

УДК 591

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ В ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

© 2012 г. Д. В. Ярыгин*, Н. О. Минькова*, Ю. Б. Филиппович**

*ФГБОУ ВПО Московский государственный гуманитарный университет имени М.А. Шолохова
109240 Москва, ул. Верхняя Радищевская, д. 16–18

** ФГБОУ ВПО Московский педагогический государственный университет
129278 Москва, ул. Кибальчича, д. 6
E-mail: den282@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.09 г.
Окончательный вариант получен 17.02.12 г.

Исследована внутриклеточная локализация сериновых, цистеиновых и аспартильных протеиназ и их белковых ингибиторов в грена тутового шелкопряда в постдиапаузный период ее эмбрионального развития. Протеолитическая активность аспартильных и цистеиновых протеиназ обнаружена в лизосомальной, митохондриальной и ядерной фракциях грены. Активность сериновых протеаз обнаружена в субклеточных фракциях грены 4 дня постдиапаузного развития. Показано, что активность белковых ингибиторов и конкретных пептидогидролаз в субклеточных фракциях обеспечивает согласованность и тонкую регуляцию функционирования протеолитического комплекса ферментов.

Ключевые слова: субклеточные фракции, пептидогидролазы, белковые ингибиторы, грена, тутовый шелкопряд.

Внутриклеточная локализация протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в тканях и органах животных изучена в той или иной степени (Коновалов, 1986; Немова, 1996; Ohshita, Kido, 1995; Zhivotovsky et al., 1995; Chapman et al., 1997). Однако, эти работы, в основном, сосредоточены на исследовании субклеточных фракций тканей позвоночных животных. Установлено, что белковые ингибиторы позвоночных локализованы в клетке в зависимости от выполняемых функций в ядерной, митохондриальной и лизосомальной фракциях, в эндоплазматическом ретикулуме, цитозоле, плазматической мембране и в других субклеточных структурах (Куцый и др., 1999; Vasilev et al., 1991; Spiess et al., 1994; Gburek et al., 1995; Wakayama, Iseki, 1997; Fabra, Cerdà, 2004).

Данные о субклеточном распределении протеолитических ферментов и белковых ингибиторов в тканях и органах насекомых крайне ограничены (Cho et al., 1999; Gan et al., 2001; Yamahama et al., 2003; Zhao et al., 2005; Yang et al., 2006, Yang et al., 2007). Исследование динамики активности пептидогидролаз и их белковых ингибиторов у насекомых в процессе их развития демонстрирует определяющую роль белковых ингибиторов протеиназ в регуляции протеолиза в онтогенезе насе-

комых (Ярыгин и др., 2001). Существенную информацию о функциональной роли белковых ингибиторов предоставляет изучение субклеточной локализации пептидогидролаз и их белковых ингибиторов.

В настоящей работе предпринято исследование субклеточной локализации пептидогидролаз и их белковых ингибиторов в грена тутового шелкопряда.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для выделения субклеточных фракций служила грена гибрида М7 × М6, представленная Миргородским гренажным заводом (Украина, Полтавская обл.), находящаяся на 4 дне постдиапаузного развития (бластокинез). Грена в этот период развития характеризуется наличием двух типов клеток – клеток развивающегося зародыша и желточных клеток. Однако основную массу клеток на данной стадии развития грены представляют желточные или питающие клетки, запасные вещества которых интенсивно используются в процессе роста и дифференцировки зародыша.

Субклеточное фракционирование грены тутового шелкопряда осуществляли методом диффе-

ренициального центрифугирования (Банников, 1983). Все операции по выделению из грены субклеточных фракций проводили при 0–2°C.

Для получения субклеточных фракций навеску грены (25 г) гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса в 100 мл 0.01 М трис-НСI буфера (рН 7.3), содержащего 0.32 М сахарозы, 5 мМ СаСl₂, 3 мМ МgСl₂ и 5 мМ КСl. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань для отделения хориона, после чего фильтрат центрифугировали при 200 g в течение 10 мин на центрифуге К-23 (“Janetzki”, Германия). Полученный осадок (клеточные обломки) отбрасывали, а из надосадочной жидкости осаждали ядра, центрифугированием при 900 g в течение 10 мин. Осадок (грубая ядерная фракция) трижды промывали 0.01 М Трис-НСI (рН 7.3) буфером, содержащем 0.127 М NaСl, 5 мМ СаСl₂, 3 мМ МgСl₂ и 5 мМ КСl (буфер В), каждый раз центрифугируя полученную суспензию при 900 g в течение 15 мин. Промывные воды отбрасывали, а осадок представлял собою очищенную ядерную фракцию.

