

На правах рукописи



КАНЦЕРОВА
Надежда Павловна

Ca²⁺-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ
НЕКОТОРЫХ ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И РЫБ

Специальность 03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск
2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институте биологии Карельского научного центра РАН

Научный руководитель: член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор
НЕМОВА Нина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
ШАРОВА Наталья Петровна

доктор биологических наук, профессор
МУХИН Вячеслав Анатольевич

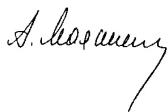
Ведущее учреждение: Учреждение Российской академии наук
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится 22 марта 2011 года в 12.00 на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 212.087.02 при Карельской государственной педагогической академии по адресу: 185680, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельской государственной педагогической академии (185680, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17).

Автореферат разослан " " февраля 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
к.м.н., доцент



А.И. Малкиель

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Протеолиз – ферментативный гидролиз пептидных связей в белках и пептидах – один из наиболее важных и универсальных химических процессов живой природы (Антонов, 1983; Kirschner, 2000). Актуальность изучения внутриклеточных протеиназ определяется, с одной стороны, их базовыми функциями в клетке, а с другой стороны – их ролью в развитии ответных реакций организма на действие разнообразных стресс-факторов, в том числе и факторов среды. Функции внутриклеточных протеолитических ферментов заключаются в деградации белков, а также в катализе реакций ограниченного протеолиза, необходимых для регуляции клеточного метаболизма. Последняя функция становится более очевидной с повышением эволюционной организации живых организмов (Степанов, 1994), и сегодня система Ca^{2+} -зависимого протеолиза, включающая Ca^{2+} -зависимые протеиназы семейства кальпаинов и их эндогенный ингибитор кальпастатин, рассматривается как одна из важнейших регуляторных систем клеток высших эукариот (Goll et al., 1990; Croall, DeMartino, 1991; Goll et al., 2003). Кальпаины (КФ 3.4.22.17; клан цистеиновых протеиназ CA, семейство C2) – Ca^{2+} -зависимые протеиназы, ответственные за селективную деградацию белков в цитозоле клеток всех организмов – от прокариот до человека. Они принимают участие в базовых Ca^{2+} -зависимых клеточных процессах – передаче сигнала, клеточном цикле, пролиферации, дифференцировке, апоптозе, слиянии мембран, формировании мышечных волокон и других (Sorimachi et al., 1997; Goll et al., 2003); изменение их активности описано при некоторых наследственных и эпигенетических нарушениях, дегенеративных заболеваниях (Tidball, Spencer, 2000; Suzuki et al., 2004). К настоящему моменту кальпаин-кальпастатиновая система достаточно хорошо изучена у млекопитающих, хотя и в этой области остается ряд нерешенных проблем (Бондарева и др., 2006; Goll et al., 2003). Сведения же о кальпаинах рыб, а также беспозвоночных животных сравнительно фрагментарны (Mykles et al., 1998; Ladrat et al., 2000; 2004; Salem et al., 2004; 2005a, Saito et al., 2007) и зачастую ограничиваются идентификацией кодирующих их нуклеотидных последовательностей. Несмотря на ограниченность структурных исследований Ca^{2+} -зависимых протеиназ цитозоля и кодирующих их генов у беспозвоночных и рыб, в отдельных исследованиях (Бондарева, 2002; 2004; Johnson, 1990) показано участие этих протеиназ в физиологических процессах, включая развитие адаптивных и патологических перестроек метаболизма. Критериями участия кальпаинов в этих процессах является изменение их функциональной активности (на уровне экспрессии, активации, компартментализации, ингибирования, синтеза специфичных форм и их соотношения) и ряда других свойств. Таким образом, исследования структуры, свойств и роли Ca^{2+} -зависимых протеолитических ферментов в метаболизме беспозвоночных и рыб представляют несомненный интерес как в сравнительно-эволюционном, так и в физиолого-биохимическом и экологическом аспектах.

Цель работы заключалась в характеристике внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеолитических ферментов семейства кальпаинов у водных беспозвоночных и рыб и выявлении ответных реакций на уровне Ca^{2+} -зависимого протеолиза при влиянии на организмы некоторых антропогенных факторов среды.

Задачи исследования:

1. Выделить и идентифицировать так называемые «классические» формы кальпаинов или их гомологи из органов и тканей беспозвоночных и рыб, изучить их структурные и энзиматические свойства.

2. Изучить общие и специфические особенности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ у рыб и беспозвоночных.

3. Выявить изменения активности и экспрессии мРНК внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ беспозвоночных и рыб при воздействии на них антропогенных факторов среды.

Положения, выносимые на защиту:

1. Базовый уровень активности, а также структурные и энзиматические свойства внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ зависят от филогенетического положения объекта.

2. Характер ответной реакции со стороны внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ на изученные антропогенные факторы зависит от концентрации, времени воздействия и природы действующего вещества.

Научная новизна. Впервые исследован базовый уровень активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ у ранее неизученных в этом отношении объектов – пресноводных беспозвоночных (кольчатых червей, насекомых, ракообразных, двусторчатых и брюхоногих моллюсков). На примере изученных беспозвоночных выявлена зависимость уровня активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ от филогенетического положения объекта. Впервые показано изменение уровня экспрессии гена кальпаин-подобной протеиназы в тканях беспозвоночных животных при антропогенном воздействии (при влиянии солей тяжелых металлов в аквариальном эксперименте). Показана роль исследуемых протеиназ в развитии ответной реакции водных беспозвоночных и рыб при воздействии некоторых антропогенных факторов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Значение результатов диссертационной работы для фундаментальной науки заключается в получении новых сведений о роли внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ в механизмах регуляции клеточного метаболизма у животных. Они могут послужить основой для дальнейших исследований протеиназ семейства кальпаинов и механизмов регуляции их активности в сравнительно-эволюционном и физиолого-биохимическом аспектах. Исследуемые показатели внутриклеточного Ca^{2+} -зависимого протеолиза у рыб и беспозвоночных могут быть использованы

