

УДК 577.152.592.595

©Коллектив авторов

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ПРОФЕНОЛОКСИДАЗЫ У ИМАГО КОМНАТНЫХ МУХ

Н.М. Кутузова, Д.Д. Девятников, Е.А. Яныкина*

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Московский Педагогический Государственный Университет” (МПГУ),
ул. Кибальчича, д. 6, корп. 5, 123243, Москва; тел.: 683-47-84; факс: 683-16-07;
эл. почта: Biochem_mpgu@mail.ru

Установлено, что фенолоксидазный комплекс ферментов насекомых, локализованных, как правило, в кутикуле и гемолимфе, существуют в форме инактивированных проферментов, которые активируются под действием целого ряда энзимов, составляющих “фенолоксидазную активирующую систему” или “профенолоксидазный каскад”. Вся цепь реакций этого каскада до настоящего времени полностью не изучена, но известно, что в её состав входят эстеразы, активирующие сериновые протеиназы, в том числе и терминальную, кислая фосфатаза, некоторые дегидрогеназы и протеинкиназы.

Показано, что монофенол-монооксигеназа (МФМО) у имаго комнатных мух существует в виде профермента, активация которого происходит под действием эндогенных и экзогенных протеаз.

Полученные результаты позволяют высказать предположение о том, что форма МФМО с ОЭП 0,06 является агрегированным производным формы с ОЭП 0,23, что подтверждают исследования и других авторов.

Сравнительный субстратный анализ протеолитически активированной МФМО чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух свидетельствует о том, что у последней значительно возрастает сродство к *п*-дифенолу – гидрохинону, и, следовательно, степень склеротизации кутикулы.

Ключевые слова: насекомые, резистентность, иммунитет, инсектициды, фенолоксидаза, протеазы.

ВВЕДЕНИЕ. Устойчивость насекомых к внешним и внутренним воздействиям обеспечивается покровами, пищеварительной системой и продуктами секреции разнообразных желез. Уровень устойчивости может значительно отличаться между видами, в пределах вида, зависеть от стадии развития насекомых, их физиологического состояния и занимаемой экологической ниши [1-4].

Внутренние защитные системы насекомых представлены клеточными и гуморальными системами иммунитета. Основными структурными элементами, принимающими участие в формировании клеточного иммунитета насекомых, являются клетки кроветворной ткани, перикардимальные клетки, многочисленные гемоциты [5].

Защитные реакции насекомых, осуществляющиеся при участии фенолоксидазной системы, сводятся к заявлению поврежденной кутикулы и развитию устойчивости насекомых к заражению болезнетворными микроорганизмами и воздействию ксенобиотиков.

* - адресат для переписки

При исследовании роли МФМО в распознавании чужеродных тел гемоцитами *Galleria melonella* было установлено, что активация профенолоксидазы под действием экстрактов клеточных стенок исследованных микроорганизмов значительно повышает эффективность распознавания этих бактерий. Добавление ламинарина или эндотоксина к культуре клеток гемоцитов *Galleria melonella* в несколько раз увеличивает поглощение ими *Bacillus cereus* [5, 6].

Установлено, что активация профенолоксидазы гемолимфы некоторых насекомых наблюдается при инъекции компонента бактериальных стенок β -1,3-глюкана, причем процесс перехода неактивного профермента в активную МФМО зависит от присутствия ионов Ca^{2+} и осуществляется по механизму ограниченного протеолиза [6, 7].

Изучение микробной активации МФМО гемолимфы тутового шелкопряда показало, что бактериальный препарат зимозан и препараты клеточных бактериальных стенок индуцируют активацию специфической протеазы, активирующей профенолоксидазу насекомого [5, 8].

