

УДК 577.2

**Жуковская А.Ф., Бельчева Н.Н., Челомин В.П.**

Тихоокеанский Океанологический Институт им. В. И. Ильичева  
Дальневосточного отделения РАН (Владивосток)

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЧАСТИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КАДМИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

**A. Zhukovskaya, N. Belcheva, V. Chelomin**

*V.I.Ilichev Pacific Oceanological Institute of the Far Eastern Branch of RAS (Vladivostok)*

### INVOLVMENT OF HIGH MOLECULAR WEIGHT Cd -BINDING PROTEINS IN Cd-ACCUMULATION IN THE SCALLOP *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

**Аннотация.** Многое уже известно о кадмий-связывающих лигандах в других видах семейства Pectinidae, однако ничего не известно о дальневосточном представителе этого семейства – приморском гребешке *Mizuhopecten yessoensis*. В работе были исследованы кадмий-связывающие лиганды в пищеварительной железе *M. yessoensis*. В данной работе впервые обнаружены в клетках пищеварительной железы *Mizuhopecten yessoensis* термостабильные, устойчивые к органическим растворителям высокомолекулярные кадмий-связывающие лиганды. Уникальными особенностями Cd-связывающих белков данного вида является не только вес (72 кДа и 43 кДа), но также и спектроскопические характеристики ( $\lambda 254/\lambda 280 \text{ нм} > 2$ ); 10 SH - групп на два белка. Результаты исследований накопления кадмия в пищеварительной железе приморского гребешка и исследование распределения кадмия среди цитоплазматических белков в особях из мест с разной степенью антропогенного вмешательства свидетельствуют о хорошо развитых механизмах адаптации у *Mizuhopecten yessoensis* к кадмию.

**Ключевые слова:** кадмий-связывающие белки, MT-подобные белки, тяжелые металлы, приморский гребешок, адаптация.

**Abstract.** Mollusks have long been known to naturally accumulate metals to high concentrations, particularly in the digestive gland. Among them scallops have able to accumulate toxic Cd to concentrations far exceeding those in the surrounding seawater. We have studied the cadmium-binding ligands in the digestive gland of *M. yessoensis*. The results have revealed two high molecular weight proteins with a 72 and 43 kDa in *M. yessoensis* with specific spectroscopic relation ( $\lambda 254/\lambda 280 \text{ nm} > 2$ ) and 10 SH-groups for both proteins. The results of the study of cadmium accumulation in the digestive gland of the scallop and the distribution of cadmium among cytoplasmic proteins in the *M. yessoensis* from locations with varying degrees of anthropogenic impact showed a well-developed mechanism of adaptation in *M. yessoensis* to highly toxic cadmium.

**Key words:** Cd-binding proteins, MT-like proteins, heavy metals, scallop, Bivalvia, biochemical adaptation.

Проблема загрязнения морей тяжелыми металлами (Cd, Hg, Cu и др) существует всего несколько десятилетий, и на сегодняшний день много еще не известно о механизмах детоксикации и функционирования системы адаптации морских беспозвоночных к тяжелым металлам. В настоящее время распространена точка зрения, что центральным звеном в биохимической системе детоксикации потенциально токсичных металлов являются металлсвязывающие белки металлотioneины (MT). Эти представления базируются на уникальных свойствах и

повсеместном распространении этих белков, которые обнаружены в представителях практически всех основных филогенетических групп от простейших до позвоночных [8, 913; 11, 25; 16, 153; 19, 81].

