

# Inhibitory proteinaz serynowych plazmy nasienia ryb

MARIOLA WOJTCZAK, JOANNA NYNCA, ANDRZEJ CIERESZKO

Zakład Biologii Nasienia Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Wojtczak M., Nynca J., Ciereszko A.

## Serine proteinase inhibitors of fish seminal plasma

### Summary

The seminal plasma of teleost fish contains a species-specific system of proteins with anti-trypsin activity. Serine proteinase inhibitors are one of the main proteins of fish seminal plasma and their electrophoretic pattern is similar to blood plasma. Anti-trypsin activity correlates with protein and sperm concentration. To date one of the proteinase inhibitors of seminal plasma of common carp and rainbow trout has been identified. It belongs to the serpin family and is similar to  $\alpha_1$ -antitrypsin. A characteristic feature of this inhibitor is the ability to form an irreversible complex with serine proteinases. Serine proteinase inhibitors of fish seminal plasma may participate in the protection of reproductive tissue and spermatozoa from proteolytic attack.

**Keywords:** fish seminal plasma, serine proteinase inhibitors, serpin

W utrzymaniu homeostazy organizmu bardzo istotną rolę odgrywa regulacja i kontrola aktywności enzymów proteolitycznych. Proteoliza jest częścią wielu procesów fizjologicznych, np.: transkrypcji, cykli komórkowych, apoptozy, produkcji hormonów, fibrynolizy, krzepnięcia krwi, aktywacji dopełniacza, migracji czy różnicowania komórek. Proteoliza musi być zatem precyzyjnie regulowana. Białkowe inhibitory enzymów proteolitycznych, obecne w osoczu krwi i innych płynach ustrojowych oraz wewnątrz komórek, zapewniają stałą ochronę przed niekontrolowanym wzrostem aktywności proteolitycznej. Inhibitory proteinaz stanowią około 10% białek osocza krwi. Są trzecią co do wielkości, po albuminach i immunoglobulinach, grupą białek osocza krwi. Zaburzenia równowagi proteinaza–inhibitor prowadzą do rozregulowania szlaków biochemicznych i fizjologicznych. Niekontrolowana aktywność proteinaz wywołuje uszkodzenia tkanek i w konsekwencji prowadzi do stanów patologicznych.

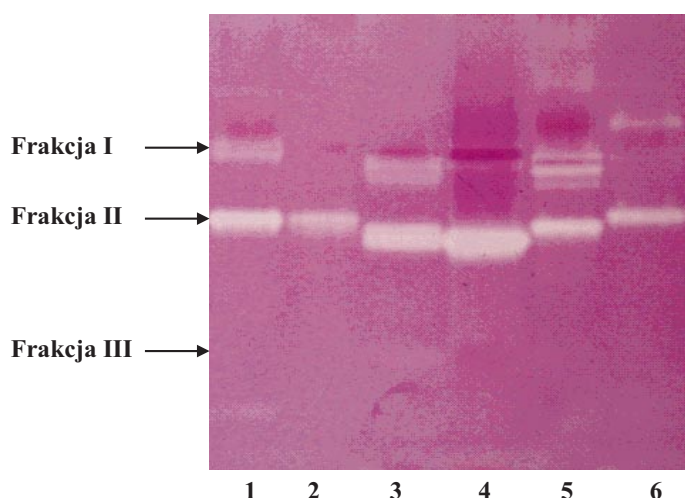
Do najliczniejszej i najlepiej scharakteryzowanej klasy specyficznych inhibitorów proteinaz należą inhibitory proteinaz serynowych. Wykazują one zdolność hamowania proteinaz serynowych (np. trypsyny, chymotrypsyny), które w miejscu reaktywnym zawierają serynę. W obrębie inhibitorów proteinaz serynowych wyróżnia się kilka rodzin, różniących się między sobą strukturą, masą cząsteczkową oraz mechanizmem reakcji. Najważniejsze z nich to rodziny: Kunitz, Kazal, Bowman-Birk, inter- $\alpha$ -inhibitory oraz serpiny (16). Inhibitory te biorą udział w trawieniu, fibrynolizie, apoptozie, aktywacji dopełniacza, koagulacji krwi, angiogenezie, funkcjonowaniu centralnego układu ner-

wowego oraz modulowaniu odpowiedzi immunologicznej (2, 9, 11, 15).

