

УДК 577.152.34.032:597.553.2-113.32

ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ В ПРОЦЕССАХ РОСТА И РАЗВИТИЯ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

© 2016 г. Н. Н. Немова, Л. А. Лысенко, Н. П. Канцерова

Институт биологии Карельского научного центра РАН
185910 г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: l-lysenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.12.2015 г.

Окончательный вариант получен 01.02.2016 г.

Дан анализ литературных сведений и материалов собственных исследований о роли ферментов внутриклеточного протеолиза и регулируемых ими метаболических и сигнальных процессов на некоторых этапах роста и развития лососевых рыб. Рассмотрены основные пути внутриклеточного протеолиза – лизосомально-аутофагический, протеасомный и кальпаиновый – и их соотношение в скелетных мышцах рыб. Скелетные мышцы составляют более половины веса рыб и испытывают наиболее выраженные изменения при действии анаболических и катаболических сигналов. Особо внимание уделено интенсивности белковой деградации в период активного роста рыб, сопровождающийся высокой скоростью синтеза и обмена белка, и в репродуктивный период, связанный, напротив, с преобладанием катаболических процессов. Учитывая уникальную для рыб роль скелетных мышц как депо пластических и энергетических субстратов, процесс деградации мышечных белков рассмотрен как ключевой механизм регуляции интенсивности роста ювенильных лососей, а также поддержания жизнеспособности и репродуктивного потенциала лососевых рыб в периоды созревания половых продуктов, голодания и нерестовой миграции. В статье обосновывается возможность использования системы показателей внутриклеточного протеолиза для характеристики раннего развития лососевых рыб.

Ключевые слова: внутриклеточный протеолиз, кальпаин, катепсин, протеасома, лососевые рыбы, рост, развитие.

DOI: 10.7868/S0475145016040066

ВВЕДЕНИЕ

Семейство Лососевые (Salmonidae) объединяет рыб с различным жизненным циклом, анадромные и пресноводные формы. Рыбы родов *Oncorhynchus* и *Salmo* широко распространены как в дикой природе, так и в условиях искусственного разведения. Коммерческая ценность лососевых и большие усилия, направленные на восстановление их естественных популяций (Веселов, Калужин, 2001; Noakes, Beamish, 2011), диктуют необходимость в мониторинге благополучия их природных и искусственных стад, включая оценку темпов роста и репродуктивного потенциала рыб.

Для понимания молекулярных основ процессов роста и развития рыб необходимы четкие представления о ферментных системах, критически значимых для перехода от одного этапа раннего развития к другому – от оплодотворения до вылупления (Нейфах, Тимофеева, 1977; Немова, 1996) – и далее определяющих эффективность ростовых процессов и репродуктивный успех. Одной из важнейших сигнальных и метаболических ферментных систем является внутриклеточный протеолиз, который, находясь под гормо-

нальным контролем (Cleveland, Weber, 2011), регулирует метаболизм на всех стадиях развития организма (Bohley, 1987; Немова, 1996; Attaix et al., 1999). Функции протеиназ можно условно разделить на собственно *белковую деградацию* – полный гидролиз, которому подвергаются все функциональные и структурные белки организма в ходе их обмена, а также дефектные, избыточные и чужеродные, и *регуляторные реакции ограниченного протеолиза* белковых молекул, которые, благодаря такой модификации, приобретают или, напротив, утрачивают биологическую активность. Белковая деградация, катализируемая системой протеиназ и пептидаз, рассматривается в настоящее время как высокоселективный и строго контролируемый механизм биологической регуляции (Attaix et al., 1999; Hershko et al., 2000; Лысенко и др., 2011). Основными системами белковой деградации у позвоночных животных признаны убиквитин-протеасомная, лизосомально-аутофагическая и кальпаиновая, причем у млекопитающих преобладают первые два пути – протеасомный и лизосомальный (Sandri, 2010), а у рыб – лизосомальный и кальпаиновый (Martin et al., 2002; Salem et al., 2005a). Помимо отличного от млеко-

питающих соотношения вклада указанных протеолитических систем в общую белковую деградацию, уникальной особенностью рыб является энергетическая роль продуктов протеолитической реакции — аминокислот, которые, наряду с липидами, служат субстратами окислительного фосфорилирования и предшественниками для глюконеогенеза (у млекопитающих, как известно, основными источниками энергии являются углеводы) (Van den Thillart, 1986; Peragon et al., 1999; Mommsen, 2001; Ezaki et al., 2011; Seiliez et al., 2014). Процесс роста — преобразования пищевых веществ и энергии в биосинтез и накопление живой массы — имеет у рыб свои особенности, связанные с его недетерминированностью, в основе которой лежит преобладание синтетических процессов над катаболическими на протяжении всего жизненного цикла. Вместе с тем, лососевые рыбы переживают периоды массивной потери резервных и структурных веществ (до половины массы тела) — истощающие миграции, нерест, длительное голодание. Основные изменения — наиболее интенсивный прирост белковой массы и самые значительные ее потери — происходят в белых мышцах рыб за счет синтеза и деградации миофибриллярных белков. Исходя из этого, внутриклеточные протеолитические системы скелетных мышц отвечают у лососевых рыб не только за базовый обмен клеточных белков, но и обеспечивают жизнеспособность особей в ситуациях, связанных с повышенными энергозатратами — в периоды созревания половых продуктов (Cleveland, Weber, 2011), нерестовых миграций (Salem et al., 2006), ограничения кормовой базы (Cleveland, Burr, 2011) и голодания (Немова и др., 1980; Salem et al., 2005a, 2007; Salmerón et al., 2013). Изучение роли внутриклеточных протеолитических ферментов на различных этапах онтогенеза лососевых рыб дает новую информацию о специфических механизмах их роста и развития.

РОЛЬ БЕЛКОВОЙ ДЕГРАДАЦИИ В ОНТОГЕНЕЗЕ РЫБ

В рамках данного обзора основное внимание уделено регуляторной роли процесса белковой деградации — массового гидролиза эндогенных белков внутриклеточными протеиназами — на постэмбриональных этапах развития лососевых рыб. Деградация белка и активность осуществляющих ее протеолитических ферментов в мышцах рыб строго регулируются; они зависят от многих факторов, в том числе возраста, этапа годового цикла и кормовой базы (Salem et al., 2007; Overturf, Gaylord, 2009; Cleveland, Burr, 2011). Жизненный цикл рыб включает периоды с преобладанием анаболических и катаболических процессов, в одинаковой мере зависящие от тонкой настройки интенсивности деградации эндогенных белков, преимущественно, мышечных. Как ни парадоксально, именно белковая деградация лежит в ос-

нове регуляции недетерминированного роста рыб, свойственного большинству представителей кл. Костистых рыб (Teleostei), включая лососевых. Также посредством белковой деградации поддерживается жизнеспособность и репродуктивный потенциал особей лососевых и нерестовый период, связанный с огромными затратами энергетических и пластических ресурсов на созревание половых продуктов и нерестовую миграцию, протекающие к тому же на фоне голодания. Важная роль накопления и утилизации миофибриллярных белков является причиной наиболее интенсивного изучения протеолитического аппарата мышечной ткани рыб в рамках обсуждаемой проблемы (Purintrapiban et al., 2003; Salem et al., 2005a, 2006; Seiliez et al., 2008, 2014; Немова и др., 2014; Лысенко и др., 2015).

