

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАТЕПСИНА D ЛИЧИНОК ТРУТНЕВОГО РАСПЛОДА РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Аннотация.

Актуальность и цели. В нашей работе мы исследовали активность и некоторые физико-химические свойства катепсина D в личинках трутневого расплода на разных стадиях онтогенеза с целью выяснения динамики изменения активности катепсина D и его роли в ходе развития трутневых личинок.

Материалы и методы. Работа выполнена на личинках трутневого расплода разного возраста. Методом гель-фильтрации идентифицированы две формы фермента, различающихся по молекулярной массе. Найден pH оптимум действия этих форм, исследовано их отношение к специфическому ингибитору катепсина D – пепстатину.

Результаты. Установлена динамика изменения активности катепсина D в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития. Идентифицированы две формы, различающихся по молекулярной массе, данного фермента в личинках трутневого расплода. Установлено, что специфический ингибитор для катепсина D позвоночных животных – пепстатин – является неэффективным для катепсина D личинок трутней.

Выводы. Предполагается, что такая динамика изменения активности катепсина D частично отражает метаболизм белков в клетке на конкретном этапе развития личинок.

Ключевые слова: катепсин D, трутневой расплод, онтогенез.

Zh. W. Grishina, M. T. Gengin

RESEARCH OF ACTIVITY AND PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF CATHEPSIN D IN DRONE BROOD LARVAE AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT

Abstract.

Background. In our study, we examined the activity and some physicochemical properties of cathepsin D in drone brood larvae at different stages of ontogeny in order to clarify the dynamics of changes in the activity of cathepsin D and its role in the development of drone larvae.

Materials and methods. The dealt with drone brood larvae of various ages. By gel filtration the authors identified two enzyme forms, differing in molecular weight. The researchers found the pH optimum of action of these forms and studied their relation to a specific inhibitor of cathepsin D – pepstatin.

Results. The authors ascertained the dynamics of changes of cathepsin D activity in the larvae of drone brood at different stages of development. It identified two forms, differing in the molecular weight of the enzyme in the larvae of drone brood. It was found that a specific inhibitor of cathepsin D of vertebrates – pepstatin – is ineffective for cathepsin D of drone larvae.

Conclusions. It is expected that such dynamics of cathepsin D activity changes partially reflects the metabolism of proteins in a cell at a particular stage of larval development.

Key words: cathepsin D, drone brood larvae, ontogenesis.

Введение

Для понимания эволюционного развития организмов чрезвычайно важно исследование молекулярных механизмов регуляции метаболизма на конкретных этапах онтогенеза. Обмен веществ на протяжении всего жизненного цикла любого организма претерпевает существенные изменения. Особенно интенсивно эти процессы протекают у насекомых при смене фаз развития.

В качестве объекта исследования мы использовали личинки трутневого расплода. Известно, что масса трутневой личинки за несколько суток увеличивается в полторы тысячи раз, что позволяет говорить о высокой интенсивности обмена веществ [1].

Скорость и направленность метаболических процессов, как известно, определяются ферментативными реакциями, среди которых особо можно выделить ферменты белкового катаболизма, к которым относятся протеолитические ферменты. В результате действия этих ферментов в клетке, с одной стороны, разрушаются «отработанные» белки, а с другой – высвобождаются пептиды, аминокислоты с новыми физико-химическими и биологическими свойствами, что, естественно, сказывается на всем комплексе обменных процессов. Другими словами, протеолитические ферменты осуществляют контроль над метаболизмом в клетке на протяжении всего периода существования живого организма. При этом изучение динамики активности протеолитических ферментов в онтогенезе может дать существенную информацию о процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза, сопровождающих развитие личинок [2]. Ряд авторов отмечают, что изучение ферментов насекомых в онтогенезе имеет фрагментарный характер, что также относится и к протеолитическим ферментам [3].

В работе исследовали относительно хорошо изученный фермент – катепсин D. Большинство исследователей относят катепсин D к ферментам лизосомальной локализации, принимающих участие в реакциях неспецифического протеолиза [4–7]. Также по литературным данным известно, что катепсину D и другим кислым протеазам отводится лидирующая роль в метаболизме запасных белков на стадии эмбриогенеза насекомых (Izumietal., 1994; Giorgietal., 1994).

Цель нашего исследования – изучение активности катепсина D и некоторых его физико-химических свойств на разных стадиях развития трутневых личинок.

