مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۱، ۳۱-۲۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,1:25-31, 2014

مطالعه کاتپسین‌های مرتبط با هضم هموگلوبین و ویتلین در نوزاد کنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس به روش زایموگرافی یک بعدی و دوبعدی

محمد طاهری[۱] صدیقه نبیان[۲*] غلامرضا نیکبخت[۳] پرستو یوسفی[۱]
۱) آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۲۲ مرداد ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۲۷ آبان ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: بیوشیمی هضم پروتئین‌ها در کنه‌ها یک فرآیند پیچیده است و مطالعات پروتئومیکس عملکردی که بیانگر نقش آنزیم‌های پروتئولیتیک است می‌تواند در ارتباط با انتخاب این آنزیم‌ها بعنوان واکسن مفید واقع شود. تبدیل پروتئین‌های خون از جمله هموگلوبین به ویتلین در کنه‌های بالغ ماده صورت می‌گیرد. همچنین هضم ویتلین در تخم و لاروکنه‌های خون نخورده در جهت تأمین اسیدآمینه و انرژی، از فرآیندهای مهم و حیاتی در روند تکاملی کنه‌ها می‌باشد. مطالعات متعدد، حاکی از وجود شبکه ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک در رابطه با هضم هموگلوبین و ویتلین می‌باشد. این آنزیم‌ها در اغلب موارد مربوط به سیستئین پپتیدازها و آسپارتیک پپتیدازها می‌باشند. **هدف:** هدف از این مطالعه، بررسی کاتپسین‌ها در عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، بوده است. **روش کار:** در این تحقیق، با اضافه نمودن هموگلوبین وژلاتین به ژل آکریل آمید و با روش زایموگرافی یک‌بعدی و دوبعدی، به بررسی کاتپسین‌ها در عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، پرداخته‌شد. **نتایج:** نتایج بدست‌آمده از زایموگرافی یک‌بعدی، نشان دهنده حضور یک باند حدود ۲۸ kDa بود. در زایموگرافی دوبعدی نیز نواحی شفاف در زمینه تیره ژل با وزن‌های مولکولی حدود ۲۱kDa تا ۶۵ و با pH ایزوالکتریک مختلف مربوط به کاتپسین‌ها، مشاهده‌شد. زمانی که DTT به بافر انکوباسیون (بافر استات ۱۰mM و pH=۴) اضافه گردید، فعالیت پروتئازی افزایش یافت که در زایموگرافی یک‌بعدی به صورت تشکیل باندشفاف واضح‌تر در مقایسه با نمونه‌های قرار گرفته در بافر فاقد DTT نمایان گردید. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به این که pH بافر انکوباسیون اسیدی بوده و با اضافه نمودن DTT فعالیت این آنزیم‌ها افزایش یافته است، لذا به‌نظر می‌رسد که برخی از این آنزیم‌های پروتئولیتیک مربوط به سیستئین پروتئازها بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: کاتپسین، هموگلوبین، ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، ویتلین

مقدمه

کنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، یک کنه تک میزبانه می‌باشد که علاوه بر ایجاد خسارات مستقیم ناشی از خونخواری از بدن دام‌ها، همچنین سبب انتقال برخی از اجرام بیماریزا از جمله بابزیا بیژمینا و آناپلاسما مارژیناله در گاوهای مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری می‌گردد (۵) تا کنون یکی از مهمترین روش‌های مبارزه علیه این کنه استفاده از مواد شیمیایی بوده است اما با توجه به احتمال ایجاد کنه‌های مقاوم به این سموم و ایجاد آلودگی‌های محیطی و باقیمانده‌های این سموم در شیر و گوشت دام‌ها محدودیت‌هایی در مصرف این سموم ایجاد شده است و لذا توجهات بسیاری از محققین معطوف تهیه واکسن علیه این کنه‌ها گردیده است. لذا شناخت فرآیندهای فیزیولوژیک حیاتی کنه‌ها مانند هضم خون و ویتلین که در رشد تخم و نوزاد تأثیرگذار می‌باشد در جهت توسعه روش‌های کنترلی جدید علیه کنه‌ها کمک کننده خواهد بود (۲۴).

تبدیل پروتئین‌های خون (از جمله هموگلوبین) به ویتلوژنین در کنه‌های بالغ ماده صورت می‌گیرد. هضم داخل سلولی هموگلوبین توسط ترکیب اندوزوم‌ها با لیزوزوم‌های اولیه و سپس تشکیل لیزوزوم‌های ثانویه و در شرائط pH اسیدی کمتر از ۶/۳ در سلول‌های اپی تلیال روده میانی کنه‌ها، شروع می‌شود (۱۶). ویتلوژنین، پیش ساز ویتلین می‌باشد که در سلول‌های روده میانی کنه و از مواد ناشی از هضم هموگلوبین ساخته می‌شود. سلول‌های تولید کننده ویتلوژن در مجاورت سلول‌های هضم کننده هموگلوبین قرار دارند و مواد ایجاد شده ناشی از هضم هموگلوبین را از این سلول‌ها دریافت می‌نمایند تا در جهت ساخت و ساز ویتلوژنین بکار گیرند. ویتلین بیشترین پروتئین زرده می‌باشد (۵).