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ РЫБ

В скелетных мышцах рыб, как и прочих эукариот, присутствуют разнообразные протеиназы, протеолитические комплексы и многочисленные пептидазы. Белковая деградация в мышцах рыб осуществляется кальпаиновой, лизосомально-аутофагической и, в меньшей степени, убиквитин-протеасомной протеолитическими системами (Mommsen, 2004; Salem et al., 2006; Overturf, Gaylord, 2009; Salmerón et al., 2013, 2015). Протеиназы, пространственно организованные по двум относительно независимым путям — лизосомальному и нелизосомальному, синергично участвуют в выполнении общей функции.

Кальцийзависимые протеиназы семейства кальпаинов и их эндогенный ингибитор, кальпаастатин, функционируют в эукариотических клетках как единая высокорегулируемая протеолитическая система (Goll et al., 2003; Ono, Sorimachi, 2012). В скелетных мышцах кальпаины локализованы в саркомерах и саркоплазме в виде проферментов, которые транслоцируются к сарколемме в ответ на повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} . Кальпаиновая система рыб представлена несколькими молекулярными формами протеиназ, среди которых преобладают μ - и m -кальпаины (димеры полипептидов кальпаин 1 или кальпаин 2 и малой субъединицы кальпаинов соответственно), и кальпастином. Доказана жизненная важность m -кальпаина в раннем развитии животных, а отсутствие μ -кальпаина компенсируется (Goll et al., 2003), что свидетельствует о функциональной разнокачественности основных форм фермента. В скелетных мышцах также присутствует тканеспецифичный кальпаин 3, причем уровень его экспрессии в десять раз превышает таковой кальпаинов 1 и 2 (Sorimachi et al., 1989); однако его основная роль — сигнальная — не связана с белковой деградацией в скелетных мышцах (Goll et al., 2008). Учитывая особенности филогенеза Teleostei (Jékely, Friedrich, 1999), предсказуемым оказалось



Соотношение активностей основных протеолитических систем в культурах мышечных клеток млекопитающих (а) и рыб (б). Данные (Purintrapiban et al., 2003; Seiliez et al., 2014), полученные путем ингибирования отдельных путей протеолиза, дают приблизительную картину в силу кросс-реактивности ингибиторов. В отличие от млекопитающих, у рыб преобладают АТФ-независимые пути гидролиза мышечных белков.

обнаружение у лососевых двойного набора последовательностей, кодирующих ортологи кальпаинов и кальпастина млекопитающих (Salem et al., 2005a, 2005b; Лысенко и др., 2012).

Кальпаины осуществляют селективную деградацию белков, преимущественно короткоживущих, в цитозольном компартменте и обеспечивают тем самым регуляцию таких процессов, как внутриклеточная сигнализация, цитодифференцировка, различные пути клеточной гибели и другие (Goll et al., 2003; Немова и др., 2010; Оно, Sorimachi, 2012). Кальпаинозависимый гидролиз мышечных белков по многим механизмам обеспечивает поддержание структуры миофибрилл. Из экспериментов с млекопитающими известно, что кальпаины и кальпастин регулируют процесс формирования мышечных волокон, способствуя слиянию миобластов и реорганизации цитоскелета клетки (Cottin et al., 1994; Temm-Grove et al., 1999). Детально изучено участие кальпаинов и кальпастина не только в физиологическом обмене миофибрилярных белков при дифференцировке, атрофии и регенерации мышц (Goll et al., 2008), но и в патологической потере мышечной массы при развитии определенных типов мышечных дистрофий и кахексиях иного генеза у млекопитающих и человека (Goll et al., 2003; Sorimachi, Оно, 2012). Кальпаины активируются на самых ранних этапах удаления саркомерных белков; обычно они сконцентрированы вблизи Z-дисков, в начальном сайте деструкции миофибрилл (Goll et al., 2003). В ходе кальпаинозависимого ограниченного гидролиза субстратных белков, коннектина или небулина, разрушается структура миофибрилл (Huang, Forsberg, 1998; Goll et al., 2003, 2008), и тем самым облегчается дальнейшее расщепление миофибрилярных белков протеасомами или катепсинами (Jackman, Kandarian, 2004). Таким образом, осуществляя “разборку” мышечных волокон, кальпаины инициируют многие пути белковой деградации, что приводит к атрофии мышц. Кальпаины рыб вносят еще более существенный вклад в гидролиз миофибрилярных белков, о чем свидетельствуют их высокая протеолитическая активность (рисунок) и значитель-

но более широкая субстратная специфичность в сравнении с кальпаинами млекопитающих. Так, спектр кальпаинчувствительных субстратов у рыб включает основные миофибрилярные и саркоплазматические белки (тяжелую цепь миозина, тропомиозин, α -актинин, тропонины Т и I, коннектин, десмин; Verrez-Bagnis et al., 2002; Немова и др., 2010; Salmerón et al., 2013).

Лизосомальные протеиназы (катепсины) осуществляют гидролиз белков цитоплазмы или органелл клетки в ходе аутофагической реакции, протекающей при низких значениях pH внутри везикул – аутофаголизосом (Bohley, 1987; Chen, Klionsky, 2011; Ciechanover, 2013). У рыб обнаружены более десяти различных катепсинов, относящихся к четырем основным каталитическим типам, из них основная роль в тотальном протеолизе отводится катепсину D, второстепенная – катепсинам B, H и L (Немова, 1996; Nielsen, Nielsen, 2001; Mommsen, 2004). Катепсин D, протеиназа аспартагного типа – основной фермент протеолиза мышечных белков у рыб; он расщепляет нативные белки, включая тяжелую цепь миозина, актин и тропомиозин (Nielsen, Nielsen, 2001). Его созревание в лизосомах требует участия цистеиновых протеиназ, например, катепсина B (Chen, Klionsky, 2011). В свою очередь, гидролизующая способность катепсина B по отношению к миофибрилярным белкам невысока: он расщепляет только тропонин I, коннектин и небулин, причем последние – крайне медленно, не гидролизует нативный коллаген (Yamashita, Konagaya, 1992; Bahuaud et al., 2010). Данные о pH оптимуме, субстратной специфичности *in vitro*, ингибиторного анализа свидетельствуют о значительном сходстве ферментов рыб с одноименными лизосомальными ферментами из других организмов (Немова, 1996; Лысенко и др., 2015). В мышцах рыб регуляция аутофагии осуществляется по универсальным механизмам (внутрилизосомальный pH, эндогенные ингибиторы цистатины и другие; Chen, Klionsky, 2011) и, вместе с тем, имеет свои особенности: например, у рыб функционально неактивен сигнальный путь регуляции аутофагии Akt-FoxO (Cleveland, Evenhuis, 2010), основной в

мышцах млекопитающих (Glass, 2010). Свободные аминокислоты служат отрицательным регулятором этой системы (Seiliez et al., 2012). Лизосомальные протеиназы осуществляют глубокий и низкоselectивный протеолиз; по этому пути в мышцах млекопитающих и рыб гидролизуется сходное количество белков — около 40% (рисунок; Purintrapiban et al., 2003; Seiliez et al., 2014).

Базальный уровень аутофагии, протекающей во всех, за редким исключением, клетках, критически важен для гомеостаза в мышцах, поскольку по этому пути элиминируются белковые агрегаты и дефектные митохондрии (Masiero et al., 2009; Sandri, 2010). При избирательном подавлении аутофагии в мышцах нарушаются их функции — наблюдается выраженная слабость, атрофия, сниженная сократительная способность (показано на модели мыши) (Masiero et al., 2009). Индукция аутофагии происходит вследствие голодания, оксидативного стресса или инфекционных заболеваний (Mizushima, Klionsky, 2007). Активация лизосомальной системы и особенно катепсина D в период нерестовой миграции — специфичная для лососевых рыб стратегия; с ней связывают неопосредованные изменения в тканях лососей, приводящие к их гибели. Степень активации катепсина D и тяжесть вызванных ею структурных повреждений варьирует у разных видов лососевых. В некоторых случаях катепсин D действует совместно с другими лизосомальными протеиназами, особенно цистеиновыми катепсином L и катепсин-L-подобными ферментами (Ando et al., 1986; Yamashita, Konagaya, 1992).

