

УДК 593.9:591

ПРОТЕИНАЗЫ С ЖЕЛАТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ИХ УЧАСТИЕ В РЕГЕНЕРАЦИИ АМБУЛАКРА У ГОЛОТУРИЙ *EUPENTACTA FRAUDATRIX* (D'YAKONOV & BARANOVA, 1958) И *CUCUMARIA JAPONICA* (SEMPER, 1868) (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA)

© 2020 г. А. П. Шульга¹, Н. Е. Ламаш^{1, 2, *}

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

²Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок 152742, Россия

*e-mail: ninalamash@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.2019 г.

После доработки 07.02.2020 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

У голотурий *Eupentacta fraudatrix* и *Cucumaria japonica* методом количественной зимографии исследовали спектр протеиназ и динамику их активности в структурах амбулакра в норме, а также и после его поперечного разрезания. Установлено, что желатиназы присутствуют только у голотурии *E. fraudatrix*, у которой выявлено два пула желатиназ. Высокомолекулярный пул представлен одним (132 кДа) или двумя (132 и более 250 кДа) белками, а низкомолекулярный пул – белками с молекулярной массой 53 и 47 кДа. По способности лизировать желатин, но не казеин, а также по чувствительности к ингибиторам разных классов ферментов желатиназы *E. fraudatrix* подобны матриксным металлопротеиназам позвоночных животных. Показано, что активность протеиназ увеличивается после повреждения животного, а селективный ингибитор металлопротеиназ GM6001 блокирует их активность. Высказано предположение, что у голотурий протеиназы с желатиназной активностью являются одним из ключевых факторов регенерации.

Ключевые слова: голотурии, *Eupentacta fraudatrix*, *Cucumaria japonica*, амбулакр, желатиназы, матриксные металлопротеиназы, регенерация

DOI: 10.31857/S0134347520060091

Способность к восстановлению поврежденных или утраченных тканей и органов – одна из важных особенностей живых организмов (Короткова, 1997; Garcia-Artaés, Greenberg, 2001; Carlson, 2007). Регенерация осуществляется за счет миграции клеток организма в место повреждения и их участия в морфогенезе. Основным механизмом направленной миграции и дифференцировки клеток является их взаимодействие с внеклеточным матриксом. Свойства соединительной ткани изменяются под воздействием специальных ферментов – матриксных металлопротеиназ (ММП).

Основная часть сведений о ММП, включая доменную структуру, механизмы активации и ингибирования, а также роль в морфогенезе, относится к ферментам позвоночных животных (Huxley-Jones et al., 2007; Page-McCaw et al., 2007). На основании доменной структуры и субстратной специфичности ММП разделяют на пять подсемейств: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, ММП мембранного типа и ММП, не относящиеся к известным подсемействам. В то же время информация о ММП беспозвоночных фрагментарна, а данные об участии

этих ферментов в процессе регенерации единичны (Page-McCaw et al., 2007; Ribeiro et al., 2012). Белки с коллагеназной активностью обнаружены в регенерирующих структурах гидры и планарии (Sawada et al., 1999; Yan et al., 2000). Несмотря на существенные различия в доменной структуре, данные белки имеют ряд общих свойств с ММП позвоночных животных: они секретируются в виде проферментов, содержат цинк в активном центре, проферменты активируются хаотропными реагентами и тиолмодифицирующими агентами (Angerer et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007).

У иглокожих ММП-подобные белки были впервые обнаружены в развивающихся эмбрионах, а затем в гонадах, спикулах и мышцах морских ежей (Angerer et al., 2006; Ribeiro et al., 2012). Считают, что они регулируют процессы гастрюляции и формирования гиалинового слоя, а также рост спикул у личинок. Высказано предположение о наличии в геноме морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* более 240 генов ММП (Angerer et al., 2006). Несмотря на предполагаемое разнообразие ММП у иглокожих, их роль в регенерации до сих пор не изучена. Имеются лишь единичные

работы по данной проблеме. Так, показано что ММП участвуют в регенерации нерва у морской звезды *Marthasterias glacialis* (см.: Franco et al., 2011), а ММП-подобные протеиназы регулируют развитие скелета эмбрионов морского ежа *Paracentrotus lividus* (см.: Pinsino et al., 2014). Известны работы, посвященные ремоделированию внеклеточного матрикса при регенерации кишечника у голотурий и участию ферментов, обладающих свойствами ММП, в этом процессе (Pasten et al., 2012; Lamash, Dolmatov, 2013). Анализ транскриптомов регенерирующих органов голотурий выявил активность генов, гомологичных генам ММП позвоночных (Sun et al., 2011; Mashanov et al., 2014; Dolmatov et al., 2018). Однако продукты этих генов не идентифицированы.

Ранее у голотурии *Eupentacta fraudatrix* охарактеризованы 4 протеиназы; показана их роль в процессе регенерации кишки и аквафарингеального комплекса (Lamash, Dolmatov, 2013), а также получено экспериментальное подтверждение ингибирования процесса регенерации у этого вида голотурий синтетическим ингибитором ММП — GM6001 (Dolmatov et al., 2019). В тоже время сами протеиназы — возможные мишени данного ингибитора, не были установлены. Кроме этого, показано, что у голотурии *Cucumaria japonica*, не обладающей способностью к заживлению кожной раны (Долматов, Машанов, 2007), отсутствует желатиназная активность в месте повреждения (Dolmatov et al., 2019). Цели настоящего исследования — с помощью биохимических методов выявить протеиназы в амбулакре у голотурий *E. fraudatrix* и *C. japonica*, установить природу этих протеиназ и изучить динамику их активности при регенерации амбулакра у *E. fraudatrix*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали следующие реактивы: 1,10-фенантролин (P9375, Sigma), фенолметансульфонил фторид (ФМСФ) (P7626, Sigma), бестатин гидрохлорид (B8385, Sigma), N-этилмалеимид (НЭМ) (128-53-0, Sigma), E-64 (E3132, Sigma), желатин из свиной кожи (G8150, Sigma), казеин из коровьего молока (C6554, Sigma), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир)-N, N, N', N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), 4-аминофенилртути ацетат (APMA) (A9563, Aldrich), преокрашенные стандарты молекулярных масс PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (26620, Thermo Scientific, США), изготовленные фирмой "Bio-Rad" реактивы для электрофореза и дитиотриетол (ДТТ) (161-0611), а также ингибитор матриксных металлопротеиназ GM6001 (2983, Tocris Bioscience, UK).

