

На правах рукописи

ДЯЧУК
Вячеслав Алексеевич

**МИОГЕННАЯ И НЕЙРОНАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК
ЛИЧИНОК МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS* IN VIVO И IN VITRO**

03.00.30 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2008

Работа выполнена в Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской Академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Одинцова Нэлия Адольфовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Долматов Игорь Юрьевич

кандидат биологических наук,
доцент
Токмакова Наталья Павловна

Ведущая организация: **Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН**

Защита состоится «5» декабря 2008 года в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д005.008.01 при Институте биологии моря им.
А.В. Жирмунского ДВО РАН, по адресу: 690041, г. Владивосток, ул.
Пальчевского, 17. Телефон: (4232) 310-905, факс: (4232) 310-900,
e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. 690041, г. Владивосток, ул.
Пальчевского, 17.

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

Автореферат разослан « » ноября 2008 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Выяснение механизмов, контролирующих дифференциацию мышечной и нервной системы, является одной из важнейших проблем современной биологии развития. Большинство исследований миогенеза и нейрогенеза было проведено на позвоночных животных. Однако прогресс, достигнутый в последнее время в изучении развития мышечной и нервной системы некоторых групп беспозвоночных животных, позволил выяснить общие закономерности развития двух систем.

Исследования последнего десятилетия в основном были направлены на выяснение механизмов специализации предшественников мышечных и нервных клеток всего лишь двух модельных объектов: дрозофилы *Drosophila melanogaster* и нематоды *Caenorhabditis elegans*. Расширение круга модельных объектов необходимо для понимания как общих, эволюционно консервативных основ миогенеза, так и его особенностей у представителей разных таксонов многоклеточных животных. Особый интерес в этом плане представляют двустворчатые моллюски.

У двустворчатых моллюсков обнаружены поперечно-полосатые, косо-исчерченные и гладкие мышцы. Гладкие мышцы моллюсков – это одна из общепринятых модельных систем для изучения регуляции мышечного сокращения и, в частности, механизма запирающего тонуса, регулируемого нейромедиаторами (Twarog, 1976). Сердцевину толстых нитей таких мышц образует белок парамиозин (Rüegg, 1961), на поверхности которого расположены миозин (Szent-Gyorgyi *et al.*, 1971), миород (Shelud'ko *et al.*, 1999) и твитчин (Vibert *et al.*, 1993). Предполагают, что фосфорилирование твитчина регулирует запирающий тонус гладких мышц двустворчатых моллюсков (Siegmán *et al.*, 1998), а в основе этого явления лежит образование твитчиновых сшивок между толстыми и тонкими нитями (Shelud'ko *et al.*, 2004; 2007). Свойства мышц взрослых моллюсков интенсивно изучаются уже более 40 лет. Однако данные о времени начала дифференцировки, образования зрелых мышечных волок и последующего формирования мышечной системы в онтогенезе моллюска *Mytilus trossulus* отсутствуют.

Двустворчатые моллюски имеют бифазный жизненный цикл, в котором взрослому животному предшествует стадии свободно плавающих личинок. Очевидное эволюционное преимущество такого цикла – повышенная выживаемость и лучшее расселение потомков. Развитие некоторых двустворчатых моллюсков изучено на уровне электронной микроскопии (Bayne, 1976; Cragg, 1985; Малахов, Медведева, 1985; Cragg, Crisp, 1991; Флячинская, Кулаковский, 1991). Детальное изучение мышц личинок двустворчатых моллюсков с применением современных методов биохимии и иммунологического маркирования ранее не предпринималось, а данные о взаимодействии мышечной и нервной систем, особенно на ранних этапах развития, отсутствуют. Использование первичной культуры клеток

личинок мидии *Mytilus trossulus* и современных адекватных маркеров дифференцировки могут помочь заполнить «белые пятна» в исследовании основных этапов развития мышечной и нервной систем моллюсков.

Цель и задачи работы

Целью работы было изучение закономерностей дифференцировки мышечных клеток, формирования мышечной системы и её взаимосвязи с нервной системой в раннем онтогенезе мидии *Mytilus trossulus*.

В рамках поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- выяснить последовательность появления мышечных белков в развитии мидии;
- определить стадию начала экспрессии гена твитчина в развитии мидии;
- провести детальный морфологический анализ развивающейся мышечной системы личинок мидии;
- установить время появления первых нервных клеток, взаиморасположение мышечных и нейрональных структур в раннем онтогенезе мидии;
- показать, что миогенная и нейрональная программы могут быть воспроизведены в первичной культуре клеток, полученной из личинок мидии премиогенных стадий развития.

Научная новизна и теоретическое значение работы

Впервые установлено, что парамиозин, белок толстых нитей мидии, присутствует в кортексе неоплодотворенных яйцеклеток мидии *M. trossulus*. Другие белки толстых нитей, твитчин и миозин экспрессируются одновременно в первых мышечных клетках личинок мидии и задолго до начала формирования мышечной системы личинки мидии велигера. Мышцы взрослого моллюска закладываются на стадии раннего велигера и развиваются параллельно с мускулатурой личинки. Показано, что поперечно-полосатые миофибриллы появляются на ранних стадиях развития личинок. Обнаружена кардинальная перестройка мышечной системы личинки во время метаморфоза, в результате которой развивается полноценная гладкая мускулатура взрослых моллюсков, способная к состоянию запирающего тонуса. Показано, что первые нервные клетки появляются раньше мышечных клеток личинок двустворчатых моллюсков. Миогенная и нейрональная программы, запускаемые в раннем онтогенезе моллюсков, могут быть реализованы в культуре клеток, полученных из личинок премиогенных стадий развития. Миогенная программа, воспроизведенная *in vitro*, сходна с таковой *in vivo* и в обоих случаях протекает без формирования многоядерных миотуб в отличие от миогенеза позвоночных животных.

Научно-практическое значение работы

Полученные маркеры дифференцировки мышечных клеток и тестированные в экспериментах маркеры нейрогенеза могут быть использованы для анализа нейро- и миоанатомии личинок и взрослых беспозвоночных животных и могут представлять интерес для специалистов, изучающих процессы дифференцировки клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Разработанные условия длительного культивирования позволят проводить различные молекулярно-биологические манипуляции, для изучения механизмов индукции и ингибирования дифференцировки клеток. Методические разработки и часть результатов работы включены в программу лекций и практических занятий спецкурса «Теоретические и практические основы культивирования клеток морских беспозвоночных животных» для студентов Отделения биохимии и биотехнологии АЭМББТ ДВГУ.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были доложены на ежегодных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (г. Владивосток, 2003; 2006; 2008); на Ежегодной региональной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (г. Владивосток, 2004); на 8-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2004); на Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (г. Санкт-Петербург, 2006); на Международном симпозиуме «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (г. Москва, 2007); на семинаре Лаборатории структуры и функции хромосом Биологического НИИ СПбГУ (г. Санкт-Петербург, 2007) и на Международном симпозиуме «Biological Motility: Achievements and Perspectives» (г. Пущино, 2008). По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов ДВО РАН (гранты № 06-II-CO-06-025, № НТ-08-016-04), РФФИ (гранты № 03-04-49568, № 06-04-96039) и гранта «Лучший аспирант РАН-2008» Фонда содействия отечественной науке.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и 1 таблицей. Список литературы содержит 196 наименований, из них 185 на английском языке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

В качестве объектов исследования использовали яйцеклетки и личинки мидии *M. trossulus*, находящиеся на разных стадиях развития, а также мышцы взрослых моллюсков. Личинок получали путем искусственного оплодотворения яйцеклеток мидии (индукция нереста термальным шоком) и в дальнейшем культивировали при 17°C в климатической камере. Материал для экспериментов собирали на стадиях яйцеклетки, двух бластомеров, бластулы (12 ч после оплодотворения), ранней, средней и поздней трохофоры (17-36 ч), раннего, среднего, позднего велигера (40-142 ч и 15 сут) и педивелигера (20 сут). Более поздние стадии развития мидии были отобраны из планктона.