Убиквитин-протеасомная система — высококонсервативный путь деградации белков, обнаруживаемый у всех форм жизни, начиная с археобактерий (Hershko et al., 2000). Сложноорганизованные белковые структуры — 20S и 26S протеасомы — включают протеолитические модули (β -субъединицы) с разными типами протеолитической активности (трипсин-, химотрипсин- и каспазаподобной), способные расщеплять любые полипептиды, проникшие в полость протеасомы. Селективность протеасомной белковой деградации достигается за счет серии реакций, в ходе которых предназначенный для гидролиза субстрат приобретает полиубиквитиновую метку (Ardley, Robinson, 2005).

Протеасомный путь деградации белков рассматривается как основной в большинстве тканей позвоночных животных (до 90% общей белковой деградации), при этом в скелетных мышцах млекопитающих (показано на L8 миобластах крысы) его активность несколько ниже — до 62% белковой деградации (рисунок; Purintrapiban et al., 2003; Lecker et al., 2004). В мышцах рыб содержание компонентов протеасом значительно ниже, чем в других органах (например, гонадах и печени; Busconi et al., 1992), а их активность составляет менее 4% тотального протеолиза, из чего следует, что у рыб доминируют непротеасомные пути белковой деградации — аутофагический и каль-

цийзависимый (30–34 и 40% гидролизуемого белка соответственно; Martin et al., 2002; Dobby et al., 2004; Seiliez et al., 2014). Некоторые исследователи связывают предпочтение лизосомального и кальпаинового путей протеолиза в метаболизме рыб с их энерго-независимостью (Seiliez et al., 2014).

Протеасомы контролируют клеточный цикл и качество синтезируемых клеткой белков, элиминируя стадийспецифичные, избыточные и дефектные (Ciechanover, 2013). Традиционно этот путь связывали с деградацией короткоживущих растворимых белков, и доказательства участия протеасом в деградации и обмене белковых компонентов саркомеров относительно новы (Solomon et al., 1998). На модели дрозофилы с нарушенной функцией протеасом показана повсеместная дезорганизация мышц, индукция атрофии (12 ч после воздействия) и дальнейшие обездвиживание, потеря структуры саркомеров, повышение количества аутофагосом и экспрессия шаперонов (24 ч после воздействия) (Haas et al., 2007). Протеасомы способны к медленному *in vitro* гидролизу актина, актомиозина и тяжелой цепи миозина и значительно более эффективны против их мономерных форм (Solomon et al., 1998; Lecker et al., 2004). При избытке субстратов *in vivo*, протеасомному гидролизу должны предшествовать дополнительные протеолитические этапы, например, с участием кальпаинов или каспазы-3, облегчающие доступность субстратных белков (Cottin et al., 1994; Jackman, Kandarian, 2004; Goll et al., 2008). Обмен самих протеасомных комплексов может осуществляться аутокаталитически (Tanaka, Ichihara, 1989) или по лизосомальному пути (Cuervo, Dice, 1998).

Атрофия мышц у млекопитающих, вызванная голоданием, заболеваниями, связанными с потерей мышечной массы, или возрастными изменениями (саркопенией), сопровождается деградацией мышечных белков преимущественно по убиквитин-протеасомному пути (Lecker et al., 2004). Две убиквитин лигазы, MuRF1 и MAFbx (или Атрогин-1), рассматриваются как транскрипционные маркеры атрофии мышц у позвоночных; MuRF1 участвует в расщеплении миофибриллярных белков, включая тяжелую цепь миозина, а MAFbx — в контроле белкового синтеза за счет регуляции транскрипционных факторов, таких как MyoD (Glass, 2010; Sorimachi, Ono, 2012). У рыб основной причиной атрофии мышц является длительное голодание (Guderley et al., 2003), а о возрастных изменениях (саркопении) можно говорить лишь у тех немногих видов, рост которых детерминирован, таких как данио *D. rerio* (Froehlich et al., 2013).

Таким образом, в скелетных мышцах рыб присутствуют классические ферментные системы внутриклеточного протеолиза — протеасомная, катепсина и кальпаиновая — однако их вклад в тотальную белковую деградацию тканеспецифичен и отличен от такового у млекопитающих. Протеиназы непосредственно участвуют как в

физиологическом обмене мышечных белков, так и в деструктивных (атрофических) изменениях мышечной ткани.

БЕЛКОВАЯ ДЕГРАДАЦИЯ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ РОСТА И РАЗВИТИЯ

Период активного роста

Характерной чертой большинства представителей кл. Костистых рыб (Teleostei), к которому принадлежит сем. Лососевые, является недетерминированный рост. Лососевые – показательная модель для изучения ростовых процессов указанного типа, в отличие от, например, данио *D. rerio*, имеющего предельный размер. Прирост мышечной массы рыб осуществляется за счет гиперплазии (образования новых волокон) примерно до 40–50% от максимальной длины особи, а далее, до самой гибели – за счет гипертрофии (увеличения размера волокон) (Johnston, 2006).

Скорость роста лососевых рыб на протяжении их жизни очень неравномерна, она особенно вариабельна у молоди весом от 5 до 300 г (Hutchings, Jones, 1998). Индивидуальные различия в скорости роста между рыбами определенного размера или возраста в решающей мере объясняются регуляцией обмена белков в мышцах. Синтез белка при недетерминированном росте должен превалировать над его распадом, по крайней мере, в мышечной ткани, которая составляет более половины веса рыбы. Белые мышцы рыб состоят преимущественно из белка, вследствие чего от скорости его аккумуляции в мышцах напрямую зависит прирост живого веса рыбы (Vigneau et al., 2006). Следовательно, интенсивность деградации белка в мышцах рыб может значительно изменять скорость накопления белковой массы и, в итоге, роста рыб.

Высокая скорость синтеза белка у активно растущих особей (от 0+ до 3+) сопровождается интенсивной работой протеолитических систем, отвечающих за его обмен и контроль качества, при том, что баланс синтеза и распада белка остается положительным. Возрастная динамика кальпаинового, протеасомного и катепсин D-зависимого протеолиза связана обратной зависимостью со скоростью прироста мышечной массы ювенильных лососей: у молоди первого года жизни, при максимальной скорости роста активность этих ферментов минимальна; наиболее четкие зависимости установлены для катепсина D и кальпаинов (Dobly et al., 2004; Lysenko et al., 2015; Лысенко и др., 2015). Снижение активности кальпаинов в мышцах молоди рыб происходит преимущественно по механизму их ингибирования кальпастатином, а именно его “длинной” формой CAST-L, которая, в силу регуляторного значения для белкового обмена, является потенциальным биомаркером прироста белковой массы рыб (Salem et al., 2005b, 2006). В то же время, корреляция активности катепсина B с морфометрическими

показателями молоди рыб положительна (Лысенко и др., 2015), по-видимому, это отражает его приоритетное участие в регуляторных процессинговых реакциях, а не в белковой деградации.

Особый интерес представляет малоизученный вопрос о роли внутриклеточного протеолиза в формировании индивидуальной фенотипической разнокачественности молоди лососевых рыб после выклева в ходе расселения по биотопам. При сравнении одновозрастной молоди, обитающей в разных по кормовой базе и гидрологическим условиям биотопах (основном русле реки и мелководных притоках), отмечается ее дифференциация по размеру и массе, а также по активности метаболических процессов (Чурова и др., 2015). У особей из более благоприятных для обитания и нагула условий наблюдается сниженная активность кальпаинов и катепсина D и повышенная – катепсина B (Немова и др., 2014, 2015).