Уровень экспрессии фенолоксидазной системы под влиянием различных соединений, в том числе моносахаридов и олигосахаридов может служить показателем интенсивности иммунных реакций насекомых. Так была установлена экспрессия дополнительных молекулярных форм фенолоксидаз у комнатных мух и колорадского жука при действии на них бактериального препарата, хито-олигосахаридов и N-ацетил-О-глюкозамина [9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. Сравнительное исследование активности МФМО и её физико-химической характеристики у чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух проводили на имагинальной стадии развития. Имаго комнатных мух получали из инсектария Всероссийского научно-исследовательского института химических средств защиты растений (г. Москва).

Суммарную активность МФМО определяли спектрофотометрически по методу Хоровица и Шена [4]. Реакционная смесь состояла из 3 мл 1 мМ раствора ДОФА ("Serva", ФРГ), приготовленного на растворе 1,15 М Na,K-фосфатного буфера с pH 5,6. Реакцию начинали добавлением к инкубационной смеси экстракта, содержащего 250-1000 мкг белка. Инкубация длилась 15 минут при 37°C. Количество образовавшегося в результате реакции ДОФА-хрома измеряли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 490 нм. Активность МФМО выражали приростом оптической плотности (ΔE_{490}) в мин в расчете на 1 мг белка.

Обнаружение белковых фракций, обладающих активностью МФМО, проводили по модифицированному методу Андерсена [10]. После проведения электрофореза гелевые колонки промывали водой и помещали в 0,1 М ацетатный буфер (pH 5,6). Спустя 10 минут колонки переносили в инкубационную смесь, состоящую из 10 мл буфера, содержащего в качестве субстрата 0,1 М дофамин, а также 0,01%-ный пролин (для усиления гидроксимирующей активности фермента). По истечении 10-20 минут инкубации (20°C) на бесцветном фоне гелевых колонок выступали окрашенные в коричневый цвет зоны активности МФМО. Полученные энзимогаммы хранили в смеси, состоящей из этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30.

Для частичной очистки активированной трипсином МФМО чувствительной и резистентной к фталофосу рас имаго комнатных мух использовали фракционирование с сульфатом аммония и гель-фильтрацию. Белковые фракции, полученные после осаждения сульфатом аммония (50% насыщение), подвергали гель-фильтрации через ТСК-гель (Toyopearl, HW-55, Япония), на колонке размером 1,6×65,0 см. Все процедуры по очистке МФМО проводили в холодильной камере Combi Cold Lab ("LKB", Швеция) при температуре 4°C, используя проточный абсорбциометр (Uvicord II), коллектор фракций и перистальтический насос Microperplex ("LKB", Швеция).

Изоэлектрическую точку МФМО определяли методом аналитического изоэлектрофокусирования в тонком слое полиакриламидного геля на приборе Multifor ("LKB", Швеция), используя стандартные гелевые пластины ("LKB", Швеция), содержащие амфолины с диапазоном pH 3,5-9,5 [11].

Определение субстратной специфичности МФМО имаго чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух проводили в стандартных реакционных условиях [11, 12]. В качестве монофенольных субстратов использовали тирозин ("Reanal", Венгрия), тирамин, ДОФА ("Serva", ФРГ), дофамин ("Sigma", США), пирокатехин и гидрохинон отечественного производства ("Реахим").

При исследовании влияния ингибиторов на активность частично очищенной МФМО имаго чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух использовали азид натрия ("Sigma"), фторид натрия, диэтилдитиокарбамат в концентрациях 10^{-3} – 10^{-5} М и фенилтиомочевину в концентрациях 10^{-4} – 10^{-6} М ("Реахим"). Все вышеперечисленные ингибиторы использовали в виде водных растворов. К препарату частично очищенной МФМО добавляли раствор ингибитора до соответствующей его конечной концентрации и через 15 минут приливали раствор, содержащий субстрат. В контрольные образцы вместо раствора ингибитора добавляли равное ему количество дистиллированной воды. В качестве субстратов использовали 1 мМ дофамин и 1 мМ гидрохинон.

Молекулярную массу нативной МФМО определяли методом вертикального электрофореза на пластинах ПААГ с градиентом концентрации акриламида от 3,5% до 20%. Маркерами для определения молекулярных масс служили следующие белки: тиреоглобулин (669 000 Да), ферритин (440 000 Да), каталаза (232 000 Да), лактатдегидрогеназа (140 000 Да), бычий сывороточный альбумин (67 000 Да).