Выделение актомиозиновых (АМ) экстрактов мидии и их анализ

АМ-экстракты выделяли из личинок мидии, находящихся на разных стадиях развития, и гладких мышц взрослого моллюска (Odintsova *et al.*, 2006). Эти препараты представляют собой нерастворимый белковый комплекс, который аналогичен актомиозину мышц взрослых животных. Такой подход позволяет контролировать появление в процессе развития именно мышечных форм сократительных белков, поскольку немышечные формы удаляются при предварительных отмывках материала растворами с низкой ионной силой.

ДСН-электрофорез и иммуноблоттинг

Состав белковых препаратов изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по стандартной методике (Laemmli, 1970) в модификации Шелудько (Shelud'ko *et al.*, 1999). Полученные гели сканировали и оцифровывали для анализа интегральной оптической плотности белковых полос с использованием компьютерной программы FRLPSCAN версии 3.12 (Scanalytics, США). Идентификация отдельных белков, разделенных гель-электрофорезом, была выполнена методом иммуноблоттинга (Towbin *et al.*, 1970).

Процедура получения первичной культуры клеток мидии

Первичные клеточные культуры личинок мидии *M. trossulus* получали по методу Одинцовой (Одинцова, 2001). Клетки (3×10^6 клеток/мл) культивировали в модифицированной среде Лейбовича (L-15) с антибиотиками, на покровных стеклах в чашках Петри (Lux, Швеция) или в 24-луночных планшетах (Nunc, Дания) при 15-17°C. Покровные стекла предварительно были обработаны аморфным углеродом (методом напыления) или адгезивными молекулами: коллагеном (I тип, Sigma, США),

поли-L-лизинном (190 кДа, Sigma) или фибронектином (Sigma), как описано в работе Одинцовой с коллегами (Odintsova *et al.*, 1994). Жизнеспособность клеток определяли методом прямого подсчета в камере Горяева после окрашивания трипановым синим (Serva, Германия). Первую полную смену среды проводили через сутки после посадки клеток. Последующие смены среды (50% объема) проводили в зависимости от состояния первичной культуры клеток через 3-5 сут. Для получения субпопуляций клеток трохофоры и избавления от контаминации мы использовали метод фракционирования в ступенчатом градиенте Перколла (Sigma). Концентрированную суспензию клеток (не менее 8.6×10^6 клеток/мл) фракционировали в Перколле, приготовленном на искусственной морской воде без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (CMFSW). После центрифугирования полученные фракции клеток отмывали от Перколла стерильным CMFSW (2 раза, 1000 г, 10 мин) и морской водой. Осадок клеток был ресуспендирован в среде L-15 с добавками. Клетки фотографировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axiovert 200 или Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия).

Получение специфических антител к мышечным белкам

Поликлональные антитела кролика к парамиозину, миозину и твитчину, выделенные из запирающих мышц *Crenomytilus grayanus* (Shelud'ko *et al.*, 2004) получали по методике Егорова (Егоров и др., 1991). Антитела к миороду были любезно предоставлены сотрудником NHLBI/NIH (США) к.б.н С.В. Плотниковым. Их специфичность была доказана ранее (Plotnikov *et al.*, 2003). Качество и титр антител в первичной сыворотке тестировали с помощью радиальной двумерной иммунодиффузии в 1%-ном агарозном геле (по Оухтерлони). Титр и специфичность Ig-фракций вторичной (после повторных иммунизаций) сыворотки тестировали иммуноблоттингом, непрямой иммунофлуоресценцией с помощью сканирующей лазерной конфокальной микроскопии на гладких мышцах *M. trossulus* и поперечно-полосатых мышцах гребешка *Mizuhopecten yessoensis*.

Для иммунохимического маркирования мышечных клеток использовали полученные поликлональные антитела кролика (Ig-фракции) к парамиозину, миозину и твитчину в разведении 1:800. Иммуноцитохимическое окрашивание проводилось двух- или трехступенчатым непрямой метод по стандартной методике (Voronezhskaya *et al.*, 2008).

Иммунохимия

Для иммунохимического мечения мышечных белков, нейрональных элементов и ресничек использовали последовательную обработку личинок и культур клеток мидии первичными и вторичными антителами. Для

маркирования нейрональных элементов были использованы поликлональные антитела кролика к серотонину (5-НТ) и FMRFамиду (Immunostar, США) в разведении 1:2000. Выявление ресничных клеток проводили с помощью моноклональных антител мыши к ацетилованному α -тубулину (Sigma) в разведении 1:5000. Анти-кроличьи или анти-мышинные вторичные антитела были мечены флюоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) или тетраметилродамин изотиоцианатом (ТРИТЦ) (MP Biomedicals и Molecular Probes, США) в разведении 1:800-1:1000. Для детекции фибриллярного актина (Ф-актина) материал инкубировали с фаллоидином, меченым флуорохромом AlexaFluor 488 или AlexaFluor 532 в разведении 1:400 (Molecular Probes).

Личинки мидии после окрашивания заключали в среду Мовиол 4-88 (Calbiochem, США) с 2.5% раствором 1,4-диазабцикло [2.2.2.] октана (Sigma) в фосфатном буфере (ФБ), оставляя на сутки при комнатной температуре до полимеризации среды. Клетки окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлоридом (DAPI, Sigma) для визуализации ядер. Далее клетки заключали в среду Vectashield (Vector, США). Препарирование мышечных волокон гладкомышечного аддуктора взрослой мидии и поперечно-полосатой части аддуктора гребешка *M. yessoensis* проводили под биноклем (МБС-9, Россия). Волокна фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 2 ч при 4 °С и отмывали ФБ с 0.1% раствором тритона X-100 и хранили в ФБ с 0.03%-ным NaN_3 . Иммуноокрашивание белков мышц взрослого моллюска проводили аналогично окрашиванию мышечных белков личинок мидии. Стандартные контроли включали материал, инкубированный только с вторичными антителами.

Конфокальная лазерная микроскопия и обработка изображений

Регистрацию окрашенного личиночного материала и мышц взрослых животных проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе TSC SP5 и TSC SPE (Leica, Германия), оснащенным 4-мя лазерами: диодным (405 нм), аргоновым (488 нм) и гелий-неоновыми (543 и 633 нм). Последовательное сканирование срезов проводили в формате 1024X1024 точек на дюйм, используя объектив с масляной иммерсией Leica HCX PL APO 63X с апертурой 1.4, электронным увеличением не более 3.5 и частотой сканирования 800-1000 Гц (лин./с).

Изображения внутреннего оригинального формата `lif` преобразовывали в стандартный формат изображения `tif`. Для обработки полученных изображений использовали программу 3D визуализации. Анализ оптических срезов проводили, используя программу объемной реконструкции (3D). При перекрытии спектров использовали программу коррективы изображений ImageJ (National Institutes of Health, США) в каждом из каналов, учитывая адаптивное разделение на основе корреляции интенсивностей. Обработку изображений проводили с помощью пакета оригинальных программ LAS AF 1.7.0. и Adobe Photoshop 8.0.

Микроскопия генерации второй оптической гармоники

Характер распределения мышечного миозина у личинок (велигеров) мидии был проанализирован с помощью микроскопии генерации второй гармоники в лаборатории В. Молера (Центр Здоровья Университета Коннектикут, США). В качестве контроля были использованы поперечно-полосатые волокна аддуктора гребешка *M. yessoensis*. С экспериментальной схемой установки можно ознакомиться на сайте <http://www.ccam.uchc.edu>. Сканирование образцов было выполнено совместно с сотрудником NHLBI/NIH (США) к.б.н. С.В. Плотниковым.