в качестве дополнительного биохимического критерия для оценки состояния организмов, обитающих в загрязненных водоемах. Материалы диссертации могут быть использованы в лекционных курсах «Экологическая биохимия» и «Введение в энзимологию» для студентов биологических факультетов вузов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на российских и зарубежных научных конференциях: Всероссийской конференции «Научное наследие академика Л.А. Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний» (Санкт-Петербург, 2008), III International conference «Arctic Frontiers. Arctic marine ecosystems in an era of rapid climate change» (Tromsø, Norway, 2009), XVI Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2009), Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2009» (Минск, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), XXVIII Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» (Петрозаводск, 2009), IV International conference «Balwois – 2010. Water observation and information system for decision support» (Ohrid, Republic of Macedonia, 2010), III Международной конференции с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010), Международной школе-семинаре для молодых ученых «Биологические ресурсы Арктики и Субарктики – потенциал для биотехнологии: исследования и инновации» (Петрозаводск, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, из которых 1 монография в соавторстве, 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 8 статей в других изданиях и 11 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, 28 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов. Список цитируемой литературы включает 305 источников, в том числе 206 работ зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своим учителям и наставникам: научному руководителю д.б.н., член-корр. РАН Н.Н. Немовой, научному консультанту к.б.н. Л.А. Лысенко, сотрудникам лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации. Автор искренне признательна сотрудникам ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, ИППЭС КНЦ РАН, ИМБП РАН, ББС ЗИН РАН «Картеш» за помощь в получении биологического материала, постановке экспериментов и обсуждении результатов исследований. Самые теплые слова благодарности сотрудникам группы молекулярной биологии ИБ КарНЦ РАН к.б.н. Л.В. Топчиевой и к.б.н. И.Е. Малышевой за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01140-а, 09-04-90733-моб ст), Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-306.2008.4 и НШ-3731.2010.4.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены современные данные о структуре, свойствах, механизмах регуляции и биологической роли внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеолитических ферментов семейства кальпаинов у животных, в том числе у рыб и беспозвоночных. Обобщены данные литературы о роли исследуемых протеиназ в механизмах эколого-биохимических адаптаций в условиях изменения различных факторов окружающей среды, включая антропогенные. Обозначены нерешенные вопросы и перспективы исследования Ca^{2+} -зависимых протеиназ у низших позвоночных и беспозвоночных животных.

Глава 2. Материал и методы исследований

Материал. В качестве объектов исследования были использованы представители следующих таксонов **беспозвоночных**: тип Кольчатые черви (Annelida): олигохета *Stylodrilus heringianus* (кл. Oligochaeta, отр. Lumbriculida), малая ложноконская пиявка *Herpobdella octoculata* (кл. Hirudinea, отр. Pharyngobdellae); тип Членистоногие (Arthropoda), кл. Ракообразные (Crustacea): водяной ослик *Asellus aquaticus* (отр. Isopoda), дафния *Daphnia pulex* (отр. Cladocera), полифемус *Polyphemus pediculus* (отр. Cladocera), амфиподы *Gammarus* sp. (отр. Amphipoda); тип Членистоногие (Arthropoda), кл. Насекомые (Insecta): личинки эритроммы большой *Erythromma najas* (отр. Odonata), личинки ручейника-глазка *Limnephilus stigma* (отр. Trichoptera), личинки подёнки Линнея *Siphonurus linneanus* (отр. Ephemeroptera), личинки полоскуна *Acilius* sp. (отр. Coleoptera), личинки хаборуса *Chaoborus* sp. (отр. Diptera); тип Моллюски (Mollusca), кл. Брюхоногие (Gastropoda): прудовик *Lymnaea intermedia*, прудовик болотный *L. palustris*, лужанка *Viviparius viviparius*, катушка окаймленная *Planorbis planorbis*; тип Моллюски (Mollusca), кл. Двустворчатые (Bivalvia): дрейссена полиморфная *Dreissena polymorpha*, дрейссена бугская *D. bugensis*, перловица *Unio longirostris*, мидия обыкновенная *Mytilus edulis* L.; а также **пресноводные рыбы**: щука *Esox lucius* L. (сем. Esocidae), карась *Carassius auratus* L. (сем. Cyprinidae), сиг *Coregonus lavaretus* (L.) (сем. Coregonidae).

Экстракция протеиназ из тканей. Экстракцию проводили:

1) стандартным методом. Навеску ткани (5.0 г) гомогенизировали в 3-кратном объеме 10 mM трис-HCl буфера (pH 7.5) с добавлением 0.25 М сахарозы

(Murachi et al., 1981). Гомогенаты центрифугировали 20 мин при 2000 g, затем 60 мин при 105 000 g;

2) микрометодом. Навеску ткани (100 мг) гомогенизировали в 10-кратном объеме 20 mM трис-HCl буфера (pH 7.5) (Enns, Belcastro, 2006). Гомогенаты центрифугировали 20 мин при 20 000 g. Супернатант (цитозольная фракция фермента) декантировали. Осадок ресуспендировали в 10 объемах того же буфера с добавлением 0.33% тритона X-100 и повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатант после повторного центрифугирования (мембраносвязанная фракция фермента) хранили на льду для последующего анализа.

Частичная очистка внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ. Ионообменную хроматографию проводили на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой (Дэвени, Гергей, 1976). Элюцию ферментов проводили с помощью непрерывного градиента р-ра NaCl (0.1-0.4 M). Фракции, содержащие Ca^{2+} -зависимую протеолитическую активность, концентрировали на ПЭГ-10 000 и использовали для дальнейшей очистки. Гель-фильтрацию проводили на колонках с Sephacryl S-300 («Sigma-Aldrich», США). Элюцию проводили со скоростью 24 мл/ч. Молекулярную массу выходящих с колонки фракций белка определяли с помощью калибровочного графика, построенного по результатам пропускания через колонку белков с известной молекулярной массой: иммуноглобулина G (110 кДа), БСА (67 кДа), трипсина (32.5 кДа), цитохрома c (11.7 кДа). Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970), окрашивание препаратов белка проводили 0.15% Coomassie G-250 (Hames, 1990).

Определение активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ. Активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ определяли спектрофотометрически по гидролизу щелочно-денатурированного казеина во фракциях, полученных после гель-хроматографического разделения образцов (Murachi et al., 1981) или в цитозольной и мембраносвязанной фракциях, полученных без хроматографического разделения (Enns, Belcastro, 2006). Удельную активность кальпаинов определяли в единицах активности (ЕА) на 1 мг белка. Содержание белка в тканях определяли согласно методу Бредфорд (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта БСА.

Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Тотальную РНК из ткани (50 мг) выделяли с помощью набора «Yellow-Solve» («Клоноген», Россия) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Первую цепь комплементарной ДНК (кДНК) синтезировали из 5 мкг тотальной РНК с использованием случайных гексапраймеров и M-MLV обратной транскриптазы («Силекс», Россия). Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической

приставкой iQ5 («Bio-Rad», США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Праймеры к нуклеотидным последовательностям исследуемого гена кальпаин-подобной протеиназы и референсного гена актина подбирали с использованием компьютерной программы Primer Premier 5. Уровень экспрессии исследуемого гена определяли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистическая обработка данных. Полученные данные обработаны с применением общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакетов программ MS Excel и StatGraphics. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия U (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) (Коросов, Горбач, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы некоторых водных беспозвоночных и рыб. Особенности структуры и свойств

3.1. Активность кальпаинов в тканях некоторых беспозвоночных и рыб

Исследован базовый уровень активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ у некоторых видов беспозвоночных и рыб. Анализ полученных результатов (рис. 1) показал, что уровень активности кальпаинов у животных разных таксонов значительно варьирует. Максимальные величины удельной активности кальпаинов в цитозольной фракции отмечены у представителей типа Кольчатые черви – пиявок и олигохет. У остальных исследованных гидробионтов активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ в цитозольной фракции значительно ниже. При изучении уровня удельной активности кальпаинов в мембраносвязанной фракции установлено, что наивысшие значения активности характерны для кольчатых червей, несколько меньшие – для двустворчатых моллюсков, минимальные – для членистоногих. Промежуточные, близкие между собой значения активности исследуемых ферментов отмечены у брюхоногих моллюсков, а также у рыб. Установленные различия в конститутивном уровне внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической активности у изученных видов беспозвоночных и рыб могут быть связаны как с физиологическими особенностями, так и с таксономической принадлежностью объектов. Ранее высказывалось предположение, что Ca^{2+} -зависимые протеиназы эволюционно более древних организмов выполняют преимущественно катаболическую функцию, в то время как у более высокоорганизованных животных на первый план выходит их регуляторная функция в клеточном метаболизме (Степанов, 1994; Бондарева, 2002).

