

ПЛАСТИНКА В ЗОНЕ КОНТАКТА ООЦИТА С ЗАЧАТКОВЫМ ЭПИТЕЛИЕМ У СЦИФОМЕДУЗЫ *AURELIA AURITA* ИМЕЕТ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ СХОДСТВО С ZP-ДОМЕНСОДЕРЖАЩИМ БЕЛКОМ МЕЗОГЛЕИНОМ

© Л. С. Адонин,¹ О. И. Подгорная,² И. В. Матвеев,² Т. Г. Шапошникова¹

¹ Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: matrix.evo@gmail.com; leo.adonin@gmail.com

Проведено описание морфологических особенностей строения области на границе соединения ооцита с зачатковым эпителием (эпителиальной стенкой полового синуса) у сцифомедузы *Aurelia aurita*. Для удобства описания выделено семь стадий, различающихся между собой по размеру растущего ооцита. Обнаруженная в данной области структура названа пластинкой в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием: по мере роста ооцита происходит слияние отдельных специфических гранул в линейно расположенную гомогенную массу в месте контакта ооцита и эпителиального слоя. Показано, что компоненты, входящие в состав пластинки, специфически связывают антитела к мезоглеину. Очевидно, что взаимодействующий с антителами материал в пластинке содержит в своем составе ZP-доменсодержащие белки. Результаты электрофореза и иммуноблота свидетельствуют о том, что белки, иммунологически сходные с мезоглеином, обладают более высокой молекулярной массой. Причиной этого могут быть посттрансляционные модификации, которые в высшей степени характерны для экстраклеточных белков. С другой стороны, белки гонад могут являться другими представителями семейства ZP-доменсодержащих белков медуз. Дальнейшая экспериментальная работа позволит сделать выбор между этими альтернативами.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, *Aurelia aurita*, ZP-доменсодержащие белки, эволюция.

Кишечнополостные (Coelenterata, или Cnidaria) — низшие многоклеточные животные, тело которых образовано двумя эпителиальными слоями. Между наружным (эпидерма) и внутренним (гастродерма) слоями тела расположена прослойка межклеточного вещества, называемая мезоглеей (Чарпан, 1974; Догель, 1981). У взрослых медуз толщина мезоглеи составляет несколько сантиметров. Мезоглея выполняет функцию скелета, придавая определенную форму телу животного; она участвует также в транспорте и запасании питательных веществ (Bouillon, Corpois, 1977; Weber, Schmid, 1985). Усилие, производимое мышечной системой зонтика, обеспечивает сокращение диаметра внешней части зонтика, тогда как эластичность мезоглеи обеспечивает медузе возврат к первоначальной форме после каждого мышечного сокращения (Bouillon, Corpois, 1977). У сцифоидной медузы *Aurelia aurita* и ряда других представителей классов Scyphozoa и Anthozoa мезоглея заселена свободными подвижными клетками. У таких кишечнополостных мезоглея приобретает внешнее сходство с соединительными тканями других животных (Заварзин, 1945; Chapman, 1974).

С помощью электрофоретического анализа белкового состава мезоглеи зрелых медуз *A. aurita* мы показали наличие в ней нескольких мажорных белков. Одним из них является белок с мол. массой 45—47 кДа, который не распознается антителами для известных компонентов внеклеточного матрикса (Sarras et al., 1991). Мы получили поликлональные антитела против белков фракции

45/47 кДа (RA45/47) и подтвердили их специфичность с помощью иммуноблота. Иммунохимический анализ срезов *A. aurita* показал, что антиген 45/47 кДа локализуется в гранулах мезоглеальных клеток и в апикальной части клеток эпидермы, а у зрелых медуз он выявляется также в составе «эластических» волокон межклеточного матрикса мезоглеи (Shaposhnikova et al., 2005).

Ген для белка 45/47 кДа был клонирован и секвенирован. Поскольку данный белок оказался не описанным ранее, мы назвали его мезоглеином (Matveev et al., 2007). Анализ доменного состава мезоглеина показал, что он относится к обширному суперсемейству белков внеклеточного матрикса, имеющих в своем составе домен zona pellucida (ZP). Впервые домен был обнаружен в белках, образующих блестящую оболочку (zona pellucida) вокруг ооцита мыши (Bork, Sander, 1992). В настоящее время известно более 680 белков, содержащих этот домен, у представителей разных ветвей эволюционного дерева (Jovine et al., 2005). Функции ZP-доменсодержащих белков разнообразны: от структурных компонентов в оболочке яйца до компонентов, передающих механическую нагрузку в крыле дрозофилы, или рецепторов у млекопитающих и других позвоночных. На сегодняшний день мезоглеин является наиболее древним представителем белков этого семейства.