همچنین هضم ویتلین در جهت توسعه و تکامل تخم و مرحله لاروی کنه خون نخورده انجام می‌پذیرد، به طوریکه این پروتئین به عنوان منبع اسید آمینه و انرژی در فرآیندهای مهم حیاتی و در روند تکاملی کنه‌ها نقش دارد (۷).

کاتپسین‌ها، پروتئازهای لیزوزومی می‌باشند که بر مبنای نوع اسید آمینه مکان فعالیتشان نامگذاری می‌شوند و دارای اعضاء مختلفی مانند سیستئین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها و سرین پروتئازها می‌باشند. کاتپسین‌ها ابتدا به صورت زایموژن غیر فعال سنتز می‌شوند و پس از عبور

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۴۴۶۹-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: nabian@ut.ac.ir

از شبکه آندوپلاسمی دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شوند و سپس به داخل محیط اسیدی لیزوزوم می‌روند. نقش فیزیولوژیک این آنزیم‌ها تخریب پروتئین‌های داخل سلولی و همچنین پروتئین‌های خارج سلولی است که از طریق اندوسیتوز وارد سلول شده‌اند. تفاوت‌های ساختمانی میان کاتپسین‌های مختلف منجر به داشتن سوبستراهای متنوع و همچنین مکانیزم‌های مهارشوندگی مختلف برای این آنزیم‌ها می‌گردد. برای مثال برخی از این پروتئازها دارای فعالیت اندوپپتیدازی برای پروتئین‌هایی مانند هموگلوبین، کازئین، کلاژن و ایمونوگلوبولین‌ها و غیره می‌باشند و در تخریب پروتئین‌ها نقش دارند. همچنین در فرآوری پروتئین‌ها مانند تنظم فعال شدن پیش هورمون‌ها، پیش آنزیم‌ها، متابولیسم، بازسازی بافت، آپپتوزیس دخالت دارند(۴،۱۲). در این تحقیق، با استفاده از روش هموگلوبین و ژلاتین زایموگرافی یک بعدی و دو بعدی به بررسی کاتپسین‌ها در عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، پرداخته شد.

مواد و روش کار

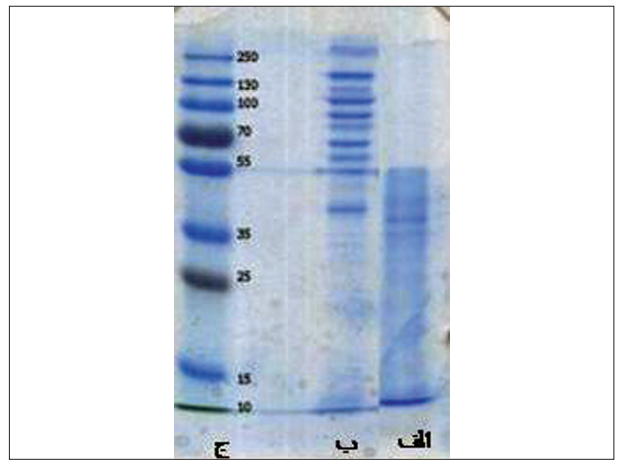
الف- جمع آوری وکشت کنه: پس از جمع آوری کنه‌های ماده کاملاً خون خورده از روی گاوهای ارجاعی به کشتارگاه روستای بندپی شهرستان بابل، کنه‌های مذکور پس از حمام الکل ۷۰٪ در دستجات ۵ عددی در داخل لوله‌های پرورش کنه تقسیم شده و سپس در داخل انکوباتور با دمای $28^{o}C$ و رطوبت ۸۵٪ قرار داده شدند. پس از تخمگذاری کامل کنه‌ها در طی حدود ۷ روز و از تخم برآیی آنها در طی مدت ۲ هفته، کنه‌های بالغ تلف شده حذف گردیده و پس از طی زمان تقریبی ۱۰ روز جهت محکم شدن ضمائم دهانی، نوزادها بر روی گوساله‌های نر ۳ ماهه نژاد هلشتاین به‌منظور خونخواری انتقال یافتند. پس از طی مدت حدود ۱۸ تا ۲۱ روز اقدام به جمع آوری کنه‌های بالغ خون خورده از روی بدن دام گردید(۳).