Протеолитическую активацию МФМО осуществляли по методу Андерсена [10]. Для этого к экстракту имаго комнатных мух, содержащему МФМО, добавляли кристаллический трипсин ("Spoph", Чехия) до 1%-ной концентрации. Через 1 час инкубации реакцию останавливали, добавлением 2 мМ фенилметилсульфонилфторида ("Sigma"), растворенного в 5%-ном этаноле.

Величину среднеарифметической ошибки и достоверность результатов оценивали используя формулы и t_s -критерий Стьюдента при уровне вероятности $p=0,05$ [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. С целью выяснения функциональной роли МФМО у рас комнатных мух, устойчивых к ФОС, было проведено сравнительное исследование некоторых физико-химических свойств фермента у чувствительной и резистентной к фталофосу рас мух. Последняя была выбрана для анализа вследствие того, что обладала высоким биологическим показателем резистентности и наиболее активной МФМО. Первым этапом работы явилось выяснение хода протеолитической активации МФМО.

Оказалось, что при экстракции МФМО из гомогенатов имаго комнатных мух в кислой или нейтральной среде активность фермента не выявляется, тогда как после экстракции 0,05 М трис-глициновым буфером (pH 8,3), активность МФМО равна 8,39 мМ ДОФА в минуту на мг белка $\times 10^2$. Полученные данные свидетельствуют о том, что МФМО у имаго комнатных мух существует в виде профермента, активация которого происходит при экстракции щелочным буферным раствором. Образовавшийся активный фермент с высокой молекулярной массой, определить которую не удастся традиционными методами, такими как гель-фильтрация (фермент элюируется с колонки одновременно с голубым декстраном) и электрофорез в полиакриламидном геле. Под действием экзогенного трипсина в концентрации 1 мг/мл (37°C) МФМО переходит в новое, по данным электрофореза, более низкомолекулярное состояние. Через полчаса после инкубации с трипсином образуются 2 формы фермента – ОЭП 0,06 и 0,23. Через 1 час и более на электрофореграммах выявляется лишь одна форма с ОЭП 0,23. Наряду с трипсином исследовали воздействие 1%-го тритона и 2 М NaCl

АКТИВАЦИЯ ПРОФЕНОЛОКСИДАЗЫ У МУХ

на активность МФМО. Установлено, что обработка гомогената тритоном X-100 и NaCl не влияла на высокомолекулярный фермент. Необходимо отметить, что аналогично трипсину воздействуют на МФМО и эндогенные протеазы. Так, установлено, что при хранении в течение недели (4°C) высокомолекулярный фермент под действием эндогенных протеаз переходит сначала в форму с ОЭП 0,06, при дальнейшей элюции которой с TSK-геля 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,2), содержащим 0,2 М KCl, происходит переход её в форму с ОЭП 0,23. Изоэлектрофокусирование в полиакриламидном геле форм МФМО с ОЭП 0,06 и 0,23, полученных при воздействии эндогенных протеаз, а также под действием экзогенного трипсина, показало, что они имеют одну и ту же изоэлектрическую точку (pI=5,6). Полученные результаты позволяют высказать предположение о том, что формы МФМО с ОЭП 0,06 является агрегированным производным с ОЭП 0,23, что подтверждают данные других авторов, свидетельствующие о том, что процесс протеолитической активации МФМО насекомых сопровождается образованием агрегатов [1, 2, 14]. Так, у тутового шелкопряда и табачного бражника в зависимости от условий, в которых осуществляется протеолитическая активация МФМО (pH, ионная сила раствора и др.) образуется от четырёх до восьми форм фермента.