Среди морских беспозвоночных двустворчатые моллюски являются наиболее интересными представителями, так как являются гетерогенной группой по содержанию разного типа металлсвязывающих белков и чувствительной группой организмов к повышенным содержаниям тяжелых металлов в окружающей среде. Среди *Bivalvia* именно у представителей сем. *Pectinidae* были обнаружены чрезвычайно высокие концентрации кадмия в почках и пищеварительной железе даже в видах, обитающих в акваториях с низким содержанием кадмия в морской воде [21, 216: 4, 1355]. Этот факт говорит о том, что представители сем. *Pectinidae* хорошо развили биохимические механизмы адаптации к повышенным содержаниям токсичного кадмия в среде. Среди дальневосточных представителей сем. *Pectinidae* наиболее интересным видом является приморский гребешок (*Mizuhopecten yessoensis*), который способен накапливать высокие концентрации высокотоксичного кадмия в мягких тканях. Однако на сегодняшний день ничего не известно о кадмий-связывающих белках в тканях этого вида двустворчатого моллюска. Поэтому целью данного исследования являлось идентификация и частично характеристика биохимических механизмов адаптации приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* к высокотоксичному кадмию.

**Материал и методы.** Приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* (возраст 3 и 5 лет) был отобран из акваторий с разной степенью нагрузки кадмием: из загрязненной акватории Амурского залива (Японское море) г. Владивостока вблизи нефтебазы (район 1-я речка) и из экологически чистой акватории залива Посьета Японского моря. Пищеварительную железу приморского гребешка извлекали для дальнейшего проведения биохимических исследований. Водорастворимые цитоплазматические белки разделяли с

помощью гель-хроматографии на Superosa 12 с соблюдением условий и рекомендаций, разработанных для морских организмов [18, 263]. Выход фракций регистрировали при  $\lambda$  254 нм и  $\lambda$  280 нм. В процессе хроматографии элюат отбирали для определения металлов (Cd, Zn и Cu). Содержание металлов определяли так же на всех стадиях фракционирования и очистки белков методом [10, 9; 1]. Для определения концентрации белка использовали метод Лоури [13, 265]. SDS-PAAGE электрофорез проводили согласно методу Лэммли [12, 680]. Концентрация акриламида в разделяющем геле в зависимости от эксперимента варьировала от 9 до 12%. Визуализацию белков проводили методом окрашивания красителями Кумасси G-250 и хлористым серебром.

**Результаты.** Получено, что 70 % всего аккумулярованного пищеварительной железой кадмия содержится в цитоплазматической фракции (фракция А), при этом на долю этой же фракции приходится более 90 % всего белка. Результаты анализа содержания кадмия среди цитоплазматических белков показали, что основная часть этого металла находится в белках с молекулярной массой в области 70 кДа, и только малая часть кадмия – в области низкомолекулярных белков (рис. 1). Интересно, что после многоэтапного фракционирования (температурное осаждение, осаждение органическим растворителем), доля кадмия во фракции D (фракция, полученная после 80 % ацетонного осаждения) составляет более 50 %, а доля белка составляет от 15 до 20 % от всего белка, находящегося в цитоплазме клетки. Получено также, что на 1 мг белка приходится от 7 до 10 мкг кадмия.

На долю фракции В (15 мин при  $t$  70 °С), содержащей термостабильные белки приходится от 70 до 80 % всего цитоплазматического кадмия, что свидетельствует о том, что основной кадмий-связывающий белок является термостабильным. Осаждение органическим растворителем (50% и 80% содержание ацетона – фракция С и фракция D) показало, что кадмий находится в белках,

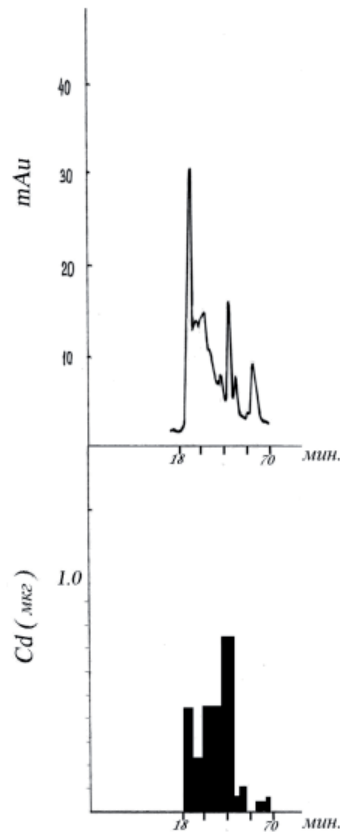


Рис. 1. Распределение кадмия в цитоплазматических белках пищеварительной железы *M. yessoensis* (FPLC, Superosa 12).

