

УДК 577.1.574.24

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ (КАТЕПСИНОВ В И D) В МЫШЦАХ МОЛОДИ (0+, 1+, 2+) АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ ИЗ РЕКИ ВАРЗУГА

Н. Н. Немова, М. Ю. Крупнова, Д. А. Ефремов, А. Е. Веселов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по изменению активности лизосомальных протеиназ в мышцах молоди атлантического лосося на ранних стадиях онтогенеза. Исследованы основные протеолитические ферменты лизосом (катепсины В и D), которые являются важнейшими участниками лизосомально-аутофагической системы клетки и различаются по химизму катализа, рН оптимуму, субстратной специфичности, отношению к ингибиторам, функциональной активности. Показана сравнительно высокая активность основной эндопротеиназы лизосом аспаратного типа – катепсина D в раннем развитии лосося (сеголетки 0+), что указывает на ведущую роль именно этого фермента в полной деградации белка, необходимого для обеспечения аминокислотами и пептидами для поддержания гомеостаза организма молоди в период, когда завершается экзогенное питание и начинается переход на смешанное питание. Активность цистеинзависимой протеиназы лизосом – катепсина В в мышцах рыб возрастает по мере «взросления» молоди лосося от сеголеток до пестряток, что указывает на интенсификацию протеолиза, связанную с ускорением темпов роста по мере развития молоди. Разнонаправленное изменение активности основных протеиназ лизосом (повышение активности катепсина В и снижение активности катепсина D) в мышцах атлантического лосося разных возрастов (0+, 1+, 2+) указывает на специфичный характер участия этих гидролаз во внутриклеточном протеолизе у молоди исследуемых рыб.

Ключевые слова: экологическая биохимия; атлантический лосось; рост и развитие; лизосомы; катепсины.

N. N. Nemova, M. Yu. Krupnova, D. A. Efremov, A. E. Veselov. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEASES (CATHEPSINS B AND D) IN THE MUSCLES OF JUVENILE (0+, 1+, 2+) ATLANTIC SALMON FROM THE VARZUGA RIVER

The results of experimental studies on changes in lysosomal protease activity in muscles of Atlantic salmon early in the ontogeny are presented. The main lysosomal proteolytic enzymes (cathepsins B and D) participating in lysosomal autophagy and differing in the catalysis chemistry, pH optimum, substrate specificity, response to inhibitors, functional activity were investigated. A relatively high activity of the main lysosomal aspartate type endoproteinase (cathepsin D) at the early stage of salmon development (0+) was shown. It points to the leading role of this enzyme in complete protein degradation required to supply amino acids and peptides to maintain the homeostasis in juveniles as they move on to the mixed feeding mode. The activity of the lysosomal cystein type proteinase

(cathepsin B) in muscles increases as the development of salmon progresses from stage 0+ (fingerlings) to stage 2+ (parr). This fact indicates intensification of proteolysis due to increasing growth rates. Multidirectional changes in the activity of the main lysosomal proteases (increase in the activity of cathepsin B and decrease in the activity of cathepsin D) in the muscles of Atlantic salmon of ages 0+, 1+, 2+ indicates that the involvement of these hydrolases in the intracellular proteolysis in juvenile salmon is stage-specific.

Key words: environmental biochemistry; Atlantic salmon; growth and development; lysosomes; cathepsins.

Введение

Одна из важнейших сигнальных и метаболических ферментных систем клетки – внутриклеточный протеолиз, который находится под гормональным контролем и регулирует метаболизм на всех стадиях развития организма [Дин, 1980; Лысенко и др., 2011]. Известно, что скорость роста рыбы, ее двигательная активность и обеспеченность энергетическими субстратами детерминированы интенсивностью расщепления белка в скелетных мышцах, составляющих до 75 % живого веса рыбы [Mommsen, 2001, 2004; Ling et al., 2011]. Регуляция скорости деградации белка может значительно изменить скорость роста и накопления белковой массы, поэтому характеристика протеолитических механизмов очень важна для понимания ростовых процессов. Непосредственными регуляторами деградации белков мышечной ткани рыб служат лизосомально-аутофагическая (с участием катепсинов) и кальпаиновая протеолитические системы [Mommsen, 2004; Saleem et al., 2006; Seilliez, 2012, 2014]. У рыб обнаружены более десяти катепсинов, относящихся к химически различным типам катализа, из них основную роль во внутриклеточном протеолизе играют катепсины В (цистеиновая протеиназа) и D (аспаратная протеиназа) [Mommsen, 2004; Лысенко и др., 2011]. Кислый pH-оптимум (3,0–4,0 для катепсина D; 4,8–5,0 для катепсина В), субстратная специфичность, данные ингибиторного анализа свидетельствуют о значительном сходстве ферментов рыб с одноименными лизосомальными ферментами из более высокоорганизованных организмов. У лососевых рыб, по оценкам Seilliez с соавторами [Seilliez et al., 2014], аутофагическая деградация составляет 30–34 %, а оставшаяся доля приходится на кальцийзависимый протеолиз, протеасому и малоизученные протеиназы цитозоля.

