



УДК 577.152.34.032:597.553.2-113.32

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ БЕЛКОВАЯ ДЕГРАДАЦИЯ В ПРОЦЕССЕ РОСТА АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L.¹

© 2015 г. Л. А. Лысенко*, Н. П. Канцерова, М. Ю. Крупнова, А. Е. Веселов, Н. Н. Немова

ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Поступила в редакцию 13.04.2015 г. Принята к печати 01.06.2015 г.

На примере атлантического лосося *Salmo salar* L., сем. Лососевые (Salmonidae) приведены краткие сведения об универсальных чертах и специфических особенностях протеолитического аппарата скелетных мышц рыб. Среди множества протеиназ мышечной ткани наиболее подробно изучены те, что определяют уровень белковой деградации в формирующихся и активно растущих мышцах молоди лосося и тем самым регулируют интенсивность накопления в них белка и ростовых процессов в целом, а именно — лизосомальные катепсины В и D и кальцийзависимые протеиназы (кальпаины). Обнаружены возрастные различия активности внутриклеточных протеиназ в мышцах лосося, свидетельствующие о значении регуляции протеолиза в процессе роста и о специфичной роли отдельных протеолитических ферментов. Так, получены данные об отрицательной корреляции уровня активности катепсина D и кальпаинов в мышечной ткани с интенсивностью прироста массы лососей разных возрастных групп. Выявленная положительная взаимосвязь активности катепсина В с морфометрическими показателями молоди рыб, по-видимому, отражает его приоритетное участие в обмене белков, преимущественно немиофибриллярных.

Ключевые слова: белковая деградация, скелетные мышцы, кальпаин, катепсин, атлантический лосось, рост.

DOI: 10.7868/S0132342315060093

ВВЕДЕНИЕ

Деградации — полному гидролитическому расщеплению с участием протеиназ — подвергаются все белковые молекулы, как эндогенные, подлежащие замене, дефектные или избыточные, так и чужеродные. Внутриклеточная белковая деградация — базовая, эволюционно древнейшая функция протеолитических ферментов. В тканях позвоночных животных, включая рыб, обнаружены многочисленные протеиназы и пептидазы [1–4]. У млекопитающих ведущими путями белковой деградации признаны убиквитин-протеасомный и лизосомально-аутофагический [2, 4, 5], а в деградации белков мышечной ткани, наравне с ними, участвует кальпаиновая система, включающая кальцийзависимые протеиназы и их ингибитор кальпаистатин [6–8].

Специфическая особенность обмена белков в скелетных мышцах рыб заключается в сниженном уровне протеасомной активности [9] и, соответственно, относительно малом вкладе убиквитин-протеасомной системы в тотальную белковую деградацию (около 4% от суммарной, по оценкам [10]). Вместе с тем, у рыб значительно выявляется роль кальпаинопосредованного протеолиза как механизма белковой деградации, в том числе благодаря более широкому спектру кальпаинчувствительных субстратов среди миофибриллярных белков [11, 12]. Суммируя данные *in vitro*- и *in vivo*-исследований ферментов деградации белков мышечной ткани рыб [10, 13–15], можно заключить, что доли участия протеасом, катепсинов и кальпаинов в этом процессе примерно соотносятся как 0.1 : 1 : 1 (для млекопитающих это соотношение выглядит иначе — 3 : 1 : 1, по данным [16]), то есть непосредственными регуляторами белковой деградации в скелетных мышцах рыб служат лизосомально-аутофагическая и кальпаиновая протеолитические системы.

Процессы белкового распада и синтеза в клетках организмов, находящихся вне периода активного роста, обычно уравновешены; вместе с тем у

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VII Российском симпозиуме "Белки и пептиды"; Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.

Сокращения: АМС — аминотетракумарин; CatB, CatD — катепсины В и D; DTT — дитиотреитол; EDTA-Na — натриевая соль этилендиамин тетрауксусной кислоты; PMSF — фенилметилсульфонилфторид; SDS — додецилсульфат натрия; ТСА — трихлоруксусная кислота.

* Автор для связи (тел.: +7 (8142) 57-18-79; факс: +7 (8142) 76-98-10; эл. почта: l-lysenko@yandex.ru).

рыб, характерной чертой которых является недетерминированный рост, синтез белка должен превалировать, по крайней мере в мышечной ткани, составляющей более половины веса рыбы и состоящей преимущественно из белка [17, 18]. Из этого следует, что интенсивность деградации белка в мышцах рыб может значительно изменять скорость их роста и накопление белковой массы. Деградация белка и активность осуществляющих ее протеолитических ферментов в мышцах рыб строго регулируются; они зависят от многих факторов, в том числе стадии развития организма, возраста и кормовой базы [19–21]. Другой особенностью метаболизма рыб является доминирующая роль белков и липидов в качестве энергетических субстратов (в отличие от млекопитающих, энергопродукция которых, как известно, основана на гидролизе углеводов) [13], в связи с чем перечисленные протеолитические системы отвечают не только за базовый обмен белков в органах рыб, но и обеспечивают жизнеспособность особей в ситуациях, связанных с повышенными энергозатратами — в периоды созревания половых продуктов [22], нерестовых миграций [14], при ограничении питания [21] и голодании [19, 23, 24].

