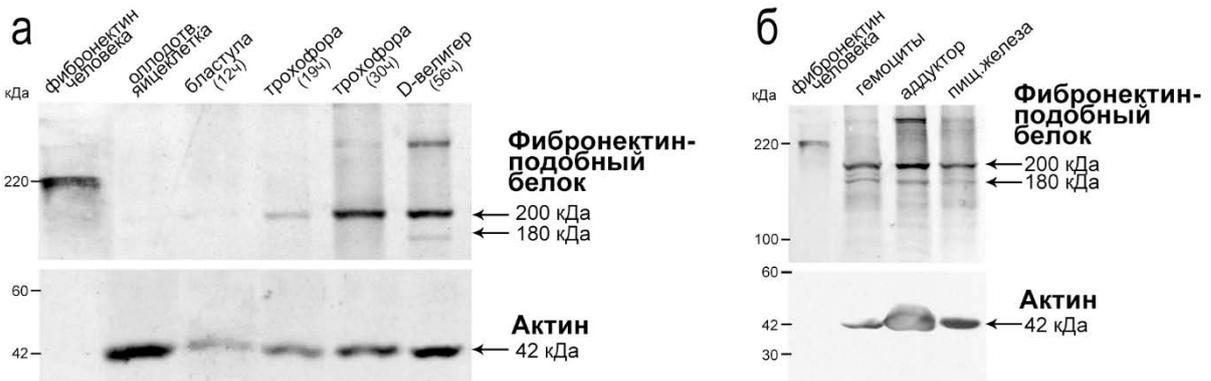


Рисунок 15. Вестерн-блот анализ тотальных лизатов оплодотворенных яйцеклеток и личинок мидии *M. trussulus* (а), а также тканей и клеток взрослых моллюсков (б) с использованием поликлональных антител к фибронектину человека (верхняя панель). Актин использован как контроль нагрузки по белку в препаратах (нижняя панель).

3.3. Распределение β -интегрин-подобного белка в процессе личиночного развития

Чтобы проверить распределение β -интегрин-подобного белка в процессе развития мидии, мы проследили его появление от зиготы до стадии позднего велигера. Окраска отсутствовала как в оплодотворенных яйцеклетках, так и в личинках на стадии бластулы (12 ч после оплодотворения) (рисунок 16 б). Первые клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, появлялись в зачатке пищеварительного тракта на стадии ранней трохофоры примерно в 5–10% исследованных личинок (19 ч, рисунок 16 б). На стадии средней трохофоры (24 ч), β -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 (рисунок 16 г, вставка на большем увеличении г1). В ходе дальнейшего развития количество клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, увеличивалось, и на стадии поздней трохофоры такие клетки были расположены в один слой, формируя внутреннюю выстилку желудка. Эти клетки имели округлую форму и размер около 7–8 мкм. На стадии велигера окраска на интегрин становится особенно заметной в стенках желудка (рисунок 16 д) и имеет поляризованное распределение с максимальной интенсивностью в апикальной части клеток пищеварительного тракта (рисунок 16 г, вставка на большем увеличении г1). Просвет желудка личинки покрыт мерцательным эпителием с многочисленными микроворсинками и ресничками (рисунок 16 е1). Клетки эпителия желудка кубические или слегка уплощенные, расширенные к основанию, имеют диаметр около 5 мкм. Следует отметить, что на стадии велигера более поздних сроков развития можно обнаружить два скопления клеток, окрашенных более ярко, чем остальные клетки желудка, и расположенных симметрично в верхней части желудка, по бокам от него, в противоположной стороне от ротового отверстия. Эти скопления состоят из 2–5 крупных клеток без ресничек и, вероятно, соответствуют области, в которой формируется зачаток пищеварительной железы (рисунок 16 е, е1, стрелки).

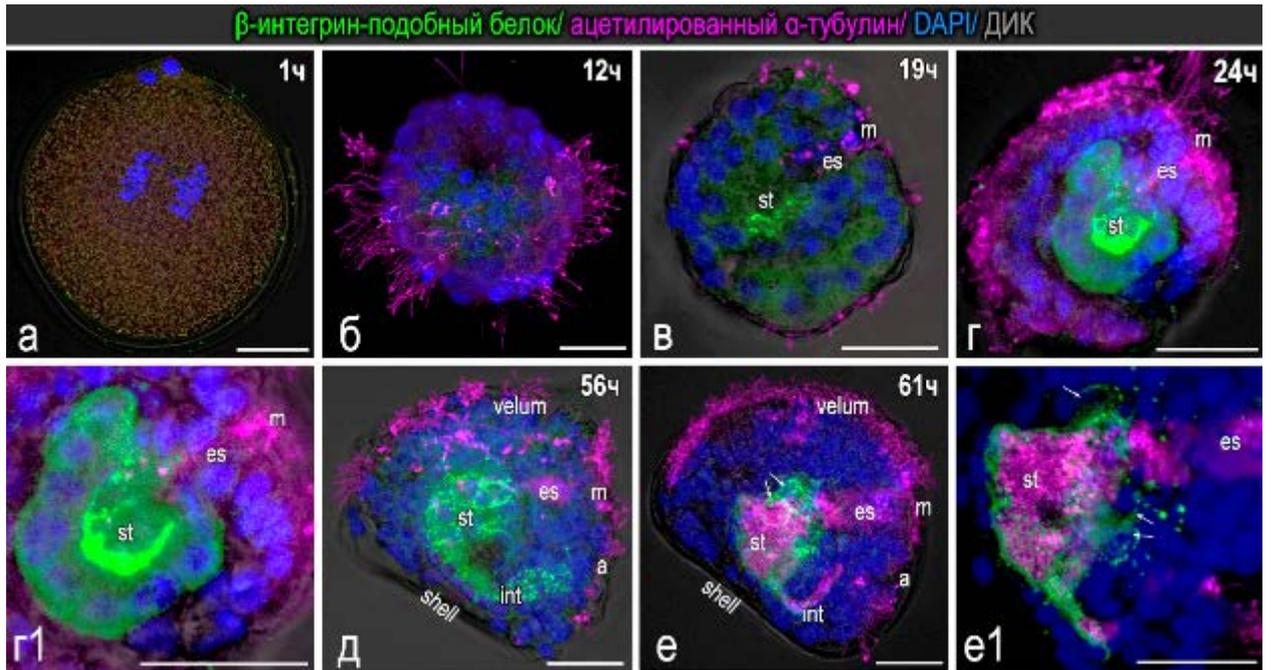


Рисунок 16. Появление β -интегрин-подобного белка в раннем развитии личинок мидии *M. trossulus*. Иммунодетекция β -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и ресничек (маджента). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стадии развития: оплодотворенная яйцеклетка (а), бластула (б), ранняя трохофора 19 ч (в), средняя трохофора 24 ч (г, г1), средний велигер 56 ч (д) и поздний велигер 60 ч (е, е1). Обозначения: *es* – пищевод, *m* – рот, *shell* – раковина, *st* – желудок, *velum* – велюм, *int* – кишечник, *a* – анальное отверстие. Масштабная линейка 20 мкм (а – е), 10 мкм (г1, е1).

Для того чтобы понять детально, в какой части клеток личинок располагается β -интегрин-подобный белок, мы рассмотрели фрагмент мерцательного эпителия желудка велигера (рисунок 17). После окраски хорошо видно, что данный белок локализован именно в апикальных частях клеток эпителия желудка – на клеточных мембранах; часть клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, имеет хорошо развитые реснички.

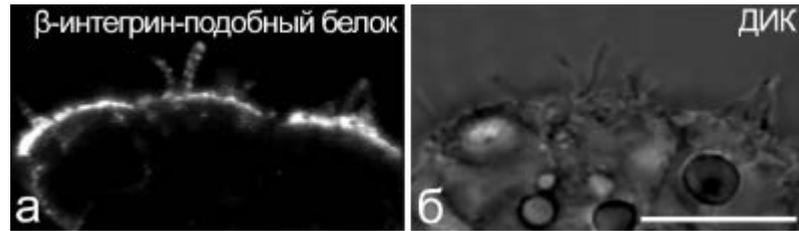


Рисунок 17. Фрагмент мерцательного эпителия желудка велигера мидии *M. trossulus*. Окраска антителами к $\beta 1$ -интегрину человека (а), дифференциально-интерференционный контраст (б). Масштабная линейка 5 мкм.

Характер распределения клеточных делений в личинках представлен на рисунке 18: митотические клетки (фосфо-Н3-гистон-иммунопозитивные) были хаотически расположены в различных органах как на стадии трохофоры, так и велигера.

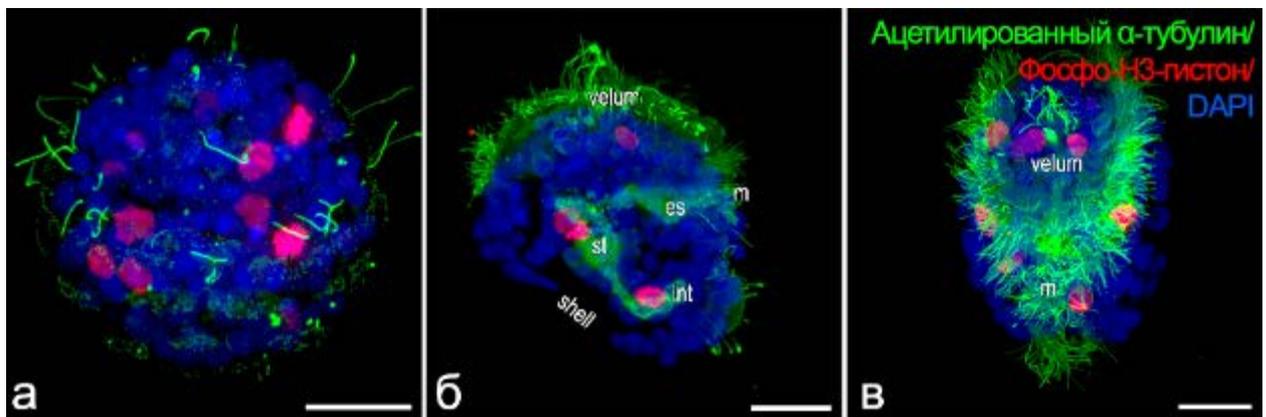


Рисунок 18. Иммунодетекция митотических (фосфо-Н3-гистон-позитивных) клеток (красный цвет) и ресничек (α -тубулин-позитивных) (зеленый цвет) в процессе развития личинок мидии *M. trossulus*. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стадии развития: трохофора 24 ч (а), велигер 56 ч (б – вид с боку, в – вид со стороны ротового отверстия). Обозначения: *es* – пищевод, *m* – рот, *shell* – раковина, *st* – желудок, *velum* – велюм. Масштабная линейка 20 мкм.

Кроме того, была использована двойная окраска антителами к фосфо-Н3-гистону и β 1-интегрину, чтобы оценить способность клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, к пролиферации. На рисунке 19 представлены результаты иммунодетекции клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, и митотических клеток (отмечены стрелками и головчатыми стрелками) в процессе развития личинок мидии.

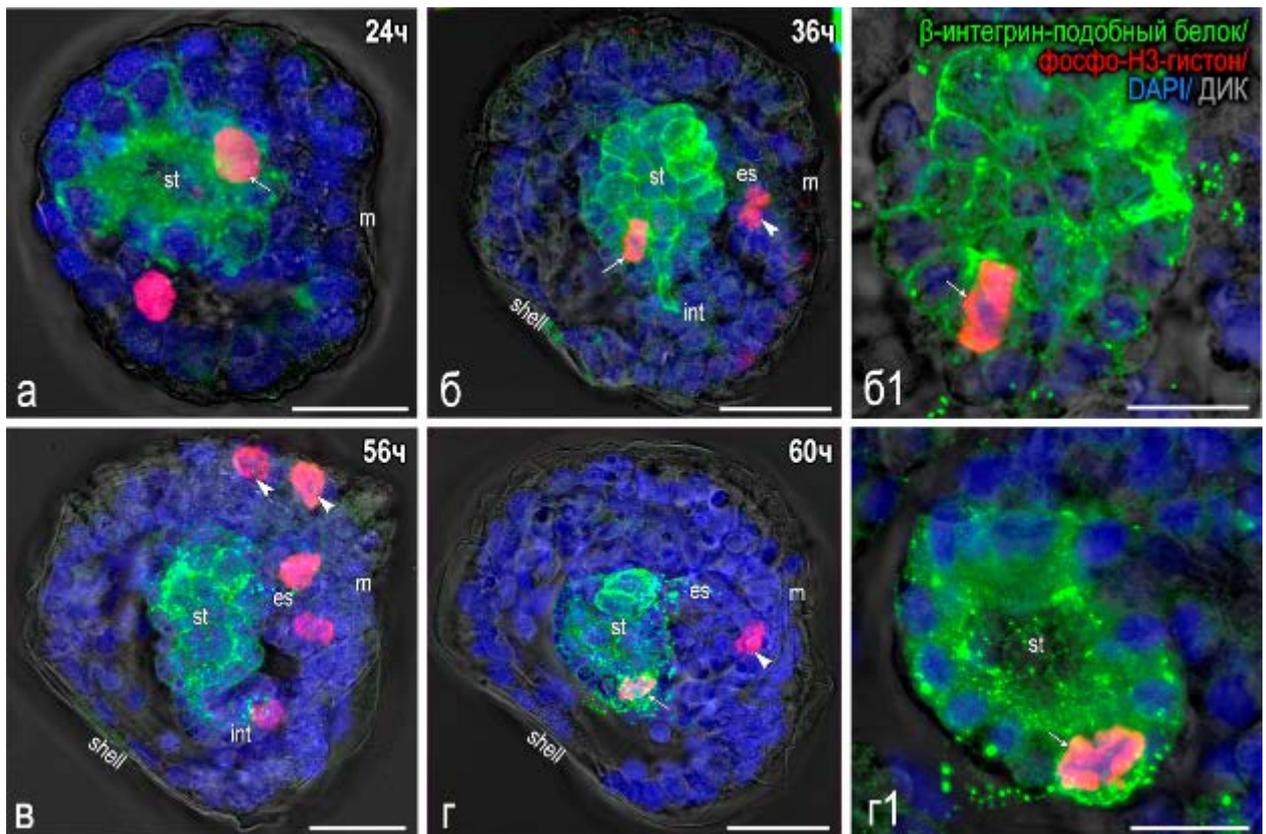


Рисунок 19. Иммунодетекция клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, (зеленый цвет) и митотических (фосфо-Н3-гистон-позитивных) клеток (красный цвет) в процессе развития личинок мидии *M. trossulus*. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стадии развития: трохофора 24 ч (а) и 36 ч (б, б1, велигер 56 ч (в) и 60 ч (г, г1). Обозначения: *es* – пищевод, *m* – рот, *shell* – раковина, *st* – желудок, стрелки – митозы в β -интегрин-позитивных клетках. Масштабная линейка 20 мкм (а – г), 10 мкм (б1, г1).

Часть фосфо-НЗ-гистон-иммунопозитивных клеток была расположена в районе формирующейся пищеварительной железы на стадии трохофоры и в области желудка на стадии велигера. В некоторых случаях, клетки пищеварительной системы, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, были способны к митотическому делению (отмечены стрелками). Эти данные указывают на факт пролиферации клеток пищеварительной системы, а также на способность клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, к пролиферации.

Дополнительно, мы провели анализ со-локализации β -интегрин-подобного белка с маркерами мышечных клеток и нейронов, выполнив серию экспериментов с использованием антител к мышечному миозину (маркер мышечных клеток) и серотонину (5-НТ), который детектирует нейроны в личинках. Как показано на рисунке 20, ни мышечные (рисунок 20 а–в), ни нейрональные клетки (рисунок 20 г–е) не экспрессируют β -интегрин-подобный белок. Этот белок был обнаружен исключительно на мембранах клеток пищеварительной массы на стадии трохофоры и в клетках желудка на стадии велигера, тогда как миозин-позитивные клетки появлялись только в верхней полусфере на стадии трохофоры (рисунок 20 а), и позже, в мышцах, окружающих желудок, на стадии велигера (рисунок 20 в). Распределение серотонин-позитивных клеток также отличалось от распределения клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок (рисунок 20 г–е): последние располагались ниже, в районе желудка.

3.4. Динамика экспрессии и распределения фибронектин-подобного белка в процессе развития личинок мидии *M. trossulus*

Динамика экспрессии и распределения Фб-подобного белка в процессе развития личинок мидии *M. trossulus* представлена на рисунке 21. Первые фибронектин-позитивные клетки появились на стадии бластулы (рисунок 21 а, а1), однако они были видны только в одной из 25–30 проверенных личинок.