В данной работе изучалась динамика активности основных лизосомальных протеиназ (катепсинов В и D) в мышцах атлантического лосося из реки Варзуга (Собачий порог) у молоди разных возрастных групп (0+, 1+ и 2+).

Материалы и методы

Молодь лосося (*Salmo salar* L.) разных возрастных групп (0+, 1+ и 2+) отлавливали в осенний сезон (октябрь 2014 г.) в Собачьем пороге главного русла приполярной реки Варзуга (бассейн Белого моря), расположенном на удалении в 24,6 км от устья (рис. 1). Протяженность порога составляет около 600 м, ширина изменяется в пределах 120–160 м. Собачий порог, как и большинство порогов этой реки, мелководный. На нем ежегодно происходит нерест производителей атлантического лосося и обитает молодь разных возрастных групп: 0+, 1+, 2+, 3+. После вторичного перераспределения мальки лосося (сеголетки 0+) занимают летние микростации, активно питаются и ведут типичный для пестряток лосося оседлый образ жизни (в диапазоне температур 13–19 °С). Плотность молоди всех возрастов варьирует в пределах 22–54 экз./100 м² (0,7 экз./м²). Осенью при снижении обилия дрифта пестрятки переходят на частичное питание донными организмами с грунта и прикрепленными к водной растительности личинками ручейников и моллюсков, доминирующих в это время года в составе бентоса [Шустов и др., 2012]. К осени размер мальков составляет 3,8–4,3 см. В последующие годы происходит рост молоди лосося в три летних периода (1+ – 5,1–6,8 см, 2+ – 8,8–10,1 см, 3+ – 11,5–15,7 см) и зимовки в состоянии низкой активности. В конце четвертого зимнего периода пестрятки смолтифицируются и мигрируют на нагул из реки в море. Размер смолтов 12,0–17,5 см.

Для вылова рыб применяли аппарат электролова (Fa-1) норвежского производства. После отлова мальков выдерживали в течение суток в русловых садках для снятия эффекта воздействия электрического поля [Нефедова и др., 2014].

Экспериментальные работы выполнены с использованием оборудования ЦКП ИО Института биологии КарНЦ РАН.

В мышцах молоди атлантического лосося возраста 0+, 1+, 2+ изучали активность



Рис. 1. Спутниковая фотография Собачьего порога (из Google earth). Стрелками обозначено направление стрежня потока воды

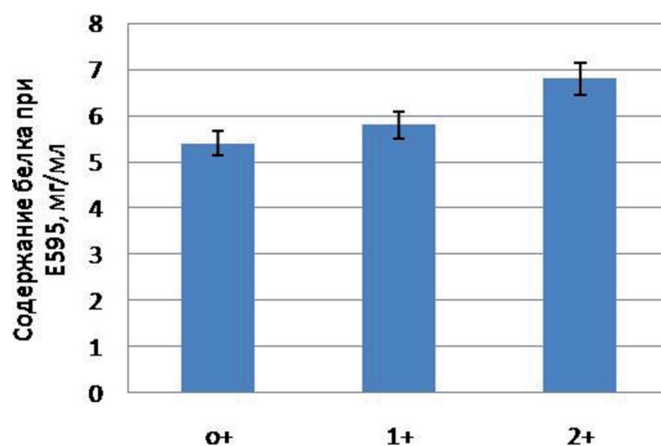


Рис. 2. Содержание белка в скелетных мышцах молоди (0+, 1+, 2+) лосося из р. Варзуга (Собачий порог), $p \leq 0,05$

кислых протеиназ лизосом – катепсинов В (ЕС 3.4.22.1) и D (ЕС 3.4.23.5). Показатели оценивали индивидуально ($n = 5-7$).