Анализ литературных данных подтверждает сделанный нами вывод о протеолитической активации МФМО имаго комнатных мух. Так, показано, что у тутового шелкопряда [14] и табачного бражника [1] активация МФМО осуществляется под действием высокоспецифической сериновой протеазы. Кроме того, у саранчи *Locusta migratoria* установлена взаимосвязь между изменением активности фенолоксидазы и уровнем липофоринов в гемолимфе [7]. Введение ламинарина совместно с адипокинетическим гормоном пролонгировало активность фермента на стадии имаго.

Активация фенолоксидазной системы при инфекционном заражении комнатных мух и колорадского жука также осуществляется сериновыми протеиназами [9]. Однако кроме активации профермента, по мнению авторов, немаловажную роль играет индукция (т.е. усиление синтеза) и инициация секреции ферментов в гемолимфу из гемоцитов.

Установлено, что гидролитическое расщепление зимогена трипсином не сопровождается повышением сродства возникающей из него активной формы МФМО к *o*-дифенолам – ДОФА и дофамину – оно как было, так и остается высоким (табл. 1).

Таблица 1. Активация трипсином МФМО чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух.

Этапы очистки	Общий объем (мл)	Белок		Общая активность			Удельная активность			Активирование, %		
		мг/мл	мг в общем объеме	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Грубый экстракт												
S	20	25,2	504	42,2	98,0	2,54	8,39 ±0,23	19,44 ±0,36	0,70 ±0,02			
R _{фталюфос}	20	26,4	528	63,4	114,2	5,32	12,0 ±0,25	21,63 ±0,40	1,01 ±0,03	+43,02	+11,26	+44,28
Грубый экстракт (активация трипсином)												
S	20	23,0	460	40,8	95,2	4,2	8,87 ±0,21	20,69 ±0,39	0,90 ±0,02			
R _{фталюфос}	20	27,0	560	51,8	112,2	11,4	9,60 ±0,30	22,61 ±0,42	2,13 ±0,06	+8,22	+9,27	+136,6

Примечание: здесь и в табл. 2 удельная активность МФМО (в ΔA₄₉₀/мин/мг белка×10³). Субстраты: I - ДОФА, II - дофамин, III - гидрохинон, S - чувствительная раса, R_{фталофос} - резистентная к фталофосу раса (p=0,05).

Однако, как следует из полученных данных, значительно возрастает сродство активированной МФМО к *n*-дифенолу – гидрохинону. Сравнение активности фермента, активированного трипсином по отношению к гидрохинону у чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух, свидетельствует о значительно более высокой (136%) активности окисления гидрохинона этим ферментом у резистентных мух по сравнению с таковым у чувствительных.

Частичная очистка активированной трипсином МФМО имаго чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух включала в себя 2 стадии – осаждение при 50%-ном насыщении сульфатом аммония и гель-фильтрацию через TSK-гель (табл. 2).

Таблица 2. Этапы очистки МФМО чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух.

Этапы очистки	Удельная активность			Степень очистки			Активирование, %		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Грубый экстракт									
S	8,9 ±0,2	20,7 ±0,4	0,9 ±0,02						
R _{фталофос}	9,6 ±0,3	22,6 ±0,4	2,1 ±0,06				+8,2	+9,3	+136,6
Осаждение при 50%-ном насыщении сульфатом аммония									
S	14,2 ±0,35	55,0 ±1,65	0,9 ±0,02	1,6	2,6	1,03			
R _{фталофос}	20,0 ±0,5	66,6 ±1,5	2,6 ±0,05	2,08	2,9	1,21	+40,9	+20,9	+177,4
Гель-фильтрация через TSK-гель									
S	511 ±13,8	2337 ±28,0	50 ±1,2	57,7	113	55,5			
R _{фталофос}	716 ±12,8	2701 ±72,4	139 ±0,3	74,6	119	65,2	+40,1	+15,6	+178,8

Молекулярную массу МФМО имаго чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух определяли методом электрофореза в градиенте концентрации полиакриламидного геля от 3,5% до 20%. Значение молекулярной массы определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по белкам-маркерам [11]. Найдено, что молекулярная масса МФМО имаго чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух одинакова и равна 360000 Да, что вполне сопоставимо со значением молекулярной массы МФМО и у других представителей отряда двукрылых [15].