Активность протеолитических систем согласованно изменяется в период физиологической подготовки молоди лососей к обитанию в полносолевой морской воде – на стадии смолтификации. В эту стадию вступают пары лососевых разного возраста (от 1+ до 4+), достигшие достаточных размеров и находящиеся в благоприятной для интенсивного роста среде (Björnsson, Bradley, 2007). В мышцах смолтов атлантического лосося *S. salar* наблюдается активизация синтетических процессов и супрессия белкового катаболизма (Seear et al., 2010), направленные на ускорение прироста массы особей и накопление резервных веществ, включая структурные белки скелетных мышц. Смолты кумжи *S. trutta*, в отличие от лосося *S. salar*, к моменту ската в море зачастую не обладают сформированной системой осморегуляции. В этих условиях протеолиз эндогенных белков, преимущественно кальпаинозависимый (Канцерова и др., неопубликованные данные), способствует пополнению внутриклеточного пула аминокислот, среди которых наиболее важны для адаптации в новой среде осмотически активные (Somero, Yancey, 2011). Эта протеиназорегулируемая адаптивная стратегия поддержания осмолярности клеток роднит анадромных рыб с более примитивными организмами, обитающими в водоемах с неустойчивым соленостным режимом (Lysenko et al., 2012).

Характеристика протеолитических механизмов роста рыб и способов его регуляции должна учитываться в коммерческом рыбоводстве при разработке мер по ускорению роста рыб путем увеличения эффективности трансформации питательных веществ. Оптимальный рацион лососевых рыб, для которых характерно хищное питание, должен включать преимущественно белок животного происхождения (например, рыбный фарш), поскольку при его замене на растительный с аналогичной пищевой и энергетической ценностью прирост мышечной массы замедляется на 10% и более (Alami-Durante et al., 2010). Неответствие растительных белков свойственным

хищным рыбам путем трансформации веществ и энергии приводит к снижению динамики прироста живой массы лососей, в решающей мере за счет повышения уровня экспрессии катепсина D (Alami-Durante et al., 2010). В рыборазведении должно быть отдано предпочтение линиям лососевых с конститутивно повышенным уровнем кальпастина, благодаря которому достигается снижение кальпаинозависимой белковой деградации, ускоряется прирост мышечной массы и улучшается качество получаемого продукта за счет большей плотности мышечной массы (Salem et al., 2005b).

Периоды, сопровождающиеся мышечной атрофией

Особенность жизненного цикла лососевых рыб заключается в наличии периодов, когда три разных механизма — голодание, созревание гонад и высокая двигательная активность — одновременно направлены на беспрецедентно высокий уровень протеолиза и обогащение тела аминокислотами. Во время нерестовой миграции рыба утрачивает почти весь запас липидов и примерно половину массы скелетных мышц, в которых белковые компоненты замещаются водой, за счет чего поддерживается общая масса и форма тела. Вместе с тем, будучи холоднокровными животными и обитая в водной среде — идеальном растворителе, рыбы существенно сокращают свои затраты на детоксикацию азотсодержащих продуктов обмена и поддержание температуры тела, а избыток энергии направляется на аккумуляцию белков, включая мышечные. Метаболические адаптации лососевых рыб, миграции которых могут продолжаться более месяца при полном голодании, позволяют им сохранить высокую двигательную активность и реализовать свой репродуктивный потенциал. Нерестовая миграция тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* — более чем тысячекilометровая дистанция в пресной воде против течения и с постоянным положительным уклоном — занимает около шести недель и завершается нерестом и гибелью производителей. Другие виды лососевых, например, атлантический лосось *S. salar*, сохраняют способность к возврату с нерестилищ в море и к неоднократному нересту (Веселов, Калужин, 2001).

Ресурсы организма в нерестовый период расходуются по двум в равной степени важным направлениям — на формирование массы созревающих гонад и высокую двигательную активность в ходе миграции. Поэтому не все продукты гидролиза белков используются для окисления, существенная их часть становится строительными блоками для развивающихся ооцитов, в частности — биосинтеза вителлогенина в печени. Липидные и белковые запасы могут использоваться дифференцированно, например, у сельди липиды преимущественно обеспечивают метаболические процессы, а белки дают строительные блоки для

развивающихся гонад (Bradford, 1993). Энергозатраты и роль в них белков существенно возрастают по ходу миграции — энергетически затратного периода; при этом во второй половине миграции и нереста они могут представлять единственный источник энергии. Глюкоза необходима для нормального функционирования жизненно важных органов, таких как мозг, но ее запасы невелики и требуют постоянного восполнения за счет глюконеогенеза. Глюконеогенез осуществляется в печени ферментами гликолитического пути, синтез которых не прекращается даже при сильном истощении (Morata et al., 1982), а субстратом являются свободные аминокислоты (Mommensen et al., 1980).

В период длительной нерестовой миграции из морской воды в пресную в белых мышцах лососевых десятикратно возрастает протеолитическая активность лизосомальных протеиназ, далее, по мере продвижения рыбы к месту нереста, она линейно увеличивается (Mommensen, 2004). Избирательная активация катепсина D происходит за счет усиления его синтеза, а не по другим механизмам (удаления эндогенного ингибитора, например). Активация, помимо того, не связана с увеличением количества лизосом, о чем свидетельствует стабильная в течение всей миграции активность маркерного фермента лизосом, h-N-ацетилглюкозаминидазы. Также двукратно повышается активность кислой карбоксипептидазы А, другого лизосомального фермента, участвующего в белковой деградации в белых мышцах (Mommensen, 2004). Индукция катепсина D и карбоксипептидазы А при неизменном количестве лизосом свидетельствует об их избирательном синтезе и селективном переносе в лизосомы. Сходная картина лизосомальной активности в мышцах рыб была описана у мигрирующих нерки (*O. nerka*; Mommensen, 2004) и кеты (*O. keta*; Ando et al., 1986; Yamashita, Konagaya, 1990), нерестящихся атлантического лосося (*S. salar*; Немова и др., 1980; von der Decken, 1992) и айю (*Plecoglossus altivelis*; Toyohara et al., 1991), а также у лососей, обитающих в загрязненных водоемах (Carnevali, Maradona, 2003). Эти результаты подчеркивают общность регуляции активации лизосомальной аутофагии кортикостероидами, поскольку каждый из рассмотренных факторов — миграция, токсиканты и интенсивная нагрузка — приводит к повышению активности гипоталамо-надпочечниковой системы (Carruth et al., 2000), определяющей уровень кортизола. У большинства изученных видов процесс атрофии мышц, связанной с нерестом, протекает без участия компонентов убиквитин-протеасомного пути (Salem et al., 2006).

Сочетанное действие факторов, индуцирующих атрофию, обладает настолько выраженным деструктивным действием, что производители тихоокеанских лососей (*Oncorhynchus* spp.) нерестятся единственный раз в жизни, после чего погибают. Активация лизосомальных протеиназ приводит к массовой деградации белков и разру-

шению тонкой структуры не только скелетных мышц, но и сердечной мышцы и гладкомышечных элементов кровеносных сосудов (Немова, 1996), что становится причиной их гибели. Вместе с тем, среди атлантических лососей есть особи, сохраняющие способность к нересту до четырех раз; по-видимому, этот вид обладает достаточными эндогенными ресурсами для переживания энергозатратного периода и более совершенной системой репарации повреждений.

