

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КОЛОНИИ МШАНОК: АНАЛИЗ НА УРОВНЕ ПРОТЕОМА

© В. А. Кутюмов,^{1,*} А. Л. Мальцева,¹ О. Н. Котенко,¹ А. Н. Островский^{1, 2}

¹Кафедра зоологии беспозвоночных С.-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, 199034,

и ²Департамент палеонтологии, Университет Вены, 1090;

* электронный адрес: mcdanaan@yandex.ru

Модульные организмы состоят из повторяющихся структурных единиц. Мшанки (тип Bryozoa) — типичный пример модульной организации. Рост колоний мшанок осуществляется за счет почкования модулей (зооидов), а разнообразие форм колоний обусловлено различиями в распределении локусов почкования. В большинстве случаев способностью к почкованию обладают лишь зооиды в периферических частях колонии, где находится растущий край или локальные терминальные зоны роста. В тех частях колонии, где почкование отсутствует, также можно выделить зоны, различающиеся по функциональной нагрузке. Для многих видов мшанок характерно закономерное повторение зон с питающимися и непитающимися модулями, связанное с периодической дегенерацией и регенерацией полипида — втяжной кроны щупалец, кишечника и обслуживающей их мускулатуры. Механизмы, регулирующие функциональную дифференцировку зон внутри колонии, не изучены. Предположительно существуют детерминанты, индуцирующие (ингибирующие) почкование зооидов и рециклизацию полипидов в разных зонах колонии. Выявление белковых маркеров, являющихся потенциальными детерминантами функциональной спецификации отдельных зон в колониях Bryozoa, возможно при помощи протеомного метода, который позволяет оценить и сравнить профиль белков, экспрессируемых в конкретных зонах (в клетках, ткани, органе). Сравнение протеомов различных функциональных зон в колониях Bryozoa может позволить выявить белковые маркеры, являющиеся потенциальными детерминантами функциональной спецификации. В нашей работе был проведен анализ трех различающихся по форме колоний видов беломорских мшанок — *Flustrellidra hispida*, *Terminoflustra membranaceotruncata* и *Securiflustra securifrons*. С помощью двухмерного разностного электрофореза 2D-DIGE было проведено сравнение протеомов периферической зоны роста, зоны с полипидами и зоны без полипидов. Был оценен общий уровень различий между зонами, а также выявлены белки, относительное количество которых градиентно изменяется вдоль проксимально-дистальной оси колонии. Эти белки, возможно, вовлечены в детерминацию функциональной зональности колонии.

Ключевые слова: мшанки, Bryozoa, функциональная дифференцировка, модульные организмы, протеомный анализ, 2D-DIGE.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, ХАПС — 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний-]-1-пропансульфонат, АСН — ацетонитрил, ДТТ — дитиотреитол, DIGE — дифференциальный электрофорез, IEF — изоэлектрическое фокусирование, IPG — иммобилизованный градиент рН, SDS — додецилсульфат натрия.

Мшанки (тип Bryozoa) — группа водных эпибионтов-фильтраторов, которые, как и прочие колониальные животные, состоят из однотипных, повторяющихся структурных единиц (модулей), называемых зооидами. Модульную организацию от прочих проявлений сериальности в природе помимо высокого уровня структурной и в ряде случаев физиологической интеграции составляющих ее элементов отличает особый тип морфогенеза, называемый циклическим, или повторяющимся. Именно повторяющийся морфогенез составляет основу модульного роста, классически трактуемого как не доведенное до конца бесполое размножение (почкование). В сущности, этот процесс сводится к циклическому повторению одной и той же последовательности морфогенетических со-

бытий, в результате чего образуются однотипные структурные единицы — модули. Образование нового модуля завершается закладкой зачатка следующего (дочернего) модуля, идентичного предыдущему (родительскому) и т. д. Формируется не только конкретный модуль, но и возникают предпосылки к повторению этого морфогенетического цикла снова и снова (Марфенин, 1999, 2008).

Эволюционная тенденция к разделению функций между модулями за счет возникновения полиморфных зооидов, что особенно характерно для мшанок отряда Cheilostomata, хорошо изучена и подробно описана в литературе (Human, 1959; Клюге, 1962; Беклемишев, 1964; Silen, 1977; Cheetham et al., 2006; Lidgard et al., 2012; Ostrovsky, 2013). Однако существует иной путь дифференци-

ации исходно однородных элементов в колониях Metazoa — специализация группы модулей для выполнения одной функции. Одним из вариантов такой специализации является формирование кормидиев, которые Беклемишев (1964) называл «колониями внутри колонии». Другой вариант — образование «зон роста». У большинства мшанок способность к активному росту и почкованию сохраняется лишь у периферических зооидов почти по всему периметру колонии или локально в терминальных зонах роста. В первом случае иногда используется термин «растущий край» (Ryland, 1970; Lidgard, 1985, 1986). Таким образом, одной из главных отличительных особенностей модульных организмов является дифференциация колониального «тела» на растущие и нерастущие участки.