В опытах по изучению субстратной специфичности МФМО имаго комнатных мух установлено, что фермент, как у чувствительной, так и у резистентной к фталофосу расы, обладает широкой субстратной специфичностью и окисляет монофенолы, а также *o*- и *n*-дифенолы. Монофенолы (тирозин и тирамин) фермент

АКТИВАЦИЯ ПРОФЕНОЛОКСИДАЗЫ У МУХ

преобразует с небольшой скоростью, в то время как дифенолы окисляет до соответствующих хинонов с относительно высокой скоростью. При этом надо отметить, что на активность фермента большое влияние оказывает наличие или отсутствие дополнительного радикала в ароматическом кольце субстрата, поскольку гидрохинон и пирокатехин окисляются с меньшей скоростью, чем ДОФА и дофамин.

Таким образом, немногочисленные литературные и полученные нами экспериментальные данные позволяют высказать предположение, что МФМО является полифункциональным ферментом, в пределах единой полипептидной цепи которого сформированы домены с разной оксигеназной активностью. Естественно, что в результате протеолитического расщепления в процессе активности МФМО в её составе может оказаться разное число доменов, что может регулировать субстратную специфичность фермента, а экспрессия активности фенолоксидазы под влиянием иммуномодуляторов может служить показателем интенсивности иммунной реакции насекомых [9].

Исследование кинетики реакции, катализируемой МФМО, частично очищенной из имаго чувствительной и резистентной рас комнатных мух, показало, что зависимость активности фермента от концентрации субстрата подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

Константы Михаэлиса (K_m) по ДОФА, дофамину и гидрохинону представлены в таблице 3. Полученные данные свидетельствуют о том, что у резистентной расы повышается сродство к дофамину, ДОФА и гидрохинону в 1,16; 1,24 и 2,72 раза соответственно; это подтверждает результаты субстратного анализа об увеличении сродства фермента резистентной расы по сравнению с чувствительной преимущественно к *n*-дифенолу – гидрохинону.

Таблица 3. Субстратная специфичность и константы Михаэлиса МФМО чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух.

Субстраты	Раса, чувствительная к фталофосу		Раса, резистентная к фталофосу	
	K_m (мМ)	Активность МФМО	K_m (мМ)	Активность МФМО
Монофенолы				
Тирозин		11,53±0,36		1,33±0,32
Тиразин		12,82±0,38		12,00±0,39
o-Дифенолы				
ДОФА	0,47	523±10,98	0,38	750±18,75
Дофамин	0,40	2073±58,04	0,34	2676±53,52
Пирокатехин		42,36±1,22		49,57±1,28
n-Дифенолы				
Гидрохинон	0,91	36,75±1,17	0,33	90,00±3,06

Примечание: активность МФМО выражена в ед. $\Delta A_{490}/\text{мин}/\text{мг}$ белка $\times 10^2$ ($p=0,05$).

Детальное исследование МФМО в сравнительном аспекте чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух показало, что фермент существует в виде зимогена, от протеолитической активации которого в значительной степени зависит различие в деятельности МФМО у чувствительной и резистентной к ФОС рас комнатных мух.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведенный субстратный и ингибиторный анализ, а также данные изoeлектрофокусирования ($pI = 5,6$), определения молекулярных масс и K_m частично очищенной МФМО чувствительной и резистентной к фталофосу рас комнатных мух позволяет сделать вывод о количественном преобладании у устойчивой расы активированного фермента с

молекулярной массой 360 кДа, в результате чего увеличивается скорость окисления *n*-дифенолов. Изучение влияния ингибиторов на активность МФМО показало, что активность фермента у обеих исследованных рас мух в наибольшей степени подавляется фенилтиомочевинной. Совокупность полученных результатов убеждает, что центральным звеном в цепи событий, приводящих к большей интенсивности окисления *n*-дифенолов у резистентных мух, является более высокая скорость по сравнению с чувствительной расой гидролитического расщепления высокомолекулярного зимогена. Причинами этого могут быть, с одной стороны, измененная структура самого зимогена, который становится более доступен действию протеаз, а с другой, что вероятнее, – увеличение активности протеаз у резистентных насекомых и атакуемости ими различных пограничных зон между доменами в молекуле профермента.

