

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ В.И. УЛЬЯНОВА-ЛЕНИНА

На правах рукописи

ГУСЕВ ОЛЕГ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ КОНТРОЛЯ
НЕРЕСТА БЕРЕГОВОГО КРАБА *SESARMA HAEMATOCHEIR*
(*BRACHYURA: GRAPSIDAE*).**

03.00.04 – биохимия,

03.00.08 – зоология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань
2004

Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных Казанского государственного университета имени В.И. Ульянова-Ленина и в лаборатории морской биологии и экологии Окаямского Национального Университета (г. Окаяма, Япония).

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
А. И. Голубев

профессор М. Сайгуза (Masayuki Saigusa)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук З.И. Абрамова

доктор биологических наук, профессор

Р.Н. Буруковский

Ведущее учреждение:

Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН

Защита состоится **« 21 » октября 2004 г.** в **13-00** часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан « 21 » сентября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

А.Н. Аскарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Феномен биологических ритмов в живых системах – одно из самых загадочных и малоизученных явлений в природе. Внутренние часы организмов разных уровней организации демонстрируют удивительную стабильность и в то же время достаточную пластичность для подстраивания фазы активности под изменяющиеся внешние циклы среды. Многочисленными экспериментами было показано, что даже в отсутствии регулярной внешней стимуляции, биологические ритмы самоподдерживаются в организме на протяжении длительного времени (Enright, 1980; Grosse et al., 1995 и др.).

Современные методы исследований позволили выявить и охарактеризовать основные механизмы молекулярного контроля циркадианных ритмов у ряда видов беспозвоночных и позвоночных животных, включая человека. Были установлены группы генов, экспрессирующихся лишь в определенный период светового цикла (Chen et al., 1991; Baylies et al., 1992 и др.). На основании этих экспериментальных данных проведено генетическое исследование «clock-мутантов» дрозофилы и была построена детальная модель циркадианного осциллятора (Helfrich-Förster, 1996). Понимание биохимических механизмов лежащих в основе функционирования окологосуточных биологических часов было успешно применено в фармацевтике для создания ряда лекарственных препаратов (Kondo et al., 1994; Kutsuna et al., 1998 и др.).

Наряду с этими достаточно хорошо изученными механизмами молекулярного контроля существуют уникальные примеры синхронизации биологической активности с внешними циклами среды. Одним из них является нерестовое поведение некоторых видов крабов семейства *Grapsidae*. Взрослые особи крабов ведут полусухопутный образ жизни, возвращаясь на берег для нереста лишь один-два раза в год, когда после месяч-

ной инкубации на абдоминальных придатках икра стряхивается в морской воду. Уникальность этого события в том, что нерест крабов строго ассоциирован с ночными приливами и не происходит в другое время (Saigusa, 1982). Другая особенность поведения крабов в том, что в течение получаса после попадания в морскую воду эмбрионы прорывают яйцевые оболочки и переходят к свободноплавающему личиночному образу жизни. Выклев эмбрионов крабов (*хатчинг* – от англ. *hatching*) находится в непосредственной зависимости от поведения самки. В лабораторных условиях хатчинг также высоко синхронизирован среди эмбрионов. Однако, отделенные от абдомена самки более чем за 48 часов до ожидаемого момента хатчинга, эмбрионы не способны завершить развитие. А эмбрионы, изолированные от самки менее чем за 48 часов до момента нереста, способны самостоятельно завершить эмбриогенез и перейти в личиночную стадию. Молекулярные основы контроля биологических часов такого типа к настоящему времени не были известны. Лишь для некоторых десятиногих ракообразных установлено существование гомологов *clock*-локусов, но косвенное участие этих генов было продемонстрировано в контроле циркадианной структуры только для локомоторной активности (Naylor, 1997, 2003). Между тем, контроль времени хатчинга эмбрионов *Grapsidae* представляет собой, по видимому, совершенно иную структуру, независимую от циклического изменения уровня РНК определенных генов под действием светового режима. Другой сложностью изучения механизмов *хатчинг-программы* (термин Saigusa, 2000) у крабов является отсутствие информации о нерестовых ферментах ракообразных. Эта группа ферментов ответственна за полное или частичное растворение яйцевых оболочек у многих рыб, морских ежей и амфибий (Lepage et al., 1990; Lin et al., 2000). Как было показано, экспрессия этих белков непосредственно связана со временем предполагаемого нереста.

Таким образом, три аспекта изучения нереста полусухопутных крабов на наш взгляд представляют особый интерес. Это – механизмы контроля времени хатчинга, идентификация генов, экспрессия которых непосредственно связана с хатчинг-программой, а также выявление и характеристика активных веществ, вовлеченных в процессы морфологических и физиологических изменений, сопровождающих хатчинг.

Цель исследования. Идентификация генов и многофакторный анализ активных веществ, участвующих в регулировании времени хатчинга развивающихся эмбрионов у берегового краба *Sesarma haematocheir*, а также попытка инициации хатчинга *in vitro*.

В ходе исследования нами решались следующие **задачи**:

1. Идентифицировать и проанализировать гены, которые экспрессируются избирательно лишь в эмбрионах, находящихся в программе хатчинга.