Остальные субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования объединенного супернатанта, полученного после отделения грубой ядерной фракции. Осадок митохондриальной фракции собирали после центрифугирования супернатанта при 4500 g в течение 10 мин, а лизосомальной фракции — при 20000 g в течение 60 мин. Каждую субклеточную фракцию трижды отмывали от сахарозы буфером В.

Для освобождения от сахарозы постлизосомальной фракции (супернатант, полученный после выделения лизосомальной фракции), ее аликвоту подвергали диализу в течение 12 часов против 0.01 М трис-НСI буфера, рН 7.3.

Разрушение субклеточных фракций проводили путем двукратного замораживания и оттаивания. Полученные суспензии центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин, используя в дальнейшем супернатанты в качестве исходных препаратов для выявления в них активности протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов.

Чистоту полученных субклеточных фракций контролировали измерением в них активности маркерных ферментов: в митохондриальной фракции — цитохром-с-оксидазы, в лизосомальной — кислой фосфатазы (Кривченкова, 1977, Морозова, Безбородова, 1972).

Содержание белка в экстрактах субклеточных фракций определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Общую протеолитическую активность растворимых белков грены тутового шелкопряда определяли по методу Ансона (Anson, 1939), модифицированному для выявления активности пептидогидролаз в тканях и органах тутового

шелкопряда (Клунова и др., 1987). С этой целью к 0.15 мл 1%-ного раствора гемоглобина в фосфатно-цитратном буфере (рН 2.2–7.2), либо 0.5%-ного раствора казеина в 0.2 М боратном буфере (рН 7.2–8.0) и в 0.05М боратном буфере (рН 9.0–10.2) добавляли 0.2 мл ферментного экстракта, содержащего до 300 мкг белка. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 16 ч, а затем реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси 0.24 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В контрольных вариантах ТХУ добавляли к смеси одновременно с ферментным экстрактом. Полученные смеси помещали на 10 мин в холодильную камеру для формирования осадка, который отделяли центрифугированием при 8000 g. К 0.3 мл полученного супернатанта добавляли 0.6 мл 0.5М NaOH и 0.18 мл реактива Фолина (0.7 н.). Через 5 мин определяли оптическую плотность реакционной смеси при 750 нм. Измерение активности трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ проводили спектрофотометрическим методом, описанным в руководстве “Preparations for biochemistry” фирмы “Merck” (Германия), используя в качестве субстратов растворы N-бензоил-D,L-аргинил-п-нитроанилида (BAPNA) и сукцинил-D,L-фенилаланин-п-нитроанилида (SUPNEPA) в диметилформамиде из расчета 5 мг/мл. За единицу протеолитической активности грены тутового шелкопряда принимали такое количество ферментного препарата, которое вызывало увеличение оптической плотности на 0.01 при длине волны 750 нм в случае применения природных субстратов и при длине волны 405 нм в случае использования синтетических субстратов.

Для определения подклассовой принадлежности протеолитических ферментов, выявленных в субклеточных фракциях в грене тутового шелкопряда, использовали ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеиназ соответствующих подклассов: в качестве ингибитора сериновых протеиназ — фенилметилсульфонилфторида, цистеиновых протеиназ — п-хлормеркурибензоата, аспартильных протеиназ — пепстатина и металлопротеиназ — этилендиаминтетраацетата. Концентрация всех вышеперечисленных ингибиторов составляла 1×10^{-3} М. Оценивая влияние тех или иных ингибиторов, вычисляли долю (% от контроля) остаточной активности фермента в присутствии соответствующего эффектора.

О наличии эндогенных ингибиторов пептидогидролаз в субклеточных фракциях грены тутового шелкопряда судили по торможению активности соответствующих коммерческих препаратов протеиназ (папаина, пепсина, трипсина и химотрипсина) в присутствии ферментных экстрактов грены. Эндогенную ингибиторную активность по отношению к протеолитическим ферментам