Количественное содержание белка в тканях (мг/мл) определяли по методу Брэдфорд [Bradford, 1976], применяя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Активность лизосомальных протеиназ. После гомогенизации образцов тканей в соотношении 1 : 10 в растворе 0,25 М сахарозы с добавлением 0,01 % Тритона X-100 (1200 об./мин, 60 с) и их центрифугирования (10000 г, 30 мин, K-24, Германия) в супернатанте определяли спектрофотометрически активность катепсина В (КФ 3.4.22.1) по расщеплению 0,065 М этилового эфира гидрохлорида N-бензоил L-аргинина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,0) [Matsuda, Misaka, 1974] и катепсина D (КФ 3.4.23.5)

по гидролизу 1%-го бычьего гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 3,6) согласно модифицированному методу Ансона [Anson, 1938; Barrett, Heath, 1977; Дин, 1980]. Активность катепсинов В и D (ед. акт.) выражали в единицах изменения оптического поглощения (E_{525} и E_{280} соответственно) на 1 мг белка за 1 ч инкубации (37 °C).

Статистическая обработка результатов. Достоверность различий оценивалась с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Различия в содержании белка в скелетных мышцах молоди лосося разных возрастов незначительные (рис. 2).

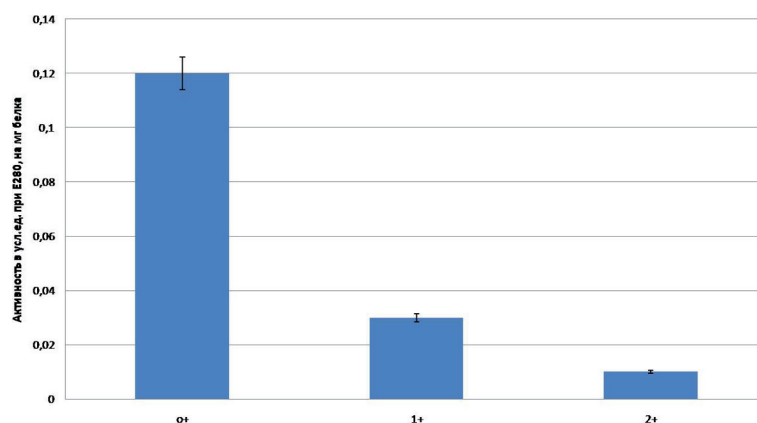


Рис. 3. Активность катепсина D в скелетных мышцах молоди (0+, 1+, 2+) лосося из р. Варзуга (Собачий порог), $p \leq 0,05$

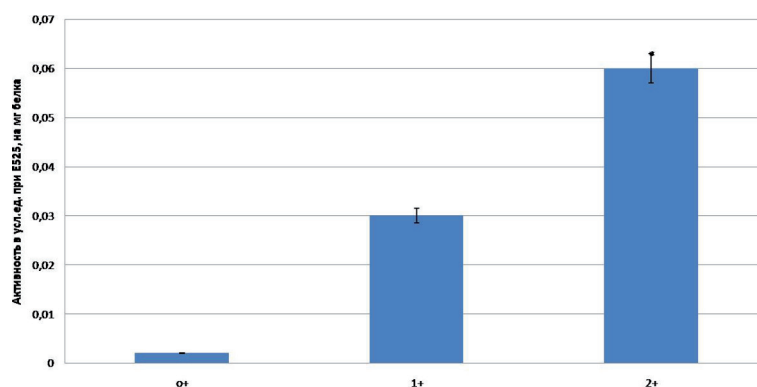


Рис. 4. Активность катепсина B в мышцах молоди (0+, 1+, 2+) лосося из р. Варзуга (Собачий порог), $p \leq 0,05$

Активность аспаратной протеиназы лизосом – катепсина D в скелетных мышцах молоди лосося возраста 1+ и 2+ (пестрятки) достоверно снижена по сравнению с сеголетками (0+) в 3–5 раз (рис. 3). При этом активность цистеиновой протеиназы лизосом – катепсина B повышается в 3–5 раз в процессе развития молоди лосося от сеголеток (0+) до пестряток (2+) (рис. 4).