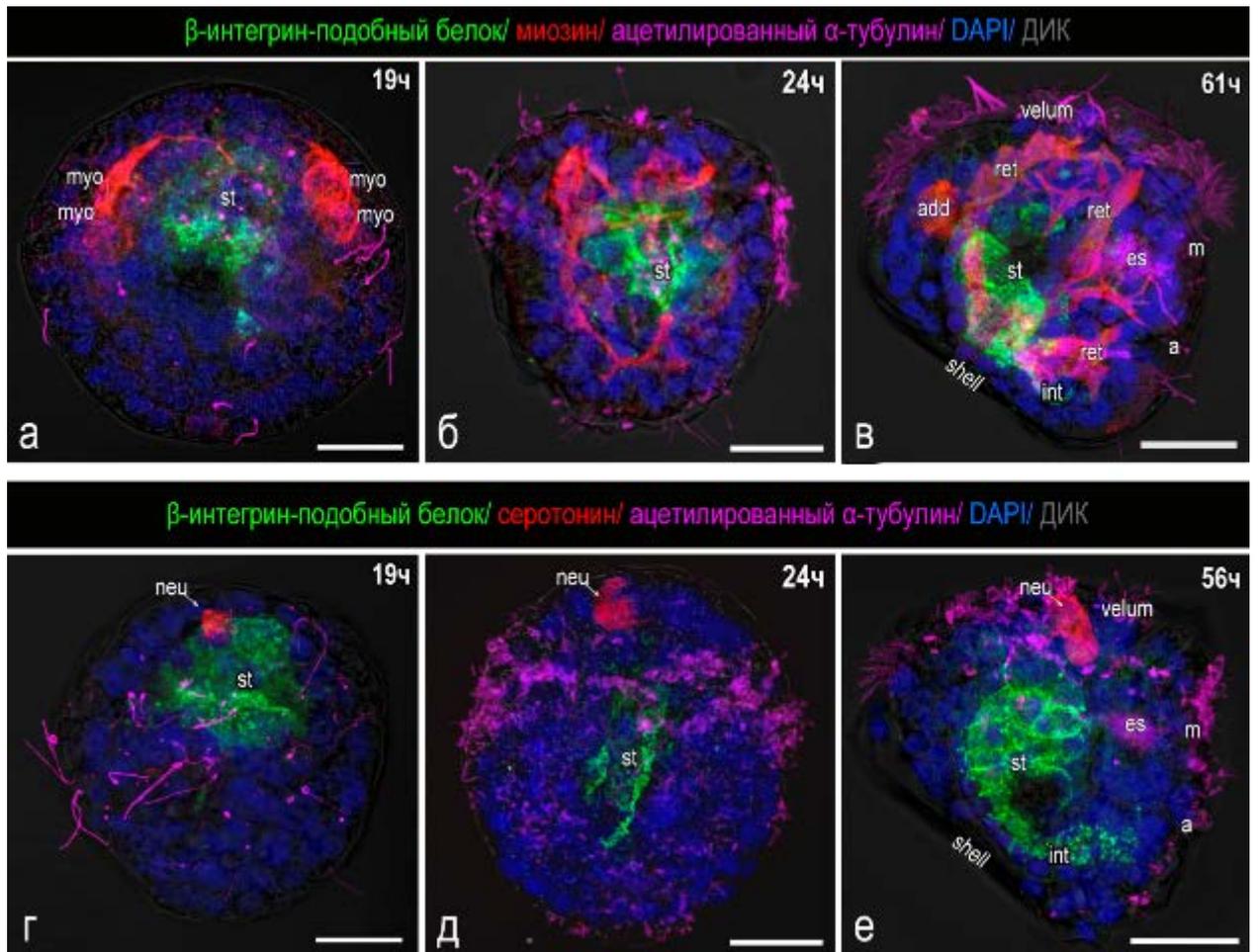


Рисунок 20. Выявление β -интегрин-подобного белка в ходе развития мышечной (а–в) и нейрональной (г–е) систем личинок мидии *M. trossulus*. Детекция β -интегрин-подобного белка (зеленая окраска), ацетилированного α -тубулина (маджента), миозина (а, б, в) и серотонина (г, д, е) (красная окраска). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Сокращения: *myo*– миоциты, *m* – рот, *st* – желудок, *ret* – ретракторы, *es* – пищевод; *add* – аддуктор; *a* – анальное отверстие; *int* – кишечник; *neu* – нейроны. Масштабная линейка 50 мкм.

Позже, иммуноокраска на фибронектин была представлена во всех личинках на стадии трохофоры (рисунок 21 б, б1). Фибронектин-иммунопозитивные клетки были хаотически разбросаны в личинке. На стадии велигера их расположение заметно отличалось от расположения клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок. Фб-подобный белок был обнаружен, главным образом, в клетках

периферии тела личинок. Позже он появлялся в велюме велигера (рисунок 21 в), а затем в незначительных количествах был обнаружен в соединительной ткани, окружающей желудок личинки (рисунок 21 г, г1). Фб-подобный белок можно было наблюдать как в тонком слое цитоплазмы, так и в ядрах (стрелки).

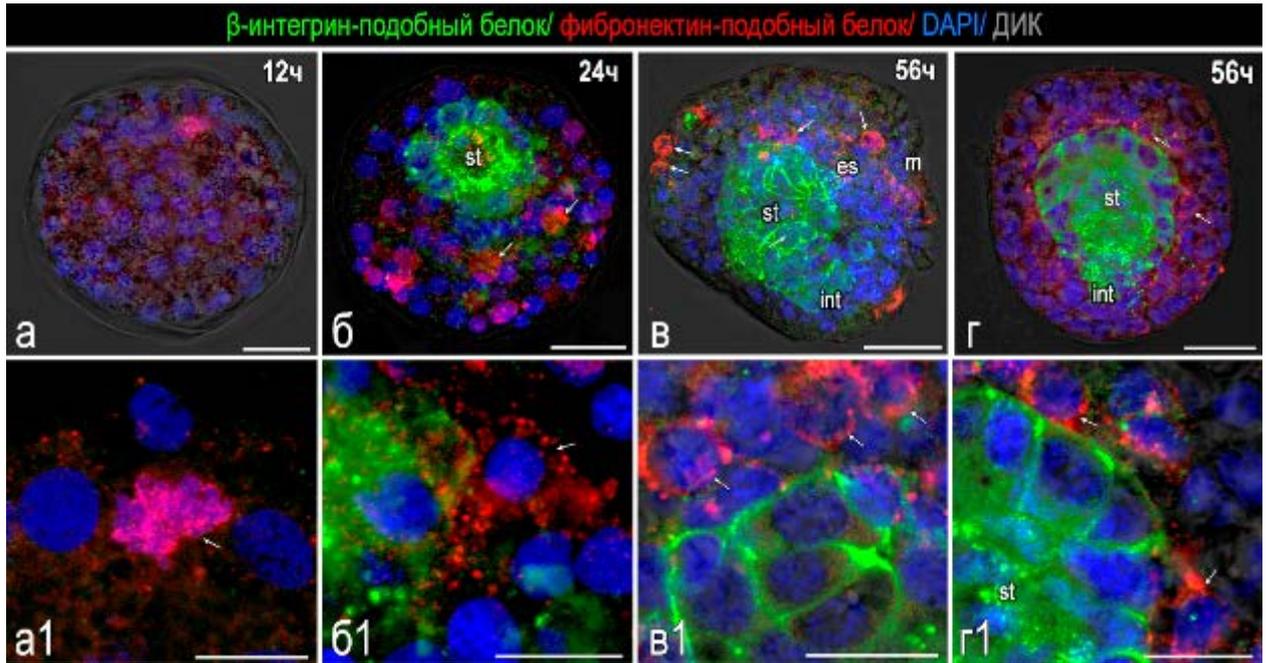


Рисунок 21. Иммунодетекция β -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и фибронектин-подобного белка (красный цвет) в процессе развития личинок мидии *M. trossulus*. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стадии развития: бластула 12 ч (а, а1), трохофора 24 ч (б, б1), велигер 56 ч (в, в1 – сагиттальный вид, г, г1 – отдельный оптический срез). 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).

Кроме того, для сравнения локализации Фб-подобного белка и мышечных структур в личинках мидии на стадии велигера (48 ч), было проведено двойное иммуноокрашивание с помощью антител к фибронектину (рисунок 22, а, б, в) и миозину (рисунок 22, б, в). Яркая флуоресцентная метка Фб-подобного белка обнаружена в отдельных клетках велюма. В некоторых мышечных клетках

личинок присутствовали отдельные мелкие гранулы Фб-подобного белка вдоль ретракторов и в аддукторе, хотя в других мышечных клетках метка не обнаружена (рисунок 22, в). Причина того, что вторичные антитела красили не только мышечные клетки, но и частично клетки, экспрессирующие Фб-подобный белок, связана с происхождением первичных антител, которые в обоих случаях были получены в кролике.



Рисунок 22. Двойное иммуноокрашивание с помощью антител к фибронектину (а–в) и миозину (б, в) для выявления фибронектин-подобного белка и мышечных структур в личинках мидии *M. trossulus* на стадии велигера (48 ч). Совмещение каналов (в): визуализация отдельного оптического среза через ретракторы. Стрелками обозначены фибронектин-позитивные мышечные клетки. Масштабная линейка 20 мкм.

3.5. Распределение β -интегрин-подобного белка, актина и фибронектин-подобного белка в культивируемых гемоцитах мидии *M. trossulus*

Для того чтобы выяснить, существуют ли популяции гемоцитов в гемолимфе мидий, в которых одновременно экспрессируется β -интегрин-подобный белок и Фб-подобный белок, мы провели ряд дополнительных экспериментов по двойному иммуноокрашиванию изолированных и культивированных в течение суток

гемоцитов. Присутствие различных популяций гемоцитов подтверждает как одновременная окраска гемоцитов антителами к $\beta 1$ интегрину (стрелки) и фаллоидином для детекции актина (рисунок 23), так и одновременная окраска гемоцитов антителами к $\beta 1$ -интегрину и фибронектину (рисунок 24). В последнем случае, использованные антитела узнавали различные популяции гемоцитов.

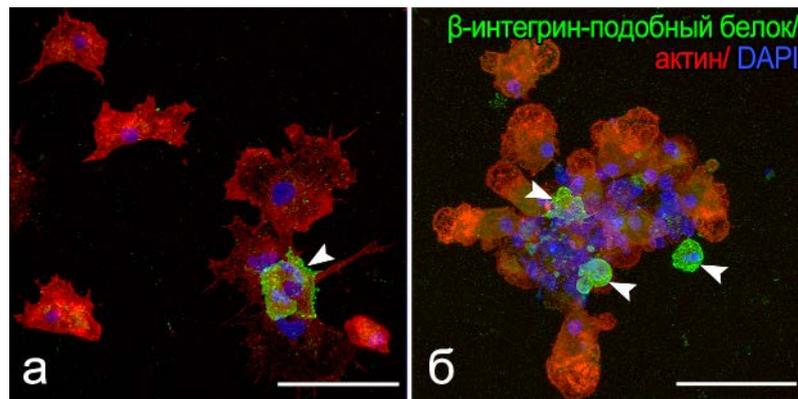


Рисунок 23. Выявление β -интегрин-подобного белка (стрелки) и фибриллярного актина в гемоцитах мидии *M. trossulus*, культивированных в течение 24 ч на: а – фибронектине, б – коллагене. Масштабная линейка 20 мкм.

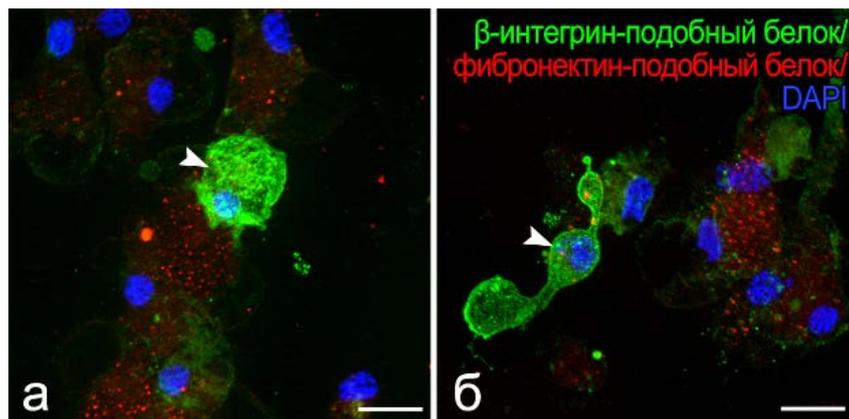


Рисунок 24. Выявление β -интегрин-подобного белка (стрелки) и фибронектин-подобного белка в гемоцитах мидии *M. trossulus*, культивированных в течение 24 ч на стекле (а, б). Масштабная линейка 10 мкм.

Эти результаты совпадают с ранее полученными данными об отсутствии локализации β -интегрин-подобного белка и Фб-подобного белка в клетках личинок мидии в процессе развития. Таким образом, установлено, что существует корреляция экспрессии β -интегрин-подобных белков с развитием пищеварительной системы, клетки которой способны к пролиферации, но β -интегрин-подобный белок не экспрессируется ни в мышцах личинок, ни в нейронах. Предполагаемый лиганд этого типа интегринов – Фб-подобный белок, не участвует в развитии пищеварительной системы, но может участвовать в развитии мышечной системы личинок. Среди гемоцитов мидии обнаружены популяции гемоцитов, в которых экспрессируется β -интегрин-подобный белок, но существуют и другие популяции гемоцитов, в которых экспрессируется только Фб-подобный белок. Не исключено отсутствие взаимодействия между этими белками на ранних стадиях развития личинок моллюсков, в отличие от тесного взаимодействия сходных белков в эмбриогенезе у млекопитающих.

3.6. Распределение β -интегрин-подобного белка в культивируемых клетках личинок мидии *M. trossulus*

Чтобы определить, могут ли процессы дифференцировки и пролиферации проходить одновременно в клетках личинок моллюсков, и участвуют ли в этих процессах интегрины, а также выяснить факторы, которые приводят к изменениям адгезии клеток моллюсков, мы использовали искусственные условия культуры клеток.

Через 2 ч после посева небольшие округлые клетки (6–10 мкм в диаметре) личинок мидии прикреплялись к поверхности покровных стекол, предварительно покрытых адгезивными молекулами. Часть этих клеток находилась в небольших агрегатах. Одновременно в культуре были обнаружены первые β -интегрин-позитивные клетки округлой формы с четкой точечной окраской на цитоплазматической мембране. Эти клетки преимущественно находились в

агрегатах на всех исследованных субстратах (2 ч после посадки); причем, в основном, на поверхности агрегатов, а не в их глубине. Первые распластанные клетки появлялись через 6 ч на фибронектине, а затем и на других тестируемых субстратах. Через 12–24 ч культивирования мы наблюдали спонтанные ритмические сокращения биполярных клеток.

Для исследования лигандной специфичности β -интегрин-подобного белка клетки культивировали на покровных стеклах, покрытых различными субстратами. Однако морфология и распределение клеток на всех тестированных субстратах (стекле, ламинине 2/4, фибронектине, поли-D-лизинеи коллагене I типа) были похожи: в течение всего срока культивирования (до 10 суток) клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, сохраняли округлую форму, практически не имели выростов и никогда не распластывались на поверхности субстрата (рисунок 25). На флуоресцентных изображениях видно, что только на ламинине 2/4 (рисунок 25 б1), клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, образовывали участки, похожие на монослойные группы эпителицито-подобных клеток.

Количество клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, постепенно возрастало в процессе культивирования (рисунок 26). 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). На фибронектине количество этих клеток было примерно в два раза меньше.

Трехмерная реконструкция подтвердила, что только на ламинине клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, были близко расположены к друг другу и к самому субстрату (рисунок 27 а). На других субстратах эти клетки были близко расположены к друг другу, но прямо не прикреплялись к субстрату (рисунок 27 б, в), что может указывать на отсутствие взаимодействия между клетками, экспрессирующими β -интегрин-подобный белок, и субстратом.

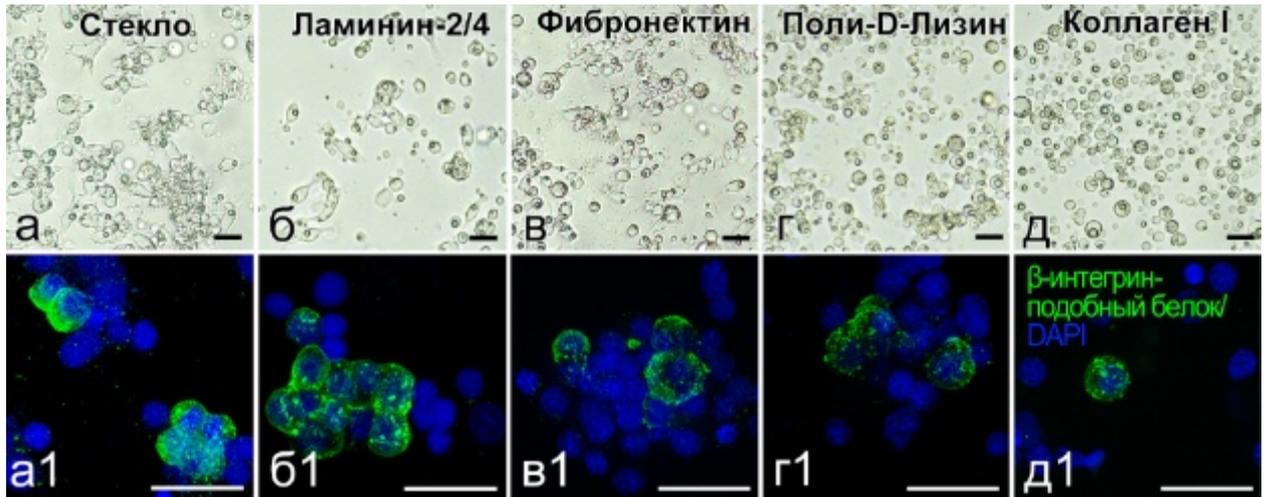


Рисунок 25. Клетки личинок мидии *M. trossulus*, культивируемые на стекле (а, а1), ламинине 2/4 (б, б1), фибронектине (в, в1), полилизине (г, г1) и коллагене I (д, д1), в течение 6 ч (микроскопия светлого поля) и 12 ч (флуоресцентная микроскопия). Иммунодетекция β -интегрин-подобного белка (зеленый цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 20 мкм.