(трипсину и химотрипсину) определяли спектрофотометрически по расщеплению синтетических субстратов BAPNA и SUPHERA. Эксперимент проводили с использованием трех серий проб. Все серии и пробы были унифицированы по объемам и количеству одноименных компонентов, времени и условиям инкубации. Первая серия представляла собою контроль, в котором активность коммерческого препарата фермента проявлялась в исходном варианте. Пробы содержали 0.3 мл буфера с соответствующим значением pH, 0.15 мл раствора модельного субстрата (500 мкг) и 0.05 мл раствора фермента (15 мкг). Опытные пробы второй серии, кроме перечисленных компонентов, содержали 0.2 мл исходного экстракта (0.1 мг белка). На образование комплекса фермент-ингибитор отводилось 20 мин, по истечении указанного времени в инкубационную среду вносили раствор субстрата и пробы выдерживали 40 мин при комнатной температуре. Третья серия проб представляла собой контроль, позволяющий тестировать возможную активность эндогенных протеаз по отношению к вносимым субстратам и маскирующим действие ингибитора. Пробы третьей серии содержали буфер, субстрат и исходный белковый экстракт. Варианты каждой серии имели собственные контроли на реагенты. Реакцию останавливали добавлением к инкубационной среде 1.5 М раствора уксусной кислоты и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 405 нм. Активность эндогенных ингибиторов выражали либо в процентах от исходной активности коммерческого препарата, либо в условных единицах. За условную единицу принимали такое количество препарата ингибитора гренны, которое вызывало уменьшение оптической плотности инкубационной среды на 0.01. По этой же схеме определяли описанным выше методом Ансона активность белковых ингибиторов пепсина и папаина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение активности исследованных протеиназ и их белковых ингибиторов с оптимумом pH 3.0, 3.6, 6.2, 7.2, 8.6 и 9.0 по субклеточным фракциям гренны (рис. 1, 2), показывает существенные различия в уровне активности протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов между отдельными субклеточными фракциями яиц тутового шелкопряда, что свидетельствует о разнообразии функций, выполняемых ферментами и их ингибиторами в каждой из субклеточных структур.

Максимальный уровень протеолитической активности исследованных аспартильных, кислых и слабокислых цистеиновых протеиназ (оптимум pH 3.0, 3.6 и 6.2), основной функцией которых является деградация запасных белков, главным об-

разом присущ лизосомальной фракции гренны. Существенно меньший уровень активности характерен для ядерной и митохондриальной фракций гренны (рис. 1). В литературе имеются сведения о наличии лизосомальных цистеиновых и аспартильных протеиназ в яйцах насекомых (Иванов, 1986; Takahashi et al., 1993; Dittmer, Raikhel, 1997), а также об обнаружении цистеиновых протеиназ в ядерной и митохондриальной фракциях животных клеток (Назаров, 1993; Кущий и др., 1999), что полностью совпадает с результатами нашей работы. Присутствие пептидогидролаз в ядрах насекомых является достаточно хорошо установленным фактом. Так, охарактеризован протеолитический комплекс хроматина гренны, в составе которого обнаружены протеиназы с оптимумами pH 3.4 и 6.2. Установлено, что выявленные в хроматине ядра гренны пептидогидролазы, участвующие в регуляции активности генома, являются кислыми цистеиновыми протеиназами (Назаров, 1993).

Согласно литературным данным (Dittmer, Raikhel, 1997; Cho et al., 1999), лизосомальные цистеиновые и аспартильные протеиназы (катепсина-В-подобные, катепсина-Л-подобные и катепсина-Д-подобные протеиназы) участвуют в расщеплении запасных белков (вителлин) в эмбриогенезе насекомых. Так, катепсина-В-подобная протеиназа из *Aedes aegypti*, которая в виде предшественника синтезируется в жировом теле самок, в зрелых яйцах принимает участие в эмбриональной деградации вителлина (Cho et al., 1999), а катепсина-Л-подобная протеиназа, выделенная из яиц *Blattella germanica*, участвует в процессе эмбриогенеза в деградации вителлина и протеолитической активации своей проформы, локализованной в желточных гранулах питающих клеток яиц (Liu et al., 1996).

Наличие высокой активности аспартильных и цистеиновых протеиназ в митохондриальной фракции не является неожиданным фактом (рис. 1). Активность цистеиновых протеиназ была обнаружена в митохондриях желточных клеток артемии (Lu, Warner, 1991) и в митохондриях ооцитов сиговых рыб (Коновалов, 1986). Полученные нами результаты нельзя объяснить наличием возможной примеси лизосом в митохондриальной фракции, так как высокая активность кислой фосфатазы, которая обнаружена в лизосомальной фракции, не выявлена в митохондриях.