Изучение ростовых процессов и регулирующих их факторов, включая внутриклеточный протеолиз, у рыб сем. Лососевые (*Salmonidae*) носит не только фундаментальный характер, но и имеет практическое значение для разработки стратегий по ускорению накопления биомассы искусственно разводимых рыб. В данной работе кратко охарактеризованы основные протеолитические ферменты, отвечающие за деградацию миофибриллярных белков у рыб — лизосомальные катепсин В (*CatB*) и катепсин D (*CatD*) и кальцийзависимые протеиназы (кальпаины) — и оценена их активность в скелетных мышцах ювенильных особей лосося *Salmo salar* разных возрастов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеризация изучаемых протеиназ S. salar

Был изучен ряд структурно-функциональных характеристик протеиназ из мышц лосося — лизосомальных катепсинов D и B, играющих решающую роль в аутофагической белковой деградации [4], и кальпаинов, осуществляющих пусковые этапы дезинтеграции миофибрилл [8]. При наличии релевантных литературных сведений, полученные данные о свойствах мышечных протеиназ лосося приводятся в сравнении с характеристиками ферментов из млекопитающих, поскольку структурно-функциональные отличия могут объяснить описанные ранее особенности регуляции и биологической активности протеиназ разных путей белковой деградации в мышцах рыб.

Кальпаины — семейство кальцийзависимых протеиназ, основные из которых μ -кальпаин (КФ 3.4.22.52) и m -кальпаин (КФ 3.4.22.53), — описаны у многих видов рыб, включая рыб сем. Лососевые [25–28]. О принадлежности кальпаинов к цистеиновому каталитическому типу протеиназ судили по их высокой чувствительности к группоспецифичным ингибиторам: E64, лейпептину, иодацетату, а также хелатору двухвалентных катионов EDTA (остаточная активность 4, 8, 4 и 0%, соответственно). Частично очищенные кальпаины из мышц лосося проявляли максимальную активность против казеина при концентрации ионизированного кальция 100 мкМ (μ -кальпаин) и 1.2 мМ (m -кальпаин); эти значения находятся в диапазоне кальциевой чувствительности кальпаинов из других видов рыб [25, 26, 29] и превосходят значения для μ - и m -кальпаинов млекопитающих (3–50 мкМ и 0.4–0.8 мМ соответственно) [3].

Установленный pH-оптимум казеинолитической активности m -кальпаина из мышц лосося составил 7.4, то есть находился в нейтральном pH-диапазоне, аналогичном для кальпаинов из всех ранее изученных источников [3]. Была отмечена высокая pH-стабильность кальпаинсодержащих фракций из мышц лосося: при pH 6.0 они сохраняли до 70% протеолитической активности от максимальной, а при pH 5.0 — около 30%; вероятно, это общее свойство для кальпаинов рыб [28]. Температурный оптимум кальпаинов из мышц лосося составил 28°C, помимо этого, ферменты лосося оказались более термостабильными, чем кальпаины млекопитающих: сохраняли активность при 0°C (20% от максимальной), а также при прогревании и заморозке. Эта черта кальпаинов отмечалась также и для других видов рыб; существует мнение, что температурный оптимум ферментативной активности может зависеть от температуры среды обитания [30]. Известно [31, 32], что, наряду с кальцийзависимыми протеиназами, в мышцах лосося присутствует их белковый ингибитор, кальпаастатин, причем его количество и кальпаинингибирующая способность значительно превосходят характеристики ингибитора из млекопитающих.

Катепсин В (*CatB*, КФ 3.4.22.1) из мышц лосося, по нашим данным, обладает типичными для фермента из разных источников характеристиками, включая его принадлежность к цистеиновому типу, подтвержденную данными ингибиторного анализа, согласно которым фермент высокочувствителен к универсальному ингибитору протеиназ цистеинового типа, E64, и частично утрачивает активность при действии ионов двухвалентных металлов — Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} и Zn^{2+} . Температурный и pH-оптимумы расщепления ферментом из мышц лосося специфического синтетического дипептида, Z-Arg-Arg-AMC, составили 34°C и 5.6, соответственно, что близко свойствам этого бел-