Plazma nasienia posiada zdolność hamowania proteinaz serynowych, w tym trypsyny (18). Aktywność antytrypsynową plazmy nasienia ssaków wiąże się głównie z hamowaniem akrosyny (trypsyno-podobnej proteinazy akrosomu plemników) lub innych proteinaz akrosomu. W plemnikach większości ryb doskonałości nie występuje akrosom, a co się z tym wiąże – również akrosyna. Tym niemniej w plazmie nasienia ryb stwierdzono występowanie wysokich poziomów aktywności antytrypsynowej.

Aktywność antytrypsynową (AT) w plazmie nasienia ryb wykryto po raz pierwszy w 1994 roku (7). Wykazano, że plazma nasienia pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), siei amerykańskiej (*Coregonus clupeaformis*) oraz okonia żółtego (*Perca flavescens*) posiada zdolność hamowania trypsyny wołowej i dorszowej. Następne prace dotyczące analizy porównawczej aktywności antytrypsynowej kolejnych gatunków ryb: pstrąga potokowego (*Salmo trutta m. fario*), źródlanego (*Salvelinus fontinalis*), siei (*Coregonus lavaretus*), głowaci (*Hucho hucho*), szczupaka (*Esox lucius*), leszcza (*Abramis brama*), miętusa (*Lota lota*), karpia (*Cyprinus carpio*), karasia (*Carasius auratus*), klenia (*Leuciscus cephalus*), jelca (*Leuciscus idus*) oraz bolenia (*Aspius aspius*) potwierdziły uniwersalne występowanie aktywności AT w plazmie nasienia ryb doskonałości oraz gatunkowe uwarunkowanie ich zmienności (5).

Aktywność inhibitorów proteinaz serynowych związana jest z cechami jakościowymi nasienia oraz odzwierciedla sezonowe zmiany jego składu. Aktywność

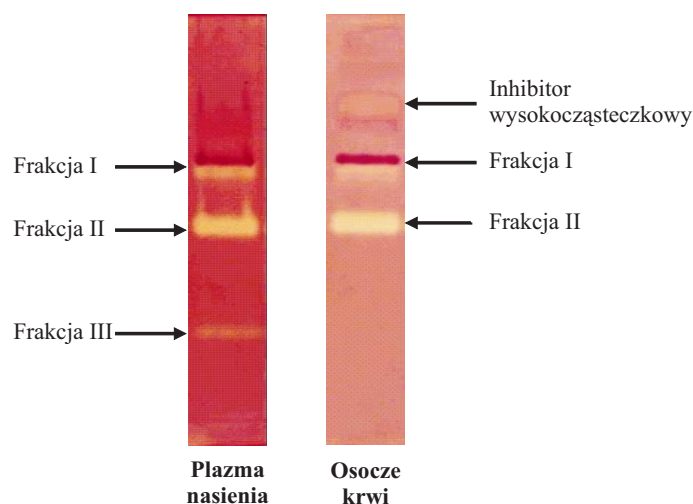


Ryc. 1. Profile elektroforetyczne aktywności antytrypsynowej (jasne pasma) w plazmie nasienia wybranych gatunków ryb karpioatych. 1 – leszcz, 2 – lin, 3 – karp, 4 – płoć, 5 – jaź, 6 – kleń

antytrypsynowa plazmy nasienia ryb koreluje ze stężeniem białka i koncentracją plemników (3). Poziom aktywności AT zależy od okresu sezonu rozrodczego (3, 5). Wykazano, że pod koniec sezonu rozrodczego pstrąga tęczowego oraz siei następuje obniżenie aktywności antytrypsynowej w plazmie nasienia równoległe do spadku stężenia białka (24).

Stwierdzono istnienie odmiennych, specyficznych dla rodziny profili aktywności AT w plazmie nasienia ryb karpioatych i łososiowatych. Plazma nasienia ryb karpioatych charakteryzuje się występowaniem wspólnego modelu profilu aktywności AT (23). Typowy profil inhibitorów ryb karpioatych składa się z trzech frakcji (I-III) o aktywności antytrypsynowej (ryc. 1). Frakcja I (o wolnym tempie migracji) charakteryzuje się zróżnicowanym, zależnym od gatunku tempem migracji elektroforetycznej. W przeciwieństwie do tej frakcji, różnice w tempie migracji elektroforetycznej inhibitorów frakcji II (o pośrednim tempie migracji) są mniejsze. Podobnie jak dla ryb karpioatych, w plazmie nasienia ryb łososiowatych wykazano istnienie wspólnego profilu aktywności AT. Typowy profil aktywności AT składa się z dwóch pasm (frakcja I i III) o wolnym tempie migracji, pasma (frakcja II) o pośrednim tempie migracji oraz pasma o szybkim tempie migracji (4). Specyficzność gatunkowa wyraża się w różnicy tempa migracji poszczególnych pasm aktywności AT.

