

## ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

УДК 577.152.34:597.553.2:591.3

### ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЦИСТЕИНЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ И НЕКОТОРЫХ ПЕПТИДАЗ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L.

© 2017 г. Н. Н. Немова\*, Е. И. Кяйвярйнен, М. Ю. Крупнова

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

*\*E-mail: nemova@krc.karelia.ru*

Поступила в редакцию 31.05.2016 г.  
Окончательный вариант получен 03.07.2016 г.

Исследована динамика активности цистеинзависимых ферментов внутриклеточного протеолиза у пресноводного лосося *Salmo salar* L. в процессе его раннего развития: от этапа образования бластодиска до выклева, а также в икре перед ее оплодотворением. Проанализирована  $Ca^{2+}$ -активируемая протеолитическая активность кальпаинов, активность кислой протеиназы лизосом – катепсина В, а также ряда пептидаз, используя в качестве субстратов содержащие хромогенный компонент *n*-нитроанилин пептиды: L-Ala-pNA, L-Arg-pNA, L-Arg-pNA, N-Bzl-L-Arg-pNA, L-Phe-pNA, N-Glu-L-Phe-pNA, Z-Gly-Pro-pNA. Показано увеличение активности исследуемых ферментов на стадии поздней бластулы – ранней гаструлы. Следующее возрастание активности катепсина В и кальпаинов наблюдается на стадии пигментации глаз, а пептидаз и катепсина В – в икре перед выклевом. Обсуждается функциональное значение изменений ферментов внутриклеточного протеолиза в процессах белкового обмена, связанных развитием зародыша атлантического лосося.

*Ключевые слова:* протеолитические ферменты, пресноводный лосось, эмбриогенез

**DOI:** 10.7868/S0475145017040073

#### ВВЕДЕНИЕ

В понимании молекулярных основ процессов роста и развития значительное место занимает изучение ферментных систем, изменение активности которых считается общепринятым критерием цитодифференцировки (Нейфах, Тимофеева, 1977; Озернюк, 1985). Регуляция существует и проявляется на всех стадиях развития организма, и одним из важнейших механизмов биохимического контроля является внутриклеточный протеолиз, включающий широкий набор протеиназ и пептидаз и являющийся прерогативой (в силу своей необратимости) выживания клеток, тканей организмов (Bohley, 1987; Лысенко и др., 2011). У млекопитающих преобладают протеасомный и лизосомальный пути протеолиза (Purintrapiban, 2003), а у рыб – лизосомальный и кальпаиновый (Mommensen, 2004; Salem et al., 2005, 2006; Seiliez et al., 2012, 2014). Известно, что к числу протеиназ с регуляторной функцией относятся ферменты, каталитическая активность которых зависит от реакционной способности тиоловых групп остатков Cys в активном центре. Основные внутриклеточные цистеинзависимые протеиназы – кальпаины цитозоля и лизосомальный катепсин В (Otto, 1971; Mellgren R.L., Murachi, 1990; Бондарева и др.,

2006). Наряду с участием в неспецифическом гидролизе белков, они также осуществляют ограниченный гидролиз специфичных субстратов, который необратимым образом определяет судьбу белков на посттрансляционном уровне и влияет на многие биологические процессы (Лысенко и др., 2011). Помимо протеиназ с эндопептидазной функцией в протеолизе принимают участие карбокси- и аминопептидазы различной специфичности, отщепляющие C- или N-концевые аминокислотные остатки, ди- или трипептиды белковой молекулы, но иногда они более активны на начальных стадиях разрушения белков, лимитируя скорость этого процесса (McDonald, Schwabe, 1977).

Цель настоящей работы – исследование динамики активности цистеинзависимых ферментов внутриклеточного протеолиза (кальпаинов и катепсина В) и некоторых пептидаз у атлантического лосося *Salmo salar* L. в ходе эмбрионального развития до вылупления предличинок.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы химические реагенты, субстраты протеиназ и носители для гель-хроматографии, произведенные “Sigma-Al-

drich” (США), пептиды, предоставленные Отделом пептидов Института органической химии и биохимии АН Республики Чехия, приборы ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН: гомогенизатор Tissue Lyser LT (Qiagen, Германия), центрифуга Allegra 64R Beckman Coulter, США, термостатируемая водяная баня UT-4334 (Россия), аппаратура для гель-хроматографии (LKB-Pharmacia, Швеция), спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО “ОКБ-Спектр”, Россия).