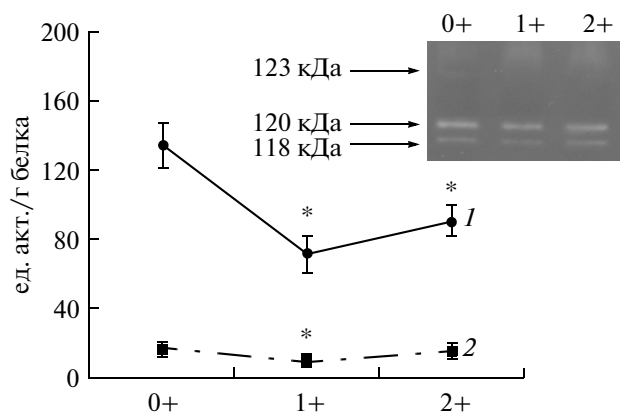


Рис. 1. Удельная активность кальпаинов (ед. акт./г белка) в скелетных мышцах лосося разных возрастов. Цифрами обозначены соответствующие фракции кальпаинов: 1 – цитозольная, 2 – мембраносвязанная. На врезке – зимограмма кальпаинов, выделенных из скелетных мышц лосося разных возрастов. Полоса с молекулярной массой 123 кДа соответствует μ -кальпаину, 120 кДа – m -кальпаину, 118 кДа – аутолизовавшему m -кальпаину.

ка из мышц других видов рыб [33, 34]. По нашим оценкам, активность CatB в мышцах лосося многократно выше, чем аналогичный показатель в мышцах теплокровных (крысы, быка); вероятно, это общая для рыб особенность, отмеченная и в других работах [32].

Катепсин D (CatD, КФ 3.4.23.5) из мышц атлантического лосося был максимально активен против гемоглобина при pH 3.0 и полностью утрачивал протеолитическую активность в присутствии ингибитора аспаргатных протеиназ, пепстатина, проявляя, таким образом, универсальные свойства CatD – кислый pH-оптимум и аспаргатный механизм катализа [4]. Частично очищенный фермент лосося быстро утрачивал активность после 20 мин прогревания (остаточная активность 85% при 40°C, 20% при 50°C) в сравнении с более термостабильным ферментом из теплокровных животных; эта черта сходна для CatD из нескольких видов рыб арктических и субарктических водоемов [35]. Уровень протеолитической активности CatD в мышцах рыб оказался лишь незначительно ниже, чем у теплокровных; кроме того, судя по литературным данным [32, 35], этот уровень выше, чем у других лизосомальных протеиназ, у разных линий позвоночных животных.

Наши данные указывают на то, что при всем сходстве организации протеолитических систем у рыб и млекопитающих, ферментам лосося присущ ряд особенностей, по всей видимости, общих для представителей кл. Костистых рыб (Teleostei), к которому он принадлежит.

*Характеристика ростовых показателей изученных особей *S. salar**

Изученные особи лосося трех возрастных групп достоверно различаются морфометрическими показателями (приведены в разделе “Экспериментальная часть”). Сеголетки (0+) отличаются по массе от годовиков лосося (1+) более, чем в 5 раз; темп прироста массы на третьем году жизни значительно снижается (масса увеличивается в 1.4 раза). Прирост веса рыбы напрямую зависит от скорости накопления мышечной массы [17]; непосредственно на рост расходуется примерно 76% синтезируемых в белых мышцах белков (показано для форели [18]), основным из которых является тяжелая цепь миозина (МуНС), входящая в состав миофибрилл. Транскрипты МуНС обнаруживаются в белых мышцах рыб на протяжении всей их жизни, а отрицательный регулятор миогенеза, миостатин, при этом отсутствует [17, 36], что и обеспечивает недетерминированный рост рыб. Изучаемые группы лососей ведут оседлый образ жизни в едином биотопе, и, следовательно, имеют сходную кормовую базу и ресурсы для накопления мышечной массы. Повышенный анаболизм молоди лосося всех изученных групп, связанный с активным потреблением пищи, стимулирует как синтез новых белков, так и, в меньшей степени, их деградацию для обеспечения обмена белков и роста. При относительно равной скорости белкового синтеза именно факторы, изменяющие эффективность деградации белков, становятся критическими для возникновения индивидуальных размерных различий у молоди рыб.

Возрастная динамика активности внутриклеточных протеиназ

Были установлены следующие возрастные особенности **активности кальпаинов** в мышцах ювенильных лососей: общая Ca^{2+} -зависимая протеолитическая активность наиболее молодых особей (возрастная группа 0+) значительно превышает показатели у рыб старших возрастных групп (1+, 2+) (рис. 1). Достоверные различия были установлены для обеих фракций кальпаинов – цитозольной и мембраносвязанной. Запасы латентных молекул кальпаинов, дисперсно распределенных в цитозоле клетки, обычно десятикратно превышают пул зрелых, протеолитически активных молекул, которые, благодаря особенностям аутокаталитического механизма активации, локализируются в примембранной области и ассоциированы с фосфолипидами [3]. Уровень активности кальпаинов в цитозольной (в мышцах – саркоплазматической) фракции, таким образом, позволяет судить об общем содержании ферментов в клетке, то есть косвенно отражает уровень их синтеза, а активность мембраносвязанного кальпаина – степень