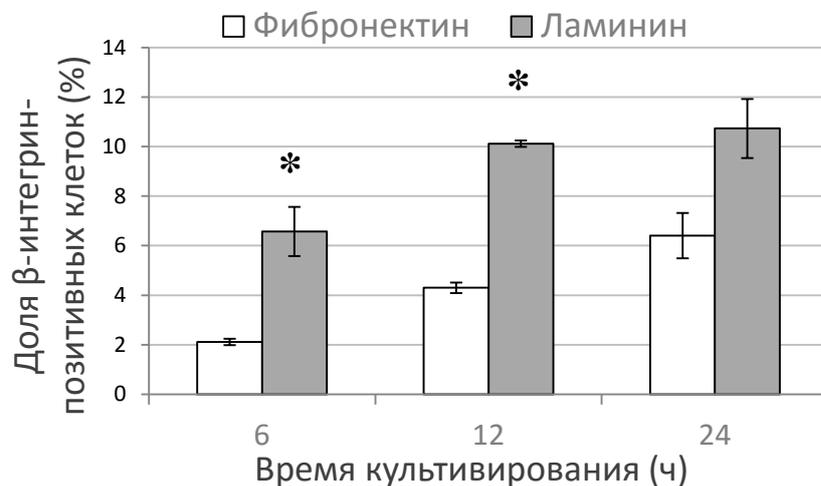


Рисунок 26. Динамика появления клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, в культуре клеток личинок мидии *M. trossulus*, культивируемых на фибронектине и ламинине-2/4. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение среднего. звездочкой отмечен уровень значимости отличий ($p < 0,05$) относительно количества β -интегрин-позитивных клеток, культивируемых на фибронектине.

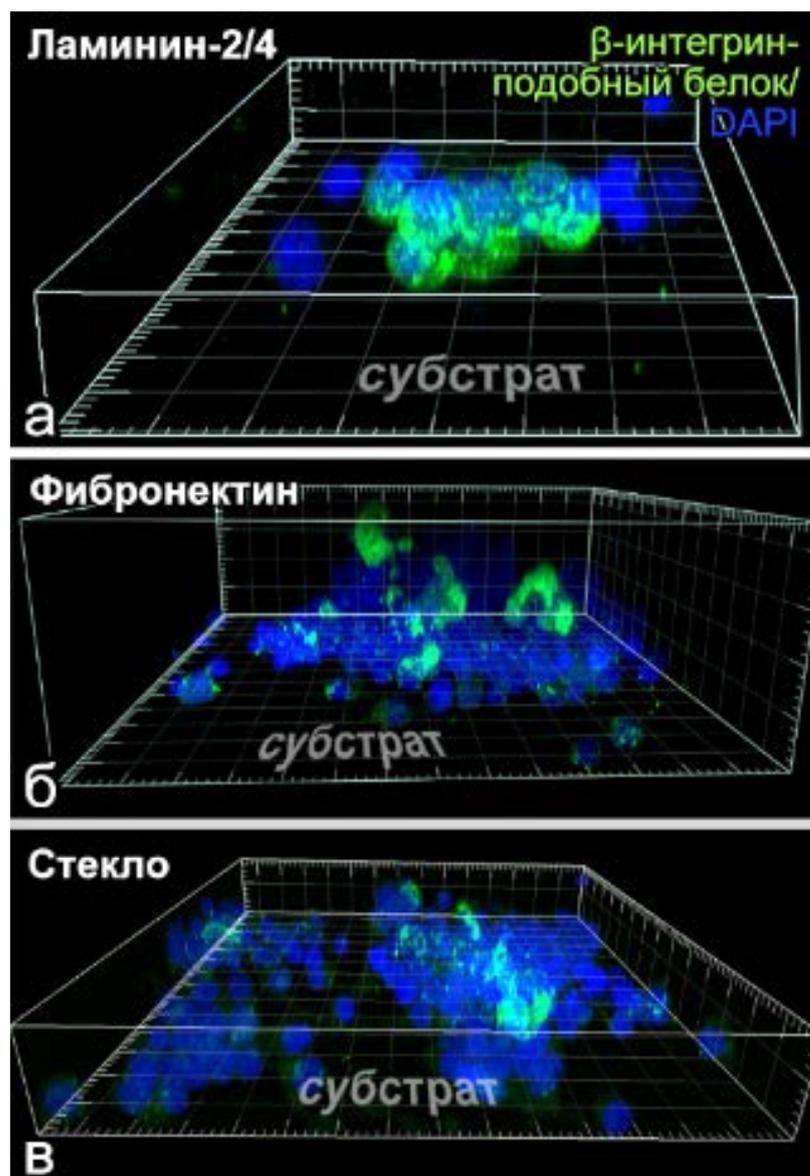


Рисунок 27. Трехмерная реконструкция агрегатов клеток личинок мидии *M. trossulus*, культивируемых на ламинине 2/4 (а), фибронектине (б) и стекле (в) в течение 24 ч. Детекция β-интегрин-подобного белка (зеленый цвет), ядра окрашены DAPI (синий цвет). Нижняя сетка примерно соответствует плоскости субстрата.

3.7. Типы дифференцировки в культуре клеток личинок мидии

Клетки личинок мидии могут спонтанно дифференцироваться в культуре в несколько типов: миоциты (миозин- или парамиозин-позитивные клетки), нейрональные (5-НТ или FMRF-амид-позитивные) и ресничные эпителиальные (α -тубулин-позитивные) клетки.

*Миогенная и нейрональная дифференцировка в культуре клеток мидии *M. trossulus**

Так же, как и в экспериментах *in vivo*, в условиях культуры не было выявлено со-локализации β -интегрин-подобного белка с маркерами нейрональной и мышечной дифференцировки (рисунок 28). Многочисленные биполярные сокращающиеся клетки наблюдали через 24 ч культивирования на фибронектине. В отличие от фибронектина, на коллагене клетки, в основном, были округлой формы, не распластывались и только в редких случаях демонстрировали сократительную активность. Кроме того, нейрональные и мышечные клетки появлялись в культуре через 6–12 ч, что намного позже появления клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, которые можно было идентифицировать уже через 2 ч после посадки.

3.8. Выявление β -интегрин-подобного белка в ресничных эпителиальных клетках личинок мидии *M. trossulus*

Как указано выше, одновременная окраска антителами к β 1-интегрину и α -ацетилованному тубулину выявила β -интегрин-позитивные ресничные эпителиальные клетки в теле личинок. В условиях культуры, точечная окраска, характерная для β -интегрин-подобного белка, была связана с клетками, экспрессирующими этот белок. Многие клетки этого типа также имели микроворсинки или реснички на поверхности (рисунок 29).

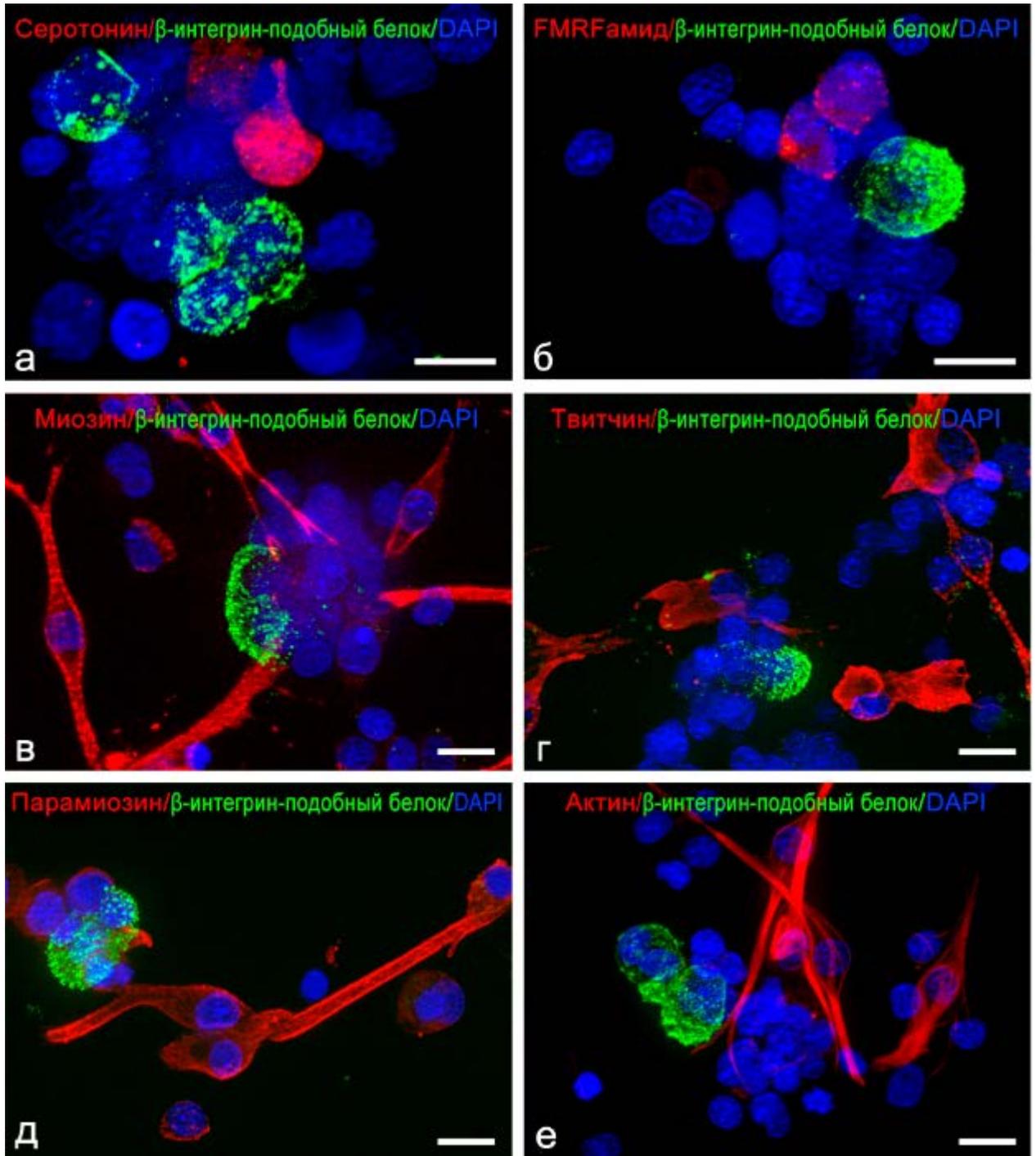


Рисунок 28. Одновременное выявление β -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и маркеров нейрональной (а, б) или миогенной дифференцировки (в–е) (красный цвет) в культуре клеток личинок мидии *M. trossulus*, культивируемых на фибронектине в течение 48 ч. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 10 мкм.

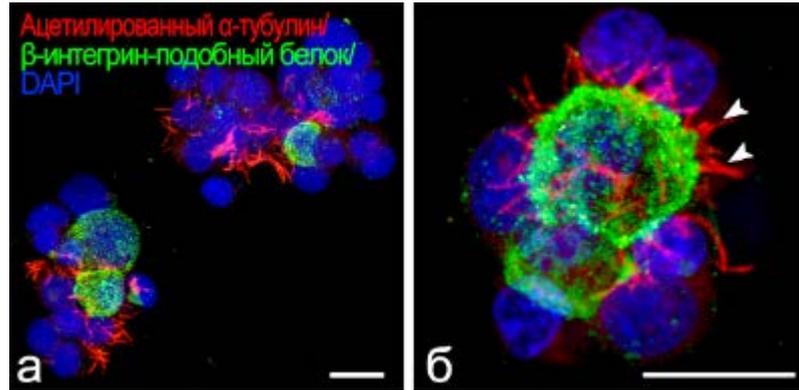


Рисунок 29. Выявление β -интегрин-подобного белка (зеленый цвет) и ресничек (красный цвет), в клетках личинок мидии *M. trossulus*, культивируемых на фибронектине в течение 48 ч. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стрелками обозначены реснички. Масштабная линейка 10 мкм.

β -интегрин-подобный белок присутствовал как на клеточной мембране, так и в вакуоле-подобных структурах под клеточной мембраной (рисунок 30, г, з). Некоторые ресничные клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, были поляризованы, и край с микроворсинками располагался на одном полюсе таких клеток, обращенном на периферию клеточных агрегатов. Окраска на актин и интегрин была наиболее выраженной в районах ресничных кластеров (рисунок 30, д, е). Округлая форма, реснички на некоторых клетках и их поляризованное расположение указывают на то, что клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, являются эпителиальными.

3.9. Пролиферация в культуре клеток личинок мидии *M. trossulus*

В первые 4 часа культивирования на всех субстратах были выявлены многочисленные митотические (фосфо-Н3-гистон-позитивные) клетки. Окраска на анти- α -ацетилованный тублин выявила как микротрубочки в интерфазных клетках, так и веретено деления в митотических клетках (рисунок 31 а, вставка).

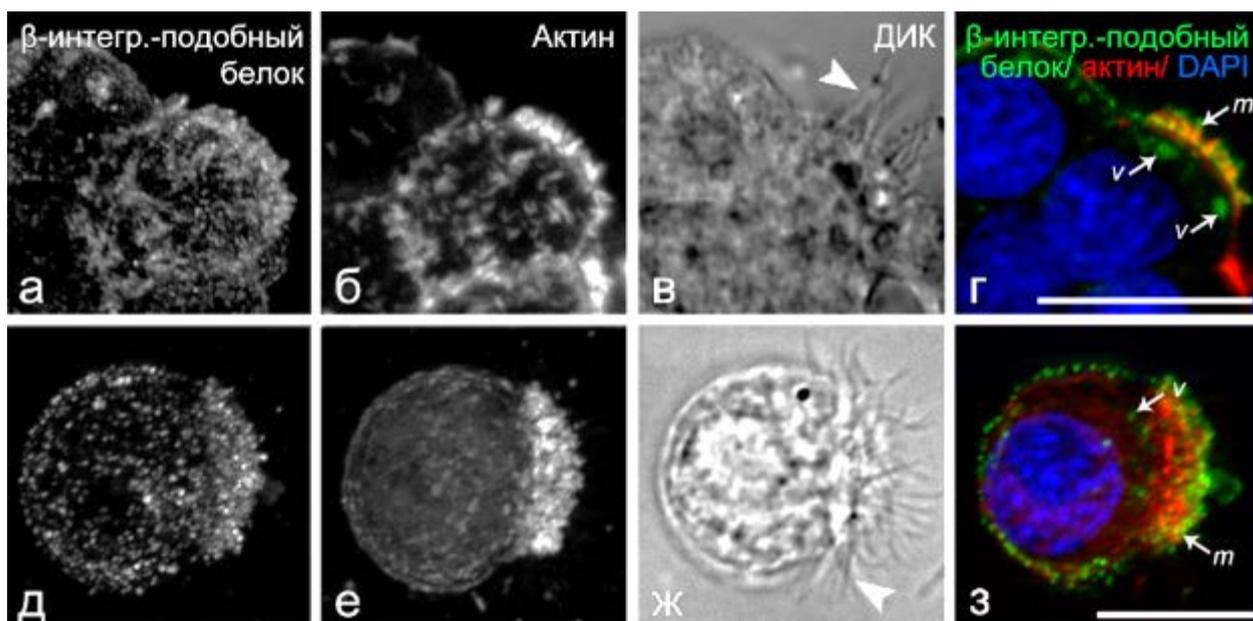


Рисунок 30. Двойная иммунодетекция в клетках личинок мидии *M. trossulus*, β -интегрин-подобного белка (а, д) и филаментного актина (б, е). Клетки были культивированы 24 ч на фибронектине (а–г) либо на ламинине (д–з). Визуализация клеток методом ДИК (в, ж) - стрелками обозначены реснички; совмещенные изображения отдельных оптических срезов (г, з). Ядра окрашены DAPI. Обозначения: v – вакуоли, m – микроворсинки. Масштабная линейка 10 мкм.

На фибронектине максимальное число митотических клеток мидии (приблизительно 3%) появляется через 4 ч после посадки (рисунок 32). После двух суток культивирования доля митотических клеток резко уменьшается (до 0,5%) и практически падает до нуля на 9 сутки. Существенной разницы в количестве митотических клеток между субстратами после двух суток культивирования не обнаружено.