ب- زایموگرافی یک بعدی: جهت تهیه عصاره نوزاد کنه ابتدا نوزادها داخل هاون چینی به همراه بافر فسفات نمکی با PH=۷/۲ له گردیده و سپس در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از جداسازی مایع رویی پروتئین سنجی با روش برادفورد انجام پذیرفت(۲). سپس عصاره نوزاد کنه در بافر نمونه SDS- PAGE فاقد مواد احیاء کننده تهیه گردید بطوری که ۲۰µL از عصاره نوزاد که حاوی ۲۰۰۰µg/mL پروتئین بود با ۲۰µL بافر نمونه SDS-PAGE مخلوط گردید و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۲µL آن در گوده مربوطه ریخته شد و جهت تعیین وزن مولکولی باندهای به دست آمده از مارکر پروتئینی استفاده گردید. جهت الکتروفورز نمونه‌ها، بر روی ژل پلی اکریل آمید(ژل رویی ۴٪) و ژل جداکننده ۱۲٪ که به آن ۰/۱٪ هموگلوبین و یا ژلاتین اضافه گردیده بود، قرار داده شد و در سیستم بافری لاملی الکتروفورز صورت گرفت. پس از انجام عمل الکتروفورز با ولتاژ ۸۰، ژل به مدت نیم ساعت در محلول حاوی تریتون X۱۰۰ با غلظت ۲/۵٪ جهت حذف SDS قرار داده شد. سپس ژل با آب مقطر شستشو داده شد و مدت ۱۸ ساعت در بافر استات ۱۰mM با PH=۴ و حاوی DTT ۲mmol در انکوباتور 37^{o} قرار داده شد و سپس با کوماسی بلورنگ آمیزی گردید. پس از انجام رنگبری، باندهای مربوط به پروتئازها به صورت روشن در زمینه آبی تیره آشکار گردید(۶).

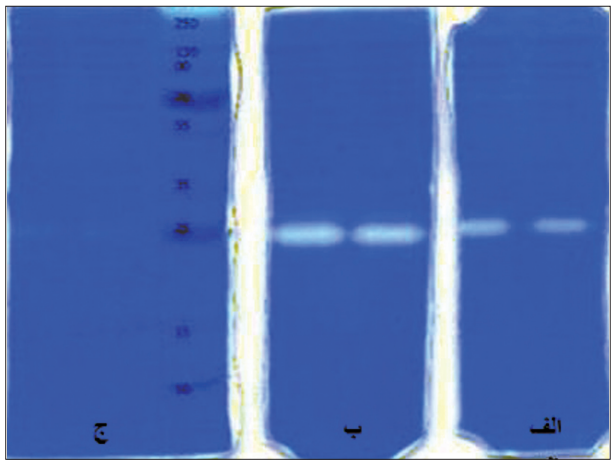
ج- زایموگرافی دوبعدی: انجام این آزمایش طبق روش Palaksha و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مقداری تغییرات انجام پذیرفت. مقدار ۰/۱g نوزاد کنه بوافیلوس آنولاتوس در هاون چینی ریخته شده و به آن ۳mL از محلول لیزکننده (شامل: اوره ۲mol، تیواوره ۰/۵mol، چپس ۱٪ و بیولیت ۱۰-۳=PH به میزان ۰/۲٪) اضافه نموده و به مدت یک ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در g ۱۲۰۰۰ و دمای $4^{o}C$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از جداسازی محلول رویی با روش برادفورد، پروتئین سنجی انجام پذیرفت. مقدار ۳۰۰µg از پروتئین کنه‌ها در حجم ۱۲۰µL در سینی مخصوص آبگیری مجدد (رهیدراسیون) قرار گرفت و سپس نوار شیب (IPG) ۷Cm PH ساخت شرکت بیوراد با PH=۳-۱۰ غیر خطی (non linear) به مدت ۱۸ ساعت بر روی نمونه قرار داده شد. در این مدت نیز جهت ممانعت از تبخیر نمونه بر روی آن روغن معدنی ریخته شد. پس از خشک کردن نوار IPG بر روی کاغذ خشک کن، این نوار، جهت انجام ایزوالکتروفوکوسینگ در دستگاه مربوطه ساخت شرکت بیوراد قرار داده شد و دستگاه جهت انجام الکتروفورز طوری تنظیم گردید که ابتدا ۲۰ دقیقه با ۲۵۰V و سپس به تدریج ولتاژ دستگاه افزایش یافته به طوری که در طی ۲ ساعت به ۴۰۰۰V رسید و نهایتاً در طی ۴ ساعت به ۱۴۰۰۰V در ساعت ثابت گردید. سپس نوار IPG به مدت ۲۰ دقیقه در بافر متعادل سازی (حاوی اوره ۲mol، تریس ۵۰mmol، برومو فنل بلو ۰/۰۰۲٪، SDS ۲٪، گلیسرول ۳۰٪ با PH=۸/۸) قرار گرفت. سپس نوار IPG بر روی ژل جداکننده SDS-PAGE با غلظت ۱۲٪ و حاوی ۰/۱٪ ژلاتین انتقال یافت و پس از انجام الکتروفورز با ولتاژ ۸۰V، ژل مربوطه به مدت ۰/۵ ساعت در محلول حاوی تریتون X۱۰۰ به میزان ۲/۵٪ قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت یک شب در بافر سیترات ۰/۱mol با PH=۴ حاوی ۲mmol دی تیوتریتول، قرار داده شد و سپس با کوماسی بلورنگ آمیزی و پس از آن رنگبری شد(۱۹).