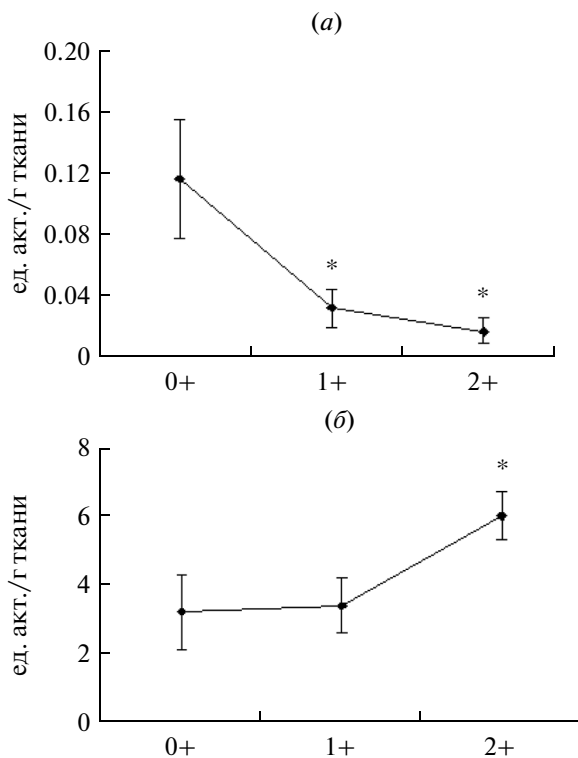


Рис. 2. Активность катепсинов D (а) и В (б) (ед. акт./г ткани) в скелетных мышцах лосося разных возрастов.

активации фермента *in vivo*. У молоди первого года жизни запасы кальпаинов в саркоплазме миоцитов вдвое выше, чем у наиболее активно растущих лососей (1+), и в дальнейшем (группа 2+) уровень их синтеза существенно не изменяется (рис. 1). Поскольку соотношение кальпаинов, ассоциированных с мембранами и локализованных в саркоплазме, является достаточно стабильной величиной (в среднем 9 : 1), то на фоне истощения общего пула кальпаинов у молоди возраста 1+ и 2+ закономерным образом снижается и количество активированного фермента. Кроме того, в период максимального прироста массы соотношение активных и неактивных кальпаинов смещается в сторону увеличения доли последних (1 : 9.3 у пестрятков 1+ против 1 : 8.7–8.9 – в других группах). Между возрастными группами 0+ и 2+ достоверные отличия характерны только для цитозольной фракции фермента, а соотношение пула латентных и зрелых молекул фермента – близкое. Обнаруженные отличия группы 1+ – сниженный уровень синтеза и доля активированных кальпаинов – вероятно, демонстрируют механизм торможения белковой деградации в мышцах, который способствует ускоренному накоплению в них белков.

Методом зимографии с казеином была оценена относительная активность различных форм Ca^{2+} -зависимых протеиназ в мышцах рыб разного возраста и подтверждена зависимость активно-

сти кальпаинов от возраста рыб (рис. 1, врезка). Относительное содержание основных форм кальпаина – μ и m , в скелетных мышцах лосося указывает на значительное преобладание последней (в 10.4 раза). Это наблюдение относится и к другим видам рыб, в мышцах которых также обнаружен крайне низкий уровень μ -кальпаина [24], вплоть до полного его отсутствия [37]. По-видимому, это проявление тканевой специфики распределения кальпаинов у рыб. Выявленная для суммарной активности кальпаинов закономерность – максимальный ее уровень в мышцах сеголеток 0+ и снижение у рыб старших возрастных групп, также справедлива и для индивидуальных форм фермента: μ - и m -кальпаинов и аутолизированной формы m -кальпаина. Повышенная протеолитическая активность кальпаинов в мышцах молоди рыб 0+ может быть связана как с их участием в обмене миофибриллярных белков, активно синтезируемых в связи с высокой скоростью метаболических процессов в целом, так и с сигнальным значением кальпаинов в дифференцировке миоцитов при формировании мышечных волокон [38].

Спектр кальпаинчувствительных миофибриллярных белков у рыб значительно шире, чем у млекопитающих, он включает тяжелую цепь миозина, тропомиозин, α -актинин, тропонины Т и I, десмин [3, 11, 12]. Благодаря этому, кальпаины рыб способны осуществлять глубокий гидролиз большинства миофибриллярных белков, а не только пусковые реакции дезинтеграции надмолекулярных комплексов и Z-дисков саркомеров, как это описано для млекопитающих [3, 6–8]. Также из экспериментов с млекопитающими известно, что реорганизация цитоскелета клетки, необходимая для слияния миобластов скелетных мышц в ходе дифференцировки – высокорегулируемый кальпаинозависимый процесс, затрагивающий синтез всех компонентов кальпаиновой системы [38].