**Материал.** Икра озерагого лосося до и после искусственного оплодотворения была получена на рыбодонной станции, расположенной на реке Шуя бассейна Онежского озера (Республика Карелия). Эмбриональное развитие икры происходило в лабораторных условиях на решетках, омываемых речной водой, в камере при постоянной температуре (5°C). Известно, что в природных условиях процесс созревания икры лосося довольно длительный – от 100 до 230 дней (Рыжков, 1976). В данном эксперименте выклев личинок лосося начался на 108 сутки после оплодотворения, так как в инкубационной камере поддерживалась более высокая, чем в природе после нереста, температура, а скорость эмбриогенеза и процессы жизнедеятельности пойкилотермных животных, как известно, зависит от температуры окружающей среды (Детлаф и др., 1974; Озернюк, 1985). Активность ферментов изучали в икре лосося перед оплодотворением и в процессе эмбриогенеза на 6 стадиях развития зародыша: № 0 – перед оплодотворением, № 1 – образование бластодиска (3 ч после оплодотворения), № 2 – дробление бластодиска (поздняя бластула–ранняя гастрюла); № 3 – образование хвостовой почки (27 сут), № 4 – начало пульсации сердечной трубки и начало кровообращения (40 сут), № 5 – начало пигментации глаз (органогенез), № 6 – подготовка к вылуплению и частичный выход зародышей из оболочки (108 сут). На каждой стадии развития для исследования брали по 10–25 икринок.

**Биохимические методы.** Проанализирована активность цистеинзависимых внутриклеточных протеолитических ферментов: общей Са<sup>2+</sup>-активируемой, кислой протеиназы лизосом – катепсина В, а также пептидаз, использующих в качестве субстратов содержащие хромогенный компонент *n*-нитроанилин пептиды: L-Ala-pNA, L-pro-pNA, L-Arg-pNA, N-Bzl-L-Arg-pNA, L-Phe-pNA, N-Glu-L-Phe-pNA, Z-Gly-Pro-pNA. Процедуры экстракции и реакции протеиназ проводили при 4°C.

**Активность катепсина В (КФ 3.4.22.1).** После гомогенизации образцов (в соотношении 1 : 10 с 0.25 М сахарозой с добавлением 0.01% Тритон Х-100 при 1200 об./мин 60 с) в осветленном гомогенате (10000 г 30 мин) определяли активность катепсина В по расщеплению 0.065 М раствора этилового

эфира гидрохлорида *N*-бензоил L-аргинина в 0.1 М ацетатном буфере (рН 5.0) (Matsuda, Misaka, 1974; Barrett, Heath, 1977). Активность катепсина В выражали в единицах изменения оптического поглощения (E<sub>525</sub>) на 1 мг белка за 1 ч инкубации (37°C).

**Активность кальцийактивируемых протеиназ.** Образцы гомогенизировали в 20 мМ Трис-НСI буфере (рН 7.5), содержащем 80 мМ КСI, 5 мМ Na соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na-ЭДТА) и 20 мМ дитиотреитол (ДТТ). Смесь центрифугировали при 15000 г в течение 15 минут и супернатант (растворимую фракцию) использовали для нанесения на колонку (2.5 × 95 см) с гелем Sephacryl S-300, уравновешенным буфером А (10 мМ Трис-НСI, содержащим 50 мМ NaCl, 4 мМ Na-ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, рН 7.5). Гель-хроматографическое разделение образцов проводилось с целью отделения специфического белкового ингибитора кальпаинов – кальпастатина, а также фракционирования молекулярных форм фермента. Во фракциях элюата определяли Са<sup>2+</sup>-активируемую активность стандартным методом по гидролизу казеина (Murachi et al., 1981). Реакционная смесь для определения активности кальпаинов, общим объемом 2.5 мл, включала 50 мМ имидазол-НСI буфер рН (7.5), 0.4% казеина, 5 мМ дитиотреитол и ферментсодержащий элюат. Инкубация опытных проб происходила в присутствии мкМ и мМ СаСI<sub>2</sub>, в контрольные пробы кальций добавляли после инкубации. После 30 мин инкубации (30°C) реакцию останавливали добавлением равного объема 10% ТХУ. Концентрацию кислоторастворимых продуктов гидролиза определяли спектрофотометрически (E<sub>280</sub>). Единицу активности кальпаинов (ед. акт.) определяли в единицах изменения оптической плотности (E<sub>280</sub>) за 30 мин инкубации. Активность фермента во фракциях элюата с различной молекулярной массой суммировали.