Объект и методы исследования

Объектом нашего исследования служили личинки трутневого расплода 1, 2, 3, 4, 5–6- и 7-суточного возраста. Исследование активности катепсина D проводили в водных экстрактах трутневых личинок: 1 г личинок гомогенизировали в 10 мл 0,9 %-го NaCl, затем на рефрижераторной центрифуге в течение 30 мин при 10 000 об/мин отделяли оставшиеся неразрушенные клетки и субклеточные структуры, сливали супернатант и в нем определяли активность фермента. Все операции по приготовлению проб и составлению инкубационной смеси проводили в ледяной бане при температуре 5–7 °С.

В качестве субстрата для определения активности исследуемого фермента использовали 8 %-й гемоглобин. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль продукта реакции (тирозина) за 1 мин на 1 мг белка. Количество выделившегося тирозина определяли по калибровочной кривой.

Для проведения опытов по изучению активности катепсина D в инкубационную среду, содержащую 120 мкл 100 мМ натрий-ацетатного буфера (рН = 4,5), добавляли 40 мкл 10 %-го экстракта трутневых личинок, 40 мкл 8 %-го гемоглобина, перемешивали и на 40 мин помещали в водяной термостат на инкубацию при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 5 %-го раствора ТХУ. Пробы центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин и отбирали 100 мкл супернатанта на проведение цветной реакции. Количество продуктов гидролиза гемоглобина определяли по методу Лоури [8]. Из полученной величины оптической плотности опытных проб вычитали величину оптической плотности соответствующих контрольных проб, которые отличались от опытных проб тем, что ТХУ в них вносили перед добавлением субстрата.

Для определения молекулярной массы катепсина D использовали гель-фильтрацию, которую осуществляли на колонке 40*1,5 см с сефадексом G-100. На колонку, предварительно уравновешенную 0,9 %-м NaCl, наносили 0,5 мл 10 %-го экстракта (2 мг белка). Скорость элюции белков с колонки составила 20 мл/ч, собирали 28 проб по 2 мл. Параметры колонки: свободный объем – 16 мл, рабочий – 56 мл. Свободный и внутренний объем колонки определяли по голубому декстрану и рибофлавиону [9]. Концентрацию элюирующихся белков измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. В каждой фракции определяли протеолитическую активность фермента. В качестве маркерных белков для определения молекулярной массы использовали БСА (M_r = 68 000 Да), яичный альбумин (M = 42 000 Да), цитохром C (M_r = 12 000 Да).

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Microsoft Excel 2010. Сравнение средних значений показателей активности проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия У Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение

Из литературных данных известно, что рН оптимум катепсина D у насекомых отличается от аналогичного фермента в тканях позвоночных животных (Liu et al., 1996; Giorgi et al., 1997; Иванов, 1985). В связи с этим нами был проведен кинетический анализ: подбор оптимума рН действия, концентрации субстрата, времени инкубации, а также ингибиторный анализ.

Для определения рН оптимума действия катепсина D измерение протеолитической активности вели в диапазоне рН от 3,0 до 6,0 с интервалом точек рН 0,5. Полученные результаты (рис. 1) показали, что оптимум рН действия катепсина D равен 4,5 и практически на единицу сдвинут в щелочную область в отличие от такового фермента тканей и органов позвоночных животных, где рН оптимум данного фермента 3,8 (Е. Пресс, 1960; Huang, Tappel, 1971).

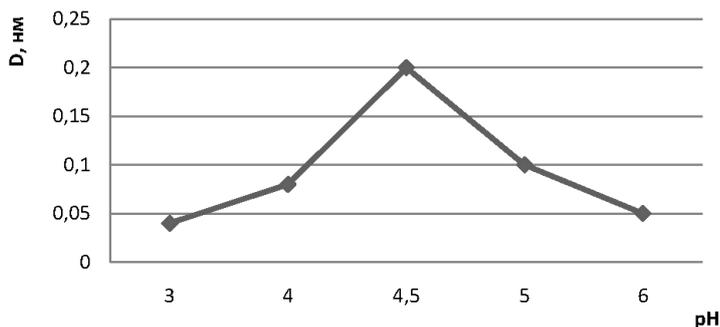


Рис. 1. Зависимость активности катепсина D личинок трутневого расплода от pH инкубационной среды

Ингибиторный анализ показал, что специфический ингибитор катепсина D – пепстатин – незначительно снижает его активность, не более чем на 7–10 %. Подобные данные были получены рядом исследователей на других насекомых [10].