Inhibitory proteinaz serynowych plazmy nasienia ryb wykazują podobieństwo obrazu elektroforetycznego oraz chromatograficznego w porównaniu z inhibitorami osocza krwi (4, 23). Zarówno w plazmie nasienia, jak również w osoczu krwi karpia wykazano obecność inhibitorów frakcji I i II (ryc. 2). Występowanie związku pomiędzy białkami krwi i plazmy nasienia pstrąga tęczowego zostało opisane przez Loir i wsp. (13). Badacze ci udowodnili, że wiele białek obecnych



Ryc. 2. Profile elektroforetyczne aktywności antytrypsynowej plazmy nasienia i osocza krwi karpia. Frakcje I i II – wspólne dla plazmy nasienia i osocza krwi, frakcja III – specyficzna dla plazmy nasienia, inhibitor wysokocząsteczkowy – specyficzny dla osocza krwi

w plazmie nasienia wykazuje takie same właściwości antygenowe, jak białka osocza krwi. Także Mak i wsp. (14) oraz Wojtczak i wsp. (21) wykazali podobieństwo pomiędzy  $\alpha_1$ -antyproteinazą plazmy nasienia i osocza krwi zarówno pstrąga tęczowego, jak i karpia. Na podstawie tych wyników można sugerować, że inhibitory frakcji I i II występujące w plazmie nasienia i osoczu krwi ryb, mogą być transportowane z krwi do nasienia. Możliwe jest także, że białka te mogą być częściowo syntetyzowane w układzie rozrodczym oraz częściowo transportowane z krwi. Skinner i wsp. (17) wykazali, że białka wchodzące w skład plazmy nasienia mogą pochodzić z dwóch źródeł. Autorzy ocenili, że 10-20% transferyny w płynie sieci jąder u tryka pochodzi z krwi, a pozostałe 80-90% jest syntetyzowane w jądrach przez komórki Sertoliego. Podobne zależności stwierdzono także dla transferyny plazmy nasienia karpia (22). Wyjaśnienie pochodzenia białek plazmy nasienia ryb wymaga dalszych badań.

Inhibitory frakcji I i II obecne są także w śluzie karpia (12). Przypuszczalnie, podobnie jak w przypadku plazmy nasienia, inhibitory te pochodzą z krwi. Hjelmeland (10) wykazał, że inhibitory proteinaz wyizolowane ze śluzu i surowicy krwi dorsza posiadają identyczną ruchliwość elektroforetyczną, punkt izoelektryczny, skład aminokwasowy i masę cząsteczkową. Inhibitory proteinaz obecne w śluzie posiadają zdolność hamowania wzrostu chorobotwórczych wirusów i bakterii (1, 25), najprawdopodobniej poprzez inaktywację proteinaz drobnoustrojów. Analogicznie można założyć, że podobne właściwości mogą mieć inhibitory frakcji I i II obecne w śluzie karpia.

Niezależnie od wspomnianych podobieństw inhibitorów proteinaz serynowych w płynach ustrojowych i wydzielinach zwierząt istnieją także specyficzne inhibitory. Nasze badania (12) doprowadziły do identyfikacji unikalnych inhibitorów osocza i plazmy nasie-

nia karpia (ryc. 2). W osoczu krwi występuje dodatkowo inhibitor o wolnym tempie migracji (wysokocząsteczkowy inhibitor), zaś w plazmie nasienia unikalny inhibitor o szybkim tempie migracji (niskocząsteczkowy inhibitor, frakcja III). Uzyskane informacje umożliwiają określenie związków pomiędzy inhibitorami nasienia, krwi i śluzu oraz wykorzystanie inhibitorów proteinaz serynowych do oceny stopnia zanieczyszczenia nasienia przez śluz i krew.