**Активность пептидаз.** Процедуру определения специфичной пептидазной протеолитической активности проводили согласно методике (Barth et al., 1999). В качестве субстратов использовали *n*-нитроанилидные производные семи различных пептидов (табл. 1). Хромогенный компонент *n*-нитроанилин освобождается под действием специфических пептидаз (Anzenbacherová et al., 1994; Kronovetr et al., 1998). Для получения образца, содержащего пептидазы, оболочку 10 икринок расщепляли ножницами в 5 мл 0.05 М Трис-НСI буфера (рН 8.0) и центрифугировали (8000 г) в течение 20 минут. Реакция осуществлялась в растворе, содержащем 0.05 мл 0.5 мМ соответствующего пептида, 0.25 мл полученного супернатанта, 1.0 мл буфера и 0.2 мл дистиллированной воды (общий объем 1.5 мл). Изменение оптической плотности *n*-нитроанилина, образовавшегося в реакционных

**Таблица 1.** Перечень пептидов, используемых в качестве субстратов

Пептиды	Молекулярная масса субстратов	Тип пептидазной активности
N-Bzl-L-Arg-pNA	498.31	Трипсин-подобная пептидаза
Z-Gly-Pro-pNA	425	Эндопролилпептидаза
L-Phe-pNA	295.3	Специфическая для ароматических аминокислот аминопептидаза
L-Arg-pNA	375.1	$\beta$ -Аминопептидаза
L-Ala-pNA	209.3	Аланинаминопептидаза
L-Pro-pNA	235.12	Пролинаминопептидаза
N-Glt-L-Phe-pNA	384.4	Химотрипсин-подобная пептидаза

**Таблица 2.** Активность протеолитических ферментов (кальпаинов и катепсина В) и содержание белка на различных стадиях развития зародыша лосося

№	Стадия развития	Активность кальпаинов, ед. акт.	Активность катепсина В, ед. акт.	Содержание белка [мг в 1 икринке]
0	Икра перед оплодотворением	1.62 ± 0.10	2.91 ± 0.15	0.45 ± 0.03
1	Образование бластодиска	1.0 ± 0.07*	2.90 ± 0.15	0.39 ± 0.02*
2	Дробление (ранняя гастрюла)	1.30 ± 0.08*	4.91 ± 0.30*	0.56 ± 0.04*
3	Образование хвостовой почки	0.78 ± 0.05*	3.21 ± 0.25	0.45 ± 0.03
4	Начало пульсации сердечной трубки и кровообращения	0.60 ± 0.05*	2.50 ± 0.20*	0.57 ± 0.04*
5	Пигментация глаз	1.20 ± 0.10*	6.52 ± 0.55*	0.58 ± 0.04*
6	Выклев	0.7 ± 0.05*	0.72 ± 0.06*	0.98 ± 0.07*

\* Статистически достоверные отличия ( $p \leq 0.05$ ) относительно стадии № 0 (перед оплодотворением).

смесях в результате действия пептидаз, оценивали спектрофотометрически при 405 нм. Для построения графиков использовали процентное отношение значений оптической плотности реакционной смеси (А) к максимальному значению оптической плотности *n*-нитроанилина ( $A_{max}$ ), образовавшегося в результате гидролиза N-Bzl-L-Arg-pNA (Barth et al., 1999).

**Количественное содержание белка** в тканях определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), применяя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

**Статистическая обработка результатов.** Достоверность различий оценивалась с использованием непараметрического критерия U Манна–Уитни ( $p \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В икре лосося, готовой к оплодотворению, обнаружена сравнительно высокая общая  $Ca^{2+}$ -зависимая протеолитическая активность (табл. 2). В эмбриональном развитии лосося выявлено два пика повышенной активности кальпаина — на этапе поздней бластулы–ранней гастрюлы (стадия № 2) и органогенеза (пигментация глаз) (стадия № 5). Сходная динамика в эмбриогенезе ло-