Поликлональные антитела против мезоглеина при окраске иммуноблотов после электрофоретического разделения белков мезоглеи, мезоглеальных клеток, эпидермы и гастродермы (кроме зоны, соответствующей мезо-

глеину) окрашивают высокомолекулярные зоны (80 и 210 кДа) на дорожках, соответствующих мезоглеальным клеткам и эпидерме. Возможно, мезоглеин синтезируется в виде белка-предшественника, который подвергается посттрансляционному расщеплению (Shaposhnikova et al., 2005; Matveev et al., 2007).

Из-за того что мезоглеин оказался белком, родственным белкам блестящей оболочки млекопитающих, мы обратили особое внимание на оогенез *A. aurita*. Оказалось, что на срезах тканей медузы антитела к мезоглеину окрашивают также материал в области контакта ооцитов с зачатковым эпителием. Для удобства изложения далее мы будем называть окрашенную область пластинкой в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием.

Оогенез у представителей класса Scyphozoa описан до настоящего времени неполно. Известно, что ооциты сцифоидных медуз возникают из зачаткового эпителия — эпителиальной стенки полового синуса, обращенной к эндодерме (Иванова-Казас, 1975; Ecklbarger, Larson, 1988). Кроме того, описаны модифицированные клетки этого эпителия, которые, возможно, принимают участие в питании развивающегося ооцита (Иванова-Казас, 1975). Они также создают в зачатковом эпителии воронковидные углубления прямо под зрелыми ооцитами, где в дальнейшем скапливаются сперматозоиды. Эти клетки называют трофоцитами (Ecklbarger, Larson, 1988), но экспериментально их роль в транспорте питательных веществ в ооцит не показана.

Какие-либо специфические структуры на границе соединения ооцита с зачатковым эпителием ранее описаны не были. На первом этапе необходимо было проследить стадии формирования пластинки, что и определило задачу настоящего исследования.

Материал и методика

Сбор материалов. Объектом исследования являются взрослые медузы *Aurelia aurita* (класса Scyphozoa, отр. Semaestomae, сем. Ulmaridae) с диаметром зонтика 20 см и более. Животных отлавливали во второй половине июля и в августе в Чупинской губе Белого моря в окр. Беломорской биологической станции Картеш Зоологического института РАН. Медуз собирали с весельной лодки сачком на глубине до 2 м.

Животных препарировали, отделяя гонады с помощью пинцета и скальпеля от эпидермы и мезоглеи. Кусочки мезоглеи и гонад самок замораживали для хранения при -20°C , в условиях стационарной лаборатории использовали уже замороженный материал.

Электрофоретическое разделение белков в условиях SDS-электрофореза по Лэммли. Белковый состав мезоглеи и гонад сравнивали, разделяя гомогенаты соответствующих образцов с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по стандартной методике (Laemmli, 1970). Концентрация акриламида в гелях составляла в разных вариантах от 5 до 12%. В качестве маркера молекулярной массы белков при электрофоретическом разделении в условиях SDS-электрофореза применяли белковый маркер — миофибриллы кролика. Гель фиксировали и окрашивали Кумасси G-250 (Sigma, США).

Электрофоретическое разделение белков в условиях кислого электрофореза по Чокли.

Разделение белков мезоглеи и гонад производили в полиакриламидном геле в присутствии уксусной кислоты (5.4%) и мочевины (3 М) (Panyrm, Chalkley, 1969) с некоторыми модификациями (Podgornaya, Shaposhnikova, 1998). Концентрацию акриламида в гелях варьировали от 10 до 13%.

Иммуноблот (Вестерн-блот). Процедура основана на методике (Towbin et al., 1979). После разделения белков с помощью SDS- или кислого электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (polyvinylidene difluoride) в модифицированном электродном буфере Лэммли (25 мМ Tris, 192 мМ глицин, pH 8.3, 0.01%-ный SDS, 10%-ный этанол) с помощью полусухого переноса.

После переноса мембраны оставляли в PBS, содержащем 0.05% Tween-80 (PBS-Tween). Для инактивации неспецифических сайтов связывания мембрану инкубировали 12 ч в растворе PBS-Tween, содержащем 5% лиофилизированного обезжиренного молока и 1.5% бычьего сывороточного альбумина. Затем добавляли антитела к мезоглеину (RA45/47 в конечном разведении 1:5000 в PBS-Tween) и инкубировали в течение 1 ч. После этого мембрану отмывали от не связанных с антигеном антител в четырех сменах PBS-Tween. Затем производили инкубацию в растворе вторых антител, которые были конъюгированы со щелочной фосфатазой (GAR-AP, Sigma, США) в разведении 1:20 000; время инкубации 1 ч. Далее следовала отмывка в четырех сменах PBS-Tween, затем в двух сменах буфера для щелочной фосфатазы (pH 9.5) в течение 10 мин каждая. Выявление связанной щелочной фосфатазы проводили раствором BCIP-NBT. В качестве контроля мембраны с перенесенными белками инкубировали в растворе PBS-Tween, содержащем 5% лиофилизированного обезжиренного молока.

Получение и определение специфичности антител RA45/47 описано ранее (Shaposhnikova et al., 2005).