Было установлено, что активность **катепсина D** максимальна в скелетных мышцах лосося возрастной группы 0+ и минимальна – в группе 2+ (рис. 2а). Снижение активности наиболее выражено при переходе от сеголеток к пестряткам 1+ (различие в 3.7 раза), на следующем году жизни скорость CatD-зависимого протеолиза снижается вдвое. Уровень активности CatD связан отрицательной корреляцией с темпом прироста массы лососей. Кроме того, динамика возрастных изменений активности CatD сходна с обнаруженной для кальпаинов, что косвенно отражает синергичное участие этих ферментов в белковой деградации. Ранее аналогичное сходство изменений протеолитической активности кальпаинов и CatD и противоположность изменений в этом тандеме ферментов и активности CatB неоднократно обнаруживались у рыб разных видов, испытывающих действие экзо- и эндогенных факторов [2, 20]. Обнаруженный

нами высокий уровень тотального протеолиза в мышцах лосося возраста 0+, определяющийся высокой активностью его основных исполнителей — CatD и кальцийзависимых протеиназ, — указывает, по всей видимости, на максимально высокую скорость обмена белка в изучаемой ткани у сеголеток лосося по сравнению с особями старших возрастов. Среди прочих лизосомальных протеиназ CatD рассматривается как ключевой метаболический фермент, участвующий в расщеплении белка в тканях животных; гидролизуемые катепсином D *in vitro* субстраты включают основные миофибриллярные белки — миозин, актин, тропомиозин [35].

Уровень активности катепсина В в мышцах молодого лосося возрастных групп 0+ и 1+ достоверно не различался, двукратное его повышение было отмечено на третьем году жизни (рис. 2б). В целом, гидролизующая способность CatB по отношению к миофибриллярным белкам невысока: он расщепляет только тропонин I, коннектин и небулин, причем последние — крайне медленно, не гидролизует нативный коллаген [27, 33]. Поскольку субстратная специфичность этого фермента ограничивает его участие в гидролизе миофибриллярных белков, можно предположить, что на стадии активного роста его активность направлена на процессы физиологического обмена белков, преимущественно немиофибриллярного происхождения, и гидролиза субстратов с целью получения пластического материала для биосинтетических процессов. Известно, что роль этого фермента многократно возрастает в периоды преобладания катаболических процессов, например, при созревании половых продуктов и нерестовых миграциях его активность повышается в 3–7 раз по сравнению с периодом нагула, при том, что активность метаболических ферментов снижается [13, 19, 20]. Выявленная нами возрастная динамика активности CatB обратна наблюдаемой для кальпаинов и CatD.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возрастной специфике белковой деградации, тесно связанной с интенсивностью ростовых процессов у ювенильных лососей. В нашем исследовании подтверждено регуляторное значение протеолиза в целом и специфичная роль каждой из изученных внутриклеточных протеиназ в процессе накопления мышечной массы у рыб. Показано, что активность кальпаинов и CatD связаны с интенсивностью прироста мышечной массы лосося обратной зависимостью, а активность CatB — прямой, что свидетельствует не только о функциональной разнокачественности протеиназ, подтвержденной данными об особенностях их субстратной специфичности, но и о синергизме их действия в процессе гидролиза белковых субстратов.

Изучаемые параметры внутриклеточного протеолиза могут служить индикаторами роста и состояния рыб на личиночной и ювенильной стадиях развития, наряду с общепризнанными показателями роста — индексом РНК/ДНК, уровнем экспрессии миофибриллярных белков (МуНС), активностью ключевых пищеварительных и метаболических ферментов, содержанием липидов, особенно триацилглицеридов (ТАГ), индексами ТАГ/стерин, ТАГ/холестерин [39]. Результаты проведенного исследования важны как для установления фундаментальных основ роста, обладающего у рыб уникальными особенностями, так и дополняют информацию о потенциальных молекулярных мишенях для разработки стратегий ускорения роста рыб и накопления в их мышцах белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали химические реагенты, ингибиторы, субстраты протеиназ, красители производства “Sigma-Aldrich” (США); приборы ЦКП ИО ИБ КарНЦ РАН: микроцентрифугу 5417R (Eppendorf, Германия), ультрацентрифугу Optima Beckman LE 80 (Beckman-Coulter, США), твердотельный термостат СН-100 (BioSan, Латвия), камеру для электрофореза Mini Protean-3 Cell и флуориметр VersaFluor (Bio-Rad, США), спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО “ОКБ-Спектр”, Россия).