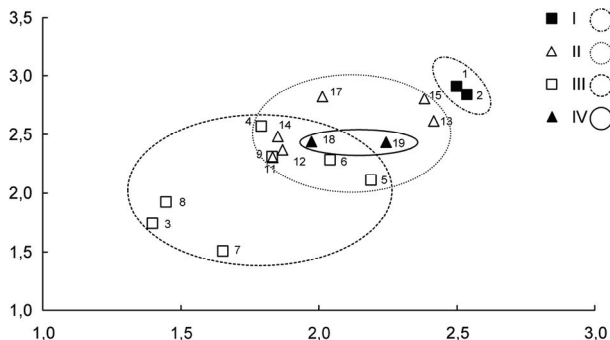


Рис. 1. Удельная активность внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ у изученных видов беспозвоночных и рыб. По горизонтали: логарифм значений удельной активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ в цитозольной фракции; по вертикали: – в мембраносвязанной фракции. I – кольчатые черви, II – моллюски, III – членистоногие, IV – рыбы. Арабскими цифрами обозначены изученные виды организмов (1 - *Stylodrilus heringianus*, 2 - *Herpobdella octoculata*, 3 - *Asellus aquaticus*, 4 - *Daphnia pulex*, 5 - *Polyphemus pediculus*, 6 - *Limnephilus stigma*, 7 - *Erythronma najas*, 8 - *Siphonurus linneanus*, 9 - *Acilius sp.*, 11 - *Lymnaea intermedia*, 12 - *L. palustris*, 13 - *Planorbis planorbis*, 14 - *Viviparius viviparius*, 15 - *Dreissena bugensis*, 17 - *Unio longirostris*, 18 - *Carassius auratus*, 19 - *Esox lucius*).

Действительно, наиболее высокие значения активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ характерны для представителей типа Кольчатые черви – наиболее древних и просто организованных животных среди исследованных групп беспозвоночных (рис. 1). Можно предположить, что более высокий уровень активности кальпаинов у представителей типа Кольчатые черви является отражением древности и примитивности организации данной группы организмов. Высокая эффективность Ca^{2+} -зависимого протеолиза в цитозоле у низших животных (по данным Д. Майклса (Mykles, 1998), у ракообразных в цитозоле гидролизует до 60% белков) тесно связана с другой особенностью их кальпаинов – низкой селективностью по сравнению с гомологами из теплокровных, которая отражается в более широкой субстратной специфичности (Мухин, 2000; Mykles, 1998) и более полном гидролизе белковых субстратов (до коротких пептидов) непосредственно в цитозоле.

3.2. Выделение и частичная очистка внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ из тканей рыб. Распределение, тканевая специфичность и некоторые энзиматические свойства

Энзиматические свойства Ca^{2+} -зависимых протеиназ рыб исследовали на примере сига *C. lavaretus*. На рисунке 2 приведен профиль элюции водорастворимых белков мышц сига после гель-хроматографии. Белки во всех случаях разделяются по молекулярной массе на три пика: наиболее

высокомолекулярные белки составляют первый пик (M_r 400-110 кДа), белки с M_r 110-10 кДа – второй, третий пик включает низкомолекулярные (< 10 кДа) вещества белковой природы, пептиды. Протеолитическая активность, индуцируемая ионами Ca^{2+} , обнаруживается в трех фракциях белкового элюента с M_r

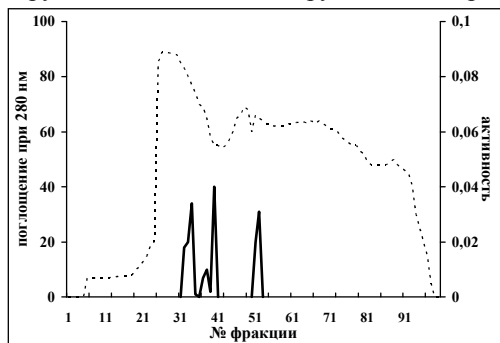


Рис. 2. Профиль элюции водорастворимых белков (-----) и уровень Ca^{2+} -зависимой активности (—) (EA) в мышцах сига *C. lavaretus*.

120, 110 и 80 кДа (рис. 2). Соотношение активностей в разных фракциях фермента имеет органную специфичность. Для различных фракций фермента определили концентрацию Ca^{2+} , необходимую для проявления максимальной активности. Ca^{2+} -зависимые протеиназы сига максимально активны при 100 мкМ – фракция с M_r 120 кДа, 2.0 мМ – фракция 110 кДа и 1.0 мМ – фракция 80 кДа. Таким образом, зависимость

активности кальпаинов сига от концентрации Ca^{2+} была установлена для процессов, происходящих в бесклеточной реакционной среде. Кроме того, в наших экспериментах на примере крыс была показана зависимость активности кальпаинов от концентрации Ca^{2+} непосредственно в клетке (Алтаева и др., 2010). В исследовании pH оптимума Ca^{2+} -зависимых протеиназ сига показано, что фракция фермента с M_r 120 кДа максимально активна при pH 7.4, фракции 110 и 80 кДа – при pH 7.2.

При воздействии широкого спектра ингибиторов показано, что Ca^{2+} -зависимые протеиназы сига чувствительны к ингибиторам, взаимодействующим с SH-группами цистеина: алкилирующим реагентам, ионам тяжелых металлов (Hg^{2+}). Кроме того, Ca^{2+} -зависимая протеолитическая активность не детектируется в присутствии ЭГТА – хелатора ионов Ca^{2+} . При воздействии группового ингибитора сериновых протеиназ (PMSF), а также ингибитора аспартатных протеиназ (пепстатина) уровень Ca^{2+} -зависимой протеолитической активности достоверно не снижается по сравнению с контролем. Установлено, что эндогенный ингибитор кальпаинов кальпастатин из мышц сига элюируется с колонки Sephacryl S-300 с белковой фракцией с M_r 170 кДа.

Чувствительность исследуемых ферментов к ингибиторам цистеиновых протеиназ, абсолютная зависимость активности от присутствия ионов Ca^{2+} и нейтральный pH оптимум однозначно позволяют отнести изучаемые ферменты к цистеиновым протеиназам семейства кальпаинов C2 (Rawlings et al., 2010).