Следует указать, что образующиеся в начале формирования колонии зооиды характеризуются увеличивающимися линейными размерами (и как следствие — объемом) по мере их отдаления от первого зооида-основателя. Вместе они образуют так называемую зону астогенетического изменения. Затем размер зооидов перестает увеличиваться, и основная часть колонии (зона астогенетического повторения) состоит из приблизительно одинаковых зооидов (Boardman et al., 1983).

Конструкции, состоящие из однотипных повторяющихся элементов, могут давать огромное разнообразие форм и часто характеризуются высокой степенью пластичности в рамках экофенотипической изменчивости. Разнообразие форм хорошо иллюстрируется на примере Bryozoa: колонии мшанок бывают одно- и многорядными, одно- двух- и многослойными, инкрустирующими и вертикальными, неветвящимися и древовидными, цельными и членистыми, колпачковидными, сетчатыми, листовидными и др. Эволюционный успех отряда Cheilostomata рассматривают как результат высочайшей морфологической пластичности и варибельности форм колоний (Hyman, 1959; McKinney, Jackson, 1989; Reed, 1991; Hageman et al., 1998; Hageman, 2003). Такая пластичность объясняется прежде всего потенциальной свободой закладки новых модулей в той или иной части колонии. Регуляция формы модульного организма, таким образом, должна заключаться в том, что одни части колонии растут, тогда как в других частях рост отсутствует. Растущие части одной и той же колонии могут отличаться друг от друга: одни могут расти быстрее, другие медленнее, формируя более или менее толстые или тонкие, короткие или длинные ветви или лопасти, а также демонстрируя те или иные паттерны ветвления (Nikulina, 2002).

Сочетание экофенотипической пластичности формы в рамках онтогенеза одной колонии и разнообразия видоспецифичных паттернов роста модульных организмов вообще и мшанок в частности может быть объяснено в рамках гипотезы о регулятивности процесса функциональной дифференцировки внутри колонии и существовании детерминантов, управляющих этой дифференцировкой. Детерминанты, связанные с организацией модульного строения колоний мшанок на молекулярном уровне, на данный момент совершенно не изучены. В этой работе мы оценили возможность использования и уровень информативности протеомного подхода к изучению молекулярных механизмов морфофункциональной дифференцировки колонии мшанок.

Протеомный подход, основанный на количественном анализе данных 2D-электрофореза, ранее не использовали для изучения дифференцировки колонии мшанок (как

и любых других колониальных животных). Однако он был с успехом применен для анализа изменений, происходящих во время оседания и метаморфоза плавающей личинки хейлостомной мшанки *Bugula neritina*, и в частности, позволил показать ведущую роль фосфорилирования белков в этих процессах (Thiyagarajan et al., 2009; Wong et al., 2010).

Материал и методика

Животные. Мультисериальные колонии трех видов гимнолематных мшанок (класс Gymnolaemata) — *Flustrellidra hispida* (отряд Stenostomata), *Terminoflustra membranaceotruncata* и *Securiflustra securifrons* (оба из отряда Cheilostomata) — были собраны в окрестностях Морской биологической станции С.-Петербургского государственного университета (Белое море, Кандалакшский залив, губа Чупа) с верхней сублиторали (*F. hispida*, корковые колонии, обрастающие талломы фукоидов) и глубины 9—17 м (*T. membranaceotruncata*, прямостоячие колонии, основанием прикрепляющиеся к грунту) или 20—22 м (*S. securifrons*, прямостоячие колонии, основанием прикрепляющиеся к грунту) при помощи легководолазного снаряжения. Сборы проводили в августе—сентябре 2014 г. Мшанок содержали в лабораторных условиях в активно аэрируемых контейнерах с морской водой при 4—12 °С.

Тканевые лизаты. Собранные колонии вручную очищали от обрастателей, разрезали на фрагменты и помещали в охлажденный лизирующий буфер (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4%-ный ХАПС (3-[(3-холаминопил)диметиламмоний-]-1-пропансульфонат), 25 мМ Трис (трисгидроксиметиламинометан), pH 8.5). Отрезанные фрагменты, соответствующие «краевой» (почки и молодые зооиды с еще не сформировавшимся полипидом), «срединной» (питающиеся зооиды с функционирующим полипидом) и «базальной» (непитающиеся зооиды без полипидов) зонам, отсортировывали и анализировали отдельно. В составе одного лизата (соответствующего одной из трех зон) объединяли материал нескольких колоний одного вида, чтобы компенсировать индивидуальную изменчивость протеомов и увеличить представительность образцов (Diz et al., 2009). Ткани колоний замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в вибрационной мельнице Mixer Mill MM 400 (Retsch, Германия). Взвесь осаждали центрифугированием при 10 000 g, 15 мин, 4 °С. Надосадочную жидкость собирали и замораживали до момента использования (–20 °С).