Исследования проводили на половозрелых особях голотурий *Eupentacta fraudatrix* и *Cucumaria japonica*, собранных в зал. Петра Великого Японского моря. После отлова и во время экспериментов животных содержали в аквариумах с аэрируемой

морской водой. Повреждение наносили ножницами приблизительно в середине тела, перерезая его стенку и правый дорзальный амбулакр. Поскольку скорость восстановления у *E. fraudatrix* зависит от температуры воды, при взятии материала ориентировались на стадии регенерации амбулакра. Материал брали в сроки, соответствующие первой, второй и третьей стадиям. Первая стадия — заживление кожной раны; вторая стадия — начало регенерации структур амбулакра; третья стадия — окончание регенерации, она характеризуется восстановлением целостности перерезанных структур амбулакра (Dolmatov et al., 1996; Dolmatov, Ginanova, 2001; Dolmatov et al., 2007).

Одновременно отбирали образцы тканей у интактных голотурий, которые содержались в таких же условиях, как и экспериментальные животные. Эксперименты с перерезкой амбулакра у *C. japonica* проводили в осенне-зимний период при температуре воды 12–14°C. У этого вида материал для исследования брали через 13 и 28 сут после повреждения.

Для получения гомогенатов в месте ранения вырезали участок амбулакра с подлежащей гиподермой размером 3 × 3 мм у *E. fraudatrix* и 5 × 5 мм у *C. japonica*. У интактных животных вырезали такой же по размеру участок правого дорзального амбулакра в средней части тела. Навеску ткани, полученную от одного животного, гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора 3 раза по 5 с при температуре 4°C в 50 мМ Трис-НСI буфере, рН 7.8, содержащем 1% Тритон X-100 в соотношении 1 : 3. Образец инкубировали на холоде в течение 30 мин, повторно гомогенизировали и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин, 4°C на центрифуге Eppendorf 5417R. Супернатант сразу замораживали и хранили при температуре –80°C не более 30 сут.

ДСН-ПААГ электрофорез и зимография

Активность протеиназ исследовали методом количественной зимографии, подробно описанном ранее (см.: Lamash, Dolmatov, 2013). После электрофореза (10% ДСН-ПААГ, сополимеризованный с 0.1% желатином или казеином в качестве субстрата) додецилсульфат натрия (ДСН) удаляли из гелей несколькими промываниями с помощью 2.5% Тритон X-100 в 50 мМ Трис-НСI, рН 7.5. Затем зимограммы инкубировали в течение 18 ч при температуре 30°C в этом же буфере с 100 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ и 0.02% NaN₃. При проведении зимографии в инкубационную среду вносили модификаторы ферментативной активности: тиолмодифицирующий агент — ДТТ (1 мМ), ZnCl₂ (2.5 мМ), MgCl₂ (55 мМ), хелаторы двухвалентных ионов — ЭДТА (5 или 10 мМ) и ЭГТА (5 мМ), ингибитор сериновых и треониновых протеиназ — ФМСФ (0.5 мМ), ингибиторы аминопептидаз — бестатин (0.5 мМ) и НЭМ (0.1 мМ), ингибитор цистеиновых протеиназ — E-64 (0.01 мМ), ингибитор цинковых металлопротеиназ — 1,10-фенантролин

(2 мМ) и селективный ингибитор матриксных металлопротеиназ – GM6001 (0.1 мМ).

Для изучения влияния рН на уровень желатиназной активности использовали два буфера: 25 мМ МЭС (2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты гидрат), 100 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, рН 3.5–5.8 и 25 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 100 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, рН 6.8–10. Гели окрашивали 2.5% Кумасси синим R-250 в 50% метаноле и 10% ледяной уксусной кислоте в течение 30 мин и промывали в течение 1–2 мин в 30% метаноле и 10% уксусной кислоте. Неокрашенные полосы на зимограмме указывали на присутствие протеиназ, разрушающих желатин.

В качестве активатора желатиназы использовали АРМА – стимулятор ММП позвоночных животных (Springman et al., 1990; Nagase, 1996). Эффект АРМА на желатиназы голотурий исследовали с помощью ранее описанного метода (см.: Knäuper, Murphy, 2010). Готовили 10 мМ стоковый раствор АРМА разведением 70.4 мг АРМА в 400 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим добавлением 19.6 мл буферного раствора 50 мМ Трис-НCl, рН 7.8. Гомогенаты преинкубировали в 50 мМ Трис-НCl, рН 7.8, 10 мМ CaCl₂ без раствора или с раствором АРМА (конечная концентрация 1 мМ) при 37°C в течение 30, 60 и 120 мин. После инкубации образцы анализировали с помощью метода количественной зимографии, как описано выше.

После сканирования зимограмм проводили денситометрический анализ с использованием компьютерных программ ImageQuant 5.2 и GrafPad Prism 3. Об активности ферментов судили по плотности зоны лизиса на инвертированном изображении сканированного геля. Уровни желатинолитической активности определяли по денситометрическим значениям. Активность ферментов выражали в процентах от общей желатиназной активности, измеренной на приведенной зимограмме для фермента этой молекулярной массы. Измерения каждого образца производили не менее трех раз и в трех разных гелях.

Концентрацию белка в пробах для зимографии определяли методом Бредфорда (Kruger, 2009). Предварительно в пробы, содержавшие Тритон X-100, добавляли ДСН до конечной концентрации 2% (Dulley, Grieve, 1975). Содержание белка в пробе рассчитывали по калибровочному графику. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Иммуноблоттинг

После проведения электрофореза в 10% ДСН-ПААГ белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Для блокировки неспецифического связывания мембрану оставляли на ночь в 0.01М Трис-буферном растворе (ТБС, 0.01М Трис-НCl, 0.15М NaCl, рН 8.0), содержавшем 4% БСА. Затем мем-

браны ополаскивали в дистиллированной воде и инкубировали с кроличьими поликлональными антителами, полученными к каталитическому домену ММП-9 человека, в разведении 1/1000 (AB19016, Merck) в ТБС, содержавшем 1% БСА и 0.2% Твин-20, в течение 12 ч при 4°C. По окончании инкубации мембраны промывали на шейкере в ТБС, содержавшем 0.2% Твин-20, 2 раза по 10 мин. Далее мембраны инкубировали в том же буфере со вторыми антителами, меченными пероксидазой хрена (PI-1000, Vector Laboratories, США, разведение 1/10000), в течение 1.5 ч. После трехкратной промывки в течение 10 мин мембрану окрашивали с использованием системы проявления Vector VIP Substrate (SK4600, Vector Laboratories, Калифорния, США). После проявления окраски мембраны 5 мин промывали в дистиллированной воде и сушили. Молекулярную массу белка определяли по подвижности предварительно окрашенных маркеров молекулярной массы.