Усиление аутофагии в период нерестовой миграции служит не только целям энергопродукции, но и позволяет избавиться от белков с нарушенной структурой, которые образуются в различных стрессовых ситуациях (Cuervo, Dice, 1998; Kuma et al., 2004), включая нерестовые миграции. Деструкция мышц у рыб имеет существенные отличия от атрофических изменений в мышцах млекопитающих. Аминокислоты, получаемые при гидролизе эндогенных белков, являются для рыб основным субстратом для обеспечения энергетических потребностей, а у млекопитающих они расходуются лишь при истощении углеводных и липидных резервов (Mommensen, 2001; Seilliez et al., 2014). Другая отличительная особенность протеолиза мышечных белков у рыб — участие в этом процессе лизосомальных ферментов, главным образом, катепсина D, активация которого никогда не сопровождается патологией мышечной ткани атрофического характера у млекопитающих (Sorimachi, Ono, 2012).

Ниже обсуждаются имеющиеся данные, которые позволяют, в известной мере, дифференцировать вклад отдельных индуцирующих атрофию факторов — созревания половых продуктов, двигательной нагрузки и голодания — в общую белковую деградацию у лососевых в период нерестовой миграции.

Созревание гонад

Рыбы, в сравнении с другими позвоночными, тратят гораздо большую долю энергии, особенно запасенную в белых мышцах, на воспроизводство, часто в условиях дефицита питания или голодания. Созревание гонад у всех видов рыб сопровождается высокой интенсивностью белковой деградации, направленной на получение аминокислот — пластических веществ для биосинтеза и субстратов для энергопродукции одновременно (Van den Thillart, 1986). У самок лососевых яичники могут составлять до 20% от веса тела, а энергия и пластические вещества, необходимые для синтеза белков желтка (вителлогенина) и роста гонад, частично мобилизуются из эндогенных депо, преимущественно висцеральных липидов и мышечных белков (Aussanasuwannakul et al., 2011). Поскольку всем рыбам свойственен недетерминированный рост, ресурсы для созревания гонад с возрастом повышаются.

В период созревания гонад показатели белковой деградации в белых мышцах лососевых возраст-

тают, причем активация разных систем происходит синергично. В мышцах фертильных нерестящихся рыб повышается экспрессия генов и активность катепсина D, B и L, кальпаинов и, в меньшей степени, протеасомы и каспаз (Salem et al., 2006). Активации катепсина в ходе созревания половых продуктов также способствует одновременное снижение уровня их эндогенных ингибиторов (показано на айю, *P. altivelis*), особенно выраженное у самок рыб (Toyohara et al., 1991). В работах, выполненных на атлантическом лососе и радужной форели (в условиях аквакультуры) (Немова и др., 1980; Немова, 1996) была показана взаимосвязь уровня активности исследуемых протеиназ с переходом к тому или иному этапу оогенеза рыб, при этом максимальная активность протеиназ была отмечена в печени и мышцах самок на этапе трофоплазматического роста ооцитов, то есть в период наиболее активной транспортировки питательных веществ в ооциты.

Активация внутриклеточного протеолиза тесно связана с повышением уровня половых стероидов, главным образом, 17 β -эстрадиола (Lubzens et al., 2010), которое рассматривается как сигнал к созреванию. Эстрадиол ускоряет катаболизм белков мышечной ткани на стадии вителлогенеза в оогенезе лососевых по механизму эстроген-зависимого снижения уровня циркулирующего инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) (Cleveland, Weber, 2011), анаболического гормона. При введении экзогенного эстрадиола атлантическому лососю *S. salar* были получены доказательства избирательной активации лизосомальных (преимущественно катепсина D), но не нейтральных протеиназ, и усиления расщепления тяжелой цепи миозина в этих условиях (Olin et al., 1991). Эти наблюдения подтверждают присутствие в гене катепсина D эстроген-респонсивных элементов, отвечающих повышением его транскрипции при действии стероидов (Cavaillès et al., 1991).

Расходование гидролизованного белка может различаться у разных видов рыб и в зависимости от потребностей. У нерки *O. nerka*, при ее энергозатратной нерестовой миграции аминокислоты, полученные при гидролизе белковых ресурсов расходуются на созревание гонад, окисление и глюконеогенез. У других видов стратегия может быть иной; например, у самок атлантического лососа *S. salar*, при умеренной метаболической нагрузке, связанной с миграцией, продукты протеолиза скелетных мышц направляются на созревание гонад. Расход мышечных белков на созревание гонад в отсутствие миграционного компонента ограничивается их саркоплазматической фракцией, а миофибриллярные остаются интактными (von der Decken, 1992).

Возможной моделью, позволяющей разграничить траты, связанные с созреванием и миграцией, являются немигрирующие подвиды лососевых, например, озерная красная нерка (*O. nerka*). Метаболические затраты на миграцию у этого ви-

да минимизированы, а затраты ресурсов на созревание гонад также велики, как и у мигрирующих подвидов, но при этом производители также погибают после нереста (Carruth et al., 2000). Вероятно, важен генерализованный характер протеолиза у лососевых рыб, затрагивающий также компоненты внутримышечной соединительной ткани. В мышцах нерестящихся рыб (показано на айю; Ito et al., 1992) происходит дезинтеграция межклеточной соединительной ткани, а также деградация коллагена I типа матриксной металлопротеиназой 13 (показано на радужной форели; Saito et al., 2000).

Деструктивные изменения в мышцах при половом созревании происходят не только у тихоокеанских лососей или других погибающих вслед за нерестом рыб. Специфика рассматриваемого процесса у лососевых состоит в том, что созревание гонад протекает на фоне больших энергетических затрат по другим направлениям. Для рыб протеолиз периферических, преимущественно мышечных, тканей – физиологическое явление, связанное с половым созреванием.

Двигательная нагрузка

Нерестовая миграция сопровождается для большинства лососевых рыб истощающей двигательной нагрузкой – передвижением против течения, с постоянным положительным уклоном. Гидролиз эндогенных белков и роль аминокислот в энергообмене особенно велики в течение периодов аэробной нагрузки (Alsop et al., 1999). Высокая двигательная активность является причиной не только механического стресса всех задействованных структур тела, но и оксидативного стресса, приводящего к образованию перекисей липидов и окисленных белков (Silva et al., 2011).

Высокая двигательная активность сопровождается выбросом в кровь тестостерона, к моменту достижения рыбами нерестилищ его уровень падает. Уровень тестостерона и изменения в активности кислых и нейтральных протеиназ в мышцах рыб подчиняются сходной зависимости; более выраженные изменения этих показателей происходят у самок рыб (Ando et al., 1986). Выявлен высокий коэффициент корреляции уровня половых стероидов, особенно андрогенов, и активности кальпаинов, а с активностью катепсинов эта взаимосвязь не такая четкая.

Из экспериментов, проведенных на млекопитающих, известно, что основной вклад в быстрое изменение скорости обмена мышечных белков принадлежит кальпаинам, а активация ферментов лизосом при действии нагрузки развивается с временной задержкой (Kasperek, Snider, 1989; Belcastro et al., 1998; Blazevid, Sharp, 2005). Другим доказательством ведущей роли кальпаинов в деструкции мышц при избыточной нагрузке является прогрессирующая утрата способности мышц предотвращать изменения в уровне Ca^{2+} –

основного регулятора активности кальпаинов (Goll et al., 2008). Моделью, позволяющей дифференцировать эффект физической нагрузки у рыб, может служить эксперимент по вынужденному длительному плаванию садковой форели в зимовальный период (Немова, 1980, 1996), в котором была показана избирательная активация кальпаинов в мышцах рыб, а также развитие у рыб стресс-реакции и снижение выживаемости.