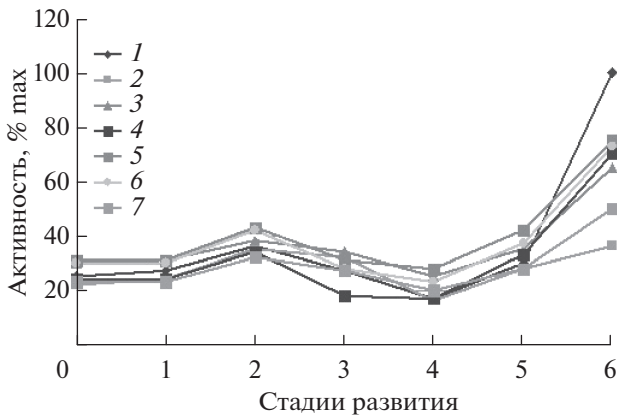
сося обнаружена и для цистеиновой протеиназы лизосом — катепсина В.

Тотальная аминопептидазная активность (рис. 1) в ходе развития оплодотворенной икры лосося особенно высока в отношении субстратов L-Ala-pNA, L-Pro-pNA и L-Phe-pNA. Она изменяется в икре лосося сходным с катепсином В и кальпаином образом, за исключением стадии выклева (№ 6).

На этапе выклева зародышей из оболочек (стадия № 6) наблюдается заметное увеличение активности всех исследуемых пептидаз, причем наибольший прирост характерен для трипсин-подобной активности, оцениваемой по гидролизу субстрата N-Bzl-L-Arg-pNA.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в процессе оплодотворения происходят значительные метаболические изменения в яйцеклетке, запускающие программу развития. К числу таких триггерных (спусковых) механизмов относится кальциевая регуляция (Whitaker, 2008). В большинстве клеток плазматическая мембрана практически непроницаема для кальция, разделяя два пространства с огромной разницей в концентрации свободного  $Ca^{2+}$ : примерно 1.2 мМ снару-



Активность пептидаз, расщепляющих субстраты (1 – N-Bzl-L-Arg-pNA; 2 – Z-Gly-Pro-pNA; 3 – L-Phe-pNA; 4 – L-Arg-pNA; 5 – L-Ala-pNA; 6 – L-Pro-pNA; 7 – N-Glt-L-Phe-pNA) на различных стадиях развития (№ 0–6, описания приведены в табл. 2).

жи и 0.1 мкМ – в цитозоле покоящейся клетки. Так как внутриклеточная концентрация кальция в норме сравнительно низка ( $10^{-8}$  М), она флуктуирует даже за счет небольших кальциевых токов через открывшиеся  $Ca^{2+}$  каналы, связанных с генерацией потенциала действия, особенно вблизи внутренних ворот каналов. Это делает  $Ca^{2+}$  идеальным сигнальным мессенджером. Было показано (Whitaker, 2006; Webb et al., 2011; Webb, Miller, 2013), что кальций, участвующий в активации икры при оплодотворении у медаки (*Oryzias latipes*) и данио (*Danio rerio*), освобождается из внутриклеточного депо эндоплазматического ретикулума (ЭР). Избыток ионов кальция, обладающего триггерной функцией, служит сигналом к реализации клеткой генетических программ (Gwatkin et al., 1973; Epel et al., 1978; Сарис и Карафоли, 2005).

В наших исследованиях раннего развития атлантического лосося показано, что активность  $Ca^{2+}$ -активируемых протеиназ в икре, готовой к оплодотворению, сравнительно высока, что может указывать на их участие в биохимических реакциях, сопровождающих процесс оплодотворения, опосредованный повышением концентрации внутриклеточного кальция (Эпель, 1992). Кроме того в оплодотворенной яйцеклетке происходит пространственное разобщение протеиназы и его эндогенного ингибитора кальпастина (Naim et al., 2006), что ожидаемо приводит к активации кальпаинов. После оплодотворения активность кальпаинов в икре лосося снижается и возрастает уже на стадии гаструляции, которая, как известно (Деллаф и др., 1974; Нейфах, Тимофеева, 1977), является одной из “критических” точек эмбрионального развития, поскольку в этот период закладываются зародышевые листки эм-