Объекты исследования. Исследование было проведено на атлантическом лососе *Salmo salar* L. разных возрастных групп ($n = 10–12$) — сеголетках 0+ (длина 5.64 ± 0.13 см, масса 1.38 ± 0.09 г), пестрятках 1+ (длина 9.75 ± 0.15 см, масса 6.96 ± 0.31 г) и пестрятках 2+ (длина 11.56 ± 0.69 см, масса 9.95 ± 0.86 г). Молодь лосося была выловлена в едином биотопе (пороге Собаčem основного русла р. Варзуга, Мурманская обл.) и одновременно (октябрь 2014 г.). Молодь этих возрастов находится на ювенильной стадии развития, ведет оседлый образ жизни в речных условиях, интенсивно питается [40]. Для биохимического анализа были взяты и заморожены в жидком азоте до начала анализа образцы скелетных мышц.

Активность катепсина В в мышечной ткани определяли в надосадочной жидкости, полученной после гомогенизации образцов в 50 мМ ацетатном буфере (pH 5.0) с добавлением 0.1 М NaCl, 1 мМ EDTA-Na, 0.2% CHAPS (соотношение 1 : 9, вес/объем) и центрифугирования (20000 g, 30 мин). Ферментосодержащую фракцию преактивировали с 4 мМ цистеином и инкубировали с синтетическим субстратом Z-Arg-Arg-AMC в реакционной смеси следующего состава: 0.0625 мМ субстрат, 100 мкл ферментной фракции, 2 мМ EDTA-Na, 4 мМ DTT, 0.2% CHAPS в Na-фосфатном буфере (pH 6.0). После 5 мин инкубации (37°C) реакцию останавливали добавлением 1 мл 3% SDS. Кон-

центрацию свободного АМС определяли флуориметрически (λ_{exc} 360 нм, λ_{em} 460 нм). Единицу активности (ед. акт.) определяли как количество фермента в 1 г ткани, расщепляющее 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 37°C.

Активность катепсина D оценивали в осветленном экстракте мышечной ткани, полученном путем ее гомогенизации в 20 mM Трис-НСI-буфере (pH 7.0) с добавлением 0.25 M сахарозы, 1 mM EDTA-Na и 0.1% тритона X-100 (соотношение 1 : 9, вес/объем) с последующим центрифугированием (20000 g, 30 мин). В надосадочной жидкости тестировали гемоглинолитическую активность катепсина D согласно модифицированному методу Ансона [41]. Реакционная смесь, общим объемом 1000 мкл, включала 250 мкл 2.5% раствора бычьего гемоглобина (вес/объем), 250 мкл ферментной фракции и 500 мкл 0.2 M ацетатного буфера (pH 2.8), содержащего 10 mM меркаптоэтанол и 1 mM EDTA. После 60 мин инкубации (37°C) реакцию останавливали добавлением ТСА в конечной концентрации 5%. После центрифугирования (18000 g, 15 мин) определяли содержание кислоторастворимых пептидов спектрофотометрически (280 нм). За единицу активности (ед. акт.) катепсина D принимали количество фермента в 1 г ткани, вызывающее увеличение оптического поглощения на 1 OE₂₈₀ за 1 ч инкубации при 37°C.

Активность кальпаинов определяли в цитозольной фракции и во фракции мембраносвязанных белков [42]. Цитозольную фракцию получали из ткани, гомогенизированной в 20 mM Трис-НСI-буфере (pH 7.5), содержащем 80 mM KCl, 5 mM EDTA-Na и 20 mM DTT (соотношение 1 : 10, вес/объем) с последующим центрифугированием (20000 g, 20 мин). Фракцию мембраносвязанных белков — повторным центрифугированием (20000 g, 20 мин) получившегося осадка, предварительно ресуспендированного в равном объеме того же буфера с добавлением 0.33% тритона X-100. Буфер для гомогенизации включал смесь ингибиторов протеиназ: лейпептина (0.5 мкг/мл), пепстатина (1 мкг/мл), апротинина (1 мкг/мл) и 1 mM PMSF. В полученных фракциях оценивали Ca²⁺-зависимую катепсиналитическую активность, чувствительную к ингибиторам цистеиновых протеиназ. Реакционная смесь, объемом 500 мкл, включала 0.5 мг казеина, денатурированного щелочью, 20 mM DTT, 200 мкл ферментной фракции и 2.5 mM CaCl₂ или EDTA (для оценки Ca²⁺-зависимой и Ca²⁺-независимой активности соответственно) в 50 mM Трис-НСI-буфере (pH 7.5). После 30 мин инкубации (28°C) в аликвотах 100 мкл спектрофотометрически определяли содержание белка по методу Брэдфорд [43]. В экспериментах по

изучению температурного оптимума ферментативной активности и ее pH-зависимости инкубацию вели при заданной температуре (диапазон 0–50°C) или в буфере с соответствующим pH (5.0–8.0). Единицу активности кальпаинов (ед. акт.) определяли, как количество фермента, вызывающее увеличение оптического поглощения на 0.1 OE₅₉₅ за 1 ч реакции в указанных условиях. Удельную активность рассчитывали на 1 г белка соответствующей фракции.