В последнее время появились сообщения о том, что митохондрии играют ключевую роль в апоптозе. Так, белок с молекулярной массой 50 кДа, являясь цистеиновой протеиназой, локализованной в митохондриях, в бесклеточной системе изолированных ядер вызывает конденсацию хроматина и межнуклеосомную фрагмента-

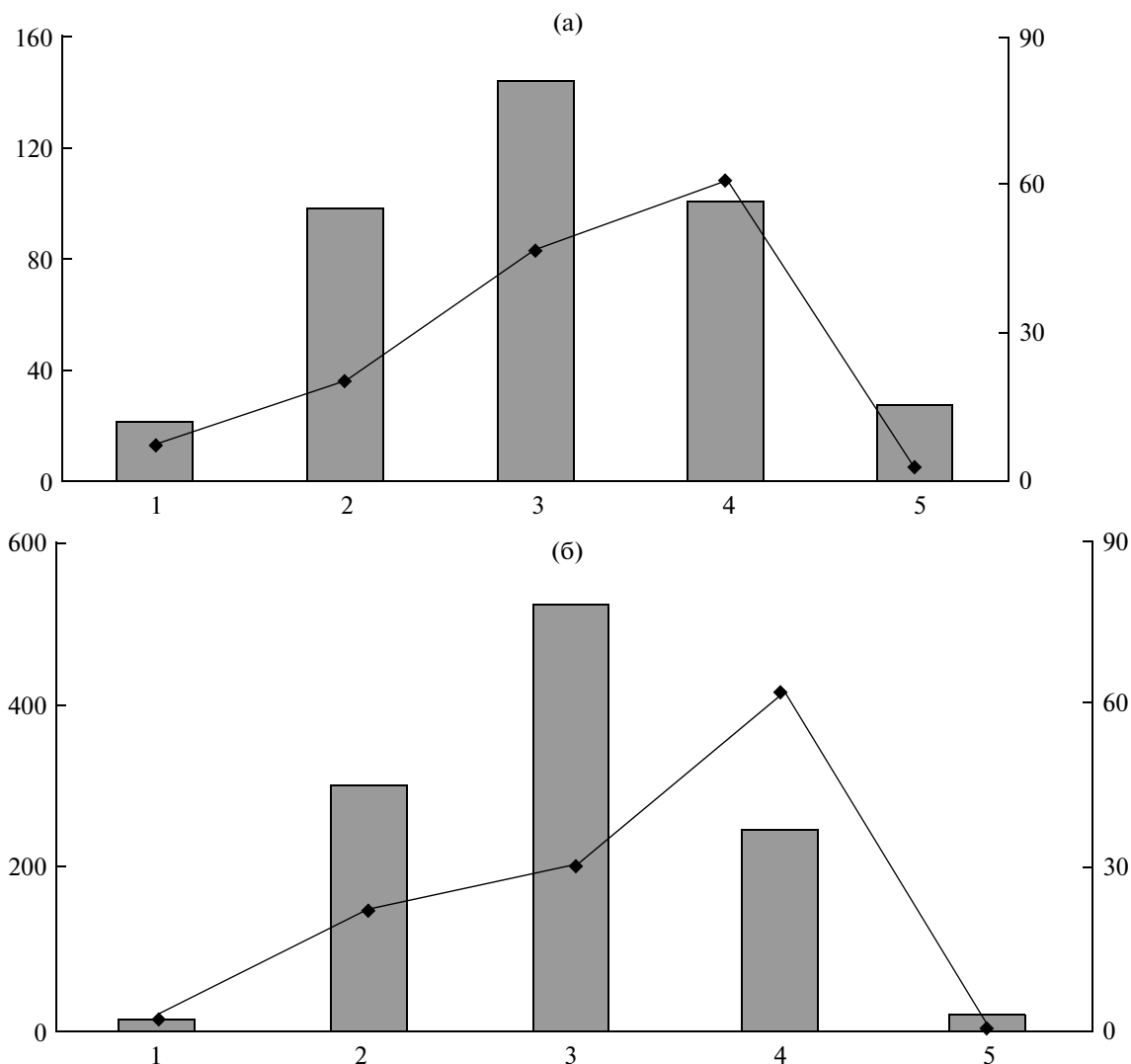


Рис. 1. Распределение активности пепсинободобных (оптимум рН 3.0) (а), тиоловых протеиназ (оптимум: б – рН 3.0, в – рН 3.6, г – рН 6.2, д – рН 8.6) и их белковых ингибиторов по субклеточным фракциям грены тутового шелкопряда. Здесь и на рис. 2: Линия – протеолитическая активность; столбики – активность ингибиторов. По оси ординат: слева – активность ингибиторов, справа – протеолитическая активность (усл. ед/мг белка); по оси абсцисс – субклеточные фракции: 1 – исходный гомогенат, 2 – ядерная фракция, 3 – митохондриальная фракция, 4 – лизосомальная фракция, 5 – постлизосомальная фракция.