نتایج

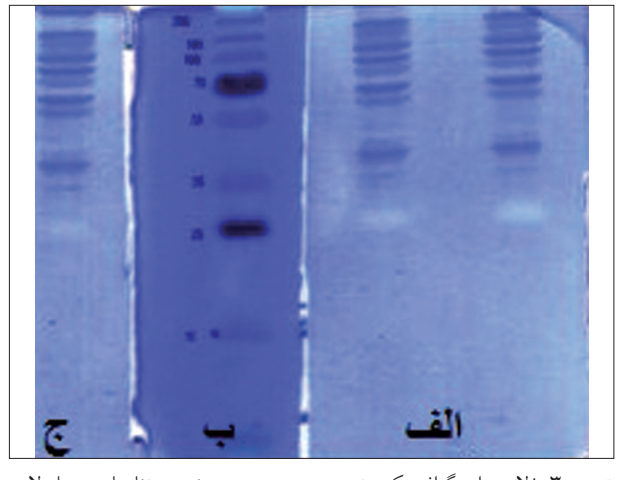
الف- هضم پروتئین‌های عصاره نوزاد کنه توسط کاتپسین‌ها: در تصویر ۱ به نمایش هضم پروتئین‌های عصاره لاروی کنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس توسط کاتپسین‌ها پرداخته شده است. به این منظور عصاره کنه در بافرهای PBS با PH=۷/۲ و بافر استات با PH=۳/۵ به مدت یک شب در $37^{o}C$ قرار داده شد. پس از انجام عمل SDS- PAGE چنانچه در تصویر مشاهده می‌شود، عصاره پروتئینی لاروکنه در بافر استات، هضم شده است و به صورت اسمیر دیده می‌شود (ستون ۳) که نمایانگر حضور کاتپسین‌ها و فعالیت آنها می‌باشد.



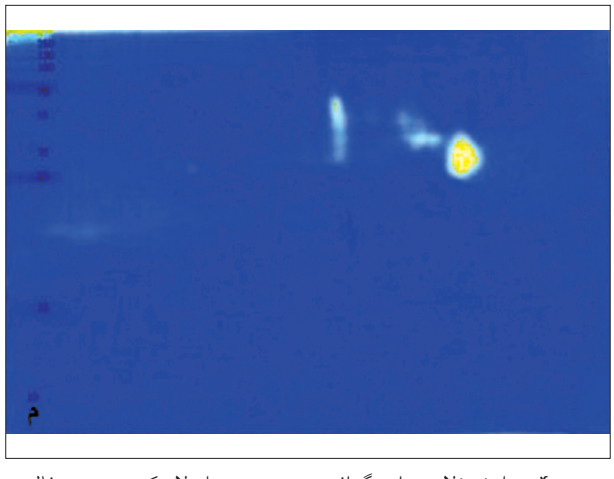
تصویر ۱. هضم پروتئین‌های عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس توسط کاتپسین‌ها. هضم عصاره لاروکنه ری پی سفالوس(بوافیلوس) آنولاتوس در بافر اسیدی (بافر استات۳/۵=pH) (الف)، عدم هضم عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس در بافر خنثی (بافر فسفات۷/۲=pH(ب)، مارکر وزن مولکولی (ج).



تصویر۲. نمایش هموگلوبین زایموگرافی جهت بررسی سیستئین پروتئازها در عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، انکوباسیون ژل در بافر فاقد DTTسبب ایجاد ناحیه شفاف بواسطه هضم هموگلوبین توسط کاتپسین‌ها گردید (الف)، انکوباسیون ژل در بافر حاوی DTT سبب ایجاد ناحیه شفاف بیشتری بواسطه هضم هموگلوبین در اثر افزایش فعالیت کاتپسین ها شد(ب)، مارکر وزن مولکولی(ج).



تصویر ۳. ژلاتین زایموگرافی یک بعدی جهت بررسی سیستئین پروتئازها درعصاره لارو کنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، بافر انکوباسیون ژل در بافر حاوی DTT سبب ایجاد ناحیه شفاف بیشتری بواسطه هضم ژلاتین در اثر افزایش فعالیت کاتپسین ها شد (الف)، مارکر وزن مولکولی (ب)، انکوباسیون ژل در بافر فاقد DTT سبب ایجاد ناحیه شفاف بواسطه هضم ژلاتین توسط کاتپسین ها گردید (ج).