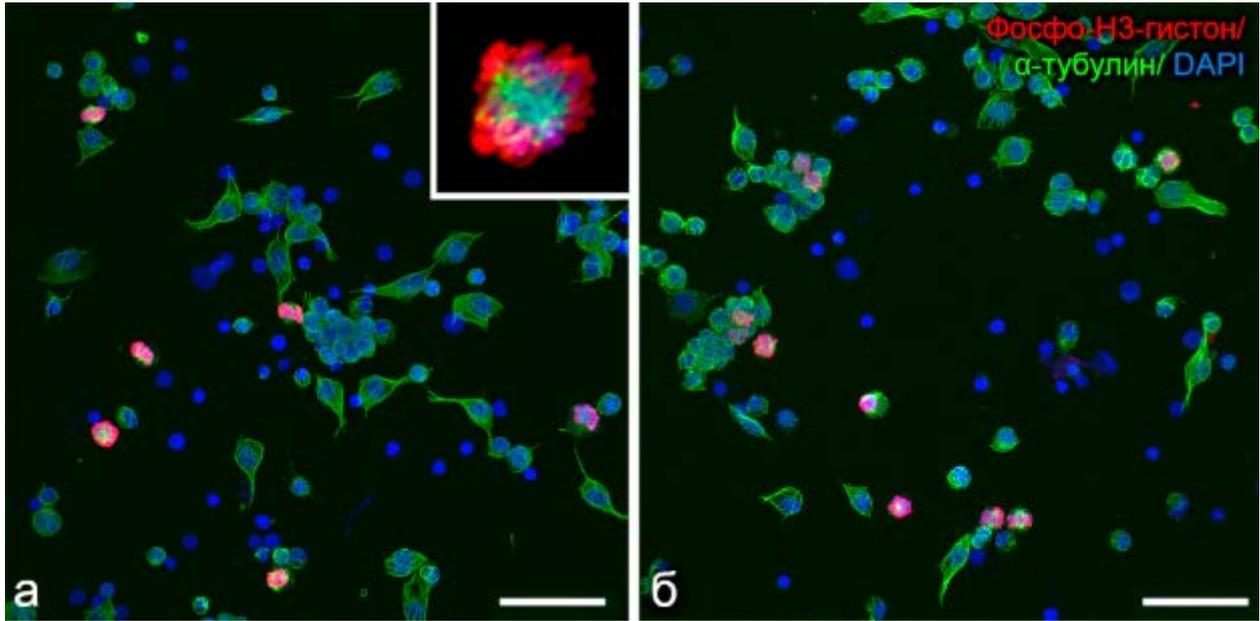


Рисунок 31. Делящиеся клетки личинок мидии *M. trossulus*, культивированные в течение 4 ч на коллагене (а) и фибронектине (б). Детекция митотических клеток (красный цвет), микротрубочек цитоскелета и веретена деления (зеленый цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 50 мкм.

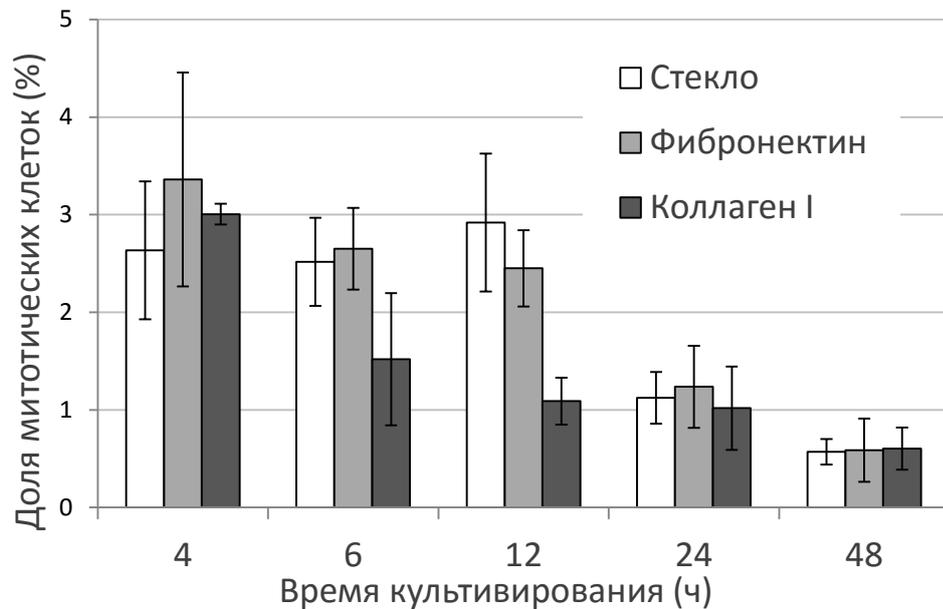


Рисунок 32. Динамика пролиферации клеток личинок мидии в культуре на различных субстратах (количество фосфо-Н3-гистон-позитивных) клеток. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

На рисунке 33 приведены данные по иммунодетекции пролиферирующих клеток – митотических (фосфо-Н3-гистон-позитивных) и S-фазных (PCNA-позитивных) клеток. Через двое суток культивирования количество митотических клеток было в 5–7 раз меньше, чем количество S-фазных клеток. Максимальное количество клеток с PCNA-позитивными ядрами было обнаружено через 12 ч культивирования на фибронектине, но позже, через 3 суток, доля таких клеток упала до 1% (данные не представлены).

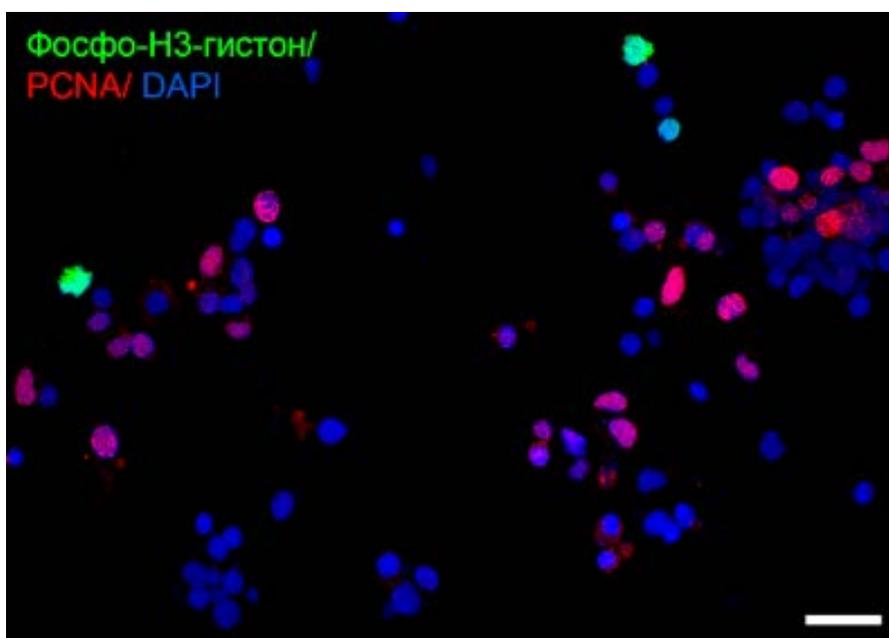


Рисунок 33. Иммунодетекция ядер митотических (зеленые) и S-фазных (красные) клеток личинок мидии, культивируемых в течение двух суток на стекле. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 20 мкм.

Для того чтобы получить ответ на вопрос, могут ли β -интегрин-позитивные клетки мидии делиться в культуре, мы проверили их способность к пролиферации. Как видно на рисунке 34, β -интегрин-позитивные клетки, культивируемые на фибронектине в течение 24 ч, способны к митотическому делению. 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.

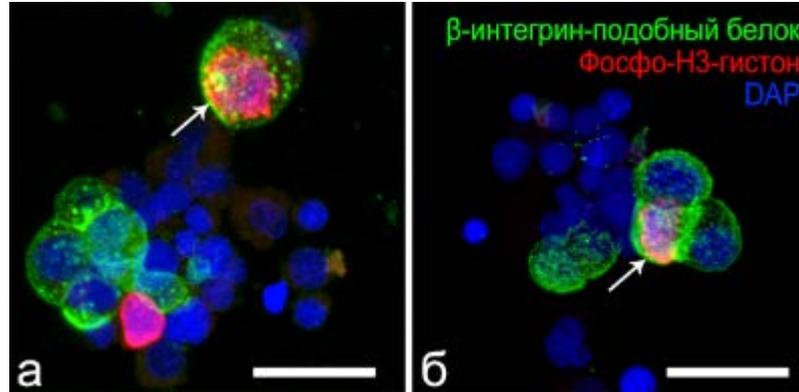


Рисунок 34. Выявление митотических клеток (фосфо-Н3-гистон-позитивных) – красный цвет, и β -интегрин-позитивных клеток – зеленый цвет, в культуре клеток личинок мидии, культивированных на ламинине (а) и фибронектине (б) в течение 24 ч. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Стрелками обозначены делящиеся клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок. Масштабная линейка 10 мкм.

3.10. Распределение β -интегрин-подобного белка в условиях воздействия факторов, нарушающих адгезию

Нарушения адгезии, происходящие в клетках морских беспозвоночных, связаны с действием многих факторов. Мы провели несколько добавочных тестов, сравнивая нарушения, вызванные специфическими и неспецифическими факторами, влияющими на адгезию: интегрин-блокирующего RGDS-пептида, хелатирующих агентов ЭДТА и ЭГТА, и криоконсервации.

В первой группе экспериментов по клеточной адгезии были использованы интегрин-блокирующий RGDS-пептид и неспецифичный RGES-пептид. Клетки, культивированные с RGDS-пептидом на любом из субстратов, оставались округлыми, не распластывались (рисунок 35, а), тогда как в контрольной культуре

или в клетках, культивированных с контрольным RGEС-пептидом (рисунок 35, в), клетки становились веретеновидными и образовывали отростки. На флуоресцентных изображениях после инкубации с RGDS-пептидом окраска на β -интегрин-подобный белок выявляла гораздо меньше клеток, экспрессирующих этот белок, чем после инкубации с RGEС-пептидом (рисунок 35, б, г).

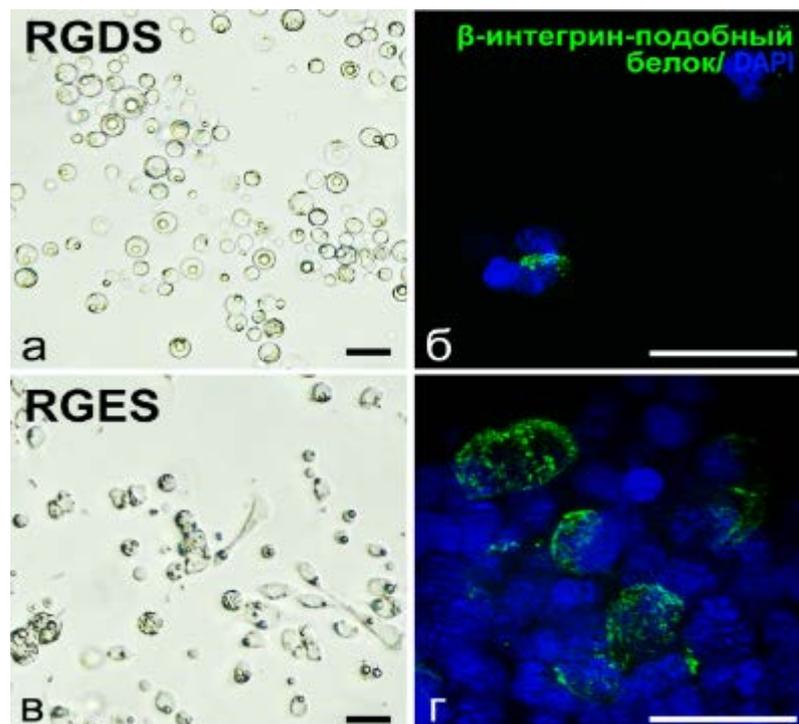


Рисунок 35. Эффект RGDS-пептида (а, б) и контрольного RGEС-пептида (в, г) на морфологию культивируемых на фибронектине клеток личинок мидии (а, в) и распределение β -интегрин-подобного белка (флуоресцентные изображения, б, г). Клетки были мечены антителами к β 1-интегрину (зеленый цвет). Ядра (синие) окрашены DAPI. Масштабная линейка 20 мкм.

На рисунке 36 а представлена динамика изменения количества клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, при культивировании контрольной культуры, а также в присутствии RGDS- и RGEС-пептидов.

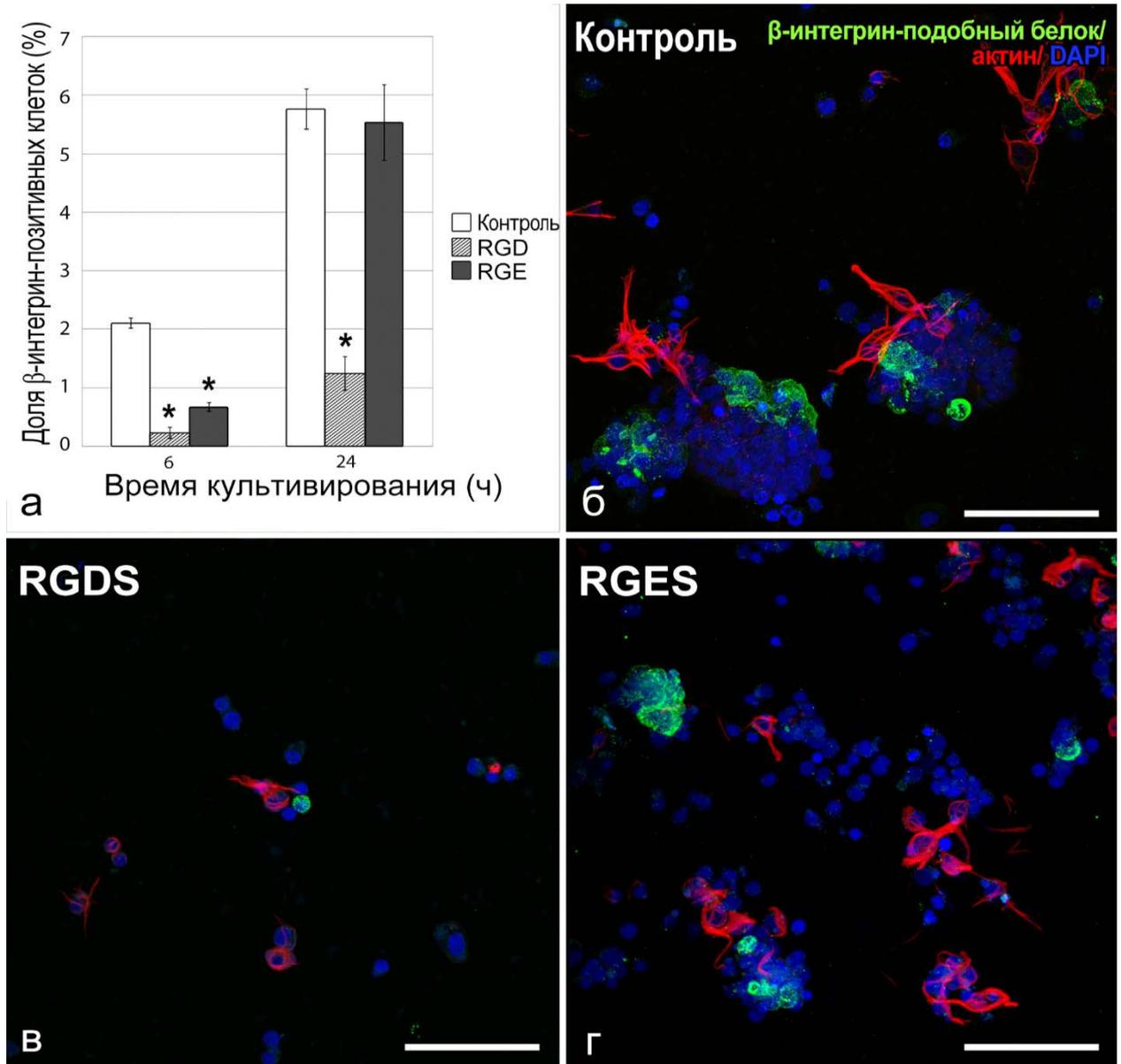


Рисунок 36. Нарушения адгезии клеточных мицелл мидии *M. trossulus* после культивирования с RGDS-пептидом. (а) Динамика появления β-интегрин-позитивных клеток в процессе культивирования в контрольной культуре, после инкубации с RGDS-пептидом или RGE-пептидом. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; * отмечен уровень значимости отличий ($p < 0,05$) относительно количества β-интегрин-позитивных клеток в контрольной культуре. Флуоресцентные изображения (б, в, г) клеток (6 – 24 ч) в контрольной культуре (б), с RGDS-пептидом (в), или с RGE (г). Клетки были мечены антителами к β1-интегрину (зеленый цвет) и фаллоидином для детекции актина (красный). Ядра (синие) окрашены DAPI. Масштабная линейка 50 мкм.

Количество клеток мидии, экспрессирующих β интегрин-подобный белок, при культивировании в присутствии RGDS-пептида уменьшалось в 4–6 раз (в зависимости от времени культивирования). На рисунке 36 б представлены флуоресцентные изображения культивируемых на стекле клеток (6–24 ч) в контрольной культуре, после инкубации с RGDS-пептидом (рисунок 35 в), или с RGES-пептидом (рисунок 36 г).

Во второй серии экспериментов мы анализировали воздействие $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелаторов (рисунок 37). После их воздействия (5 мМ) количество β -интегрин-положительных клеток также уменьшалось – через 6 ч оно было более чем в 2 раза меньше количества таких клеток в контрольной культуре (рисунок 37, а). При более длительном культивировании (24 ч) эта тенденция сохранялась, но разница между количеством β -интегрин-позитивных клеток в контроле и количеством β -интегрин-позитивных клеток после воздействия хелаторов, стала значительно меньше. Наибольший ингибирующий эффект был зарегистрирован для ЭГТА (5 мМ). При уменьшении концентрации хелаторов до 1 мМ, достоверного уменьшения в количестве β -интегрин-положительных клеток не обнаружено (данные не представлены). 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 (рисунок 37 б–г).