цию ДНК, то есть индуцирует апоптоз (Куцый и др., 1999).

В отличие от аспартильных и цистеиновых протеиназ, активность сериновых протеаз не обнаружена в субклеточных фракциях грены 4 дня постдиапаузного развития (рис. 2, б, в), так как их основная активность проходит на конец эмбрионального развития насекомого. Исключение составляют лишь химотрипсиноподобные протеиназы (оптимум рН 7.2), активность которых обнаружена в постлизосомальной фракции (рис. 2, а).

Существенно, что белковые ингибиторы кислых пептидогидролаз локализованы в тех же компартаментах клетки, что и протеолитические фер-

менты. При этом активность белковых ингибиторов по отношению к активности соответствующего энзима имеет обратную корреляцию в каждой субклеточной фракции (рис. 1), что косвенно указывает на наличие функциональной связи между ними.

Известно, что в ядрах насекомых и млекопитающих обнаружены комплексы протеаза-ингибитор. Такие комплексы описаны для цистеиновых протеиназ (каспаза). Цистеиновая протеиназа связывается ковалентно с ингибитором через дисульфидную связь (Куцый и др., 1999). Высокая активность белковых ингибиторов аспартильных, цистеиновых и сериновых протеиназ в ядерной фракции грены (рис. 1, 2) свидетельствует на наш