تصویر۴. نمایش ژلاتین زایموگرافی دو بعدی عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس جهت بررسی کاتپسین‌ها- نقاط شفاف در زمینه تیره مربوط به کاتپسین‌ها می‌باشد که در نواحی با وزن‌های مولکولی در حدود ۲۱ تا ۶۵ و درنواحی مختلف عرض ژل با PH ایزوالکتریک مختلف قرار گرفته‌اند. مارکر وزن مولکولی(م).

از آن جایی که بر اساس منابع موجود، غالب پروتئین های عصاره لاروی مربوط به ویتلین می باشد و عمدتاً در طیف وزن مولکولی ۴۵kDa تا ۲۰۰ می باشند، لذا این مطلب می تواند نشان دهنده هضم ویتلین توسط کاتپسین ها باشد.

ب- هموگلوبین زایموگرافی یک بعدی: جهت بررسی سیستئین پروتئازها در عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس، با اضافه نمودن ۰/۱٪ هموگلوبین به ژل اکریل آمید، زایموگرافی انجام پذیرفت. قابل ذکر است که به‌منظور دقت بیشتر، نمونه‌ها به صورت دو تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. چنانچه ملاحظه می شود هنگامی که در بافر از DTT استفاده شده است فعالیت پروتئازی افزایش یافته است که به صورت تشکیل باند شفاف واضح تر در مقایسه با نمونه‌های قرار گرفته در بافر فاقد DTT تظاهر یافته است که می تواند حاکی از وجود سیستئین پروتئازها باشد.

ج- ژلاتین زایموگرافی یک بعدی: در مرحله دیگر، آزمایش زایموگرافی با استفاده از ژلاتین انجام گرفت. چنان که در تصویر ۳ مشاهده می شود نتایج مشابهی با نتایج تصویر ۲ بدست آمده است.

د- ژلاتین زایموگرافی دو بعدی: با توجه به نتایج زایموگرافی یک بعدی عصاره پروتئینی لاروکنه، مبنی بر اثبات حضور کاتپسین‌ها (تصاویر ۲،۳)، بمنظور بررسی بیشتر آنها اقدام به انجام زایموگرافی دو بعدی گردید. چنانچه در تصویر ۴ نشان داده شده است نقاط شفاف در زمینه تیره

مربوط به کاتپسین‌ها می‌باشد که در نواحی با وزن‌های مولکولی حدود ۲۱kDa تا ۶۵kDa و با PH ایزوالکتریک مختلف در نقاط مختلف ژل قرار گرفته‌اند.

بحث

بیوشیمی هضم پروتئین‌ها در کنه‌ها یک فرآیند پیچیده است و مطالعات پروتئومیکس عملکردی که بیانگر نقش آنزیم‌های پروتئولیتیک است می‌تواند در ارتباط با انتخاب این آنزیم‌ها بعنوان واکسن مفید واقع شود (۹،۱۳). مطالعات متعدد، حاکی از وجود شبکه‌ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک در رابطه با هضم هموگلوبین و ویتلین می‌باشند. این آنزیم‌ها در اغلب موارد مربوط به سیستئین پپتیدازها و آسپارتیک پپتیدازها می‌باشند. اگرچه پپتیدازهای مربوط به سایر کلاس‌های آنزیم‌ها نیز در روده میانی کنه‌ها بیان می‌شوند، برای مثال متالوآمینوپپتیداز و سرین اندوپپتیداز نیز در روده میانی کنه دیده شده است. خرد شدن هموگلوبین ابتدا توسط کاتپسین D و L شروع می‌شود. برش‌های اولیه مولکول هموگلوبین صورت می‌گیرد و سپس توسط آمینوپپتیدازها و کربوکسی پپتیدازها مثل کاتپسین B و C ادامه می‌یابد تا قطعات حاصل از برش‌های اولیه به قطعات دی پپتیدی تبدیل شوند. همچنین مونوپپتیدازها در آزادسازی اسیدهای آمینه از پپتیدهای حاصل از هضم هموگلوبین نقش ایفاء می‌نمایند (۱۰).

تعدادی از آنزیم‌های پروتئولیتیک که در خرد کردن ویتلین نقش دارند در بافت چربی و روده میانی ساخته شده و پس از ورود به همولنف توسط اُاسیست‌های در حال رشد اخذ می‌شوند، که از آن میان می‌توان به سیستئین اندوپپتیدازهایی مانند کاتپسین B (۱۵) و کاتپسین L (۸) وکاتپسین D (۱)، آسپارتیک اندوپپتیداز (۲۰)، آسپارتیک پروتئاز متصل شونده به هم (۲۳) و همچنین سرین اندوپپتیداز (۱۱) اشاره نمود.