Статистический анализ

Результаты представлены в виде средних значений и стандартной ошибки (SE). Количество животных для каждого измерения составляло не менее трех. Сравнительный анализ полученных данных проводили с использованием ANOVA Крускала–Уоллиса для непараметрической статистики, с $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявление протеиназ

На зимограммах гомогенатов тканей неповрежденных особей *Eupentacta fraudatrix* присутствовали два пула белков, обладающих литической активностью в отношении желатина. Высокомолекулярный пул протеиназ представлен одним (132 кДа) или двумя (132 и более 250 кДа) белками (рис. 1; дорожки 1, 2, 3). Низкомолекулярный пул протеиназ представлен белками с молекулярной массой 53 и 47 кДа. Иногда протеиназы 53 и 47 кДа плохо разделялись при электрофорезе и выявлялись на зимограмме в виде одного пятна с размытыми границами. У некоторых животных активность низкомолекулярных протеиназ была очень низкой или отсутствовала (рис. 1, дорожка 2). Ни один из обнаруженных белков не проявлял протеолитическую активность в отношении казеина. В гомогенатах тканей неповрежденных особей *Cucumaria japonica* белки с протеолитической активностью в отношении желатина не выявлены (рис. 1, дорожка 4).

Иммуноблоттинг гомогенатов тканей интактных особей *E. fraudatrix* показал, что по подвижности два иммунологически подобные ММП-9 белка соответствуют желатиназам 53 и 47 кДа, которые выявляются на зимограмме (рис. 2).

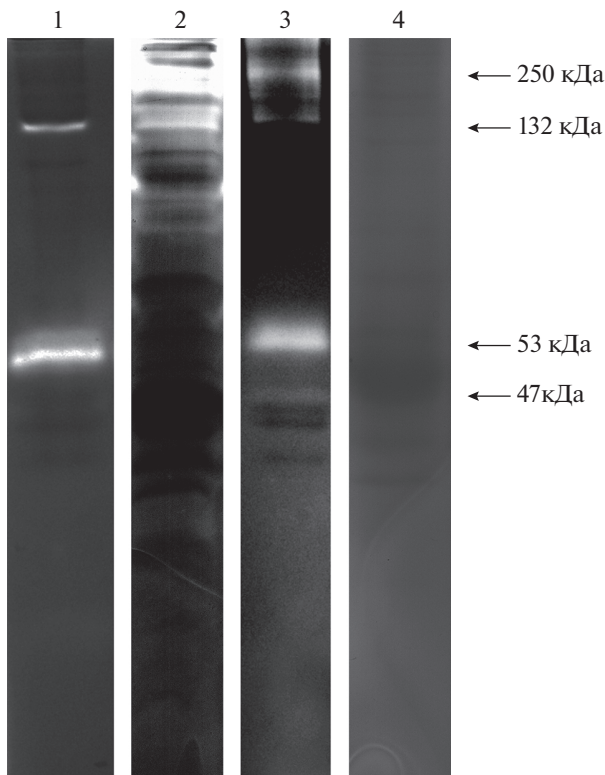


Рис. 1. Состав протеиназ амбулакра интактных особей *Eupentacta fraudatrix* (дорожки 1, 2, 3) и *Cucumaria japonica* (дорожка 4). Стрелки указывают зоны лизиса на зимограмме и молекулярные массы протеиназ (кДа).

Влияние pH на активность протеиназ

Желатиназная активность всех протеиназ зависела от pH инкубационной среды (рис. 3). Высокомолекулярные белки проявляли активность в диапазоне pH 5.8–8.8, а низкомолекулярные – при pH 6.9–8.8. Активность всех протеиназ была максимальной при pH около 7.8. При pH больше 9 все протеиназы быстро теряли активность (рис. 3).

Влияние ингибиторов и активаторов

Для классификации выявленных протеиназ исследовали влияние на их протеолитическую активность низкомолекулярных активаторов и ингибиторов ММП разных классов. ДТТ подавлял активность всех протеиназ. Хелаторы двухвалентных ионов ЭДТА (5 мМ) и ЭГТА (5 мМ) ингибировали активность только низкомолекулярных протеиназ (табл. 1). Однако увеличение концентрации ЭДТА до 10 мМ приводило к подавлению активности и высокомолекулярных белков. Введение в среду инкубации ионов магния не восстанавливало активность ингибированных ЭГТА протеиназ.

ФМСФ, бестатин и НЭМ не влияли на желатинолитическую активность белков. Ингибитор цинковых металлопротеиназ 1,10-фенантролин и ингибитор ММП GM6001 полностью подавляли

