



УДК 577.112.088.3

СЕМЕЙСТВО ГЕНОВ МУЛЬТИДОМЕННЫХ СВОБОДНЫХ ЛЕКТИНОВ ПЛАНАРИИ: СТРУКТУРА, ЭКСПРЕССИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ДЛЯ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА РЕГЕНЕРАЦИЕЙ

© 2004 г. Е. А. Богданова, Е. В. Барсова, Н. И. Пунькова, О. В. Британова, Д. А. Шагин, Н. Г. Гурская, Н. Ю. Усман, С. А. Лукьянов[#]

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 24.09.2003 г. Принята к печати 17.03.2004 г.

Описано семейство генов бесполой расы планарии *Girardia tigrina*, кодирующих белки с уникальной доменной организацией, относящиеся к суперсемейству лектинов С-типа. Выявленные гены дифференциально экспрессируются в теле планарии. Белковые продукты, по крайней мере двух из этих генов (*scarf2* и *gtlec1*), выводятся во внешнюю среду по длинным отросткам специализированных железистых клеток. Сопоставление результатов электронной микроскопии и иммуногистохимии с литературными данными позволяет отнести указанные клетки к группе желез адгезии. Наблюдение за регенерацией отростков этих желез у нормальных и искусственно созданных двухголовых планарий показало, что дорсовентральный контакт на краю головного отдела тела планарии направляет и поддерживает рост отростков *gtLec1*-продуцирующих клеток в ходе регенерации.

Ключевые слова: планария, лектины С-типа, отростки железистых клеток, регенерация.

ВВЕДЕНИЕ

Суперсемейство лектинов С-типа животных объединяет обширную группу белков, содержащих один или более гомологичных доменов, называемых лектиноподобными доменами С-типа (ЛПДС) [1]. Многие ЛПДС осуществляют кальцийзависимое связывание углеводных остатков, но для ряда ЛПДС были продемонстрированы и другие функции. Лектины С-типа, как правило, помимо ЛПДС, имеют и другие функциональные домены, определяющие широкий спектр биологических процессов, в которые вовлечены белки этого суперсемейства [1–3].

В настоящее время на основании анализа аминокислотных последовательностей, особенностей доменной организации белков и экзон-интронной организации генов, кодирующих ЛПДС, внутри суперсемейства лектинов С-типа выделяют несколько семейств: асиалогликопротеиновые рецепторы, селектины, маннозсвязывающие рецепторы макрофагов, протеоглики межклеточного матрикса, коллектины, тетранектины и свободные лектины [1–4]. Последние представляют

собой секретируемые (имеют лидерный пептид) белки, состоящие из одного ЛПДС, и не содержат других функциональных доменов [1, 3].

Недавно при анализе геномов нематоды *Caenorhabditis elegans* и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* были предсказаны гены, кодирующие белки, имеющие в своем составе два ЛПДС и не содержащие иных функциональных доменов [1, 5]. Однако свободных лектинов с большим числом ЛПДС до сих пор обнаружено не было.

Ранее у планарии *Girardia tigrina* мы выявили группу генов, гомологичных генам лектинов С-типа [6, 7]. В дальнейшем для большинства из них были определены полные кодирующие последовательности. Анализ предсказанных соответствующих им аминокислотных последовательностей показал, что эти гены кодируют белки, принадлежащие к новому семейству лектинов С-типа с уникальной доменной организацией [8].

Цель настоящей работы – описание структурной организации идентифицированного нами семейства генов и анализ их экспрессии у интактных, регенерирующих и искусственно созданных двухголовых планарий.

Сокращения: ЛПДС – лектиноподобные домены С-типа; MDFL-белки – мультидоменные свободные лектиноподобные (MDFL, MultiDomain Free Lectin-like) белки.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-70-56; эл. почта: luk@ibch.ru).

Гены лектиноподобных белков планарии

| Гены | Номер в GenBank | Количество ЛПДС-кодирующих последовательностей | Полноразмерность | Группа генов |
|----------------|--------------------|--|------------------|-----------------------------|
| <i>scarf1</i> | AY057980 | 1 | + | <i>scarf</i> -подобные гены |
| <i>scarf2</i> | AY057974; AY057975 | 2 | + | |
| <i>scarf3a</i> | AY057976 | 3 | + | |
| <i>scarf3b</i> | AY057977 | 3 | + | |
| <i>gtlec1</i> | AY057969 | >13 | - | <i>gtlec1</i> |
| <i>gtlec2a</i> | AY057970 | 5 | + | <i>gtlec2</i> |
| <i>gtlec2b</i> | AY057971 | 5 | + | |
| <i>gtlec2c</i> | AY057972 | 5 | + | |

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура семейства генов лектиноподобных белков планарии

В ходе поиска генов, дифференциально экспрессирующихся вдоль передне-задней оси тела планарии и в ходе регенерации, мы идентифицировали восемь генов, гомологичных генам лектинов С-типа, у бесполой расы планарии *G. tigrina* (таблица) [6, 7]. Для семи из них были получены кДНК, содержащие полную кодирующую последовательность, и для одного (*gtlec1*) – кДНК, содержащая протяженную открытую рамку считывания. Получение полноразмерной кДНК оказалось затруднено, так как 5'-конец кДНК этого гена содержит более семи прямых повторов.

Основываясь на сходстве структуры кДНК, мы разделили выявленные нами гены на три группы: *scarf*-подобные гены, *gtlec1* и *gtlec2* (таблица).

Анализ аминокислотных последовательностей. Анализ доменной организации белков, предсказанных на основе последовательностей кДНК выявленных генов, показал, что все они содержат лидерный пептид и различное число ЛПДС, разделенных короткими внедоменными последовательностями (рис. 1а). Других функциональных доменов, кроме ЛПДС, в структуре предсказанных белков найдено не было. На основании такой структурной организации, мы назвали эти белки мультидоменными свободными лектиноподобными (MDFL, от MultiDomain Free Lectin-like) белками и соответствующие гены планарии – MDFL-генами.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей ЛПДС планарии с известными ЛПДС лектинов животных показал, что в большинстве случаев у планарии наблюдается сохранение консервативных аминокислотных остатков, характерных для углеводсвязывающих доменов С-типа животных, в частности, сохранены позиции высококонсервативных цистеинов и аро-

матических аминокислот (рис. 2). При построении филогенетического дерева с использованием последовательностей аминокислот ЛПДС различных белков было показано, что ЛПДС MDFL-белков образуют отдельную ветвь внутри суперсемейства лектинов С-типа (рис. 3).

Кроме того, сравнение аминокислотных последовательностей позволило осуществить анализ предполагаемых участков связывания ионов кальция и углеводов в ЛПДС MDFL-белков. Большинство известных лектинов С-типа содержит консервативный участок 2, ответственный за координированное связывание ионов кальция и углевода, а некоторые – также дополнительный кальцийсвязывающий участок 1, аналогичный описанному для маннозосвязывающего белка МВР-А [9, 10]. На рис. 2 отмечены позиции аминокислотных остатков, образующих эти участки связывания кальция в МВР-А. Наличие в ЛПДС пяти аминокислотных остатков, формирующих участок 2, является важным критерием для предсказания способности домена связывать углеводы, аналогично МВР-А [10, 11].

Анализ ЛПДС белков MDFL показал, что ряд доменов (*gtLec2a-A*, *gtLec2c-A*, *gtLec2b-B*, *gtLec2a-C*, *gtLec2b-C* и *gtLec2c-C*) имеет участок 2, идентичный описанному для маннозосвязывающих белков (рис. 2). Поэтому можно предположить, что, по крайней мере, эти ЛПДС могут координированно связывать кальций и маннозу. Структура участка 2 у всех ЛПДС белка *gtLec1*, за исключением С-концевого домена *gtLec1-G*, идентична структуре участка 2, описанной для ряда ЛПДС *S. elegans* [5], но отличается от структуры аналогичного участка 2 известных маннозо- и галактозосвязывающих ЛПДС. Тем не менее было высказано предположение, что такой участок способен связывать ионы кальция [5].