В третьей серии экспериментов мы протестировали изменения цитоскелета и связанных с ним белков в клетках личинок мидии до и после замораживания в жидком азоте (рисунок 38). Количество клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, было максимальным в контрольных (незамороженных) культурах, тогда как количество таких клеток в экспериментальных культурах значительно зависело от используемых криопротекторов (рисунок 38 а). Многочисленные распластаные (вероятно, мышечные) клетки и округлые клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, были обнаружены в контрольных

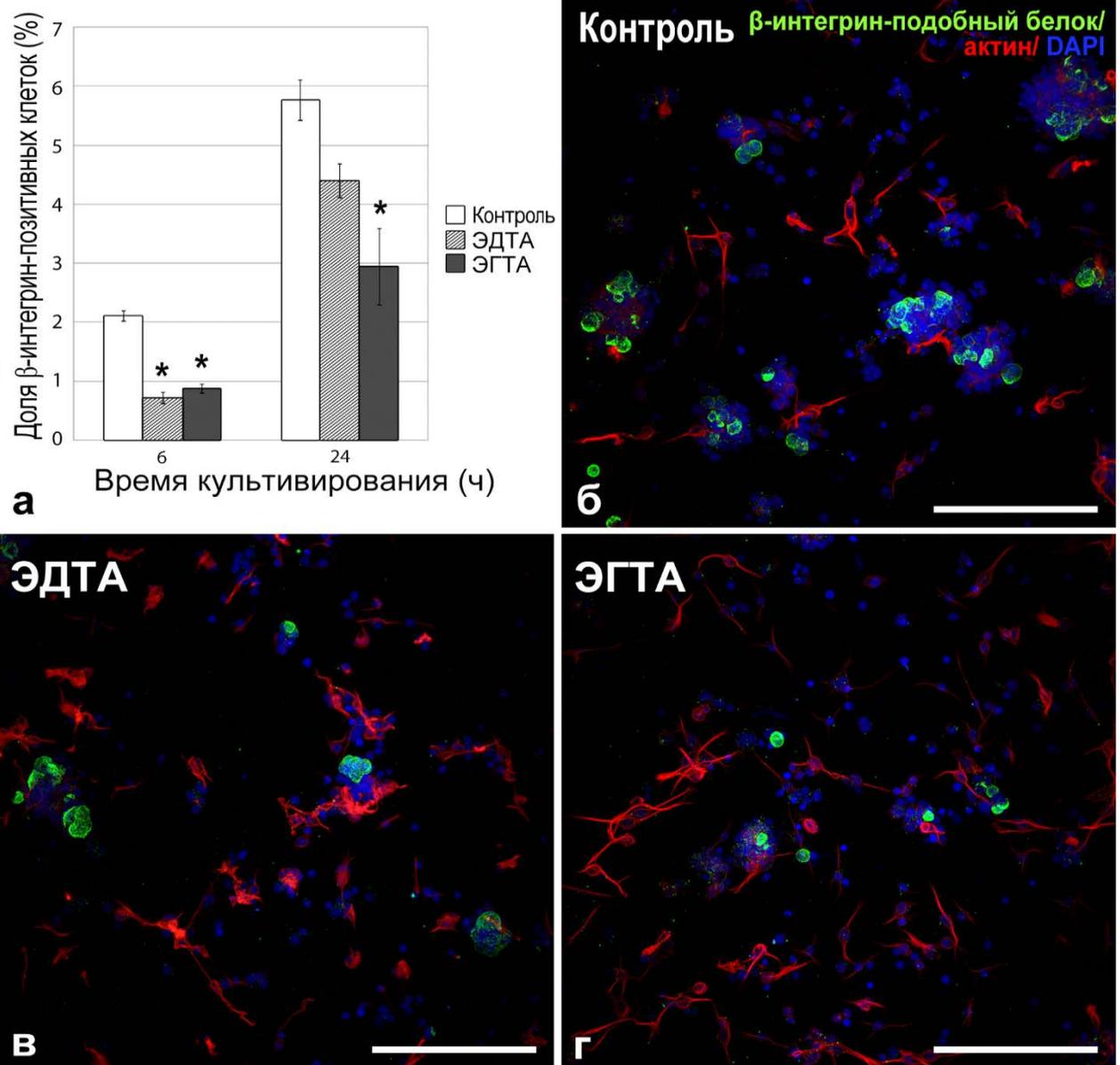


Рисунок 37. Нарушения адгезии клеток личинок мидии *M. trossulus* после культивирования с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелаторами (5 мМ). (а) Динамика появления клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, в контрольной культуре и в процессе культивирования с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -хелаторами. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение; * отмечен уровень значимости отличий ($p < 0,05$) относительно количества β -интегрин-позитивных клеток в контрольной культуре. Флуоресцентные изображения (б, в, г) культивируемых клеток личинок мидии (6 – 24 ч) в контрольной культуре (б), с ЭДТА (в), или с ЭГТА (г). Клетки были мечены антителами к $\beta 1$ -интегрину (зеленый цвет) и фаллоидином для детекции актина (красный). Ядра (синие) окрашены DAPI. Масштабная линейка 50 мкм.

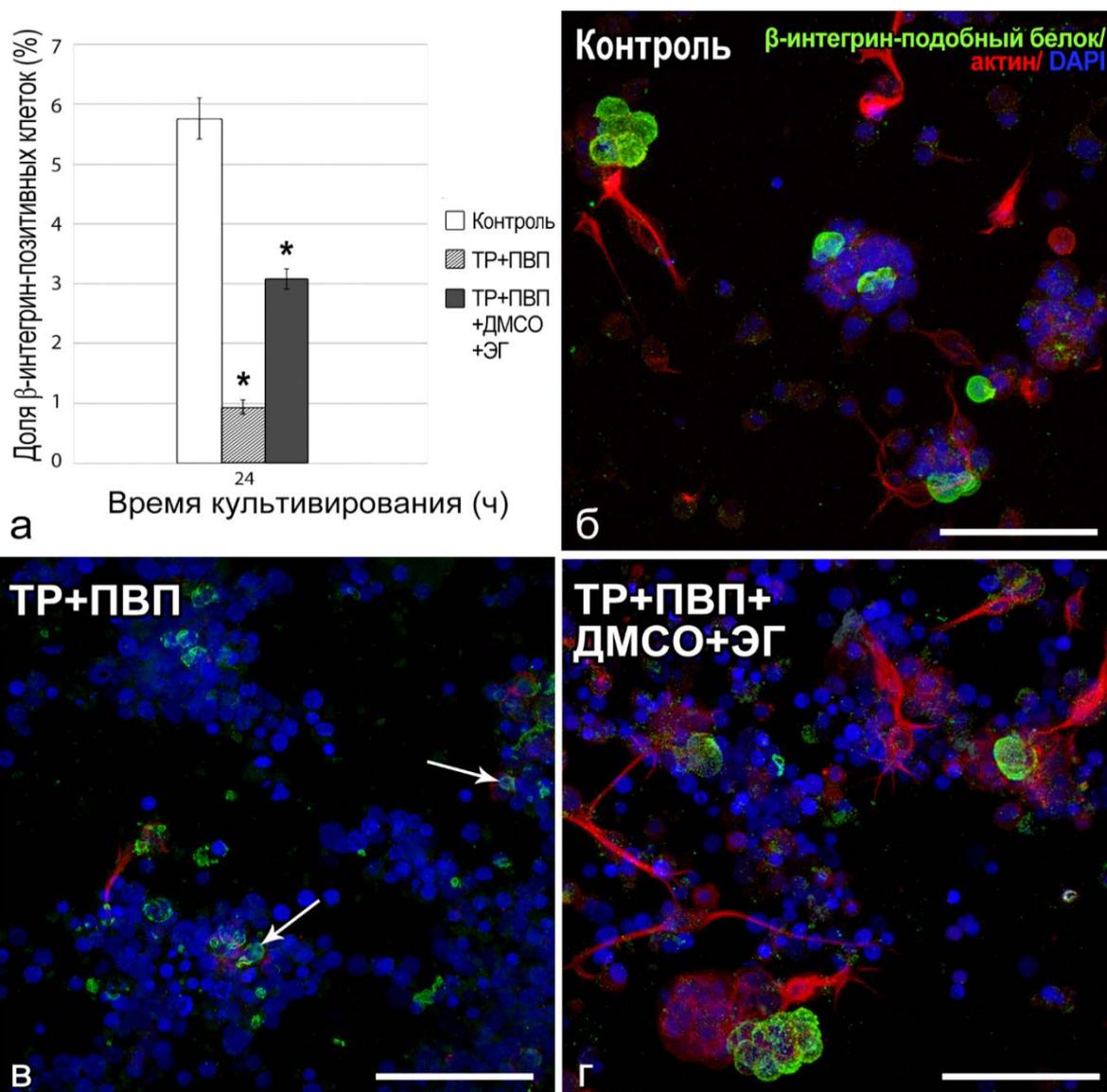


Рисунок 38. Нарушения адгезии клеточличинок мидии *M. trossulus* после криоконсервации. (а) Динамика появления клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, в контрольной культуре и после криоконсервации. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение; * отмечен уровень значимости отличий ($p < 0,05$) относительно количества β -интегрин-положительных клеток в контрольной культуре. Флуоресцентные изображения (б–г) культивируемых клеток личинок мидии (6–24 ч) в контрольной культуре (б), после замораживания в присутствии только непроникающих криопротекторов ТР+ПВП (в), или после замораживания в присутствии смеси криопротекторов ТР+ПВП+ДМСО+ЭГ (г). Клетки были мечены антителами к $\beta 1$ -интегрину (зеленый цвет) и фаллоидином для детекции актина (красный). Ядра (синие) окрашены DAPI. Масштабная линейка 50 мкм.

культурах и в культурах, замороженных в присутствии смеси проникающих и непроникающих криопротекторов. В противоположность этому, в культурах, замороженных только в присутствии непроникающих криопротекторов, после оттаивания было характерно почти полное отсутствие распластанных клеток. В этих экспериментах мы могли только в редких случаях детектировать появление клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, либо остатки этих клеток. Анализ распределения актина, одного из основных цитоскелетных белков, в клетках после цикла замораживания-оттаивания показал, что он прекрасно сохраняется в клетках моллюсков и после криоконсервации.

Таким образом, использование в качестве маркера стабильного состояния клеток β -интегрин-подобного белка в комплексе с филаментным актином позволяет провести объективную оценку нарушений адгезии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство исследований интегринов выполнено на таких «модельных» объектах, среди которых практически нет трохофорных животных. Морские двустворчатые моллюски – трохофорные животные и одновременно всемирно популярные объекты биотехнологии; исследование их развития важно для марикультуры. Однако, они – не модельные организмы. С недавним завершением анализа геномов трех морских беспозвоночных, а именно, двух из Deuterostomia (морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* и ланцетника *Branchiostoma floridae*) (Sodergren et al., 2006; Yu et al., 2008) и одного из Protostomia (актинии *Nematostella vectensis*) (Putnam et al., 2007) можно получить более полную картину об эволюционном развитии последовательностей β -интегрин-подобных белков. Кроме того, использование этих данных, полученных для животных, имеющих простые генные сети, может пригодиться для анализа геномов других беспозвоночных животных, таких как моллюски.

Мы идентифицировали в транскриптоме мидии *M. trossulus* четыре полноразмерных транскрипта, кодирующих последовательности, гомологичные β -интегринам, и определили экспрессию генов этих белков на различных стадиях личиночного развития и в некоторых органах и клетках взрослых моллюсков. 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). Четыре идентифицированных транскрипта являются изоформами двух генов β -А и β -В. Изоформы гена β -А 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 (β -В) представлен тоже двумя изоформами, но которые отличались небольшими вставками в белок-некодирующей области. Не исключено, что существование этих двух изоформ является следствием аллельного разнообразия гена β -В. Более чем 2000 генов мидии имеют по две изоформы, а около 1000 генов имеют пять изоформ (Gerdol et

al., 2015). Это неудивительно, так как для популяций мидий характерен чрезвычайно высокий уровень гетерозиготности (Mosquera et al., 2003).

Установлена высокая степень сходства β -интегрин-подобных белков мидии с их гомологами среди интегринов устрицы (62–70% сходства). В отличие от консервативных цитоплазматических и трансмембранных доменов, последовательность внеклеточных доменов β -интегрин-подобных белков мидии, на долю которой приходится 80–90% молекулы, совпадает только в нескольких консервативных участках. Тем не менее, все 56 цистеиновых остатков, присутствие которых характерно для внеклеточных доменов β -субъединиц интегринов позвоночных, присутствуют во внеклеточных доменах β -интегрин-подобных белков мидии. Сходство между эпитопами, узнаваемых используемым клоном антител, и соответствующими сайт-специфическими последовательностями β -интегрин-подобных белков мидии составляет около 50%. Несмотря на невысокую степень сходства, участки взаимодействия с антителами богаты цистеинами, что, вероятно, обуславливает определенную вторичную структуру, необходимую для специфического связывания с антителами.

Интегриновые субъединицы позвоночных заметно дивергировали (Hynes, 2002). Для α -интегриновых субъединиц есть доказательства дивергенции до разделения Первичноротых от Вторичноротых (Hynes, 2012), тогда как для β -интегриновых субъединиц таких доказательств дивергенции нет. Вероятно, β -интегрин-подобные субъединицы губок и кораллов образовались независимо друг от друга, а разделение на классы β -интегрин-подобных субъединиц у позвоночных является событием, которое произошло поздно в эволюции, скорее всего, только в линии Вторичноротых, и, возможно, только в пределах хордовых (Brower et al., 1997). Существует другое мнение: у беспозвоночных произошла независимая дивергенция β -интегрин-подобных субъединиц от предковой формы в нескольких линиях билатеральных животных (Burke, 1999). Сохранение расстояний между консервативными цистеинами может быть случайным событием, но, скорее всего, эти расстояния строго определяются функцией интегринов. β -интегрин-подобные

белки дрозофилы и нематоды *C. elegans* показывают высокую степень сходства с β -интегриновой субъединицей позвоночных. Кроме того, для них доказано широкое вовлечение в процессы развития. По крайней мере, для β -интегрин-подобных субъединиц могло произойти независимое разделение этих белков внутри большинства главных таксонов, и ортологов β -интегринов позвоночных нет (Burke, 1999). Хотя последовательности β -интегрин-подобных белков не лучший вариант для построения филогенетических деревьев, мы сталкиваемся с повсеместным присутствием последовательностей интегрин-подобных белков у всех типов животных.

Учитывая тот факт, что в настоящее время не существует видоспецифичных антител для моллюсков не только к $\beta 1$ -интегрину, но и фибронектину, и рассматривая эти белки как имеющие высококонсервативные последовательности у различных организмов (Bozyczko, Horwitz, 1986; Horwitz et al., 1986; Bozyczko et al., 1989; Lakonishok et al., 1992; Hynes, 2002; Loulier et al., 2009), мы использовали коммерческие моноклональные антитела мыши к $\beta 1$ -интегрину человека и поликлональные антитела кролика к фибронектину из плазмы крови человека, чтобы идентифицировать клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок и фибронектин-подобные белки, в развитии двустворчатого моллюска *M. trochus* и в его гемоцитах. Два клона антител мыши к внеклеточному домену $\beta 1$ -субъединицы интегрин человека (LM534 и P4G11, Chemicon) обнаружили β -интегрин-позитивные клетки во время личиночного развития и в некоторых тканях взрослого моллюска (Dyachuk et al., 2015). Несмотря на то, что интегрины – высококонсервативные молекулы и геномы моллюсков содержат гены интегринов (Lockyer et al., 2007; Zhang et al., 2012), мы смогли доказать кросс-реактивность для интегрин-подобных молекул у моллюсков только одного клона антител (LM534, в области 588–706 аминокислот) (Maiorova et al., 2014). Проведенный нами BLAST анализ аминокислотной последовательности внеклеточных доменов $\beta 1$ -субъединицы интегрин человека и β -интегрин-подобных молекул у двустворчатых моллюсков обнаружил 38% идентичности именно в этом районе

молекул (в области 588–706 аминокислот). Сигнал на Вестерн-блоте связан с белковой полосой с м.м. 110 кДа, что соответствует размеру β 1-субъединицы интегрина у позвоночных.

Вызывает вопрос присутствие клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, в личинках на стадии ранней и средней трохофоры и отсутствие полосы, соответствующей β -интегрин-подобному белку в экстрактах личинок на этих стадиях на Вестерн-блоте. Получить синхронную культуру личинок очень трудно (сказывается эффект плотности личинок в культуре, градиента температуры, pH и других абиотических факторов). Как результат, на стадии трохофоры (26 ч после оплодотворения) полоса, соответствующая β -интегрин-подобному белку, отсутствовала, так как только примерно у 20–30% личинок из тестируемой культуры появляется кластер клеток, экспрессирующих высокий уровень β -интегрин-подобного белка в формирующемся желудке. Только позже, когда все личинки становятся старше и начинают питаться (стадия велигера, 56 ч после оплодотворения), мы можем обнаружить полосу, соответствующую β -интегрин-подобному белку на Вестерн-блоте. Недавние результаты, полученные по анализу транскриптома пищеварительной железы мидии, показывают, что из 30 наиболее экспрессируемых генов в этом органе два гена кодируют цистеин-богатые белки (Gerdol et al., 2015).

Известно, что β 1-субъединицы интегринов играют важную роль в нейро- и миогенезе позвоночных животных (Bozyczko, Horwitz, 1986; Bozyczko et al., 1989; Cann et al., 1996). В наших экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* обнаружено, что β -интегрин-подобный белок отсутствует в нервных и мышечных клетках мидии (в отличие от подобных клеток позвоночных), но появляется в формирующейся пищеварительной системе личинок. Для позвоночных появление и функционирование β 1-интегрина существенно не только для развития мышечной и нервной систем, но и для развития и дифференцировки различных типов эпителиев, включая эпителий пищеварительной системы (Chenard et al., 2000). В этом случае, экспрессия интегриновых субъединиц коррелировала с развитием

поляризованного фенотипа эпителиальных клеток. Эти результаты согласуются с данными, показывающими, что $\beta 1$ -интегрин является важным регулятором полярности в эпителиях (Schwimmer, Ojakian, 1995). Интегрины важны для эпителиальной организации кишечника не только человека, но и насекомых, таких как *Drosophila* (Devenport, Brown, 2004), табачного бражника *Manduca sexta* (Midboe et al., 2003), и табачной листовёрки *Heliothis virescens* (Loeb, 2006, 2010). У морских ежей личиночный βL -интегрин обнаружен в архенторе (первичной пищеварительной трубке) (Marsden, Burke, 1998), и позже он появляется на стадии гастрюлы и плутеуса в желудке (Marsden, Burke, 1997).