Известно (Murachi et al., 1981; Goll et al., 2003), что при разделении кальпаинов позвоночных первой с колонки элюируется белковая фракция, содержащая более высокомолекулярный μ -кальпаин, затем – m -кальпаин, а третий пик, скорее всего, обусловлен наличием каталитических субъединиц, образовавшихся в результате диссоциации высокомолекулярных форм (Suzuki et al., 1988). Данные гель-фильтрации образцов с последующим электрофорезом в ПААГ свидетельствуют о том, что протеиназы фракций 120 и 110 кДа состоят из двух различных субъединиц с M_r приблизительно 80 и 27 кДа, то есть в нативном состоянии имеют структуру гетеродимеров, фракция 80 кДа включает смесь двух полипептидов с близкими значениями M_r . Дополнительным критерием различения μ - и m -кальпаинов у позвоночных служит их термостабильность при нагревании при 58 °С в течение 5 минут. Так, активность m -кальпаина карпа снижается в этих условиях на 25%, тогда как активность μ -кальпаина не изменяется (Murachi et al., 1981). В наших экспериментах показано, что фракция фермента сига с M_r 110 кДа утрачивает 60% активности при нагревании до 58 °С. Протеиназа с M_r 120 кДа сохраняет 70% от первоначальной активности при инкубации при 58 °С. Термостабильность фракции фермента 80 кДа промежуточная. Таким образом, по совокупности экспериментальных данных о димерной структуре, молекулярной массе субъединиц, чувствительности к Ca^{2+} , термостабильности можно установить сходство протеиназы фракции 120 кДа с μ -кальпаином человека, протеиназы фракции 110 кДа – с m -кальпаином человека, фракция 80 кДа предположительно содержит смесь их каталитических субъединиц.

3.3. Выделение и частичная очистка внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ беспозвоночных. Распределение и некоторые энзиматические свойства

Исследование энзиматических свойств кальпаин-подобных протеиназ проводили у двустворчатых моллюсков (мидий *Mytilus edulis*) и ракообразных (амфипод *Gammaridae*). Как упоминалось выше, у позвоночных первой с колонки элюируется фракция, в которой определяется активность μ -кальпаина, затем – m -кальпаина (Murachi et al., 1981; Goll et al., 2003), а третий пик, скорее всего, обусловлен наличием каталитически активных субъединиц (Suzuki et al., 1988). Подобное соотношение пиков наблюдается также на хроматограмме мидий и амфипод. Ca^{2+} -зависимая протеолитическая активность в экстрактах мягкого тела моллюска обнаруживается в белковых фракциях с M_r 110, 85 и 65 кДа, в гомогенатах амфипод – в белковых фракциях с M_r 110, 80 и 65 кДа; полипептиды этих фракций мигрируют в ПААГ с белками M_r 85 и 65 кДа. Ферменты мидии максимально активны в присутствии 4.0 мМ Ca^{2+} (фракция 85 кДа) или 2.0 мМ (фракции 110 и 65 кДа) (рис. 3). Ферменты амфипод с M_r 110, 80 и 65 кДа максимально активны при 3.0, 5.0 или 4.0 мМ Ca^{2+} , соответственно. Полученные результаты

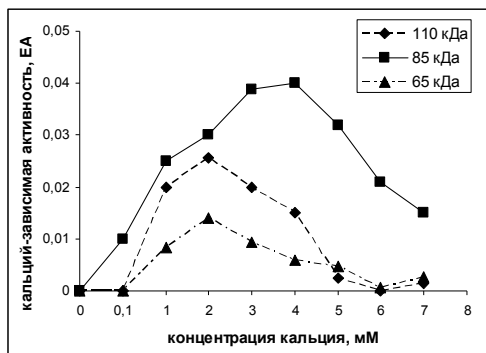


Рис. 3. Зависимость активности кальпаин-подобных протеиназ (M_r 65, 85 и 110 кДа) из мягкого тела мидии *M. edulis* от концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде

согласуются с данными литературы о том, что для активации кальпаин-подобных протеиназ беспозвоночных требуются миллимолярные концентрации Ca^{2+} (Mykles, 1998), в то время как потребность в Ca^{2+} у большинства из известных кальпаинов позвоночных животных (например, изученных нами рыб) лежит в микромолярном диапазоне (исключение — m-кальпаин). Увеличение квоты кальпаинов с высокой чувствительностью к Ca^{2+} ранее было продемонстрировано при сравнении пула

эритроцитарных форм кальпаинов среди позвоночных животных (Nemova et al., 2000). Максимальная активность трех выделенных молекулярных форм фермента мидии зафиксирована при pH 7.4. Ферменты амфипод максимально активны при значениях pH 7.4 (фракции с M_r 110 и 80 кДа) и 7.6 (65 кДа). При изучении термостабильности Ca^{2+} -зависимых протеиназ мидии было показано, что фракция фермента с M_r 85 кДа утрачивает 70% активности при нагревании при 38 °C и полностью инактивируется при воздействии 48 °C. Протеиназа с M_r 110 кДа теряет активность на 40% при 48 °C и сохраняет 10% от первоначального уровня активности при температуре 58 °C. Сходные результаты были получены для кальпаин-подобных ферментов амфипод. Полученные данные свидетельствуют о том, что кальпаин-подобные ферменты беспозвоночных значительно более чувствительны к нагреванию, чем кальпаины рыб (материалы главы 3.2). Ингибиторный анализ показал, что Ca^{2+} -зависимые протеиназы амфипод чувствительны к ингибиторам цистеиновых протеиназ. В то же время при воздействии группового ингибитора сериновых протеиназ (PMSF), а также ингибитора аспартатных протеиназ (пепстатина) уровень активности кальпаинов амфипод снижался на 20% по сравнению с контролем. Ca^{2+} -зависимые протеиназы мидий также чувствительны к ингибиторам протеиназ цистеинового типа, их активность не выявляется в присутствии ЭГТА. При воздействии PMSF и пепстатина уровень активности кальпаинов мидий снижался на 25% по сравнению с контролем. Чувствительность Ca^{2+} -зависимых протеиназ беспозвоночных к пепстатину и PMSF была отмечена ранее и другими авторами у омара (Mattson, Mykles, 1993). В тканях мидий и амфипод не обнаружена активность кальпастина.

Свойства кальпаин-подобных белков мидий и амфипод (необходимая для активации концентрация Ca^{2+} , pH оптимум, чувствительность к действию ингибиторов) позволяют отнести изучаемые ферменты к цистеиновым протеиназам семейства кальпаинов C2 (Rawlings et al., 2010). Вместе с тем, кальпаин-подобным ферментам беспозвоночных свойственны специфические особенности структуры и свойств по сравнению с кальпаинами рыб (обобщены в табл.1), выражающиеся в меньшей чувствительности к Ca^{2+} , меньшей термостабильности, чувствительности к ингибиторам протеиназ нецистеинового типа. Кроме того, в их структуре отсутствует субъединица, подобная регуляторной субъединице 28 кДа кальпаинов позвоночных. У беспозвоночных отсутствует эндогенный ингибитор кальпастина.