осаждаемых в присутствии ацетона с концентрацией от 50 до 80 %. Фракцию D, ресуспендированную в 0,02 М Tris-HCl буфере pH 8,5, разделили методом высоко скоростной проточной жидкостной хроматографии FPLC на колонке Superosa 12. Получено два кадмий-содержащих пика (рис.2), соответствующих высокомолекулярным белкам. При этом, основная часть кадмия локализуется в первом и втором элюированном пике (пик 1 и пик 2) у гребешков из экологически чистой акватории, тогда как у животных из импактного района кадмий локализуется в пике 1 (табл. 1). Согласно полученным результатам, белок, соответствующий пику 1, является основным кадмий-связывающим белком.

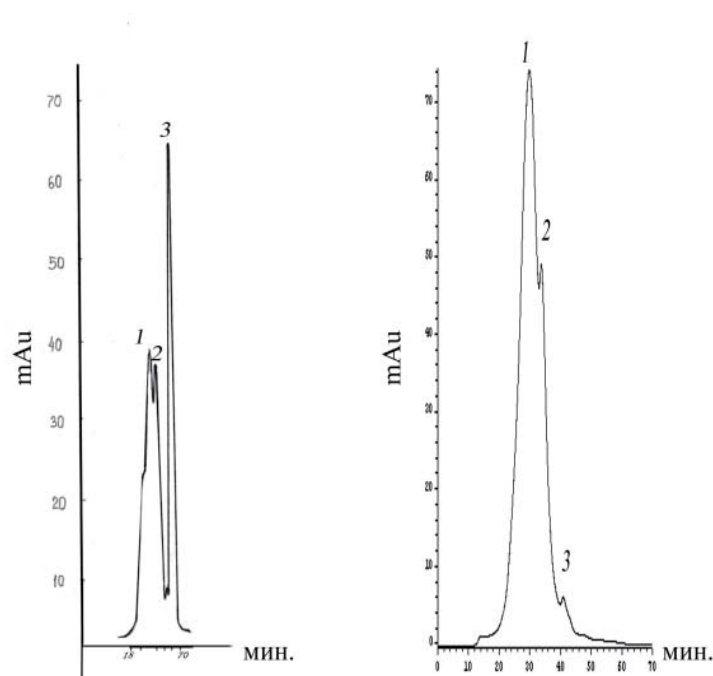
Анализ содержания микроэлементов показал, что кроме токсичного кадмия в полу-

ченных белках содержатся и такие физиологически важные металлы, как Cu и Zn. Соотношение Cd:Zn:Cu в пике 1 и пике 2, а следовательно, можно предполагать, и в кадмий-связывающих белках, составляет 2:3,5:1 и 2,7:3,2:1, соответственно, для гребешков из зал. Посьет. Для гребешков из района нефтебазы это же соотношение в пике 1 составляет 34:2:1, а в пике 2 соотношение Cd:Zn:Cu составляет 5:3,5:1. Соотношение адсорбции в кадмий-содержащих белках при  $\lambda$  254 и  $\lambda$  280 нм составляет около 2, что существенно ниже, чем это же соотношение для МТ. При разделении Cd- связывающего белка методом SDS-электрофореза в ПААГЕ было получено две полосы, которые соответствуют полипептидам с массой 72 и 43 кДа (рис. 3).

Таблица 1

**Сравнение распределения кадмия (мкг) в фракциях 80% ацетонного осадка элюированных FPLC между приморском гребешке из экологически чистой и импактной акваторий**

НАЗВАНИЕ ПРОБЫ	Cd, мкг		Zn, мкг		Cu, мкг	
	Посьет	1-я речка	Посьет	1-я речка	Посьет	1-я речка
Пик 1	0,11	3,4	0,18	0,2	0,05	0,1
Пик 2	0,11	0,32	0,13	0,03	0,04	0,03
Пик 3	0,01	0,1	-	0,07	-	0,02



залив Посьета

район 1-я речка

Рис. 2. Хроматографический профиль (FPLC, Superosa 12,  $\lambda$  280 нм) ресуспендированного ацетонного осадка пищеварительной железы приморского гребешка из акваторий с различным содержанием кадмия в среде (экологически чистый район и импактная акватория).

**Обсуждение.** В данной работе впервые проведено исследование по изучению кадмий-связывающих лигандов в приморском гребешке *M. yessoensis*. Представленные результаты демонстрируют, что *M. yessoensis* способен концентрировать в некоторых тканях токсичный кадмий до уровней, превышающих концентрации этого металла в окружающей среде. Такая уникальная способность приморского гребешка, как и других видов *Pectinidae*, свидетельствует о хорошо развитых механизмах адаптации представителей этого семейства к высокотоксичному кадмию.

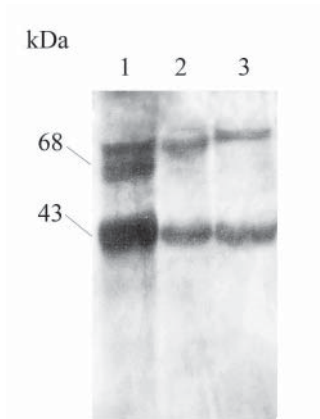


Рис. 3. Молекулярная масса Cd-связывающих белков *Mizuhopecten yessoensis*. 1-стандарты, 2- проба 10 мкл (пик № 1 и пик № 2), 3- проба 20 мкл (пик № 1 и пик № 2). Окраска Кумасси.

В многочисленных исследованиях на представителях разных семейств двустворчатых моллюсков получено, что помимо пищеварительной железы в аккумуляции тяжелых металлов могут участвовать такие органы, как жабры, мантия и др. [3, 726; 15, 153]. У представителей сем. Pectinidae кадмий накапливается главным образом в пищеварительной железе, вне зависимости от источника поступления кадмия (морская вода, грунт или еда). Так, в эксперименте по изучению путей поступления кадмия на двух видах гребешков [14, 58]: королевского гребешка *Chlamys varia* и королевского гребешка *Pecten maximus*, получено, что пищеварительная железа является основным органом, аккумулирующим кадмий. В приморском гребешке *Mizuhopecten yessoensis* жабры и мантия принимают минимальное участие в накоплении кадмия по сравнению с пищеварительной железой и почками [2].

Наши исследования показали, что кадмий в пищеварительной железе приморского гребешка *M. yessoensis* аккумулируется в цитоплазматической фракции (около 80 % кадмия) и связан с белками: проявляющими устойчивость к температуре (70 °С 15 мин.) и способными растворяться в органическом растворителе с 50 % концентрацией. У гребешка *P. maximus* также около 80 % кадмия приходится на водорастворимую фракцию

клеток пищеварительной железы, тогда как в этой же работе авторами [14, 58] обнаружено, что у королевского гребешка *C. varia* только 40 % кадмия приходится на цитоплазматическую фракцию.

Свойства термостабильности и устойчивости к органическим растворителям характерны для белков, которым принадлежит ведущая роль в связывании высокотоксичных металлов, в том числе и кадмия – металлотионеинов (МТ) и МТ-подобным белкам, найденным во многих представителях морских беспозвоночных [5, 185; 7, 739; 9, 425].

Распределение кадмия среди термостабильных цитоплазматических белков в приморском гребешке *M. yessoensis* показывает, что кадмий связывается с высокомолекулярными белками (72 и 43 кДа). В импактной группе *M. yessoensis* кадмий связывается с белком с молекулярной массой 72 кДа.

