

О-ГЛИКОЗИЛГИДРОЛАЗЫ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* И ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ИХ БИОСИНТЕЗ

© Н. С. Веригина, М. И. Киселева, С. П. Ермакова, В. В. Сова, Т. Н. Звягинцева

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия
E-mail: sova@piboc.dvo.ru

Резюме

В эмбрионах морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* обнаружены О-гликозилгидролазы: высокоактивные 1,3-β-D-глюканаза и α-D-маннозидаза, а также β-D-глюкозидаза β-D-галактозидаза с более низким уровнем активности. Исследована динамика изменения активности ферментов на разных стадиях развития эмбрионов морского ежа. Изучено влияние некоторых соединений: природных фукоиданов, β-1,3; 1,6-глюканов, полученных ферментативным синтезом, и белкового ингибитора эндо-1,3-β-D-глюканаз морских моллюсков — на процесс развития эмбрионов и биосинтез в них α-D-маннозидазы и 1,3-β-D-глюканазы.

Ключевые слова: морской еж *Strongylocentrotus intermedius*, эмбрионы, О-гликозилгидролазы, фукоиданы, β-1,3, 1,6-глюканы, белковый ингибитор эндо-1,3-β-D-глюканаза.

Введение

Эмбрионы морских ежей являются уникальным и весьма популярным объектом для токсикологического и фармакологического исследований различных препаратов [1]. На данной модели оцениваются различные нарушения эмбрионального развития, которое хорошо изучено [2—4]. Биохимические процессы, происходящие в течение эмбрионального развития, в частности связанные с биосинтезом ферментов, недостаточно исследованы. Можно предположить, что нарушения эмбрионального развития, вызванные действием химических соединений, будут также сопровождаться изменениями в биосинтезе ферментов.

Известно, что 1,3-β-D-глюканаза (НФ 3.2.1.58) присутствует в неоплодотворенных яйцеклетках морских ежей. Она локализована в кортикальных гранулах и при оплодотворении большая часть этого фермента высвобождается в перивителлиновое пространство и окружающую морскую воду [5, 6]. Была исследована динамика изменения уровня активности 1,3-β-D-глюканазы в процессе развития эмбрионов различных видов морских ежей [7]. Из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. purpuratus* [8] и эмбрионов на стадии бластулы *S. intermedius* [9] выделены и охарактеризованы индивидуальные 1,3-β-D-глюканазы. Первичная структура 1,3-β-D-глюканазы из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. purpuratus* была

установлена на основании нуклеотидной последовательности гена методом молекулярного клонирования [10].

Роль 1,3-β-D-глюканазы в неоплодотворенных яйцеклетках до сих пор точно не установлена. Высказано предположение, что яйцеклетки и эмбрионы на ранних стадиях развития секретируют фермент для разрушения клеточного матрикса, как, например, в случае аутолиза, происходящего при развитии клеточных стенок грибов [10]. Однако в оболочке оплодотворения яйцеклеток морских ежей эндогенный β-глюкановый субстрат не обнаружен.

Углеводный анализ вителлинового слоя яйцеклеток морских ежей, из которого формируется оболочка оплодотворения, показал наличие фукозы, маннозы, галактозы, глюкозы, ксилозы, глюкозамина, галактозамина и силовой кислоты [11, 12], что позволяет предполагать присутствие в яйцеклетках и эмбрионах соответствующих гликозидаз. Информации о гликозидазах, участвующих в процессах эмбриогенеза морских ежей, не имеется. Вопрос о присутствии в эмбрионах морских ежей ферментов, принимающих участие в превращении углеводов, и характер изменения уровня их активности в процессе развития эмбрионов представляет несомненный интерес.

Цель данной работы состояла в изучении состава О-гликозилгидролаз, динамики изменения активности ферментов на разных стадиях развития эмбрионов

морского ежа *S. intermedius*, а также влияния некоторых природных биополимеров на процесс развития эмбрионов и биосинтез в них О-гликозилгидролаз.

Материал и методика

Материалы. Работу проводили на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН (зал. Посыета Хасанского р-на Приморского края, Японское море) в августе—сентябре 2006 г. Получение гамет из морского ежа *S. intermedius* и дальнейшее оплодотворение производили в соответствии с методикой, описанной в работе [1]. Пищеварительный тракт взрослых морских ежей, собранных в тот же период, отмывали 0.05 М сукцинатным буфером, pH 5.2, от остатков пищи и замораживали при -16°C .