бриона, из которых в последующем эмбриональном развитии формируются органы и ткани. Кроме кальция к числу регуляторов активности цистеинзависимых ферментов, в т.ч. кальпаинов, относят тиоловые (SH–) группы, количество которых также повышается на этапе гаструляции (Ральникова, 1973). Обнаруженная нами активация кальпаинов на разных этапах раннего развития атлантического лосося, учитывая множество регулируемых ими клеточных функций, позволяет предположить их участие в регуляции онтогенетических программ, как это было показано ранее для млекопитающих (Ben-Aharon et al., 2005a; 2005b; 2005c) и амфибий *Xenopus laevis* (Cao et al., 2001; Duan et al., 2002). На стадии поздней бластулы–гаструлы развития эмбриона лосося обнаруживается повышение активности еще одной цистеинзависимой протеиназы – лизосомального катепсина В (табл. 2), а также тотальной пептидазной активности (рисунков), что указывает на начало интенсивного разрушения белкового материала запасного желтка икры. В работах (Браше, 1961; Нейфах и Тимофеева, 1977) было показано, что в этот период наблюдается увеличение скорости деградации белков запасенного в оогенезе желтка до пептидов и свободных аминокислот и миграция их в зародышевые клетки развивающейся икры, где они используются в процессах синтеза вновь образующихся белков и на энергетические нужды. Кроме того, как уже упоминалось ранее, эти протеиназы участвуют в реакциях ограниченного протеолиза синтезируемых в зародыше белков. Согласованное изменение активности и элементы взаимной регуляции кальпаинов и катепсина В были также продемонстрированы в исследованиях на оплодотворенной икре лягушки *Xenopus* (Mizote et al., 1999). Было показано, что катепсин В может способствовать активации икры и выходу ионов кальция (одного из активаторов кальпаинов) из внутриклеточных депо, включая ЭР. Можно полагать, что на этапах оплодотворения и раннего эмбриогенеза – на этапах бластуляции и гаструляции, имеет место, скорее всего, активация предсуществующих ферментных молекул, запасенных в оогенезе, в т.ч. с участием внутриклеточного кальция и избытком тиоловых групп (Озернюк, 1985; Немова, 1996; Немова и др., 2010).

Следующее увеличение активности исследуемых цистеинзависимых протеиназ – кальпаинов и катепсина В и, следовательно, интенсивности белкового катаболизма в развивающейся икре лосося наблюдается на стадии органогенеза (пигментации глаз), с которой связаны процессы дифференцировки головного мозга перед выклевом зародышей из оболочек. Лизосомальные протеиназы завершают кальпаининдуцированный процесс деградации белков (Лысенко и др., 2011). Для пептидаз также характерно повышение активности на этой стадии эмбриогенеза, которое достигает

максимума на стадии выклева мальков лосося. Процесс выклева личинки из оболочки связан с деятельностью желез вылупления, которые выделяют так называемый “фермент вылупления”, разрушающий оболочку икры у рыб (Зотин, 1953; Nagasawa et al., 2015), морских звезд *Asterias amurensis* (Li, Kim, 2013), рачков артемии *Artemia salina* (Fan et al., 2010). По своей химической природе вещества, секретируемые этими железистыми образованиями, относятся (Мацук, 1977; Post et al., 1988; Shi et al., 2006) к группе протеиназ серинового (трипсин-подобного типа). В нашем исследовании на стадии выклева мальков был обнаружен наиболее высокий прирост трипсин-подобной пептидазной активности, определяемой по гидролизу N-Bzl-L-Arg-pNA.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдаемая динамика активности исследуемых ферментов внутриклеточного протеолиза в икре атлантического лосося отражает интенсивность белкового обмена, тесно связанную с процессами дифференцировки, формообразования и развития зародыша. В эмбриональном развитии лосося на стадии гастрюляции, когда начинается активное использование запасных белков желтка для биосинтеза и построения белковых структур зародыша, обнаружена синергичная активация цистеинзависимых протеиназ различных клеточных компартментов – лизосомального катепсина В и цитозольных кальпаинов. Обнаруженная нами активация кальпаинов на разных этапах эмбрионального атлантического лосося, учитывая множество регулируемых ими клеточных функций, позволяет предположить участие в регуляции онтогенетических программ. На этапе готовности личинок к выходу из оболочек обнаружена активация аминопептидаз, преимущественно с трипсин-подобным типом активности. Результаты исследования динамики внутриклеточных протеолитических ферментов на различных этапах эмбрионального развития лососевых рыб могут представлять интерес как для развития фундаментальных представлений о механизмах белкового обмена и протеолитической регуляции на разных стадиях онтогенеза, так и для решения ряда практических задач, связанных с искусственным воспроизводством этих ценных рыб.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кяйвярйнен Е.И. Внутриклеточная  $Ca^{2+}$ -зависимая протеолитическая система животных. М.: Наука, 2006. 294 с.