Парафиновые срезы. Кусочки гонады с прилегающей мезоглеей фиксировали в растворе 4%-ного параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере, тоничность подводи́ли сахарозой и NaCl. Зафиксированный материал заливали в парафиновые блоки. Изготавливали серийные срезы толщиной 3—5 мкм при помощи санного микротом Leica SM 2000 R. Перед окрашиванием срезы обезпарафинировали, переводя в водную среду по стандартной методике, и окрашивали гематоксилином—эозином и по методу Маллори — для морфологических наблюдений, ализановым синим и реактивом Шиффа (ШИК-реакция) — для выявления полисахаридов (Пирс, 1962). Препараты заключали в даммар-лак или канадский бальзам.

Полутонкие срезы. Кусочки гонады с прилегающей мезоглеей фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере и дофиксировали в 1%-ном растворе OsO_4 . Зафиксированный материал заливали в Эпон по методике, предложенной производителем (Sigma, США). Полутонкие срезы изготавливали на ультратоме Leica EM UK6. Полутонкие срезы окрашивали 0.1%-ным раствором кислого фуксина на 30%-ном этаноле в течение 1—2 мин при постоянном подогреве, после чего краску смывали. Наблюдение и фотосъемку проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Leica DM 6000B.

Иммуногистохимия. Кусочки мезоглеи и гонады фиксировали, как описано выше в разделе «Парафиновые срезы». Материал хранили в 70%-ном этаноле. Фиксированные образцы заключали в парафин и изготавливали срезы 3—5 мкм толщиной. После депарафинирования

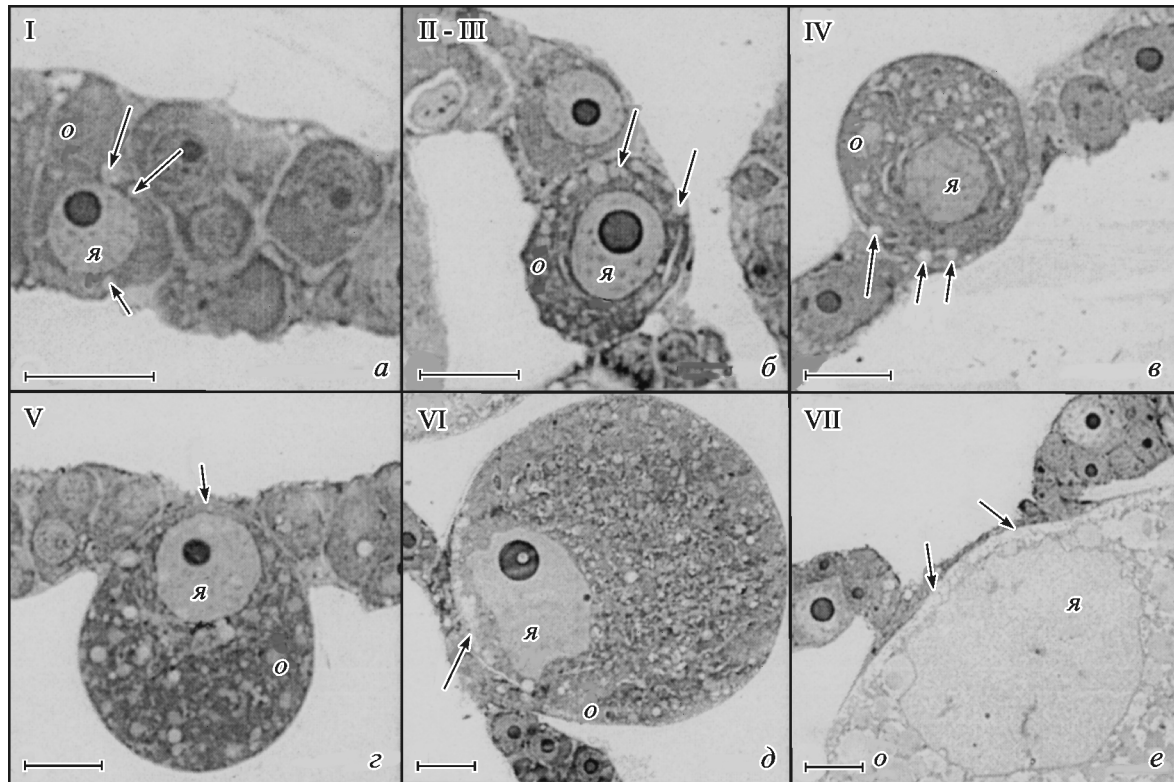


Рис. 1. Стадии развития ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita*.

a — I стадия, *б* — II—III стадии, *в* — IV стадия, *г* — V стадия, *д* — VI стадия, *е* — VII стадия развития ооцита. Стрелками указана исследуемая структура на анимальном полюсе ооцита; *о* — ооцит, *я* — ядро ооцита. Масштабные линейки — 10 мкм.