Фукоиданы были выделены из бурых водорослей *Laminaria sichorioides* и *Fucus evanescens* [13], ламинаран и ингибитор 1,3-β-D-глюканаз — из *L. sichorioides* по ранее описанным методам [14, 15]. Транслам и антивир получены ферментативной трансформацией ламинарана из *L. sichorioides* [16]. *n*-Нитрофенил-β-D-глюкопиранозид, *n*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид и *n*-нитрофенил-α-D-маннопиранозид — препараты фирмы Sigma (США).

Инкубация эмбрионов морского ежа. В экспериментах использовали яйцеклетки только тех морских ежей, процент оплодотворения которых был не ниже 98 %. В качестве тест-реакции были использованы изменения эмбрионального развития, происходящие в присутствии веществ, по сравнению с контролем. Число нормальных зародышей и личинок в контрольных пробах на всех стадиях эмбриогенеза было выше 95 %. Тестируемые вещества в различных концентрациях (транслам 50, антивир 50, фукоиданы 150, ингибитор 1,3-β-D-глюканаз 12.5 мкг/мл) добавляли в инкубационную смесь через 60 мин после оплодотворения яйцеклеток на стадии зиготы. Все варианты опытов проводили при температуре 19—21 °С. Концентрация яйцеклеток 4000 клеток/мл.

Оплодотворенные яйцеклетки инкубировали с веществами в открытых сосудах с фильтрованной морской водой при 19.2 °С до стадий развития средний плутеус 1.2. За стадиями развития наблюдали в бинокляр и визуально определяли основные признаки стадий развития по Бузникову [1], сравнивая с контролем (эмбрионы в морской воде).

Определение активности ферментов. Для определения ферментативной активности 100 мл суспензии яйцеклеток или эмбрионов морского ежа отбирали в определенные промежутки времени и концентрировали центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об./мин и 4 °С (до 0.5 мл). Эмбрионы замораживали при температуре -16°C , после размораживания центрифугировали при 10 000 об./мин и 4 °С. Активность ферментов определяли в супернатанте. Реакционная смесь для определения активности 1,3-β-D-глюканазы содержала 10 мкл супернатанта и 490 мкл раствора ламинарана (1 мг/мл) в 0.05 М сукцинатном буфере, pH 5.2. Инкубацию проводили при 37 °С.

Активность 1,3-β-D-глюканазы оценивали по накоплению восстанавливающих сахаров методов Шомоди—Нельсона [17]. Активность гликозидаз (субстраты — *n*-нитрофенильные производные соответствующих сахаров) определяли по количеству образующего *n*-нитрофенола [18]. Инкубационная смесь содержала 20 мкл супернатанта и 80 мкл раствора соответствующего субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М сукцинатом буфере, pH 5.2. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М Na_2CO_3 .

Замороженный пищеварительный тракт взрослых морских ежей тщательно измельчали и экстрагировали 0.05 М

сукцинатным буфером, pH 5.2, в соотношении 1 : 2. Экстракт центрифугировали 10 мин при 10 000 об./мин; 1 мл супернатанта подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (1 × 8 см) для удаления низкомолекулярных примесей. Активность ферментов оценивали, как описано выше.

Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури [19]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта (глюкозы или *n*-нитрофенола) в 1 мин. Удельную активность выражали в ед./мг белка.

Статистическую обработку данных проводили при помощи критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее значение из трех независимых экспериментов, в каждом из которых выполнялись три параллельных измерения. Антифунгальная активность экстрактов эмбрионов морского ежа была оценена методом диффузии в агаре [20].

Результаты и обсуждение

Проведен анализ содержания некоторых О-гликозилгидролаз (1,3-β-D-глюканазы и гликозидаз) в развивающихся эмбрионах морского ежа *S. intermedius*. Уровень активности четырех О-гликозилгидролаз эмбрионов на нескольких стадиях развития показан на рис. 1. Для сравнения приведен состав и активность этих же ферментов, присутствующих в пищеварительном тракте взрослых морских ежей. На всех указанных стадиях развития эмбрионов обнаружен достаточно высокий уровень активности α-D-маннозидазы (НФ 3.2.1.24) и 1,3-β-D-глюканазы (НФ 3.2.1.58), активность β-D-глюкозидазы (НФ 3.2.1.21) оказалась низкой, β-D-глюкозидаза (НФ 3.2.1.23) в эмбрионах ранних стадий практически не определялась. В пищеварительном тракте *S. intermedius* уровни активности ферментов отличались от уровней эмбриональных: значительно более высоким был уровень активности β-D-глюкозидазы и β-D-галактозидазы. Вероятно, это связано с различной функцией О-гликозилгидролаз. Как показано для 1,3-β-D-глюканазы, в эмбрионах она принимает участие в процессах развития, у зрелых морских ежей выполняет пищеварительную функцию [21].