Обратно-транскрипционная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР)

Тотальную РНК выделяли из яйцеклеток, личинок, находящихся на разных стадиях развития и переднего аддуктора мидий, при помощи набора «Yellow-Solve» (Clonogen, Россия). Качество тотальной РНК проверяли электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле в однократном ТБЕ буфере. Гели окрашивали 0.01% раствором бромистого этидия и просматривали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе UVT-1 (Biosom, Россия). Концентрацию тотальной РНК оценивали спектрофотометрически при длине волны 260 нм на спектрофотометре (UV 1240, Shimadzu, Япония). Праймеры к гену твитчина были подобраны с помощью программы Primer-master, версия 1.0 (Санкт-Петербург, Россия) на основе нуклеотидной последовательности РНК твитчина *M. galloprovincialis*, взятой из генетического банка: www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed (GenBank, AB062881). Праймеры, прямой: 5'-TTT TCA CAG GTT GGG TAG CG-3' и обратный 5'-CAT GGT ACC GAC AAC TGG TC-3' фланкировали фрагмент в 780 пар оснований (п.о.) гена твитчина. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе (UNO Thermoblock thermal cycler, Biometra, Германия), нагрев до 37°C в течение 60-70 мин, затем до 65°C в течение 10 мин и охлаждение до 4°C. ПЦР проводили в амплификаторе, запрограммированном на первоначальный шаг денатурации в 3 мин при 95°C, затем на 35 циклов: 50 с при 95°C, 50 с при 50°C, 60 с при 72°C, затем при 72°C в течение 3 мин для доработки продуктов амплификации с последующим охлаждением до 4°C.

Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 1.5% агарозном геле в однократном ТБЕ буфере. В качестве маркера молекулярных весов использовали синтетический маркер с шагом в 100 п.о. (100-1000 п.о., Сибэнзим).

Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена на персональном компьютере с использованием программ «Excel 7.0». Экспериментальные данные выражены как $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное

отклонение от среднего). Достоверность различий средних величин (p) при межгрупповом сравнении устанавливали по t -критерию Стьюдента. Величины $p < 0.05$ считали достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Доказательство специфичности антител

Полученные антитела к мышечным белкам мидии и коммерческие антитела к нейромедиаторам были использованы для детекции мышечной и нервной систем личинок мидии в процессе развития, а также для выявления миогенных и нейрональных клеток первичной в культуре.

На рис. 1 А, Б демонстрируется специфичность антител к мышечным белкам – твитчину (ТВ, 530 кДа, Funabara *et al.*, 2003), тяжелым цепям миозина (ТЦМ, 200 кДа) и парамиозину (ПМ, 100 кДа, Szent-Gyorgyi *et al.*, 1971). Видно, что электрофоретическая подвижность тестируемых белков на PVDF-мембране такая же, как на полиакриламидном геле и Ig-фракции сыворотки не содержат антител к другим мышечным белкам. Кроме того, полученные нами антитела специфически связывались с белками сократительного аппарата поперечно-полосатых волокон аддуктора гребешка *M. yessoensis* и гладких мышц мидии *M. trossulus* с образованием характерного для обоих случаев исчерченного (поперечно-полосатого) и непрерывного (гладкого) паттерна окрашивания (рис. 1 В-З).

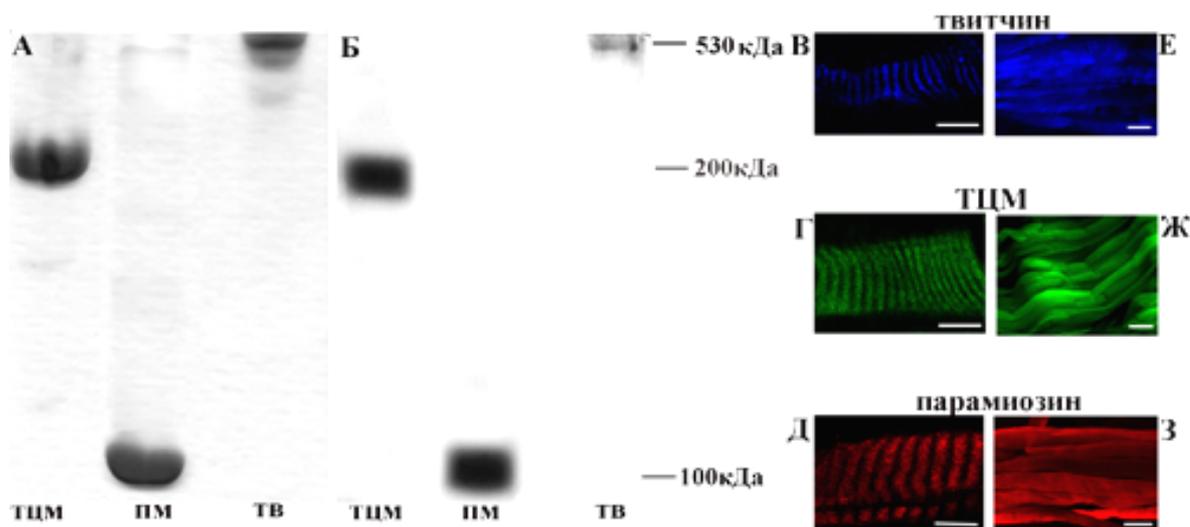


Рис. 1. Демонстрация специфичности поликлональных антител к мышечным белкам посредством иммуноблоттинга и непрямой иммунофлуоресценции.

А – ДСН-электрофорез очищенных препаратов белков: ТЦМ, ПМ и ТВ; Б – иммуноблоттинг мышечных белков. В – З – поперечно-полосатые мышцы гребешка *M. yessoensis* (В – Д) и гладкие мышцы мидии *M. trossulus* (Е – З). Линейка – 5 мкм.

МИОГЕНЕЗ *IN VIVO*

Экспрессия мышечных белков мидии *M. trossulus*

Методом ДСН-электрофореза были исследованы АМ-экстракты личинок мидии, находящиеся на разных стадиях развития, и взрослых животных (рис. 2 А). Мы показали, что личинки ранних стадий развития мидии содержат белки, электрофоретическая подвижность которых совпадает с основными мышечными белками контрольного препарата, выделенного из гладких мышц взрослой мидии. С помощью иммуноблоттинга было установлено присутствие параамиозина в яйцеклетках, а твитчина и миорода – на стадии бластулы мидии (рис. 2 Б – Г). Таким образом, мышечные белки толстых нитей экспрессируются задолго до начала сборки функционально активной мышечной системы личинки мидии велигера (Дячук и др., 2005).

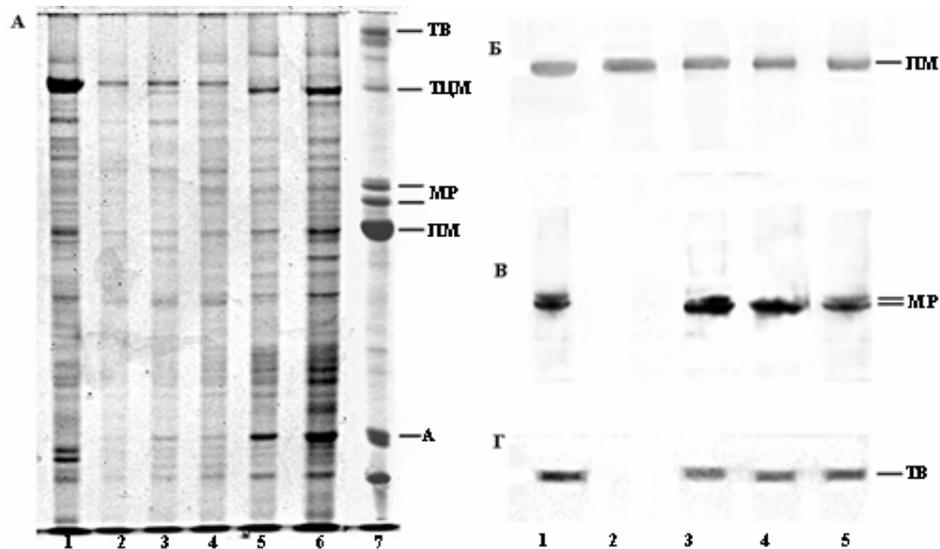


Рис. 2. ДСН-электрофорез (А) и иммуноблоттинг (Б-Г) АМ-экстрактов яйцеклеток, личинок и тканей мидии *M. trossulus* .