Дифференциальный электрофорез (2D-DIGE). Концентрацию белка в пробах оценивали по методу Брэдфорд с использованием планшетного спектрофотометра Epoch 2 (BioTek Instruments, США). Три зональных образца каждого из видов конъюгировали в течение 30 мин (на льду, в темноте) с флуоресцентными метками (Cy2, Cy3 или Cy5, Luminoprobe, BioDye, Россия) в соотношении 400 пмоль флуорофора на 50 мкг общего белка. Реакцию останавливали добавлением 10 мкмоль лизина в буфере 25 мМ Трис (pH 8.5) и последующей инкубацией в течение 10 мин (на льду, в темноте). Далее пробы, конъюгированные с разными Cy-метками, объединяли, добавляли дитиотреитол до концентрации 100 мМ и биолиты (BioRad, США) до концентрации 0.4 %. Пробу загружали в IPG (иммобилизованный градиент pH)-стрип (pH 3—10) 7 см (BioRad, США) пассивно

при регидратации стрипа 16—18 ч при комнатной температуре. Изоэлектрическое фокусирование (IEF) проводили в ячейке IEF Cell (BioRad, США), следуя рекомендациям фирмы-производителя: общее количество вольт-часов 10 000 Вч, максимальное напряжение 4000 В, максимальный ток 50 мА на 1 стрип, 20 °С.

По завершении фокусирования производили смену буферной системы для разделения второго направления: стрипы последовательно инкубировали по 15 мин в двух эквilibрирующих буферных растворах — 6 М мочевины, 0.375 М Трис (pH 8.8), 2%-ный додецилсульфат натрия (SDS), 20%-ный глицерин, 2%-ный дитиотреитол (DTT), 6 М мочевины, 0.375 М Трис (pH 8.8), 2%-ный SDS, 20%-ный глицерин и 2.5%-ный йодацетамид.

Разделение второго направления проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением ДДС по Лэммли (в двухслойном геле: концентрирующий — 4 %, разделяющий — 15 %) в камере TetraCell (BioRad, США). Визуализацию проводили с использованием лазерного сканера Typhoon FLA9500 (GE Healthcare, США). Для образцов *F. hispida* и *T. membranaceotruncata* эксперимент повторяли 3 раза, для *S. securifrons* — 2. Количественный и качественный анализ электрофореграмм проводили с использованием программного обеспечения PDQuest Advanced 8.0.1 (BioRad, США).

Статистическая обработка данных. Значения интенсивностей белковых пятен, измеренные при помощи BioRad PDQuest, были переведены в логарифмическую форму. В ряде случаев белковые сигналы присутствовали в результатах одного эксперимента, но отсутствовали в других. Недостающие значения были сгенерированы при помощи алгоритма импутации данных k-nearest-neighborhood на языке статистического программирования R (R Core Team, 2015). Логарифмы интенсивности от результатов трех экспериментов (двух в случае *S. securifrons*) усредняли и рассчитывали коэффициент изменения обилия с использованием Microsoft Excel.

Трипсинизация белков. Гели окрашивали спиртовым раствором кумасси бриллиантового голубого G250 (BioRad, США). Пятна вырезали из геля, измельчали скальпелем, после чего вымывали SDS и краситель, инкубируя образцы трижды по 15 мин в 200 мкл забуференного раствора 50%-ного ацетонитрила (ACN), 25 мМ Трис, pH 8.2. Кусочки геля дегидратировали 100%-ным ACN и подсушивали в вакуумном концентраторе (Centri-Vap, Labconco, США). Регидратацию геля проводили в растворе трипсина 20 нг/мкл (Sigma-Aldrich, США) на льду в течение 45 мин. Затем удаляли излишки трипсина, добавляли 50 мкл 25 мМ Трис (pH 8.2) и инкубировали при 37 °С 16—18 ч.

Триптические пептиды экстрагировали из геля 50%-ным ACN, подкисленным 0.1%-ной муравьиной кислотой, высушивали в вакууме и перерастворяли в 5%-ном ACN на 0.1%-ной муравьиной кислоте (фаза А для последующей жидкостной хроматографии).

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрический анализ проводили на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent QTOF UHD 5832 (Agilent Technologies, США), конъюгированном с жидкостным хроматографом Agilent 1260 (Agilent Technologies, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax C18 (Agilent Technologies, США; 150 мм, внутренний диаметр 0.5 мм, зерно 3 мкм, поры 80 Å) в градиенте ацетонитрила в присутствии 0.1%-ной муравьиной кисло-

ты (5 % В до 60 % В за 25 мин и далее до 100 % В за 5 мин, где В — это 90%-ный ACN, 0.1%-ная муравьиная кислота; А — 5%-ный ACN, 0.1%-ная муравьиная кислота) при потоке 20 мкл/мин. Анализ элюируемых с колонки аналитов проводили при постоянной подаче референс-масс; частота определения 3 спектра/с; режим автоматического МС/МС-анализа, 3 спектра/с, материнские ионы 2⁺, 3⁺, n⁺.