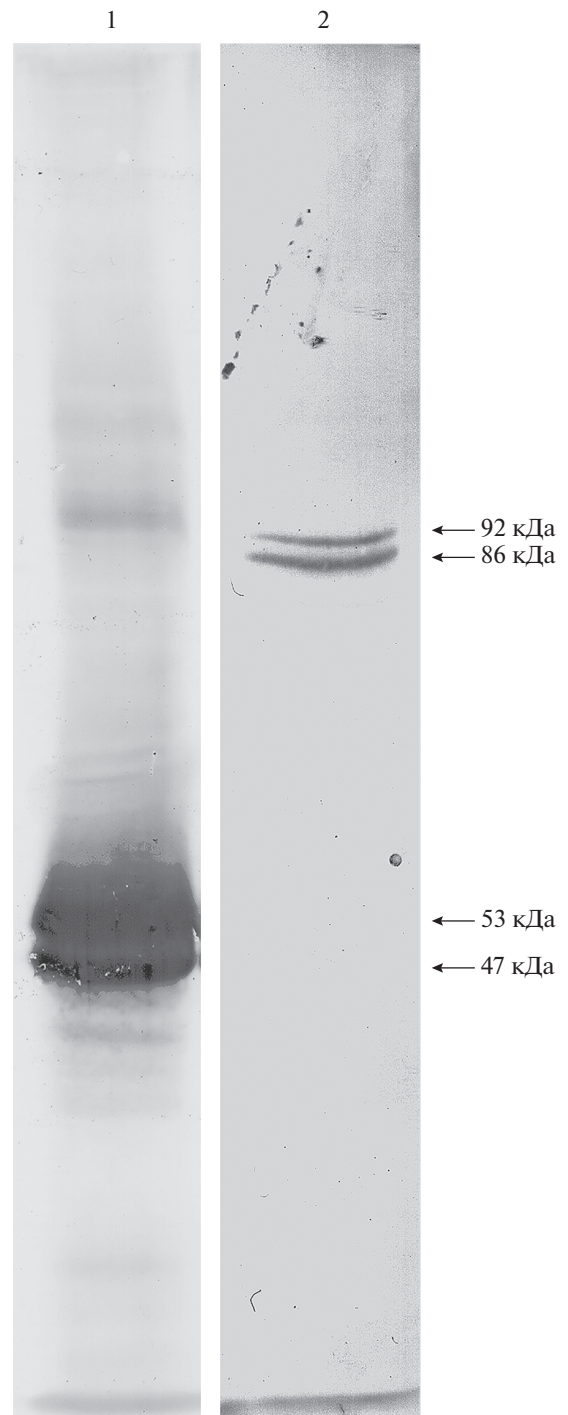


Рис. 2. Иммуноблотт гомогената амбулакра *Eupentacta fraudatrix* с АТ-ММП-9 (1/1000 dilution, AB19016, Merck) (дорожка 1). Положительный контроль – гомогенат мозга крысы (дорожка 2).

активность низкомолекулярных протеиназ и значительно снижали активность высокомолекулярных комплексов (рис. 4).

При использовании активатора ММП АРМА на зимограммах регистрировали добавочные зоны лизиса, которые соответствовали редуцированным

формам фермента (рис. 5). Уже через 30 мин инкубации с АРМА выявлялись зоны лизиса в области белка с молекулярной массой около 20 кДа. Нарастание литической активности этого белка коррелировало со снижением активности протеиназы 53 кДа и зависело от времени преинкубации с АРМА. Через 60 мин преинкубации с АРМА активность протеиназы в области 53 кДа уже не определялась (рис. 5). Значимого изменения активности высокомолекулярных протеиназ при действии АРМА не выявлено.

Динамика активности протеиназ при регенерации амбулакра

На зимограммах гомогенатов тканей интактных особей *E. fraudatrix* на протяжении всего эксперимента выявлялись только протеиназы 132 и 250 кДа, активность которых поддерживалась на одном уровне. У экспериментальных животных на первой стадии регенерации активность протеиназы 132 кДа увеличивалась более чем в 2 раза, а активность комплекса 250 кДа значительно снижалась (рис. 6). На второй стадии регенерации активность обеих протеиназ возрастала. Кроме этого на зимограммах регистрировалась область лизиса в районе 53 кДа. На третьей стадии регенерации сохранялась высокая активность всех протеиназ. В амбулакре *S. japonica* в месте перерезки белки с желатиназной активностью не выявлены ни через 13 сут, ни через 28 сут после операции.

Сравнительный анализ спектров ММП амбулакра и кишки *E. fraudatrix*

Для сравнения спектра протеиназ при разных способах повреждения проведен анализ желатиназной активности в амбулакре и кишке одной и той же особи *E. fraudatrix* после электрофоретического разделения и зимографии в одном геле. Оказалось, что активность белков в кишке была значительно выше, чем в амбулакре голотурии. Спектры выявляемых желатиназ совпадали и были представлены протеиназами с одинаковыми молекулярными массами (рис. 7). Однако необходимо отметить, что у некоторых животных в амбулакре выявлялись комплексы с молекулярной массой более 250 кДа, тогда как в кишке таковые не обнаружены. Кроме этого в амбулакре, в

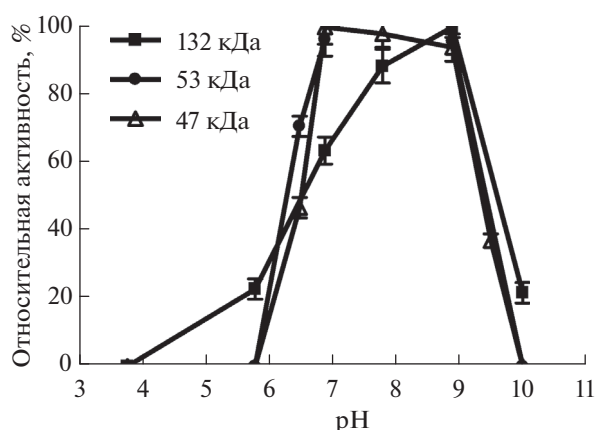


Рис. 3. Влияние pH на активность протеиназ амбулакра *Eupentacta fraudatrix*.

отличие от кишки, число выявляемых желатиназ варьировало и не всегда присутствовал пул низкомолекулярных желатиназ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование показало, что голотурии могут различаться по наличию в их тканях желатиназ. У неповрежденных особей *Cucumaria japonica* мы не смогли выявить протеиназы с желатиназной активностью. В то же время у *Eupentacta fraudatrix* в структурах амбулакра обнаружены 250, 132, 53 и 47 кДа белки с гидролитической активностью в отношении желатина, но не казеина. Хелаторы двухвалентных ионов ЭДТА и ЭГТА ингибировали их активность, и в безкальциевой среде ионы магния ее не восстанавливали. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные желатиназы являются кальций-зависимыми металлопротеиназами, каталитическая функция которых связана с разрушением белков внеклеточного матрикса. Как и большинство эндопептидаз (Nagase, 1996), желатиназы *E. fraudatrix* максимально активны в нейтральной и слабощелочной среде (оптимум pH 7.8) и теряют активность при pH больше 9. Значение pH-оптимума действия желатиназ голотурий соответствует таковому желатиназ морских ежей (Ribeiro et al., 2012).