А: 1 – АМ-экстракт яйцеклеток; 2 – АМ-экстракт бластулы (12 ч); 3, 4 – АМ-экстракты трохофор (17 и 48 ч); 5, 6 – АМ-экстракты велигеров (55 и 96 ч); 7 – АМ-экстракт переднего аддуктора взрослой мидии. Маркерные белки: ТВ (530 кДа); ТЦМ (200 кДа); миород (МР) (106-113 кДа); ПМ (100 кДа); актин (42 кДа, А), тропомиозин (36 кДа, ТМ); Б-Г: 1 – АМ-экстракт переднего аддуктора взрослой мидии; 2 – АМ-экстракт яйцеклеток; 3 – АМ-экстракт бластулы; 4 – АМ-экстракт трохофоры; 5 – АМ-экстракт велигера.

Данные денситометрии позволили нам оценить количественное соотношение мышечных белков сократительного аппарата мидии. Оказалось, что соотношение ПМ/ТЦМ у раннего и позднего велигера между собой отличается незначительно, однако сильно отличается от такового соотношения, полученного для гладкой мышцы взрослой мидии (см. таблицу, Odintsova *et al.*, 2006).

Таблица

Весовые соотношения ПМ/ТЦМ и А/ТЦМ в АМ-экстрактах велигера и мышцы взрослой мидии *M. trossulus*

Стадии развития мидии	ПМ/ТЦМ	А/ТЦМ
Велигер (55 ч)	0.37±0.06	1.25±0.03
Велигер (96 ч)	0.59±0.02	1.26±0.13
Взрослая мидия (передний аддуктор)	5.52±0.67 5.76±0.75 ^a	1.8±0.08 1.3±0.1 ^b

p<0.05

^aLevine *et al.*, 1976 (передний ретрактор мидии *M. trossulus*)

^bMargulis *et al.*, 1979 (гладкая мышца мии *Mya japonica*)

Соотношение белков на стадии велигера не соответствует таковому в гладких мышцах взрослого моллюска, а характерно для поперечно-полосатых мышц. Возможно, это связано с тем, что сформировавшаяся к стадии велигера сократительная система способна скорее к фазному сокращению характерному для поперечно-полосатых мышц, чем к тоническому, свойственному гладким мышцам взрослых мидий.

С помощью ОТ-ПЦР мы показали, что мРНК гена твитчина присутствует уже на стадии бластулы и последующих стадиях развития мидии (рис. 3).

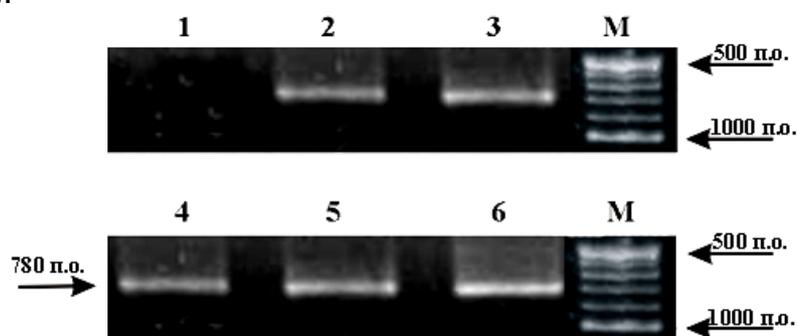


Рис. 3. Экспрессия гена твитчина на ранних стадиях развития мидии при помощи ОТ-ПЦР.

Тотальная РНК была выделена из яйцеклеток (дорожка 1), бластулы (дорожка 2), ранней и поздней трохофоры (дорожки 3, 4), велигера (дорожка 5) и из переднего аддуктора взрослой мидии (дорожка 6). М – синтетический маркер с шагом в 100 п.о. (100-1000 п.о.) (Сибэнзим, Россия). Размер фрагмента 780 п.о. Контрольная реакция с тотальной РНК была отрицательной (данные не представлены).

Судя по раннему появлению твитчина в онтогенезе мидии и его способности взаимодействовать с другими белками толстых и тонких нитей, можно предположить иницирующую роль этого белка в сборке сократительного аппарата, как это показано в случае титина (Fürst *et al.*, 1989).

Миогенная дифференцировка клеток личинок мидии *M. trossulus*

В нашей работе мы впервые использовали метод двойного и тройного совместного иммуномечения мышечных и нейрональных клеток в личинках мидии. Это позволило выявить появление оформленных структур развивающейся мышечной системы и первых нейрональных клеток моллюска. Анализируя ранние стадии развития мидии, мы обнаружили, что из всех тестируемых белков толстых нитей в яйцеклетках присутствует только парамиозин, располагаясь в зоне их кортекса (рис. 4 А, Б). Неожиданным стало исчезновение парамиозина уже через 2 ч после оплодотворения на стадии двух бластомеров (рис. 4 В).

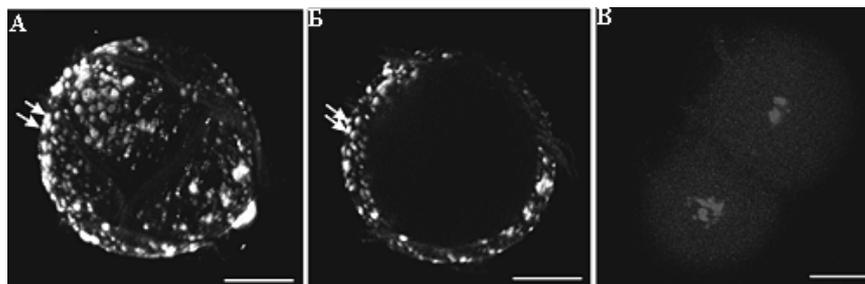


Рис. 4. Обнаружение парамиозина в раннем эмбриогенезе мидии.

А, Б – неоплодотворенные яйцеклетки; В – эмбрион на стадии двух бластомеров. Окрашивание антителами к парамиозину и DAPI для выявления ядер; Б – конфокальный срез. Окраска антителами к парамиозину и DAPI. Стрелками показаны скопления белка в кортексе яйцеклеток; В – стадия двух бластомеров (2 ч после оплодотворения). Видно отсутствие иммунореакции антител к парамиозину. Линейка – 20 мкм.

Немного позже можно отчетливо различить 4 клетки (32 ч, рис. 6 Б), а потом 6 мышечных клеток (36 ч, рис. 5 Ж – И; рис. 6 В), расположенных на анимальном полюсе трохофоры. Первые мышечные клетки имеют округлую форму, они одноядерные, их окраска распределена в цитоплазме гомогенно. Эксперименты с двойным мечением мышечных белков толстых нитей позволяют утверждать, что парамиозин, твитчин и миозин появляются одновременно на стадии трохофоры мидии и локализованы в одних и тех же клетках (рис. 5). Следующий шаг развития мускулатуры мидии – формирование поперечно-полосатого мышечного кольца на анимальном полюсе трохофоры (рис. 5 Ж – И; рис. 6 Г), от которого впоследствии отходит пара исчерченных волокон (рис. 6 Д).

Мышечное кольцо найдено и в других классах личинок моллюсков: у Polyplacophora на стадии ранней трохофоры (74 ч после оплодотворения при 10-12°C) (Wanninger, Haszprunar, 2002 a, b) и у некоторых представителей Gastropoda (Wanninger *et al.*, 1999; Page, 1997). Однако необходимо отметить, что в вышеперечисленных работах поперечно-полосатая исчерченность мышечного кольца не была показана.