Установлено, что первые β -интегрин-позитивные клетки располагаются в просвете полости желудка и могут быть покрыты многочисленными тубулин-положительными ресничками. Клетки, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, входят в состав мерцательного эпителия пищеварительной системы, и, возможно, выполняют важную роль в циркуляции пищевых частиц, а также в их фагоцитозе и пищеварении.

Следует отметить, что окраска интегринов всегда была связана с мембранами клеток и никогда не встречалась в ядре, так как это рецепторы адгезии. В противоположность этому, возможные лиганды β -интегрин-подобного белка, Фб-подобные белки были обнаружены в большинстве случаев в цитоплазме, но иногда встречались в ядрах клеток ранних стадий развития мидии. Подобная локализация фибронектина была отмечена в нескольких типах клеток позвоночных: в HeLa клетках человека (Zerlauth et al., 1988) и в клетках межпозвонковых дисков мыши (Oegema et al., 2000). У позвоночных взаимодействие интегринов и фибронектина чрезвычайно важно на ранних стадиях развития (Boucaut et al., 1984; Krotoski, Bronnerfraser, 1990; Johansson et al., 1997). Было обнаружено, что интегрины человека, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, и $\alpha 5\beta 1$, содержащие $\beta 1$ -субъединицы интегринов, связываются с фибронектином (Ruoslahti, 1991; Busk et al., 1992).

У двустворчатых моллюсков Фб-подобные белки играют важную роль в клеточной адгезии и распластывании (Suzuki, Funakoshi, 1992; Dirosa et al., 1994;

Ranara et al., 1996). Как показано ранее, Фб-подобные белки синтезируются в мантии взрослых устриц (Zhang et al., 2012). В отличие от позвоночных животных, со-локализации β -интегрин-подобного белка и Фб-подобных белков в моллюсках не обнаружено – ни в личинках мидии, ни в культивируемых гемоцитах, хотя нельзя исключить возможность их прямого взаимодействия на последующих стадиях органогенеза. Присутствие высокомолекулярных димеров Фб-подобных белков в наших экспериментах на Вестерн-блоте можно объяснить образованием агрегатов в используемых условиях разделения. Подобные димеры фибронектина были ранее описаны для беспозвоночных (моллюсков) (Paz et al., 2002; 2005) и позвоночных (человек) (Vartio, Kuusela, 1991).

Хотя лиганды интегринов у беспозвоночных охарактеризованы недостаточно, такие лиганды, как ламинин и RGD-содержащие компоненты ВКМ, по-видимому, участвуют во взаимодействии интегринов с клетками беспозвоночных (Burke, 1999). Наши результаты о специфическом взаимодействии β -интегрин-позитивных клеток с ламинином и формировании небольших эпителиоподобных структур на этом субстрате в условиях культуры, совпадают с данными, полученными для эпителиоцитов эмбрионов дрозофилы, которые формировали кластеры β -PS3-интегрин-позитивных клеток при культивировании на ламинине, но не на витронектине (Gullberg et al., 1994). Известно, что ламинин является одним из компонентов базальных мембран эпителиев у многих животных (Cooper et al., 1981), поэтому не удивителен факт специфического взаимодействия эпителиоцитов пищеварительной системы личинок мидии с ламинином.

Неоднократно было доложено, что RGDS-пептид влияет на адгезию клеток позвоночных и беспозвоночных животных. У позвоночных, активный сайт β -субъединицы интегрина расположен в межклеточном пространстве и участвует в клеточном сигналинге через связывание с цитоскелетом (Shattil et al., 2010). Известно, что RGDS-пептид и двухвалентные ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} значительно воздействуют на адгезию и форму клеток, но информация о влиянии этих агентов на распределение β -интегрин-подобных молекул у моллюсков отсутствует. Наши

результаты показывают, что распределение и относительное количество β -интегрин-позитивных клеток в моллюсках зависят от присутствия RGDS-пептида и обработки хелаторами. Кроме того, структуры клеток, вовлеченные в адгезию и межклеточные контакты, могут быть объектами крио-индуцированного повреждения. Понимание ультраструктурных изменений в клетках в ответ на замораживание-оттаивание важно для разработки стратегий криоконсервации клеток и тканей моллюсков. Количество клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок, было максимальным в контрольных (незамороженных) культурах, тогда как количество таких клеток после замораживания-оттаивания значительно зависело от используемых криопротекторов. Мы не провели специальных экспериментов, чтобы подтвердить конформационные изменения интегринов в процессе культивирования, но во всех сериях экспериментов мы использовали контрольные культуры. Это позволило нам говорить об изменениях в распределении интегрин-подобных молекул и относительном количестве клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок.

Количество делящихся клеток для многих беспозвоночных резко уменьшается в процессе культивирования, что можно объяснить общим уменьшением митотической активности после 7–10 суток культивирования (Одинцова, 2009; Rinkevich, 2011). По мере увеличения сроков культивирования, снижается уровень пролиферации в культурах, но при этом возрастает количество мышечных клеток, находящихся на терминальных стадиях дифференцировки. Значительные различия в длительности митоза и S-периода, вероятно, обуславливают различия в количестве митотических клеток и PCNA-позитивных клеток на всех тестируемых нами сроках культивирования: количество митотических клеток было примерно в 5–6 раз меньше.

По-видимому, все геномы двустворчатых моллюсков, как это показано для устрицы (Takeuchi et al., 2012; Zhang et al., 2012), высоко полиморфны и богаты повторяющимися последовательностями, в которых проходят некоторые замены, формирующие различные вариации. Только 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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, полученные для устрицы *C. gigas* (Zhang et al., 2012) и мидии *M. trossulus* (результаты наших исследований), доказывают присутствие интегрин-подобных последовательностей в геномах двустворчатых моллюсков. Установлена высокая степень сходства β -интегрин-подобных белков двустворчатых моллюсков с их гомологами среди интегринов позвоночных. Все 56 цистеинов, присутствие которых характерно для внеклеточных доменов β -субъединиц интегринов позвоночных, присутствуют во внеклеточных доменах β -интегрин-подобных белков мидии.

В этом исследовании мы использовали антитела к интегрину и фибронектину человека, но показали специфичность используемых клонов антител. Учитывая, что β -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 β -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, экспрессирующие β -интегрин-подобный белок, содержат многочисленные реснички и образуют эпителиоподобные структуры в культуре, что может указывать на их участие в работе мерцательного эпителия желудка личинок мидии. В процессе развития личинок мидии установлено появление Фб-подобных белков на стадии бластулы, тогда как β -интегрин-подобный белок появляется позже, на стадии велигера, когда все личинки начинают питаться.

Способность β -интегрин-позитивных клеток к пролиферации в составе однослойного эпителия в личинках и в культуре клеток указывает на их возможное участие в росте и регенерации пищеварительного эпителия мидии.

При стрессовых ситуациях, таких как нарушение адгезии или замораживание-оттаивание, происходит уменьшение доли клеток, экспрессирующих β -интегрин-подобный белок. Оценка распределения β -интегрин-положительных клеток может быть использована как критерий состояния клеток после внешних воздействий.

Эти результаты помогут выяснить возможные функции β -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 β -интегрин-подобных белков, которые являются изоформами двух генов. Установлена высокая степень их сходства с интегринами различных видов моллюсков. Экспрессия одного из этих генов (β -А) связана с ранними стадиями развития личинок, а экспрессия второго гена (β -В), в основном, характерна для гемоцитов.
2. В развитии мидии β -интегрин-подобный белок появляется на стадии ранней трохофоры, и его появление коррелирует с развитием пищеварительной системы личинок, но не связано с развитием нервной и мышечной систем. Некоторые эпителиоциты, экспрессирующие β -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 β -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 β -интегрин-подобный белок.
4. Клетки личинок мидии, экспрессирующие β -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 β -интегрин-подобный белок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дячук В.А. Миогенная и нейрональная дифференцировка клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* *in vivo* и *in vitro*: Дисс. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2008. 111 с.
2. Заварзин А.А. Основы общей цитологии. Л.: Издательство Ленинградского государственного университета. 1982. 240 с.
3. Иванова-Казас О.М. К вопросу о соотношении морфологических осей у Spiralia // Зоологический журнал. 1974. Т. 53, № 1. С. 5–19.
4. Исаева В.В. Клетки в морфогенезе. М.: Наука. 1994. 224 с.
5. Кирик О., Безнин Г., Коржевский Д. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях // Морфология. 2009. Т. 136, № 6. С. 95–100.
6. Малахов В., Медведева Л. Эмбриональное и раннее личиночное развитие двустворчатого моллюска *Mytilus edulis* // Зоологический журнал. 1985. Т. 64, № 12. С. 1808–1815.
7. Одинцова Н.А. Основы культивирования клеток морских беспозвоночных. Владивосток: Дальнаука. 2001. 162 с.
8. Одинцова Н.А., Дячук В.А., Карпенко А.А. Развитие мышечного аппарата и сократительной активности мидии *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // Онтогенез. 2007. Т. 38, № 3. С. 1–6.
9. Одинцова Н.А. Стволовые клетки морских беспозвоночных: регуляция пролиферации и индукция дифференцировки *in vitro* // Цитология. 2009. Т. 51, № 4. С. 367–372.
10. Сахаров Д., Каботянский Е. Интеграция поведения крылоногого моллюска дофамином и серотонином // Журнал общей биологии. 1986. Т. 47, № 2. С. 234–245.
11. Северин Е. Биохимия: учебник для ВУЗов. М.: Высшая школа. 2004. 779 с.

12. *Флячинская Л.П., Кулаковский Э.Л.* Личиночное развитие двустворчатого моллюска *Mytilus edulus* (Mytilida, Mytilidae) // Зоологический журнал. 1991. Т. 70, № 11. С. 23–29.
13. *Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В.* Выращивание мидий и устриц в Черном море / под. ред. В.Н. Еремеева. Севастополь: Национальная академия наук Украины, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. 2010. 424 с.
14. *Albelda S.M., Buck C.A.* Integrins and other cell adhesion molecules // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1990. Vol. 4, № 11. P. 2868–2880.
15. *Arnaout M.A., Mahalingam B., Xiong J.P.* Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2005. Vol. 21. P. 381–410.
16. *Assoian R.K.* Anchorage-dependent cell cycle progression // Journal of Cell Biology. 1997. Vol. 136, № 1. P. 1–4.
17. *Bakolitsa C., Cohen D.M., Bankston L.A., Bobkov A.A., Cadwell G.W., Jennings L., Critchley D.R., Craig S.W., Liddington R.C.* Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion // Nature. 2004. Vol. 430, № 6999. P. 583–586.
18. *Bassim S., Tanguy A., Genard B., Moraga D., Tremblay R.* Identification of *Mytilus edulis* genetic regulators during early development // Gene. 2014. Vol. 551. P. 65–78.
19. *Bayne B.L.* The biology of mussel larvae. In: Marine mussels: their ecology and physiology Cambridge: Cambridge University Press. 1976. P. 81–120.
20. *Beninger P.G., Le Pennec G., Le Pennec M.* Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. // Biological Bulletin. 2003. Vol. 205, № 1. P. 83–92.
21. *Berger T.M., Hirsch E., Djonov V., Schittny J.C.* Loss of beta1-integrin-deficient cells during the development of endoderm-derived epithelia // Anatomy and embryology. 2003. Vol. 207, № 4-5. P. 283–288.

22. *Berman A.E., Kozlova N.I., Morozevich G.E.* Integrins: structure and signaling // *Biochemistry (Biokhimiia)*. 2003. Vol. 68, № 12. P. 1284–1299.
23. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, № 15. P. 2114–2120.
24. *Boucaut J.C., Darribere T., Poole T.J., Aoyama H., Yamada K.M., Thiery J.P.* Biologically-active synthetic peptides as probes of embryonic-development – a competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell-migration in avian embryos // *Journal of Cell Biology*. 1984. Vol. 99, № 5. P. 1822–1830.
25. *Boulo V., Cadoret J.P., Shike H., Shimizu C., Miyanochara A., Burns J.C.* Infection of cultured embryo cells of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by pantropic retroviral vectors // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*. 2000. Vol. 36, № 6. P. 395–399.
26. *Bozyczko D., Horwitz A.F.* The participation of a putative cell surface receptor for laminin and fibronectin in peripheral neurite extension // *The Journal of Neuroscience*. 1986. Vol. 6, № 5. P. 1241–1251.
27. *Bozyczko D., Decker C., Muschler J., Horwitz A.F.* Integrin on developing and adult skeletal muscle // *Experimental Cell Research*. 1989. Vol. 183, № 1. P. 72–91.
28. *Brabant M.C., Brower D.L.* PS2 integrin requirements in *Drosophila* embryo and wing morphogenesis // *Developmental Biology*. 1993. Vol. 157, № 1. P. 49–59.
29. *Bromley M., Rew D., Becciolini A., Balzi M., Chadwick C., Hewitt D., Li Y.Q., Potten C.S.* A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa // *European Journal of Histochemistry*. 1996. Vol. 40, № 2. P. 89–100.
30. *Brower D.L., Brower S.M., Hayward D.C., Ball E.E.* Molecular evolution of integrins: genes encoding integrin beta subunits from a coral and a sponge // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. Vol. 94, № 17. P. 9182–9187.

31. *Bunch T.A., Brower D.L.* Drosophila PS2 integrin mediates RGD-dependent cell-matrix interactions // *Development*. 1992. Vol. 116, № 1. P. 239–247.
32. *Burke R.D.* Invertebrate integrins: structure, function, and evolution // *International Review of Cytology*. 1999. Vol. 191. P. 257–284.
33. *Burkin D.J., Kaufman S.J.* The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease // *Cell and Tissue Research*. 1999. Vol. 296, № 1. P. 183–190.
34. *Busk M., Pytela R., Sheppard D.* Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein // *The Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267, № 9. P. 5790–5796.
35. *Campos L.S.* Beta1 integrins and neural stem cells: making sense of the extracellular environment // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 2005. Vol. 27, № 7. P. 698–707.
36. *Cann G.M., Bradshaw A.D., Gervin D.B., Hunter A.W., Clegg D.O.* Widespread expression of beta1 integrins in the developing chick retina: evidence for a role in migration of retinal ganglion cells // *Developmental Biology*. 1996. Vol. 180, № 1. P. 82–96.
37. *Carballal M.J., Lopez M.C., Azevedo C., Villalba A.* Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Diseases of Aquatic Organisms*. 1997. Vol. 29, № 2. P. 127–135.
38. *Carlini D.B., Reece K.S., Graves J.E.* Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) // *Molecular Biology and Evolution*. 2000. Vol. 17, № 9. P. 1353–1370.
39. *Charo I.F., Nannizzi L., Smith J.W., Cheresh D.A.* The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin // *Journal of Cell Biology*. 1990. Vol. 111, № 6. Pt 1. P. 2795–2800.
40. *Chen S., Wang C.* Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Röding // *Methods in Cell Science*. 1999. Vol. 21, № 4. P. 183–192.

41. *Chenard M., Basque J.R., Chailler P., Tremblay E., Beaulieu J.F., Menard D.* Expression of integrin subunits correlates with differentiation of epithelial cell lineages in developing human gastric mucosa // *Anatomy and Embryology*. 2000. Vol. 202, № 3. P. 223–233.
42. *Cheng T.C.* Hemocytes: forms and functions // *The eastern oyster Crassostrea virginica*. 1996. Vol. 1. P. 75–93.
43. *Cohen C.* Matching molecules in the catch mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982. Vol. 79, № 10. P. 3176–3178.
44. *Cooper A.R., Kurkinen M., Taylor A., Hogan B.L.* Studies on the biosynthesis of laminin by murine parietal endoderm cells // *European Journal of Biochemistry*. 1981. Vol. 119, № 1. P. 189–197.
45. *Corbetta S., Bairati A., Vitellaro Zuccarello L.* Immunohistochemical study of subepidermal connective of molluscan integument // *European Journal of Histochemistry*. 2002. Vol. 46, № 3. P. 259–272.
46. *Cox G.N.* Molecular and biochemical aspects of nematode collagens // *Journal of Parasitology*. 1992. Vol. 78, № 1. P. 1–15.
47. *Cragg S.* The adductor and retractor muscles of the veliger of *Pecten maximus* (L.)(Bivalvia) // *Journal of Molluscan Studies*. 1985. Vol. 51, № 3. P. 276–283.
48. *Cragg S.M., Crisp D.J.* The biology of scallop larvae. In: *Biology, Ecology and Aquaculture of Scallops*. Amsterdam: Elsevier. 1991. P. 75–132.
49. *Davids B.J., Wu X.J., Yoshino T.P.* Cloning of a beta integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusc, *Biomphalaria glabrata* // *Gene*. 1999. Vol. 228, № 1–2. P. 213–223.
50. *De Laat S.W., Tertoolen L.G., Dorresteyn A.W., van den Biggelaar J.A.* Intercellular communication patterns are involved in cell determination in early molluscan development // *Nature*. 1980. Vol. 287, № 5782. P. 546–548.
51. *Degnan B.M., Degnan S.M., Fentenany G., Morse D.E.* A Mox homeobox gene in the gastropod mollusc *Haliotis rufescens* is differentially expressed during

- larval morphogenesis and metamorphosis // FEBS Letters. 1997. Vol. 411, № 1. P. 119–122.
52. *DeSimone D.W., Spiegel E., Spiegel M.* The biochemical identification of fibronectin in the sea urchin embryo // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1985. Vol. 133, № 1. P. 183–188.
53. *DeSimone D.W., Hynes R.O.* *Xenopus laevis* integrins. Structural conservation and evolutionary divergence of integrin beta subunits // Journal of Biological Chemistry. 1988. Vol. 263, № 11. P. 5333–5340.
54. *Devenport D., Brown N.H.* Morphogenesis in the absence of integrins: mutation of both *Drosophila* beta subunits prevents midgut migration // Development. 2004. Vol. 131, № 21. P. 5405–5415.
55. *Dirosa I., Contenti S., Fagotti A., Simoncelli F., Principato B., Panara F., Pascolini R.* Fibronectin from the hemolymph of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* – purification, immunological characterization and immunocytochemical localization // Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry and Molecular Biology. 1994. Vol. 107, № 4. P. 625–632.
56. *Dyachuk V., Odintsova N.* Development of the larval muscle system in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia) // Development, Growth and Differentiation. 2009. Vol. 51, № 2. P. 69–79.
57. *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. Vol. 57, № 7. P. 515–528.
58. *Enomoto M.I., Boettiger D., Menko A.S.* Alpha 5 integrin is a critical component of adhesion plaques in myogenesis // Developmental Biology. 1993. Vol. 155, № 1. P. 180–197.
59. *Ewan R., Huxley-Jones J., Mould A.P., Humphries M.J., Robertson D.L., Boot-Handford R.P.* The integrins of the urochordate *Ciona intestinalis* provide novel insights into the molecular evolution of the vertebrate integrin family // BMC Evolutionary Biology. 2005. Vol. 5. P. 31.