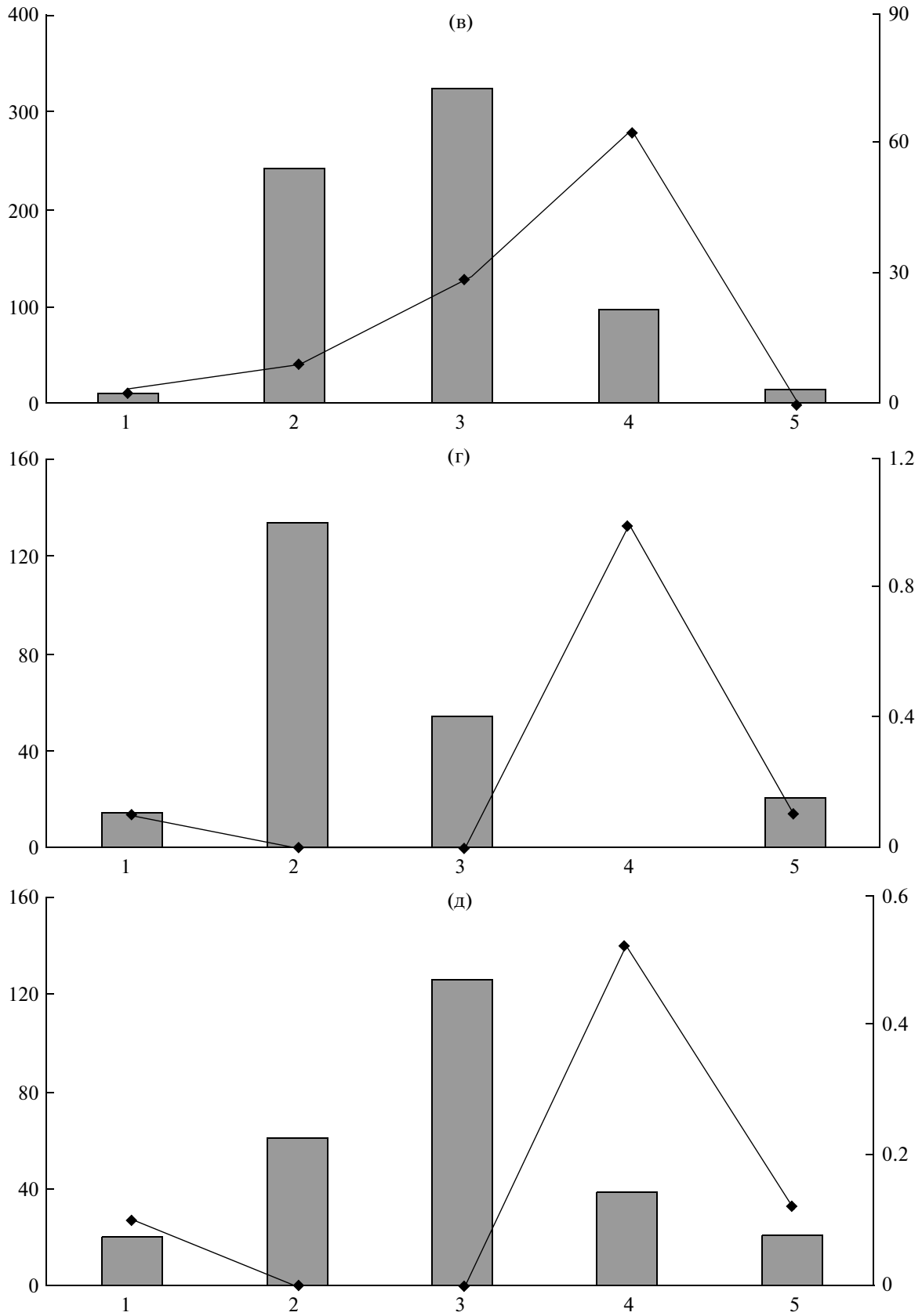


Рис. 1. Окончание.

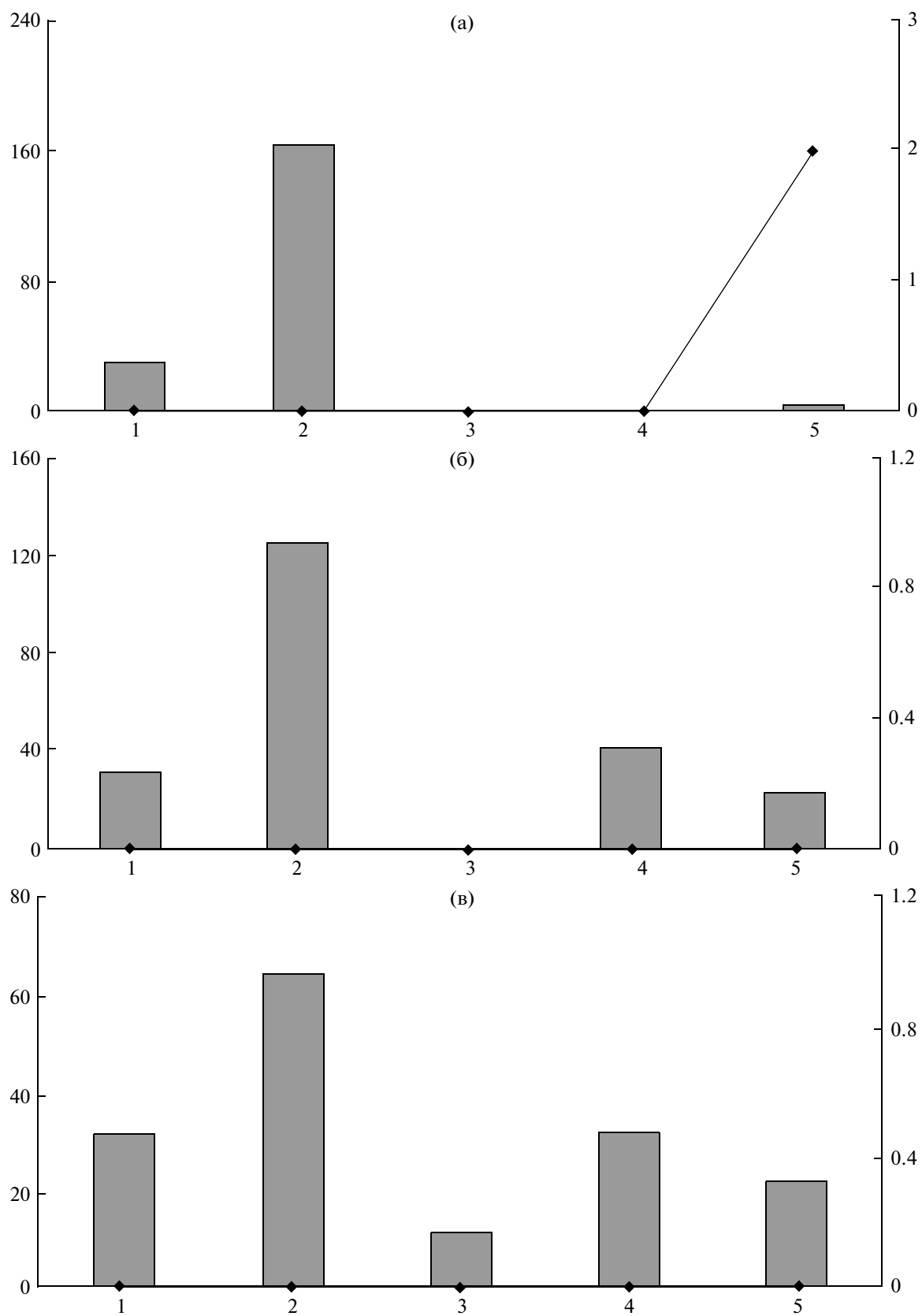


Рис. 2. Распределение активности химотрипсиноподобных (оптимум pH 7.2) (а), трипсиноподобных протеиназ (оптимум: δ – pH 6.2, σ – pH 9.0) и их белковых ингибиторов по субклеточным фракциям грены тутового шелкопряда.