Тем не менее высокомолекулярные желатиназы *E. fraudatrix* были активны уже при pH 5.8, что

Таблица 1. Влияние низкомолекулярных ингибиторов ферментов на уровень желатиназной активности тканевых белков голотурии *Eupentacta fraudatrix*

Ингибитор	Концентрация ингибитора, Мм	Ингибирование, %			
		250 кДа	132 кДа	53 кДа	47 кДа
ЭДТА	5	57 ± 3	60 ± 1	100	100
ЭДТА	10	100	100	100	100
ЭГТА	5	21 ± 2	35 ± 3	100	100
ЭГТА + MgCl ₂	5 + 55	30 ± 2	33 ± 2	100	100
ДТТ	2.5	70 ± 1	100	100	100

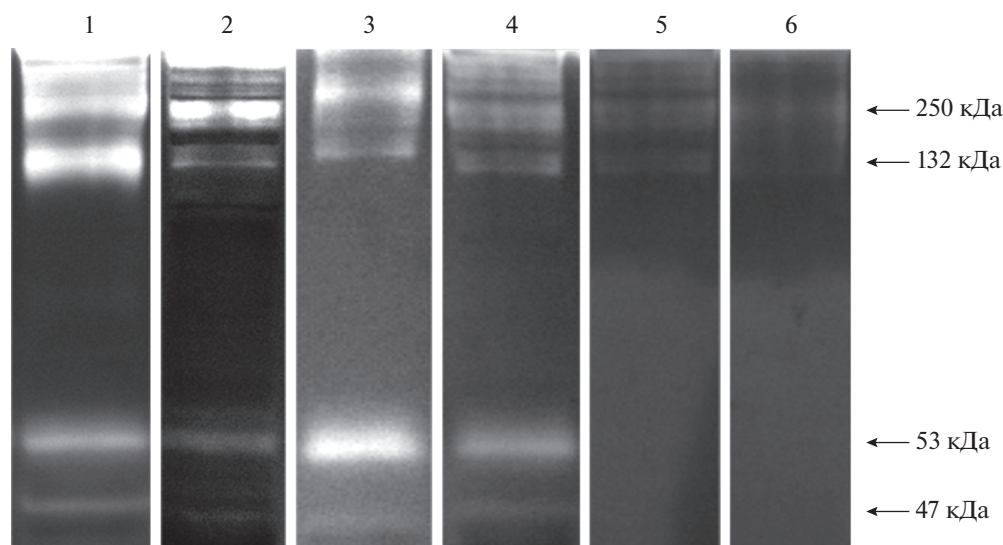


Рис. 4. Эффект ингибиторов на активность протеиназ амбулакра *Eupentacta fraudatrix*. На каждой зимограмме представлены гомогенаты регенератов от двух животных. 1 – без ингибиторов, а также при добавлении: 2 – 0.5 мМ бестаина, 3 – 1 мМ НЭМ, 4 – 0.5 мМ ФМСФ, 5 – 2 мМ 1,10-фенантролина и 6 – 0.1 мМ GM6001.

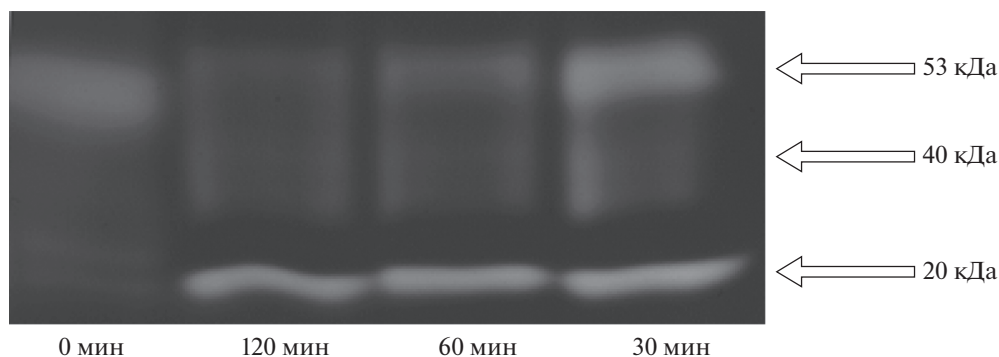


Рис. 5. Эффект активатора ММП – АРМА на протеиназу 53 кДа в зависимости от времени инкубации при температуре 37°C.

указывает на их бóльшую устойчивость к кислой среде по сравнению с низкомолекулярными. Возможно, это связано с тем, что белки 132 и 250 кДа могут представлять собой олигомерные комплексы. В таких комплексах каталитический центр фермента часто экранирован аминокислотными группами и защищен от колебаний рН среды. В пользу этого предположения свидетельствуют данные по влиянию ЭДТА на активность желатиназ: для полного подавления активности высокомолекулярных желатиназ требовались бóльшие его концентрации, чем для ингибирования низкомолекулярных желатиназ.

Для идентификации желатиназ мы использовали метод с применением групповых ингибиторов, который считается достаточно информативным (Barrett, 1980). Ингибиторы сериновых и треониновых протеиназ (ФМСФ), аминопептидаз (бестатин и НЭМ) и цистеиновых протеиназ (E-64) оказались неэффективными в отношении изучаемых ферментов. В то же время хелатирующие ингибиторы цинк-зависимых металлопротеиназ 1,10-фенантролин и GM6001 подавляли или зна-

чительно снижали литическую активность желатиназ *E. fraudatrix*.

GM6001 – достаточно специфичный ингибитор ММП (Yamamoto et al., 1998; Hao et al., 1999; Antczak et al., 2008). Его влияние на активность протеиназ *E. fraudatrix* свидетельствует о том, что все желатиназы, выявленные нами в амбулакре голотурии, могут быть отнесены к семейству ММП. Этот вывод частично подтверждают и данные иммуноблоттинга. Несмотря на большие различия в структуре ММП иглокожих и позвоночных, каталитические домены протеиназ у этих животных очень схожи (Angerer et al., 2006; Dolmatov et al., 2018). Вероятно, использованные нами антитела к ММП-9 человека связывались именно с каталитическими доменами протеиназ 53 и 47 кДа *E. fraudatrix*. Отсутствие ММП-9-иммунореактивности с высокомолекулярными белками, возможно, связано с недоступностью каталитического домена в данных комплексах для иммуноглобулинов.