Голодание

Лососевые в течение жизненного цикла неоднократно сталкиваются с продолжительными периодами голодания. В отсутствие экзогенного питания, функции протеиназ пищеварительного тракта переходят к внутриклеточным, которые поддерживают необходимый уровень аминокислот за счет эндогенных источников. Физиология рыбы при голодании полностью зависит от доступных энергетических и пластических резервов, прежде всего, висцеральных и мышечных белков; метаболическая адаптация к голоданию может затрагивать и другие жизненно важные органы, например, печень.

Результаты экспериментов по воздействию голодания на теплокровных и рыб указывают на сходство их ответной реакции, включающей, во-первых, снижение скорости белкового синтеза (Salem et al., 2007) и, во-вторых, усиленную деградацию мышечных белков, при непродолжительном голодании – саркоплазматических, затем – миофибриллярных (Немова и др., 1980; Emery et al., 1986). Регулируемое снижение скорости белкового синтеза происходит за счет снижения активности генов рибосомальных белков и позволяет быстро сократить расход аминокислот и АТФ в условиях их дефицита (Salem et al., 2007). Несмотря на синхронное снижение транскрипционной активности генов биосинтетических путей при голодании, оно не сказывается на экспрессии генов катаболических путей (Salem et al., 2007): кальпаинов 1 и 2, малой субъединицы кальпаинов, компонентов протеасомной системы (субъединиц $\alpha 5$, $\beta 3$, N3, регуляторной субъединицы и полиубиквитина), катепсинов D и L. Вместе с тем известно, что мобилизация белковых резервов у лососевых рыб сопровождается повышением активности всех внутриклеточных протеиназ – 20S протеасом, кальпаинов и, в меньшей степени, катепсинов (Salem et al., 2005a, 2007; Preziosa et al., 2013). Это означает, что активность протеиназ при голодании регулируется в основном на посттрансляционном этапе, например, при помощи эндогенных ингибиторов. Так, у радужной форели при голодании существенно снижается экспрессия длинной формы кальпаистатина – CAST-L, в результате чего повышается каталитическая активность кальпаинов (Salem et al., 2007). Аналогичный способ регуляции кальпаиновой системы при голодании характерен и для млекопитающих

(Du et al., 2004). Также регуляторными воздействиями объясняется повышенная активность 20S протеасомы у голодающей рыбы (Salem et al., 2006, 2007). Содержание и активность лизосомальных протеиназ у рыб, по имеющимся данным, при действии голодания существенно не изменяются (Salem et al., 2006), хотя убедительно доказана их активация в ходе нереста лососевых.

Уже при краткосрочном голодании (а также действию других катаболических сигналов) кальпаины запускают процесс деградации миофибриллярных белков, а завершающие этапы гидролиза происходят при участии протеасом и, в меньшей степени, лизосомальных протеиназ (главным образом, катепсина D), причем последние существенно активируются лишь после нескольких суток голодания (Немова и др., 1980, 1996; Martin et al., 2002; Blazevidich, Sharp, 2005). После отмены действия фактора активность кальпаинов и генная экспрессия некоторых белков убиквитин-протеасомного пути снижаются (Seiliez et al., 2008).

Реакция на голодание у мигрирующих рыб, эволюционно преадаптированных к действию этого фактора, и немигрирующих в основных чертах сходна: активность кальпаинов в мышцах рыб остается повышенной в течение всего периода голодания (Tripathi, Verma, 2003). Вместе с тем, у немигрирующих рыб достаточно быстро исчерпываются эндогенные резервы, в частности, содержание мышечных белков достигает минимума уже при 35-суточном голодании (показано на *Ictalurus punctatus*; Tripathi, Verma, 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные литературы и собственные наблюдения свидетельствуют о том, что уровень активности основных протеиназ в скелетных мышцах — кальцийзависимых кальпаинов, протеасом и лизосомальных катепсинов, согласованно изменяется в зависимости от физиологического статуса рыб сем. Лососевые и служит индикатором определенных этапов их онтогенеза и годового цикла — периода активного роста, созревания гонад, голодания, нерестовой миграции. Функциональное взаимодействие и элементы взаимной регуляции лизосомального и нелизосомального путей протеолиза проявляются как в ходе физиологического обмена мышечных белков, так и при их усиленной деградации, направленной на обогащение пула пластических и энергетических субстратов. Мобилизация мышечных белков у рыб имеет уникальные черты, объясняющиеся спецификой их белкового обмена в целом: значительно большим объемом обмениваемых белков, резервной ролью структурных белков, использованием аминокислот в качестве субстратов для окисления и не только. Пути мобилизации белковых резервов могут различаться в разных физиологических или стрессовых условиях; так, атрофия мышц при нерестовых миграциях развивается за счет беспре-

цедентно высокого уровня лизосомального протеолиза, а голодание стимулирует прежде всего кальпаиновую систему. Изучение комплекса внутриклеточных протеолитических ферментов у лососевых рыб, наряду с другими показателями их биохимического статуса, дает новую информацию о механизмах их роста и развития. Среди ферментов и регуляторов внутриклеточного протеолиза выделяются потенциальные биомаркеры роста рыб (например, уровень экспрессии CAST-L) и степени деструкции их мышечной ткани (активность катепсина D), важные для рыборазведения и природоохранной деятельности.

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

- Веселов А.Е., Калюжин С.М. Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.
- Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Крупнова М.Ю. и др. Внутриклеточная белковая деградация в процессе роста атлантического лосося *Salmo salar* L. // Био-орган. химия. 2015. Т. 41. № 6. С. 717–724.
- Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Немова Н.Н. Протеиназы семейства кальпаинов у водных беспозвоночных и рыб // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. № 3. С. 324–332.
- Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Канцерова Н.П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 482 с.
- Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 312 с.
- Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1996. 104 с.
- Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Ефремов Д.А., Веселов А.Е. Активность лизосомальных протеиназ (катепсинов В и D) в мышцах молоди (0+, 1+, 2+) атлантического лосося из реки Варзуга // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2015. № 11. С. 85–91.
- Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Нефедова З.А., Веселов А.Е. Кальцийзависимые протеиназы (кальпаины) у сеголеток (0+) атлантического лосося *Salmo salar* L. из двух биотопов реки Варзуга // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Сер. Естественные и технические науки. 2014. № 8 (145). Т. 1. С. 7–11.
- Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. Протеиназы семейства кальпаинов. Структура и функции // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 5. С. 381–389.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С., Пунатти П.О. Лизосомальное переваривание белков органов лосося *Salmo salar* L. при голодании в условиях содержания в садках в преднерестовый период // Вопр. ихтиологии. 1980. Т. 120. С. 180–182.
- Чурова М.В., Мещерякова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена и уровень некоторых молекулярно-ге-