Зимографию с казеином выполняли согласно методу [44]. Общую фракцию цитоплазматических и мембраносвязанных белков получали центрифугированием тканевых гомогенатов (105000 g, 30 мин) в 50 mM HEPES-NaOH-буфере (pH 7.6), содержащем 150 mM NaCl, 10% глицерин, 0.1% тритон X-100, 5 mM EDTA-Na, 10 mM 2-меркаптоэтанол и ингибиторы протеиназ (0.1 mM PMSF, 10 мкг/мл лейпептина) (соотношение 1 : 10, вес/объем). Разделяли белки (30 мкг на дорожку) в 12% ПААГ, сополимеризованном с казеином в концентрации 0.2%. После проведения нативного электрофореза гели инкубировали в 50 mM Трис-НСI-буфере (pH 7.2), содержащем 10 mM 2-меркаптоэтанол и 5.0 mM CaCl₂, при комнатной температуре и постоянном помешивании, и спустя 12 ч окрашивали Coomassie brilliant blue R-250.

Ингибиторный анализ проводили для подтверждения каталитического типа изучаемых протеиназ. Использовали группоспецифичные ингибиторы протеиназ в следующих концентрациях (мкМ, если не указано иначе): E64 (1.0), лейпептин (1.0), антипаин (10.0), пепстатин А (1000), N-этил-малеимид (1000), иодацетамид (1000), EDTA (5000), 1,10-фенантролин (5000), N α -D-тозил-L-лизинхлорометилкетон (1000), PMSF (1000), соевый ингибитор трипсина (1000 мкг/мл). Ферментосодержащие фракции, полученные, как описано ранее, предынкубировали с соответствующим ингибитором в указанной концентрации в течение 15 мин при температуре реакции в стандартной реакционной смеси без субстрата (в случае с кальпаинами — без кальция). Ферментативную реакцию проводили по стандартному протоколу после внесения субстрата (для кальпаинов — 5 mM Ca²⁺ или EDTA). Значение протеолитической (пептидазной) активности соотносили с ее уровнем в отсутствие ингибитора, принятым за 100% (остаточная активность).

Концентрацию белка во фракциях определяли методом Брэдфорд [43] с использованием BSA в качестве стандарта.

Статистическую обработку результатов проводили с применением общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакета

тов программ MS Excel и StatGraphics. Распределение данных отличалось от нормального, поэтому достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия U.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда по проекту № 14-24-00102 “Лососевые рыбы Северо-Запада России: эколого-биохимические механизмы раннего развития”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bond J.S., Butler P.E. // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 333–364.
2. Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1996. 104 с.
3. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83(3). P. 731–801.
4. Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1824. P. 68–88.
5. Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L. // *Cell.* 1994. V. 78. P. 761–771.
6. Dayton W.R., Goll D.E., Stromer M.H., Reville W.J., Zeece M.G., Robson R.M. // *Proteases and Biological Control* / Ed. Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1975. P. 551–577.
7. Huang J., Forsberg N.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 12100–12105.
8. Goll D.E., Neti G., Mares S.W., Thompson V.F. // *J. Anim. Sci.* 2008. V. 86. P. E19–E35.
9. Busconi L., Folco E.J., Studdert C., Sanchez J.J. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1992. V. 102. P. 303–309.
10. Seiliez I., Dias K., Cleveland B.M. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. V. 307. P. R1330–R1337.
11. Kołodziejewska I., Smorski Z.E. // *J. Food Biochem.* 1996. V. 20. P. 349–363.
12. Verrez-Bagnis V., Ladrat C., Noëlle J., Fleurence J. // *J. Sci. Food Agric.* 2002. V. 82. P. 1256–1262.
13. Mommsen T.P. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2004. V. 139(3). P. 383–400.
14. Salem M., Kenney B., Rexroad C., Yao J. // *Comp. Biochem. Physiol. D.* 2006. V. 1. P. 227–237.
15. Seiliez I., Gabillard J.C., Riffle M., Sadoul B., Dias K., Averous J., Tesseraud S., Skiba S., Panseerat S. // *Autophagy* 2012. V. 8. P. 364–375.
16. Purintrapiban J., Wang M.C., Forsberg N.E. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2003. V. 136. P. 393–401.
17. Mommsen T.P. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2001. V. 129. P. 207–219.
18. Johnston I.A., Bower N.I., Macqueen D.J. // *J. Exp. Biol.* 2011. V. 214. P. 1617–1628.
19. Salem M., Silverstein J., Rexroad C.E., Yao J. // *BMC Genomics.* 2007. V. 8. P. 328.
20. Overturf K., Gaylord T.G. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2009. V. 152. P. 150–160.
21. Cleveland B.M., Burr G.S. // *Aquaculture.* 2011. V. 319. P. 194–204.
22. Cleveland B.M., Weber G.M. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011. V. 174. P. 132–142.
23. Немова Н.Н., Сидоров В.С., Рунатти П.О. // *Вопр. ихтиологии.* 1980. Т. 20. № 1. С. 180–182.
24. Salmerón C., García de la serrana D., Jiménez-Amilburu V., Fontanillas R., Navarro I., Johnston I.A., Gutiérrez J., Capilla E. // *PLoS ONE.* 2013. V. 8(9). P. e75349.
25. Nemova N.N., Kaivarainen E.I., Bondareva L.A. // *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 2 Khimiya.* 2000. V. 41(Suppl. 6). P. 106–108.
26. Salem M., Kenney P.B., Killefer J., Nath J. // *J. Muscle Foods.* 2004. V. 15. P. 245–255.
27. Bahuaud D., Gaarder M., Veiseth-Kent E., Thomassen M. // *Aquaculture.* 2010. V. 310. P. 213–220.
28. Gaarder M., Thomassen M.S., Veiseth-Kent E. // *Food Chemistry.* 2011. V. 125. P. 1091–1096.
29. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Немова Н.Н. // *Биоорг. химия.* 2012. Т. 38. № 3. С. 324–332. [Lysenko L.A., Kantserova N.P., Ushakova N.V., and Nemova N.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2012. V. 38. P. 282–290.]
30. Muramoto M., Yamamoto Y., Seki N. // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1989. V. 55. P. 917–923.
31. Salem M., Yao J., Rexroad C., Kenney B., Semmens K., Killefer J., Nath J. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2005. V. 141. P. 488–497.
32. Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M., Verrez-Bagnis V. // *Food Chem.* 2007. V. 101. P. 1474–1479.
33. Yamashita M., Konagaya S. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1992. V. 103(4). P. 999–1003.
34. Liu H., Yin L., Zhang N., Li S., Ma C. // *Food Chem.* 2008. V. 110(2). P. 310–318.
35. Wang P.A., Stenvik J., Larsen R., Maehre H., Olsen R.L. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2007. V. 147(3). P. 504–511.
36. Чурова М.В., Мещерякова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н. // *Онтогенез.* 2015. № 5 [в печати].
37. Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noël J., Fleurence J. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2000. V. 125. P. 83–95.
38. Cottin P., Brustis J.J., Poussard S., Elamrani N., Broncard S., Ducastaing A. // *Biochim Biophys Acta.* 1994. V. 1223(2). P. 170–178.
39. Fukuda M., Sako H., Shigeta T., Shibata R. // *Marine Biology.* 2001. V. 138(1). P. 47–55.
40. Шустов Ю.А., Барышев И.А., Белякова Е.Н. // *Биология внутренних вод.* 2012. № 3. С. 66–70.
41. Anson M.L. // *J. Gen. Physiol.* 1938. V. 22. P. 79–89.
42. Enns D.L., Belcastro A.N. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. V. 84. P. 601–609.
43. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
44. Arthur J.S.C., Mykles D.L. // *Calpain. Methods and Protocols* / Ed. Elce J.S. New Jersey: Humana Press, 2000. P. 109–116.

Intracellular Protein Degradation in Growth of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L.**L. A. Lysenko[#], N. P. Kantserova, M. Yu. Krupnova, A. E. Veselov, N. N. Nemova**[#]Phone: +7 (8142) 57-18-79; fax: +7 (8142) 76-98-10; e-mail: l-lysenko@yandex.ru*The Institute of Biology, Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences, 185910, Petrozavodsk, Pushkinskaya, 11*

A brief review on the common characteristics and specific features of proteolytic machinery in fish skeletal muscles (based on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Salmonidae) has been given. Among a variety of proteases in the muscle tissue, those determining protein degradation level in developing and intensively growing muscles in salmon young and by this way regulating protein retention intensity and growth at all namely lysosomal cathepsins B and D and calcium-dependent proteases (calpains) were comprehensively studied. Revealed age-related differences in intracellular protease activity in salmon skeletal muscles indicate the role of proteolysis regulation in growth in general and a specific role of the individual proteolytic enzymes in particular. The data on negative correlation of cathepsin D and calpain activity levels in muscles and the rate of weight increase in juvenile salmon were obtained. A revealed positive correlation of cathepsin B activity and morphometric parameters in fish young presumably indicates its primary contribution to non-myofibrillar protein turnover.

Keywords: protein degradation, skeletal muscle, calpain, cathepsin, Atlantic salmon, growth