Более детальный анализ динамики изменения уровня активности 1,3-β-D-глюканазы показал (рис. 2), что 1,3-β-D-глюканаза присутствовала в неоплодотворенных яйцеклетках, и на начальных стадиях развития эмбрионов уровень ее активности заметно не менялся. Падение активности наблюдалось после стадии 3—5 (2, 4, 8 бластомеров) и на более поздних стадиях развития эмбрионов (ранний плутеус 3—средний плутеус 1) уровень активности 1,3-β-D-глюканазы составлял 3—4 уд. единицы.

Ранее было показано, что характер изменений активности 1,3-β-D-глюканазы в развивающихся эмбрионах отличается у различных видов морских ежей [7]. У некоторых видов, таких как *Triplunestes esculents*, в неоплодотворенных яйцеклетках обнаружен высокий уровень 1,3-β-D-глюканазной активности (около 40 уд. ед.), после оплодотворения активность постепенно уменьшается и на стадии плутеуса уже практически отсутствует. У *Lytechinus variegatus* и *Arbacia in-*

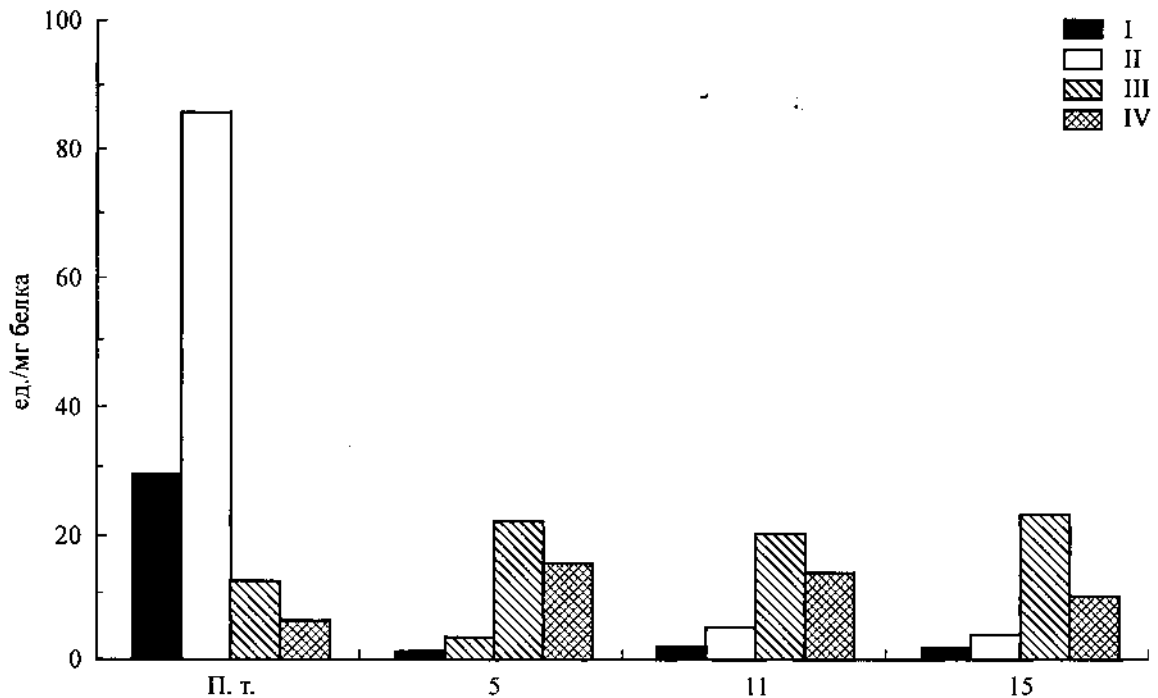


Рис. 1. Уровень активности О-гликозилгидролаз (по вертикали) в пищеварительном тракте морского ежа *S. intermedius* и эмбрионах на разных стадиях развития.