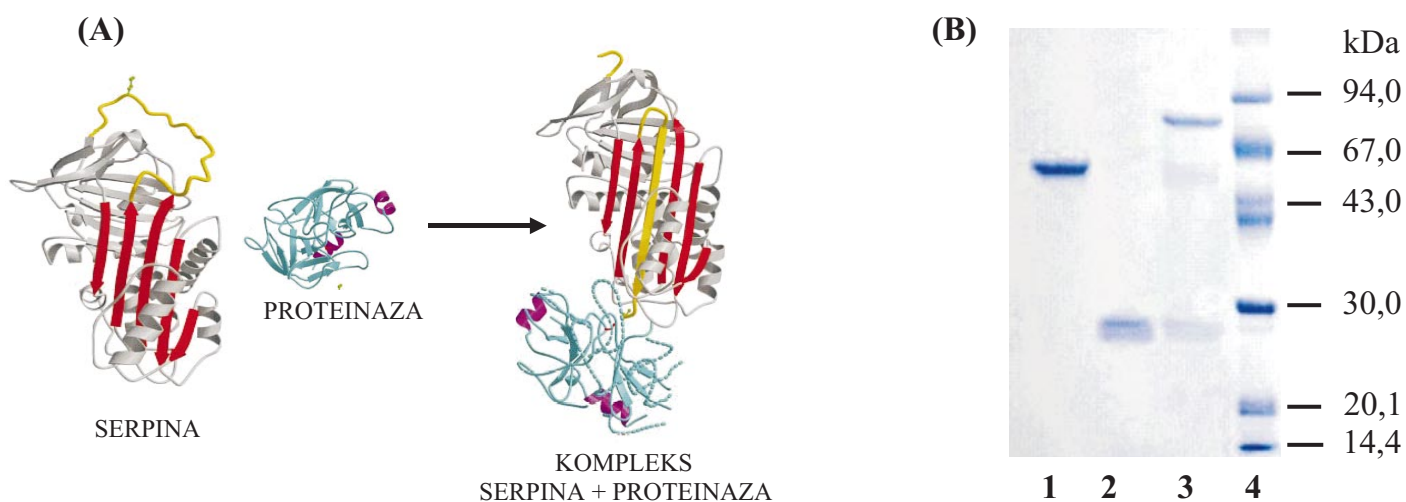
Prace izolacyjne doprowadziły do pogłębionej charakterystyki inhibitorów frakcji II plazmy nasienia pstrąga tęczowego i karpia. Masa cząsteczkowa (55-56 kDa) tych inhibitorów, ich glikoproteinowa budowa oraz zawartość reszty cukrowej (11-12%) zawierają się w zakresie charakterystycznym dla serpin (serine proteinase inhibitor), co pośrednio wskazuje na ich przynależność do tej rodziny. Otrzymane sekwencje aminokwasowe, a także wykazanie zdolności do tworzenia trwałych kompleksów inhibitorów frakcji II z proteinazami serynowymi ostatecznie potwierdziło ich przynależność do rodziny serpin typu  $\alpha_1$ -antytrypsyny (14, 21). Ponadto uzyskano sekwencję cDNA inhibitora frakcji II plazmy nasienia pstrąga tęczowego. Analiza tej sekwencji wykazała obecność domeny konserwatywnej dla serpin oraz wysoką homologię do  $\alpha_1$ -antytrypsyny krwi karpia i ssaków (14).

Serpiny w przeciwieństwie do innych rodzin proteinaz serynowych charakteryzują się nieodwracalnym mechanizmem reakcji, polegającym na tworzeniu trwałych, niedysocjujących kompleksów z proteinazami serynowymi (ryc. 3). Procesowi temu towarzyszy zmiana konformacji serpiny, w wyniku czego traci ona zdolność hamowania kolejnych proteinaz. Największą grupę serpin stanowią serpiny podobne do  $\alpha_1$ -antytrypsyny (19). Główną funkcją serpin jest kontrola wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych szlaków proteolitycznych, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Serpiny regulują aktywność proteinaz w wielu procesach fizjologicznych, m.in. w krzepnięciu krwi,

fibrynolizie, aktywacji dopełniacza, spermatogenezie, angiogenezie, przebudowie tkanek oraz apoptozie (15). Oprócz kontroli aktywności własnych enzymów proteolitycznych organizmu, są pierwszą linią obrony przed atakiem organizmów patogennych, wchodząc w skład nieswoistego mechanizmu obronnego typu humoralnego.