Таблица 1. Некоторые свойства Ca^{2+} -зависимых протеиназ у животных разных таксономических групп

Некоторые свойства	Беспозвоночные		Рыбы	Тенденция в эволюционном ряду
	Мидии	Амфиподы		
чувствительность к Ca^{2+}	2 – 4 мМ	3 – 5 мМ	100 мкМ – 2 мМ	повышается
термостабильность (остаточная активность фермента после инкубации при 58 °С в течение 5 мин)	0 – 10%	0 – 10%	40 – 70%	повышается
pH оптимум	7.4	7.4 – 7.6	7.2 – 7.4	не изменяется
чувствительность к PMSF и пепстатину	+	+	–	утрачивается
регуляторная субъединица	–	–	+	усложнение механизмов регуляции
кальпастин	–	–	+	

Глава 4. Влияние некоторых типов антропогенного загрязнения на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеолитические ферменты водных беспозвоночных и рыб

4.1. Внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы мидии *Mytilus edulis* при воздействии нефтепродуктов

Исследовали влияние нефтепродуктов на активность внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ в тканях мидий в аквариальном эксперименте. Предварительно акклимизированных к лабораторным условиям моллюсков подвергали воздействию различных концентраций нефтепродуктов (дизельного топлива, разведенного в морской воде в соотношении 1:9) в течение 6 суток. В контрольный аквариум дизельное топливо не вносили. Активность кальпаинов оценивали после предварительной гель-хроматографии образцов на колонках Sephacryl S-300 (рис. 4).

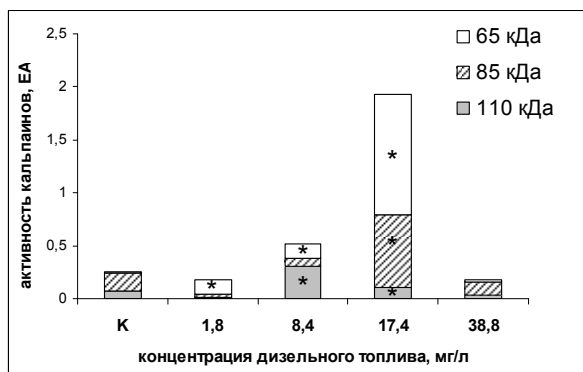


Рис. 4. Ca^{2+} -зависимая протеолитическая активность (EA) в различных белковых фракциях экстракта мягкого тела мидии *M. edulis* при действии различных концентраций дизельного топлива, К – контроль, * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.05$.

Наиболее выраженная активация всех компонентов Ca^{2+} -зависимой кальпаиновой системы, и, как следствие, максимальная суммарная активность, наблюдается у мидий при воздействии дизельного топлива в концентрации 17.4 мг/л. Можно предположить, что активация кальпаин-подобных ферментов в тканях мидий, наблюдаемая в данном эксперименте, свидетельствует о компенсаторных изменениях обмена веществ моллюсков, направленных, вероятно, на повышение эффективности утилизации и детоксикации нефтепродуктов. О компенсаторном характере ответной реакции метаболизма мидий при воздействии нефтепродуктов свидетельствуют изменения и других биохимических параметров (Амелина и др., 2006; Bakhmet et al., 2009).

4.2. Внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы мидии *Mytilus edulis* при воздействии солей меди и кадмия

В аквариальном эксперименте исследовали влияние солей тяжелых металлов на экспрессию мРНК и активность внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ в органах мидий. Для исследования были выбраны два металла – кадмий, способный связываться с SH-группами биомолекул (Антонов, 1983) и медь – эссенциальный металл, входящий в состав ферментов, однако, в высоких концентрациях токсичный для организма (Губанов и др., 2008; Моисеенко, 2009). Предварительно акклиматизированных к лабораторным условиям моллюсков подвергали воздействию растворов хлоридов меди и кадмия следующих концентраций: 5 мкг/л Cu^{2+} , 50 мкг/л Cu^{2+} , 250 мкг/л Cu^{2+} , 10 мкг/л Cd^{2+} , 100 мкг/л Cd^{2+} , 500 мкг/л Cd^{2+} (концентрация приведена в пересчете на катион) в течение 24 и 72 ч. Контролем служили моллюски, содержащиеся в аквариуме без добавления металлов.

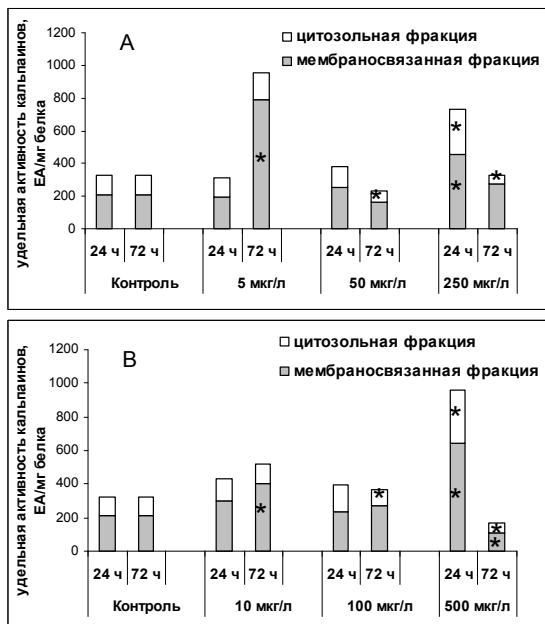


Рис. 5. Удельная активность кальпаинов (ЕА/мг белка) в жабрах *M. edulis* L. при действии различных концентраций меди (А) и кадмия (В) (экспозиция 24 и 72 часа), * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.05$).

стресс-реакции при действии экстремальных факторов сопровождается повышением активности протеолитических ферментов (Генгин и др., 2000). После 72 ч воздействия меди (50, 250 мкг/л) в жабрах, подверженных максимальной аккумуляции металлов (Челомин, 1998; Андроников и др., 2002), наблюдалось снижение активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ по сравнению с контролем. Вероятно, избыток меди в жабрах оказывает влияние на биохимические процессы, в том числе и на протеолитические. После 72 ч воздействия кадмия (100, 500 мкг/л) также наблюдалось снижение активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ цитозоля в жабрах мидий по сравнению с контролем. Подавление активности кальпаинов, вероятно, является следствием способности данного металла к ингибированию биомолекул за счет специфичного связывания с их реакционными SH-группами. В гепатопанкреасе мидий при суточном воздействии меди и кадмия активность кальпаинов не изменялась; тогда как через трое суток наблюдались достоверные изменения активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ в данном органе. Наблюдаемые различия, вероятно, можно объяснить тем, что к

Активность кальпаинов в жабрах и гепатопанкреасе мидий, подвергнутых воздействию солей меди и кадмия, изменялась в зависимости от природы металла, его концентрации и времени воздействия на организм. Так, по истечении 24 ч воздействия меди (250 мкг/л) и кадмия (500 мкг/л) наблюдался более высокий уровень активности кальпаинов в жабрах по сравнению с контролем (рис. 5 А, В). Вероятно, наблюдаемая активация кальпаинов в жабрах мидий при остром краткосрочном воздействии тяжелых металлов свидетельствует о развитии стресс-реакции. Известно, что становление

этому времени начинается отток металлов от уязвимых тканей (жабры) к тканям, функционально задействованным в аккумуляции, детоксикации и экскреции ксенобиотиков (гепатопанкреас и почки).