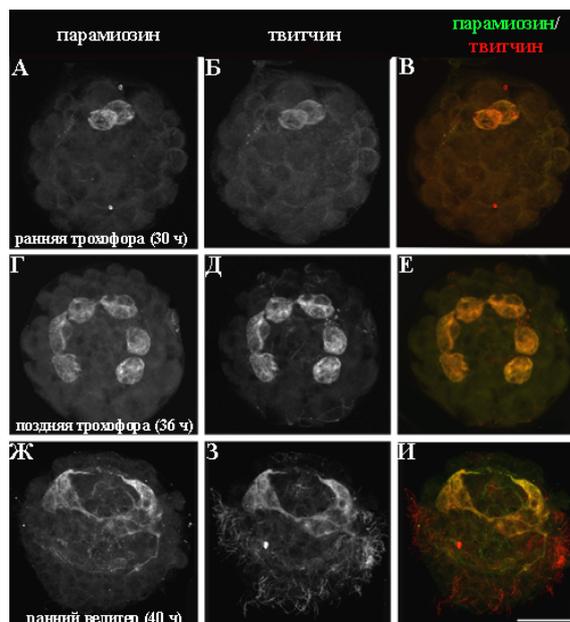


Рис. 5. Локализация парамиозин- и твитчин-иммунореактивных клеток личинок мидии.

Окрашивание личинок антителами к парамиозину (А, Г, Ж), твитчину (Б, Д, З) и ацетилированному α -тубулину (Ж – И). В, Е, И – совмещение окрасок. Линейка – 50 мкм.

У представителей класса моллюсков Scaphoroda мышечное кольцо вообще отсутствует.

Дальнейшее развитие мидии связано со смещением осевой плоскости личинки и закладкой створок раковины мидии. В результате этих событий кольцо, вероятно, разъединяется, и формируются 3 поперечно-полосатых ретрактора, прикрепленных в основании раковины (рис. 6 Е), дихотомически ветвящихся на стадии D-велигера (рис. 6 Ж). Ретракторы описаны у многих представителей двустворчатых моллюсков, имеющих, как предполагают, косо-исчерченную организацию толстых и тонких нитей (Cragg, 1985; Cragg, Crisp, 1991). Непарные и несимметричные ретракторные мышцы найдены у гастропод (Page, 1997). Их сократительная активность является причиной «онтогенетического скручивания» раковины. Вопрос о типе этих мышц остается дискуссионным, потому что нет неоспоримых доказательств организации миофибрилл у данных классов моллюсков. У представителей классов Polyplacophora и Scaphoroda отчетливо выраженные ретракторы не обнаружены (Haszprunar, Wanninger, 2000). Предполагают, что потеря ретракторов у более примитивных классов моллюсков является результатом вторичной редукции в эволюции этих животных. Это дает возможность предполагать независимую эволюцию классов внутри типа Mollusca (Haszprunar, Wanninger, 2000).

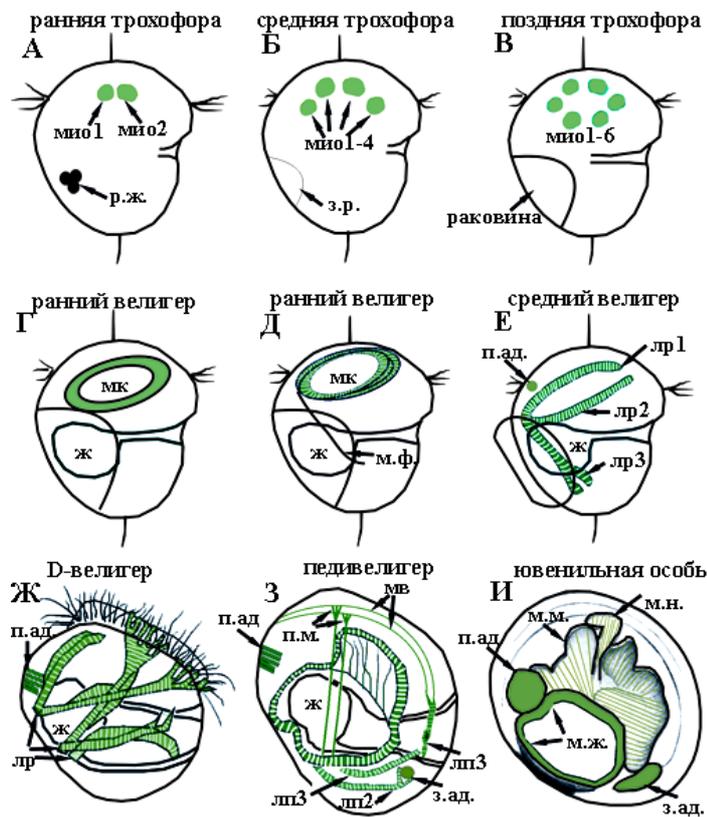


Рис. 6. Схематическое изображение развития мышечной системы личинок мидии *M. trossulus*. Вид личинок с правой латеральной стороны.

А – на стадии ранней трохофоры (30 ч) видны первые две мышечные клетки (мио 1, 2) и зачаток раковинной железы (р.ж.); Б – на стадии средней трохофоры (32 ч) количество клеток увеличивается и появляется зачаток раковины (з.р.); В – на стадии поздней трохофоры (36 ч) обнаружено шесть мышечных клеток (мио 1-6); Г – на стадии велигера (40 ч) формируется первая мышечная структура, мышечное кольцо (мк) и желудок (ж); Д – на этой же стадии, но чуть позже (42 ч), мышечное кольцо приобретает поперечно-полосатую исчерченность; от кольца отходят парные миофибриллы (м.ф.); Е – на стадии среднего велигера (60 ч) мышечное кольцо разъединяется, формируются три пары ретракторов (лр 1, 2, 3) и появляется передний аддуктор (п.ад.); Ж – на стадии более позднего велигера (90 ч, D-велигер) ретракторы начинают активно развиваться и ветвиться в районе вельюма; З – на стадии педивелигера (20 сут) появляются протракторы (лп 1, 2, 3), мышцы вельюма (мв) и зачаток заднего аддуктора (з.ад.), развиваются мышцы пищеварительной системы (п.м.); И – после метаморфоза (после 30 сут) личинки поперечно-полосатые ретракторы и протракторы резорбируются. Отчетливо видны аддукторы (п.ад., з.ад.), мышечные пучки мантии (м.м.), ноги (м.н.) и толстые мышцы желудка (м.ж.).

На стадии среднего велигера появляется передний аддуктор, зачаток мышцы взрослого животного. На более поздних стадиях развития личинки мидии формируются гладкие мышцы пищеварительной системы, три пары исчерченных и ветвящихся протракторов вельюма (рис. 6 З). После оседания в процессе метаморфоза резорбируются личиночные ретракторы и протракторы. После метаморфоза остаются только два гладкомышечных аддуктора, мышечные пучки мантии и ноги (рис. 6 И). Таким образом,

переход активно двигающейся личинки к малоподвижному образу жизни взрослого животного сопровождается постепенной утратой исчерченной и развитию гладкой мышечной ткани (Одинцова и др., 2007). Суммарная схема развития мышечной системы мидии представлена на рис. 6.

Мы обнаружили, что только после экспрессии белков толстых нитей и их сборки в незрелые саркомеры появляется Ф-актин, который встраивается в саркомеры на более поздней стадии развития мидии (60 ч). Наши результаты согласуются с данными других авторов, полученных при исследовании миогенеза у позвоночных и беспозвоночных животных. Экспрессия и сборка тонких нитей у позвоночных животных происходит независимо от толстых нитей и иногда с некоторой задержкой организации актина (Ehler *et al.*, 1999). У *C. elegans* Ф-актин появляется только после экспрессии парамиозина, миозина, титина и кеттина (Hresko *et al.*, 1994; Kolmerer *et al.*, 2000). У *D. melanogaster* белки толстых и эластичных нитей (миозин и D-титин) в первых миоблестах также появляются до экспрессии мышечной изоформы актина (Zhang *et al.*, 2000).

Обнаружив поперечно-полосатую исчерченность мышц велигера, мы сравнили ее с организацией поперечно-полосатой мышцы гребешка *M. yessoensis*. Мечение антителами к миозину и фаллоидином для детекции Ф-актина выявило схожесть организации миофибрилл (рис. 7 А – В, Д – Ж).