Analiza kinetyczna wykazała, że serpiny plazmy nasienia karpia i pstrąga tęczowego są efektywnymi inhibitorami proteinaz podobnych do elastazy, trypsyny i chymotrypsyny. Elastaza okazała się enzymem najskuteczniej hamowanym przez  $\alpha_1$ -antytrypsynę plazmy nasienia karpia (stała asocjacji,  $K_{on} = 8,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 21). Uzyskane wyniki są zgodne z właściwościami  $\alpha_1$ -antytrypsyny ssaków, dla których elastaza jest głównym enzymem docelowym. Uważa się, że biologiczna funkcja  $\alpha_1$ -antytrypsyny u człowieka związana jest z kontrolą elastazy leukocytów. Ostatnie badania wykazały obecność leukocytów w nasieniu pstrąga tęczowego (6, 20). Można zatem wnioskować, że elastaza leukocytów jest docelową proteinazą hamowaną przez inhibitory frakcji II plazmy nasienia karpia. W przeciwieństwie do karpia, inhibitor plazmy nasienia pstrąga tęczowego charakteryzował się niższą aktywnością inhibitorową w stosunku do elastazy ( $K_{on} = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 14). Dane te świadczą o różnicach gatunkowych w specyficzności serpin plazmy nasienia ryb.

Dotychczas niewiele wiadomo na temat charakterystyki inhibitorów frakcji I i III. Inhibitory frakcji I należą do wysokocząsteczkowych inhibitorów proteinaz serynowych o budowie glikoproteinowej, charakteryzujących się bardzo wysoką zawartością komponenty węglowodanowej (27-29%). Ponadto nie mają one zdolności tworzenia trwałych kompleksów, co wyklucza ich przynależność do rodziny serpin (Wojtczak i wsp., dane niepublikowane). Oprócz wysokocząsteczkowych inhibitorów w plazmie nasienia ryb występują inhibitory niskocząsteczkowe (frakcja III). Przyszłe badania powinny doprowadzić do identyfi-



Ryc. 3. Tworzenie kompleksów serpina–proteinaza serynowa. A) Schemat reakcji serpiny typu  $\alpha_1$ -inhibitor trypsyny z proteinazą /[http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6806/fig\\_tab/407\\_923a0\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6806/fig_tab/407_923a0_F1.html); B) Obraz elektroforetyczny (SDS-PAGE): 1 – serpina z plazmy nasienia karpia, 2 – elastaza, 3 – kompleks serpina + elastaza, 4 – standardy mas cząsteczkowych

kacji inhibitorów frakcji I i III. Takie badania są obecnie prowadzone w naszym laboratorium.

Inhibitory proteinaz serynowych stanowią jedne z głównych białek plazmy nasienia ryb. Ich funkcje nie zostały poznane. Uważa się, że pełnią funkcje ochronne, zabezpieczając plemniki przed atakiem proteolitycznym i przedwczesną aktywacją (4, 8, 14). Ochrona plemników przed proteinazami jest szczególnie ważna w warunkach rozrodu sezonowego, gdzie plemniki produkowane są przed okresem tarła, a następnie przechowywane w nasieniowodach. Obecny w plazmie nasienia ryb system inhibitorów proteinaz serynowych najprawdopodobniej uczestniczy w zabezpieczeniu prawidłowego funkcjonowania układu rozrodczego, w szczególności w zakresie ochrony jakości plemników do momentu tarła. Potencjalne proteiny hamowane przez inhibitory plazmy nasienia ryb mogą pochodzić z plazmy nasienia, uszkodzonych plemników (12) oraz, jak wspomniano wcześniej, z leukocytów, występujących w nasieniu ryb (6). Przypuszcza się, że inhibitory mogą uczestniczyć w przebudowie struktur tkanek układu rozrodczego oraz w regulacji spermatogenezy (6, 21). Określenie właściwości inhibitorów proteinaz plazmy nasienia jest niezbędne do zrozumienia fizjologicznych podstaw funkcjonowania męskiego układu rozrodczego ryb oraz wykorzystania tej wiedzy do doskonalenia skuteczności biotechnik stosowanych w kontroli rozrodu ryb.