взгляд, о возможном участии ингибиторов пептидогидролаз в поддержании структуры и целостности ядер, т.к. протеолитическое расщепление их структурных и функциональных белков приводит к нарушению структурной организации органелл, к разбалансировке упорядоченных биохимических реакций в них и в итоге к фрагментации ДНК и гибели клеток.

Таким образом, ядерные белковые ингибиторы протеаз грены тутового шелкопряда, возможно, принимают участие в регуляции механизмов процесса клеточной гибели (апоптоза).

Наличие высокой активности белковых ингибиторов цистеиновых и аспартильных протеиназ в митохондриальной фракции (рис. 1), по-видимому, связано с присутствием в этом компартменте соответствующих протеиназ и с защитой структурных и функциональных белков от протеолитического действия этих энзимов.

Локализация белковых ингибиторов протеиназ в лизосомальной фракции свидетельствует об участии этих белков в процессах регуляции гидролиза запасных белков желтка в ходе эмбрионального развития тутового шелкопряда. Так, высокий уровень активности пептидогидролаз в лизосомах, участвующих в деградации запасных белков, объясняется незначительной активностью белковых ингибиторов протеиназ в этих субклеточных структурах.

Таким образом, приведенные выше экспериментальные данные о субклеточной локализации цистеиновых, аспартильных и сериновых протеиназ и их белковых ингибиторов в грене тутового шелкопряда позволяют заключить, что основная функция белковых ингибиторов пептидогидролаз, состоящая в регуляции активности эндогенных протеиназ, реализуется в грене при осуществлении различных процессов, и, в том числе при защите внутриклеточных структурных и функциональных белков ядер и митохондрий от повреждающего действия протеиназ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банников В.М. Ферменты аминокислотного обмена и некоторые метаболически связанные с ними энзимы в эмбриогенезе тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МПГИ, 1983. 16 с.
- Иванов В.Г. Белковый комплекс и протеолитические ферменты желточного содержимого грены тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МПГИ, 1985. 14 с.
- Клунова С.М., Тарасенко Н.В., Киреева З.В. Изучение протеолитического комплекса ферментов в гемолимфе и шелкоотделительной железе тутового шелкопряда на заключительном этапе его личиночного развития // Биохимия насекомых. М.: МПГИ, 1987. С. 112–120.
- Коновалов Ю.Д. Свойства, локализация, роль и возможные пути регуляции активности протеиназ и аминотрансфераз в раннем онтогенезе рыб // Успехи соврем. биологии. 1986. Т. 101. № 3. С. 359–373.
- Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // В кн. "Современные методы в биохимии" под ред. Ореховича В.Н. М.: Медицина, 1977. С. 47–49.
- Куцкий Н.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. Участие протеаз в апоптозе // Биохимия. 1999. Т. 64. № 2. С. 149–163.
- Морозова В.П., Безбородова С.И. Кислая внеклеточная фосфомоноэстераза *Aspergillus clavatus* // Микробиология. 1972. Т. 12. № 3. С. 404–412.
- Назаров А.Ю. Характеристика протеолитического комплекса ферментов хроматина тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МПГУ, 1993. 14 с.
- Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КНЦ РАН, 1996. 104 с.
- Филиппович Ю.Б., Лантвега Т.Н., Никитина И.Л. Основы биохимии тутового шелкопряда. М.: Прометей, 1992. 306 с.
- Ярыгин Д.В., Клунова С.М., Филиппович Ю.Б. Исследование комплекса протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в эмбриогенезе тутового шелкопряда // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 4. С. 269–276.
- Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. 1939. V. 22. № 1. P. 79–82.
- Chapman H.A., Riese R.I., Shi G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology // Ann. Rev. Physiol. 1997. V. 59. P. 63–88.
- Cho W.L., Tsao S.M., Hays A.R., Walter R., Chen J.S., Shigirevskaya E.S., Raikhel A.S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 19. P. 13311–13321.
- Dittmer N.T., Raikhel A.S. Analysis of the Mosquito lysosomal aspartic protease gene – an insect reousekeeping gene with fat body-enhanced expression // Insect Biochem. Molec. Biol. 1997. V. 27. № 4. P. 323–335.
- Fabra M., Cerdà J. Ovarian cysteine proteinases in the teleost *Fundulus heteroclitus*: Molecular cloning and gene expression during vitellogenesis and oocyte maturation // Mol. Reprod. Dev. 2004. V. 67. P. 282–294.
- Gan H., Wang Y., Jang H.B., Mita K., Kanost M.R. A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta* // Insect Biochem. and Molec. Biol. 2001. V. 31. № 9. P. 887–898.
- Gburek J., Osada J., Siekierka M., Warwas M. Clearance of chicken cystatin from the rat circulation // Compar. Biochem. Physiol. B. 1995. V. 112. № 4. P. 697–701.
- Liu X.D., Mccarron R.C., Nordin J.H. A cysteine protease that processes insect vitellin-purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 52. P. 33344–33351.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Rangall R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 2. P. 265–275.