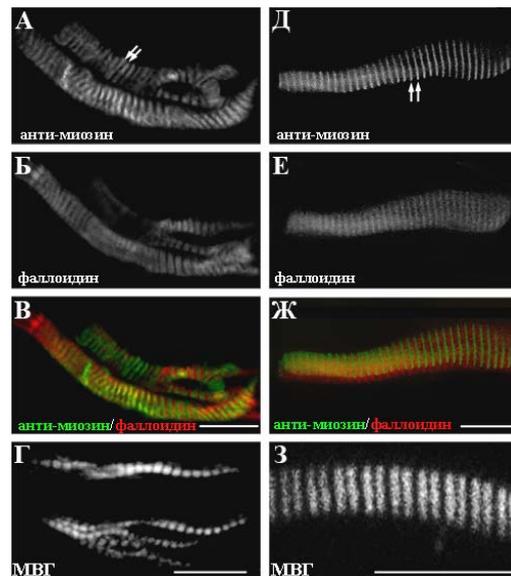


Рис. 7. Поперечно-полосатая исчерченность мышц моллюсков.

А – Г – мышцы личинки велигера мидии (60 ч); Д – З – поперечно-полосатые мышцы гребешка *M. yessoensis*; распределение миозина (А, Д), актина (Б, Е) и совмещение окрасок (В, Ж) в поперечно-полосатых мышцах моллюсков. Стрелками показана длина саркомера в расслабленном состоянии (около 2.5 мкм). Г, З – локализация миозина в мышцах велигера мидии и мышце гребешка была детектирована с помощью метода МВГ (съемка проведена совместно с сотрудником NHLBI/NIH, США, к.б.н. С.В. Плотниковым). Линейка: А – Ж – 20 мкм, З – 10 мкм.

Более того, используя данные, полученные с помощью метода микроскопии второй гармоники, мы доказали поперечно-полосатую исчерченность миофибрилл и установили, что в зрелых миофибриллах личинок и взрослого гребешка длина саркомера совпадает и составляет около 2.5 мкм (в расслабленном состоянии, рис. 7 Г, З). Поперечно-полосатая исчерченность миофибрилл, обнаруженная на стадии раннего велигера, исчезает после метаморфоза педивелигера. До настоящего исследования, используя актин в качестве маркера развития мышечной системы, авторам более ранних работ, в которых использовался актин в качестве маркера развития, не удавалось обнаружить поперечно-полосатую организацию мышц личинок двустворчатых моллюсков (Wanninger, 2001). Только лишь ранние электронно-микроскопические работы по ультраструктуре личинок указывают на схожесть организации некоторых волокон с поперечно-полосатой структурой мышц позвоночных или косо-исчерченными волокнами мышц беспозвоночных животных (Bayne, 1976).

Миогенная и нейрональная дифференцировка клеток личинок мидии

Мы проанализировали взаимное распределение мышечных клеток и нейрональных элементов на ранних стадиях развития мидии (трохофоры и раннего велигера). Маркерами нервной системы моллюсков были нейромедиаторы – серотонин (5-НТ) и FMRFамид. Ранее было показано, что антитела к этим нейромедиаторам выявляют самые первые элементы нервной системы и являются подходящими маркерами формирующихся ганглиев дефинитивной центральной нервной системы моллюсков (Croll, Voronezhskaya, 1996; Croll, 2000; Voronezhskaya *et al.*, 2008). Это дает возможность детально изучить возникновение и развитие личиночной нервной системы. Мы обнаружили, что первые серотонин- и FMRFамид-иммунореактивные клетки появляются на стадии ранней трохифоры на анимальном полюсе. Мышечные клетки, формирующие исчерченное кольцо, появляются позже (36 ч). Расположение 5-НТ- и FMRFамид-иммунореактивных клеток относительно мышечного кольца различается. Как видно на рис. 8, три 5-НТ-иммунореактивные клетки расположены в центре мышечного кольца, а шесть FMRFамид-иммунореактивных клеток – на периферии мышечного кольца. Часть отростков FMRFамид-иммунореактивных клеток на стадии велигера располагается в велюме, а часть направлена к переднему аддуктору. На стадии раннего велигера мы обнаружили четыре серотонин-иммунореактивные клетки (рис. 8 В, Е).

Известно, что развитие и функционирование мышц неотъемлемо связано с их иннервацией. Сенсорные нейроны апикального органа личинок мидии могут быть связаны с мышцами, что, вероятно, приводит к способности личинки быстро реагировать на внешние сигналы.

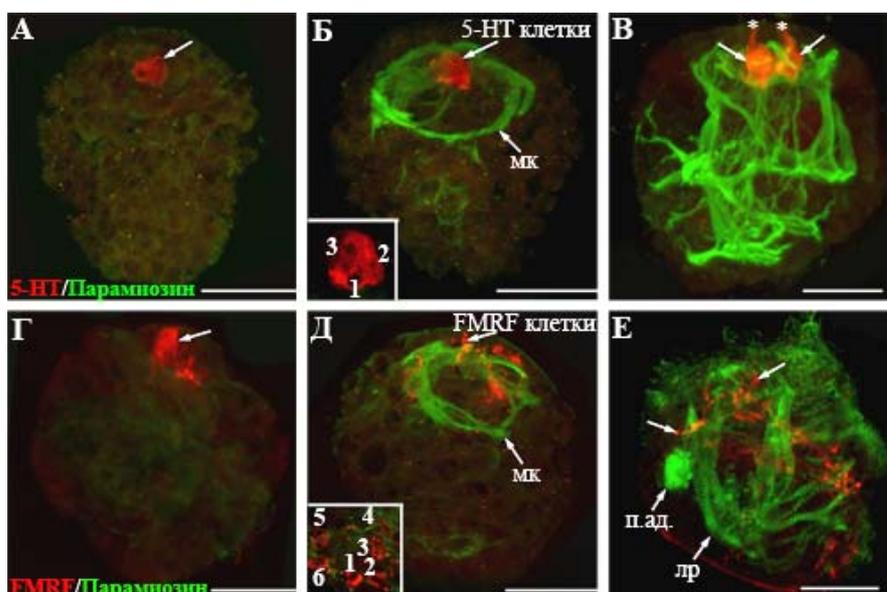


Рис. 8. Локализация мышечных структур и сенсорных нейронов трохофоры и велигера мидии.

5-НТ- (А, Б, В) или FMRFамид- (Г, Д, Е) (красная окраска) и параамиозин-иммунореактивные клетки (зеленая окраска) на ранних стадиях развития личинок. А, Г – на стадии трохофоры (28 ч) появляются первые нейрональные элементы (показано стрелками); Б, Д – на стадии трохофоры (36 ч) видно три 5-НТ-иммунореактивные клетки, локализованные в центре мышечного кольца и шесть FMRFамид-иммунореактивных клеток; В – на стадии велигера (60 ч) выявлены четыре 5-НТ-иммунореактивные клетки с нейропилем, содержащим варикозные расширения (отмечено звездочками). С боковой стороны видно только две 5-НТ-иммунореактивные клетки (показано стрелками). Е – нейрофибриллы FMRFамид-иммунореактивных клеток велигера (60 ч) простираются от велюма к переднему аддуктору (п.ад.) (стрелка). Линейка – 50 мкм.

Возможно, что поперечно-полосатое мышечное кольцо функционально активно и может регулировать положение сенсорных нейронов апикального органа личинки. В то же время, мы не обнаружили специфических связей между первыми мышечными клетками и нейронами на ранних стадиях развития мидии. Вопрос, регулируют ли нейромедиаторы сокращение ретракторов личинки мидии, до сих пор не решен. Известно, что во время развития дрозофилы дифференцировка мышц личинок происходит до иннервации, однако нейроны необходимы для сократительной активности мышц на более поздних стадиях развития (Broadie, Bate, 1993).

МИОГЕНЕЗ *IN VITRO*

Миогенная дифференцировка клеток личинок мидии в культуре

Ранее разработанный метод получения миогенных клеточных культур из личинок премиогенных стадий развития дал нам возможность более детально исследовать стадии миогенной дифференцировки мидии *in vitro*.