Для установления возможных механизмов регуляции активности кальпаинов, оценивали уровень экспрессии гена кальпаин-подобной протеиназы в жабрах

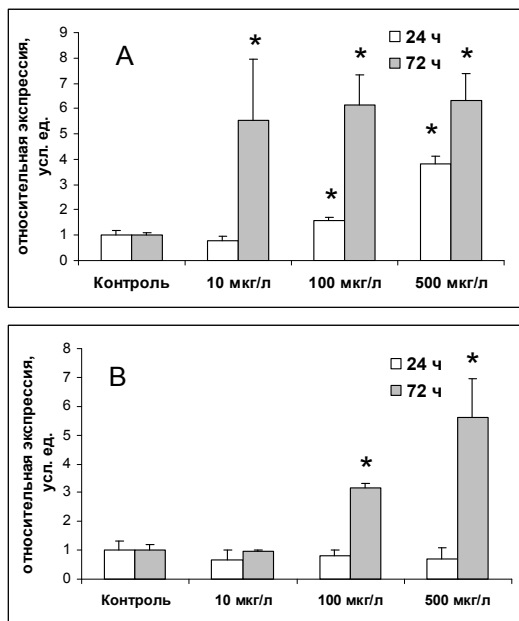


Рис. 6. Относительная экспрессия гена кальпаин-подобной протеиназы в жабрах (А) и гепатопанкреасе (В) мидии *M. edulis*. при действии различных концентраций кадмия (экспозиция 24 ч и 72 ч), * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.05$).

в наших экспериментах было установлено, что влияние ионов тяжелых металлов приводит к достаточно быстрому и значительному (в отдельных случаях более чем к 6-кратному) увеличению экспрессии гена кальпаин-подобной протеиназы в органах мидий.

Сопоставление данных о количестве мРНК Ca^{2+} -зависимой протеиназы и ее активности показало стабильность обоих показателей в гепатопанкреасе при 24-часовом воздействии металлов и их сочетанное увеличение при 72-часовом воздействии, тогда как в жабрах после 72 ч воздействия металлов активность кальпаинов и их экспрессия изменялись

в жабрах и гепатопанкреасе мидий экспериментальных групп. Несмотря на то, что кальпаины – конститутивные ферменты, их нельзя рассматривать как белки «домашнего хозяйства», поскольку экспрессия их генов регулируется (Cottin et al., 1994; Nakashima et al., 2005; Lepage, Bruce, 2008). Содержание транскриптов гена кальпаин-подобной протеиназы в жабрах и гепатопанкреасе мидий было стабильным при 24-часовом воздействии меди, и увеличилось только через 72 часа. При воздействии кадмия в жабрах мидии уровень экспрессии исследуемого гена увеличился по сравнению с контролем уже при 24-часовом воздействии (рис. 6 А), а в гепатопанкреасе – только после 72 часов (рис. 6 В). Таким образом,

разнонаправлено: при повышении количества мРНК активность кальпаинов снижалась. По-видимому, наблюдаемые изменения направлены на поддержание достаточного уровня кальпаинов, обеспечивающего нормальное функционирование клетки: так, при обеднении пула функционально активных кальпаинов за счет блокады их активных центров металлом (кадмием) увеличивается скорость их синтеза *de novo*. Однако сделанные на основании полученных результатов выводы носят в определенной мере гипотетический характер из-за отсутствия данных о количественном содержании кальпаинов. Прямая оценка их уровня оказалась на настоящем этапе исследований невозможной в отсутствии доступных коммерческих антител к указанным белкам.

Для более полной оценки возможных механизмов действия солей тяжелых металлов, растворенных в среде, на кальпаины мидий, в эксперименте *in vitro* была протестирована способность различных катионов (в том числе Cu^{2+} и Cd^{2+}) воздействовать на активность частично очищенного препарата кальпаинов (ионы добавлялись в конечной концентрации 2.5 мМ в составе хлоридов). Относительная активность кальпаинов также была определена при совместном добавлении 2.5 мМ изучаемого катиона и 2.5 мМ Ca^{2+} . Как и ожидалось, Ca^{2+} является наиболее эффективным активатором кальпаинов (Ca^{2+} -индуцируемая активность принята за 100%). Ионы Cu^{2+} также способны активировать фермент, но в значительно меньшей степени, до 24 % от референтного уровня. В присутствии 2.5 мМ Cd^{2+} активность фермента не выявлялась, как и при сочтанном действии Ca^{2+} и Cd^{2+} , что, вероятно, можно объяснить способностью кадмия блокировать SH-группу активного центра фермента.

4.3. Влияние накопления стронция на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы сига *Coregonus lavaretus* из водоемов Мурманской области

Исследована активность внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ в тканях сига из водоемов Мурманской обл., различающихся по степени техногенного загрязнения – оз. Нижняя Пиренга (контроль), качество вод которого является удовлетворительным (уровень микроэлементов не превышает предельно допустимые концентрации для рыбохозяйственных водоемов) и оз. Ковдор (опыт), испытывающего загрязнение стронций-содержащими сточными водами Ковдорского горнообогатительного комбината. Установлено, что стронций – наиболее интенсивно аккумулирующийся в тканях рыб тяжелый металл из состава загрязнителей оз. Ковдор (Кашулин, 1999; Королева, 2001). Стронций представляет серьезную опасность для позвоночных из-за его структурного сходства с кальцием, которое обуславливает способность стронция замещать кальций в костной и других тканях (Шведов, 1997; Оноприенко, 2002).

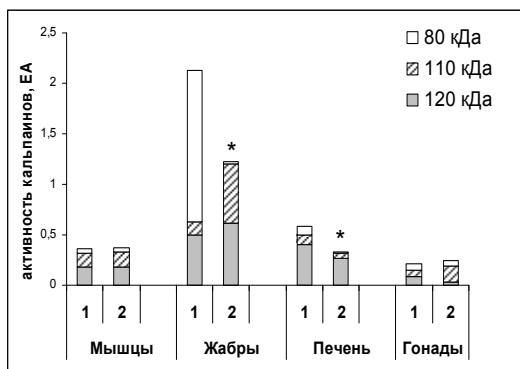


Рис. 7. Ca²⁺-зависимая протеолитическая активность (ЕА) в тканях самцов сига из оз. Ниж. Пиренга (1 - контроль) и оз. Ковдор (2 - опыт), * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.05$.