Домены *gtLec2a-D*, *gtLec2b-D* и *gtLec2c-D* содержат остаток триптофана в положении, соответствующем остатку Asn205 белка МВР-А.

Подобная замена в участке 2 была описана для ряда белков семейства тетранектина, способных связывать кальций и углеводы [12, 13]. Остальные ЛПДС содержат ряд замен в участке 2, которые могут в той или иной степени изменять способность к кальцийзависимому связыванию углеводов.

Таким образом, анализ ЛПДС белков MDFL показывает, что некоторые из них, вероятно, способны координированно связывать углеводы и кальций аналогично белку MBR-A. Кроме того, некоторые, как например ЛПДС белков Scarf (за исключением домена Scarf3a-B), содержат участок связывания кальция, идентичный участку 1 белка MBR-C [11]. ЛПДС *gtLec2*-белков (за исключением С-концевых доменов E) содержат участок 1, идентичный участку 1 тетранектина, способного связывать ионы кальция [12].

Анализ интрон-экзонной организации MDFL-генов. Для ряда генов (*scarf1*, *scarf2*, *gtlec2a*, *gtlec2b*, *gtlec2c*) была определена интрон-экзонная структура (рис. 1б). Мы показали, что в этих генах последовательности, кодирующие ЛПДС, содержат по два интрона в одинаковых позициях (рис. 1б и 2), при этом граница первого интрона, разрывающего ЛПДС, проходит между кодонами, а второй интрон разрывает кодирующий триплет между вторым и третьим нуклеотидом. Лидерный пептид и спейсерные последовательности также содержат по одному интрону. Мы клонировали геномные последовательности, кодирующие три ЛПДС гена *gtlec1*, и обнаружили, что и в этом случае ЛПДС-кодирующие последовательности разбиваются интронами в тех же позициях, что и у других MDFL-генов.

Для ряда генов животных, кодирующих лектины С-типа, известна экзон-интронная структура. Во всех описанных случаях ЛПДС-кодирующая область отделена от остальной последовательности интроном. У протеогликанов и асиалогликопротеиновых рецепторов ЛПДС-кодирующая последовательность разделяется двумя, а у свободных лектинов – тремя интронами. Гены лектинов С-типа других семейств не содержат интронов в области, кодирующей ЛПДС [14]. Внутри одного семейства позиции интронов консервативны, но отличаются у представителей разных семейств лектинов С-типа.

У MDFL-генов каждый участок, кодирующий ЛПДС, также отделен интроном от остальной части молекулы. Позиции интронов, разделяющих ЛПДС в MDFL-генах, полностью совпадают с позициями интронов в генах асиалогликопротеиновых рецепторов [14].

MDFL-белки образуют отдельное семейство внутри суперсемейства лектинов С-типа

Все MDFL-белки имеют сходную доменную организацию, содержат лидерный пептид и различное количество ЛПДС. Подобную “белковую архитектуру” имеют свободные лектины и двухдоменные лектины *C. elegans* и плодовой мушки. Однако, в отличие от этих групп лектинов, для большинства MDFL-белков (*Scarf3a,b*, *gtLec2a-c*, *gtLec1*) характерно наличие более двух ЛПДС. Кроме того, последовательности генов, кодирующие ЛПДС MDFL-белков, имеют иную, нежели гены свободных лектинов, интрон-экзонную организацию. Таким образом, на основании анализа доменной организации MDFL-белков, интрон-экзонной организации MDFL-генов и данных филогенетического анализа мы выделили MDFL-белки в отдельное семейство внутри суперсемейства лектинов С-типа.

Анализ экспрессии MDFL-генов

Анализ распределения мРНК MDFL-генов в теле планарии был проведен с помощью *in situ*-гибридизации тотальных препаратов планарии и с помощью ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-ПЦР). Для гибридации *in situ* использовали три антисмысловых РНК-зонда: один был специфичен для *scarf*-подобных генов, второй – для генов группы *gtlec2* и третий – для гена *gtlec1*. Для определения локализации экспрессии конкретных генов использовали ОТ-ПЦР. Планарий разрезали на шесть примерно равных частей, из которых выделяли тотальную РНК, синтезировали первую цепь кДНК и анализировали уровень экспрессии тестируемых генов в каждом из полученных образцов. Полученные данные суммированы на рис. 4. На основании данных гибридации *in situ* (рис. 4а) и ОТ-ПЦР (рис. 4б) мы заключили, что: 1) гены *gtlec1* и *gtlec2a* имеют сходную картину экспрессии в виде полосы в первой трети предглоточной области; 2) клетки, экспрессирующие *scarf*-подобные гены, расположены в двух шарообразных сгущениях в первой трети предглоточной области и в идущих от этой зоны в каудальном направлении клеточных тяжах. Различий в картине экспрессии разных *scarf*-подобных генов выявлено не было; 3) *gtlec2b*-экспрессирующие клетки образуют кольцо по краю тела планарии, а также диффузно распределены по всему телу, исключая голову; 4) ген *gtlec2c* экспрессируется в той же зоне, что и гены *gtlec2a* и *gtlec1*, а также в треугольном выступе, направленном в голову.

Анализ распределения MDFL-белков

При анализе распределения MDFL-белков в теле планарии мы использовали Fab-фрагменты поликлональных антител к рекомбинантным

```

110      120      130      140      150      160      170
MBP-A  KFTVTNHERMPEISKKALCSSELRGTVAIIPRAEENKAEQEVAKT----SAFLGITTEVTVGCFMY
MBP-C  KYFMSSVRRMPLNRKALCSSELQGTVAIPRAEENRQONVAKD----VAFLGITTEVTVGCFMY
CD23   KCNYFEGEGSKQIQKFTCSOLEGLRIVSIHSQKEQDELMQHINK---KESVWIGLQLNMGGEFVW
RHL-1  SCWFSSSVKPELEADKYQOLENAHIVVVTSWEEQRELVQOHMGP---LNTWGLTQNGP--KKW
AGC1   HCFRHFDPRETVDAERRCREQQSHLSSIIVTPEEQEYVNNNAQD---YQWIGLNRRTIIGDTRW
CSPG3  HCFRYFAHRRAMEDAEKDCRRRSGHLTSVHSPEEHSFNSFGHE---NTWIGLNRIVIRDEQW
E-Sel  WSNNTSTEAMTIDEASAYCQORYTHLVAIQNKKEIEKINSILSYSPS--YWIIGIRVYNNV--VWV
P-Sel  WTTHYSTKAYSNIIRKYCQNRVTDLVAIQNKNEIDLNKVLPPYSS--YWIIGIRVNNKT--RQW
Scarfl  QYIHLNKNKMMNDVVKYCNKSKEIRLVKITDSQTNAVFEELASKNGMGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf2-A  QYIHLNKNKMMNDVVKYCNKSKEIRLVKITDSQTNAVFEELASKNGMGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf3a-A  QYIHLNKNKMMNDVVKYCNKSKEIRLVKITDSQTNAVFEELASKNGMGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf3b-A  QYIHLNKNKMMNDVVKYCNKSKEIRLVKITDSQTNAVFEELASKNGMGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf3a-B  ENHHTNKNKMTNDVVKYCNDRNMDLVKIPNSEVNNVYNLALKHNLGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf3b-B  ENHHTNKNKMTNDVVKYCNDRNMDLVKIPNSEVNNVYNLALKHNLGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf2-B  ENHHTNKNKMTNDVVKYCNDRNMDLVKIPNSEVNNVYNLALKHNLGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf3b-C  ENHHTNKNKMTNDVVKYCNDRNMDLVKIPNSEVNNVYNLALKHNLGTYWMNGNDIAIIGTQVD
Scarf3a-C  ENHHTNKNKMTNDVVKYCNDRNMDLVKIPNSEVNNVYNLALKHNLGTYWMNGNDIAIIGTQVD
gtLec1-A  EGMHMGNTKMTSDDAVKYCKDKQMDLVRIPNNSVNMIVFNLAAKNNLGRYVINGNDRKRGTVYV
gtLec1-B  EGMHMGNTKMTSDDAVKYCKDKQMDLVRIPNNSVNMIVFNLAAKNNLGRYVINGNDRKRGTVYV
gtLec1-C  RNRVRSNAKTTDDAVKYCKDKQMDLVRITNADNNEVYNLAVKYGIGRYVINGNDRKRGTVYV
gtLec1-E  RNRVRSNAKTTDDAVKYCKDKQMDLVRITNADNNEVYNLAVKYGIGRYVINGNDRKRGTVYV
gtLec1-D  RNRVRSNAKTTDDAVKYCKDKQMDLVRITNADNNEVYNLAVKYGIGRYVINGNDRKRGTVYV
gtLec1-F  INMQNNNAKMTSDDAVKYCKDKQMDLVRISNAEINTVEFKLSEKYGKGYVINGNDRKRGTVYV
gtLec1-G  TSHLNTNAKMTSDDAVKYCKDKQMDLVRIPNEEVNNAVFKKAAKYNLETVINGNDRKRGTVYV
gtLec2c-A  NTFVTKVLVTVNEAIQSCCKARGMVLVRVTSAEDNTVINGYANKVLADTYVLDGNDHTNIGTQVD
gtLec2a-A  NTFVTKVTVTVNEAIQSCCKARGMVLVRVTSAEDNTVINGYANKVLADTYVLDGNDHTNIGTQVD
gtLec2b-A  NTFVTKVLVTVNEAIQSCCKARGMVLVRITSAEDNTVINGYANKVLADKYVLDGNDHTNIGTQVD
gtLec2b-D  DNMISTERYTNEALQYQRTRGTLVRIKNEASKCELAFAFAKKIVADYYVLDGNDHTNIGTQVD
gtLec2c-D  DNMISTERYTNEALQYQRTRGTLVRIKNEASKCELAFAFAKKIVADYYVLDGNDHTNIGTQVD
gtLec2a-D  NSEDMISTERYTNEALQYQRTRGSLVRVKSAAKCELAAYTKKIVADYYVLDGNDHTNIGTQVD
gtLec2b-B  SGIIVSRGKMTSDAQEYCSNRGMKMKVIGHALDNNAVHSFARETSOYYVIDANLVTVGKQVD
gtLec2c-B  SGIIVSRGKMTSDAQEYCSNRGMKMKVIGHALDNNAVHSFARETSOYYVIDANLVTVGKQVD
gtLec2a-B  SGIIVSRGKMTSDAQEYCSNRGMKMKVIGHALDNNAVHSFARETSOYYVIDANLVTVGKQVD
gtLec2c-C  NTFIASHERLTYEADQDYCKGLGLKMAKANSAAEENGHGFTRRVYLDLYLDGNDJAKVGGKQVD
gtLec2a-C  NTFIASHERLTYEADQDYCKGLGLKMAKANSAAEENGHGFSRRYLDLYLDGNDJAKVGGKQVD
gtLec2b-C  NTFIASHERLTYEADQDYCKGLGLKMAKANSAAEENGHGFTRRVFLDLYLDGNDJAKVGGKQVD
gtLec2b-E  LDHHTYTKMTSDGMAKYCKSIGLKMIRIKDQPTDREINGGSLKHKLSTYVLDGNDNDQDRQVD
gtLec2c-E  LDHHTYTKMTSDGMAKYCKSIGLKMIRIKDQPTDREINGGSLKHKVCSYVLDGNDNDQDRQVD
gtLec2a-E  VDFHSRTKLTSDAVKYCNMGLNIIHKODNENSEFLGSAKKNLNGTHVLDGNDNAEAGKQVW

```

```

180      190      200      210      220
MBP-A  VTGGR-LT--SNWKKDLEHHGSG---GSDCVI---VDNLEHNDISQAS-HTVWCEFP
MBP-C  LTGNR-VR--VTNNEGEPNNVGS---GSDCVI---LTNKKNDVPCSDS-FLVWCEFS
CD23   PDGSP-VG--SNWNPFGFPNNG-GQ---GSDCVI---RGSEQWDAFCRSYLDWVCEQL
RHL-1  VDGTD-VTGEKKNRPGFPDQWYGHGLGGGSDCHHE---TDEHNDHNDVCRRP-TRWVCEFE
AGC1   SDGHP-VQ--FENWRPNPDDHFFAA---GSDCVI---HEKEEMNDVFCNYH-LPFTCKKG
CSPG3  DDMTG-LQ--FENWRENPDHFFAG---GSDCVI---HESEWRNDVFCNYH-LPFTCKKG
E-Sel  VGTQKELTEEEKKNWAPGFPNRRQK---DEDCVYIYKREKDYGMNDEPCSKK-KLALCYTA
P-Sel  VGTQKALTNENENWADNFPNKRK---NEDCVYIYKSPAPKRNDEHCLKK-KHALCYTA
Scarfl  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYNA
Scarf2-A  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYV
Scarf3a-A  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYV
Scarf3b-A  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYV
Scarf3a-B  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYV
Scarf3b-B  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYV
Scarf2-B  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYNA
Scarf3b-C  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYNA
Scarf3a-C  TENKP-LV--YKNWYKGFNNWGG---DQNCVYAY---HPNEMVEDICGNTL-NSVTCYNA
gtLec1-A  TNNRE-LT--YKNWQAGFPNNWGG---SQCILGAY---FPHFVDDDFNODTK-NAVTCYV
gtLec1-B  TNNRE-LT--YKNWQAGFPNNWGG---SQCILGVY---FPHFVDDDFNODTK-NAVTCYV
gtLec1-C  TNNKE-LT--YKNWQSGFPNNSGG---SQCILGAY---YPHFVDDDFNODTK-NRVTCYV
gtLec1-E  TNNKE-LT--YKNWQSGFPNNSGG---SQCILGAY---YPHFVDDDFNODTK-NRVTCYV
gtLec1-D  TNNKE-LT--YKNWQSGFPNNSGG---SQCILGAY---YPHFVDDDFNODTK-NAVTCYV
gtLec1-F  TNNKE-LP--YKNWQKGFNNWGG---VQHCVGGY---YSDFFVDDDFNODTK-NSVTCESR
gtLec1-G  TDNNV-LT--YKNWSTGDPNNSGG---NKHCVQGSN---NLWYVFAASQNGL-NSVVCVRL
gtLec2c-A  ARGNQ-LP--YKNEAPHPFPNGK---NENCNGY---RVNRMNLDLNCVAR-LWATCQRD
gtLec2a-A  ARGNQ-LP--YKNEAPHPFPNGK---NENCNGY---RVNRMNLDLNCVAR-LWATCQRD
gtLec2b-A  ARGNQ-LP--YKNEAPHPFPNGK---NENCNGY---RVNRMNLDLNCVAR-LWATCQRD
gtLec2b-D  ANGRL-LT--YKNWANNFPNGR---NENCNGY---NLEAWNLIICCTNK-YFAVCSRN
gtLec2c-D  ANGRL-LT--YKNWANNFPNGR---NENCNGY---NLEAWNLIICCTNK-YFAVCSRN
gtLec2a-D  ANGQV-LT--YKNWANNFPNGR---NENCNGY---NLEAWNLIICCTNK-YFAVCSRN
gtLec2b-B  PDGKE-LV--YKNEHFGFPNGR---NENCNGY---LTIIDLVNDFCYSYQ-LWATCYRE
gtLec2c-B  ADGKE-LV--YKNEHFGFPNGR---NENCNGY---LTVDDLVNDFCYSYQ-LWATCYRE
gtLec2a-B  ADGKE-LV--YKNEHFGFPNGR---NENCNGY---LTVDDLVNDFCYSYQ-LWATCYRE
gtLec2c-C  SDDVE-LK--YKGFYPGFPNGR---NENCNGY---LLHDLVLDLRCYKRLFALCYKD
gtLec2b-C  SDDVE-LK--YKGFYPGFPNGR---NENCNGY---LLHDLVLDLRCYKRLFALCYKD
gtLec2b-E  ADKTE-LS--YKNEFSGFPNGR---EKNCNTN---KTCQWAECCCTRL-NRVVVCYGN
gtLec2c-E  ADKTE-LS--YKNEFSGFPNGR---EKNCNTN---KTCQWAECCCTRL-NRVVVCYGN
gtLec2a-E  RKNGE-LS--YKNEFSGFPNGR---ERSQVSL---PSYVHTSKMDSL-NSVTCYGS

```


белкам Scarf2 и gtLec1 для иммуноокрашивания срезов и тотальных препаратов. Белковые продукты генов *scarf2* и *gtlec1* были выявлены в длинных клеточных отростках, идущих от зоны детекции мРНК к краю тела планарии (рис. 5а). Дополнительное окрашивание эозинем срезов тела планарии, окрашенных антителами к белкам Scarf2 или gtLec1, показало, что эти белки ассоциированы с содержащимися в клеточных отростках кислыми гранулами (данные не приведены).

Более подробное исследование структуры клеточных отростков, окрашенных антителами к белку Scarf2, с помощью электронной микроскопии ультратонких срезов показало, что они имеют развитый скелет, состоящий из микротрубочек, и заполнены электронно-плотными гранулами, в которых и локализуется белок (рис. 5б, отмечено стрелками). Отростки открываются в край тела планарии на границе вентрального и дорсального эпителия и окружены характерными клетками, имеющими микроворсинки (данные не приведены).

Кроме того, с помощью окрашивания антителами было показано, что белки gtLec1 и Scarf2 присутствуют и в слизевом секрете, окружающем тело червя (рис. 5в).

Таким образом, мы показали, что белки gtLec1 и Scarf2 продуцируются специализированными железистыми клетками и выделяются во внешнюю среду по длинным клеточным отросткам.

MDFL-продуцирующие клетки планарии принадлежат к группе клейких желез адгезии

Согласно литературным данным, у турбеллярий имеется развитая система железистых клеток, принимающих участие в образовании слизи [15, 16]. Такие клетки располагаются на базальной мембране среди эпидермальных клеток, под базальной мембраной (клетки находятся под мышечным слоем, а поверхности тела достигают их отростки), или находятся глубоко в паренхиме, достигая поверхности тела червя с помощью длинных отростков, так называемых шеек. Шейки содержат развитую систему микротрубочек и предназначены для транспортировки секреторных гранул во внешнюю среду [16].

У турбеллярий описано несколько типов железистых клеток [15, 16]. Клетки, производящие

слизь, защищающую тело червя от внешних факторов, открываются по всей поверхности тела. Это так называемые рабдоиды и эпителиосомы. Они содержат сферические секреторные глобулы с хлопьевидным содержимым и дают интенсивную ацидофильную окраску при стандартном гистологическом окрашивании.

Клетки, секрет которых принимает участие в локомоторной функции и обеспечивает скольжение червя по субстрату, в основном сосредоточены на вентральной стороне тела. Эти клетки описаны в литературе как “цианофильные” железы. Предполагается, что основу их секрета составляют сложные углеводные комплексы.

Многие турбеллярии используют слизь для прикрепления к субстрату. У турбеллярий группы Rhabditophora описаны железы адгезии с ацидофильным содержимым, так называемые “дуо-железы” (duo-glands) [17, 18]. Различают “дуо-железы” двух типов: “клейкие железы” (viscid glands), которые содержат яйцевидные электронно-плотные секреторные гранулы с липким веществом неизвестной природы; и “высвобождающие железы” (releasing glands), продуцирующие более мелкие гранулы с менее плотным содержимым. Секрет высвобождающих желез выделяется через модифицированные эпидермальные клетки, называемые “якорными”. Выходные отверстия шеек клейких желез окружены особыми “воротничковыми” клетками, имеющими микроворсинки.

Многочисленные неохарактеризованные железистые клетки располагаются в хвостовом отделе тела червя. Предполагается, что некоторые из них также принимают участие в прикреплении животных к субстрату [15, 16].

Мы показали, что два MDFL-гена (*scarf2* и *gtlec1*) экспрессируются в специализированных железистых клетках, тела которых расположены в паренхиме, а белковые продукты этих генов выделяются во внешнюю среду в составе ацидофильных электронно-плотных гранул по длинным клеточным отросткам. Отростки железистых клеток имеют развитую систему микротрубочек и выходные отверстия, окруженные характерными воротничковыми клетками. Белки Scarf2 и gtLec1 были обнаружены также в составе слизевого секрета планарии (рис. 5).

Рис. 2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей ЛПДС планарии и лектинов животных. MBP-A – маннозосвязывающий белок А крысы (номер в GenBank, P19999); MBP-C – маннозосвязывающий белок С крысы (P08661); CD23 крысы (S34198); RHL-1 – гепатолектин 1 крысы (NP_036635); AGC1 – агрекан человека (NP_037359); CSPG3 – нейрокан человека (NP_004377); E-Sel – селектин Е человека (NP_000441); P-Sel – селектин Р человека (CAA18142). ЛПДС обозначены латинскими буквами начиная с N-концевого. Нумерация аминокислотных остатков соответствует последовательности MBP-A. Разрывы, внесенные для выравнивания последовательностей, обозначены прочерками. Аминокислотные остатки, характерные для ЛПДС, отмечены черным (полностью консервативные) или серым цветом (консервативны не менее чем в 70% случаев). Остатки, образующие первый и второй участки связывания Ca²⁺ у MBP-A, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно. Стрелками отмечены позиции интронов MDFL-генов.