Миогенная дифференцировка клеток мидии в культуре происходит на всех субстратах, за исключением коллагена. Мы предполагаем, что отсутствие мышечного фенотипа клеток, культивируемых на коллагене (1 мг/мл), видимо, происходит из-за того, что этот субстрат в такой концентрации не является подходящим субстратом для миогенной дифференцировки клеток личинок мидии. Мы показали, что из-за отсутствия твердого субстрата актиновые и парамиозиновые (или миозиновые) фибриллы оказываются закрученными вокруг ядра клеток и не формируют строго упорядоченные нити, образующие саркомер. Подобное ингибирование миофибриллогенеза было отмечено у скелетно-мышечных симпластов (Puri *et al.*, 1980) и кардиомиоцитов (Vechem *et al.*, 1985) при культивировании их на неадгезивном субстрате.

Через 2 ч после посадки клеток мидии на фибронектин, полилизин или стекло, покрытое углеродом, они прикреплялись к тестируемым субстратам, а через 12 ч были отмечены первые спонтанные сокращения. Количество сокращающихся клеток увеличивалось по мере дальнейшего культивирования. На поздних стадиях культивирования мы наблюдали сокращение целых колоний монослойных клеток. Используя антитела к мышечным белкам и фаллоидин для выявления Ф-актина, мы обнаружили, что уже через 2 ч появляются нити актина, но отсутствуют другие тестируемые белки. Экспрессия белков толстых нитей была обнаружена через 6 ч культивирования, а их распределение в клетках было диффузно (рис. 9 А – В).

Через 12 ч мы обнаружили чередующееся распределение белков толстых нитей и актина (рис. 9 Г – Е), создающее поперечную исчерченность, что коррелирует с появлением первых сокращений клеток. Эти клетки можно рассматривать как терминально-дифференцированные постмитотические миоциты, поскольку синтез ДНК в них не обнаружен. Клетки, культивируемые на всех субстратах (кроме коллагена), оставались одноядерными с латерально расположенным ядром. Необходимо отметить, что длина саркомеров клеток в культуре совпадала с таковой у личинок мидий (2.5 мкм). Однако через 20 сут после начала культивирования клеток, исчерченность распределения толстых и тонких нитей сменилась на диффузное расположение белков в цитоплазме клеток, свойственное гладким мышцам взрослой мидии (рис. 9 Ж – И). Процесс формирования миотуб на протяжении всего времени культивирования нами обнаружен не был.

Общепризнанными на сегодняшний день являются две модели сборки миофибрилл: модель «матрицы», в которой основой будущего саркомера являются стресс-фибриллы, и модель «независимой сборки» единиц саркомера (Sanger *et al.*, 2006). Однако у некоторых представителей позвоночных и беспозвоночных животных миофибриллогенез не подходит ни под одну из общепринятых моделей (Sanger *et al.*, 2006).

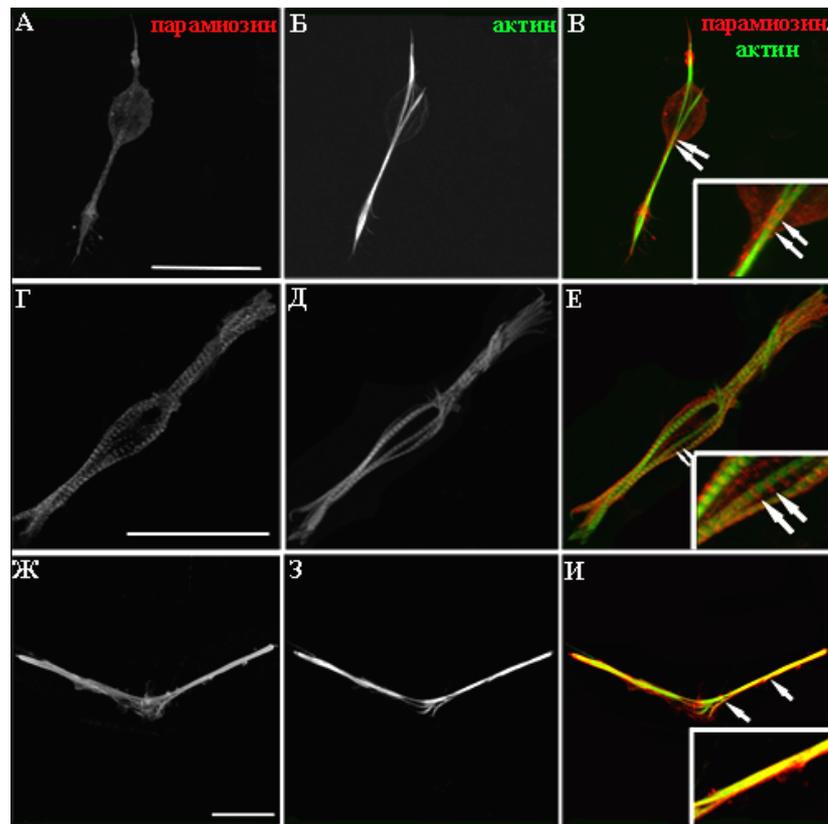


Рис. 9. Изменение организации сократительных белков в процессе сборки саркомеров в клетках мидии.

Парамиозин (красная окраска, А, Г, Ж), актин (зеленая окраска, Б, Д, З) и совмещенная картина окрашивания белков (В, Е, И). Клетки культивировали в течение 2 ч (А – В), 12 ч (Г – Е) и 30 сут (Ж – И). Длина саркомера составляет 2.5 мкм. Отсутствие поперечно-полосатой исчерченности мышечных клеток на поздних сроках культивирования (Ж – И). Линейка: А – В – 10 мкм, Г – И – 20 мкм.

Например, сборка саркомеров у рыбы *Danio rerio* происходит в отсутствие стресс-фибрилл и структур-предшественников миофибрилл (Costa *et al.*, 2002). Миоциты эмбриона, не сливаясь, созревают в поперечно-полосатые мышечные клетки без формирования миотуб (Costa *et al.*, 2003). Аналогичную ситуацию мы наблюдали в первичной культуре клеток мидии, дифференцирующихся в миоциты. Как и у *D. rerio*, мышечные клетки мидии, не сливаясь в миотубы, созревают в поперечно-полосатые миоциты, тем самым, повторяя программу миогенеза в развитии моллюска. Однако между программами миогенной дифференцировки у *D. rerio* и *M. trossulus* есть существенные различия. Прежде всего, у *D. rerio* первыми специализируются гладкие мышцы, а потом поперечно-полосатые (Roy *et al.*, 2008), а у мидии наоборот.

На сегодняшний день известно мало работ, в которых говорится о независимости развития мышечной системы личинок и мышц взрослых особей моллюсков (Cragg 1985; Crag, Crisp 1991). Нами обнаружен параллелизм развития двух мышечных систем мидии. В результате

метаморфоза мускулатура личинки, а именно ее поперечно-полосатая часть (ретракторы и протракторы) резорбируются. По-видимому, процессы, происходящие *in vivo*, реализуются также и в культуре клеток. Действительно, поздних стадиях культивирования клеток мидии мы не обнаружили исчерченных мышечных клеток.

Миогенная и нейрональная дифференцировка клеток мидии *in vitro*

Исследование нейронов и миоцитов в условиях культуры важно для изучения взаимодействия отдельных типов клеток в процессе развития и влияния их друг на друга. Мы обнаружили, что на начальных этапах культивирования расположение мышечных и нейрональных клеток было хаотично (рис. 10 А, Б, Г, Д). После диссоциации все клетки имели округлую форму. Первые 5-НТ- и FMRF-амид-иммунореактивные клетки появляются через 4 часа после их посадки в чашки. Однако на более поздних стадиях культивирования, после терминальной дифференцировки обоих типов происходила ассоциация клеток в колонии (рис. 10 В, Е). Интересно, что в центре каждой колонии располагались серотонин- и FMRFамид-иммунореактивные клетки, а миоциты располагались на периферии и объединялись с другими агрегатами, формируя сеть сокращающихся клеток.