Масс-спектрометрические данные анализировали в программе Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev B. 04.00.127 (Agilent Technologies, США) в режиме «Identity» с использованием баз данных SwissProt и «454 sequencing of *Bugula neritina* metamorphosis transcriptome fragment library» (Wang et al., 2010).

Используемые реактивы: мочевины, Трис и SDS (Helicon, Россия); Cy2, Cy3 и Cy5 (BioDye, Россия); биолиты и кумасси бриллиантовый голубой (BioRad, США); трипсин, ацетонитрил и йодацетамид (Sigma-Aldrich, США); тиомочевина, лизин и муравьиная кислота (Sigma-Aldrich, Германия); DL-дитиотреитол (Sigma-Aldrich, Канада); ХАПС (AppliChem, Германия); глицерин (Вектон, Россия).

Результаты и обсуждение

Разграничение функциональных зон в колониях. В колониях изученных видов мшанок были выделены описанные ранее в литературе (Stach, 1938; Dyrund, 1981) три зоны, сменяющие друг друга вдоль дистальнопроксимальной оси. Согласно принятой терминологии, эти зоны были условно названы следующим образом: 1) «краевая зона», «растущий край» колонии (зона формирования почек зооидов и полипидов в молодых зооидах); 2) «средняя зона» (зона активно питающихся зооидов с функционирующими полипидами); 3) «базальная зона» (зона зооидов с дегенерировавшими полипидами).

Поскольку для старых колоний *T. membranaceotruncata* и *S. securifrons* характерно чередование нескольких последовательных участков, состоящих из зон питающихся и непитающихся зооидов, для получения лизата в этом случае мы использовали лишь материал из зон самой дистальной пары, примыкающей к почкующемуся краю.

Протеомный анализ сравниваемых функциональных зон. Анализ данных 2D-DIGE при помощи программного обеспечения BioRad PDQuest позволил воссоздать общую протеомную карту для каждого вида (рис. 1) и вычислить значения интенсивностей белковых сигналов. Всего для *F. hispida* удалось выявить 99 белковых сигналов, для *T. membranaceotruncata* — 194 и для *S. securifrons* — 192.

Средние значения логарифмов интенсивностей белковых сигналов от разных зон сравнивали попарно. В том случае, если разность логарифмов превышала 2 (т. е. количество белка в одной зоне превышало таковую в любой другой более чем в 3 раза), пятно считали зоноспецифичным. Если пятно отсутствовало в какой-то одной зоне (в результатах всех измерений), но присутствовало в другой, его также считали зоноспецифичным. В результате было выделено семь категорий белковых сигналов.

1. Неспецифичные: присутствующие во всех трех зонах, интенсивность ни в одной из них не превышает интенсивность в другой более чем в 3 раза.

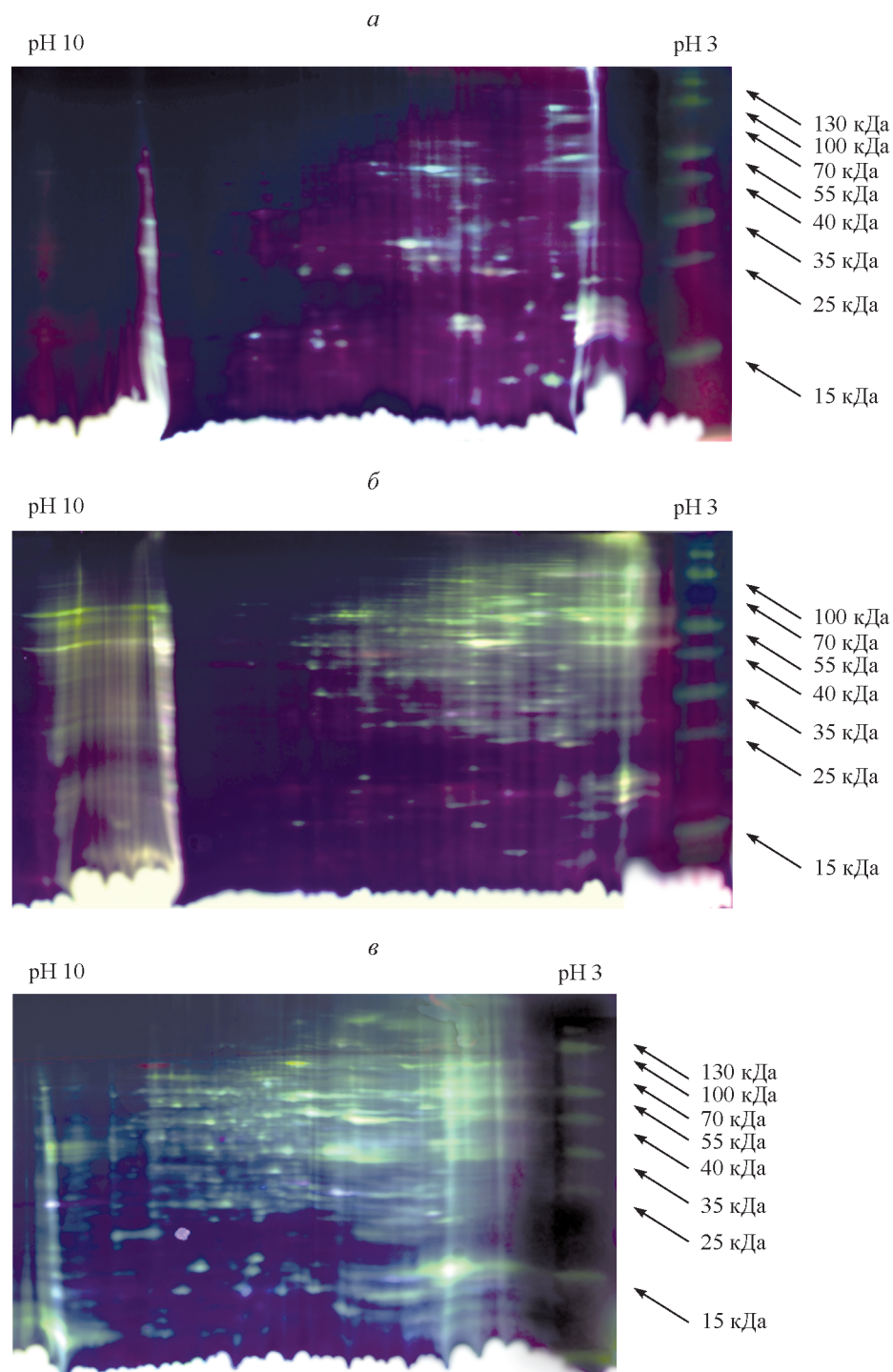


Рис. 1. 2D-электрофореграммы изученных видов.

а — *Flustrellidra hispida*, б — *Terminoflustra membranaceotruncata*, в — *Securiflustra securifrons*.

2. Специфичные для краевой (почкующейся) зоны: интенсивность в краевой зоне превышает интенсивность в средней и базальной зонах более чем в 3 раза (частный случай — полное отсутствие белкового сигнала в средней и базальной зонах).

3. Специфичные для краевой и средней зон: интенсивность сигнала в краевой и средней зонах превышает таковую в базальной более чем в 3 раза, при этом различия между краевой и средней зонами не превышают порогового значения.

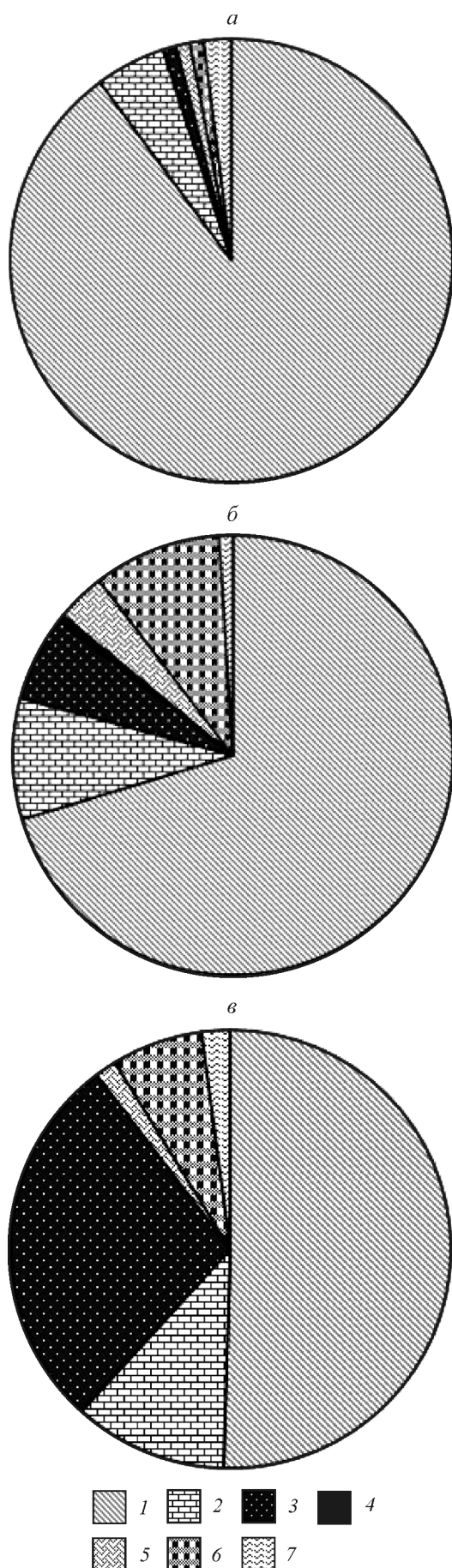
4. Специфичные для средней зоны (зоны функционирующих полипидов): аналогично пункту 2.

5. Специфичные для средней и базальной зон: аналогично пункту 3.

6. Специфичные для базальной зоны (зоны дегенерирующих полипидов): аналогично пункту 2.

7. Специфичные для базальной и краевой зон: аналогично пункту 3.

Доля специфичных пятен различается у всех трех видов (рис. 2). Наибольшая доля специфичных пятен выяв-



лена у *T. membranaceotruncata* — 49.5 %. Почти на 20 % доля специфичных пятен меньше у *S. securifrons* — 29.7 %. У *F. hispida* доля специфичных пятен наименьшая — 10.1 % от числа проанализированных белковых сигналов. Наименьшее количество зоноспецифичных белков, выявленных у *F. hispida*, подразумевает менее строгую дифференциацию колонии на молекулярном уровне, что в целом коррелирует с довольно слабой выраженностью функциональных зон в колониях этого вида. Слабая подразделенность на зоны в свою очередь может быть связана с тем, что данный вид характеризуется корковыми колониями, обрастающими талломы бурой водоросли *Ascophyllum nodosum*, тогда как вертикальные колонии двух прочих изучаемых видов (*Terminoflustra* и *Securiflustra*) приподнимаются над субстратом. Пряморастущие (вертикальные) колонии существуют в более неравномерных условиях окружающей среды, чем колонии, обрастающие водоросли, что создает предпосылки для функциональной дифференцировки частей их колоний (McKinney, Jackson, 1989).

Специфичных для средней зоны белковых сигналов не было выявлено, за одним исключением (1 белок у *S. securifrons*). У *T. membranaceotruncata* и *S. securifrons* наибольшее количество зоноспецифичных пятен приурочено к базальной и краевой/среднекраевой зонам; у *F. hispida* — к краевой зоне (рис. 3). Таким образом, подавляющее количество зоноспецифичных белков в колониях всех изученных видов приурочено к дистальным и проксимальным зонам колонии. Область преимущественной экспрессии белков, характерных для ростовой или базальной зон, может распространяться на среднюю зону, но при этом белков, специфичных строго для средней зоны, обнаружено не было (за исключением 1 белка у *S. securifrons*). Можно заключить, что специфика функциональных зон колонии внутри зоны астогенетического повторения определяется двумя противоположными градиентами: проксимально-дистальным (представленным белками, специфичными для проксимальной зоны с дегенерировавшими полилидами) и дистально-проксимальным (представленным белками, специфичными для почкующейся зоны); в средней зоне указанные градиенты перекрываются.

Дистально-проксимальный градиент по направлению и локализации совпадает с описанным в литературе онтогенетическим градиентом (Ryland, 1976; Lidgard, Jackson, 1989), который представлен в виде закономерной смены фенотипических черт строения зооидов по мере удаления от края колонии (от ювенильных зооидов к зрелым). Возможно, большое количество специфичных белков, приуроченных к краевой зоне, связано с индукцией почкования и тех морфологических перестроек, которые претерпевает зооид в ходе своего онтогенеза. Хотя противоположный ему проксимально-дистальный градиент и совпадает по направлению с астогенетическим градиентом, последний приурочен к зоне астогенетического изменения в центре или основании колонии (тогда как наше

Рис. 2. Процентное соотношение различных категорий зоноспецифичных белков (от общего количества проанализированных) у *Flustrellidra hispida* (а), *Securiflustra securifrons* (б) и *Terminoflustra membranaceotruncata* (в).

1 — неспецифичные белки, 2 — белки краевой зоны, 3 — общие белки средней и краевой зон, 4 — белки средней зоны, 5 — белки средне-базальной зоны, 6 — белки базальной зоны, 7 — белки базально-краевой зоны.



Рис. 3. Распределение зонспецифичных белков по категориям у *Flustrellidra hispida* (а), *Terminoflustra membranaceotruncata* (б) и *Securiflustra securifrons* (в).

Подписаны краевая, средняя и базальная зоны, где отображены соответствующие им белки. Общие белки для средней и краевой, средней и базальной и краевой и базальной зон, а также группа неспецифичных белков отображены в соответствующих областях перекрытия.

исследование ограничивалось зоной астогенетического повторения на ее периферии; см. выше) и связан с процессами, которые во «взрослых» участках колонии завершены.