- Lu J., Warner A.H. Immunodetection of thiol proteinase levels in various populations of *Artemia cysts* and during development // *Biochem. Cell. Biol.* 1991. V. 69. № 2–3. P. 96–101.
- Ohshita T., Kido H. Simple preparation of rat-brain lysosomes and their proteolytic properties // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. № 1. P. 41–47.
- Spiess E., Bruning A., Gack S., Ulbricht B., Spring H., Trefz G., Ebert T. Cathepsin B activity in Human lung-tumor cell-lines-ultrastructural – localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular – level // *J. Histochem. Cytochem.* 1994. V. 42. № 7. P. 917–929.
- Takahashi S.Y., Yamamoto Y., Shionoya Y., Kageyama T. Cysteine proteinase from the eggs of the Silkworm, *Bombyx mori* – identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing *in vivo* and *in vitro* // *J. Biochem.* 1993. V. 114. № 2. P. 267–272.
- Vasilev A.V., Gutkin D.V., Dankova T.G., Vorobeichik T.A., Tutelyan V.A. Content of endogenous inhibitors of thiol – dependent proteinases in subcellular – fractions of rat hepatocytes // *Voprosy meditsinskoi khimii.* 1991. V. 37. № 6. P. 89–91.
- Wakayama T., Iseki Sh. Expression and localization of urinary trypsin inhibitor in the rat embryo // *Acta Histochem. Cytochem.* 1997. V. 30. № 5–6. P. 557–565.
- Yamahama Y., Uto N., Tamotsu S., Miyata T., Yamamoto Y., Watabe S., Takahashi S.Y. In vivo activation of pro-form *Bombyx cysteine* protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules // *J. Insect Physiol.* 2003. V. 49. № 2. P. 131–140.
- Yang X.M., Hou L.J., Dong D.J., Shao H.L., Wang J.H., Zhao X.F. Cathepsin B-like proteinase is involved in the decomposition of the adult fat body of *Helicoverpa armigera* // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2006. V. 62. № 1. P. 1–10.
- Yang X.M., Hou L.J., Dong D.J., Wang J.H., Zhao X.F. Expression and function of cathepsin B-like proteinase in larval hemocytes of *Helicoverpa armigera* during metamorphosis // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2007. V. 64. P. 164–174.
- Zhao X.F., An X.M., Wang J.H., Dong D.J., Du X.J., Sueda S., Kondo H. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development // *Arch. Insect biochem. Physiol.* 2005. V. 58. № 1. P. 39–46.
- Zhivotovsky B., Nicotera P., Orrenius S. Mechanisms of the multistage cleavage of chromatin in apoptosis // *Cell. Proliferat.* 1995. V. 28. № 4. P. 172.

Study of Intracellular Localization of the Proteolytic Enzyme Complex and Its Protein Inhibitors in *Bombyx* Grain

D. V. Yarygin^a, N. O. Minkova^a, and Yu. B. Filippovich^{†b}

^a Sholokhov Moscow State Humanitarian University, 109240, Moscow, Russia

^b Moscow State Pedagogical University, 129278, Moscow, Russia

e-mail: den282@mail.ru

Abstract—Intracellular localization of serine, cysteine and aspartate proteases, as well as their protein inhibitors, in *bombyx* grain in the postdiapause period of embryogenesis has been studied. Proteolytic activity of aspartate and cysteine proteases was found in lysosomal, mitochondrial, and nuclear fractions of grains. Serine protease activity was not observed in subcellular fractions of grains of the fourth day of postdiapause development. It has been shown that activities of protein inhibitors and certain peptide hydrolases in subcellular fractions provide consistent functioning and fine regulation of the proteolytic enzyme complex.

Keywords: subcellular fractions, peptide hydrolases, protein inhibitors, grain, *bombyx*