- нетических показателей у молоди лосося (*Salmo salar* L.), различающейся возрастом и массой // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. С. 304–312.
- Alami-Durante H., Médale F., Cluzeaud M., Kaushik S.J. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal // Aquaculture. 2010. V. 303. P. 50–58.
- Alsop D.H., Kieffer J.D., Wood C.M. The effects of temperature and swimming speed on instantaneous fuel use and nitrogenous waste excretion of the Nile tilapia // Physiol. Biochem. Zool. 1999. V. 72. P. 474–483.
- Ando S., Hatano M., Zama K. Protein degradation and protease activity of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) muscle during spawning migration // Fish Physiol. Biochem. 1986. V. 1. P. 17–26.
- Ardley H.C., Robinson P.A. E3 ubiquitin ligases. The ubiquitin-proteasome system // Essays Biochem. 2005. V. 41. P. 15–30.
- Attaix D., Combaret L., Taillandier D. Mechanisms and regulation in protein degradation. In: *Protein metabolism and nutrition*, Lobley G.E. (Ed.), Proceedings VIII. Purdue University Press, 1999. P. 51–67.
- Aussanasuwannakul A., Kenney P.B., Weber G.M. et al. Effect of sexual maturation on growth, fillet composition, and texture of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on a high nutritional plane // Aquaculture. 2011. V. 317. P. 79–88.
- Bahuaud D., Gaarder M., Veiseth-Kent E., Thomassen M. Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Aquaculture. 2010. V. 310. P. 213–220.
- Belcastro A.N., Shewchuk L.D., Raj D.A. Exercise-induces muscle injury: a calpain hypothesis // Mol. Cell. Biochem. 1998. V. 179. P. 135–145.
- Björnsson B.T., Bradley T.M. Epilogue: Past successes, present misconceptions and future milestones in salmon smoltification research // Aquaculture. 2007. V. 273. P. 384–391.
- Blazevich A.J., Sharp N.C. Understanding muscle architectural adaptation: macro- and micro-level research // Cells Tissues Organs. 2005. V. 181. № 1. P. 1–10.
- Bohley P. Intracellular proteolysis. In: *Hydrolytic enzymes*. Biomedical division, 1987. P. 307–332.
- Bradford R.G. Differential utilization of storage lipids and storage proteins by Northwest Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) // J. Fish Biol. 1993. V. 43. P. 811–824.
- Bureau D.P., Hua K., Cho C.Y. Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 150 to 600 g // Aquac. Res. 2006. V. 37. P. 1090–1098.
- Busconi L., Folco E.J., Studdert C., Sanchez J.J. Purification and characterization of a latent form of multicatalytic proteinase from fish muscle // Comp. Biochem. Physiol., B. 1992. V. 102. P. 303–309.
- Carnevali O., Maradonna F. Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers // Gen. Comp. Endocrinol. 2003. V. 131. P. 203–208.
- Carruth L.L., Dores R.M., Maldonado T.A. et al. Elevation of plasma cortisol during the spawning migration of landlocked kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka kennerlyi*) // Comp. Biochem. Physiol., C. 2000. V. 127. P. 123–131.
- Cavaillès V., Augereau P., Rochefort H. Cathepsin D gene of human MCF7 cells contains estrogen-responsive sequences in its 5' proximal flanking region // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 174. № 2. P. 816–824.
- Chen Y., Klionsky D.J. The regulation of autophagy – unanswered questions // J. Cel. Sci. 2011. V. 124. P. 161–170.
- Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21 (12). P. 3400–3410.
- Cleveland B.M., Burr G.S. Proteolytic response to feeding level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. 2011. V. 319. P. 194–204.
- Cleveland B.M., Evenhuis J.P. Molecular characterization of atrogin-1/Fbx protein-32 (FBXO32) and F-box protein-25 (FBXO25) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): expression across tissues in response to feed deprivation // Comp. Biochem. Physiol., B. 2010. V. 157. P. 248–257.
- Cleveland B.M., Weber G.M. Effects of sex steroids on indices of protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) white muscle // Gen. Comp. Endocrinol. 2011. V. 174. P. 132–142.
- Codogno P., Meijer A.J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death // Cell Death Differ. 2005. V. 12. P. 1509–1518.
- Cottin P., Brustis J.J., Poussard S. Ca²⁺-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1223. P. 170–178.
- Cuervo A.M., Dice J.F. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases // J. Mol. Med. 1998. V. 76. P. 6–12.
- Dobly A., Martin S.A., Blaney S.C., Houlihan D.F. Protein growth rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is negatively correlated to liver 20S proteasome activity // Comp. Biochem. Physiol., A. 2004. V. 137. P. 75–85.
- Du M., Zhu M.J., Means W.J. et al. Effect of nutrient restriction on calpain and calpastatin content of skeletal muscle from cows and fetuses // J. Anim. Sci. 2004. V. 82. № 9. P. 2541–2547.
- Emery P.W., Cotellessa L., Holness M. et al. Different patterns of protein turnover in skeletal and gastrointestinal smooth muscle and the production of N tau-methylhistidine during fasting in the rat // Biosci. Rep. 1986. V. 6. № 2. P. 143–153.
- Ezaki J., Matsumoto N., Takeda-Ezaki M. et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels // Autophagy. 2011. V. 7. P. 727–736.
- Froehlich J.M., Fowler Z.G., Galt N.J. et al. Sarcopenia and piscines: the case for indeterminate-growing fish as unique genetic model organisms in aging and longevity research // Front. Genet. 2013. V. 4. P. 159.
- Glass D.J. Signaling pathways perturbing muscle mass // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2010. V. 13. P. 225–229.
- Goll D.E., Netti G., Mares S.W., Thompson V.F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains // J. Anim. Sci. 2008. V. 86. P. E19–35.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al. The calpain system // Physiol. Rev. 2003. V. 83. P. 731–801.
- Guderley H., Lapointe D., Bédard M., Dutil J.-D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. // Comp. Biochem. Physiol., A. 2003. V. 135. P. 347–356.