Можно предположить, что два обнаруженных нами противонаправленных градиента белковых факторов связаны с осуществлением важнейших процессов в онтогенезе зооида — формированием новых полипидов в молодых зооидах краевой зоны и их дегенерацией в базальной зоне. У мшанок, образующих несколько зон функционирующих полипидов, перемежающихся с зонами их дегенерации, проксимальнее последней зоны располагается узкая «промежуточная» полоска зооидов с регенерирующими полипидами. Сравнивая дифференциальные белковые факторы, характерные для зоны почкования и зоны регенерации полипидов, мы сможем подтвердить или опровергнуть эту гипотезу. Если гипотеза о связи выявленных градиентов с рециклизацией полипидов верна, то различия между этими двумя зонами (формирования полипидов на краю колонии и их регенерации в промежуточных зонах) будут минимальны.

На данный момент вопрос о том, с каким морфологическим процессом связана концентрация зонспецифичных белков в краевой (или краевой и средней зонах вместе) — онтогенетическим градиентом и закладкой новых почек или инициацией формирования и дегенерации полипидов (или с обоими процессами сразу), — остается открытым.

Идентификация белков. 102 белковых пятна (51 для *S. securifrons*, 29 для *F. hispida* и 22 для *T. membranaceotruncata*) были вырезаны из гелей и подвергнуты трипсинизации и последующему МС-анализу. В результате поиска в базах данных SwissProt и «454 sequencing of *Bugula neritina* metamorphosis transcriptome fragment library» (Wang et al., 2010) ни один белок достоверно идентифицировать не удалось. Неудача при идентификации конкретных белков не позволяет говорить об их возможных функциях в процессах онтогенеза, что указывает на ограниченную информативность протеомного подхода к поставленной проблеме до реализации транскриптомных или геномных проектов на изучаемых видах.

Авторы выражают признательность специалистам и директору ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета (СПбГУ), предоставившим оборудование для двухмерного электрофореза и масс-

спектрометрии, С. В. Багрову (СПбГУ) за помощь при сборе материала на Морской биологической станции СПбГУ и М. А. Варфоломеевой (СПбГУ) за помощь при статистической обработке данных, а также Г. Е. Гениховичу (Университет Вены) за ценные консультации при обсуждении данных, а также всему коллективу кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ за всестороннюю помощь и поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке СПбГУ (проекты 1.38.233.2015 и 1.42.1493.2015).

Список литературы

- Беклемисhev В. Н. 1964. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Т. 1. Проморфология. М.: Наука. 432 с. (*Beklemishev V. N. 1964. Basics of comparative anatomy of invertebrates. Vol. 1. Promorphology. M.: Nauka. 432 p.*)
- Клюге Г. А. 1962. Мшанки северных морей СССР. Определители по фауне СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 76. 584 с. (*Kluge G. A. 1962. Bryozoans of the north seas of USSR. Identification keys of the fauna of USSR. M.; L.: USSR Academy of Sciences, 76. 584 p.*)
- Марфенин Н. Н. 1999. Концепция модульной организации в развитии. Журн. общ. биол. 60(1): 6—17. (*Marfenin N. N. 1999. The concept of modular organization in development. Zh. Obsch. Biol. 60 (1): 6—17.*)
- Марфенин Н. Н. 2008. Фундаментальные закономерности модульной организации в биологии. Вестн. Твер. ун-та. Сер. «Биология и экология». 9: 147—161. (*Marfenin N. N. 2008. Fundamental patterns of modular organization in biology. Vestn. Tver Univ. Ser. «Biology and Ecology». 9: 147—161.*)
- Boardman R. S., Cheetham A. H., Blake D. B., Utgaard J., Karklins O. L., Cook P. L., Sandberg P. A., Lutaud G., Wood T. S. 1983. Bryozoa (Part G, revised). In: Treatise on invertebrate paleontology. Vol. 1. Geological Society of America, Lawrence, University of Kansas, Boulder. 1—625.
- Cheetham A. H., Sanner J., Taylor P. D., Ostrovsky A. N. 2006. Morphological differentiation of avicularia and the proliferation of species in mid-Cretaceous *Wilbertopora* Cheetham, 1954 (Bryozoa: Cheilostomata). J. Paleontol. 80: 49—71.
- Diz A. P., Trubano M., Skibinski D. O. 2009. The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. Electrophoresis. 30: 2967—2975.
- Dyrinda P. E. 1981. A preliminary study of patterns of polypide generation-degeneration in marine cheilostome Bryozoa. In: Recent and fossil Bryozoa. Fredensborg: Olsen and Olsen. 73—81.
- Hageman S. J. 2003. Complexity generated by iteration of hierarchical modules in Bryozoa. Integr. Comp. Biol. 43: 87—98.

