

**Идентификация и роль в пищеварении сериновых пептидаз и их гомологов у жука *Tenebrio molitor*****Научный руководитель – Элпидина Елена Николаевна***Жиганов Н.И.<sup>1</sup>, Терещенкова В.Ф.<sup>2</sup>, Эленбергер Г.Р.<sup>3</sup>, Элпидина Е.Н.<sup>4</sup>, Салимгареев Р.С.<sup>5</sup>*

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра энтомологии, Москва, Россия, *E-mail: nikitoooc@rambler.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химии природных соединений, Москва, Россия, *E-mail: lerunehka\_lu@mail.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химии природных соединений, Москва, Россия, *E-mail: elnberg2397@gmail.com*; 4 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Москва, Россия, *E-mail: elp@belozersky.msu.ru*; 5 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия, *E-mail: s18b1\_salimgareev@179.ru*

Жуки семейства Tenebrionidae, вместе с представителями других семейств инфраотряда Сисциформия, характеризуются особенностями в организации пищеварительной системы. В отличие от млекопитающих, у жуков этого семейства основными пищеварительными ферментами являются цистеиновые и сериновые пептидазы (СП). Модельными объектами из этого семейства являются вредители зерновых запасов жуки *Tenebrio molitor* и *Tribolium castaneum*.

Целью данной работы было изучение набора предсказанных сериновых пептидаз семейства химотрипсина S1 в транскриптомах кишечников личинок *T. molitor* и *T. castaneum*, а также последующая идентификация активных пептидаз в экстрактах кишечников с использованием селективных пептидных субстратов и масс-спектрометрических методов.

Поиск последовательностей производили в программе BLAST с использованием последовательности трипсина 2 человека (UniProt ID P07478), обработка последовательностей на сайте molbiol.ru, а множественное выравнивание в онлайн-сервисе Clustal W.

Было выявлено, что у *T. molitor* в кишечнике личинок присутствует 223 последовательности транскриптов белков, гомологичных пептидазам семейства S1, а у *T. castaneum* - 177. Среди них активных ферментов у *T. molitor* - 110, у *T. castaneum* - 97, неактивных гомологов сериновых пептидаз или псевдопептидаз (ГСП), у которых выявлены замены в а.к. остатках активного центра, - 113 и 80, соответственно. Интересным является то, что число последовательностей ГСП оказалось очень большим и близким к половине от общего числа последовательностей этого типа. Также была подсчитана экспрессия мРНК сериновых пептидаз в кишечнике личинок *T. molitor* и *T. castaneum*. Для каждого вида было выделено по 20 наиболее высоко экспрессируемых пептидаз, которые предположительно могут являться пищеварительными.

Для *T. molitor* была подсчитана экспрессия мРНК на различных стадиях развития жука - яйцо, личинка II-го возраста, личинка IV-го возраста, куколка, имаго. Было показано, что высокоэкспрессируемые пептидазы на стадии личинки, такие как трипсин, химотрипсин, коллагеназа, экспрессируются только на питающихся стадиях личинок и имаго и не экспрессируются на стадиях яйца и куколки, что указывает на их пищеварительную функцию.

Для биохимических исследований использовали экстракт из средней кишки личинок *T. molitor*. Кишечник разделяли на две части: АМ - anterior midgut, РМ - posterior midgut.

Каждую фракцию гомогенизировали, гомогенат центрифугировали при 15000 об/мин., а полученный супернатант использовали для дальнейших исследований.

Далее было проведено фракционирование экстрактов методом аналитической гель-фильтрации в системе FPLC. Фракции, где проявлялась протеолитическая активность, были обессолены, сконцентрированы и исследованы методом пост-электрофоретического тестирования с использованием селективных флуорогенных пептидных субстратов (Z-FR-AMC, Z-RR-AMC, Suc-AAPF-AMC). Обнаруженные по свечению в геле ферменты идентифицировали методами масс-спектрометрии MALDI-TOF и MS/MS.

Проведенное исследование позволило достоверно идентифицировать в АМ последовательности 4 активных СП: 1 трипсин, 2 химотрипсиноподобные и 1 коллагеназа - и 2 ГСП. В РМ были идентифицированы только активные СП: 2 трипсина, 2 химотрипсиноподобные, 1 коллагеназа и 1 эластазоподобная пептидаза. Выявленные в средней кишке *T. molitor* активные СП являются высокоэкспрессируемыми, они экспрессируются на питающихся стадиях и их можно отнести к пищеварительным ферментам *T. molitor*. Анализ экспрессии мРНК двух найденных последовательностей ГСП показал, что одна является высокоэкспрессируемой на питающихся стадиях - личинке и имаго, а вторая низкоэкспрессируемая на всех стадиях жизненного цикла жука. Роль ГСП, выявленных в средней кишке личинок, остается неясной и требует дальнейшего изучения.

Исследование по неактивным гомологам сериновых пептидаз (псевдопептидаз) выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00080).