П. т. — пищеварительный тракт. Стадии развития (по горизонтали) обозначены согласно рекомендациям работы [1]: 5 — 8 blastomeres, 11 — средняя blastula 2, 15 — ранняя gastrula 2. I — β -D-галактозидаза, II — β -D-глюкозидаза, III — α -D-маннозидаза, IV — 1,3- β -D-глюканаза.

cissa после оплодотворения наблюдается уменьшение активности 1,3- β -D-глюканазы, но после стадии гаструляции происходит ее увеличение. Установлено, что на этой стадии происходит биосинтез пищеварительной 1,3- β -D-глюканазы, отличающейся по иммунологическим свойствам от 1,3- β -D-глюканазы яйцеклеток [21]. Встречаются виды морских ежей, например *Echinometra lucshites*, у которых неоплодотворенные яйцеклетки изначально имеют очень низкий уровень 1,3- β -D-глюканазной активности, возрастающий после оплодотворения [7].

Нами было показано, что величина активности 1,3- β -D-глюканазы в неоплодотворенных яйцеклетках *S. intermedius* соизмерима с активностью фермента из яйцеклеток *L. variegates*. Динамика изменения уровня этой активности в эмбрионах морского ежа *S. intermedius* наиболее близка к варианту, полученному для *T. esculents*. Отличие состоит в том, что у *S. intermedius* на стадии плутеуса уровень фермента не падает до нуля.

Высказана гипотеза о том, что 1,3- β -D-глюканаза может выполнять функцию защиты эмбрионов морских ежей от вторжения морских патогенных грибов, содержащих β -глюканы в составе их клеточных стенок [10]. Для подобных предположений имеются основания. Показано, например, что экстракт оболочки оплодотворенных яйцеклеток морских рыб *Plecoglossus atliveis*, *Tribolodon lakopensis* и *Salmo gairdneri*, содержащий широкий набор О-гликозилгидролаз, обладал антифунгальным действием на гриб *Saprolegnia parasitica*, выделенный с поверхности тела карпа [22]. Пре-

параты из оболочек оплодотворенных яйцеклеток рыб *Cyprinus carpio*, *Salvelinus leucomaenis* и *P. atliveis* проявили сильное антибактериальное действие на штамм *Vibrio anguillarum*, выделенный из больных рыб [23, 24]. Однако экстракты вителлиновой оболочки яйцеклеток морских рыб такого действия не проявляли. Методом диффузии в агаре нами также было

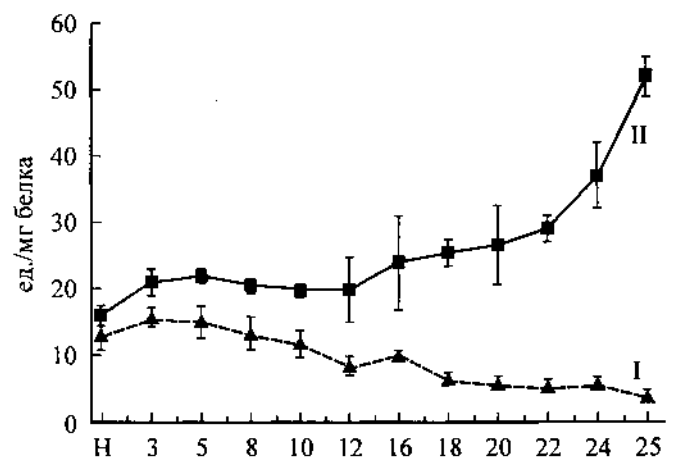


Рис. 2. Изменения активности 1,3- β -D-глюканазы (I) и α -D-маннозидазы (II) в процессе развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius*.

Стадии развития: H — неоплодотворенные яйцеклетки; 5 — 8 blastomeres, 8 — ранняя blastula 1, 10 — средняя blastula 1, 12 — поздняя blastula 1, 16 — средняя gastrula 1, 18 — поздняя gastrula 1, 20 — призма 1, 22 — ранний плутеус 1, 24 — ранний плутеус 3, 25 — средний плутеус 1.

