РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У РЫБ

Л. А. Лысенко, Е. И. Кяйвяряйнен, М. Ю. Крупнова, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук, Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: l-lysenko@yandex.ru

Высоко упорядоченная структурная организация сократительных волокон скелетных мышц обеспечивает способность к совершению быстрых и синхронных движений. В ряде случаев в ответ на действие токсикантов у рыб развивается характерное повреждение мышечной ткани, визуально проявляющееся как атрофия и расслоение волокон. Гистохимическим признаком этого нарушения является прогрессирующая потеря целостности Z-дисков саркомеров, а на биохимическом уровне наблюдается повышенный гидролиз миофибриллярных белков. Деградация белков саркомеров осуществляется целой системой внутриклеточных протеиназ и экзопептидаз, локализованных в лизосомах и вне лизосом. Протеолиз в лизосомах, основными участниками которого являются катепсины B и D, в большей степени неселективен (Дин, 1981; Немова, 1996). Высокоселективный протеолиз в цитозоле осуществляется АТФ- и убиквитин-зависимыми протеазами, преимущественно мультисубъединичной 26S протеасомой (Hershko, Ciechanover, 1998), кальпаиновой системой, включающей Ca^{2+}-зависимые протеазы и их эндогенный ингибитор кальпастатин (Goll et al., 2003) и другими, предположительно, АТФ-независимыми, протеазами. Установлено присутствие кальпаинов, протеасом и катепсинов в тканях изученных видов рыб (Немова, 1996; Бондарева, 2002), однако, данные о свойствах и физиологической роли указанных протеиназ у рыб ограничены.

Модель обмена миофибриллярных белков была разработана В. Дэйтоном с сотр. еще в 1975 году (Dayton et al., 1975). Соотношение роли кальпаинов и протеасомы в этом процессе обсуждается исследователями в течение длительного времени. Кальпаины не способны расщеплять основные сократительные белки миофибриллы актин и миозин, поэтому результатом их действия является 1) прогрессивное разрушение Z-диска, приводящее, в конечном счете, к полной его потере; 2) последовательное высвобождение толстых филаментов миозина и тонких нитей актина с поверхности миофибриллы; 3) образование фрагментов титина (иногда величиной до 500 кДа), небулина, десмина и других кальпаин-чувствительных белков. В экспериментах показано, что ингибиторы кальпаинов, но не лизосомотропные агенты, предотвращают или снижают протеолитические процессы, характерные для патологии мышечной ткани, однако, нет оснований предполагать, то в них участвуют только кальпаины. Сайт-специфичность кальпаинов обуславливает необходимость участия других протеаз для дальнейшего расщепления крупных фрагментов титина, небулина, десмина, тропонина, тропомиозина и С-белка, а также актина и миозина. Вероятно, свободные молекулы актина, миозина и фрагменты перечисленных миофибриллярных белков подлежат убиквитинилированию, и в их дальнейшем расщеплении главная роль принадлежит протеасоме (Hershko, Ciechanover, 1998). С другой стороны, протеасома не может расщеплять интактные миофибриллы или цитоскелетные комплексы, по всей видимости, из-за того, что вход в центральную полость протеасомы (диаметр 1–1,3 нм), содержащую активные центры, слишком узок для проникновения миофибрилл (их диаметр 10–100 μм). Степень убиквитинилирования субстратов считается скорость-лимитирующим этапом протеасомной деградации белков (Ordway et al., 2000). Поскольку экспрессия субъединиц протеасомы в атрофичных мышцах изменяется незначительно, можно предположить нарушение системы убиквитинилирования. Таким образом, усиленный гидролиз белков при миодистрофии требует синергичного участия, по крайней мере, двух протеолитиче-

ских систем; при этом высвобождение актиновых и миозиновых филаментов из миофибрилл осуществляют кальпаины, а расщепление свободных полипептидов и их фрагментов до аминокислот или коротких пептидов – протеасома (Dayton et al., 1975; Goll et al., 1991; et al., 2005), а также, возможно, непосредственно лизосомальные катепсины.

При миодистрофии повышается активность и экспрессия мРНК кальпаинов, усиливается деградация кальпастатина (Goll et al., 2003; Nakamura et al., 1991). По этим признакам можно судить, что при миодистрофии увеличивается общая активность кальпаинов (отсутствие кальпастатина также потенциально увеличивает их активность). Учитывая тот факт, что менее 10% кальпаина в миоцитах находится в активированном состоянии, не вполне понятно, зачем для повышения белковой деградации в мышцах необходим его избыточный синтез. Можно предположить, что «дополнительный» кальпаин нарушает нормальную регуляцию активности этих ферментов. И кальпаины, и протеасома присутствуют в скелетных мышцах в больших количествах (Ordway et al., 2000), следовательно, для усиления протеолитических процессов не обязательно повышение их синтеза, достаточны лишь изменения в регуляции активности этих двух протеолитических систем.