## Piśmiennictwo

1. Björck L., Åkesson P., Bohus M., Trojnar J., Abrahamson M., Olafsson I., Grubb A.: Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor. *Nature* 1989, 337, 385-386.
2. Bode W., Huber R.: Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1477, 241-252.
3. Ciereszko A., Liu L., Dabrowski K.: Effects of season and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Fish Physiol. Biochem.* 1996, 15, 1-10.
4. Ciereszko A., Kwasnik M., Dabrowski K., Piros B., Glogowski J.: Chromatographic separation of trypsin-inhibitory activity of rainbow trout blood and seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol.* 2000, 10, 91-94.
5. Ciereszko A., Piros B., Dabrowski K., Kucharczyk D., Łuczyński M. J., Dobosz S., Glogowski J.: Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. *J. Fish Biol.* 1998, 53, 1292-1305.
6. Ciereszko A., Wlasow T., Dobosz S., Goryczko K., Glogowski J.: Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. *Theriogenology* 2004, 62, 1353-1364.
7. Dabrowski K., Ciereszko A.: Proteinase inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish. *J. Fish Biol.* 1994, 45, 801-809.
8. Ellis A. E.: Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 1999, 9, 291-308.
9. Hibbetts K., Hines B., Williams D.: An overview proteinase inhibitors. *J. Vet. Intern. Med.* 1999, 13, 302-308.
10. Hjelmeland K.: Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comp. Biochem. Phys.* 1983, 80, 954-999.
11. Irving J. A., Pike R. N., Lesk A. M., Whisstock J. C.: Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 2000, 10, 1845-1864.
12. Kowalski R., Wojtczak M., Glogowski J., Ciereszko A.: Gelatinolytic and anti-trypsin activities in seminal plasma of common carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa. *Aquat. Living Resour.* 2003, 16, 438-444.
13. Loir M., Labbe C., Maise G., Pinson A., Boulard G., Mourou B., Chambeyron F.: Proteins of seminal fluid and spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Partial characterization and variations. *Fish Physiol. Biochem.* 1990, 8, 485-495.
14. Mak M., Mak P., Olczak M., Szalewicz A., Glogowski J., Dubin A., Watorek W., Ciereszko A.: Isolation, characterization, and cDNA sequencing of alpha-1-antiproteinase-like protein from rainbow trout seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1671, 93-105.
15. Potempa J., Korzus E., Travis J.: The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 15957-15960.
16. Roberts R. M., Mathialagan N., Duffy J. Y., Smith G. W.: Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit. Rev. Eucar. Gene* 1995, 5, 385-436.
17. Skinner M. K., Dean L., Karmally K., Fritz I. B.: Rete testis fluid (RTF) proteins: purification and characterization of RTF albumin. *Biol. Reprod.* 1987, 37, 135-146.
18. Strzeżek J., Torska J.: Akrosyna plemników i jej inhibitory – właściwości biochemiczne oraz funkcja w procesach rozrodu zwierząt. *Post. Biol. Kom.* 1985, 12, 263-288.
19. Van Gent D., Sharp P., Morgan K., Kalsheker N.: Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003, 35, 1536-1547.
20. Wlasow T., Glogowski J., Ciereszko A.: Presence of blood cells in rainbow trout milt. *Pol. Arch. Fish.* 1999, 7, 359-364.
21. Wojtczak M., Calka J., Glogowski J., Ciereszko A.: Isolation and characterization of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor from common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007, 148, 264-276.
22. Wojtczak M., Dietrich G. J., Irnazarow I., Jurecka P., Słowińska M., Ciereszko A.: Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007 (w druku).
23. Wojtczak M., Glogowski J., Koldras M., Kucharczyk D., Ciereszko A.: Characterization of protease inhibitors of seminal plasma of cyprinids. *Aquat. Living Resour.* 2003, 16, 461-465.
24. Wojtczak M., Kuźmiński H., Dobosz S., Mikołajczyk T., Dietrich G. J., Kowalski R., Kotłowska M., Enright W. J., Ciereszko A.: Milt characteristics in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) in relation to season and hormonal stimulation with a gonadotrophin-releasing hormone analogue, azagly-nafarelin. *Archiv Hydrobiol.* 2007, 60, 171-185.
25. Ylönen A., Rinne A., Herttuainen J., Bogwald J., Järvinen M., Kalkkinen N.: Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin contains a novel kininogen and another cysteine proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 1999, 266, 1066-1072.

Adres autora: dr Mariola Wojtczak, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn;  
e-mail: mario@pan.olsztyn.pl