По молекулярной массе и чувствительности к ингибиторам, а также по способности гидролизовать желатин, но не казеин, выявленные у *E. fraudatrix*

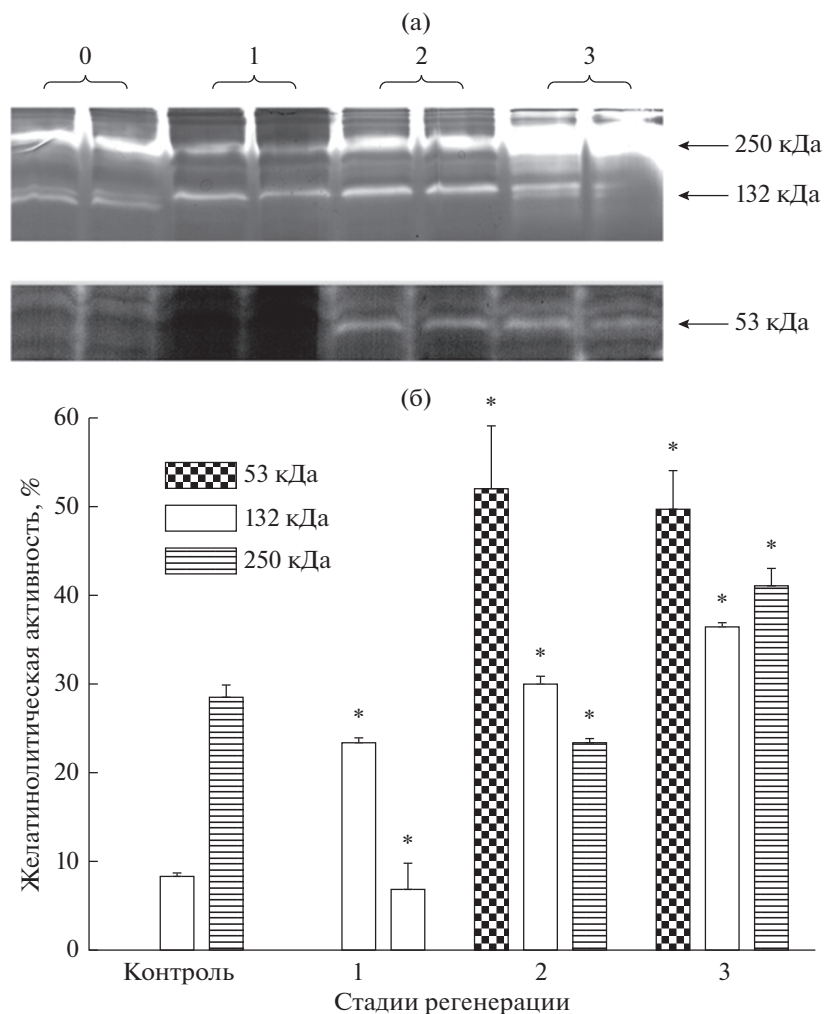


Рис. 6. Динамика активности протеиназ в ходе восстановления стенки тела и мышц *Eupentacta fraudatrix* после перерезки: а – фрагменты зимограммы; б – количественная оценка активности протеиназ.

trix желатиназы 53 и 132 кДа соответствуют протеиназам 53 и 132 кДа, обнаруженным в кишке и аквафарингеальном комплексе этой голотурии (Lamash, Dolmatov, 2013). Отличительными чертами желатиназ амбулакра являются наличие высокомолекулярного комплекса с молекулярной массой более 250 кДа и нестабильность числа низкомолекулярных белков, выявляемых на зимограмме. В наших экспериментах у одних особей низкомолекулярные желатиназы не выявлялись, а у других особей они были представлены лишь белком 53 кДа или, редко, двумя белками (53 и 47 кДа).

Одной из причин появления на зимограмме фрагментов с разной молекулярной массой может быть аутокаталитическое расщепление протеиназ в процессе экстракции их из тканей (Snoek-van Beurden, Von den Hoff, 2005). Чтобы исключить этот эффект, экстракцию протеиназ проводят в присутствии ЭДТА. Мы вводили в состав буфера для гомогенизации 5 мМ ЭДТА, однако это не влияло на число выявляемых на зимограмме желатиназ (данные не приведены).

Известно, что все белки семейства ММП синтезируются в виде неактивного профермента (Woessner, 1991). Его активация сопровождается диссоциацией Zn^{2+} -Cys-связи и отщеплением пептида с молекулярной массой 4–15 кДа (Соловьева, 1998). В большинстве случаев активация проферментов происходит ступенчато и сопровождается образованием частично активированных форм с меньшей молекулярной массой, которые выявляются на зимограмме. В искусственных условиях про-ММП могут быть активированы АРМА с образованием форм ферментов с меньшей молекулярной массой (Nagase, 1996). В наших экспериментах преинкубация гомогенатов тканей с АРМА приводила к ступенчатой деградации желатиназы 53 кДа и к появлению на зимограмме белка с молекулярной массой 20 кДа. Поскольку методом зимографии выявляются все формы ММП – активные, промежуточные и неактивные (Snoek-van Beurden, Von den Hoff, 2005), то невозможно определить, является ли белок 20 кДа активированной формой желатиназы. Нельзя также

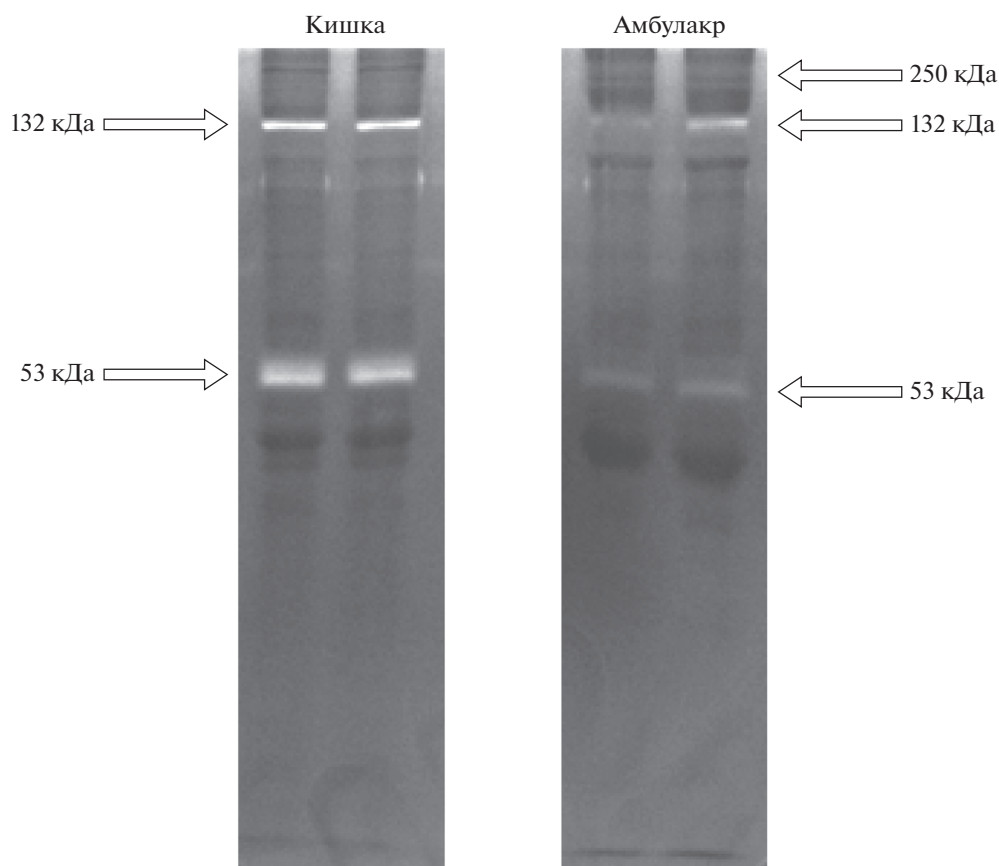


Рис. 7. Экспрессия белков в амбулакре и кишке одной и той же особи *Eupentacta fraudatrix* после электрофоретического разделения и зимографии в одном геле.