Что касается распределения цинка и меди в пищеварительной железе приморского гребешка, то из полученных нами результатов можно утверждать, что, по крайней мере, на распределение Cd, Zn и Cu в белке с молекулярной массой 43 кДа повышенное содержание кадмия в окружающей среде значительно не влияют. Основная роль в связывании кадмия принадлежит белку с молекулярной массой 72 кДа.

В ходе исследования получено, что осо-



бенностями Cd-связывающих белков данного вида приморского гребешка (*Mizuhopecten yessoensis*) являются: молекулярная масса (72 кДа и 43 кДа); спектроскопические характеристики, такие, как разница в два раза при  $\lambda$  254 нм и  $\lambda$  280 нм; и только 10 SH - групп на два белка обнаруженных кадмий-связывающих белка.

Похожие исследования на североатлантическом представителе семейства Pectinidae *Adamussium colbecki* [17, 147] обнаружили в пищеварительной железе данного вида кадмий-связывающий низкомолекулярный белок (10 кДа).

Стоун с соавторами [20, 189] идентифицировали и исследовали некоторые физико-химические свойства кадмий-связывающих компонентов в пищеварительной железе гребешка *Pecten maximus*. Авторам удалось обнаружить, что кадмий в пищеварительной железе *P. maximus* распределяется между тремя цитоплазматическими компонентами - 150 кДа, 55 кДа и 10 кДа. Фракция с молекулярным весом более чем 150 кДа содержит, по крайней мере, три компонента и связывает менее чем 5 % от всего кадмия. Компонент с молекулярным весом 10 кДа также является белком, связывающим кадмий, и охарактеризован Стоуном с коллегами как МТ-подобный белок.

В современных представлениях о стратегии адаптации организма к тяжелым металлам общепринято считать, что ведущая роль в детоксикации, например, кадмия принадлежит МТ. Далингер [6, 331], однако, считает, что такое представление о роли МТ верно только для беспозвоночных, тогда как у позвоночных основная роль МТ – связывание жизненно важных элементов, таких, как цинк и медь. Стратегии детоксикации среди огромного видового разнообразия типа Mollusca в целом схожи как на тканевом, так и на молекулярном уровне организации. Зачастую в морских моллюсках, обитающих в сублиторальной зоне, и вне зависимости от того, являются ли они концентраторами тяжелых металлов или нет, экзогенные металлы аккумулируются в одном или нескольких