60. *Fauvarque M.O., Williams M.J. Drosophila cellular immunity: a story of migration and adhesion // Journal of Cell Science. 2011. Vol. 124, Pt 9. P. 1373–1382.*
61. *Favrel P., Giard W., Benlimane N., Boucaud-Camou E., Henry M. A new biological activity for the neuropeptide FMRFamide: experimental evidence for a secretagogue effect on amylase secretion in the scallop *Pecten maximus* // Experientia. 1994. Vol. 50, № 11–12. P. 1106–1110.*
62. *Fessler J.H., Fessler L.I. Drosophila extracellular matrix // Annual review of cell biology. 1989. Vol. 5. P. 309–339.*
63. *Fleming J.C., Pahl H.L., Gonzalez D.A., Smith T.F., Tenen D.G. Structural analysis of the CD11b gene and phylogenetic analysis of the alpha-integrin gene family demonstrate remarkable conservation of genomic organization and suggest early diversification during evolution // Gene Expression Patterns. 1993. Vol. 150, № 2. P. 480–490.*
64. *Garcia M.G., Toney S.J., Hille M.B. Focal adhesion kinase (FAK) expression and phosphorylation in sea urchin embryos // Gene Expression Patterns. 2004. Vol. 4, № 2. P. 223–234.*
65. *Gerdol M., Venier P., Pallavicini A. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia // Developmental and Comparative Immunology. 2015. Vol. 49, № 1. P. 59–71.*
66. *Giancotti F.G., Ruoslahti E. Integrin signaling // Science. 1999. Vol. 285, № 5430. P. 1028–1032.*
67. *Gilcrease M.Z. Integrin signaling in epithelial cells // Cancer Letters. 2007. Vol. 247, № 1. P. 1–25.*
68. *Glinski Z., Jarosz J. Molluscan immune defenses // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 1997. Vol. 45, № 2–3. P. 149–155.*
69. *Goel H.L., Languino L.R. Integrin signaling in cancer // Cancer Treatment and Research. 2004. Vol. 119. P. 15–31.*

70. *Gratecos D., Naidet C., Astier M., Thiery J.P., Semeriva M.* *Drosophila* fibronectin – a protein that shares properties similar to those of its mammalian homolog // *Embo Journal*. 1988. Vol. 7, № 1. P. 215–223.
71. *Grimmelikhuijzen C.J., Dockray G.J., Schot L.P.* FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of *Hydra* // *Histochemistry*. 1982. Vol. 73, № 4. P. 499–508.
72. *Guan J.L., Hynes R.O.* Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1 // *Cell*. 1990. Vol. 60, № 1. P. 53–61.
73. *Gullberg D., Fessler L.I., Fessler J.H.* Differentiation, extracellular matrix synthesis, and integrin assembly by *Drosophila* embryo cells cultured on vitronectin and laminin substrates // *Developmental Dynamics*. 1994. Vol. 199, № 2. P. 116–128.
74. *Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G.* QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, № 8. P. 1072–1075.
75. *Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., Macmanes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., Leduc R.D., Friedman N., Regev A.* De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis // *Nature Protocols*. 2013. Vol. 8, № 8. P. 1494–1512.
76. *Hanselmann R., Smolowitz R.* Identification of proliferating cells in hard clams // *Biological Bulletin*. 2000. Vol. 199, № 2. P. 199–200.
77. *Hansen E.L.* A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics // *Invertebrate tissue culture: Research applications*. New York: Academic Press. 1976. P. 75–99.
78. *Har-el R., Tanzer M.L.* Extracellular matrix. 3: Evolution of the extracellular matrix in invertebrates // *FASEB Journal: Official Publication of the Federation*

- of American Societies for Experimental Biology. 1993. Vol. 7, № 12. P. 1115–1123.
79. *Haralson M., Hassell J.R., Kamoun P.* Extracellular matrix. A practical approach // Conference Proceedings: Annales de Biologie Clinique. 1996. P. 383–384.
80. *Hauschka S.D., Konigsberg I.R.* The influence of collagen on the development of muscle clones // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1966. Vol. 55, № 1. P. 119–126.
81. *Hegaret H., Wikfors G.H., Soudant P.* Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2003. Vol. 293, № 2. P. 237–248.
82. *Heino J., Huhtala M., Kapyla J., Johnson M.S.* Evolution of collagen-based adhesion systems // The International Journal of Biochemistry and Cell biology. 2009. Vol. 41, № 2. P. 341–348.
83. *Hemler M.E.* VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes // Annual Review of Immunology. 1990. Vol. 8. P. 365–400.
84. *Hernadi L., Erdelyi L., Hiripi L., Elekes K.* The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia* // Journal of Neurocytology. 1998. Vol. 27, № 10. P. 761–775.
85. *Hirata A., Inada K.-I., Tsukamoto T., Sakai H., Mizoshita T., Yanai T., Masegi T., Goto H., Inagaki M., Tatematsu M.* Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells // Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2004. Vol. 52, № 11. P. 1503–1509.
86. *Hirsch E., Gullberg D., Balzac F., Altruda F., Silengo L., Tarone G.* Alpha v integrin subunit is predominantly located in nervous tissue and skeletal muscle

- during mouse development // *Developmental Dynamics*. 1994. Vol. 201, № 2. P. 108–120.
87. *Holland L.Z.* Muscle development in amphioxus: morphology, biochemistry, and molecular biology // *Israel Journal of Zoology*. 1996. Vol. 42, Supl. 1. P. S235–S246.
88. *Holland N.D.* Cell cycle in regenerating feather star arms // *Echinoderms through time*. Balkema, Rotterdam. 1994. P. 217–220.
89. *Horwitz A., Duggan K., Buck C., Beckerle M.C., Burridge K.* Interaction of plasma-membrane fibronectin receptor with talin – a transmembrane linkage // *Nature*. 1986. Vol. 320, № 6062. P. 531–533.
90. *Hotchin N.A., Gandarillas A., Watt F.M.* Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation // *Journal of Cell Biology*. 1995. Vol. 128, № 6. P. 1209–1219.
91. *Howe A., Aplin A.E., Alahari S.K., Juliano R.L.* Integrin signaling and cell growth control // *Current Opinion in Cell Biology*. 1998. Vol. 10, № 2. P. 220–231.
92. *Hughes A.L.* Evolution of the integrin alpha and beta protein families // *Journal of Molecular Evolution*. 2001. Vol. 52, № 1. P. 63–72.
93. *Humphries J.E., Elizondo L., Yoshino T.P.* Protein kinase C regulation of cell spreading in the molluscan *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001. Vol. 1540, № 3. P. 243–252.
94. *Humphries M.J.* Integrin structure // *Biochemical Society Transactions*. 2000. Vol. 28, № 4. P. 311–339.
95. *Hynes R.O.* Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion // *Cell*. 1992. Vol. 69, № 1. P. 11–25.
96. *Hynes R.O., Zhao Q.* The evolution of cell adhesion // *Journal of Cell Biology*. 2000. Vol. 150, № 2. P. 89–96.
97. *Hynes R.O.* Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // *Cell*. 2002. Vol. 110, № 6. P. 673–687.

98. *Hynes R.O.* The evolution of metazoan extracellular matrix // *The Journal of Cell Biology*. 2012. Vol. 196, № 6. P. 671–679.
99. *Hynes R.O.* The evolution of metazoan extracellular matrix // *The Journal of Cell Biology*. 2012. Vol. 196, № 6. P. 671–679.
100. *Ivins J.K., Yurchenco P.D., Lander A.D.* Regulation of neurite outgrowth by integrin activation // *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000. Vol. 20, № 17. P. 6551–6560.
101. *Iwata M., Nakano E.* Characterization of sea urchin fibronectin // *Biochemical Journal*. 1983. Vol. 215, № 1. P. 205–208.
102. *Johansson M.W., Patarroyo M., Oberg F., Siegbahn A., Nilsson K.* Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha(M)beta(2) integrin (Mac-1, CD11b/CD18) // *Journal of Cell Science*. 1997. Vol. 110. P. 1133–1139.
103. *Katow H., Sofuku S.* An RGDS peptide-binding receptor, FR-1R, localizes to the basal side of the ectoderm and to primary mesenchyme cells in sand dollar embryos // *Development, Growth and Differentiation*. 2001. Vol. 43, № 5. P. 601–610.
104. *Kawamura K., Fujiwara S.* Establishment of cell lines from multipotent epithelial sheet in the budding tunicate, *Polyandrocarpa misakiensis* // *Cell Structure and Function*. 1995. Vol. 20, № 1. P. 97–106.
105. *Kelly D.E.* The fine structure of skeletal muscle triad junctions // *Journal of Ultrastructure Research*. 1969. Vol. 29, № 1. P. 37–49.
106. *Khaitlina S.Y.* Functional specificity of actin isoforms // *International Review of Cytology*. 2001. Vol. 202. P. 35–98.
107. *Kim T.A., Lim J., Ota S., Raja S., Rogers R., Rivnay B., Avraham H., Avraham S.* NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation // *Journal of Cell Biology*. 1998. Vol. 141, № 3. P. 553–566.

108. *Knack B.A., Iguchi A., Shinzato C., Hayward D.C., Ball E.E., Miller D.J.* Unexpected diversity of cnidarian integrins: expression during coral gastrulation // *BMC Evolutionary Biology*. 2008. Vol. 8. P. 136.
109. *Kozlova N.I., Morozevich G.E., Chubukina A.N., Berman A.E.* Integrin alpha v beta 3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells // *Oncogene*. 2001. Vol. 20, № 34. P. 4710–4717.
110. *Krotoski D., Bronnerfraser M.* Distribution of integrins and their ligands in the trunk of *Xenopus-Laevis* during neural crest cell-migration // *Journal of Experimental Zoology*. 1990. Vol. 253, № 2. P. 139–150.
111. *Lafrenie R.M., Yamada K.M.* Integrin-dependent signal transduction // *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996. Vol. 61, № 4. P. 543–553.
112. *Lakonishok M., Muschler J., Horwitz A.F.* The alpha 5 beta 1 integrin associates with a dystrophin-containing lattice during muscle development // *Developmental Biology*. 1992. Vol. 152, № 2. P. 209–220.
113. *Larson R.S., Springer T.A.* Structure and function of leukocyte integrins // *Immunological Reviews*. 1990. Vol. 114. P. 181–217.
114. *Le Marrec-Croq F., Glaise D., Guguen-Guillouzo C., Chesne C., Guillouzo A., Boulo V., Dorange G.* Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (mollusca-bivalvia) // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*. 1999. Vol. 35, № 5. P. 289–295.
115. *Liu B.L., McGrath J.J.* Effects of freezing on the cytoskeleton, focal adhesions and gap-junctions in murine osteoblast cultures // *Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 2005. P. 4896–4899.
116. *Lockyer A.E., Spinks J.N., Walker A.J., Kane R.A., Noble L.R., Rollinson D., Dias-Neto E., Jones C.S.* *Biomphalaria glabrata* transcriptome: identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES) // *Developmental and Comparative Immunology*. 2007. Vol. 31, № 8. P. 763–782.

117. *Loeb M.J.* Role of integrin beta1-like protein in proliferation and differentiation of cultured stem cells from midgut of *Heliothis virescens* // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2006. Vol. 61, № 2. P. 55–64.
118. *Loeb M.J.* Factors affecting proliferation and differentiation of Lepidopteran midgut stem cells // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2010. Vol. 74, № 1. P. 1–16.
119. *Loulier K., Lathia J.D., Marthiens V., Relucio J., Mughal M.R., Tang S.C., Coksaygan T., Hall P.E., Chigurupati S., Patton B., Colognato H., Rao M.S., Mattson M.P., Haydar T.F., Ffrench-Constant C.* Beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche // PLoS Biology. 2009. Vol. 7, № 8. P. e1000176.
120. *Lynn D.E.* Available lepidopteran insect cell lines // Methods in Molecular Biology. 2007. Vol. 388. P. 117–138.
121. *Maeda T., Titani K., Sekiguchi K.* Cell-adhesive activity and receptor-binding specificity of the laminin-derived YIGSR sequence grafted onto Staphylococcal protein A // Journal of Biochemistry. 1994. Vol. 115, № 2. P. 182–189.
122. *Maga G., Hubscher U.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners // Journal of Cell Science. 2003. Vol. 116, Pt. 15. P. 3051–3060.
123. *Maiorova M.A., Odintsova N.A.* Beta integrin-like protein-mediated adhesion and its disturbances during cell cultivation of the mussel *Mytilus trossulus* // Cell and Tissue Research. 2015. Vol. 361, № 2. P. 581–592.
124. *Maiorova M.A., Dyachuk V.A., Odintsova N.A.* Localization of beta1 integrin and fibronectin during mussel development // Conference Proceedings: the 5th Meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology. 2014. P. 337–338.
125. *Malanga C.J., Poll K.A.* Effects of the cilioexcitatory neurohumors dopamine and 5-hydroxytryptamine on cyclic AMP levels in the gill of the mussel *Mytilus edulis* // Life Sciences. 1979. Vol. 25, № 4. P. 365–374.

126. *Marcantonio E.E., Hynes R.O.* Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin beta 1 subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates, and fungi // *Journal of Cell Biology*. 1988. Vol. 106, № 5. P. 1765–1772.
127. *Marigomez I., Lekube X., Cancio I.* Immunochemical localisation of proliferating cells in mussel digestive gland tissue // *Histochemical Journal*. 1999. Vol. 31, № 12. P. 781–788.
128. *Marsden M., Burke R.D.* Cloning and characterization of novel beta integrin subunits from a sea urchin // *Developmental Biology*. 1997. Vol. 181, № 2. P. 234–245.
129. *Marsden M., Burke R.D.* The betaL integrin subunit is necessary for gastrulation in sea urchin embryos // *Developmental Biology*. 1998. Vol. 203, № 1. P. 134–148.
130. *Masuda-Nakagawa L., Beck K., Chiquet M.* Identification of molecules in leech extracellular matrix that promote neurite outgrowth // *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 1988. Vol. 235, № 1280. P. 247–257.
131. *Mathieu M., Van Minnen J.* Immunocytochemical demonstration of peptidergic cells in the cerebral ganglia of *Mytilus edulis*. // *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III – Sciences de la Vie*. 1989. Vol. 308. P. 489–494.
132. *Matlin K.S., Haus B., Zuk A.* Integrins in epithelial cell polarity: using antibodies to analyze adhesive function and morphogenesis // *Methods*. 2003. Vol. 30, № 3. P. 235–246.
133. *Matranga V., Di Ferro D., Cervello M., Zito F., Nakano E.* Adhesion of sea-urchin embryonic cells to substrata coated with cell adhesion molecules // *Biology of the Cell*. 1991. Vol. 71, № 3. P. 289–291.
134. *McCarthy R.A., Beck K., Burger M.M.* Laminin is structurally conserved in the sea urchin basal lamina // *The EMBO Journal*. 1987. Vol. 6, № 6. P. 1587–1593.