**Влияние транслама и ингибитора эндо-1,3-β-D-глюканаза
на развитие эмбрионов морского ежа**

Время инкубации (ч)	Стадии развития (основные признаки)		
	в контрольном опыте	с ингибитором эндо-1,3-β-D-глюканаза	с трансламом
3	4 (4 бластомера)	4—5 (4, 8 бластомеров)	5 (8 бластомеров)
10	7 (32 бластомера)	7 (32 бластомера)	8—9 (ранняя бластула 1, 2)
15	9 (ранняя бластула 2)	8 (ранняя бластула 1)	10 (средняя бластула 1)
35	20 (призма 1)	16—17 (средняя гастрюла 1, 2)	22 (ранний плутеус 1)
58	21—22 (призма 2 — ранний плутеус 1)	Гибель эмбрионов	24—25 (ранний плутеус 3 — средний плутеус 1)

установлено, что экстракты неоплодотворенных яйцеклеток и эмбрионов *S. intermedius* не тормозили развитие грибов *Penicillium* sp. и *Candida albicans*.

Известно, что гликозидазы присутствуют в пищеварительных органах морских беспозвоночных [25,

26], тогда как информации о наличии гликозидаз в яйцеклетках и эмбрионах морских ежей нет. Гликозидазы (α-, β-алактозидаза, α-маннозидаза, α-фукозидаза, α-, β-глюкозидаза и β-NAc-глюкозаминидаза) обнаружены в яйцеклетках мышей и в сперматозоидах жабы [27, 28]. Показано участие β-NAc-глюкозаминидазы в процессе оплодотворения, роль других гликозидаз, в том числе и α-D-маннозидазы, не установлена.

Результаты исследования α-D-маннозидазы, наиболее активной гликозидазы эмбрионов *S. intermedius*, показали, что фермент присутствовал на всех стадиях развития эмбриона — от стадии зиготы до зрелой личинки (рис. 2). До стадии гастрюляции уровень ферментативной активности α-D-маннозидазы оставался практически неизменным, затем наблюдалось постепенное увеличение активности фермента, и к стадии раннего плутеуса уровень α-D-маннозидазы увеличился в 2 раза.

Изучено влияние некоторых полисахаридов, обладающих высокой биологической активностью, на развитие эмбрионов *S. intermedius* и биосинтез 1,3-β-D-глюканазы и α-D-маннозидазы. Были выбраны фукоиданы (гетерополисахариды, состоящие преимущественно из остатков сульфатированной фукозы) из бурых водорослей *L. cichorioides* и *F. evanescens* 1.3; 1,6-β-D-глюканы антивир и транслам, полученные ферментативной трансформацией природного ламинарана [16]. Концентрации всех исследуемых веществ были подобраны экспериментально: они позволяли выявить эффекты воздействия соединений и не вызвали гибели эмбрионов.

Интересен тот факт, что сульфатированные фуканы содержатся в оболочке, окружающей неоплодотворенные яйцеклетки морских ежей [29, 30]. На примере яйцеклеток *S. purpuratus* показано, что после оплодотворения эти полисахариды исчезают, но вновь синтезируются в эмбрионах между мезенхимной бластулой и ранней гастрюлой [31]. Добавление в инкубационную смесь фукоиданов, выделенных нами из двух видов бурых водорослей и имеющих некоторые структурные отличия, в обоих случаях приводило к незначительно-