هضم ویتلین در ساختمان‌هایی به نام گرانول‌های زرده که در حقیقت نوعی از لیزوزوم‌های تغییر یافته می‌باشند، در شرایط اسیدی صورت می‌گیرد. پمپ‌های پروتون موجود در غشاء گرانول‌های زرده، تحت تأثیر سیگنال‌های سیتوپلاسمی، سبب اسیدی شدن سیتوپلاسم این گرانول‌ها می‌گردد و این اسیدی شدن سبب تبدیل پروآنزیم‌های موجود در گرانول‌ها به آنزیم فعال و همچنین جداسازی آنزیم‌ها از مهارکننده‌های خودشان می‌گردد. لذا این مکانیسم کنترلی در مراحل تکامل تخم و رشد و نمو لارو سبب فعال سازی این آنزیم‌ها گردیده و سبب هضم ویتلین در مواقع لزوم می‌گردد (۷).

در این تحقیق، ابتدا به بررسی هضم پروتئین‌های عصاره لاروکنه ری پی سفالوس (بوافیلوس) آنولاتوس توسط کاتپسین‌ها پرداخته شده است. چنانچه در تصویر ۱ مشاهده می‌شود، عصاره پروتئینی لاروکنه در بافر استات، هضم شده است و به صورت اسمیر دیده می‌شود که این موضوع نمایانگر حضور کاتپسین‌ها و فعالیت آنها می‌باشد. از آن جایی که غالب پروتئین‌های عصاره لاروی مربوط به ویتلین می‌باشد لذا این مطلب می‌تواند حاکی از توانایی هضم ویتلین توسط کاتپسین‌ها باشد.

کاتپسین‌ها به پروتئازهای داخل سلولی اطلاق می‌شود که غالباً در لیزوزوم‌ها قرار دارند و در مقادیر PH نسبتاً اسیدی لیزوزوم (pH=۵) فعال می‌باشند. در این رابطه استثنائاتی وجود دارد. برای مثال اغلب پروتئازهای لیزوزومی سیستئین پروتئاز هستند. اما کاتپسین A و G موجود در این اندامک‌ها، مربوط به سرین پروتئازها می‌باشند. همچنین کاتپسین D و E از نوع آسپارتیک پروتئاز هستند. کاتپسین B یک گلیکوپروتئین می‌باشد که کربوهیدرات‌های آن اختصاصی گونه می‌باشد. وزن مولکولی کاتپسین B، بدون کربوهیدرات در پستانداران ۲۷/۵kDa تا ۲۹kDa می‌باشد و به صورت یک پیش آنزیم ۳۹kDa تولید می‌شود.

شواهد متعددی مبنی بر نقش کاتپسین‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیک مختلف کنه وجود دارد. بسیاری از پروتئین‌ها، سوبستراهای مناسبی برای انواع کاتپسین‌ها می‌باشند (۱۸).

Sojka و همکاران در سال ۲۰۱۱، اطلاعاتی را در زمینه عملکرد سیستئین پروتئازها در کنه ایکسودس ریسینوس جمع‌آوری نمودند و نقش این آنزیم‌ها را در خونخواری و رشد کنه مشخص نمودند. همچنین عملکرد این آنزیم‌ها را در هماهنگی با سایر پروتئازهای موجود در سلول‌های روده میانی کنه، در رابطه با هضم خون و مواد غذایی نشان دادند (۲۲).

مطالعات بافت روده کنه هما فیزالیس لونگی کورنیس، حاکی از وجود آنزیم‌های پروتئولیتیک متعددی از جمله سیستئین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها، لوسین متالوآمینوپپتیدازها و سرین اندوپپتیدازها بوده است (۱۷).

در ادامه بررسی حاضر، با استفاده از هموگلوبین و ژلاتین، در ژل اکریل آمید و با استفاده از روش زایموگرافی مستقیم یک بعدی و دو بعدی به بررسی کاتپسین‌ها در عصاره لاروکنه بوافیلوس آنولاتوس، پرداخته شد. چنانچه در تصویر ۲ ملاحظه می‌شود هنگامی‌که در بافر انکوباسیون زایموگرافی مستقیم یک بعدی از DTT استفاده شد، فعالیت پروتئازی افزایش یافته است که به صورت تشکیل باند شفاف واضح تردر ناحیه با وزن مولکولی حدود ۲۸kDa و در مقایسه با زمانی که از DTT استفاده نشد، مشخص گردید (تصاویر ۲،۳) که می‌تواند وجود سیستئین پروتئازها را اثبات نماید.

با توجه به نتایج زایموگرافی یک بعدی عصاره پروتئینی لاروکنه، مبنی بر حضور کاتپسین‌ها (تصاویر ۲،۳) به‌منظور بررسی بیشتر آنها اقدام به انجام زایموگرافی دوبعدی با استفاده از سوبسترای ژلاتین گردید. چنانچه در شکل ۴ نشان داده شده است نقاط شفاف در زمینه تیره مربوط به کاتپسین‌ها می‌باشد که در نواحی با وزن مولکولی حدود ۲۱kDa تا ۶۵kDa و با PH ایزوالکتریک مختلف قرار گرفته‌اند.