В жабрах и печени рыб из загрязненного стронцием озера Ковдор наблюдается снижение активности кальпаинов (рис. 7), что можно объяснить вытеснением кальция стронцием из Ca²⁺-связывающих белков, в том числе Ca²⁺-зависимых протеиназ. Наиболее высокие значения активности кальпаинов у рыб из чистого озера обнаружены в жабрах (рис. 7). Для жабр рыб из загрязненного озера характерно наиболее выраженное по сравнению с другими органами подавление

активности кальпаинов. Это может быть связано с барьерной функцией жабр, испытывающих активное первичное воздействие токсичных компонентов среды. Несмотря на подавление суммарной активности Ca²⁺-зависимых протеиназ в жабрах сига из оз. Ковдор, обращает на себя внимание увеличение активности формы кальпаина с молекулярной массой 110 кДа, активируемого нефизиологично высокой миллимолярной концентрацией Ca²⁺, что часто рассматривается как показатель развивающихся патологических перестроек в тканях, вызванных нарушением гомеостаза Ca²⁺ в клетке (Немова, 1996; Johnson, 1990). О нарушениях в метаболизме сигов из загрязненного стронцием озера Ковдор свидетельствуют изменения других биохимических параметров (Морозов и др., 2007; Нефедова и др., 2007).

Для объяснения механизма действия катиона Sr²⁺ (основного токсичного компонента водной среды оз. Ковдор) на кальпаины сига, исследовали активность частично очищенного препарата m-кальпаина в присутствии катионов различных металлов, в том числе Sr²⁺. Ca²⁺ наиболее эффективно активирует препарат m-кальпаина (его эффективность принята за 100%). В присутствии 2.5 мМ Sr²⁺ фермент также активируется (до 68% от уровня активности, индуцированной Ca²⁺). Ранее было показано, что Sr²⁺ способен активировать кальпаины, выделенные из тканей других организмов (Ojha et al., 1988; Ladrat et al., 2002; Gaitanaki et al., 2003). Сходная способность катионов Ca²⁺ и Sr²⁺ к активации кальпаинов объясняется их структурным родством, на основании которого они входят в одну группу химических элементов периодической системы. Известно, что повышенная способность Sr²⁺ к аккумуляции в организме обусловлена замещением Ca²⁺ в костной и других тканях (Шведов, 1997; Оноприенко, 2002). Следствием этого является нарушение обмена Ca²⁺ в организме и нарушение Ca²⁺-зависимых регуляторных процессов, что и определяет токсическое действие Sr²⁺.

4.4. Внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы рыб при минеральном загрязнении водоемов стоками горно-обогатительного комбината

Исследована активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ цитозоля у сегов и шук, обитающих в озере Костомукшское – хранилище инфильтрационных вод Костомукшского горнообогатительного комбината (т.н. «хвостохранилище»). Общая минерализация воды хвостохранилища достигает 645 мг/л, концентрация (в мг/л) ионов K^+ составляет 156, Na^+ – 18, Ca^{2+} – 38, Mg^{2+} – 18, Cl^- – 7, HCO_3^- – 122, общего азота – 15, общего фосфора – 0.007-0.012; pH – 7.4-7.5. Главный загрязняющий фактор вод хвостохранилища – высокая минерализация (до 645 мг/л), при этом особенно высоки концентрации ионов K^+ и HCO_3^- . Кроме того, для вод хвостохранилища характерно наличие мелкодисперсной механической взвеси, которая затрудняет дыхание и пищеварение рыб. В качестве контроля были использованы рыбы, выловленные в озере Каменное, характеризующимся высоким качеством воды: низкой минерализацией (9.5 мг/л), низким содержанием органических соединений (общий азот – 0.41 мг/л, общий фосфор – 0.005 мг/л); pH – 5.97-6.49 (Ильмаст, 2010).

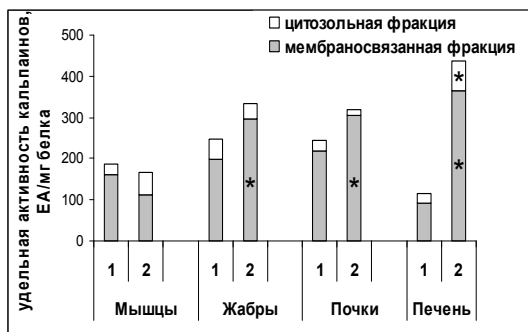


Рис. 8. Удельная активность кальпаинов (ЕА/мг белка) в тканях щуки *E. lucius* из оз. Каменное (1 - контроль) и хвостохранилища Костомукшского ГОКа (2 - опыт), * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.05$.

В жабрах, почках и печени щуки (рис. 8), а также в жабрах и печени сига, выловленных в загрязненной зоне, наблюдается более высокий уровень активности кальпаинов мембраносвязанной фракции, чем в контроле. В печени рыб, обитающих в хвостохранилище, также повышена активность кальпаинов цитозольной фракции.

Повышение активности кальпаинов в жабрах рыб, обитающих в хвостохранилище ГОКа, вероятно, объясняется неспецифическим раз-

дражающим действием минеральной взвеси на эпителий жабр. Эпителий жабр постоянно подвергается воздействию факторов окружающей среды, включая токсичные агенты, и является одним из основных путей проникновения ксенобиотиков в организм гидробионтов (Моисеенко, 2009). Вследствие повреждающего действия мелкодисперсной взвеси развивается дефицит дыхательной функции жабр, который негативно отражается на снабжении кислородом всего организма (Алабастр, Ллойд, 1984). По нашим данным, особенно высокой нагрузке в исследуемых условиях подвержена печень. Повышение активности кальпаинов в почках, основная функция которых заключается в обеспечении водно-солевого

обмена, может свидетельствовать о развитии адаптационных изменений метаболизма рыб в условиях минерального загрязнения.

Таким образом, результаты, полученные при изучении структурно-функциональных характеристик кальпаинов водных беспозвоночных и рыб в условиях антропогенного загрязнения, позволяют рекомендовать их в качестве дополнительного биохимического критерия для оценки состояния организмов, обитающих в загрязненных водоемах.

ВЫВОДЫ

1. Изученные свойства Ca^{2+} -зависимых протеиназ (чувствительность к Ca^{2+} , нейтральный pH оптимум и чувствительность к ингибиторам протеиназ цистеинового типа) исследованных видов беспозвоночных и рыб свидетельствуют о том, что эти ферменты относятся к цистеиновым протеиназам семейства кальпаинов C2. Их свойства оказались сходными с таковыми у кальпаинов млекопитающих, что указывает на определенную эволюционную консервативность белков данного семейства.

2. Кальпаины исследованных рыб отличаются от кальпаин-подобных протеиназ беспозвоночных особенностями структуры (наличием малой субъединицы) и свойств (меньшей потребностью в Ca^{2+} для активации, большей термостабильностью, нечувствительностью к ингибиторам протеиназ нецистеинового типа). Особенности выявленных характеристик кальпаинов рыб свидетельствуют об усложнении структуры и свойств ферментов и повышении возможностей более тонкой регуляции их активности.

3. Энзиматические свойства и уровень активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ цитозоля у исследованных беспозвоночных и рыб являются ткане- и видоспецифичными.

4. Уровень активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ у изученных беспозвоночных зависит от их филогенетического положения, у более примитивных организмов он выше.