2. Выделить соединения, являющиеся аналогами или гомологами нерестовых ферментов у крабов и участвующие в частичном или полном растворении яичевых оболочек, которое является условием успешного хатчинга.

3. Разработать способ искусственной инициации хатчинг-программы эмбрионов в лабораторных условиях воздействием химических соединений или физических факторов.

Научная новизна. Идентифицирована и выделена новая сериновая протеаза, а также клонирован кодирующий ее ген. Было показано, что данный фермент частично растворяет яичевые оболочки, а также способствует удалению остающихся после хатчинга эмбрионов яичевых оболочек с плеопод самки, подготавливая тем самым их к новой кладке икры. Наличие такого фермента является эволюционным преимуществом крабов, так как позволяет начинать инкубацию новой партии икры без линь-

ки, тогда как для других десятиногих раков линька является необходимым условием очистки плеопод и подготовки для новой инкубации яиц.

В ходе экспериментов по сравнению библиотек генов, экспрессирующихся в эмбрионах на разных этапах хатчинг-программы, методом супрессионной вычитающей гибридизации был идентифицирован и клонирован новый ген, по структуре схожий с генами кодирующими белки теплового шока (HSP-90). Показано, что экспрессия этого гена многократно усиливается в эмбрионах, находящихся в хатчинг-программе. Предложена гипотеза о возможной схеме участия стрессовых белков в инициации программы хатчинга в эмбрионах крабов *Grapsidae*.

Установлена возможность искусственной инициации хатчинга эмбрионов при воздействии ряда химических веществ. В этом случае нерест также был высоко синхронизирован среди эмбрионов. Проведен сравнительный анализ возможности изменения временного механизма в эмбрионах крабов и полученных ранее данных о структуре захватывания ритмов активности некоторых видов обитателей беломорской литорали.

Практическая значимость работы. Разведение десятиногих раков является на сегодняшний день одним из перспективных направлений морской биотехнологии. Один из ключевых моментов в этом направлении - эффективный мониторинг и возможность контроля репродуктивных циклов промысловых видов этой группы. Данное исследование является первой попыткой выявления молекулярных механизмов временной упорядоченности выклева эмбрионов крабов и морфологических сопутствующих изменений. Результаты работы могут послужить основой разработки комплексных подходов к искусственному контролю репродуктивных циклов десятиногих раков в аквакультуре.

Апробация работы. Результаты основных этапов диссертационной работы были доложены и обсуждались на Научных ассамблеях Международного комитета «COSPAR» (Нагойя, Япония, 1998; Варшава, Польша,

2000; Хьюстон, США, 2002; Париж, Франция, 2004), на Международной конференции «Белое море: фауна и экология» (Петрозаводск, 1999), на Ежегодном симпозиуме Зоологического общества Японии (Фукуока, 2001; Каназава, 2002; Хакодате, 2003; Кобе, 2004), на Ежегодных заседаниях Японского общества эмбриологии членистоногих (Сунадайра, 2002; Итако, 2003); на XIX Международном генетическом конгрессе (Мельбурн, Австралия, 2003), на итоговых научных конференциях Казанского университета в 2001, 2002, 2003; на международной конференции «Геон-2003» (Казань, 2003), на XIX Международном зоологическом конгрессе (Пекин, Китай, 2004). Заявлено участие в Международном научном семинаре «Проблемы репродукции и раннего онтогенеза морских гидробионтов» (Мурманск, 2-4 ноября 2004).

Публикации. По теме настоящей диссертации опубликовано 10 научных работ в зарубежных журналах и изданиях трудов российских и зарубежных конференций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Частичное растворение яичевых оболочек при нересте крабов происходит при участии сериновой протеиназы пострасляциооно принимающей двухдоменную форму. Протеиназа обладает высокой стрессовой устойчивостью и является первым выделенным представителем нерестовых протеиназ в ракообразных.

2. Выклев эмбрионов крабов может быть направленно инициирован кратковременным воздействием растворов ряда кетонов

3. Инициация выклева (хатчинга) эмбрионов крабов происходит при участии стрессового белка HSP-90, экспрессия которого развивающихся эмбрионах многократно возрастает за 40-45 часов до нереста.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 26 рисунков, включает введение обзор литературы, описание материалов и методов

исследования, их результаты, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Список литературы содержит 150 источников, из них 140 зарубежных.

Декларация личного вклада автора. Автор лично проводил сбор материала, экспериментальную лабораторную и аналитическую части исследований; в целом вклад автора составляет не менее $\frac{3}{4}$ общего объема всей работы.

Благодарности. Считаю своим долгом выразить глубокую благодарность моим научным руководителям профессору А.И.Голубеву и профессору М.Сайгузе, которые щедро делились со мной богатым опытом и навыками, необходимыми для проведения исследований, оказали определяющее влияние на формирование моих научных интересов. Ценные советы и замечания были высказаны сотрудниками биолого-почвенного факультета КГУ профессорами М.Р.Шариповой и Д.Г.Ишмухаметовой, доцентами О.Д.Любарской, А.Н.Аскаровой, А.Н.Фаттаховой, за что автор им очень благодарен. Большое спасибо Р.М.Сабирову за редактирование части рукописи и за ценную консультативную помощь. Автор также искренне благодарен за постоянную поддержку при выполнении данного исследования сотрудникам кафедры зоологии беспозвоночных КГУ и лаборатории морской биологии и экологии Окаямского национального университета (Япония).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Самки крабов *S. haematocheir* инкубирующие икру собирались в период с мая по сентябрь 2000 – 2003 годов. Крабов содержали в индивидуальных пластиковых емкостях с подсоленной пресной водой (соленость 5-6‰). Время нереста каждой самки фиксировалось индивидуально, и на

основе полученных данных строился график соотношения нереста с циклами внешней среды.

Для выделения нерестовой протеиназы воду, в которой происходил нерест, собирали и белки, содержащиеся в ней, осаждали центрифугированием. Осадок растворяли в 100 mM Tris-Cl (pH 9.0) и хранили при температуре -30°C . Белки, содержащиеся в нерестовой воде, разделяли с применением гель-фильтрации, гидрофобной, ионообменной и высокоэффективной жидкостной хроматографий. На каждом этапе отбирались биологически активные фракции. В качестве контролей использовали как воду (морскую и DW), так и жидкость, собранную с поверхности массы икры инкубируемой самкой за 7-14 дней до ожидаемого нереста. Биологическая активность определялась *in vitro* по способности содержимого белковых фракций частично растворять и размягчать структурные компоненты яичевых оболочек и плеопод крабов. Степень чистоты препарата и молекулярную массу фермента определяли электрофорезом. Белковые фракции HPLC разделяли методом электрофореза в 15% агарозном геле по методу Лаэммли (Laemmli, 1970). N-концевую последовательность сериновой протеазы определяли по методу Эдмана в образцах, полученных на этапе HPLC на колонке (150 mm x 6 mm) YMC-Pack ODS-A (YMC Co., Ltd., Japan) в градиенте концентрации (8-52%) ацетонитрила с 0.1% серной кислоты в течение 80 мин. Затем белок иммобилизовали и секвенировали с использованием автоматического аминокислотного анализатора (Apply Biosystems).

Поликлональные антитела получали серийной иммунизацией мыши смесью активных фракций на стадии гель-фильтрационной хроматографии. Иммунные сыворотки были очищены от примесей с помощью аффинной хроматографии на указанные полипептиды и протестированы в Western-блот гибридизации с суммарным белком, выделенным из эмбрионов. Выделенные и очищенные антитела использовали для West-

ern-гибридизации с целью выявления экспрессии белка на разных стадиях хатчинг-программы в эмбрионах.

На основе частично детерминированной аминокислотной последовательности нерестовой протеазы были синтезированы вырожденные олигонуклеотидные праймеры. Для клонирования гена, кодирующего искомый белок, использовали метод ПЦР с применением вырожденных заливок и кДНК-матрицей, полученной обратной транскрипцией тотальной РНК эмбрионов. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 0.8 % агарном геле. Фрагменты ДНК вырезали из геля и проводили очистку Gel Extraction Kit (Qiagen), затем клонировали в pCR 2.1 TOPO плазмидном векторе и определяли нуклеотидную последовательность с помощью автоматического сиквенатора DSQ-2000L (Shimadzu). Клонирование 5' и 3'-концевых частей кДНК, кодирующей нерестовую протеазу, осуществлялось в соответствии с протоколом Marathon cDNA Amplification Kit (BD Biosciences:). Для синтеза первой цепи кДНК была использована тотальная РНК, выделенная из эмбрионов в день нереста. Анализ экспрессии гена в развивающихся эмбрионах проводили с помощью ОТ-ПЦР, используя OPC-специфичные олигонуклеотидные праймеры и кДНК, полученную с тотальной РНК эмбрионов на разных стадиях развития.

Поиск гомологий среди известных генов и структурный анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей проводили с помощью программного пакета Vector NTI Suit 9 (Informax) с интегрированным модулем BLAST.

Эксперименты по искусственной инициации хатчинга проводились над изолированными от самки кластерами эмбрионов, помещенными в 50-луночный планшет. Эмбрионы подвергались кратковременному (5-10 минут) воздействию различных химических соединений, включающих бутанол, этанол, метанол, различные альдегиды, ацетон и пр. Далее икринки промывались в подсоленной пресной воде. На протяжении следую-

ших 72 часов эмбрионы содержались в лунках и регистрация количества эмбрионов, перешедших в стадию зоза, проводилась каждый час. Далее строились графики, отражающие структуру временной упорядоченности программы хатчинга в каждой группе эмбрионов.

Для выявления генов, непосредственно вовлеченных в контроль нерестовой программы, методом супрессионной вычитающей гибридизации (suppression subtracted hybridization - SSH) сравнивались эмбрионы двух типов: 1 – с искусственно инициированной программой хатчинга, 2- - не способные перейти в личиночную стадию. В основе вычитающей гибридизации кДНК лежит процесс гибридизации двух образцов кДНК, называемых *драйвером* и *трейсером*, в результате которой общие для двух образцов транскрипты подлежат удалению (вычитаются). Особенностью, выбранного нами метода, было использование эффекта селективной супрессии полимеразной цепной реакции при амплификации продукта гибридизации.

Для вычитающей гибридизации использовались кДНК библиотеки, приготовленные на основе суммарной РНК эмбрионов, искусственно вовлеченных в программу хатчинга, и эмбрионов из контрольной группы. В качестве основной рабочей гипотезы использовалось предположение о том, что после воздействия внешнего фактора, инициирующего внутреннюю программу хатчинга, начинается экспрессия генов, вовлеченных во временной и физиологический контроль этого события. Полученные библиотеки кДНК, обогащенные транскриптами специфичными для эмбрионов, вовлеченных в программу хатчинга, были проанализированы в первичном скрининге. Для этого были определены нуклеотидные последовательности 200 фрагментов ДНК из продуктов ПЦР финальной стадии вычитающей гибридизации экспериментальной и контрольных групп. Уникальность полученных генов и уровня их экспрессии для экспериментальной группы эмбрионов была подтверждена Нозерн блоттингом с

использованием тотальной РНК эмбрионов, использовавшихся для SSH, а также методом ОТ-ПЦР с использованием кДНК полученной с тотальной РНК эмбрионов крабов на разных этапах эмбриогенеза.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Синхронизация времени нереста между самкой и эмбрионами

Показано, что в лабораторных условиях с различными температурными (15-25°C) и световыми (DD, LD(12:12), LD (16:8)) режимами, нерест крабов синхронизируется со временем прилива в естественной среде обитания. Самки крабов осуществляли нерест лишь в условиях темноты, избегая светлые периоды. При совпадении светлого периода со временем прилива самки нерестились во время следующего прилива. При постоянном освещении условиях в лаборатории самки не нерестились вообще. В то же время нам удалось инициировать нерест у подавляющего большинства (90-95%) изолированных от самки эмбрионах кратковременным (5-10 мин.) воздействием 70% водного раствора ацетона. Нерест происходил примерно через 45-50 часов после стимуляции с высоким уровнем синхронизации среди эмбрионов (Рис.1). Следует отметить, что уровень синхронизации нереста среди эмбрионов зависел от времени их отделения от самки.

У эмбрионов отделенных от самки ближе к предполагаемому времени нереста уровень синхронизации времени нереста между собой был значительно выше того же показателя среди эмбрионов, отделенных от абдомена самки раньше. Анализ времени нереста между группами эмбрионов инкубировавшихся на абдомене самки и искусственно стимулированных действием ацетона изолированных эмбрионов позволил выдвинуть

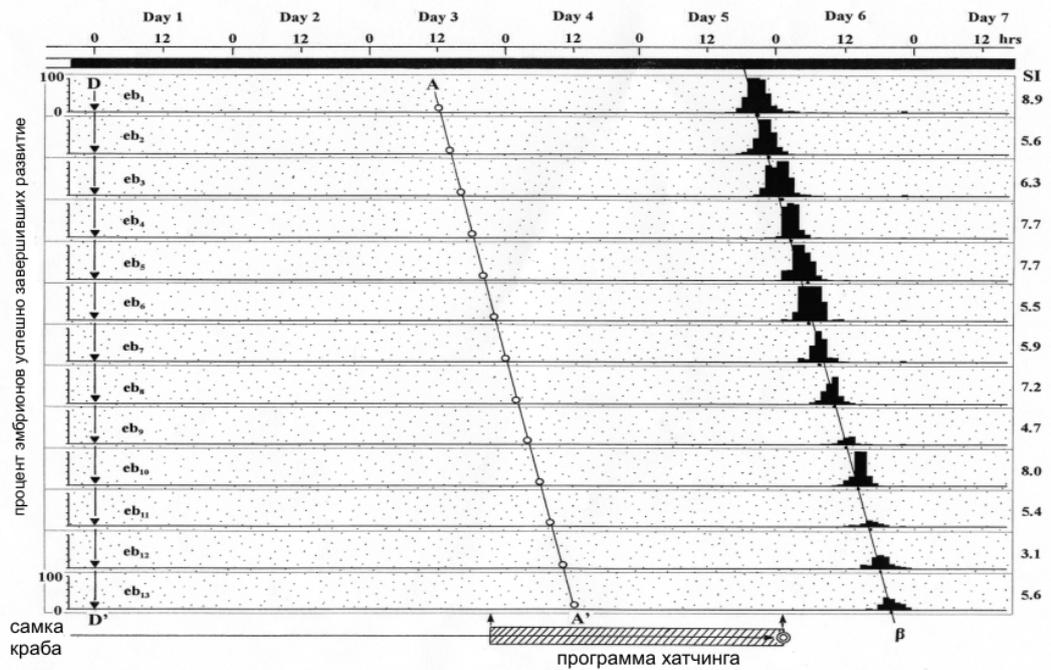


Рис. 1. Инициация нереста в эмбрионах кратковременной инкубацией в 70% растворе ацетона. **D** – время изоляции кластеров от самки. Линия **A** – время стимуляции раствором ацетона. Линия **β** – время хатчинга эмбрионов. SI – индекс синхронизации, отражающий уровень упорядоченности времени нереста среди эмбрионов ($p < 0.05$).

предположение, что стимуляция эмбрионов самкой происходит несколько раз в последние 48 часов перед нерестом. В тоже время все эмбрионы, изолированные от самки не ранее чем за 48 часов до предполагаемого времени нереста, были способны самостоятельно завершить развитие и перейти в личиночную стадию.

2.2. Выделение и клонирование нерестовой протеазы

Было установлено присутствие биологически активного фактора в воде, в которой происходил нерест. Этот фермент способен частично отслаивать яичевые оболочки эмбрионов и очищать поверхность плеопод от остающихся после нереста структурных элементов кластеров эмбрио-

нов. Он был назван OHSS (ovigerous setae stripping substance). Было показано, что белковая фракция, соответствующая протеиназе, обнаруживается на окрашенном полиакриламидном геле в виде двух фракций с молекулярной массой 22 и 25 кДа. ОТ-ПЦР с использованием РНК, полученной из эмбрионов в качестве матрицы и двух вырожденных олигонуклеотидных праймеров, синтезированных на основе частично детерминированной аминокислотной последовательности, позволил амплифицировать и клонировать фрагмент ДНК размером 240 п.н. Определение нуклеотидной последовательности этого фрагмента подтвердило, что это участок гена, кодирующего OHSS.



Рис. 2. Нуклеотидная и предсказанная аминокислотная последовательности OHSS. ▼- сайт протеолитической активации протеиназы. ↑- позиция интронов. ○ – каталитическая триада аминокислот. Аминокислотные последовательности выделенные в ходе сиквенирования заключены в прямоугольники (Pep 1-3, N-terminal)

С помощью метода быстрой амплификации концевых фрагментов кДНК (RACE от arid amplification of cDNA ends) и праймеров, специфичных к выявленному нами фрагменту, мы клонировали полноразмерную форму кДНК (1754 п.н.) этого гена из эмбрионов. Данная кДНК содержала единственную ОРС и кодировала полипептид длиной 492 а/к (рис. 2) Первичный анализ с использованием пакета программ BLAST последовательности аминокислот, предсказанной на основе последовательности нуклеотидов выявленной кДНК, показал ее существенное сходство с последовательностью группы трансмембранный сериновых протеазы трипсиновой группы (36-38% совпадений) (рис.3).

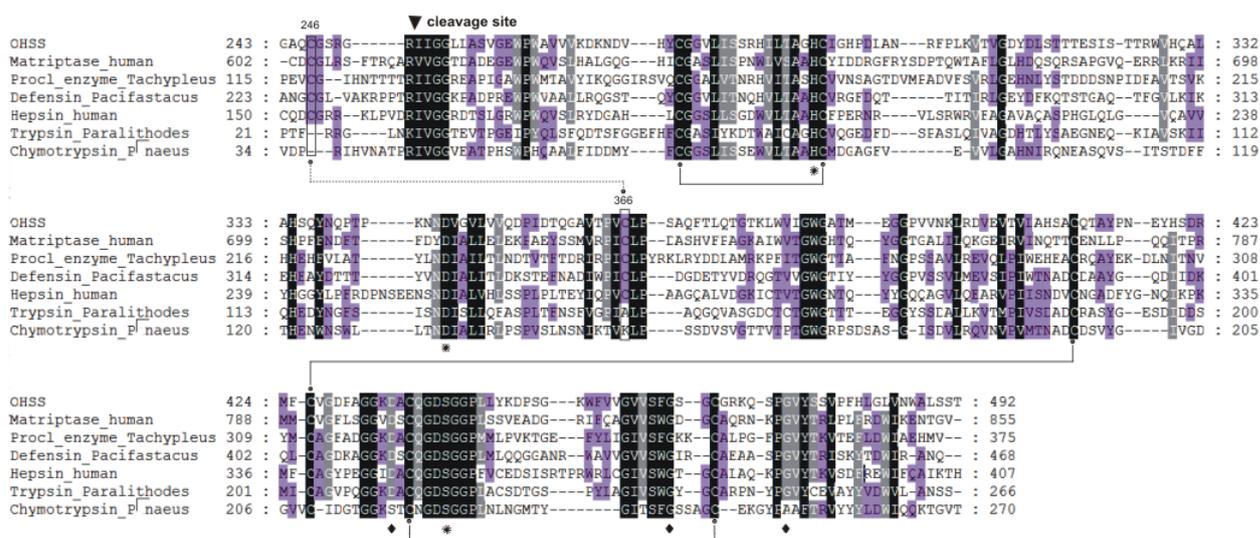


Рис. 3. Сравнение первичной структуры трипсинового домена OHSS с другими сериновыми протеазами. Линиями показаны предполагаемые дисульфидные мостики между консервативно расположенными цистеинами. Пунктирная линия отображает дополнительный дисульфидный мостик, наличие которого определится присутствием в домене дополнительного цистеина. ▼ – сайт протеолитического активирования пропептида OHSS. * - аминокислоты формирующие каталитическую триаду. ♦ - аминокислоты формирующие субстратный карман.

Положение активных аминокислот, формирующих каталитическую триаду, а также сайтов первичного распознавания субстрата, позволили нам сделать вывод, что OHSS является сериновой протеазой. Тем не менее, область высокого сходства с сериновыми протеазами распространялась лишь на часть предсказанного полипептида, тогда как аминокислотный участок располагающийся ближе к аминной группе (а/к 20-240) не обнаруживали сходства с известными на настоящий момент белками. Наличие сайта посттрансляционной активации RIGG, консервативного для сериновых протеаз, позволило сделать вывод о том, что изначально OHSS синтезируется в виде неактивного зимогена, который впоследствии расщепляется на две полипептидные цепи. Анализ аминокислотной последовательности OHSS не выявил присутствия активационного пептида. Это свидетельствует о том, что посттрансляционная активация протеазы осуществляется, по-видимому, с участием других белков. Наличие в составе трипсинового домена OHSS дополнительной пары цистеинов, дополняющих шесть консервативных, позволяет сделать вывод о том, что после активации обе полипептидные цепи остаются соединенные дополнительным дисульфидным мостиком. Это предположение также подтверждается наличием двух белковых фракций на геле после электрофореза продукта хроматографий. По-видимому, дополнительный дисульфидный мостик разрушался во время электрофореза, и полипептиды 22 и 25 кДа представляют собой каталитическую и некаталитическую цепи OHSS.

Проведены эксперименты Western-гибридизации с использованием поликлональных антител и анализа экспрессии OHSS гена эмбрионов на разных стадиях развития. Экспериментально было показано, что интенсивная экспрессия гена начинается уже на самых ранних стадиях эмбриогенеза. Присутствие в тотальном белке эмбрионов неактивированной формы OHSS (55 kDa) наблюдалось уже за 15 дней до предполагаемого

нереста. В то же время активированная форма OHSS появлялась лишь за несколько дней до ожидаемого нереста. Экспериментально было показано, что очищенная протеиназа сохраняет каталитические функции в широком диапазоне температур и pH. Фермент также показал высокую устойчивость в сохранении уникальной способности растворять структурные элементы яичевых оболочек после длительной заморозки и инкубации при высоких температурах.

2.3. Идентификация генов избирательно экспрессирующихся в эмбрионах вовлеченных в нерестовую программу

На основе результатов первичного скрининга кДНК библиотеки, обогащенной транскриптами специфичными для эмбрионов, вовлеченных в программу хатчинга, было показано, что кДНК библиотеки содержат довольно низкий процент клонов с подтвержденной дифференциальностью. Из 200 транскриптов на двух этапах гибридизации, нуклеотидная последовательность которых была определена, дифференциальность экспрессии была подтверждена лишь для двух. Для дальнейшего анализа был выбран лишь один, демонстрировавший значительную разницу в уровне экспрессии между экспериментальной и контрольной группой эмбрионов (рис. 4А). Анализ с помощью пакета программ BLAST последовательности аминокислот, предсказанной на основе последовательности нуклеотидов выявленной кДНК, показал ее существенное сходство с последовательностью группы белков теплового шока HSP-90 (heat shock protein 90kDa).

Мы сделали вывод, что выявленный нами ген является гомологом (ортологом) HSP-90 других эукариот. HSP-90– группа белков-шаперонов, синтезирующихся в клетке в ответ на большинство химических и физических стрессов. К настоящему времени в генетическом банке отсутству-

ет информация об этой группе белков в ракообразных, поэтому поиск гомологий проводили среди шаперонов других групп животных.

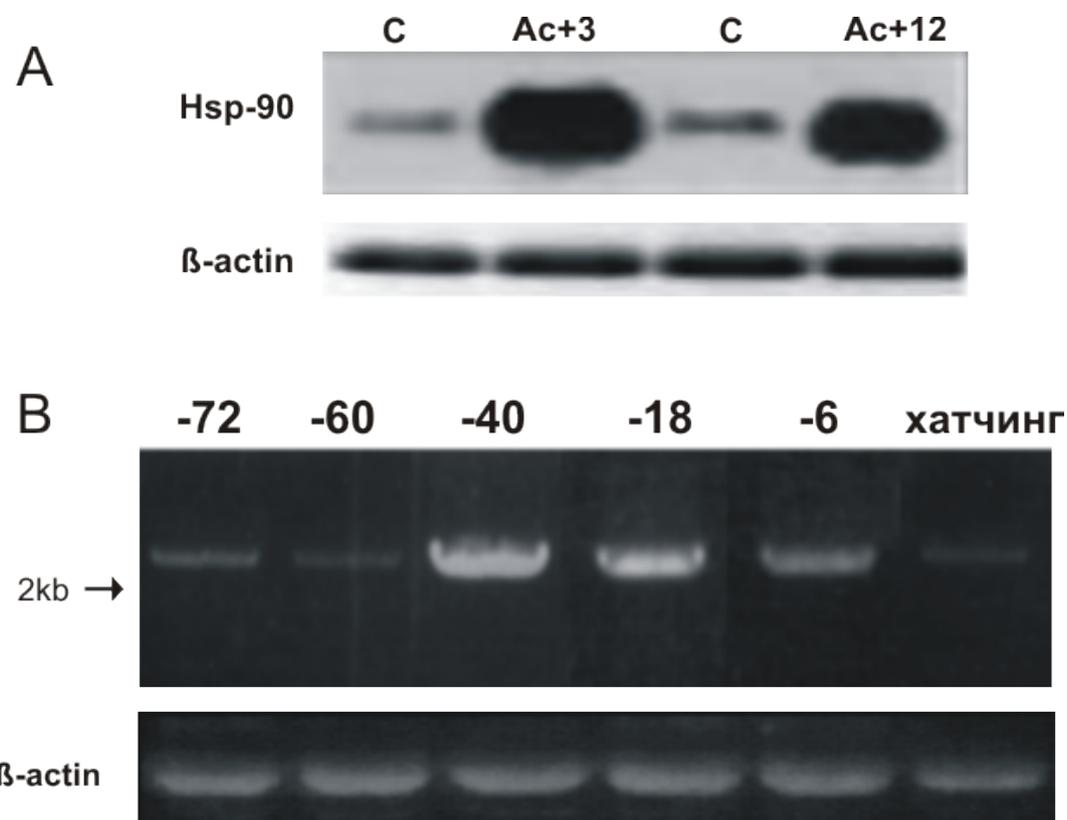


Рис. 4 Эксперессия *hsp-90* гена в развивающихся эмбрионах краба.

А – экспрессия в эмбрионах контрольной и экспериментальной группах (через 3 и 12 часов после инкубации с раствором ацетона). Метод Нозерн блоттинга

В – уровень экспрессии гена в эмбрионах инкубируемых самкой краба. (цифры обозначают часы до момента хатчинга). Метод ОТ-ПЦР.

Методом ОТ-ПЦР с использованием кДНК полученной с тотальной РНК эмбрионов было подтверждено, что HSP-90 гомолог не является просто ответом на химический стресс. На основе экспериментальных данных был сделан вывод, что экспрессия этого гена резко возрастает

также в эмбрионах развивающихся на плеоподах самки (рис. 4В). Увеличение уровня экспрессии было показано на стадии соответствующей 40-45 часам до момента нереста.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение поведенческих, физиологических и молекулярно-биологических аспектов нереста является важным шагом на пути понимания механизмов, лежащих в основе контроля биологических часов, принципиально отличных от циркадианной системы осцилляторов насекомых и позвоночных. Настоящее исследование показало, что с большой долей уверенности можно говорить о том, что упорядоченность и время хатчинга эмбрионов крабов находится в непосредственной зависимости от стимуляции со стороны самки .

К настоящему времени исследования в области нереста ракообразных были сконцентрированы в двух главных направлениях. Первое - это анализ морфологических изменений, происходящих в развивающихся эмбрионах при их переходе к свободно-плавательному образу жизни и структурных компонентах эмбриональной оболочки во время нереста. Второе – это поведенческие и экологические аспекты хатчинга среди эмбрионов и нерестового поведения самок ракообразных в синхронизации с внешними циклами среды. Ни в том, ни в другом случае практически не затрагивались молекулярные механизмы, сопровождающие нерест. Кроме того, к настоящему времени для ракообразных не было выявлено биологически активных веществ, секреция которых непосредственно была бы связана с нерестом.

Нами была выделена и клонирована ранее неизвестная сериновая протеаза (OHSS), непосредственно участвующая в расщеплении яичевой оболочки эмбрионов и облегчающая подготовку плеопод самок к новой

партии кластеров икры. Отметим, что все нерестовые протеазы, известные к настоящему времени в других группах животных принадлежат к семейству металло-протеаз, активность которых определяется присутствием атомов металлов (в большинстве случаев цинка). Тем не менее, рядом исследовательских групп были сделаны предположения о том, что нерестовые протеазы могут быть представлены трипсиновыми протеазами (Coleen et al., 2002). Эти предположения основывались на данных о том, что присутствие ингибитора трипсина блокировало расщепление оболочек яйца, делая нерест невозможным. Результаты нашего исследования впервые полностью подтвердили это предположение. По-видимому, OHSS является первым представителем качественно новой группы нерестовых протеаз, неизвестных до сих пор. Особенностью этого белка является факт того, что структурно он близок к плазменным сериновым протеазам, в большинстве своем выполняющим функцию активации других протеаз. Некаталическая часть OHSS также содержит участок, структурно близкий к активному участку распознавания субстрата хитиназ, что также подразумевает непосредственное участие этого белка в расщеплении структурных элементов кутикулярных образований абдомена самок. Посттрансляционная модификация OHSS тесно связана со временем нереста крабов. По-видимому, последние этапы активации этой протеазы происходят непосредственно в ночь нереста. Это делает дальнейшее изучение OHSS одним из перспективных подходов к пониманию механизма работы внутренних часов крабов. В то же время является вероятным участие OHSS в других физиологических процессах развивающегося эмбриона. Анализ экспрессии гена кодирующего OHSS свидетельствует о том, что транскрипты появляются в развивающихся эмбрионах уже на стадии ранней бластулы, но их дальнейшая судьба нам пока неизвестна.

Другим результатом проведенных исследований является получение метода искусственного инициирования хатчинга в эмбрионах. Нами

впервые показана возможность инициации хатчинга кратковременным воздействием растворов ряда кетонов. То, что эмбрионы, изолированные более чем за 48 часов до ожидаемого момента нереста, вообще не способны перейти в личиночную стадию, позволяет предположить, что действие кетонов сходно с действием некоего стимула передающегося от самки к эмбрионам и иницирующего хатчинг. Кроме того, экспериментальные данные об упорядоченности хатчинга среди изолированных в лаборатории эмбрионах подтверждают предположение о том, что стимуляция самкой эмбрионов происходит несколько раз на протяжении последних 48 часов перед нерестом, что, по-видимому, обеспечивает высокий уровень его синхронизации среди эмбрионов.

Впервые показано участие стрессового белка HSP-90 в программе хатчинга эмбрионов. Усиление секреции стрессовых белков является универсальным ответом организма на разнообразные внешние воздействия. С этой точки зрения нам представляется вероятным, что возможность инициации нереста действием раствора кетонов опосредована именно увеличением уровня содержания стрессовых белков в эмбрионах, что очевидно является одним из ключевых моментов запуска механизма хатчинга.

Данной работе мы выделили и структурно охарактеризовали ряд активных факторов, синтез и функционирование которых непосредственно связаны с контролем времени нереста крабов. Дальнейшие, более детальные исследования молекулярной природы активности этих соединений, также как и механизмы их взаимодействия с другими факторами в развивающихся эмбрионах, в будущем позволят, на наш взгляд, создать целостную картину структуры околопривного осциллятора контролирующего нерест ракообразных.

ВЫВОДЫ

1. Впервые экспериментально выяснена структура синхронизации времени нереста берегового краба *Sesarma haematocheir* с циклами внешней среды. Показана возможность искусственной инициации нереста у изолированных от самки эмбрионов кратковременным воздействием растворов ряда кетонов. Показано наличие у эмбрионов иницируемого внутреннего комплекса физиологических изменений, завершающихся через 45-50 часов высоко синхронизированным среди тысяч эмбрионов хатчингом.

2. Выделена и клонирована новая сериновая протеаза, являющаяся в крабах аналогом нерестовых протеаз других групп животных. Получено экспериментальное подтверждение, ранее высказанное рядом авторов предположение о том, что нерестовые протеазы могут быть представлены не только металлопротеазами, но и сериновыми протеазами.

3. Методами супрессионной вычитающей гибридизации получен ряд генов, избирательно экспрессирующихся лишь у эмбрионов, находящихся в программе хатчинга.

4. Клонирован и структурно охарактеризован новый для ракообразных стрессовый белок HSP-90. Показано, что уровень экспрессии этого шаперона многократно возрастает в эмбрионах как искусственно вовлеченных в программу хатчинга, так и нормально развивающихся на плеоподах самки, за 48-50 часов до предполагаемого хатчинга. На основе экспериментальных данных выдвинута гипотеза о роли HSP-90 в инициации хатчинга эмбрионов крабов.

Основные публикации по теме диссертации

1. Gusev O. The circatidal rhythm of activity of the White Sea barnacle *Balanus balanoides* / O. Gusev, A. Golubev, N. Petrova // Proc. of 32nd COSPAR Sci. Assembly (Nagoya, Japan). – 1998. - С. 383-384.
2. Гусев О.А. Исследования биологических ритмов беспозвоночных Белого моря в лабораторных условиях (методическое пособие) / О.А. Гусев, А.И.Голубев // Изд-во Казанск. ун-та. – Казань, 1999. – 21 с.
3. Gusev O. Tide-associated biological rhythms of some White sea littoral invertebrates / O. Gusev, A. Golubev // Adv. in Space Res., No 28. – 2001. – С. 613-615.
4. Gusev O. Novel HSP-90 protein in semi-terrestrial crab *Sesarma haematocheir* and its possible participation in control of hatching program in embryos / O. Gusev // Proc. of XIX Int. Cong. of Genetics. – 2003. - С. 230-235.
5. Gusev O. Molecular cloning and gene structure of novel serine protease from crab *Sesarma haematocheir* / O. Gusev // Proc. Int. Conf. «GEON-2003». – Kazan. - С. 63-64.
6. Hirano U. К вопросу о происхождении крабовых форм ракообразных / U. Hirano, H. Ikeda, O. Gusev, H. Takada, M. Saigusa // «Uminshi» Official J. Crustacean Soc. of Japan, No 41. – 2003 — С. 10- 13 (на японском языке).
7. Gusev O. Purification and cDNA cloning of the ovigerous-hair stripping substance (OHSS) contained in the hatch water of an estuarine crab *Sesarma haematocheir* / O. Gusev, H. Ikeda, T. Okochi, J. M. Lee, M. Hatakeyama, C. Kobayashi, K. Agata, H. Yamada, M. Saigusa // J. Experimental Biol., No 207 (Pt 4). – 2004. – С. 621-632.

8. Gusev O. Induction of hatching and expression of a 90-KD heat-shock protein (hsp90) induced by organic solvents and its possible participation on 'hatching program' of the embryo in an estuarine crab *Sesarma haematocheir* / O.Gusev, H.Ikeda, Y.Hirano, J.M.Lee, M.Hatakeyama, M.Saigusa // J. Experimental Biol. - 2004 – 8 p. (in press).
9. Gusev O. Chaperons expressions and search for new gravity-related genes in the embryos of crabs and amphibians. / O. Gusev, A. Kashiwagi, and M. Saigusa // Adv. in Space Res.. - 2004 – 5 p. (in press).
10. Гусев О.А. Молекулярный контроль выклева эмбрионов полусухопутного краба *Sesarma haematocheir* (Brachyura: Grapsidae) / О. А. Гусев, А.И. Голубев, М. Сайгуза // Тез.докл. Междунар. научн. семинара «Пробл. репродукции и раннего онтогенеза морских гидробионтов». – Мурманск, 2004. – 2 с. (в печати).