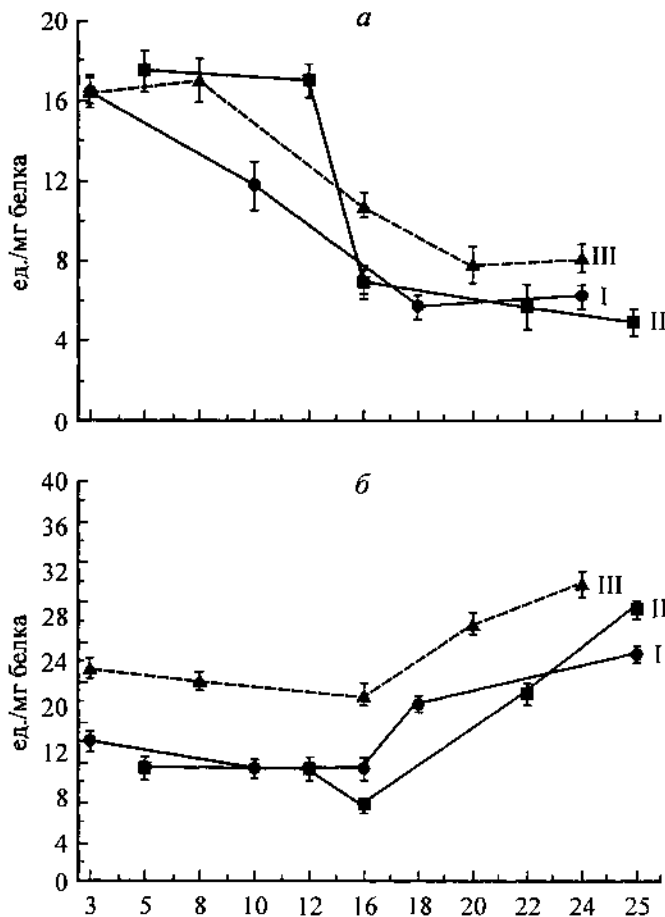


Рис. 3. Влияние природных фукоиданов из бурых водорослей *L. cichorioides* (I) и *F. evanescens* (II) на уровень активности 1,3-β-D-глюканазы (а) и α-D-маннозидазы (б) в эмбрионах *S. intermedius*, контрольный опыт (III).

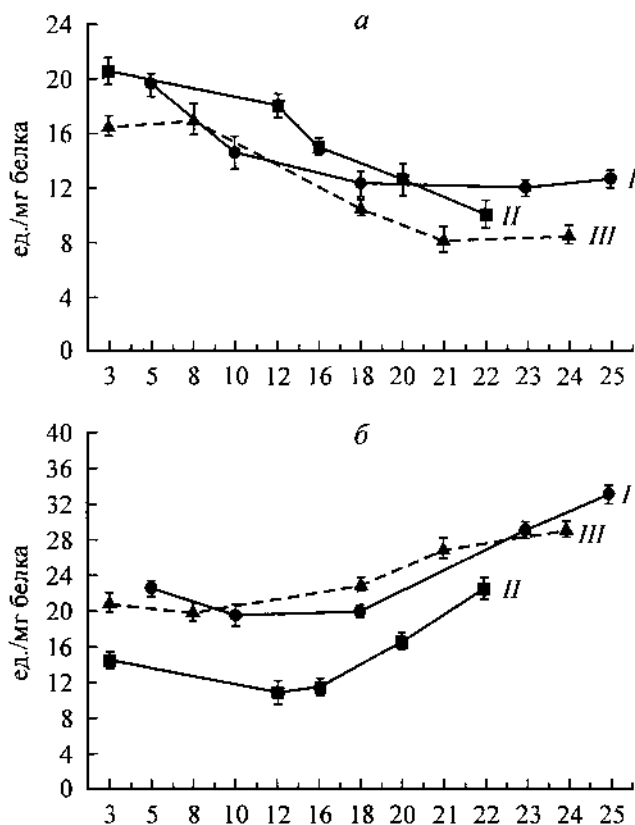


Рис. 4. Влияние транслама (I) и ингибитора 1,3-β-D-глюканазы (II) на уровень активности 1,3-β-D-глюканазы (а) и α-D-маннозидазы (б) в эмбрионах *S. intermedius*, контрольный опыт (III).

му ускорению развития эмбрионов по отношению к контролю (данные не представлены в таблице). Одновременно наблюдалось уменьшение активности как α-D-маннозидазы, так и 1,3-β-D-глюканазы практически на всех стадиях развития эмбрионов (рис. 3).

Несмотря на сходство структур 1,3; 1,6-β-D-глюканов антивир и транслам (мол. массы 6 и 8 кДа соответственно), действие их на эмбрионы *S. intermedius* было различным. Антивир не влиял на процесс развития эмбрионов и синтез в них 1,3-β-D-глюканазы и α-D-маннозидазы. При добавлении транслама наблюдали ускорение развития эмбрионов, начиная со стадии зиготы (см. таблицу). Было отмечено также повышение уровней активности 1,3-β-D-глюканазы и α-D-маннозидазы практически на всех стадиях развития эмбрионов в присутствии транслама (рис. 4). Вероятно, важную роль для биологического действия глюканов играет величина их мол. масс.