На рис. 2 представлены результаты исследований активности фермента в личинках трутневого расплода разного возраста.

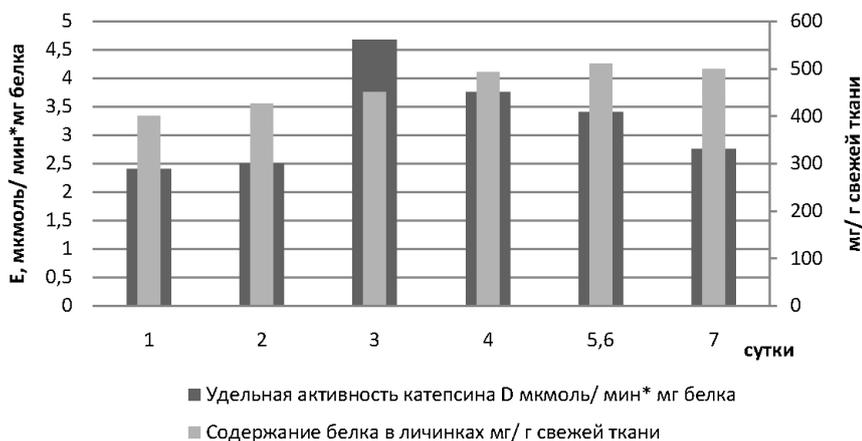


Рис. 2. Удельная активность катепсина D, содержание белка в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития ($M \pm m$, $n = 5$)

Из рис. 2 видно, что активность катепсина D наименьшая и практически одинакова в личинках 1- и 2-суточного возраста. Далее, на 3-е сутки, активность фермента увеличивается в 2 раза и затем снижается на 4, 5, 6-е и 7-е сутки, но остается еще выше активности, обнаруживаемой у односуточных личинок. По всей видимости, увеличение активности катепсина D на 3-и сутки связано с началом активизации процесса гидролиза эндогенных запасных белков с целью обеспечения строительным материалом для синтеза новых белков. Активация катепсина D при тех или иных перестройках в организме разных животных отмечена в ряде работ других авторов [4, 6, 11].

Как показано на рис. 3, активация катепсина D происходит уже на 1-е сутки развития личинки и достигает максимума на 3-и сутки, на 4–6-е сутки активность катепсина D снижается, в то время как масса личинки резко

возрастает с 120 до 280 мг. Надо полагать, что 3-и сутки развития личинки являются критическими для активации катепсина D.

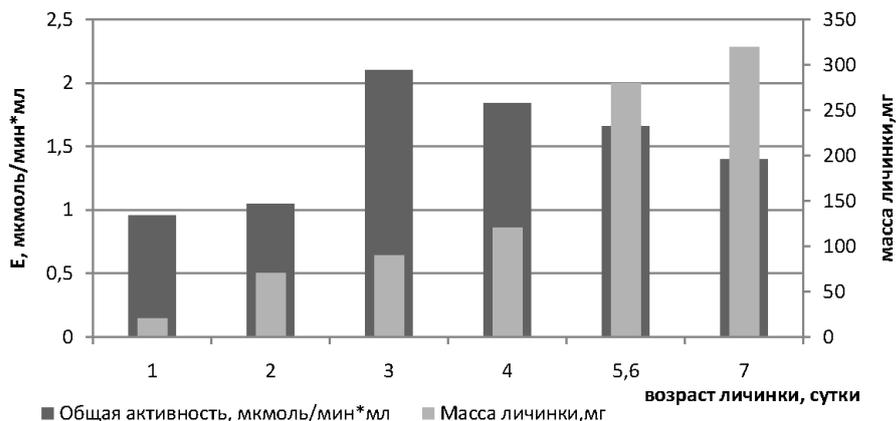


Рис. 3. Общая активность катепсина D, масса личинок на разных стадиях развития ($M \pm m$, $n = 5$)

Результаты фракционирования растворимых белков 10 %-го водного экстракта 3-суточных трутневых личинок методом гель-фильтрации представлены на рис. 4.