исключить, что он может быть продуктом автокаталитического распада желатиназы, поскольку на зимограммах выявляется только в экспериментах с АРМА. В любом случае отмеченная нами способность сохранять каталитическую активность при утрате части молекулы свидетельствует о доменной структуре желатиназы 53 кДа, что характерно для ММП (Nagase, 1996).

У позвоночных животных некоторые ММП могут формировать высокомолекулярные олигомерные комплексы (Olson et al., 2000). Эти комплексы диссоциируют при действии АРМА с образованием форм фермента с меньшей молекулярной массой. Отсутствие эффекта АРМА на высокомолекулярные желатиназы амбулакра *E. fraudatrix* и неоднозначность результатов диссоциации желатиназы 53 кДа свидетельствуют о том, что механизм действия АРМА на желатиназы голотурий отличается от такового на желатиназы ММП-2 и ММП-9 позвоночных животных.

Еще одной причиной разнородности спектра выявляемых желатиназ голотурий может быть определенное физиологическое состояние животных. Например, в лиганентах, соединяющих скелетные элементы морского ежа *Paracentrotus lividus*, выявлено несколько белков, обладающих желатинолитической активностью, с молекуляр-

ной массой от 35 до 250 кДа (Ribeiro et al., 2012). Установлено, что число выявляемых на зимограмме желатиназ и их общая активность зависят от механического состояния так называемой изменчивой коллагеновой ткани. Причем основные изменения профиля желатиназной активности наблюдали на зимограммах в области миграции высокомолекулярных белков.

Интересно, что набор протеиназ в разных органах у *E. fraudatrix* различается. В пищеварительной системе и аквафарингеальном комплексе выявлен более широкий спектр низкомолекулярных желатиназ: 58, 53 и 47 кДа (Lamash, Dolmatov, 2013), тогда как в амбулакре присутствует белок 53 кДа и очень редко 47 кДа. Различия в спектре протеиназ в разных органах указывают на разные механизмы поддержания тканевого гомеостаза у голотурий.

Изученные виды голотурий различаются по экспрессии желатиназ после повреждения. У *S. japonica* в месте разреза не обнаружено желатиназной активности ни биохимическими методами (наши данные), ни методом зимографии *in situ* (см.: Dolmatov et al., 2019). У *E. fraudatrix* выявлено несколько протеиназ, активность которых изменялась в процессе морфогенеза, что говорит об их участии в регенерации. На ранних сроках после перерезки при заживлении раны и подготовке

тканей к регенерации (первая стадия) активируются высокомолекулярные протеиназы. На первой стадии заживления происходит синтез внеклеточного матрикса в месте раны, в результате чего отверстие в стенке тела закрывается, а между перерезанными структурами амбулакра формируется прослойка соединительной ткани. Экспрессия белка 53 кДа возрастает только на стадии начала регенерации (вторая стадия), когда начинается рост перерезанных концов радиального нерва и амбулакального канала. Между концами продольных мышечных лент формируется соединительно-тканное утолщение — своеобразный каркас будущей мышцы. Мигрирующие на его поверхность клетки целомического эпителия начинают трансформироваться в миогенные клетки. В них появляются миофиламенты. Группы таких клеток погружаются в подлежащий внеклеточный матрикс, формируя в дальнейшем новые мышечные пучки. Высокая активность всех протеиназ сохранялась и на третьей стадии. Эта стадия характеризуется тем, что концы нервных тяжей объединяются, формируя единый нервный тяж. Восстанавливается целостность амбулакального канала. В соединительно-тканном зачатке продольных мышечных лент заканчивается миграция клеток целомического эпителия и завершается формирование мышечных пучков. Между скоплениями новых мышечных пучков и целомическим эпителием формируется прослойка соединительной ткани. Изменение протеиназной активности ранее отмечено также при регенерации пищеварительной системы и аквафарингеального комплекса у *E. fraudatrix* (см.: Lamash, Dolmatov, 2013).

Сравнительный анализ динамики активности протеиназ после разных типов повреждения (эвисцерация и перерезка амбулакра) выявил общие черты экспрессии этих ферментов при регенерации. На первых этапах восстановления активируются высокомолекулярные протеиназы, а на поздних стадиях регенерации в период дифференцировки и формирования утраченных структур решающее значение имеет экспрессия белков с молекулярной массой от 47 до 58 кДа (Lamash, Dolmatov, 2013, данное исследование). Выявленное нами разнесение во времени экспрессии и результаты зимографии *in situ*, а также литературные данные анализа транскриптомов голотурий (Sun et al., 2011; Mashanov et al., 2014; Dolmatov et al., 2018) свидетельствуют о существовании у голотурий нескольких ММП, которые регулируют разные этапы процесса регенерации.

Таким образом, в органах амбулакра голотурии *E. fraudatrix* нами выявлены 4 протеиназы, которые по своим свойствам сходны с желатиназами позвоночных. Их активность возрастает после повреждения животного, что, вероятно, способствует перестройке внеклеточного матрикса и миграции клеток, а в конечном итоге, восстановлению структур амбулакра. Отсутствие экспрессии ММП у *S. japonica* как в норме, так и после повреждения, по-видимому, является одной из