На ранних этапах развития (сеголетки 0+), когда молодь первого года жизни адаптируется к внешней среде обитания, для ее активного роста и дальнейшего развития лосося очень важен интенсивный протеолиз [Bohley, 1987; Лысенко и др., 2011]. Сравнительно высокая активность основной эндопротеиназы лизосом – катепсина D у сеголеток на данном этапе развития свидетельствует о ведущей роли именно этого фермента в полной деградации белка, необходимого для обеспечения аминокислотами и пептидами ранних сеголеток, у которых через три месяца после выклева завершается переход на экзогенное питание (от стадии личинки к стадии малька). Известно, что основная функция катепсина D заключается в полном протеолизе белковых молекул

до дипептидов и аминокислот [Bohley, 1987], но не в регуляторных реакциях ограниченного протеолиза.

При этом активность катепсина B возрастает по мере развития молоди лосося от стадии 0+ (сеголетки) до стадии 2+ (пестрятки). Сравнительно более высокая активность катепсина B у годовиков молоди лосося (2+) может указывать на интенсификацию лизосомального протеолиза с участием цистеиновых протеиназ в связи с усилением темпов роста молоди. Известно [Дин, 1980; Bohley, 1987], что функция катепсина B связана не только с участием в реакциях полной деградации белковой молекулы, но также показана его роль в регуляторных реакциях, связанных с ограниченным протеолизом во множестве физиологических процессов, особенно каскадных. Можно полагать, что высокая активность катепсина B у молоди лосося более старших возрастов отражает ведущую роль этой протеиназы (наряду с кальцийзависимыми цистеиновыми протеиназами) в процессах роста и развития. Не исключено, что на эти процессы может также оказывать влияние и изменение качественного состава пищи в рационе лососей, так как известно, что

двухлетки в возрасте 1+ начинают питаться более крупными беспозвоночными, что приводит к различиям в составе пищи, наблюдаемым между сеголетками (0+) и пестрятками (возраста 1+ и старше) [Шустов, 1983].

Разнонаправленный характер изменения активности исследуемых катепсинов у молоди разных возрастов может отражать их независимую генетическую регуляцию в онтогенезе, как это было показано для крыс [Messina et al., 1980]. Ранее в наших исследованиях [Немова, Высоцкая, 2004] при сравнительном изучении активности катепсинов В и D в икре лосося в процессе эмбрионального развития также был показан разнонаправленный характер изменения активности этих катепсинов.

Заключение

Таким образом, в процессе роста и раннего развития атлантического лосося от возраста 1+ до возраста 2+ и 3+ обнаружено разнонаправленное изменение активности основных протеиназ лизосом в мышцах (повышение активности катепсина В и снижение активности катепсина D), что указывает на специфичный характер участия этих гидролаз во внутриклеточном протеолизе у молоди исследуемых рыб.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-24-00102.

Литература

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1980. 120 с.

Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Канцерова Н. П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 480 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 216 с.

Нефедова З. А., Мурзина С. А., Веселов А. Е. и др. Разнокачественность липидных и жирнокислотных спектров у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* L., различающихся размерно-весовыми характеристиками // Сибирский экологический журнал. 4. 2014. С. 639–645.

Шустов Ю. А. Экология молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 1983. 152 с.

Шустов Ю. А., Барышев И. А., Белякова Е. Н. Особенности питания молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. в субарктической реке Варзуга и ее малых притоках (Кольский полуостров) // Биология внутренних вод. 2012. № 3. С. 66–70.

Anson M. L. The estimation of pepsin, tripsin, papain, and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. 1938. Vol. 22. P. 79–89.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes // In: Dingle J. T. (ed.). Lysosomes. A Laboratory handbook, Amsterdam, 1977. P. 19–27.

Bohley P. Intracellular proteolysis // Hydrolytic enzymes. Biomedical division. P. 1987. P. 307–332.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Ling C., Min Z., Li S. Identification and expressional analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) // Fish & Shellfish Immunology. Vol. 31. Iss. 6. 2011. P. 1270–1277. doi: 10.1016/j.fsi.2011.09.012. Epub 2011 Sep 16.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms // J. Biochem. 1974. Sep; 76(3):639–49.

Messina M., Tessitore L., Musi M. et al. Lysosomal hydrolase activities in the developing rat liver // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1980 Jan 15; 56(1):27–32.

Mommsen T. P. Paradigms of growth in fish // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2001 Jun; 129(2–3):207–19.

Mommsen T. P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work // Comp. Biochem. Physiol. B. 2004. Vol. 139(3). P. 383–400.

Salem M., Kenney B., Rexroad C., Yao J. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout // Comp. Biochem. Physiol. D. 2006. Vol. 1. P. 227–237. doi: 10.1016/j.cbd.2005.12.003. Epub 2006 Feb 7.