135. *Melo F., Carey D.J., Brandan E.* Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression // *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996. Vol. 62, № 2. P. 227–239.
136. *Menko A.S., Boettiger D.* Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation // *Cell*. 1987. Vol. 51, № 1. P. 51–57.
137. *Midboe E.G., Candas M., Bulla L.A.* Expression of a midgut-specific cadherin BT-R-1 during the development of *Manduca sexta* larva // *Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. Vol. 135, № 1. P. 125–137.
138. *Miosge N., Klenczar C., Herken R., Willem M., Mayer U.* Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha 7 beta 1 integrin // *Laboratory Investigation*. 1999. Vol. 79, № 12. P. 1591–1599.
139. *Miranti C.K., Brugge J.S.* Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction // *Nature Cell Biology*. 2002. Vol. 4, № 4. P. E83–E90.
140. *Miyazawa S., Azumi K., Nonaka M.* Cloning and characterization of integrin alpha subunits from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* // *Journal of Immunology*. 2001. Vol. 166, № 3. P. 1710–1715.
141. *Miyazawa S., Nonaka M.* Characterization of novel ascidian beta integrins as primitive complement receptor subunits // *Immunogenetics*. 2004. Vol. 55, № 12. P. 836–844.
142. *Mosquera E., Lopez J.L., Alvarez G.* Genetic variability of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* assessed using two-dimensional electrophoresis // *Heredity*. 2003. Vol. 90, № 6. P. 432–442.
143. *Mould A.P., Akiyama S.K., Humphries M.J.* Regulation of integrin alpha 5 beta 1-fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270, № 44. P. 26270–26277.

144. *Mueller S.C., Kelly T., Dai M., Dai H., Chen W.-T.* Dynamic cytoskeleton-integrin associations induced by cell binding to immobilized fibronectin // *Journal of Cell Biology*. 1989. Vol. 109, № 6. P. 3455–3464.
145. *Muller W.E.G.* Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review // *Cell and Tissue Research*. 1997. Vol. 289, № 3. P. 383–395.
146. *Naganuma T., Degnan B.M., Horikoshi K., Morse D.E.* Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens* // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3, № 3. P. 131–140.
147. *Odintsova N., Ermak A., Tsal L.* Substrate selection for long-term cultivation of marine invertebrate cells // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1994. Vol. 107, № 4. P. 613–619.
148. *Odintsova N., Dyachuk V., Kiselev K., Shelud'ko N.* Expression of thick filament proteins during ontogenesis of the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry*. 2006. Vol. 144, № 2. P. 238–244.
149. *Odintsova N.A., Khomenko A.V.* Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia) // *Cytotechnology*. 1991. Vol. 6, № 1. P. 49–54.
150. *Odintsova N.A., Dyachuk V.A., Nezhlin L.P.* Muscle and neuronal differentiation in primary cell culture of larval *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // *Cell and Tissue Research*. 2010. Vol. 339, № 3. P. 625–637.
151. *Odintsova N.A., Usheva L.N., Yakovlev K.V., Kiselev K.V.* Naturally occurring and artificially induced tumor-like formations in marine invertebrates: A search for permanent cell lines // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2011. Vol. 407, № 2. P. 241–249.
152. *Odintsova N.A., Maiorova M.A.* Localization of alphaVbeta3-like integrin in cultivated larval cells of the mussel *Mytilus trossulus* during neuronal and muscle differentiation // *Journal of Molecular Histology*. 2012. Vol. 43, № 4. P. 449–459.

153. *Oegema T.R., Johnson S.L., Aguiar D.J., Ogilvie J.W.* Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc // *Spine*. 2000. Vol. 25, № 21. P. 2742–2747.
154. *Owens M., Cimino C., Donnelly J.* Cryopreserved platelets have decreased adhesive capacity // *Transfusion*. 1991. Vol. 31, № 2. P. 160–163.
155. *Painter S.D.* FMRFamide inhibition of a molluscan heart is accompanied by increases in cyclic AMP // *Neuropeptides*. 1982. Vol. 3, № 1. P. 19–27.
156. *Panara F., DiRosa I., Fagotti A., Simoncelli F., Mangiabene C., Pipe R.K., Pascolini R.* Characterization and immunocytochemical localization of actin and fibronectin in haemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Histochemical Journal*. 1996. Vol. 28, № 2. P. 123–131.
157. *Pavlath G.K.* Spatial and functional restriction of regulatory molecules during mammalian myoblast fusion // *Experimental Cell Research*. 2010. Vol. 316, № 18. P. 3067–3072.
158. *Paz M., Ruiz M., Sánchez L., Mikhailov A.* Identification of a fibronectin-like molecule from a marine bivalve *Pecten maximus* (L., 1758) and its hyperaccumulation in the female compartment of the gonad // *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 2002. Vol. 18, № 1–4. P. 393–400.
159. *Paz M., Torrado M., Korochkin L.I., Mikhailov A.T.* Esterase-like and fibronectin-like polypeptides share similar sex-cell-biased patterns in the gonad of hermaphroditic and gonochoric species of bivalve mollusks // *Cell and Tissue Research*. 2005. Vol. 322, № 3. P. 475–489.
160. *Plotnikov S.V., Karpenko A.A., Odintsova N.A.* Comparative characteristic of *Mytilus muscle* cells developed *in vitro* and *in vivo* // *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative experimental biology*. 2003. Vol. 298, № 2. P. 77–85.
161. *Plows L.D., Cook R.T., Davies A.J., Walker A.J.* Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1692, № 1. P. 25–33.

162. *Plows L.D., Cook R.T., Davies A.J., Walker A.J.* Integrin engagement modulates the phosphorylation of focal adhesion kinase, phagocytosis, and cell spreading in molluscan defence cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1763, № 8. P. 779–786.
163. *Potts J.R., Campbell I.D.* Structure and function of fibronectin modules // *Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 1996. Vol. 15, № 5. P. 313–320; discussion 321.
164. *Preissner K.T.* Structure and biological role of vitronectin // *Annual Review of Cell Biology*. 1991. Vol. 7. P. 275–310.
165. *Price D.A., Greenberg M.J.* Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide // *Science*. 1977. Vol. 197, № 4304. P. 670–671.
166. *Putnam N.H., Srivastava M., Hellsten U., Dirks B., Chapman J., Salamov A., Terry A., Shapiro H., Lindquist E., Kapitonov V.V., Jurka J., Genikhovich G., Grigoriev I.V., Lucas S.M., Steele R.E., Finnerty J.R., Technau U., Martindale M.Q., Rokhsar D.S.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization // *Science*. 2007. Vol. 317, № 5834. P. 86–94.
167. *Pytela R., Suzuki S., Breuss J., Erle D.J., Sheppard D.* Polymerase chain reaction cloning with degenerate primers: homology-based identification of adhesion molecules // *Methods in Enzymology*. 1994. Vol. 245. P. 420–451.
168. *Rinkevich B.* Cell cultures from marine invertebrates: new insights for capturing endless stemness // *Marine Biotechnology*. 2011. Vol. 13, № 3. P. 345–354.
169. *Royuela M., Fraile B., Cervera M., Paniagua R.* Immunocytochemical electron microscopic study and western blot analysis of myosin, paramyosin and miniparamyosin in the striated muscle of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in obliquely striated and smooth muscles of the earthworm *Eisenia foetida* // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1997. Vol. 18, № 2. P. 169–177.
170. *Rüegg J.* Smooth muscle tone // *Physiological Reviews*. 1971. Vol. 51, № 1. P. 201–248.

171. *Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.* New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins // *Science*. 1987. Vol. 238, № 4826. P. 491–497.
172. *Ruoslahti E.* Integrins // *Journal of Clinical Investigation*. 1991. Vol. 87, № 1. P. 1–5.
173. *Sanger J.W., Kang S., Siebrands C.C., Freeman N., Du A., Wang J., Stout A.L., Sanger J.M.* How to build a myofibril // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2005. Vol. 26, № 6–8. P. 343–354.
174. *Santoni G., Spreghini E., Lucciarini R., Amantini C., Piccoli M.* Involvement of alpha(v)beta3 integrin-like receptor and glycosaminoglycans in *Candida albicans* germ tube adhesion to vitronectin and to a human endothelial cell line // *Microbial Pathogenesis*. 2001. Vol. 31, № 4. P. 159–172.
175. *Sarras M.P., Jr., Meador D., Zhang X.M.* Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. II. Influence of collagen and proteoglycan components on head regeneration // *Developmental Biology*. 1991. Vol. 148, № 2. P. 495–500.
176. *Sastry S.K., Lakonishok M., Thomas D.A., Muschler J., Horwitz A.F.* Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation // *Journal of Cell Biology*. 1996. Vol. 133, № 1. P. 169–184.
177. *Schlage W.K.* Isolation and characterization of a fibronectin from marine coelenterates // *European Journal of Cell Biology*. 1988. Vol. 47, № 2. P. 395–403.
178. *Schmid V., Bally A.* Species specificity in cell-substrate interactions in medusae // *Developmental Biology*. 1988. Vol. 129, № 2. P. 573–581.
179. *Schwimmer R., Ojakian G.K.* The alpha 2 beta 1 integrin regulates collagen-mediated MDCK epithelial membrane remodeling and tubule formation // *Journal of Cell Science*. 1995. Vol. 108, Pt. 6. P. 2487–2498.
180. *Sebe-Pedros A., Ruiz-Trillo I.* Integrin-mediated adhesion complex: cooption of signaling systems at the dawn of Metazoa // *Communicative and Integrative Biology*. 2010. Vol. 3, № 5. P. 475–477.

181. *Seigneurin D., Guillaud P.* Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker // *Pathologie Biologie*. 1991. Vol. 39, № 10. P. 1020–1028.
182. *Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H.* The final steps of integrin activation: the end game // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. Vol. 11, № 4. P. 288–300.
183. *Shimizu K., Amemiya S., Yoshizato K.* Biochemical and immunological characterization of collagen molecules from echinothurioid sea-urchin *Asthenosoma Ijimai* // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990. Vol. 1038, № 1. P. 39–46.
184. *Siegman M.J., Funabara D., Kinoshita S., Watabe S., Hartshorne D.J., Butler T.M.* Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. Vol. 95, № 9. P. 5383–5388.
185. *Sminia T., Winsemius A.A., Vanderknaap W.P.W.* Recognition of foreignness by blood-cells of the fresh-water snail *Lymnaea stagnalis*, with special reference to the role and structure of the cell coat // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1981. Vol. 38, № 2. P. 175–183.
186. *Sodergren E., Shen Y., Song X., Zhang L., Gibbs R.A., Weinstock G.M.* Shedding genomic light on Aristotle's lantern // *Developmental Biology*. 2006. Vol. 300, № 1. P. 2–8.
187. *Sugni M., Fassini D., Barbaglio A., Biressi A., Di Benedetto C., Tricarico S., Bonasoro F., Wilkie L.C., Carnevali M.D.C.* Comparing dynamic connective tissue in echinoderms and sponges: morphological and mechanical aspects and environmental sensitivity // *Marine Environmental Research*. 2014. Vol. 93. P. 123–132.
188. *Suzuki T., Funakoshi S.* Isolation of a fibronectin-like molecule from a marine bivalve, *Pinctada fucata*, and its secretion by amebocytes // *Zoological Science*. 1992. Vol. 9, № 3. P. 541–550.

189. *Takeuchi T., Kawashima T., Koyanagi R., Gyoja F., Tanaka M., Ikuta T., Shoguchi E., Fujiwara M., Shinzato C., Hisata K., Fujie M., Usami T., Nagai K., Maeyama K., Okamoto K., Aoki H., Ishikawa T., Masaoka T., Fujiwara A., Endo K., Endo H., Nagasawa H., Kinoshita S., Asakawa S., Watabe S., Satoh N.* Draft genome of the pearl oyster *Pinctada fucata*: A platform for understanding bivalve biology // *DNA Research*. 2012. Vol. 19, № 2. P. 117–130.
190. *Terahara K., Takahashi K.G., Mori K.* Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Developmental and Comparative Immunology*. 2003. Vol. 27, № 6–7. P. 521–528.
191. *Terahara K., Takahashi K.G., Mori K.* Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 2005. Vol. 141, № 2. P. 215–222.
192. *Terahara K., Takahashi K.G., Nakamura A., Osada M., Yoda M., Hiroi T., Hirasawa M., Mori K.* Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Developmental and Comparative Immunology*. 2006. Vol. 30, № 8. P. 667–683.
193. *Terry C., Hughes R.D., Mitry R.R., Lehec S.C., Dhawan A.* Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules // *Cell Transplant*. 2007. Vol. 16, № 6. P. 639–647.
194. *Tomasini B.R., Mosher D.F.* Vitronectin // *Progress in hemostasis and thrombosis*. 1991. Vol. 10. P. 269–305.
195. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
196. *Twarog B.M.* Aspects of smooth muscle function in molluscan catch muscle // *Physiological Reviews*. 1976. Vol. 56, № 4. P. 829–838.

197. *van der Flier A., Sonnenberg A.* Function and interactions of integrins // *Cell and Tissue Research*. 2001. Vol. 305, № 3. P. 285–298.
198. *Vartio T., Kuusela P.* Disulfide-bonded dimerization of fibronectin *in vitro* // *European Journal of Biochemistry*. 1991. Vol. 202, № 2. P. 597–604.
199. *Vibert P., Edelstein S.M., Castellani L., Elliott B.W., Jr.* Mini-titins in striated and smooth molluscan muscles: structure, location and immunological crossreactivity // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1993. Vol. 14, № 6. P. 598–607.
200. *Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Odintsova N.A., Plummer J.T., Croll R.P.* Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // *Zoomorphology*. 2008. Vol. 127. P. 97–110.
201. *Vuorio E., de Crombrughe B.* The family of collagen genes // *Annual Review of Biochemistry* 1990. Vol. 59. P. 837–872.
202. *Walker C., Bottger S.A., Mulkern J., Jerszyk E., Litvaitis M., Lesser M.* Mass culture and characterization of tumor cells from a naturally occurring invertebrate cancer model: applications for human and animal disease and environmental health // *Biological Bulletin*. 2009. Vol. 216, № 1. P. 23–39.
203. *Wayner E.A., Orlando R.A., Cheres D.A.* Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface // *Journal of Cell Biology*. 1991. Vol. 113, № 4. P. 919–929.
204. *Whittaker C.A., Hynes R.O.* Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere // *Molecular Biology of the Cell*. 2002. Vol. 13, № 10. P. 3369–3387.
205. *Whittaker C.A., Bergeron K.F., Whittle J., Brandhorst B.P., Burke R.D., Hynes R.O.* The echinoderm adhesome // *Developmental Biology*. 2006. Vol. 300, № 1. P. 252–266.
206. *Wildering W.C., Hermann P.M., Bulloch A.G.M.* Neurite outgrowth, RGD-dependent, and RGD-independent adhesion of identified molluscan motoneurons on selected substrates // *Journal of Neurobiology*. 1998. Vol. 35, № 1. P. 37–52.

207. *Wildering W.C., Hermann P.M., Bulloch A.G.M.* Rapid neuromodulatory actions of integrin ligands // *Journal of Neuroscience*. 2002. Vol. 22, № 7. P. 2419–2426.
208. *Winkelman L.* Comparative studies of paramyosins // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry*. 1976. Vol. 55, № 3. P. 391–397.
209. *Yamada K.M., Kennedy D.W.* Peptide inhibitors of fibronectin, laminin, and other adhesion molecules: unique and shared features // *Journal of Cellular Physiology*. 1987. Vol. 130, № 1. P. 21–28.
210. *Yamada K.M., Geiger B.* Molecular interactions in cell adhesion complexes // *Current Opinion in Cell Biology*. 1997. Vol. 9, № 1. P. 76–85.
211. *Yeh Y.C., Lin H.H., Tang M.J.* A tale of two collagen receptors, integrin beta1 and discoidin domain receptor 1, in epithelial cell differentiation // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2012. Vol. 303, № 12. P. C1207–C1217.
212. *Yoshino T.P., Bickham U., Bayne C.J.* Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines // *Canadian Journal of Zoology*. 2013. Vol. 91, № 6. P. 391–404.
213. *Yu J.K., Wang M.C., Shin I.T., Kohara Y., Holland L.Z., Satoh N., Satou Y.* A cDNA resource for the cephalochordate amphioxus *Branchiostoma floridae* // *Development Genes Evolution*. 2008. Vol. 218, № 11–12. P. 723–727.
214. *Zaldibar B., Cancio I., Marigomez I.* Circatidal variation in epithelial cell proliferation in the mussel digestive gland and stomach // *Cell and Tissue Research*. 2004. Vol. 318, № 2. P. 395–402.
215. *Zerlauth G., Wesierska-Gadek J., Sauermann G.* Fibronectin observed in the nuclear matrix of HeLa tumour cells // *Journal of Cell Science*. 1988. Vol. 89, Pt. 3. P. 415–421.
216. *Zhang G., Fang X., Guo X., Li L., Luo R., Xu F., Yang P., Zhang L., Wang X., Qi H., Xiong Z., Que H., Xie Y., Holland P.W., Paps J., Zhu Y., Wu F., Chen Y., Wang J., Peng C., Meng J., Yang L., Liu J., Wen B., Zhang N., Huang Z., Zhu Q., Feng Y., Mount A., Hedgecock D., Xu Z., Liu Y., Domazet-Lošo T., Du Y., Sun X.,*

- Zhang S., Liu B., Cheng P., Jiang X., Li J., Fan D., Wang W., Fu W., Wang T., Wang B., Zhang J., Peng Z., Li Y., Li N., Wang J., Chen M., He Y., Tan F., Song X., Zheng Q., Huang R., Yang H., Du X., Chen L., Yang M., Gaffney P.M., Wang S., Luo L., She Z., Ming Y., Huang W., Zhang S., Huang B., Zhang Y., Qu T., Ni P., Miao G., Wang J., Wang Q., Steinberg C.E., Wang H., Li N., Qian L., Zhang G., Li Y., Yang H., Liu X., Wang J., Yin Y., Wang J.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // *Nature*. 2012. Vol. 490, № 7418. P. 49–54.
217. *Zhang K., Chen J.* The regulation of integrin function by divalent cations // *Cell Adhesion and Migration*. 2012. Vol. 6, № 1. P. 20–29.