- Браше Ж. Биохимическая эмбриология. М.: Иностранная литература, 1961. 327 с.
- Детлаф Т.А., Бродский В.Я., Гаузе Г.Г. Методы биологии развития. М.: Наука, 1974. 425 с.
- Зотин А.И. Фермент вылупления у зародышей осетровых рыб // Докл. АН СССР. 1953. Т. 92. С. 685–687.
- Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Канцерова Н.П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: Кар НЦ РАН, 2011. 482 с.
- Мацук В.Е. Изучение некоторых физиолого-биохимических особенностей ранних периодов жизни микижи: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: Москва, 1976. 20 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: Кар НЦ РАН, 1996. 104 с.
- Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. Протеиназы семейства кальпаинов. Структура и функции // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 5. С. 381–389.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.
- Сарис Н.-Е.Л., Карафолли Э. Роль митохондрий в перераспределении внутриклеточного кальция: исторический обзор // Биохимия. 2005. Т. 70. № 2. С. 231–239.
- Ральникова Е.С. Сульфгидрильные группы и реактивность эмбрионов рыб. В кн.: Проблемы современной эмбриологии. М.: Наука, 1973. С. 258–263.
- Рыжков Л.П. Морфофизиологические закономерности и трансформации вещества и энергии в раннем онтогенезе пресноводных лососевых рыб. Петрозаводск: Карелия, 1976. 288 с.
- Эпель Д. Иницирование развития в период оплодотворения // Онтогенез. 1992. Т. 23. С. 213–227.
- Anzenbacherová E., Barth T., Barthová J. et al. Measures for Success. № 21. P. 137–138. In: European aquaculture society special publication, 1994. Oostende (Belgium). 1994.
- Barrett A.J., Heath M. Lysosomal Enzymes. Lysosomes. A Laboratory Handbook. Amsterdam, 1977. P. 19–27.
- Barth T., Barthova J., Vacek J. et al. Towards predictable quality. № 27. P. 8–11. In: Belgium European aquaculture society special publication, 1999. Oostende (Belgium). 1999.
- Ben-Aharon I., Ben-Yosef D., Amit A. et al. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system in the human oocyte // Fertil. Steril. 2005a. V. 83. № 6. P. 1807–1813.
- Ben-Aharon I., Brown P.R., Etkovitz N. et al. The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatozoa of the mouse // Reproduction. 2005b. V. 129. № 4. P. 435–442.
- Ben-Aharon I., Haim K., Shalgi R. et al. Expression and possible involvement of calpain isoforms in mammalian egg activation // Reproduction. 2005c. V. 130. № 2. P. 165–175.
- Bohley P. Intracellular Proteolysis. Hydrolytic Enzymes. Biomedical Division. Elsevier, 1987. P. 307–332.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