- Hageman S. J., Bock P. E., Bone Y., McGowran B. 1998. Bryozoan growth habits: classification and analysis. *J. Paleontol.* 72 : 418—436.
- Hyman L. H. 1959. The invertebrates: smaller coelomate groups. Chaetognatha, Hemichordata, Pogonophora, Phoronida, Ectoprocta, Brachiopoda, Sipunculida, the coelomate Bilateria. Vol. V. New York: McGraw-Hill. 783 p.
- Lidgard S. 1985. Budding process and geometry in encrusting cheilostome bryozoans. In: *Bryozoa: Ordovician to recent*. Fredensborg: Olsen and Olsen. 175—182.
- Lidgard S. 1986. Ontogeny in animal colonies: a persistent trend in the bryozoan fossil record. *Science*. 232 : 230—232.
- Lidgard S., Carter M. C., Dick M. H., Gordon D. P., Ostrovsky A. N. 2012. Division of labor and recurrent evolution of polymorphisms in a group of colonial animals. *Evol. Ecol.* 26 : 233—257.
- Lidgard S., Jackson J. B. 1989. Growth in encrusting cheilostome bryozoans: I. Evolutionary trends. *Paleobiology*. 15 : 255—282.
- McKinney F. K., Jackson J. B. 1989. *Bryozoan evolution*. Boston: Unwin Hyman. 238 p.
- Nikulina E. A. 2002. The evolution of colony morphogenesis in bryozoans of the order Cheilostomata. *Paleontol. J.* 36 : 353—428.
- Ostrovsky A. N. 2013. Evolution of sexual reproduction in marine invertebrates: example of gymnolaemate bryozoans. *Dordrecht; Heidelberg; New York; London: Springer*. 356 p.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Reed C. G. 1991. Bryozoa. In: *Reproduction of marine invertebrates*. Vol. 6. Echinoderms and lophophorates. Boxwood Press, Pacific Grove. 85—245.
- Ryland J. S. 1970. *Bryozoans*. London: Hutchinson University Library. 175 p.
- Ryland J. S. 1976. Physiology and ecology of marine bryozoans. *Adv. Mar. Biol.* 14 : 285—443.
- Silén L. 1977. Polymorphism. In: *Biology of Bryozoans*. New York: Acad. Press. 184—232.
- Stach L. W. 1938. Observations on *Carbasea indivisa* Busk (Bryozoa). *Proc. Zool. Soc. London*. 108 : 389—399.
- Thiyagarajan V., Wong T., Qian P. Y. 2009. 2D gel-based proteome and phosphoproteome analysis during larval metamorphosis in two major marine biofouling invertebrates. *J. Proteome Res.* 8 : 2708—2719.
- Wang H., Zhang H., Wong Y. H., Voolstra C., Ravasi T., Bajić V., Qian P. Y. 2010. Rapid transcriptome and proteome profiling of a non-model marine invertebrate, *Bugula neritina*. *Proteomics*. 10 : 2971—2981.
- Wong Y. H., Arellano S. M., Zhang H., Ravasi T., Qian P. Y. 2010. Research dependency on de novo protein synthesis and proteomic changes during metamorphosis of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Proteome Sci.* 8 : 1—14.

Поступила 18 IX 2015

FUNCTIONAL DIFFERENTIATION IN BRYOZOAN COLONY: A PROTEOMIC ANALYSIS

V. A. Kutymov,^{1,*} A. L. Maltseva,¹ O. N. Kotenko,¹ A. N. Ostrovsky^{1,2}

¹ St. Petersburg State University, Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg, 199034, and ² University of Vienna, Department of Palaeontology, 1090;

¹ e-mail: mcdanaan@yandex.ru

Bryozoans are typical modular organisms. They consist of repetitive structural units, the zooids. Bryozoan colonies grow by zooidal budding, with the distribution pattern of the budding loci underlying the diversity of colony forms. Budding is usually restricted to the zooids at the periphery of the colony, which form a «growing edge» or local terminal growth zones. Non-budding parts of the colony can be functionally subdivided, too. In many species colonies consists of regular, often repetitive zones of feeding and non-feeding modules, associated with a periodical degeneration and regeneration of the polypide, retractile tentacle crown with a gut and the accompanying musculature. So, there is functional differentiation in bryozoan colonies but its mechanisms are unknown. Presumably, budding and/or polypide recycling in different colony parts are induced or inhibited by certain determinants of functional specialization. An effective tool of their identification is the comparison of proteomes of functionally different zones. Here we report the results of proteomic analysis of three bryozoan species from the White Sea, which have a different colony form: *Flustrellidra hispida*, *Terminoflustra membranaceotruncata* and *Securiflustra securifrons*. Using differential two-dimensional electrophoresis (2D-DIGE), we compared proteomes of the growing edge and the zones consisting of feeding and non-feeding zooids in these species. We estimated the overall proteome variability, revealed proteins whose relative abundance gradually changed along the proximal-distal colony axis and suggested that they might be involved in the functional differentiation of the colony.

Key words: Bryozoa, functional differentiation, modular organisms, proteomic analysis, 2D-DIGE.