5. Ca^{2+} -зависимые протеиназы участвуют в развитии ответной реакции у беспозвоночных и рыб при воздействии на них тяжелых металлов, компонентов нефти, отходов горно-обогатительного производства. Степень ответной реакции Ca^{2+} -зависимого протеолиза зависит от концентрации, времени воздействия и природы действующего вещества. Активность кальпаинов может изменяться не только на посттрансляционном уровне, но и на уровне экспрессии гена.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДСН – додецилсульфат натрия

ДЭАЭ-целлюлоза – диэтиламиноэтилцеллюлоза

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота

M_r – молекулярная масса

PMSF – фенилметилсульфонилфторид (от англ. phenylmethylsulfonyl fluoride)

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. Кальций-зависимые протеиназы некоторых беспозвоночных и рыб // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2010. – Т. 46. – № 6. – С. 489 – 494.
2. Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. Протеиназы семейства кальпаинов. Структура и функции // Онтогенез. – 2010. – Т. 41. – № 5. – С. 381 – 389.
3. Алтаева Э.Г., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Немова Н.Н., Шенкман Б.С. Базальный уровень кальция в волокнах камбаловидной мышцы крыс при гравитационной разгрузке. Механизмы его увеличения и роль в активации кальпаинов // Доклады академии наук. – 2010. – Т. 43. – № 1. – С. 138 – 143.

Публикации в других изданиях:

4. Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Токарева (Канцерова) Н.П. Внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы млекопитающих // Известия национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2008. – № 1. – С. 64 – 84.
5. Лысенко Л.А., Кяйвяряйнен Е.И., Немова Н.Н., Токарева (Канцерова) Н.П. Адаптивный и деструктивный потенциал внутриклеточных Ca^{2+} -активируемых протеиназ // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11 – 15 мая 2008.: тез. докл. – Новосибирск: Изд-во «Арта», 2008. – С. 154.
6. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Немова Н.Н. Роль внутриклеточных протеиназ в деструкции мышечной ткани // II съезд физиологов СНГ: 29 – 31 окт. 2008 г.: тез. докл. – Кишинев, 2008. – С. 174.
7. Канцерова Н.П., Лысенко Л.А., Кяйвяряйнен Е.И., Немова Н.Н. Роль внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ в развитии соленостных адаптаций // Научное наследие академика Л. А. Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний: всерос. конф., 19 – 20 ноября 2008.: тез. докл. – СПб.: ВВМ, 2008. – С. 63 – 64.
8. Kantserova N.P., Lysenko L.A., Nemova N.N. The effect of oil products on intracellular Ca^{2+} -dependent proteases in marine invertebrates // Arctic marine ecosystems in an era of rapid climate change: abstracts of the internat. scient. conf. «Arctic Frontiers», 18 – 23 January 2009. – P. 137.
9. Канцерова Н.П., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. Влияние тяжелых металлов на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы беспозвоночных // Актуальные проблемы биологии и экологии: XVI Всерос. молодежн. науч. конф., 6–10 апр. 2009 г.: мат. конф. – Сыктывкар, 2009. – С. 81 – 83.
10. Shenkman B.S., Kachaeva E.V., Altaeva E.G., Lysenko L.A., Kantserova N.P., Nemova N.N. Regulation of calpain activities and ubiquitin-ligase expression in rat soleus during hindlimb unloading // 14-th International Conference Biochemistry of Exercise, 2-4 June, 2009: book of abstracts. - Guelph, Canada. – 2009. – P. 74.
11. Shenkman B.S., Kachaeva E.V., Altaeva E.G., Lysenko L.A., Kantserova N.P., Nemova N.N. Signaling mechanisms, involved in the regulation of proteolysis in rat soleus during gravitational unloading // 17-th IAA Humans in Space Symposium, 7-11 June, 2009, book of abstracts. - Moscow, Russia. – 2009. – P. 118.
12. Канцерова Н.П., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. Влияние тяжелых металлов на кальций-зависимую протеолитическую активность в тканях беспозвоночных // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», 23-27 июня 2009 г. – Казань: Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН, 2009. – С. 373.

13. Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. Ca^{2+} -зависимые протеиназы. Структура, функции, эволюция // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», 23-27 июня 2009 г. – Казань: Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН, 2009. – С. 10.
14. Канцерова Н.П., Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Остапкова В.В. Влияние ионов тяжелых металлов на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы *Mytilus edulis* L. в экспериментах in vitro и in vivo // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: XXVIII междунар. конф., 5 – 8 окт. 2009 г.: мат. конф. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2009. – С. 257 – 261.
15. Алтаева Э.Г., Канцерова Н.П. Изменение базального уровня кальция в миоплазме камбаловидной мышцы крыс и эффекты кратковременной гравитационной разгрузки // IX Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная Дню космонавтики, 14 апреля 2010 г.: тез. докл. – Москва, 2010. – С. 14 – 15.
16. Kantserova N. P., Lysenko L. A., Nemova N. N. Effect of Waterborne Copper and Cadmium on Calcium-Dependent Proteases in Blue Mussel, *Mytilus edulis* L. // Balwois – 2010. Conference on water observation and information system for decision support: abstracts of the internat. scient. conf., 25 – 29 May 2010. – P. 700.
17. Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. Структура и функции кальций-зависимых протеиназ // XV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, 14–18 июня 2010 г.: тез. докл. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2010. – С. 48.
18. Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. Внутриклеточные кальций-зависимые протеолитические ферменты некоторых беспозвоночных и рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: III межд. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов, 22–26 июня 2010 г.: мат. конф. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2010. – С. 73 – 74.
19. Канцерова Н.П., Лысенко Л.А. Влияние нефтепродуктов на кальций-зависимую протеолитическую активность в тканях мидий *Mytilus edulis* L. // Приложение к журналу Весці НАН Беларусі. Сер. біялагічных навук. – 2010. – С. 132 – 135.
20. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Кяйвярйянен Е.И., Немова Н.Н., Кашулин Н.А. Влияние Sr^{2+} на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Том 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей – Петрозаводск.: Карельский научный центр РАН, 2010. – С. 127 – 136.
21. Канцерова Н.П., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. Особенности структуры и свойств внутриклеточных кальцийактивируемых протеиназ у беспозвоночных животных // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Том 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей – Петрозаводск.: Карельский научный центр РАН, 2010. – С. 68 – 73.
22. Lysenko L.A., Kantserova N.P., Nemova N.N. Water organisms as a source of proteases and its inhibitors. Calcium-dependent proteases (calpains) // Current problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Volume II. Arctic and Sub-Arctic biological resources – potential for biotechnology: Collected scientific papers of the first International seminar and PhD workshop (6-9 September 2010, Petrozavodsk, Russia). – Petrozavodsk: Karelian Research Centre RAS, 2010. – P. 57 – 60.
23. Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Канцерова Н.П. Протеолитическая регуляция биологических процессов // Петрозаводск, КНЦ РАН. – 2010. – 312 с.

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$ Бумага офсетная. Гарнитура «Times».
Уч.-изд. л. 1,2. Усл. печ. л. 1,3. Подписано в печать 16.02.11.
Тираж 100 экз. Изд. № 177. Заказ № 935.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50