срезы споласкивали в дистиллированной воде и двух смывах PBS-Tween. Выявление антигенов производили по методике, описанной выше в разделе «Иммуноблот», но при этом использовали RA45/47 в конечном разведении 1 : 4000. Использовали вторые антитела, конъюгированные с FITC или Rhodamin (GAR-FITC, GAR-Rhodamin, Sigma, США). Все операции проводили при комнатной температуре (20 °C). Окрашенные срезы заключали в глицерин и наблюдали в микроскоп (Leica DM 6000 B). В контроле вместо первых антител срезы инкубировали в растворе PBS-Tween, содержащем 5 % лиофилизированного обезжиренного молока и 1.5 % бычьего сывороточного альбумина.

Использованные реактивы: BSA, BCIP, NBT, Coomassie G-250, Epon, SDS, PVDF, GAR-AP, GAR-FITC, GAR-Rhodamin, Tween (все — Sigma, США); глицин, NaCl, сахароза (все — ICN, США); гематоксилин, эозин, ализановый синий, кислый фуксин (все — Chemapol, Чехия).

Результаты

При окрашивании гематоксилином—эозином парафиновых срезов гонад самок сцифомедузы *A. aurita* в месте прикрепления ооцита к зачатковому эпителию выявлена интенсивно окрашивающаяся эозином пластинка в области контакта. Морфологические особенности ее строения на светооптическом уровне различаются на разных этапах созревания ооцита. Более детальное рассмотрение проводили на полутонких срезах (рис. 1). Для удобства описания мы выделяем семь стадий, которые разли-

чаются между собой по размеру растущего ооцита: от 10 мкм (I стадия) до 130—170 мкм на последних этапах созревания (стадия VII).

Вначале ооцит является частью эпителиального слоя и неотличим морфологически от соседних клеток. По мере роста ооцит округляется и приобретает большое светлоокрашенное ядро. Размеры ооцита на этой стадии развития (стадия I) не превышают 10 мкм. В периферической цитоплазме ооцита на границе с соседними эпителиальными клетками отмечено появление отдельных оптически менее плотных гранул (рис. 1, *a*), которые на последующих этапах развития начинают скапливаться в месте прикрепления ооцита к эпителию.

На стадиях II и III размеры ооцита увеличиваются до 40 мкм и происходит постепенное разрастание и погружение его в мезоглею. Начиная с III стадии гранулы скапливаются вдоль поверхности ооцита, прикрепленной к зачатковому эпителию (рис. 1, *б*). Стадии II и III характеризуются также тем, что эпителиальный слой, прилегающий к ооциту, становится более тонким.

По мере увеличения объема ооцита (стадия IV, диаметр ооцита около 50—70 мкм) ядро смещается к анимальному полюсу, а материал в области контакта между ооцитом и зачатковым эпителием начинает приобретать зернистую структуру (рис. 1, *в*). На стадии V (диаметр ооцита около 80—100 мкм) еще можно различить отдельные гранулы, но большая их часть уже слилась в линейно расположенную гомогенную массу в месте контакта ооцита и эпителиального слоя, т. е. формируется пластинка.

На последних этапах созревания диаметр ооцита увеличивается до 100—130 мкм на стадии VI и достигает максимального размера на стадии VII (130—170 мкм).