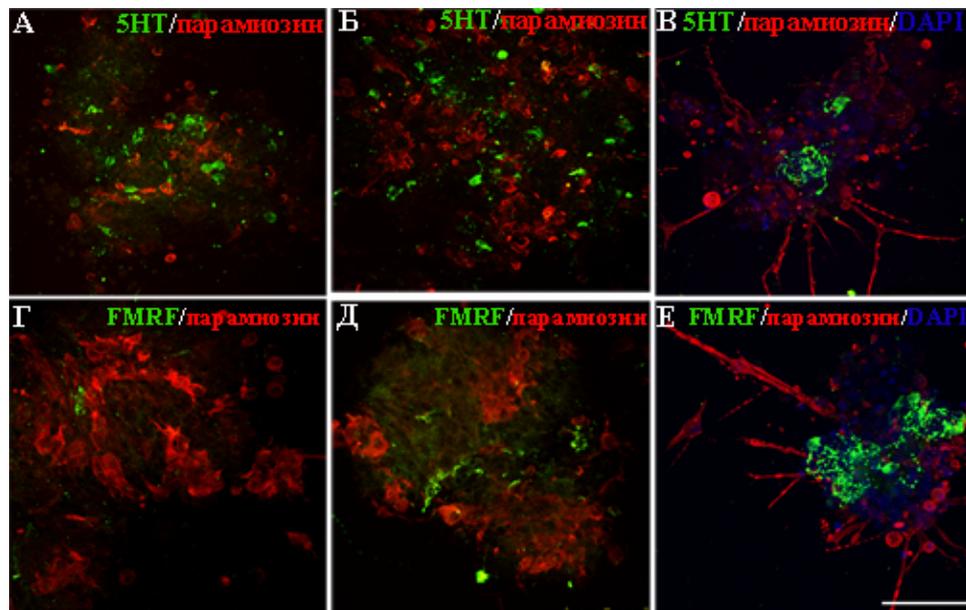


Рис. 10. Детекция нейронов и миоцитов в первичной культуре клеток мидии.

А, Б, В – окраска клеток антителами к серотонину (зеленая окраска); Г, Д, Е – окраска клеток антителами к FMRFамиду (зеленая окраска), параамиозину (красная окраска) и DAPI (синяя окраска, В, Е) клеток личинок *M. trossulus* на разных стадиях культивирования. А, Г – 2 сут в культуре, Б, Д – 9 сут в культуре и В, Е – 25 сут в культуре. Линейка – 10 мкм.

Мы обнаружили феномен агрегации нейронов и миоцитов в первичной культуре клеток личинок мидии. Способ образования агрегатов в культуре, вероятно, происходит путем взаимного перемещения миоцитов и нейронов. За время совместного культивирования клеток, нейроны мидии не были распластаны и не формировали отростки, находясь в плотных агрегатах, состоящих, в основном, из эпителио-подобных округлых клеток и ресничных трофобластов. Феномен безотростчатой агрегации нейронов в культуре ткани после их искусственной диссоциации известен (Сотников, 1985). Процесс агрегации может протекать неравномерно и сопровождаться на время выходом нейронов из агрегатов. В нашей системе *in vitro* перемещения нейронов из агрегата на поздних стадиях культивирования мы не наблюдали. Полученная *in vitro* модель является сложной и подходящей системой для дальнейшего изучения молекулярных основ взаимодействия как нейронов и мышц, так и других типов клеток. Подобная гетерогенная система клеток может быть использована для тестирования гормонов беспозвоночных животных, а исследования такого рода могут раскрыть механизмы координированного развития различных типов клеток.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что парамиозин, белок толстых нитей мышц мидии, присутствует в кортексе неоплодотворенных яйцеклеток. Другие белки толстых нитей, твитчин, миозин и миород, экспрессируются задолго до начала формирования мышечной системы личинки мидии велигера.
2. Экспрессия гена, кодирующего твитчин, начинается со стадии бластулы.
3. Первые мышечные клетки появляются на стадии ранней трохофоры и формируют кольцо, состоящее из поперечно-полосатых мышечных клеток. Кольцо трансформируется на стадии велигера в отдельные поперечно-полосатые ретракторы, которые резорбируются в процессе метаморфоза личинки. При этом гладкие мышцы взрослого моллюска закладываются до метаморфоза на стадии велигера и развиваются параллельно с мускулатурой личинки.
4. Нейрональные клетки появляются на стадии ранней трохофоры до появления первых мышечных клеток. Показано, что сенсорные клетки апикального органа расположены в центре и на периферии поперечно-полосатого мышечного кольца поздней трохофоры. Морфологических контактов между нейронами и миофибриллами на ранних стадиях развития мидии не обнаружено.
5. Миогенная и нейрональная программы дифференцировки могут быть воспроизведены в культуре клеток. Миогенная программа, воспроизведенная *in vitro*, сходна с таковой *in vivo* и в обоих случаях

протекает без формирования многоядерных миотуб в отличие от миогенеза позвоночных животных. Обнаружена самоорганизация диссоциированных клеток мидии в культуре с образованием нейромышечных колоний. Синаптических контактов при кокультивировании миоцитов и нейронов не обнаружено.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Дячук В.А.**, Плотников С.В., Одинцова Н.А. Появление мышечных белков в онтогенезе мидии *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // Биология моря. 2005. Т. 31, № 5. С. 376–379.
2. 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. 2006. Vol. 144, № 2. P. 238–244.
3. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., **Дячук В.А.** Культуры клеток морских беспозвоночных: проблемы, успехи, перспективы // Труды международной научной конференции «Инновации в науке и образовании – 2005», посвященной 75-летию основания КГТУ и 750-летию Кенигсберга-Калининграда, Калининград: издательство КГТУ, 2005. Ч. 1. С. 50–52.
4. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., **Дячук В.А.** Регуляция процессов роста и дифференцировки клеток морских беспозвоночных в культуре // Тезисы докладов и сообщений Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург: издательство «Наука». Цитология. 2006. Т. 48. С. 785–786.
5. 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. 235–240.
6. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., **Дячук В.А.**, Серов О.Л. Эволюционно консервативные гены плюрипотентности клеток морских беспозвоночных // Тезисы докладов и сообщений II съезда Общества клеточной биологии совместно с юбилейной конференцией, посвященной 50-летию Института цитологии РАН, Санкт-Петербург: издательство «Наука». Цитология, 2007. Т. 49, № 9. С. 780–781.
7. **Дячук В.А.**, Одинцова Н.А. Направленная дифференцировка эмбриональных клеток мидии *Mytilus trossulus* в культуре // «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза». Симпозиум с международным участием. М.: Т-во научных изданий КМК, 2007. С. 54–55.
8. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., **Дячук В.А.**, Борода А.В. Стволовые клетки морских беспозвоночных: регуляция пролиферации и направленной дифференцировки *in vitro*. Криосохранение // Информационный бюллетень. Выпуск 23. – СПб.: Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2008. С. 23–30.
9. **Dyachuk V.A.**, Odintsova N.A. Visualization of muscle protein expression pattern during mussel development // International Symposium «Biological Motility: Achievements and Perspectives», Pushchino, Russia. Abstracts of International Symposium. Пущино: Пущинский издательский центр РАН, 2008. С. 67–68.
10. Matusovsky O.S., **Dyachuk V.A.**, Kisilev K.V., Shelud'ko N.S., Sobieszek A. Phosphorylation of myosin by endogenous kinase from molluscan smooth muscle // International Symposium «Biological Motility: Achievements and Perspectives», Pushchino, Russia. Abstracts of International Symposium. Пущино: Пущинский издательский центр РАН, 2008. С. 41–43.

Дячук Вячеслав Алексеевич

**МИОГЕННАЯ И НЕЙРОНАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК
ЛИЧИНОК МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS* IN VIVO И IN VITRO**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук