

УДК 547

ОВАРИАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ РЫБ СОДЕРЖИТ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕАЗ

© 2015 г. А. А. Минин, С. Г. Озерова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

117808, Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: mininand2010@gmail.com

Поступила в редакцию 13.08.2014 г.

Окончательный вариант получен 05.09.2014 г.

Исследования условий, при которых происходит спонтанная, без участия спермия, активации яйца рыб, показали, что яйцо хорошо сохраняет способность к оплодотворению в овариальной (полостной) жидкости, в которой оно находится в полости гонады после овуляции. Нами ранее было обнаружено, что в искусственных средах спонтанная активация подавляется ингибиторами протеаз. В настоящей работе было исследовано наличие природных ингибиторов протеаз в овариальной жидкости, показано, что в полостной жидкости данио и вьюна содержатся ингибиторы протеаз, в частности, белковый ингибитор трипсиновых протеаз серпин *a* первого типа.

Ключевые слова: активация яйца, ингибиторы протеаз, *Misgurnus fossilis*, *Brahidanio rerio*, серпина I.

DOI: 10.7868/S0475145015010061

При половом размножении животных активация – включение программы развития зиготы – происходит обычно при взаимодействии яйца со спермием. Одним из ранних событий при активации является формирование так называемой оболочки оплодотворения в результате экзоцитоза кортикальных гранул, которое инициируется у большинства групп животных проникновением спермия в яйцо и служит для предотвращения полиспермии. Однако процесс активации яйца у рыб имеет некоторые уникальные особенности.

Известно, что яйцо большинства рыб в нерестовой среде сохраняет способность к оплодотворению на протяжении ограниченного времени, характерного для каждого вида, что связано с так называемой спонтанной, т.е. не требующей спермия, активацией, характерной для этой группы позвоночных. Условия, при которых происходит активация и оплодотворение яиц у разных видов рыб, были подробно рассмотрены и описаны в монографии А.С. Гинзбург (Гинзбург А.С., 1968). Спонтанная активация, как и нормальная, сопровождается образованием оболочки оплодотворения, предотвращающей проникновение спермиев в яйцо. Для рыб характерно внешнее оплодотворение, поэтому процесс спонтанной активации, который запускается при попадании яйца в нерестовую среду, определяет время возможного оплодотворения. Важно отметить при этом, что в гонадах рыб при созревании и овуляции икра может до нереста какое-то время сохранять способность к оплодотворению, находясь при этом в специфической среде, образующейся из содержимого

лопнувших фолликулов и тканевой жидкости в полости гонады. А.С. Гинзбург рекомендовала для этой среды название полостной жидкости.

Происходящая при попадании яйца рыб в нерестовую среду спонтанная, т.е. без участия спермия, активация, как правило, не приводит к развитию гаплоидного зародыша, а сопровождается образованием оболочки оплодотворения, аномальной ооплазматической сегрегацией, неправильным дроблением и в дальнейшем – гибелью неоплодотворенных яиц.

Активация яйца сопровождается повышением концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме (Gilkey et al., 1978, Lee K.W. et al., 1999). Экзоцитоз кортикальных гранул в яйце рыб, приводящий к образованию оболочки оплодотворения, вероятно, активируется ионами кальция и включает в себя ряд событий, в том числе реорганизацию кортикального слоя актина в яйце (Ivanenkov et al., 1990, Becker, Hart, 1999). Было показано, что при спонтанной активации яйца рыб, как и при нормальном оплодотворении, происходит волнообразное повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме и экзоцитоз кортикальных гранул (Lee K.W. et al., 1999), однако сигнальные механизмы, вызывающие это повышение, неизвестны. Таким образом, можно предположить, что спонтанная активация как общее явление, характерное для яйца рыб, тесно связана с процессами размножения у рыб и играет важную роль в определении временных параметров процесса оплодотворения.

В ряде исследований процесса активации яйца рыб без спермия при инкубации в солевых растворах разного состава (Hart N.H., Yu S.F., 1980, Lee K.W. et al., 1999, Gilkey J.C. et al., 1999) было показано, что некоторые солевые среды замедляют процесс спонтанной активации, однако только овариальная или, по другому, полостная жидкость позволяет длительное время сохранять у яиц рыб способность к оплодотворению (Corley-Smith, G.E. et al., 1995, Минин А.А., Озерова С.Г., 2008а). При этом необязательно брать овариальную жидкость от рыб того же вида, в частности, при работе с яйцами данио используют овариальную жидкость лосося (Corley-Smith, G.E. et al., 1995).

Нами был поставлен вопрос, какие именно компоненты овариальной жидкости предотвращают активацию яйца рыб и каков механизм активирующего действия нерестовой среды. Было обнаружено, что солевые среды, содержащие ингибиторы протеолитических ферментов (протеаз), предотвращают спонтанную активацию яйца рыб, при этом яйцо сохраняет способность к нормальному оплодотворению (Минин А.А., Озерова С.Г., 2008а). Известно также, что в зрелых фолликулах данио содержатся мРНК и белок ингибитора трипсиновых протеаз серпина типа a1 (Knoll-Gellida, A. et al., 2006). Мы предположили, что защита полостной жидкостью икры от спонтанной активации обеспечивается ингибиторами протеаз. В настоящей работе был исследован вопрос, содержит ли овариальная жидкость рыб ингибиторы протеаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали овариальную (полостную) жидкость трех видов карповых рыб: вьюна (*Misgurnus fossilis*), карпа (*Cyprinus carpio*) и данио (*Brahidanio rerio*).

Икру вьюна получали после стимуляции рыб внутривбрюшинной инъекцией гонадотропного гормона выдавливанием в сухую чашку Петри (Костомарова А.А., Нейфах А.А., 1964), полостную (овариальную) жидкость получали центрифугированием неоплодотворенной икры при 10000 g. Полостную жидкость данио получали центрифугированием неактивированной икры, полученной выдавливанием ее от самок непосредственно перед нерестом после их естественного созревания в присутствии самцов. Полостную жидкость карпа получали из зрелой икры после искусственного созревания самок, вызванного экстрактом гипофиза, на базе ФГУП "ВНИИПРХ", г. Дмитров Московской области благодаря любезной помощи А.В. Рекубратского.

Для изучения способности полостной жидкости ингибировать активность протеаз была использована система определения активности панкреатического трипсина с хромогенным суб-

стратом BAPNA (N-Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide). Определяли активность трипсина по изменению во времени оптической плотности при 410 нм. Пробы для определения активности готовили следующим образом: в кювету с буфером А (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 100 мМ NaCl), содержащую 50 мкл BAPNA (20 мМ в ДМСО) добавляли 1.5 мкг трипсина (исходный раствор 0.15 мг/мл), конечный объем пробы 3 мл.

Для выявления белковых ингибиторов протеаз использовали метод электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС натрия) в градиентном полиакриламидном геле (ПААГ) концентрацией 5–15% в сочетании с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Для выявления полос белков, потенциально обладающих активностью ингибиторов протеаз, использовали метод окраски полученного блота биотинилированным трипсином. Окрашивание блотов биотинилированным трипсином (БТ) с дальнейшим окрашиванием с использованием авидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, проводили описанным ранее методом (Melrose J. et al., 1994) с диаминобензидином в качестве субстрата пероксидазы. Для биотинилирования панкреатического трипсина крупного рогатого скота использовали сукцинимидный эфир 6-((6-((биотиноил)амино)гексаноил)амино)-гексановой кислоты, биотинилирование проводили по методу, описанному ранее (Melrose J. et al., 1994) с некоторыми модификациями. Очистку БТ проводили с помощью гель-фильтрации на колонке 1 × 100 см с Сефадексом G-50 superfine (Pharmacia) в буферном растворе 0.2 М глицина рН 2.5.

Для предотвращения инактивации белковых ингибиторов протеаз пробы полостной жидкости для электрофореза обрабатывали буферным раствором для приготовления образцов, не содержащим меркаптоэтанола, при комнатной температуре.

Полосы белков, выявленных на блоте окраской БТ, совмещали с полосами на геле после окрашивания Кумасси и вырезали из геля для идентификации белков с помощью масс-спектрометрии. Идентификацию белков по масс-спектрам протеолитических фрагментов после гидролиза трипсином проводили на базе Отдела протеомных исследований и масс-спектрометрии и Центра постгеномных технологий ФГБУ "ИБМХ" РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ингибирующей трипсин активности полостной жидкости вьюна. Для изучения способности полостной жидкости ингибировать активность протеаз была использована система определения активности панкреатического трипсина крупного рогатого скота с хромогенным суб-

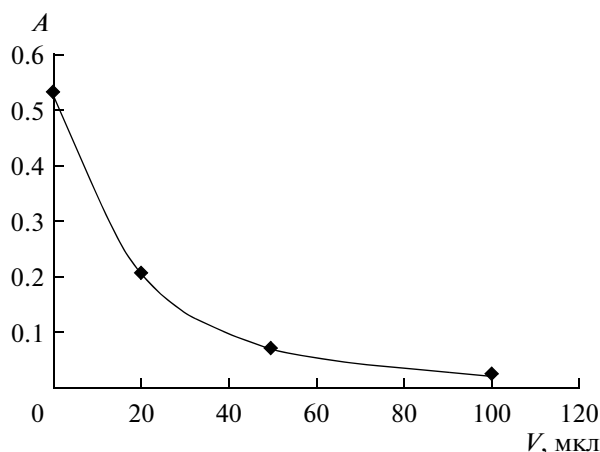


Рис. 1. Ингибирование активности бычьего панкреатического трипсина полостной жидкостью вьюна. Зависимость активности трипсина (усл. ед.) от объема (мкл) добавленной в пробу для определения активности полостной жидкости. Состав проб – см. раздел Материалы и методы.

troanilide). Относительную активность трипсина определяли, измеряя количество образующегося продукта по изменению оптической плотности при 410 нм. Для определения ингибирующей протеазу активности полостной жидкости вьюна измеряли в ее присутствии активность трипсина при разных концентрациях полостной жидкости в пробе. Для этого раствор трипсина инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут в оптической кювете с разными объемами полостной жидкости вьюна (20–100 мкл), содержащей 8.8 мг общего белка в буфере А в конечном объеме 1 мл. Затем добавляли туда остальные компоненты до нужного состава и объема 3 мл, после чего регистрировали оптическую плотность каждые 30 с в течение 10 минут.

Результаты определения активности трипсина в присутствии полостной жидкости (рис. 1) показывают, что полостная жидкость вьюна обладает ингибирующей трипсин активностью. Ингибирование на 90% наблюдается при соотношении количества белка взятого трипсина и общего белка полостной жидкости примерно 1 : 500. Исходя из этого соотношения, можно было предположить, что в полостной жидкости может содержаться белковый ингибитор трипсина в количестве не менее одного микрограмма на 600 мкг общего белка полостной жидкости. Такое количество белкового ингибитора соответствует чувствительности электрофоретического метода определения белковых ингибиторов с помощью БТ (Melrose J. et al., 1994).

Идентификация ингибиторов протеаз в полостной жидкости данио. Был получен препарат БТ ранее описанным методом (Melrose J. et al., 1994), очистку препарата после проведения реакции синтеза проводили гельфильтрацией на колонке 1 × 100 см, заполненной Sephadex G50 fine в буфе-

ре 0.2 М глицин, рН 2.5. Хранили препарат в этом же буфере при 4°C в течении месяца.

Окраска блота после электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС На полостной жидкости трех разных видов рыб, вьюна, данио и карпа, показала, что во всех трех образцах имеются белковые полосы, окрашивающиеся биотинилированным трипсином (рис. 2б).

Идентификацию белков в геле, обнаруживающих взаимодействие с БТ (рис. 2), после разделения и окраски проводили методом масс-спектрометрии пептидных карт после специфического протеолитического гидролиза, известным как Peptide Mass Fingerprint (PMF). Ранее этим методом нами были идентифицированы кальцийсвязывающие белки яйца данио (А.А. Минин, С.Г. Озерова, 2008б) В качестве специфической протеазы для получения набора пептидов чаще всего используется трипсин, расщепляющий полипептидную цепь белков только рядом с положительно заряженными аминокислотами, аргинином или лизином. На первом этапе изучаемый препарат белков подвергается электрофоретическому разделению и окраске в геле, а затем вырезаются соответствующие полосы окрашенных Кумасси белков и подвергаются протеолитическому гидролизу непосредственно в ПААГ. В результате такого гидролиза получается смесь пептидов, масса которых и определяется с помощью масс-спектроскопии. Каждый белок обладает уникальным набором триптических пептидов с определенными молекулярными массами и может быть идентифицирован по этому набору. Этот метод может быть использован для идентификации только тех белков, для которых известна полная аминокислотная последовательность. В нашем случае данные по последовательностям белков вьюна ограничены, а для белков карпа

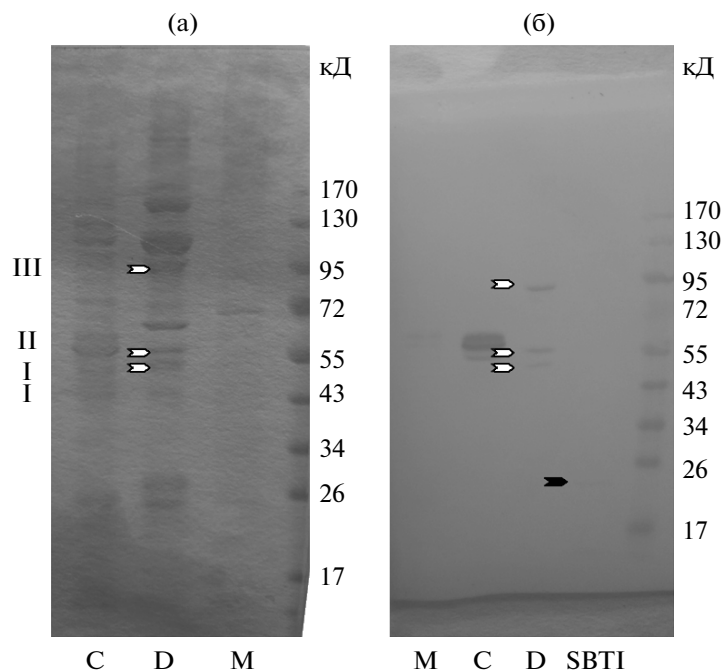


Рис. 2. Электрофоретический анализ белкового состава полостной жидкости разных рыб. (а) – гель, окрашенный Кумасси, (б) – блот, окрашенный биотинилированным трипсином, см. раздел Методы; дорожки: С – полостная жидкость карпа, *Cyprinus carpio*, М – полостная жидкость вьюна, *Misgurnus fossilis*, D – полостная жидкость данио, SBTI – ингибитор трипсина из соевых бобов, обозначен на блоте черной стрелкой; белыми стрелками обозначены на геле (а) и блоте (б) полосы белков (I, около 50 кД, II, около 60 кД и III, около 95 кД) на дорожке D, которые вырезали для анализа с использованием масс-спектрометрии.

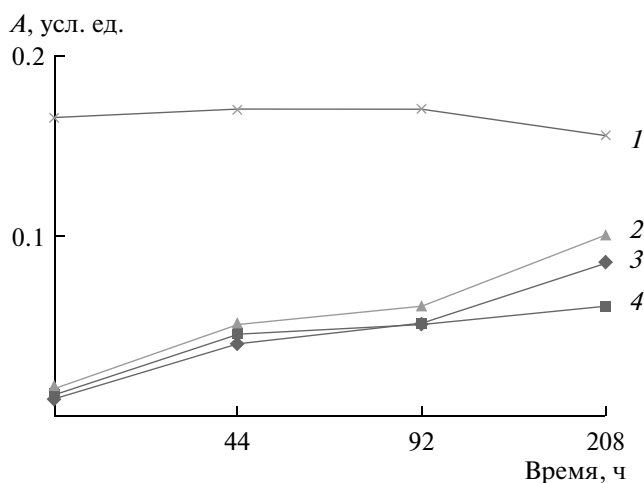


Рис. 3. Восстановление активности трипсина после инкубации с полостной жидкостью в средах разного состава. Зависимость активности трипсина (усл. единицы) от времени инкубации (ч) трипсина и полостной жидкости, взятой в объеме, ингибирующем взятое количество трипсина более, чем на 90%. (1) – трипсин (20 мМ Трис, рН 7.5, 100 мМ NaCl); (2) – трипсин, полостная жидкость (20 мМ Трис, рН 8.0, 100 мМ NaCl); (3) – трипсин, полостная жидкость (20 мМ Трис, рН 7.5, 100 мМ NaCl); (4) – трипсин, полостная жидкость (20 мМ Трис, рН 7.5).

имеется довольно много известных аминокислотных последовательностей. Наилучшим образом обстоит дело с белками данио, для которых имеется полногеномная база данных для анализа результатов Peptide Mass Fingerprint.

Поэтому после разделения и окрашивания в геле образцов полостной жидкости разных рыб

мы анализировали отдельные белковые полосы полостной жидкости данио. Анализ данных по полостной жидкости карпа не дал статистически значимого результата.

Для анализа мы вырезали те полосы геля, окрашенного Кумасси, которые максимально совпадали с полосами окраски биотинилирован-

ным трипсином, всего были проанализированы три белковые полосы (рис. 2а и 2б). Контролем для совмещения геля и блота служили полосы маркерных белков.

Статистическая обработка данных масс-спектрометрии для образцов белков данио (рис. 2а, дорожка D) позволила идентифицировать полосы трех белков со значимостью (score) более 70, которая соответствует значениям $p < 0.05$. Оказалось, что только один из них (I, около 50 кД) является ингибитором сериновых протеаз серпина типа serpin1. Два других белка — гемопексин (II) и предшественник вителлогенина (III). Два последних белка определяются с высокой степенью достоверности, однако ничего неизвестно об их взаимодействии с трипсином.

Обнаруженное наличие серпина в полостной жидкости позволило поставить вопрос о дальнейшем изучении ингибирующей трипсин активности полостной жидкости рыб. Ингибиторы протеаз серпинового типа обладают уникальной особенностью: механизм ингибирования квази необратимый — в результате взаимодействия двух белков, трипсина и ингибитора, образуется стабильный ковалентный комплекс, представляющий собой негидролизированный промежуточный продукт протеолиза серпина, связанного с остатком серина в активном центре трипсина. Этот комплекс может распадаться с образованием неактивного гидролизованного серпина и активного трипсина. Исследовали реактивацию трипсина во времени при разных условиях инкубации его с полостной жидкостью вьюна. Для этого пробы, содержащие 400 мкл полостной жидкости и 6.6 мкг трипсина (40 мкл раствора 0.15 мг/мл) инкубировали при комнатной температуре в буферных растворах с разными значениями pH и концентрацией NaCl. Через 44, 92 и 208 часов отбирали образцы из инкубационных проб и измеряли активность трипсина по изменению оптической плотности, начиная реакцию добавлением субстрата (рис. 3).

Как видно из приведенных результатов, наблюдается частичная реактивация трипсина во времени, характерная для ингибирующего действия серпина. В ходе проведенных экспериментов было выявлено влияние ионной силы и pH на стабильность комплекса. Отмечено частичное восстановление активности трипсина на 7 сутки инкубации, что свидетельствует о распаде комплекса и реактивации трипсина, характерной для квази необратимого механизма инактивации трипсина ингибиторами серпинового типа. Эти данные подтверждают наше предположение, что ингибирующая протеазы активность полостной жидкости вьюна может быть связана как и у данио с наличием в ней серпина.

Остается открытым вопрос, с каким протеазой на поверхности яйца взаимодействует серпин полостной жидкости. Комплекс серпин-протеаза должен в этом случае обладать свойством быстро распадаться в нерестовой среде с высвобождением активной протеазы, этот вопрос требует дальнейших исследований.

Таким образом, мы предполагаем, что способность полостной жидкости предотвращать активацию яйца определяется наличием в ней ингибитора протеаз серпинового типа, а активация яйца при попадании в нерестовую среду связана с распадом ингибиторного комплекса серпина с гипотетической протеазой на поверхности яйца, активность которой инициирует процесс активации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гинзбург А.С.* Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М. Наука, 1968. 358 с.
- Минин А.А., Озерова С.Г.* Спонтанная активация яиц рыб предотвращается ингибиторами протеаз // *Онтогенез*. 2008. Т. 39. № 5. С. 1–5.
- Минин А.А., Озерова С.Г.* Изучение белков группы аннексина в раннем развитии рыб. IV. Идентификация кальцийсвязывающих белков в яйце данио с использованием масс-спектрометрии // *Онтогенез*. 2008. Т. 39. № 3. С. 222–226.
- Костомарова А.А., Нейфах А.А.* Метод отделения бластодермы у зародышей вьюна и возможности его применения // *Журн. общ. биол.* 1964. Т. 25. № 5. 386–388.
- Corley-Smith G.E., Lim C.J., Brandhorst B.P.* Delayed *in vitro* fertilization using coho salmon ovarian fluid in *The Zebrafish Book; A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* // Ed. Westerfield M. Eugene, OR: University of Oregon Press, 1995. P. 722–725.
- Gilkey J.C., Jaffe L.F., Ridgeway E.B., Reynolds G.T.* A free calcium wave traverses the activating egg of medaka, *Oryzias latipes* // *J. Cell Biol.* 1999. V. 76. P. 467–482.
- Hart N.H., Yu S.F.* Cortical granule exocytosis and cell surface reorganization in eggs of *Brachydanio* // *J. Exp. Zool.* 1980. V. 213. P. 137–159.
- Ivanenkov V.V., Minin A.A., Ozerova S.G.* Phalloidin inhibits cortical granule exocytosis and ooplasmic segregation in loach eggs // *Cell Differ. Dev.* 1990. V. 29. P. 21–26.
- Knoll-Gellida A., André M., Gattegno T., Forgue J., Admon A., Babin P.J.* Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals // *BMC Genomics*. 2006. V. 7. № 46. Published online 2006 March 9. doi: 10.1186/1471-2164-7-46.
- Lee K.W., Webb S.E., Miller A.L.* A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation // *Dev. Biol.* 1999. V. 214. P. 168–180.

Fish Ovarian Fluid Contains Protease Inhibitors

A. A. Minin and S. G. Ozerova

*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: mininand2010@gmail.com*

Received August 13, 2014; in final form, September 5, 2014

Abstract—Studies of the conditions under which fish egg is activated spontaneously without the sperm showed that the egg retains the ability for fertilization in the ovarian (coelomic) fluid, which surrounds it in the gonad cavity after ovulation. Earlier, we showed that, in artificial media, the spontaneous activation is suppressed by protease inhibitors. In this study, we investigated the presence of natural protease inhibitors in the ovarian fluid and showed that the ovarian fluid of zebrafish and loach contains protease inhibitors, in particular, type I serpin *a*, a protein inhibitor of trypsin proteases.

Keywords: egg activation, protease inhibitors, *Misgurnus fossilis*, *Brahidanio rerio*, serpin *a1*