причин отсутствия регенерации у этого вида. В этой связи мы предполагаем, что ММП с желатиназной активностью являются одним из ключевых факторов регенерации у голотурий.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00574.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность И.Ю. Долматову (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН) за помощь в проведении экспериментов, за обсуждение результатов и постоянное внимание к работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука. 2007. 212 с.
- Короткова Г.П. Регенерация животных. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. 1997. 480 с.
- Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. № 4. С. 245–255.
- Angerer L., Hussain S., Wei Z. et al. Sea urchin metalloproteases: a genomic survey of the BMP-1/tolloid-like, MMP and ADAM families // J. Dev. Biol. 2006. V. 300. P. 267–281.
- Antczak C., Radu C., Djaballah H. A profiling platform for the identification of selective metalloprotease inhibitors // J. Biomol. Screening. 2008. V. 13. № 4. p. 285–294.
- Barrett A.J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates // Biochem. J. 1980. V. 187. P. 909–912.
- Carlson B.M. Tissue engineering and regeneration // Principles of Regenerative Biology. Elsevier. 2007. P. 259–278.
- Dolmatov I.Y., Afanasyev S.V., Boyko A.V. Molecular mechanisms of fission in echinoderms: transcriptome analysis // PloS One. 2018. V. 13. P. e0195836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195836>
- Dolmatov I.Y., Eliseikina M.G., Bulgakov A.A. et al. Muscle regeneration in the holothurian *Stichopus japonicus* // Roux's Arch. Dev. Biol. 1996. V. 205. P. 486–493.
- Dolmatov I.Y., Ginanova T.T. Muscle regeneration in holothurians // Microsc. Res. Tech. 2001. V. 55. P. 452–463.
- Dolmatov I.Y., Mashanov V.S., Zueva O.R. Derivation of muscles of the Aristotle's lantern from coelomic epithelia // Cell Tissue Res. 2007. V. 327. P. 371–384.
- Dolmatov I.Y., Shulga A.P., Ginanova T.T. et al. Metalloproteinase inhibitor GM6001 delays regeneration in holothurians // Tissue Cell. 2019. V. 59. P. 1–9.

- Dulley J.R., Grieve P.A. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination // *Anal. Biochem.* 1975. V. 64. № 1. P. 136–141.
- Franco C.F., Santos R., Coelho A.V. Exploring the proteome of an echinoderm nervous system: 2-DE of the sea star radial nerve cord and the synaptosomal membranes subproteome // *Proteomics*. 2011. V. 11. № 7. P. 1359–1364.
- Hao J.L., Nagano T., Nakamura M. et al. Effect of galardin on collagen degradation by *Pseudomonas aeruginosa* // *Exp. Eye Res.* 1999. V. 69. № 6. p. 595–601.
- Huxley-Jones J., Robertson D.L., Boot-Handford R.P. On the origins of the extracellular matrix in vertebrates // *Matrix Biol.* 2007. V. 26. P. 2–11.
- Knäuper V., Murphy G. Methods for studying activation of matrix metalloproteinases // *Matrix Metalloproteinase Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa NJ: Humana Press. 2010. P. 233–243.
- Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation // *The Protein Protocols Handbook*. Totowa NJ: Humana Press. 2009. P. 17–24.
- Lamash N.E., Dolmatov I.Y. Proteases from the regenerating gut of the holothurians *Eupentacta fraudatrix* // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e58433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058433>
- Mashanov V.S., Zueva O.R., Garcia-Ararras J.E. Transcriptomic changes during regeneration of the central nervous system in an echinoderm // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 357. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-357>
- Nagase H. Matrix metalloproteinases // *Zinc Metalloproteinases In Health Disease*. (Ed. Nigel M. Hooper). USA: CRC Press, Taylor & Francis group. 1996. P. 173–224.
- Olson M.W., Bernardo M.M., Pietila M. et al. Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9 differential rates for activation by stromelysin 1 // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 2661–2668.
- Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 221–233.
- Pasten C., Rosa R., Ortiz S. et al. Characterization of proteolytic activities during intestinal regeneration of the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. V. 56. P. 681.
- Pinsino A., Roccheri M.C., Matranga V. Manganese overload affects p38 MAPK phosphorylation and metalloproteinase activity during sea urchin embryonic development // *Mar. Environ. Res.* 2014. V. 93. P. 64–69.
- Ribeiro A.R., Barbaglio A., Oliveira M.J. et al. Matrix metalloproteinases in a sea urchin ligament with adaptable mechanical properties // *PLoS One*. 2012. V. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049016>
- Sawada T., Oofusa K., Yoshizato K. Characterization of a collagenolytic enzyme released from wounded planarians *Dugesia japonica* // *Wound Repair Regener.* 1999. V. 7. P. 458–466.
- Snoek-van Beurden P.A.M., Von den Hoff J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors // *Biotechniques*. 2005. V. 38. P. 73–83.
- Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H. et al. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. V. 87. P. 364–368.
- Sun L., Chen M., Yang H. et al. Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Comp. Biochem. Physiol., Part D: J. Genomics Proteomics*. 2011. V. 6. P. 195–205.
- Woessner Jr J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 2145–2154.
- Yamamoto M., Tsujishita H., Hori N. et al. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase by hydroxamate inhibitors: an examination of the subsite pocket // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. № 8. P. 1209–1217.
- Yan L., Leontovich A., Fei K.Y. et al. Hydra metalloproteinase 1: a secreted astacin metalloproteinase whose apical axis expression is differentially regulated during head regeneration // *Dev. Biol.* 2000. V. 219. P. 115–128.

Proteinases with Gelatinase Activity and their Role in Ambulacrum Regeneration in Holothurians *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov & Baranova, 1958) and *Cucumaria japonica* (Semper, 1868) (Echinodermata: Holothuroidea)

A. P. Shulga^a and N. E. Lamash^{a, b}

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^bI.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok 152742, Russia

The spectrum of proteinases and the dynamics of proteinase activity in the ambulacrum structures were studied by quantitative gel zymography in the holothurians *Eupentacta fraudatrix* and *Cucumaria japonica* under normal conditions and after transverse cutting of the ambulacrum. Proteinases with gelatinolytic activity were detected only in *E. fraudatrix*; the species had two pools of proteinases. The high-molecular-weight pool was represented by only one (132 kDa) or two (132 and more than 250 kDa) proteins; the low-molecular-weight pool included two proteins with molecular weights of 53 and 47 kDa. By the ability to lyse gelatin, but not casein, and by the sensitivity to inhibitors of different classes of enzymes, gelatinases of *E. fraudatrix* are similar to vertebrates' matrix metalloproteinases. It was shown that the activity of proteinases increased after injury to the animal and that GM6001, a selective inhibitor of metalloproteinases, blocks the proteinase activity. It was suggested that proteinases with gelatinolytic activity are a key factor of regeneration in holothurians.

Keywords: holothurians, *Eupentacta fraudatrix*, *Cucumaria japonica*, ambulacrum, gelatinase, matrix metalloproteinases, regeneration