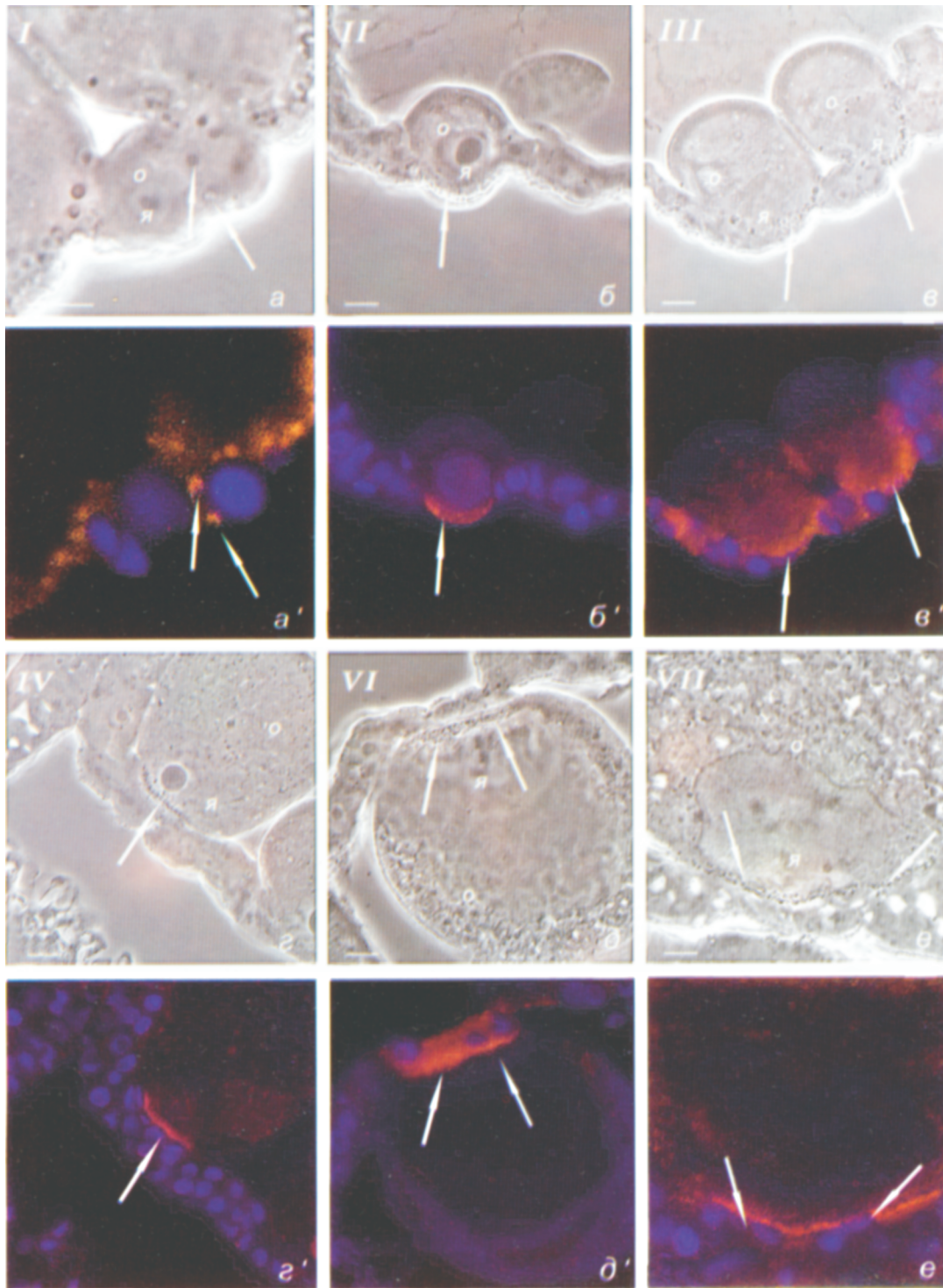


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное выявление антигена, связывающего антитела к мезоглеину (RA45/47) в области животного полюса ооцита *Aurelia aurita*.

a—e — фазовый контраст; *a'—e'* — непряная иммунофлуоресценция (вторые антитела конъюгированы с родамином), ядра дополнительно окрашены DAPI; I—IV, VI, VII — стадии развития ооцита. Стрелками указана структура животного полюса ооцита; *o* — ооцит, *я* — ядро ооцита.

На данных стадиях зернистый компонент окружен менее интенсивно окрашивающимся гомогенным материалом, расположенным в виде тонкой пластинки, тогда как на ранних стадиях был представлен только гранулярный компонент. В цитоплазме ооцита содержатся многочисленные гранулы желтка размером до 5—7 мкм (рис. 1, *г—e*). Интенсивность окрашивания материала

пластинки с III по VII стадию развития возрастает, что может свидетельствовать о его уплотнении.

Зачатковый эпителий также претерпевает морфологические перестройки в месте прикрепления ооцита. Клетки начинают уплощаться, и на последних этапах развития ооцита эпителий представлен очень тонким слоем (рис. 1, *e*).

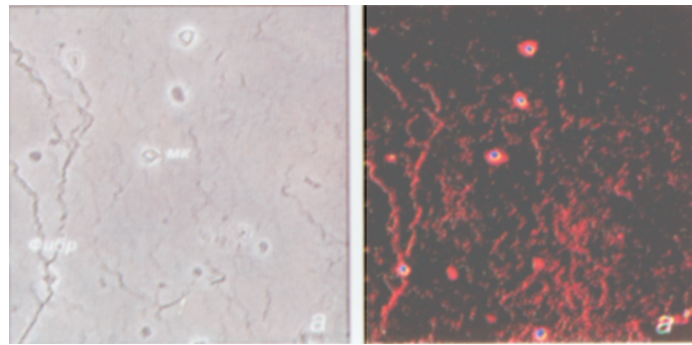


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное выявление мезоглеина и (или) его предшественника с помощью RA45/47 в «эластических» фибриллах и мезоглеальных клетках.

a — фазовый контраст, *a'* — непрякая иммунофлуоресценция (вторые антитела конъюгированы с родамином). Ядра дополнительно окрашены DAPI; *мк* — мезоглеальные клетки, *фибр* — «эластические» фибриллы.

Результаты окрашивания парафиновых срезов по методу Маллори дают основание полагать, что в составе пластинки содержатся гликопротеины. Гистохимический анализ с использованием ШИК-реакции и окраски альциановым синим показал, что полисахариды, входящие в состав гликопротеинов, имеют кислую природу.

Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов гонады сывороткой, содержащей антитела против мезоглеина (RA45/47), показало, что гранулы, а затем и гомогенный материал пластинки в зоне контакта специфически связывают антитела начиная с I—II стадий (рис. 2, *стрелки*). В качестве положительного контроля мы использовали срезы тех участков тела медузы, где в мезоглее присутствуют развитые «эластические» волокна и мезоглеальные клетки (рис. 3). Антитела взаи-

модействуют с компонентами волокон и мезоглеальных клеток.

После разделения белкового гомогената гонад самок *A. aurita* в условиях SDS-электрофореза, переноса на мембрану и окрашивания антителами против мезоглеина в пробе обнаружены две белковые полосы, связывающие RA 45/47. Их мол. массы составляют около 210 и 180 кДа (рис. 4, *a*, *дорожка 2*, *стрелки*).

Для того чтобы уточнить заряд полипептидов, провели разделение гомогената гонад самок *A. aurita* в условиях кислого электрофореза с последующим переносом на PVDF-мембрану. Иммуноблот показал, что в гонадах имеются два положительно заряженных белка, связывающих антитела против мезоглеина (рис. 4, *б*, *дорожка 2*, *стрелки*). Иммуноблот после двумерного электрофореза

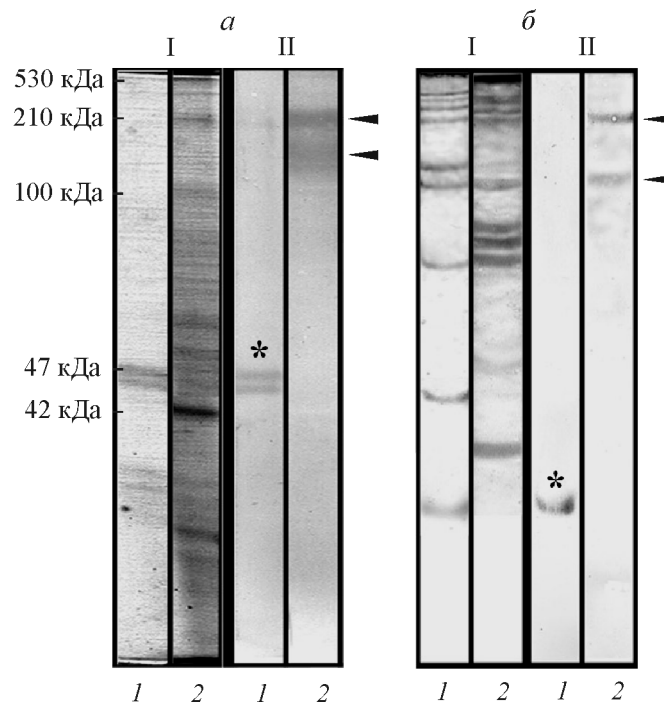


Рис. 4. Электрофореграмма и иммуноблот гомогената гонад самок *Aurelia aurita* с антителами против белка мезоглеина (RA45/47). *a* — SDS-электрофореграмма, окраска геля Coomassie (I) и иммуноблот (II); *б* — AU-электрофореграмма, окраска геля Coomassie (I) и иммуноблот (II). 1 — гомогенат мезоглеина, 2 — гомогенат гонад самок. Цифрами слева указаны молекулярные массы маркерных белков; *стрелками* указаны белки 210 и 180 кДа, *звездочками* — мезоглеин.

показывает, что с антителами против мезоглеина также взаимодействуют белки с мол. массами 180 и 210 кДа. Таким образом, положительно заряженные полипептиды гонад содержат эпитопы, имеющие иммунологическое сходство с мезоглеином.

Обсуждение

В составе блестящей оболочки, окружающей ооцит мыши, выявлены три гликопротеина, содержащих ZP-домен, — ZP1, ZP2 и ZP3 (Wassarman et al., 2001). Эти белки играют существенную роль в процессе оплодотворения. Однако до сих пор у низших многоклеточных животных ZP-доменных белков, связанных с оогенезом, не выявляли. Именно поэтому мы обратили пристальное внимание на процесс оогенеза у сцифомедузы *A. aurita*.

Недавно было описано взаимодействие питающих клеток и ооцита в оогенезе у гидры (Alexandrova et al., 2005). Показано, что ооцит гидры стремительно увеличивает свой объем, достигая 600 мкм в диаметре, за счет передачи ему компонентов цитоплазмы из питающих клеток. При этом на 1 ооцит приходится до 1000 этих клеток. У *A. aurita* ооцит взаимодействует всего лишь с несколькими клетками из зачаткового эпителия на протяжении своего развития. Являются ли эти клетки питающими или выполняют только функцию прикрепления ооцита к эпителию, остается на сегодняшний день неясным.

При оплодотворении у сцифоидных сперматозоид, как и у большинства Cnidaria, контактирует с яйцеклеткой только на одном полюсе. По нашим наблюдениям, процессу оплодотворения у *A. aurita* предшествует уплотнение клеток зачаткового эпителия в месте прикрепления ооцита к эпителию. Рядом с участками прикрепления ооцитов, находящихся на последнем этапе развития, скапливаются сперматозоиды, что согласуется с описаниями Ивановой-Казас (1975). Соответственно способ прикрепления яйцеклетки к эпителию и находящиеся в этом месте структуры могут иметь принципиальное значение для процесса оплодотворения.

Иммунофлуоресцентный анализ, проведенный на парафиновых срезах гонад самок *A. aurita*, показал, что пластинка в зоне контакта ооцита с эпителием содержит антиген(ы), связывающий антитела из сыворотки RA45/47, полученной против мезоглеина. Поскольку в аминокислотной последовательности мезоглеина ZP-домен занимает более половины всей аминокислотной последовательности, весьма вероятно, что поликлональная сыворотка RA45/47 содержит значительную долю антител против именно ZP-домена. Таким образом, очевидно, что взаимодействующий с антителами материал в зоне контакта содержится в своем составе ZP-доменсодержащие белки.

Связывание спермия с оболочкой яйца, называемой вителлиновой оболочкой у морских беспозвоночных, или блестящей оболочкой (*zona pellucida*) у млекопитающих, чрезвычайно важно для успешного оплодотворения. Основные структурные особенности матрикса яйцевой оболочки меняются крайне незначительно в ходе эволюции. Например, несмотря на 400 млн лет, прошедших после разделения предков форели и мыши, и на переход от внешнего оплодотворения и развития к внутреннему, белки этих оболочек яйца у форели и мыши имеют большое структурное сходство как между собой, так и с белками оболочек птиц и амфибий (Litscher, Wassarman, 2007). С другой стороны, показано, что у асцидии *Ciona intesti-*

nalis ZP-доменсодержащие белки, экспрессирующиеся ооцитом, значительно варьируют у отдельных индивидуумов (Kurn et al., 2007). Такая вариабельность не только обеспечивает видоспецифичное оплодотворение, но и помогает избежать самооплодотворения, что актуально для гермафродитных организмов. И ключевую роль в контроле оплодотворения играют ZP-доменные белки. Роль ZP-доменсодержащих белков в формировании оболочки и при оплодотворении у млекопитающих изучена сравнительно хорошо. Они (в частности, ZP3 у мыши) отвечают за прикрепление сперматозоида и инициируют акросомную реакцию (Jungnickel et al., 2003). Обнаруженные нами в составе пластинки белки являются ZP-доменсодержащими, поэтому можно предположить, что они могут играть ключевую роль в момент контакта сперматозоида и ооцита, учитывая их локализацию и особенности оплодотворения у этих животных.

После разделения белковой смеси гонад в условиях SDS-электрофореза по Лэммли и последующего иммуноблота выявлены два белка, взаимодействующих с антителами из сыворотки RA45/47, — 180 и 210 кДа, тогда как сам мезоглеин имеет мол. массу 47 кДа. Очевидно, что клетки гонад синтезируют белки, компоненты которых имеют сходство с антигенными детерминантами мезоглеина. Так же как в случае мезоглеальных и эпидермальных клеток, молекулярные массы полипептидов выше, чем у мезоглеина (Shaposhnikova et al., 2005).

Результаты дифференциального окрашивания парафиновых срезов и гистохимический анализ позволяют заключить, что в составе компонентов пластики в зоне контакта ооцита и эпителия присутствуют гликопротеины, содержащие кислые полисахариды. Однако в целом структура имеет ацидофильную природу, а значит, весьма вероятно, что белковая часть этих гликопротеинов несет положительный заряд. Такое предположение подтверждается результатами иммуноблота после разделения белков в кислой среде. Положительный заряд также говорит о родстве полипептидов с мезоглеином, для которого характерен высокий положительный заряд (Matveev et al., 2007).

Теоретическая кривая титрования, построенная на основании аминокислотной последовательности, имеет изоэлектрическую точку 9.03, что подтверждает экспериментальные данные о положительном заряде мезоглеина. Сильный позитивный заряд нехарактерен для ZP-содержащих белков. Среди известных белков семейства только 12.5 % имеют теоретическую изоэлектрическую точку выше 8. Средняя теоретическая изоэлектрическая точка ZP-содержащих белков составляет 6.3, а средняя изоэлектрическая точка ZP-доменов, по собственным расчетам, — 6.2 (Jovine et al., 2005; Matveev et al., 2007).

Возможны два объяснения того, что белки, определенно родственные мезоглеину и, скорее всего, несущие ZP-домен, обладают более высокой молекулярной массой. Первое из объяснений заключается в уже упоминавшихся посттрансляционных модификациях, которые в высшей степени характерны для экстраклеточных белков. Второе заключается в том, что большинство организмов, для которых известны белки ZP-семейства, имеют несколько генов для белков семейства. Высокомолекулярные белки, локализованные в структуре, прикрепляющей ооцит к зачатковому эпителию, также могут являться другим представителем этого семейства у медуз. Дальнейшая экспериментальная работа позволит сделать выбор между этими альтернативами.

Авторы признательны коллективу Беломорской биологической станции Каргеш Зоологического института РАН за теплый прием и постоянную поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-49578-а, 07-04-10086-к и 08-04-10055-к) и правительства Санкт-Петербурга (проект 2.6/4-05/85).

Список литературы

Догель В. А. 1981. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа. 606 с.

Заварзин А. А. 1945. Очерк эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М.: Медгиз. 20—77.

Иванова-Казас О. М. 1975. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск: Наука. 372 с.

Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 964 с.

Alexandrova O., Schade M., Battger A., David C. N. 2005. Oogenesis in Hydra: Nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. *Develop. Biol.* 281 : 91—101.

Bork P., Sander C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett.* 300 : 237—240.

Bouillon J., Coppo G. 1977. Etude comparative de la mesoglee des cnidaires. *Cahiers Biol. Marine.* 13 : 339—368.

Chapman D. M. 1974. Cnidarian histology. In: *Coelenterate biology. Reviews and new perspectives.* Eds. L. Muskatine, H. Lenhoff. Acad. Press. New York etc. 1—93.

Eckelbarger K. J., Larson R. J. 1988. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semaestomae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan. *Marine Biol.* 100 : 103—115.

Jovine L., Costel C. Darie, Eveline S. Litscher, Wassarman P. M. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 74 : 83—114.

Jungnickel M. K., Sutton K. A., Florman H. M. 2003. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms. *Cell.* 114 : 401—404.

Kurn U., Sommer F., Bosch T. C. G., Khalturin K. 2007. In the urochordate *Ciona intestinalis* zona pellucida domain proteins vary among individuals. *Develop. Comp. Immunol.* 31 : 1242—1254.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 4 : 680—682.

Litscher E. S., Wassarman P. M. 2007. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol. Histopathol. Mar.* 22 : 337—347.

Matveev I. V., Shaposhnikova T. G., Podgornaya O. I. 2007. A novel *Aurelia aurita* protein mesoglein contains DSL and ZP domains. *Gene.* 399 : 20—25.

Panyrm S., Chalkley R. 1969. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Biochemistry.* 8 : 3972—3979.

Podgornaya O. I., Shaposhnikova T. G. 1998. Antibodies with the cell-type specificity to the morula cells from haemolymph of ascidian *Styela rustica*. *Cell Struct. Funct.* 23 : 349—355.

Sarras M. P., jr., Madden M. E., Zhang X., Gunwar S., Huff J. K., Hudson B. G. 1991. Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. I. Isolation and characterization. *Develop. Biol.* 148 : 481—494.

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

Towbin H., Staechelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350—4354.

Wassarman P. M., Jovine L., Litscher E. S. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 3 : E59—E64.

Weber C., Schmid V. 1985. The fibrous system in the extracellular matrix of hydromedusae. *Tissue and Cell.* 17 : 811—822.

Поступила 17 XI 2008

THE PLATE IN THE ZONE OF OOCYTE AND GERMINAL EPITHELIUM CONTACT IN SCYPHOMEDUSA *AURELIA AURITA* BINDS ANTIBODIES TO ZP-DOMAIN-CONTAINING PROTEIN MESOGLEIN

L. S. Adonin,¹ O. I. Podgornaya,² I. V. Matveev,² T. G. Shaposhnikova¹

¹ Department of Cytology and Histology. St. Petersburg State University, and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: matrix.evo@gmail.com; leo.adonin@gmail.com

Cnidaria are lower multicellular animals with the body consisting of two epithelial layers. An extracellular substance — mesoglea — is situated between epidermal and gastrodermal layers of these animals. Mesoglein is one of the major mesogleal proteins of adult medusa of Scyphozoa jellyfish *Aurelia aurita*. Search for the known domains in mesoglein amino acid sequence reveals prominent zona pellucida (ZP) domain (which was found at first in the mammal oocyte zona pellucida proteins), so the protein belongs to ZP family of extracellular matrix proteins and it is an early metazoan member of ZP-domain-containing protein family. However, nothing is known about oogenesis related ZP-domain proteins in the lower multicellular animals. Oogenesis in Scyphozoa is described poorly. In this work morphological features of the zone in contact area between the oocyte and the germinal epithelium were investigated in semi-fine sections. To make it more convenient we identified seven stages according to the oocyte size and the structure found in this area was named the plate. It was shown that the components of the plate bound specifically the antibodies against mesoglein. So it seems the plate material contains ZP-domain proteins. Electrophoresis and immunoblot results give evidence that the proteins immunologically related to mesoglein have a higher molecular mass. It might be due to either the posttranslational modifications of the precursors or that they represent other proteins of ZP-domain family in Cnidaria.

Key words: extracellular matrix, *Aurelia aurita*, ZP-domain proteins, evolution.