Logullo و همکاران در سال ۱۹۹۸، یک پیش ساز آسپارتیک پروتئاز را از تخم کنه بوافیلوس میکروپلوس با روش کروماتوگرافی تعویض یونی و ژل فیلتراسیون جدا کرده و آن را پروکاتپسین زرده نامگذاری نمودند و در آزمایش الکتروفورز به صورت دو باند ۴۹kDa و ۵۴kDa مشخص کردند. انکوباسیون این پیش آنزیم در بافر با pH=۵/۳ سبب اتوپروتئولیز آنزیم گشت و همچنین مهارکننده پپستاتین فعالیت هیدرولیتیک این آنزیم بر علیه هموگلوبین را مهار کرد(۱۴).

در بررسی که با استفاده از عصاره تخم کنه نرم اورنیتودوروس موباتا صورت گرفت، حداکثر فعالیت خردکنندگی ویتلین در pH=۳/۵-۳ ظاهر گشت، در صورتی که در pH خنثی هیچ گونه فعالیت پروتئولیتیک مشاهده نشد. با استفاده از سوبستراهای اختصاصی و مهارکننده‌ها این فعالیت پروتئولیتیک به یک آنزیم شبیه کاتپسین L، نسبت داده شد. وزن مولکولی این آنزیم با روش زایموگرافی، ۳۷kDa تا ۳۹kDa بود(۸).

وجود اختلافاتی در ارتباط با وزن مولکولی و بار الکتریکی پروتئین های مربوط به کاتپسین ها با برخی از تحقیقات قبلی می تواند به دلائل زیر توجیه گردد:

۱ـ وجود اختلافات مربوط به تفاوت های پروتئینی موجود در جنس و گونه های مختلف.

۲ـ وجود انواع مختلف این آنزیم ها از جمله: انواع سیستئین پروتئازها و آسپارتیک پروتئازها که در مراحل مختلف چرخه زندگی و در بافت های مختلف کنه ها به اشکال و مقادیر مختلف تولید می شوند.

۳ـ وجود ایزوفرم های مختلف این آنزیم ها به دلیل پیرایش های متناوب mRNA، وجود ژن های متعدد برای این آنزیم ها و تغییرات پس از ترجمه.

۴ـ به دلیل اتصال آنزیم ها به پروتئین های ویتلین و جدا شدن آنها در شرائط PH اسیدی و اتولیز آنها ممکن است در وزن مولکولی آنها تنوع ایجاد شود.

نتایج بدست آمده در این بررسی حضور یک شبکه آنزیمی دخالت گر در هضم هموگلوبین و ژلاتین را در کنه بوافیلوس آنولاتوس نشان داده است.

با توجه به این که، تبدیل پروتئین های خون به ترکیبات زرده ای (در کنه های ماده) و هضم ذخائر زرده‌ای در طی مراحل گرسنگی (تخم و لاروهای خون نخورده) دو فرآیند مهم در فیزیولوژی تغذیه و تولید مثل کنه ها می باشند، لذا به نظر می رسد مطالعات بیشتر در زمینه بیوشیمی سیستم هضمی کنه ها و شناخت این آنزیم ها بتواند به عنوان هدفی در توسعه واکسن های ضد کنه ای مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می دانند که از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، جهت تخصیص اعتبارات مالی به منظور انجام تحقیق حاضر، تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Abreu, L.A., Valle, D., Manso, P.P., Façanha, A.R., Pelajo-Machado, M., Masuda, H., Masuda, A., Vaz, I. Jr., Lenzi, H., Oliveira, P.L., Logullo, C. (2004) Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. Insect Biochem Mol Biol. 34: 443-9.
2. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-54.
3. Brown, S.J., Shapiro, S.Z., Askenase, P.W. (1984) Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. J Immunol. 133: 3319-25.
4. Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, G.P. (1997) Emerging roles of cysteine protease in human biology. Ann Rev Physiol. 97: 63-88.
5. Estrada-Pena, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. (2004) Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species.University of Zaragoza, Spain.
6. Estrela, A.B., Seixas, A., Teixeira, O., Pinto, A.F., Termignoni, C. (2010) Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larvae and females. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 157: 326-35.
7. Fagotto, F. (1995) Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. J Cell Sci. 108: 3645-3647.
8. Fagotto, F. (1990) Yolk degradation in tick eggs: Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. Arch Insect Biochem Physiol.14: 217-235.
9. Franta, Z., Sojka, D., Frantova, H., Dvorak, J., Horn, M., Srba, J., Talacko, P., Mares, M., Schneider, E., Craik, C.S., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Kopacek, P. (2011) IrCL1-the haemoglobinolytic

cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. Int J Parasitol. 41: 1253-62.