Seilliez I., Gabillard J. C., Riffade M. et al. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts // Autophagy. 2012. Vol. 136. P. 393–401.

Seilliez 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. Vol. 307. P. 1330–1337. doi: 10.1152/ajpregu.00370.2014. Epub 2014 Oct 1.

Поступила в редакцию 10.09.2015

References

Din R. Processy raspada v kletke [Decay processes in cells]. Moscow: Mir, 1980. 120 p.

Lysenko L. A., Nemova N. N., Kancerova N. P. Proteoliticheskaja regulacija biologicheskikh processov

[Proteolytic regulation of biological processes]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2011. 480 p.

Nefedova Z. A., Murzina S. A., Veselov A. E., Ripatti P. O., Nemova N. N. Raznokachestvennost' lipidnykh

i zhirkislotnykh spektrov u segoletok lososya atlanticheskogo lososya *Salmo salar* L., razlichayushchikhsya razmerno-vesovymi kharakteristikami [Heterogeneity of lipids and fatty acids of fingerlings of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. different in weight and size]. *Sibirskii ekologicheskii zhurnal* [Contemporary Problems of Ecology]. 4. 2014. P. 639–645.

Nemova N. N., Vysockaja R. U. Biohimicheskaja indikacija sostojanija ryb [Biochemical indication of fish state]. Moscow: Nauka, 2004. 216 p.

Shuster Ju. A. Jekologija molodi atlanticheskogo lososja [Ecology of juvenile Atlantic salmon]. Petrozavodsk: Karelija, 1983. 152 p.

Shustov Ju. A., Baryshev I. A., Beljakova E. N. Osobennosti pitanija molodi atlanticheskogo lososja *Salmo salar* L. v subarkticheskoi reke Varzuga i ejo malyh pritokakh (Kol'skij poluoostrov) [Juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) feeding in the subarctic River Varzuga and its small tributaries (Kola Peninsula)]. *Biologija vnutrennih vod* [Inland water biology]. 2012. No 3. P. 66–70.

Anson M. L. The estimation of pepsin, tripsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938. Vol. 22. P. 79–89.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes. In: Dingle J. T. (ed.). *Lysosomes. A Laboratory handbook*, Amsterdam, 1977. P. 19–27.

Bohley P. Intracellular proteolysis. *Hydrolytic enzymes. Biomedical division*. P. 1987. P. 307–332.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Ling C., Min Z., Li S. Identification and expression analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish*

Immunology. Vol. 31, iss. 6. 2011. P. 1270–1277. doi: 10.1016/j.fsi.2011.09.012. Epub 2011 Sep 16.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms. *J. Biochem.* 1974 Sep; 76(3):639–49.

Messina M., Tessitore L., Musi M., Baccino F. M., Fiszer-Szafarz B., Nadal C. Lysosomal hydrolase activities in the developing rat liver. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1980 Jan 15; 56(1):27–32.

Mommsen T. P. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2001 Jun; 129 (2–3):207–19.

Mommsen T. P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2004. Vol. 139 (3). P. 383–400.

Salem M., Kenney B., Rexroad C., Yao J. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. D.* 2006. Vol. 1. P. 227–237. doi: 10.1016/j.cbd.2005.12.003. Epub 2006 Feb 7.

Seilliez I., Gabillard J. C., Riffade M., Sadoul B., Dias K., Averous J., Tesseraud S., Skiba S., Panserat S. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy*. 2012. Vol. 136. P. 393–401.

Seilliez 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. Vol. 307. P. 1330–1337. doi: 10.1152/ajpregu.00370.2014. Epub 2014 Oct 1.

Received September 10, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Немова Нина Николаевна

директор, чл.-корр. РАН, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Крупнова Марина Юрьевна

старший научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: mukrupnova@rambler.ru
тел.: (8142) 571879

Ефремов Денис Александрович

научный сотрудник лаб. экологии рыб и
водных беспозвоночных, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел.: (8142) 561679

CONTRIBUTORS:

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

Krupnova, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: mukrupnova@rambler.ru
tel.: (8142) 571879

Efremov, Denis

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: denisefremov@list.ru
tel.: (8142) 561679

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник лаб. экологии рыб и
водных беспозвоночных, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: veselov7771@mail.ru
тел.: (8142) 561679

Veselov, Aleksey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: veselov7771@mail.ru
tel.: (8142) 561679