органах, которые, как правило, являются органами пищеварительной системы: или же это почки, или жабры. На молекулярном уровне стратегии адаптации к тяжелым металлам у двустворчатых моллюсков представлены синтезом металлсвязывающих белков – металлотионеинов. За счет некоторых особенностей в аминокислотном составе эти белки называют металлотионеинами моллюсков. Однако, несмотря на то, что в нашем исследовании в пищеварительной железе приморского гребешка не найдено металлотионеинов, это не означает, что в исследуемом моллюске отсутствуют механизмы устойчивости к повышенному содержанию токсичного кадмия в среде. Более того, получено, что именно за счет обнаруженных новых МТ-подобных Cd-связывающих белков пищеварительной железы *M. yessoensis* способен аккумулировать кадмий в значительных количествах. Однако для того, чтобы понять функцию кадмий-связывающих белков, необходимо понять механизм связывания не только кадмия, но и цинка, и меди, и их взаимосвязь в кинетике связывания, и приоритетность в сорбции белков к этим металлам, и ответить на многие другие вопросы, касающиеся биологической и физиологической роли обнаруженных белков. Кроме того, мы полагаем, что исследования механизмов аккумуляции и детоксикации кадмия в приморском гребешке *M. yessoensis* позволит ответить не только на такие фундаментальные вопросы, как, каким же путем шла эволюция биохимической системы адаптации к тяжелым металлам у двустворчатых моллюсков и всего типа Mollusca, в целом, но также использовать полученные результаты об особенностях аккумуляции и детоксикации тяжелых металлов в приморском гребешке *M. yessoensis* в экотоксикологических исследованиях. Это позволит выполнять не только мониторинг состояния морской среды, но и сделать комплексные эколого-биохимические оценки состояния биоты в ответ на изменяющиеся условия среды.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Никаноров А.М., Жулидов А.В., Покаржевский А.Д. Биомониторинг тяжелых металлов в пресных экосистемах. Л.: Гидрометеиздат, 1985.
2. Челомин В.П. Экотоксикологические аспекты биоаккумуляции кадмия (на примере морских двустворчатых моллюсков). Автореф. дис. ... док. биол. наук. Владивосток: ТОЙ ДВО РАН. 1998.
3. Bebiano M., Serafim M. and Rita M. Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussata* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1994. V. 53.
4. Bustamante P., Miramand P. Interspecific and geographical variations of trace element concentrations in Pectinidae from European waters // Chemosphere. 2004. V. 57.
5. Dallinger R., Berger B., Gruber C., Styrzenbaum S. Metallothioneins in Terrestrial Invertebrates: Structural Aspects, Biological Significance, and Implications for their Use as Biomarkers // Cell. Mol. Biology. 2000. V. 46(2).
6. Dallinger R., Berger B., Hunziker P.E., Birchler N., Hauer C.R. and Jeremias H.R. Kagi. Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A // Eur. J. Biochem. 1993. V. 216.
7. Giguere A., Coulliard Y., Campbell P. G.C., et al. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient // Aquatic Toxicology. 2003. V. 64.
8. Hamer D.H. Metallothionein // Ann. Rev. Biochem. 1986. V. 55.
9. Jin-Sung Park, Soohee Chung, Il-Seon Park, Yangsun Kim, Chul-Hwan Koh, In-Sook Lee. Purification and characterization of metallothionein-like cadmium-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula* // Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 2002. V. 131.
10. Julshamn K., Andersen K.-J. Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed mollusks in western Norway-I. The distribution and binding of cadmium, zinc and copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis* // Comp. Biochem. Physiol. 1983. V. 75A.
11. Kagi J.H.R., Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein. Metallothionein II. Eds. by Kagi J.H.R., Kojima Y., Basel: Birkhauser Verlag. 1987.
12. Laemly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. 1970. № 5259.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. 1951. V. 193.
14. Metian Marc, Warnau Michel, Bustamante Paco, et. al. Interspecific comparisons of Cd bioaccumulation in European Pectinidae (*Chlamys varia* and *Pecten maximus*) // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2007. V. 353.
15. Nolan C.V., Duke E.J. Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis*: involvement of metallothioneins and heavy-molecular weight protein // Aquat. Toxicol. 1983. V. 4.
16. Petering D.H., Fowler B.A. Discussion summary. Role of metallothionein and related proteins in metal metabolism and toxicity: problems and perspectives // Environ. Health Perspect. 1986. V. 65.
17. Ponzano E., Dondero E., Bouquegneau J.-M., Sack R., Hunziker P., Viarengo A. Purification and biochemical characterization of cadmium metallothionein from the digestive gland of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith, 1902) // Polar Biology. 2001. V. 24.
18. Roesijadi G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals (Review) // Aquat. Toxicol. 1992. V. 22.
19. Roesijadi G., Fowler B. A. Purification of invertebrate metallothioneins // Methods in Enzymology. - 1991. V. 205.
20. Stone H.C., Wilson S.B., Overnell J. Cd-binding proteins in the scallop *Pecten maximus* // Environ. Health Perspect. 1986. V. 65.
21. Viarengo A., Canesi L., Massu-Cotelli A., Ponzano E., Orunesu M. Cu, Zn, Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith 1902): role of metallothionein in the homeostasis and in the detoxification of heavy metals // Mar. Env. Res. - 1993. - V. 35. - P. 216-217.