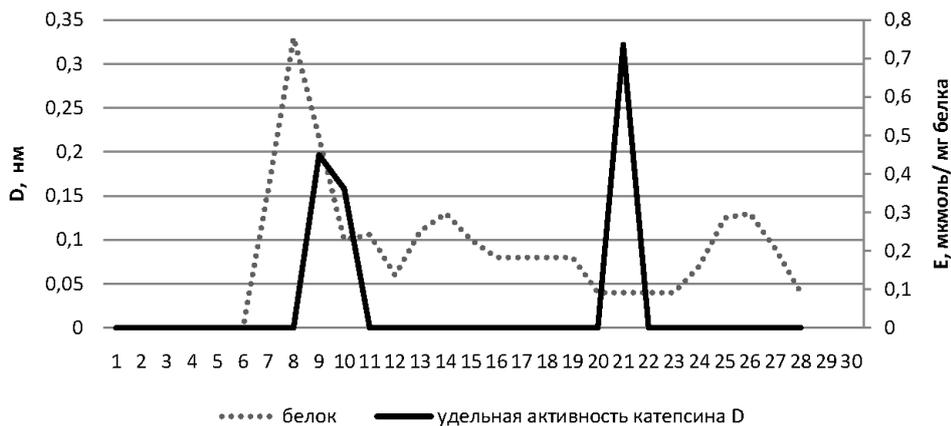


Рис. 4. Фракционирование растворимых белков 10 %-го водного экстракта 3-суточного трутневого расплода на колонке с сефадексом G-100

При гель-хроматографическом разделении установлено, что активность катепсин D-подобной протеиназы проявилась в двух формах, существенно различающихся по молекулярным массам (см. рис. 4). Из литературных данных известно, что катепсин D в клетках существует в виде изоформ. По мнению Танга и соавторов, существование изоформ обусловлено либо микрогетерогенностью тяжелой цепи фермента (положение 228 может занимать как остаток лизина, так и серина, а положение 241 – остатки глицина и глутамина), либо микрогетерогенностью олигосахаридов, связанных с остатком Asn-70 (Азарян, 1989).

По-видимому, сразу за свободным объемом колонки проявляют активность высокомолекулярные формы фермента (120 кДа). Что же касается активности в 21 фракции, то по молекулярной массе (30 кДа) он соответствует таковым ферментам, обнаруженным ранее у других насекомых [10, 11] (рис. 5). Существование изоформ катепсина D с подобными молекулярными массами (45000 Д и 110000 Д) было показано ранее в экстракте мозга крыс (Нурмагомедова и др., 1983).

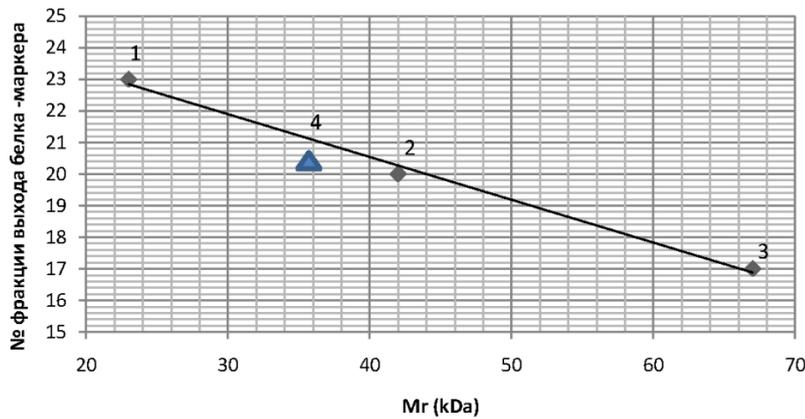


Рис. 5. Калибровочная кривая:
1 – цитохром C; 2 – яичный альбумин; 3 – БСА; 4 – катепсин D

Обнаруженные формы фермента повторяются на каждом этапе онтогенеза личинки, но соотношение их меняется (рис. 6).