Характерным примером описанного феномена является патология мышечной ткани, обнаруженная у русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti*) при развитии заболевания, вспышка которого наблюдалась в волжско-каспийском бассейне в 1987 году. Поражение рыб субтоксическими дозами промышленных загрязнителей индуцировало расслоение волокон скелетных мышц и разрушение Z-дисков саркомеров (Физиолого-биохимический статус, 1990). Первичная деструкция мышц была обусловлена активацией кальпаинов, при этом достоверное повышение их активности у пораженных рыб обнаруживалось не только в скелетных мышцах, но и в других органах, что подчеркивает генерализованный характер заболевания (Немова и др., 1992; Немова, 1996). В тканях также наблюдалась активация лизосомальных протеаз (катепсинов), необходимых для последующих этапов расщепления белков, освобожденных из состава миофибрилл кальпаинами.

Таким образом, пусковая роль в белковой деградации при повреждении мышечной ткани принадлежит кальпаинам, о чем свидетельствует состав продуктов протеолиза индивидуальных мышечных волокон, разрушение компонентов Z-дисков. Кроме того, токсическое действие веществ на тканевом уровне часто сопровождается явлением цитотоксичности, связанном с гибелью клеток путем некроза или апоптоза, а в этих процессах кальпаины также играют ключевую роль. Последующие этапы деградации белков, изолированных кальпаинами из структуры миофибрилл, до пептидов и аминокислот протекают при участии протеасомы и лизосомальных катепсинов и, следовательно, зависят от эффективности ферментов убиквитинилирования и скорости везикулообразования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 08-04-01140, 09-04-90733), Президента РФ НШ-306.2008.4 и НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

Бондарева Л. А. Ca^{2+}-активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных // Вестник молодых ученых. Сер. Науки о жизни. 2002. Т. 4. № 1. С. 52–57.

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1996. 104 с.

Немова Н. Н., Сидоров В. С., Григорьева Л. И., Валуева Т. А., Мосолов В. В., Кяйвяряйнен Е. И., Лукьяненко В. И. Внутриклеточные протеиназы в органах русского осетра *Acipenser gueldenstaedti* при расслоении мышц // Вопр. ихтиологии. 1992. Т. 32. № 5. С. 57–62.

Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани (кумулятивный политоксикоз). Отв. ред. Лукьяненко В. И. Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод АН СССР, 1990. 262 с.

Attaix D., Ventadour S., Codran A., Bechet D., Taillandier D., Combaret L. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting // Essays Biochem. 2005. V. 41. P. 173–186.

Dayton W.R., Goll D.E., Stromer M.H., Reville W.J., Zeece M.G., Robson R.M. Some properties of a $Ca2^{+}$-activated protease that may be involved in myofibrillar protein turnover. In: Proteases and Biological Control, ed. by Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab., 1975. P. 551–577.

Goll D.E, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system // Physiol. Rev. 2003. V. 83. N 3. P. 731–801.

Goll D.E., Dayton W.R., Singh I., Robson R.M. Studies of the α-actinin/actin interaction in the Z-disk by

using calpain // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 8501–8510.

Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 425–479,

Nakamura M., Imajoh-Ohmi S., Suzuki K., Kawashima S. An endogenous inhibitor of calcium-activated neutral protease in UMX 7.1 hamster dystrophy // Muscle Nerve. 1991. V. 14. P. 701–708.

Ordway G.A., Neufer P.D., Chin E.R., DeMartino G.N. Chronic contractile activity upregulates the proteosome system in rabbit skeletal muscle // J. Appl. Physiol. 2000. V. 88. P. 1134–1141.

ROLE OF INTRACELLULAR PROTEASES IN MUSCLE TISSUE DAMAGE IN FISH

L.A. Lysenko, E.I. Kaivarainen,, М. Ю. Крупнова, Н. Н. Немова

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: l-lysenko@yandex.ru

It was shown that calpains are key regulators of protein degradation in normal and damaged muscular tissue according to the composition of proteolytic products of individual muscular fibers and destruction of Z-disc components. Furthermore the effect of toxic substances at tissue level is often accompanied by the phenomenon of the cytotoxicity, related with cell death either by necrosis or apoptosis, and it is known that calpains are mediated both processes. The subsequent stages of degradation of the proteins isolated from myofibrils by calpains up to peptides and amino acids proceed at participation of proteasome and lysosomal cathepsins and, hence, depend on efficiency of ubiquitinilating enzymes and vesicle formation rates.