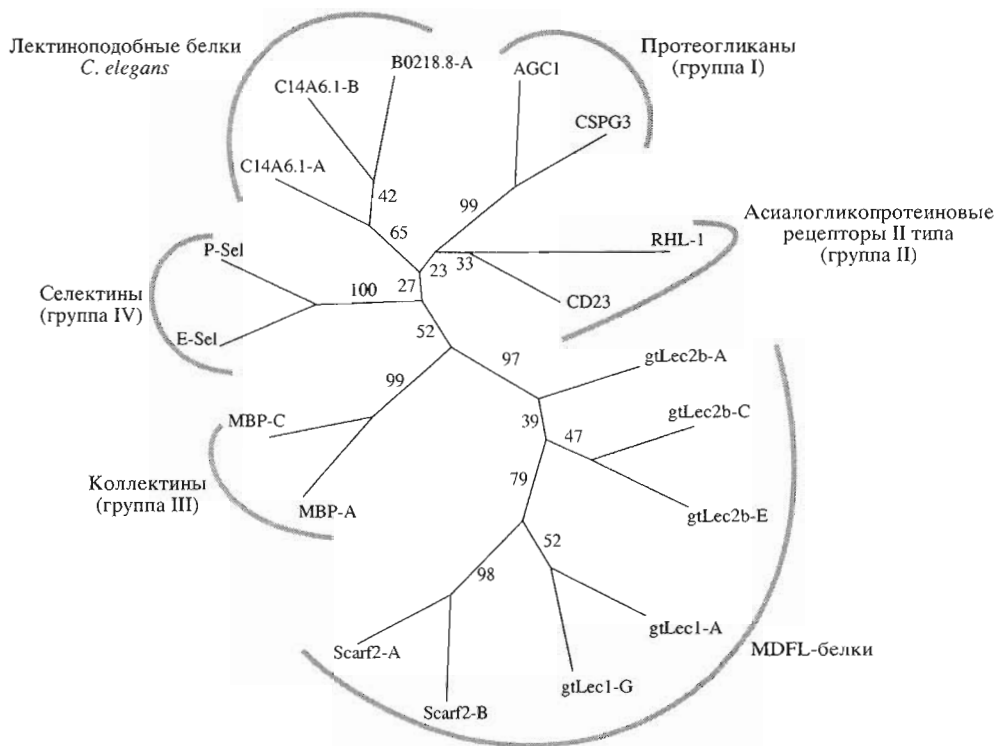


Рис. 3. Некорневое филогенетическое древо, построенное с использованием последовательностей аминокислот ЛПДС MDL-генов и лектинов С-типа животных, указанных на рис. 2, а также первого и второго ЛПДС белка C14A6.1 (номер в GenBank CAV03881) и первого ЛПДС белка B0218.8 (AAB00670) *C. elegans*. Цифрами отмечено значение бутстрэп-индекса.

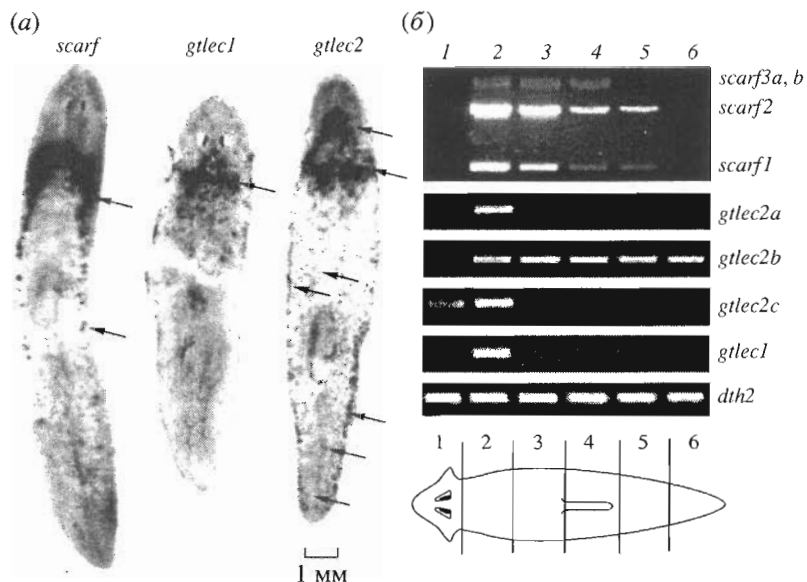


Рис. 4. Анализ распределения мРНК MDL-генов в теле планарии. *а* – гибридизация *in situ* тотальных препаратов планарии с антисмысловыми РНК-зондами к *scarf*-подобным генам, *gtlec2*-генам и гену *gtlec1* (сигналы обозначены стрелками). *б* – анализ распределения транскриптов MDL-генов и гена *dth2* (контроль) вдоль передне-задней оси тела планарии с помощью ОТ-ПЦР. Гель-электрофорез в 1.5% агарозном геле; номера дорожек соответствуют зонам, показанным на схеме.

Таким образом, сравнение полученных нами результатов с литературными данными указывает на значительное сходство Scarf2- и gtLec1-продуцирующих клеток с клейкими железами адгезии.

Анализ регенерации отростков gtLec1-продуцирующих желез

Анализ распределения белка gtLec1 в регенерирующих планариях позволил осуществить

наблюдение за регенерацией отростков *gtLec1*-продуцирующих желез. Планарий перерезали поперечно непосредственно за глазами так, чтобы в изолированном головном фрагменте оставались только отростки железистых клеток, содержащие белок *gtLec1*, а в хвостовом – *gtLec1*-продуцирующие клетки с перерезанными отростками. Планарий фиксировали через 1, 3, 5, 7, 8 и 12 сут после начала регенерации. Иммуногистохимическое окрашивание регенерантов антителами к белку *gtLec1* показало, что в изолированном головном фрагменте, в котором отсутствуют клеточные тела железистых клеток, отростки с белком *gtLec1* сохраняются без заметных изменений вплоть до 12-ти сут. В то же время в регенерирующем хвостовом фрагменте наблюдалось полное исчезновение *gtLec1*-специфического сигнала после 4 сут регенерации. В регенерантах хвостового отдела в период 5–8 сут окрашивание *gtLec1*-специфическими антителами не давало сигнала, а через 12 сут наблюдалось восстановление характерной для интактных планарий картины распределения *gtLec1*. Таким образом, восстановление отростков *gtLec1*-продуцирующих клеток происходило после восстановления головного отдела и головного края тела планарии (данные не приведены).

Мы предположили, что голова и, особенно, головной край тела могут принимать участие в регуляции регенерации *gtLec1*-продуцирующих железистых клеток, в частности, стимулировать рост отростков этих клеток. Для проверки этого предположения был осуществлен анализ распределения *gtLec1* у искусственно созданных двухголовых планарий, получаемых путем трансплантации собственной головы животного в предглоточную область, как показано на схеме (рис. 6). После трансплантации планарий оставляли регенерировать в течение 30 сут. За это время происходило как полное восстановление удаленного головного отдела, так и приживание эктопической головы. В результате были получены животные двух типов. У первых (рис. 6а, 1) эктопическая голова имела нормальный край тела с нормальным контактом дорсального и вентрального эпителия. Эктопические головы животных второго типа (рис. 6а, 2) были полностью дорсализованы, т.е. не имели вентрального эпителия. Полученных животных фиксировали и использовали для приготовления срезов и иммуногистохимической обработки *gtLec1*-специфическими антителами. Анализ показал, что эктопические головы планарий с нормальным краем тела содержат *gtLec1*-содержащие отростки, тогда как в дорсализованных головах белок *gtLec1* не был обнаружен (рис. 6). При этом в обоих типах планарий в восстановленных головах (с нормальным краем тела) были выявлены *gtLec1*-содержащие отростки.

Литературные данные указывают на важность контакта дорсального и вентрального эпителия

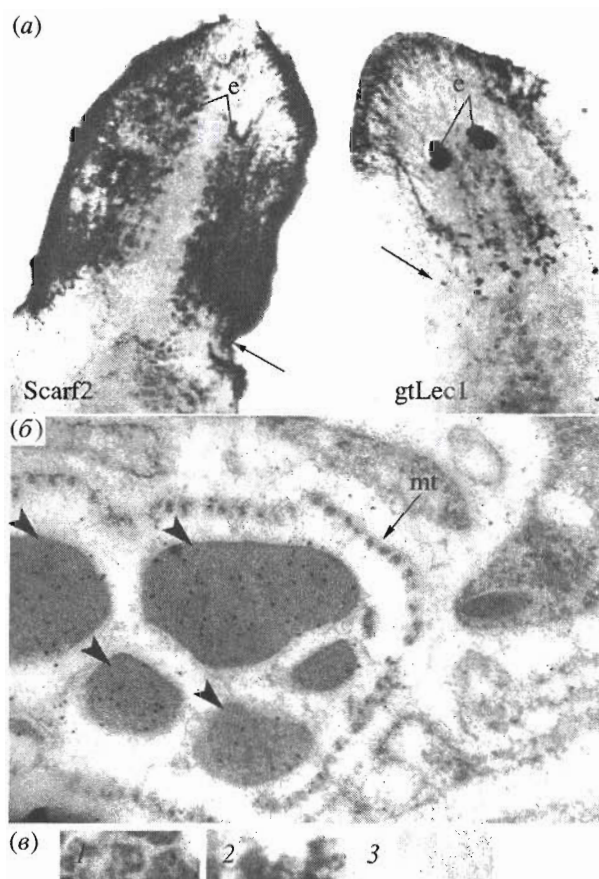


Рис. 5. Распределение белков Scarf2 и *gtLec1* в теле планарии. *a* – иммуноокрашивание тотальных препаратов планарии с помощью Fab-фрагментов поликлональных антител к белкам Scarf2 и *gtLec1*. Контрольное окрашивание Fab-фрагментами иммуноглобулинов кролика сигнала не давало. *e* – глаза; стрелками обозначены области, в которых детектировали мРНК соответствующих генов. *b* – результат электронной микроскопии ультратонких срезов планарии, окрашенных антителами к белку Scarf2. *mt* – микротрубочки; стрелками отмечены гранулы, содержащие белок Scarf2. *в* – окрашивание слизевого секрета планарии с помощью поликлональных антител к белку Scarf2 (1), к белку *gtLec1* (2) и сывороткой неиммунизированного кролика – контроль (3).

для регенерации планарий [19–21]. В частности, показано, что у животных с искусственно созданными дополнительными зонами контакта дорсального и вентрального эпителия наблюдается разрастание ткани в области эктопического контакта [22, 23]. Исследования с помощью молекулярных маркеров показали, что пересаженные в инвертированной дорсовентральной полярности фрагменты тела планарий сохраняют исходную полярность [21]. При этом в зоне контакта дорсального и вентрального эпителия устанавливается эктопическая дорсовентральная ось и образуется дополнительный край тела. Дорсовентральные взаимодействия в новообразованном краю тела

стимулируют рост прилегающих к нему тканей, в которых последовательно развиваются структуры, свойственные все более отдаленным от пересаженного фрагмента частям тела планарии. Эти данные позволяют предположить, что зона дорсовентрального контакта участвует в инициации регенерации и, возможно, в установлении новой передне-задней оси [21].

Наши данные указывают на то, что дорсовентральный контакт на краю головного фрагмента тела планарии направляет и поддерживает рост отростков *gtLec1*-продуцирующих клеток. Удаление головы и зоны контакта дорсального и вентрального эпителия приводило к исчезновению системы отростков. Наличие же головного края тела препятствовало исчезновению отростков железистых клеток даже в отсутствие клеточных тел. Создание дополнительного головного края тела индуцировало рост отростков *gtLec1*-продуцирующих клеток в направлении этого края. При этом в эктопических головах, где такой край отсутствовал, роста отростков не наблюдалось.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу проводили на лабораторной бесполой расе пресноводных планарий *G. tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). Для опытов использовали голодных особей после недельного голодания примерно одного размера (7–13 мм). Содержали планарий при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в отстоянной водопроводной воде. Операции производили микрохирургическим скальпелем под бинокулярным микроскопом.

Олигонуклеотидные праймеры. В работе использовали следующие олигонуклеотидные праймеры (5' → 3'):

scarfP1: CTGTGGGTTAATTTCCAACT;
 scarfP2: CATTTAATCACATTCGTCCTC;
 scarfP3: GACCCAAGSTCAATATTAT;
 gtlec1P1: ACAGTGTTTATCCCGCCATTATT;
 gtlec1P2: CCAAGTTCATCTACGGCACG;
 gtlec1P3: TCATATTCTTCATTAGAATCGTC;
 gtlec1P4: TCATTATTGTCATTATCAGTATC;
 gtlec1P5: GTCATTTTCGTATTACCCATGT;
 gtlec1P6: TATCACAATTAATAATCATCCAG;
 gtlec1P7: GACACTGGAACAGCTTCAGGA;
 gtlec1P8: GGTAATACGAAAATGACTTCCA;
 gtlec1P9: TTATCGTGTGAGCAATGCGAA;
 gtlec1P10: GAAAGGTGAACSTAACAACG;
 gtlec2aP1: ATTCATTTTCAGACTGAAGAAC;
 gtlec2aP2: TTCTTTCTCGACCTCCACTTG;
 gtlec2aP3: TGTATTGGGATCGGGGCCAT;
 gtlec2acP1: TGACGATTGTTGGTAACTGT;
 gtlec2abP1: GGTGGGATATAGCTTGCACA;

gtlec2bcP1: ACTTCAATATCCGTTTGAGA;
 gtlec2bP1: ACATCCAAAGCAGTATCATC;
 gtlec2bP2: CAATCGAAATACCAACGCAGA;
 gtlec2bP3: TGGCGATTGTTGGTAACTGT;
 gtlec2cP1: TACATCCAATGAACTGTAC;
 gtlec2cP2: ATTTACTCGATATACCATTAG;
 gtlec2cP3: TTGATAATTTGATGATATCAACC;
 gtlec2cP4: GTATAATGTACATCCAATGAACT;
 dth2P1: TTGGTTCCAAATCGGCTTCC;
 dth2P2: CCAGAACGTGAGCATTTGGC.

Суммарную РНК выделяли гуанидин-тиоцианатным методом [24]. Для синтеза первой цепи кДНК и амплификации кДНК использовали набор реактивов SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, США).

Выделение полноразмерных кДНК MDFL-генов. Выделение фрагментов кДНК генов *scarf1* и *scarf3a,b* осуществляли с помощью ПЦР-амплификации со *scarf2*-специфическими праймерами scarfP1 и scarfP2. Выделение полноразмерных кДНК осуществляли с помощью набора реактивов SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, США) методом быстрой амплификации концов кДНК, описанным ранее [25]. Для амплификации использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: gtlec1P1–gtlec1P5 (амплификация кДНК гена *gtlec1*); gtlec2aP1–gtlec2aP3 (кДНК *gtlec2a*); gtlec2bcP1, gtlec2bP1 и gtlec2bP2 (кДНК *gtlec2b*); gtlec2bcP1, gtlec2cP1 и gtlec2cP2 (кДНК *gtlec2c*); scarfP2 и scarfP3 (кДНК *scarf*-подобных генов).

Клонирование MDFL-генов. Геномную ДНК выделяли, как описано в работе [26], и использовали для ПЦР-амплификации с праймерами, специфичными к 5'- и 3'-концевым последовательностям кДНК MDFL-генов. 5'-Области генов изолировали методом "прогулки по хромосоме" [27] с использованием набора реактивов Universal GenomeWalker Kit (Clontech, США) и специфических олигонуклеотидных праймеров: gtlec2acP1 и gtlec2aP4 (для гена *gtlec2a*); gtlec2bcP1 и gtlec2bP3 (для гена *gtlec2b*); gtlec2acP1 и gtlec2bcP1 (для гена *gtlec2c*); scarfP2 и scarfP3 (для *scarf*-подобных генов). Для амплификации последовательностей гена *gtlec1*, кодирующих три ЛПДС, осуществляли ПЦР с парами праймеров: gtlec1P6 и gtlec1P7; gtlec1P6 и gtlec1P8; gtlec1P6 и gtlec1P9. Клонирование выявленных последовательностей ДНК осуществляли с помощью стандартных протоколов [28].

Для анализа последовательностей применяли пакет программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); для предсказания доменной организации белков – пакет программ SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) и SignalP V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>). Для выравнивания аминокислотных последовательностей использовали программу Clustal W (версия 1.8). Филогенетический

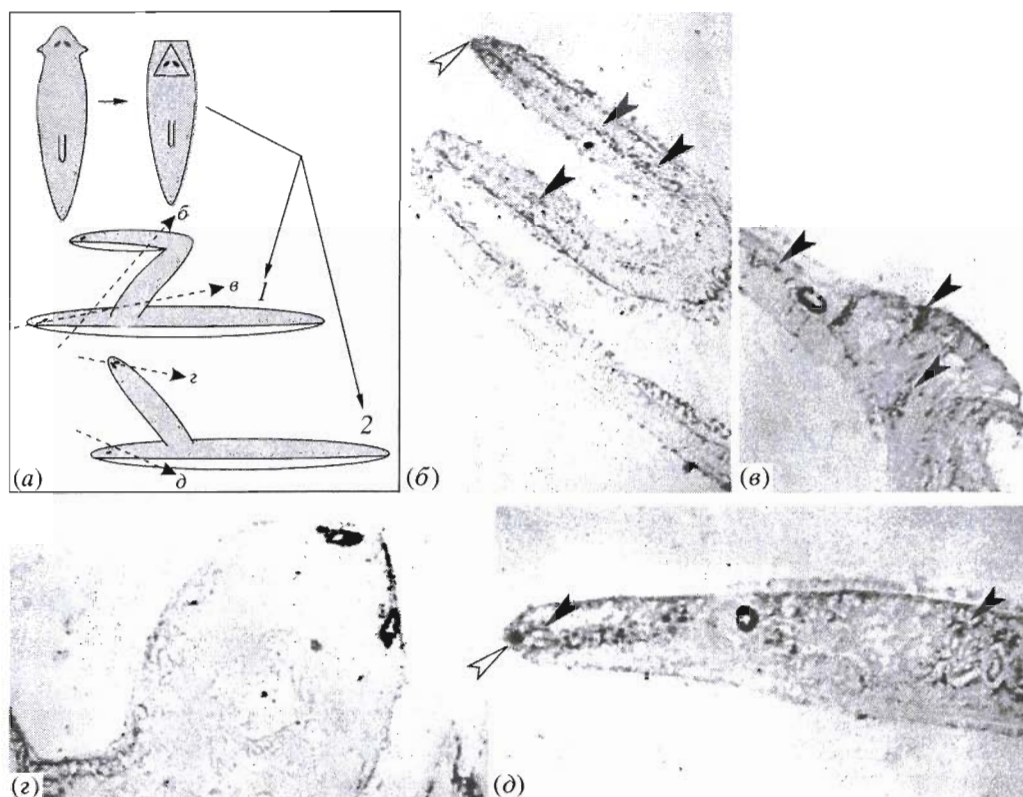


Рис. 6. Распределение белка *gtLec1* в искусственно созданных двухголовых планариях. *a* – схема операции для получения двухголовых планарий, имеющих (1) и не имеющих (2) эктопический дорсовентральный край. *b–d* – результат иммуноокрашивания антителами к белку *gtLec1* срезов эктопических (*b, c*) и восстановленных “нормальных” голов (*c, d*) планарий. Плоскости соответствующих срезов показаны пунктирными стрелками на схеме (*a*). Черными стрелками отмечены зоны, содержащие белок *gtLec1*; светлыми стрелками – эктопический дорсовентральный контакт.

анализ выровненных последовательностей проводили с помощью пакета программ PHYLIP (Phylogeny Inference Package, версия 3.57c) методом объединения ближайших соседей (neighbor-joining method). Статистическую достоверность совпадения кластеров на филогенетическом дереве проверяли с помощью процедуры бутстрэппинга (bootstrap) на 500 повторях.

Анализ экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР.

Суммарную РНК обрабатывали при 37°C ДНКазой-I (RNase-free DNAaseI, “Boehringer Mannheim”) в течение 15 мин и использовали для синтеза первой цепи кДНК как описано выше. Для контроля за качеством образцов первой цепи кДНК использовали тканеспецифичный (экспрессируется в клетках паренхимы) ген *dth2*, мРНК которого равномерно распределена вдоль передне-задней оси тела планарии [29]. Для ПЦР использовали набор реактивов Advantage 2 PCR Kit (Clontech) и специфические пары праймеров к исследуемым генам: *gtlec1* – праймеры *gtlec1P10* и *gtlec1P1*; *gtlec2a* – *gtlec2abP1* и *gtlec2aP1*; *gtlec2b* – *gtlec2abP1* и *gtlec2bcP1*; *gtlec2c* – *gtlec2cP3* и *gtlec2cP4*; *scarf*-подобные гены – *scarfP2* и *scarfP3*; *dth2* – *dth2P1* и *dth2P2*.

In situ-гибридизацию тотальных препаратов осуществляли как описано ранее [6]. Фрагменты кДНК MDFL-генов были амплифицированы с помощью ПЦР со специфическими праймерами, клонированы в вектор pT-Adv (Clontech, США), обработаны эндонуклеазой рестрикции *HindIII* (Promega, США) и использованы для приготовления дигоксингенинмеченых антисмысловых и смысловых РНК-зондов. Зонды синтезировали с помощью набора реактивов Riboprobe® Combination System SP6/T7 (Promega, США), а очистку зондов проводили с помощью набора RNeasy system (Qiagen, США).

Поликлональные антитела к рекомбинантным белкам Scarf2 и gtLec1. Фрагмент кДНК, кодирующий зрелый белок Scarf2 и фрагмент кДНК, соответствующий двум C-концевым ЛПДС белка *gtLec1*, были клонированы в вектор pQE-30 (Qiagen). Плазмиды были использованы для трансформации *Escherichia coli* (штамм Ad 494, Novagen, США). Рекомбинантные белки, содержащие шестистигидиновый якорь, были очищены с помощью металлоаффинной хроматографии с использованием Talon Resin (Clontech, США) согласно инструкции фирмы-производителя.

Очищенные рекомбинантные белки использовали для иммунизации кролика и получения поликлональных антител. Все процедуры осуществляли по стандартным протоколам [30]. Полученные поликлональные антитела анализировали с помощью ELISA kit (Haematologic Technologies, США) и использовали для получения Fab-фрагментов. Иммуноглобулины очищали с помощью хроматографии на протеин-А-сефарозе (Pharmacia, Швеция), как описано [30], диализовали против 100 мМ ацетата натрия pH 5.5 и использовали для получения Fab-фрагментов методом расщепления пепсином [30]. Fab-фрагменты очищали с помощью хроматографии на протеин-А-сефарозе и диализовали против PBS-буфера (120 мМ NaCl; 7 мМ Na₂HPO₄; 3 мМ NaH₂PO₄; 2.7 мМ KCl). Fab-фрагменты анализировали методом Вестерн-иммуноблоттинга.

Детекция MDFL-белков в слизевом секрете планарий. Животных помещали на нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher and Schuell, Германия) в капле 10-кратного раствора Локка (8% NaCl, 0.2% KCl, 0.2% CaCl₂, 0.2% NaHCO₃) для интенсификации выделения слизевого секрета. Мембраны с иммобилизованной белковой фракцией секрета преинкубировали 40 мин в буфере РТw (0.1% Твин-20 в PBS), содержащем 3% бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma, США) – РТw-BSA 3%. Все операции проводили при покачивании при комнатной температуре. Далее мембраны инкубировали в присутствии Fab-фрагментов против белков Scarf2 и gtLec1 (Fab I, разведение 1 : 300) в течение 1 ч и затем в присутствии Fab-фрагментов козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Fab II, Burlingame, США). Проявление иммунного сигнала осуществляли с помощью нитротетразолиума синего (NBT, Sigma, США) и 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфата (BCIP, Sigma, США).

Иммуноокрашивание тотальных препаратов планарий. Использование стандартных подходов для окрашивания не дало результата вследствие высокой плотности тканей планарии. Для увеличения проницаемости тканей мы применили обработку тотальных препаратов планарии ультразвуком и использовали не целые антитела, а Fab-фрагменты, которые лучше проникают в ткани. Планарий фиксировали так же, как для *in situ*-гибридизации тотальных препаратов [6]. Фиксированные образцы переводили сначала в метанол и обрабатывали ультразвуком 5–7 мин на приборе Soniprep-150 (амплитуда 10–22 мкм), а затем в буфер РТw-BSA 3% и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее к образцам добавляли Fab I (разведение 1 : 100 в РТw-BSA 1%) и инкубировали при 4°C в течение ночи. После промывания в течение нескольких часов РТw-буфером и инкубации в 5%-ной сыворотке козы 2 ч при 4°C к образцам добавляли Fab II (разведение

1 : 25000) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Проявление иммунного сигнала осуществляли как описано выше.

Иммуноэлектронная микроскопия. Планарий фиксировали в растворе, содержащем 2% формальдегид, 0.5% глутаральдегид и 0.1% какодилат, в течение 40 мин, промывали трижды PBS и один раз 0.5% глицином в PBS, затем инкубировали в PBS, содержащем 1% осмий, в течение 1 ч. Все инкубации проводили при комнатной температуре. Далее образцы обезвоживали в этаноле, заключали в смолу LR-White (London Resin, Великобритания), согласно инструкции фирмы-производителя, и использовали для приготовления ультратонких срезов. Срезы помещали на никелевые сеточки и протравляли в 3%-ном растворе перекиси водорода для увеличения проницаемости смолы LR-White. После промывания несколько раз в дистиллированной воде срезы сначала инкубировали 15 мин в PBS-BSA 1%, а затем 2 ч со Scarf2-специфическими антителами, разведенными в PBS-BSA 1%; после чего промывали пять раз PBS и инкубировали 30 мин с белком А, конъюгированным с коллоидным золотом. Затем образцы промывали пять раз в PBS-буфере и в проточной дистиллированной воде, контрастировали в уранилацетате (30 мин) и цитрате свинца (8.5 мин) и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе.

Авторы признательны Н.Н. Лучинской (Биологический факультет, МГУ) за помощь в электронной микроскопии и Н.В. Бовину за консультацию. Особую благодарность авторы выражают И.М. Шейман (Институт биофизики клетки РАН, Пущино) за плодотворные дискуссии и предоставление планарий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 97-04-50123) и Программы поддержки выдающихся российских ученых (грант для С. Лукьянова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dodd R.B., Drickamer K. // *Glycobiology*. 2001. V. 11. P. 71R–79R.
2. Drickamer K. // *Nucl. Acids Res. Mol. Biol. Prog.* 1993a. V. 45. P. 207–232.
3. Drickamer K. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9. P. 585–590.
4. Gabius H.J. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 243. P. 543–576.
5. Drickamer K., Dodd R.B. // *Glycobiology*. 1999. V. 9. P. 1357–1369.
6. Bogdanova E., Matz M., Tarabykin V., Usman N., Shagin D., Zarskiy A., Lukyanov S.A. // *Dev. Biol.* 1998. V. 194. P. 172–181.
7. Матц М.В., Шагин Д.А., Усман Н.Ю., Богданова Е.А., Фрадков А.Ф., Соболева Т.А., Лукьянов С.А. // *Биоорг. химия*. 1998. Т. 24. С. 910–915.
8. Shagin D.A., Barsova E.V., Bogdanova E., Britanova O.V., Gurskaya N., Lukyanov K.A., Matz M.V., Punk-

- ova N.I., Usman N.Y., Kopantzev E.P., Salo E., Lukyanov S.A. // *Glycobiology*. 2002. V. 12. P. 463–472.
9. Weis W.I., Kahn R., Fourme R., Drickamer K., Hendrickson W.A. // *Science*. 1991. V. 254. P. 1608–1615.
 10. Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A. // *Nature*. 1992. V. 360. P. 127–134.
 11. Ng K.K., Drickamer K., Weis W.I. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 663–674.
 12. Nielsen B.B., Kastrup J.S., Rasmussen H., Holtet T.L., Graverson J.H., Etzerodt M., Thogersen H.C., Larsen I.K. // *FEBS Lett.* 1997. V. 412. P. 388–396.
 13. Mio H., Kagami N., Yokokawa S., Kawai H., Nakagawa S., Takeuchi K., Sekine S., Hiraoka A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 249. P. 124–130.
 14. Bezouska K., Crichtow G.V., Rose J.M., Taylor M.E., Drickamer K. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 11604–11609.
 15. Pedersen K.J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1963. V. 106. P. 424–443.
 16. Rieger R.M., Tyler S., Smith III J.P.S., Rieger G.E. *Platyhelminthes: Turbellaria*. New York: Wiley Press. Inc., 1991.
 17. Tyler S. // *Zoomorphologie*. 1976. V. 84. P. 1–76.
 18. Tyler S. // *Fortschr. Zool.* 1988. V. 36. P. 331–347.
 19. Chandebis R. // *Monogr. Dev. Biol.* 1976. V. 11. P. 1–182.
 20. Baguna J., Salo E., Romero R., Garcia-Fernandez J., Bueno D., Munoz-Marmol A.M., Bayascas-Ramirez J.R., Casali A. // *Zool. Sci.* 1994. V. 11. P. 781–795.
 21. Kato K., Orii H., Watanabe K., Agata K. // *Development*. 1999. V. 126. P. 1031–1040.
 22. Santos F.V. // *Physiol. Zool.* 1931. V. 4. P. 111–164.
 23. Schilt J. // *Ann. Embryol. Morph.* 1970. V. 83. P. 93–106.
 24. Chomczynski P., Sacchi N. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156–159.
 25. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 1558–1560.
 26. Davis R.W., Thomas M., Cameron J., St John T.P., Scherer S., Padgett R.A. // *Methods Enzymol.* 1980. V. 65. P. 404–411.
 27. Siebert P.D., Chenchik A., Kellog D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1087–1088.
 28. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
 29. Garcia-Fernandez J., Baguna J., Salo E. // *Development*. 1993. V. 118. P. 241–253.
 30. Harlow E., Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.

A Family of Genes of Multidomain Free Lectins from a Planarian: Structure, Expression, and Use as Markers for Monitoring Regeneration

E. A. Bogdanova, E. V. Barsova, N. I. Pun'kova, O. V. Britanova,
D. A. Shagin, N. G. Gurskaya, N. Yu. Usman, and S. A. Lukyanov[#]

[#] *Phonelfax: +7(095) 330-7056; e-mail: luk@ibch.ru*
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A family of genes of the agamic race of planarian *Girardia tigrina* were described that encode proteins that belong to the superfamily of C-type lectins and were demonstrated to have a unique domain organization. The genes are differentially expressed in the planarian body. The protein products of at least two genes (*scarf2* and *gtlec1*) are expressed in specifically differentiated gland cells of the planarian and secreted into the environment through long cell necks. A comparison of the results obtained by electron microscopy and immunohistochemistry with literature data allows the assignment of these cells to the group of adhesion glands. The observation of the regeneration of the cell necks in normal and artificial two-headed planaria indicated that the dorsoventral contact at the edge of the head part of the planarian body directs and maintains the growth of the gtLec1-producing cell necks during regeneration. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: C-type lectins, gland cell necks, planarian, regeneration