10. Horn, M., Nussbaumerova, M., Miloslav, S., Kovarova, Z., Srba, J., Franta, Z.K., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopácek, P., Mares, M. (2009) Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multipeptidase pathway by functional proteomics. Chem Biol. 16: 1053-1063.
11. Ikeda, M., Sasaki, T., Yamashita, O. (1990) Purification and characterization of proteases responsible for vitellin degradation of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 20: 725-734.
12. Jayashankar, L. (2007) Cathepsin B: Novel cysteine proteases of the papain family. Pharmacol Rev. 5: 2.
13. Leal, A.T., Seixas, A., Pohl, P.C., Ferreira, C.A, Logullo, C. (2006) Vaccination of bovines with recombinant Boophilus Yolk pro-Cathepsin. Vet Immunol Immunopathol. 114: 341-5.
14. Logullo, C., Vaz, I.D., Sorgine, M.H., Silva, G.O., Faria, F.S. (1998) Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. Parasitology. 116: 525-532.
15. Medina, M., Leon, P., Vallejo, C.G. (1988) Drosophila cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. Arch Biochem Biophys. 263: 355-363.
16. Mendiola, J., Alonso, M., Marquetti, M.C., Finlay, C. (1996) *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. Exp Parasitol. 82: 27-33.
17. Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Huang, X., Motobu, M., Alim, M.A., Fujisaki, K. (2007) Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. J Insect Physiol. 53: 195-203.
18. Otto, H., Schirmeister, T. (1997) Cysteine proteases and their inhibitors. Chem Rev. 97: 133-171.
19. Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R, Jung, T.S. (2008) Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol. 24: 479-88.
20. Pohl, P.C., Sorgine, M.H., Leal, A.T., Logullo, C., Oliveira, P.L., Vaz Ida, S.J.r., Masuda, A. (2008) An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 151: 392-9.
21. Seixas, A., Leal, A.T., Nascimento-Silva, M.C., Masuda, A., Termignoni, L., da Silva Vaz, I.J.r. (2008) Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). Vet Immunol Immunopathol. 124: 332-40.
22. Sojka, D.D., Francischetti, M.B., Calvo, E.E., Kotsyfakis, M.M. (2011) Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites. Exp Med Biol. 712: 177-91.
23. Sorgine, M.H., Logullo, C., Zingali, R.B., Paiva-Silva, G.O., Juliano, L., Oliveira, P.L. (2000) A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick Boophilus microplus. J Biol Chem. 275: 28659-28665.
24. Willadsen, P. (2006) Vaccination against ectoparasites. Parasitology. 133: S9-S25.

Study of cathepsins involved in haemoglobin and vitellin digestion in *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae by one- and two-dimensional zymography

Taheri, M.[1], Nabian, S.[2*], Nikbakht, Gh.R.[3], Yousefi, P.[1]

[1]*Rastegar Reference Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Parasitology and Research Center of Ticks and Tick Borne Disease, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

[3]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 13 August 2013 , Accepted 18 November 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Enzymatic digestion of proteins in ticks is a complex process and the study of functional proteomics of these enzymes can help to select them as possible vaccine candidates. Blood protein changes (e.g. haemoglobin to vitellin) occur in female mature ticks. Vitellin digestion, as an amino acid and energy source, is one of the vital and important processes in development and evolution of tick eggs and larval stage of unengorged ticks. Several studies reveal a network of proteolytic enzymes involved in haemoglobin and vitellin digestion. These enzymes are mostly cysteine and aspartic peptidases. **OBJECTIVES:** The aim of this study was the detection of the cathepsins in *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae extract. **METHODS:** In the current research, cysteine proteases extracted from *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae were studied by one- and two-dimensional zymography. **RESULTS:** Findings from one dimensional zymography showed a transparent band with 28 KDa. In two-dimensional zymography transparent area are seen in the dark gel background distributed in 21 to 65 KDa zones related to cathepsins. When DTT was added to incubation buffer (10 mM acetate buffer, pH= 4), the proteolytic activity of some enzymes was increased and appeared as more clear transparent bands in one-dimentional zymography compared with samples incubated in buffer without DTT. **CONCLUSIONS:** As the pH of incubation buffer was acidic and adding DTT resulted in increased activity of the enzymes, therefore, some of these proteolytic enzymes are assumed to be cysteine proteases.

Key words: cathepsin, haemoglobin, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, vitellin

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Digestion of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae proteinase by cathepsins.

Figure2. Showing of cysteine proteinase in *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae using heamoglobin zymography.

Figure3. Showing cysteine proteinase in *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae using gelatin zymography.

Figure4. Showing cysteine proteinase in *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* larvae using two dimentional gelatin zymography.

***Corresponding author's email: nabian@ut.ac.ir, Tel: 021-66924469, Fax: 021-66933222**