Таким образом, наблюдаемое увеличение активности фермента у резистентной к фталофосу рас комнатных мух по сравнению с чувствительной согласно опытным и литературным данным свидетельствует об увеличении степени склеротизации кутикулы у резистентных насекомых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saul S.J., Sugumaran M. (1988) Arch. Insect Biochem Physiol., 7(2), 91-103.
2. Jiang H., Wang Y., Yu X.,-Q., Zhu Y., Kanost M. (2003) Insect Biochem. Mol. Biol., 33, 1049-1060.
3. Рославцева С.А. (2003) Агрохимия, 2, 117-123.
4. Филиппович Ю.Б., Рославцева С.А., Кутузова Н.М. и др. (1988) Итоги науки и техники. – Энтомология, 8, 163.
5. Глунов В.В. (2001) Механизмы резистентности насекомых. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты, Круглый год, М.
6. Hiruma K., Riddiford L.M. (1988) Developmental Biology, 130, 87-97.
7. Mullen L., Goldsworthy G. (2003) Insect Biochem. Mol. Biol., 33, 661-670.
8. Brooks C.L., Dunphy G.B. (2005) Immunology Cell biology, 83, 150-159.
9. Салтыкова Е.С., Беньковская А.В., Поскряков А.В. и др. (2003) Ж. эволюц. биохим. физиол., 39(4), 346-350.
10. Andersen S.O. (1978) Insect Biochem., 8(2), 143-148.
11. Животенко Е.Ю. (1989) Гормональная регуляция активности ферментов начального этапа катаболизма тирозина у комнатных мух и тутового шелкопряда. Автореф. дисс. канд. наук, Тип. МПГУ им. Ленина, Москва.
12. Кутузова Н.М. (2006) Гормональная регуляция активности некоторых ферментных систем насекомых. Дисс. докт. наук, ГОУ ВПО МПГУ, Москва.
13. Ивантер Э.В., Коросев А.В. (1992) Основы биометрии: введение в статистический анализ биологических явлений и процессов. Петрозаводск.
14. Ashida M. (1990) Res. Immunol., 141, 908-910.
15. Lemaitre B., Hoffmann J. (2007) Annu. Rev. Immunol., 25, 697-743.

Поступила: 06. 07. 2007.

PROTEOLYTIC ACTIVATION OF PROPHENOLOXIDASE IN THE IMAGO OF
MUSCA DOMESTICA

N.M. Kutuzova, D.D. Deviatnikov, E.A. Yanykina

Moscow State Pedagogical University (MSPU), Kibalchicha ul., 6/5, Moscow, 123243 Russia;
tel.: 683-47-84; fax: 683-16-07; e-mail: Biochem_mpgu@mail.ru

The enzyme phenoloxidase complex of insects generally localized in cuticle and hemolymph, presents in the form of inactive proenzymes, which may be activated under the influence of a range of enzymes, components of the "phenoloxidase activated system" or "prophenoloxidase cascade". Currently the whole chain of the reactions is not clear, but it includes esterases, which activate serine proteinase, including terminal proteinase, acid phosphatase, some dehydrogenase, and protein kinase.

The typhoid fly imago has monophenol-monooxygenase (MPMO) in the form of proenzyme, which is activated under the influence of endogenous and exogenous proteases.

These results allow to suppose that the form MPMO with REM 0.06 is aggregated derivative of the form with REM 0.23.

Relative substrate analysis of proteolytically activated MPMO of phtalophos-sensitive and phtalophos-resistant typhoid fly strains demonstrates that the second one has increased affinity for *p*-diphenol-hydroquinone.

Key words: insects, resistance, immunity, insecticides, phenoloxidase, proteases.