В процессе исследования взаимоотношений водорослей и беспозвоночных, поедающих эти водоросли, было обнаружено, что в бурой водоросли *L. sichooides* синтезируется соединение белковой природы, которое специфично ингибирует пищеварительную эндо-1,3-β-D-глюканазу морских моллюсков [15]. Внешенный в инкубационную смесь ингибитор эндо-1,3-β-D-глюканазы практически не влиял на начальные стадии развития эмбрионов морского ежа. Однако после стадии ранней бластулы процесс развития эмбрионов

замедлялся, и наступала их гибель (см. таблицу). В разной степени присутствие ингибитора сказывалось на биосинтезе исследуемых ферментов: уровень активности α-D-маннозидазы снижался относительно контроля, а уровень активности 1,3-β-D-глюканазы повышался (рис. 4).

Таким образом, впервые обнаружено, что яйцеклетки морского ежа *S. intermedius*, кроме 1,3-β-D-глюканазы, содержат гликозидазы, среди которых наиболее активной является α-D-маннозидаза. Показано, что уровень активности 1,3-β-D-глюканазы и α-D-маннозидазы изменяется в процессе развития эмбрионов. Присутствие в инкубационной среде биологически активных полисахаридов (транслама, фукоиданов) и ингибитора 1,3-β-D-глюканазы влияет на развитие эмбрионов и биосинтез исследуемых ферментов.

Авторы благодарны М. В. Пивкину (ТИБОХ ДВО РАН) за помощь при определении антифунгальной активности экстрактов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-4-48540-а) и Программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- [1] Бузников Г. А., Подмарев В. К. Морские ежи (*Strongylocentrotus drobachinesis*, *S. nudus*, *S. intermedius*) // Объекты биологии развития. М., 1975. С. 188—222.
- [2] Anisimov M. M., Prokofyeva N. G., Korotkikh L. Y., Kapustina I. I., Stonik V. A. Comparative study of cytotoxic activity of triterpene glycosides from marine organisms // Toxicon. 1980. V. 18. P. 221—223.
- [3] Анисимов М. М., Лихацкая Г. Н., Шенцова Е. Б., Прокофьева Н. Г., Аминин Д. Л., Агафонова И. Г. Использование яйцеклеток и эмбрионов морского ежа для биотестирования и изучения связи структура—активность природных и синтетических биологически активных соединений // Биол. моря. 1995. Т. 21. С. 417—420.
- [4] Прокофьева Н. Г., Анисимов М. М., Киселева М. И., Ребачук Н. М., Похило Н. Д. и др. Цитотоксическое действие даммарановых тритерпеноидов, выделенных из листьев берез // Изв. РАН. Сер. биол. 2002. С. 645—649.
- [5] Epel D., Muchmore A. V., Weaver A. M., Schrike R. T. β-1,3-Glucanase of sea urchin eggs; release from particles at fertilization // Science. 1969. V. 163. P. 294—296.
- [6] Wessel G. M., Truschel M. R., Chambers S. A., McClay D. R. A cortical granule-specific enzyme, β-1,3-glucanase, in sea urchin eggs // Gamet Res. 1987. V. 18. P. 339—348.
- [7] Peeler M. T., Chambers S. A., Wang C. Y., McClay D. R. Stage-specific expression of beta-1,3-glucanase in sea urchin embryos and hybrids // J. Exp. Zool. 1987. V. 244. P. 215—222.
- [8] Talbot C., Vacquier V. D. The purification and characterization of an exo-β-1,3-glucanohydrolase from sea urchin eggs // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 742—746.
- [9] Takeuchi K. Purification and characterization of exo-β-1,3-glucanase from a hatching supernatant of *Strongylocentrotus intermedius* // Can. J. Biochem. Cell Biol. 1983. V. 61. N 1. P. 54—62.