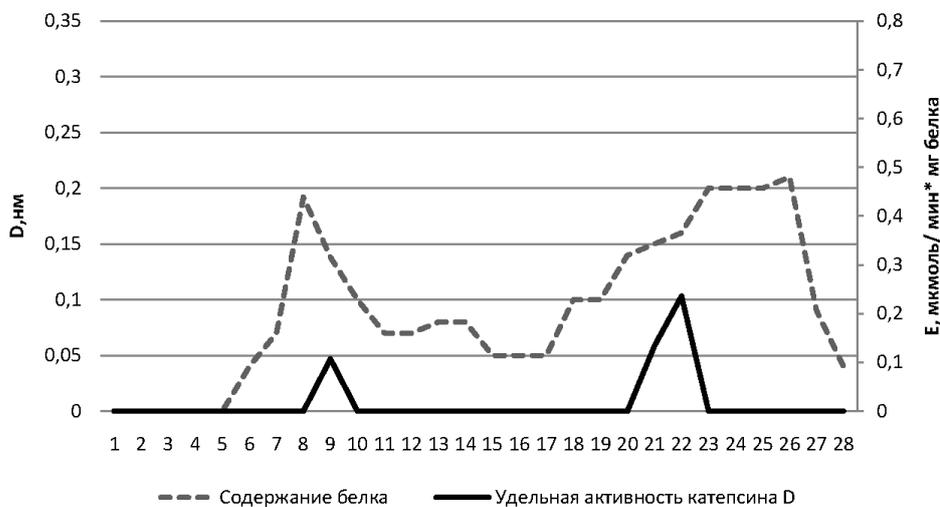


Рис. 6. Фракционирование растворимых белков 10 %-го экстракта 5, 6-суточного трутневого расплода на колонке с сефадексом G-100

Был проведен частичный анализ по изучению физико-химических свойств обнаруженных форм фермента. Определение рН оптимума представлено на рис. 7. Из рисунка видно, что рН обеих форм совпадает и соответствует 4, 5.

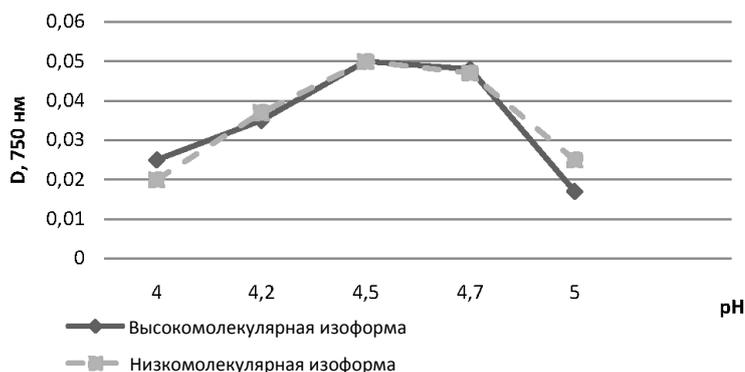


Рис. 7. pH оптимум изоформ катепсина D

В наших опытах было показано, что пепстатин ингибирует катепсин D трутневых личинок на 7–10 %, в то время как обнаруженные нами отдельные формы он ингибирует на 20–21 %. Исходя из этого, можно сказать, что пепстатин является неэффективным ингибитором для катепсина D трутневых личинок так же, как и для катепсина D некоторых других насекомых [10].

Заключение

Активность катепсина D различна в личинках трутневого расплода в зависимости от стадии их развития. Методом гель-фильтрации идентифицировано две формы фермента, различающиеся по молекулярным массам: высокомолекулярная (100–120 кДа) и низкомолекулярная (30–40 кДа). Последующие исследования с выделением и очисткой катепсина D позволят внести ясность по обнаруженным нами формам фермента.

Список литературы

1. **Бурмистрова, Л. А.** Перспективный продукт пчеловодства / Л. А. Бурмистрова // Пчеловодство. – 2005. – № 8. – С. 18.
2. **Клунова, С. М.** Ферменты белкового обмена коконопрядущих насекомых : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Клунова С. М. – М., 2005. – С. 83–89.
3. **Филиппович, Ю. Б.** Ферменты насекомых / Ю. Б. Филиппович, Н. И. Минина. – М. : ВИНТИ, 1976. – Т. 9. – 218 с. – (Итоги науки и техники. Биологическая химия).
4. **Нурмагомедова, П. М.** Пептидгидролазная активность в тканях мозга на ранних этапах постгипотермического периода / П. М. Нурмагомедова // Украинский биохимический журнал. – 1987. – Т. 59, № 4. – С. 91–93.
5. Кининогеназная активность катепсина D / О. Г. Оглоблина, В. В. Руанет, О. В. Казакова, Т. С. Пасхина, В. Н. Орехович // Биохимия. – 1980. – Т. 45, вып. 12. – С. 2217–2223.
6. Катепсины D и B лизосом мозга различных животных / А. Д. Рева, В. А. Березин, А. А. Черная, Н. Ч. Лоханская // Механизмы пластичности мозга. – Махачкала, 1982. – С. 82.
7. Разработка новых эффективных биохимических подходов к регуляции жизнедеятельности насекомых на основе исследования структуры их генома и характеристики конечных продуктов генной активности (белков и ферментов) / Ю. Б. Филиппович, В. М. Банников, А. С. Конищев, Н. М. Кутузова, Г. А. Севастьянова // Биохимия насекомых: структура хроматина и характеристика продуктов генной активности : сб. ст. – М. : МГПИ им. В. И. Ленина, 1987. – Вып. 26. – С. 3–34.

8. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrought, A. G. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
9. Лабораторный практикум «Физико-химические методы исследований» : учеб.-метод. пособие для студентов 3 курса специальности «Биохимия» / сост. В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин. – Пенза : ПГПУ им. В. Г. Белинского, 2012. – 72 с.
10. **Ярыгин, Д. В.** Изучение комплекса протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в грене тутового шелкопряда : дис. ... канд. биол. наук / Ярыгин Д. В. – М., 2000. – 163 с.
11. **Высоцкая, Р. У.** Лизосомальные ферменты в ходе жизненного цикла слепней рода *hybomitra* / Р. У. Высоцкая, В. В. Сорокина, В. С. Сидоров // *Паразитология.* – 1995. – № 29, вып. 2. – С. 83–89.

References

1. Burmistrova L. A. *Pchelovodstvo* [Apiculture]. 2005, no. 8, p. 18.
2. Klunova S. M. *Fermenty belkovogo obmena kokonopryadushchikh nasekomykh: avtor-ref. dis. d-ra biol. nauk* [Enzymes of protein metabolism of cocoon-weaving insects: author's abstract of dissertation to apply for the degree of the doctor of biological sciences]. Moscow, 2005, pp. 83–89.
3. Filippovich Yu. B., Minina N. I. *Fermenty nasekomykh* [Enzymes of insects]. Moscow: VINITI, 1976, vol. 9, 218 p. (Results of science and technology. Biological chemistry).
4. Nurmagedova P. M. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal* [Ukrainian biochemical journal]. 1987, vol. 59, no. 4, pp. 91–93.
5. Ogloblina O. G., Ruanet V. V., Kazakova O. V., Paskhina T. S., Orekhovich V. N. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 1980, vol. 45, iss. 12, pp. 2217–2223.
6. Reva A. D., Berezin V. A., Chernaya A. A., Lokhanskaya N. Ch. *Mekhanizmy plastichnosti mozga* [Mechanisms of brain plasticity]. Makhachkala, 1982, p. 82.
7. Filippovich Yu. B., Bannikov V. M., Konichev A. S., Kutuzova N. M., Sevast'yanova G. A. *Biokhimiya nasekomykh: struktura khromatina i kharakteristika produktov gennoy aktivnosti: sb. st.* [Biochemistry of insects: chromatin structure and characteristics of genetic activity products: collected articles]. Moscow: MGPI im. V. I. Lenina, 1987, iss. 26, pp. 3–34.
8. Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
9. *Laboratornyy praktikum «Fiziko-khimicheskie metody issledovaniy»: ucheb.-metod. posobie dlya studentov 3 kursa spetsial'nosti «Biokhimiya»* [Laboratory practical course "Physical and chemical research methods": tutorial of 3rd year students majoring in Biochemistry]. Comp. by V. B. Solov'ev, M. T. Gengin. Penza: PGPU im. V. G. Belinskogo, 2012, 72 p.
10. Yarygin D. V. *Izuchenie kompleksa proteoliticheskikh fermentov i ikh belkovykh inhibitorov v grene tutovogo shelkopryada: dis. kand. biol. nauk* [A study of a complex of proteolytic enzymes and their protein inhibitors in mulberry silkworm eggs: dissertation to apply for the degree of the candidate of biological sciences]. Moscow, 2000, 163 p.
11. Vysotskaya R. U., Sorokina V. V., Sidorov V. S. *Parazitologiya* [Parasitology]. 1995, no. 29, iss. 2, pp. 83–89.

Гришина Жанна Валерьевна

аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: grinzanetk@gmail.com

Grishina Zhanna Waler'evna

Postgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Генгин Михаил Трофимович

доктор биологических наук, профессор,
кафедра общей биологии и биохимии,
Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: gengin07@yandex.ru

Gengin Mikhail Trofimovich

Doctor of biological sciences, professor,
sub-department of biology
and biochemistry, Penza State
University (40 Krasnaya street,
Penza, Russia)

УДК 577.12

Гришина, Ж. В.

Исследование активности и физико-химических свойств катепсина D личинок трутневого расплода разного возраста / Ж. В. Гришина, М. Т. Генгин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2016. – № 4 (16). – С. 14–22. DOI: 10.21685/2307-9150-2016-4-2