- Haas K.F., Woodruff E. III, Broadie K. Proteasome function is required to maintain muscle cellular architecture // *Biol. Cell.* 2007. V. 99. P. 615–626.
- Hershko A., Ciechanover A., Varshavsky A. Basic medical research award. The ubiquitin system // *Nat. Med.* 2000. V. 6. P. 1073–1081.
- Huang J., Forsberg N.E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 12100–12105.
- Hutchings J., Jones M. Life history variation and growth rate thresholds for maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1998. V. 55. P. 22–47.
- Ito K., Toyohara H., Sakaguchi H. Disintegration of the pericellular connective tissue of ayu muscle in the spawning season relevant to softening // *Nippon Suisan Gakkaishi.* 1992. V. 58. P. 1553.
- Jackman R.W., Kandarian S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy // *Am. J. Physiol. Cell Ph.* 2004. V. 287. P. C834–843.
- Jékely G., Friedrich P. The evolution of the calpain family as reflected in paralogous chromosome regions // *J. Mol. Evol.* 1999. V. 49. P. 272–281.
- Johnston I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. P. 2249–2264.
- Kasperek G.J., Snider R.D. Total and myofibrillar protein degradation in isolated soleus muscles after exercise // *Am. J. Physiol.* 1989. V. 257. Pt 1. P. E1–E5.
- Kuma A., Hatano M., Matsui M. et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period // *Nature.* 2004. V. 432. № 7020. P. 1032–1036.
- Lecker S.H., Jagoe R.T., Gilbert A. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression // *FASEB J.* 2004. V. 18. P. 39–51.
- Lubzens E., Young G., Bobe J., Cerda J. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010. V. 165. P. 367–389.
- Lysenko L., Kantserova N.P., Krupnova M.Yu., Nemova N.N. Protein degradation systems in the control of salmonid fish growth // *Protein Sci.* 2015. V. 24. S1. P. 262.
- Lysenko L.A., Kantserova N.P., Kaivarainen E.I. et al. Osmotic balance in marine organisms: adaptation through protein degradation // *Comp. Biochem. Physiol., A.* 2012. V. 163. Suppl. P. S29–S30.
- Martin S.A., Blaney S., Bowman A.S., Houlihan D.F. Ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of food deprivation // *Pflügers Arch.* 2002. V. 445. P. 257–266.
- Masiero E., Agatea L., Mammucari C. et al. Autophagy is required to maintain muscle mass // *Cell. Metab.* 2009. V. 10. P. 507–515.
- Mizushima N., Klionsky D.J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism // *Annu. Rev. Nutr.* 2007. V. 27. P. 19–40.
- Mommsen T.P. Paradigms of growth in fish // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 2001. V. 129. P. 207–219.
- Mommsen T.P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2004. V. 139. № 3. P. 383–400.
- Morata P., Vargas A.M., Sanchez-Medina F. et al. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 1982. V. 71. № 1. P. 65–70.
- Nielsen L.B., Nielsen H.H. Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*) // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 2001. V. 128. P. 351–363.
- Noakes D.J., Beamish R.J. Shifting the balance: towards sustainable salmon populations and fisheries of the future / In: *Sustainable fisheries: multi-level approaches to a global problem*, Taylor W.W., Lynch A.J., Schechter M.G. (Eds). American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 2011. P. 23–50.
- Olin T., Westman A., von der Decken A. Response of epaxial muscle and liver to 17 β estradiol in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Aquaculture.* 1991. V. 99. P. 179–191.
- Ono Y., Sorimachi H. Calpains – an elaborate proteolytic system // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1824. P. 224–236.
- Overturf K., Gaylord T.G. Determination of relative protein degradation activity at different life stages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 2009. V. 152. № 2. P. 150–160.
- Peragon J., Barroso J.B., Garcia-Salguero L. et al. Selective changes in the protein-turnover rates and nature of growth induced in trout liver by long-term starvation followed by re-feeding // *Mol. Cell. Biochem.* 1999. V. 201. № 1–2. P. 1–10.
- Preziosa E., Liu S., Terova G. et al. Effect of nutrient restriction and re-feeding on calpain family genes in skeletal muscle of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) // *PLoS ONE.* 2013. V. 8. № 3. P. e59404.
- Purintrapiban J., Wang M.C., Forsberg N.E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 2003. V. 136. P. 393–401.
- Saito M., Sato K., Kunisaki N., Kimura S. Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 6943–6950.
- Salem M., Kenney P.B., Rexroad C.E., Yao J. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout // *Comp. Biochem. Physiol., D.* 2006. V. 1. № 2. P. 227–237.
- Salem M., Nath J., Rexroad C.E. et al. Identification and molecular characterization of the rainbow trout calpains (Capn1 and Capn2): their expression in muscle wasting during starvation // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 2005a. V. 140. № 1. P. 63–71.
- Salem M., Silverstein J., Rexroad C.E., Yao J. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *BMC Genomics.* 2007. V. 8. P. 328.
- Salem M., Yao J., Rexroad C. et al. Characterization of calpastatin gene in fish: its potential role in muscle growth and fillet quality // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 2005b. V. 141. P. 488–497.
- Salmerón C., García de la Serrana D., Jiménez-Amilburu V. et al. Characterisation and expression of calpain family members in relation to nutritional status, diet composition and flesh texture in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // *PLoS ONE.* 2013. V. 8 (9). P. e75349.
- Salmerón C., Navarro I., Johnston I.A. et al. Characterisation and expression analysis of cathepsins and ubiquitin-proteasome genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) skeletal muscle // *BMC Res. Notes.* 2015. V. 8. P. 149.
- Sandri M. Autophagy in skeletal muscle // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 1411–1416.
- Seear P.J., Carmichael S.N., Talbot R. et al. Differential gene expression during smoltification of Atlantic salmon

- (*Salmo salar* L.): a first large-scale microarray study // *Mar. Biotechnol.* 2010. V. 12. P. 126–140.
- Seiliez I., Dias K., Cleveland B. M. Contribution of the autophagy-lysosomal and ubiquitin-proteasomal proteolytic systems to total proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. V. 307. P. R1330–R1337.
- Seiliez I., Gabillard J. C., Rifaie M. et al. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts // *Autophagy*. 2012. V. 8. P. 364–375.
- Seiliez I., Panserat S., Skiba-Cassy S. et al. Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle // *J. Nutr.* 2008. V. 138. P. 487–491.
- Silva L.A., Silveira P.C.L., Ronsani M.M. et al. Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise // *Cell. Biochem. Funct.* 2011. V. 29. P. 43–49.
- Solomon V., Lecker S.H., Goldberg A.L. The N-end rule pathway catalyzes a major fraction of the protein degradation in skeletal muscle // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 25216–25222.
- Somero G.N., Yancey P.H. Osmolytes and cell-volume regulation: physiological and evolutionary principles // *Compr. Physiol.* 2011. P. 441–484.
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y. et al. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 20106–20111.
- Sorimachi H., Ono Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders // *Cardiovasc. Res.* 2012. V. 96. P. 11–22.
- Tanaka K., Ichihara A. Autodegradation of rat liver proteasomes (large multicatalytic proteinase complexes) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 158. № 2. P. 548–554.
- Temm-Grove C.J., Wert D., Thompson V.F. et al. Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts // *Exp. Cell Res.* 1999. V. 247. P. 293–303.
- Toyohara H., Ito K., Ando M. et al. Effect of maturation on activities of various proteases and protease inhibitors in the muscle of ayu (*Plecoglossus altivelis*) // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 1991. V. 99. P. 419–424.
- Tripathi G., Verma P. Starvation-induced impairment of metabolism in a freshwater catfish // *Z. Naturforsch.* 2003. V. 58. P. 446–451.
- Van den Thillart G. Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*). Oxidation rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine and glutamate // *J. Comp. Physiol., B.* 1986. V. 156. P. 511–520.
- Verrez-Bagnis V., Ladrat C., Noëlle J., Fleurence J. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by an endogenous m-calpain // *J. Sci. Food Agric.* 2002. V. 82. P. 1256–1262.
- von der Decken A. Physiological changes of skeletal muscle by maturation-spawning of non-migrating female Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 1992. V. 101. P. 299–301.
- Yamashita M., Konagaya S. Differentiation and localization of catheptic proteinases responsible for extensive autolysis of mature chum salmon muscle (*Oncorhynchus keta*) // *Comp. Biochem. Physiol., B.* 1992. V. 103. № 4. P. 999–1003.

Degradation of Skeletal Muscle Protein during Growth and Development of Salmonid Fish

N. N. Nemova, L. A. Lysenko, and N. P. Kantserova

*Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

e-mail: l-lysenko@yandex.ru

Received December 16, 2015; in final form, February 1, 2016

Published data and the results of the authors' own studies on the role of intracellular proteolytic enzymes and the metabolic and signaling processes regulated by these enzymes at certain stages of growth and development of salmonid fishes are analyzed in the present review. The major pathways of intracellular proteolysis relying on autophagy, proteasome activity, and calpain activity are considered, as well as the relative contribution of these pathways to proteolysis in skeletal muscle of the fish. Skeletal muscle accounts for more than half of the weight of the fish and undergoes the most significant changes due to the action of anabolic and catabolic signals. Special attention is paid to the intensity of protein degradation during the active growth period characterized by a high rate of protein synthesis and metabolism in fish, as well as to protein degradation during the reproductive period characterized by predominance of catabolic processes in contrast to the growth period. Skeletal muscle plays a unique role as a source of plastic and energy substrates in fish, and, therefore, the process of muscle protein degradation is regarded as a key mechanism for the regulation of growth intensity in juvenile salmon and for maintenance of viability and reproductive capacity of salmonid fish during the maturation of gametes, starvation, and migration related to spawning. The possibility of using a set of parameters of intracellular proteolysis to characterize the early development of salmonids is demonstrated in the review.

Keywords: intracellular proteolysis, calpain, cathepsin, proteasome, salmonid fish, growth, development