- [10] *Bachman E. S., McClay D. R.* Molecular cloning of the first metazoan β -1,3-glucanase from eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 6808—6813.
- [11] *Glabe C. G., Vacquier V. D.* Isolation and characterization of the vitelline layer of sea urchin eggs // J. Cell. Biol. 1977. V. 75. N 2. Pt. 1. P. 410—421.
- [12] *Correa L. M., Carroll E. J.* Characterization of the vitelline envelope of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Dev. Growth Diff. 1997. V. 39. N 1. P. 69—85.
- [13] *Zvyagintseva T. N., Shevchenko N. M., Popivnich I. B.* A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. P. 32—39.
- [14] *Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N.* A study of the laminarins of some far-eastern, brown seaweeds // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241—248.
- [15] *Ермакова С. П., Бурцева Ю. В., Сова В. В., Крачун В. В., Звягинцева Т. Н.* Белки бурых водорослей — ингибиторы эндо- β -1,3-глюканаз морских беспозвоночных // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 234—241.
- [16] *Звягинцева Т. Н., Елякова Л. А., Исаков В. В.* Ферментативное превращение ламинаранов в 1,3; 1,6- β -D-глюканы, обладающие иммуномодулирующим действием // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 218—225.
- [17] *Somogyi M.* Notes on sugar determination // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. N 1. P. 19—29.
- [18] *Ait N., Creutz N., Cattaneo J.* Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. P. 537—546.
- [19] *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265—275.
- [20] *Микробиологический справочник.* М., 1967.
- [21] *Truschel M. R., Chambers S. A., McClay D. R.* Two antigenically distinct forms of β -1,3-glucanase in sea urchin embryonic development // Dev. Biol. 1986. V. 117. P. 227—285.
- [22] *Kudo S.* Enzymatic basis for protection of fish embryos by the fertilization envelope // Experientia. 1992. V. 48. P. 277—281.
- [23] *Kudo S., Inoue M.* Bacterial action of fertilization envelope extract from eggs of the fish *Cyprinus carpio* and *Plecoglossus altivelis* // J. Exp. Zool. 1989. V. 250. P. 219—228.
- [24] *Kudo S., Inoue M.* Enzyme activities responsible for the defense mechanism of the fertilization envelope // Naturwissenschaften. 1991. V. 78. P. 172—173.
- [25] *Бурцева Ю. В., Кусайкин М. И., Сова В. В., Шевченко Н. М., Скобун А. С., Звягинцева Т. Н.* Распространение фукоидан-гидролаз и некоторых гликозидаз у морских беспозвоночных // Биол. моря. 2000. Т. 26. С. 429—432.
- [26] *Кусайкин М. И., Бурцева Ю. В., Светашева Т. Г., Сова В. В., Звягинцева Т. Н.* Распространение О-гликозилгидролаз в морских беспозвоночных. Ферменты морского моллюска *Littorina kurila*, катализирующие трансформацию фукоиданов // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 384—392.
- [27] *Miller D. J., Gong X., Decker G., Shur B. D.* Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy // J. Cell Biol. 1993. V. 123. N 6. Pt. 1. P. 1431—1440.
- [28] *Martinez M. L., Martelotto L., Cabada M. O.* Purification and biological characterization of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Bufo arenarum* spermatozoa // Mol. Reprod. Dev. 2000. V. 57. P. 194—203.
- [29] *Alves A. P., Mulloy B., Moy G. W., Vacquier V. D., Mourao P. A.* Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structure of their egg jelly sulfated fucans // Glycobiology. 1998. V. 8. P. 939—946.
- [30] *Vilela-Silva A. C., Alves A. P., Valente A. P., Vacquier V. D., Mourao P. A.* Structure of the sulfated α -L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition // Glycobiology. 1999. V. 9. P. 927—933.
- [31] *Vilela-Silva A. C., Werneck C. C., Valente A. P., Vacquier V. D., Mourao P. A.* Embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* a dermatan sulfate enriched in 4-O- and 6-O-disulfated galactosamine units // Glycobiology. 2001. V. 11. P. 433—440.

Поступила 4 XII 2007

O-GLYCOSYLHYDROLASES OF EMBRYOS OF THE SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* AND EFFECT OF SOME NATURAL SUBSTANCES ON THEIR BIOSYNTHESIS

© N. S. Verigina, M. I. Kiseleva, S. P. Ermakova, V. V. Sova, and T. N. Zvyagintseva

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

ABSTRACT

Embryos of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* have been revealed to contain o-glycosylhydrolases: highly active 1,3- β -D-glucanase and α -D-mannosidase as well as a lower activity of β -D-glucosidase and β -D-galactosidase. Dynamics of changes of the enzyme activities has been studied at various stages of the sea urchin embryo development. There also have been studied effects of some substances (natural fucoidans, β -1,3; 1,6-glucans formed by enzymatic synthesis as well as a protein inhibitor of marine mollusc endo-1,3- β -D-glucanases) on development of the embryos and biosynthesis of 1,3- β -D-glucanase and α -D-mannosidase.

Key words: sea urchin, embryo, *Strongylocentrotus intermedius*, o-glycosylhydrolases, fucoidans, β -1,3; 1,6-glucans, protein inhibitor of endo-1,3- β -D-glucanases.