- Cao Y., Zhao H., Grunz H. XCL-2 is a novel m-type calpain and disrupts morphogenetic movements during embryogenesis in *Xenopus laevis* // *Develop. Growth Differ.* 2001. V. 43. P. 563–571.
- Duan W.R., Ito M., Lee E.J. et al. Estrogen regulates a tissue-specific calpain in the anterior pituitary // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 295. P. 261–266.
- Epel D., Nishioka D., Perry G. The role of Ca<sup>2+</sup> in triggering development at fertilization // *Biol. Cell.* 1978. V. 32. P. 135–140.
- Fan T., Wang J., Yuan W. et al. Purification and characterization of hatching enzyme from brine shrimp *Artemia salina* // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2010. V. 42. № 2. P. 165–171.
- Gwatkin R.B.L., Williams D.T., Hartmann J.F. et al. The zona reaction of Hamster and mouse eggs production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules // *J. Reprod. Fert.* 1973. V. 32. P. 259–265.
- Haim K., Ben-Aharon I., Shalgi R. Expression and immunolocalization of the calpain calpastatin system during parthenogenetic activation and fertilization in the rat egg // *Reproduction*. 2006. V. 131. P. 35–43.
- Kronovetr J., Barthová J., Barth T. et al. // *Pol. Arch. Hydrobiology*. 1998. V. 45. P. 331–335.
- Li Z.J., Kim S.M. A novel hatching enzyme from starfish *Asterias amurensis*: purification, characterization, and cleavage specificity // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. V. 169. № 4. P. 1386–1396.
- Matsuda K., Musaka E. Studies on cathepsin D of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple form // *Biochem.* 1974. V. 76. P. 639–649.
- McDonald I., Schwabe C. Intracellular Exopeptidases. In: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Amsterdam, 1977. P. 311–391.
- Mellgren R.L., Murachi T. Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis. Boca Raton (FL): CRC, 1990.
- Mizote A., Okamoto S., Iwao Y. Activation of *Xenopus* eggs by proteases: possible involvement of a sperm protease in fertilization // *Dev. Biol.* 1999. V. 208. P. 79–92.
- Mommsen T.P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work // *Comp. Biol. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2004. V. 139. № 3. P. 383–400.
- Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y. et al. A quantitative distribution study on calpain and calpastatin in rat tissues and cells // *Biochem. Int.* 1981. V. 2. № 6. P. 651–658.
- Nagasawa T., Kawaguchi M., Sano K. et al. Sturgeon hatching enzyme and the mechanism of egg envelope digestion: Insight into changes in the mechanism of egg envelope digestion during the evolution of ray-finned fish // *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 2015. V. 324. № 8. P. 720–732.
- Otto K. Cathepsin B1 and B2. Tissue Proteinases. Amsterdam, 1971. P. 1–28.
- Post L.L., Shuel R., Shuel N. Evidence that hatching enzyme of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* is a chymotrypsin-like protease // *Biochem. Cell Biol.* 1988. V. 66. № 11. P. 1200–1209.
- Purintrapiban J., Wang M.C., Forsberg N.E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2003. V. 136. P. 393–401.
- 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.* 2005. V. 140. № 1. P. 63–71.
- Salem M., Kenney B., Rexroad C. et al. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout // *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics*. 2006. V. 1. P. 227–237.
- 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. R1330–1337.
- Seiliez I., Gabillard J.C., Riffle M. et al. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts // *Autophagy*. 2012. V. 8. P. 364–375.
- Shi Z.P., Fan T.J., Cong R.S. et al. Purification and characterization of hatching enzyme from flounder *Paralichthys olivaceus* // *Fish Physiol. Biochem.* 2006. V. 32. № 1. P. 35–42.
- Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. № 1. P. 25–88.
- Whitaker M. Calcium signalling in early embryos // *Philos. Trans R Soc. Lond B Biol. Sci.* 2008. V. 363. № 1495. P. 1401–1418.
- Webb S.E., Fluck R.A., Miller A.L. Calcium signaling during the early development of medaka and zebrafish // *Biochimie*. 2011. V. 93. № 12. P. 2112–2125.
- Webb S.E., Miller A.L. Ca<sup>2+</sup> signaling during activation and fertilization in the eggs of teleost fish // *Cell Calc.* 2013. V. 53. № 1. P. 24.

## Dynamics of Activity of Intracellular Cysteine-Dependent Proteases and Some Peptidases in Embryogenesis of Salmon *Salmo salar* L.

N. N. Nemova\*, E. I. Kyaivaryainen, and M. Yu. Krupnova

*Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185910 Russia*

\*e-mail: nemova@krc.karelia.ru

Received May 31, 2016; in final form, July 3, 2016

The dynamics of the activity of cysteine-dependent enzymes involved in intracellular proteolysis was studied in freshwater salmon *Salmo salar* L. during its early development: in the period from the blastodisc formation

to hatching as well as in eggs before fertilization. The  $\text{Ca}^{2+}$ -activated proteolytic activity of calpains, the activity of acidic lysosomal protease cathepsin B, and the activity of several peptidases that use the chromogenic component *p*-nitroaniline-containing peptides (L-Ala-pNA, L-Pro-pNA, L-Arg-pNA, N-Bzl-L-Arg-pNA, L-Phe-pNA, N-Glu-L-Phe-pNA, and Z-Gly-Pro-pNA) as substrates were analyzed. It is shown that the activity of the enzymes of interest increases at the stage of late blastula and early gastrula. The next increase in the activity of cathepsin B and calpain is observed at the stage of eye pigmentation, and the activity of peptidases and cathepsin B increases in eggs before hatching. The functional role of changes in intracellular proteolytic enzymes in the processes of protein metabolism associated with the Atlantic salmon embryo is discussed.

*Keywords:* proteolytic enzymes, freshwater salmon, embryogenesis