

УДК 577.112:57.043.017.3:595.767.29

О.К. Гулевський, О.О. Грищенко, Л.І. Реліна*, Д.В. Третяк

Порівняльний аналіз преципітованих ПЕГ-3000 білків із аклімованих та неаклімованих личинок *Tenebrio molitor*

UDC 577.112:57.043.017.3:595.767.29

O.K. Gulevsky, O.O. Gryschenkova, L.I. Relina*, D.V. Tretiak

Comparative Analysis of PEG-3000 Precipitated Proteins From Cold-Acclimated and Non-Acclimated *Tenebrio molitor* Larvae

Ключові слова: холодова аклімація, білки, поліетиленгліколь, криопреципітація, глутаровий альдегід, електрофорез.

Ключевые слова: холододовая акклимация, белки, полиэтиленгликоль, криопреципитация, глутаровый альдегид, электрофорез.

Key words: cold acclimation, proteins, polyethylene glycol, cryoprecipitation, glutaraldehyde, electrophoresis.

Однією з головних умов адаптації до низьких температур на молекулярному рівні є здатність білків зберігати нативну конформацію та повноцінно функціонувати при змінах температурного режиму. Можна припустити, що у організмів, які перебувають в умовах низьких температур протягом холодної пори року, відбуваються сезонні зміни спектра та стану білків, що, перш за все, пов'язано з їх гідратацією, яка забезпечує стабільність. Поліетиленгліколь (ПЕГ) вже багато років використовується як дегідратуючий агент у криопреципітації глобулярних білків та їх комплексів [4, 6]. Відомо, що ПЕГ не викликає незворотну денатурацію білків [2, 3]. Однак за низьких позитивних температур, коли конформація білкових молекул змінюється під впливом холоду, ПЕГ сприяє преципітації деяких білків та надмолекулярних угруповань. Тому доцільним було вивчити вплив сполученої з дією полімерних дегідратуючих агентів холодової експозиції на стан та спектр білків холодоаклімованих і неаклімованих комах.

Відповідно до цього метою даного дослідження було порівняти спектри білків, преципітованих ПЕГ-3000, з аклімованих та неаклімованих до холоду личинок *Tenebrio molitor*.

Роботу виконували на личинках великого борошняного хрущака *T. molitor* із родини чорнотілок (*Tenebrionidae*), яких аклімували при 5...7°C протягом 3-х тижнів. Гомогенат отримували із 144 личинок *T. molitor* у 48 мл 0,6%-го розчину хлориду натрію на Na-фосфатному буфері 0,1 М (pH 7,4) та центри-

The capability of proteins to preserve a native conformation and a fully function under changing temperature is one of the main conditions for low temperature adaptation at a molecular level. The organisms, being under low temperatures during cold season, may be assumed to have seasonal changes in the pattern and state of proteins, that is primarily associated with their hydration, providing stability. Polyethylene glycol (PEG) has been for many years used as a dehydrating agent in cryoprecipitation of globular proteins and their complexes [2, 5]. Polyethylene glycol is known not to cause any irreversible protein denaturation [9, 10]. However, at low positive temperatures, when the conformation of protein molecules is changed under cold, PEG promotes the precipitation of some proteins and supramolecular assemblies. Therefore, it was expedient to study the effect of cold exposure together with the effect of polymeric dehydrating agents on a state and pattern of the proteins in cold-acclimated and non-acclimated insects.

This research aim was accordingly to compare the ranges of PEG-3000 precipitated proteins from cold-acclimated and non-acclimated *Tenebrio molitor* larvae.

This research was performed in *T. molitor* mealworms of *Tenebrionidae* family, cold-acclimated at 5...7°C for 3 weeks. Homogenate was obtained from 144 *T. molitor* larvae in 48 ml 0.6% sodium chloride solution with 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 1800g. The supernatant was filtered using the filter cartridge Sartopore GF2 (Sarto-

Відділ біохімії холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Biochemistry of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: lianaisaakovna@rambler.ru

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

Надійшла 12.07.2014
Прийнята до друку 29.10.2014

Received July, 12, 2014
Accepted October, 29, 2014

фугували 10 хв при 1800g. Надосад фільтрували за допомогою фільтруючого картриджа «Sartopore GF2» («Sartorius», Німеччина) для видалення клітинного детриту. До фільтрату додавали 2,5%-й розчин глутарового альдегіду з розрахунку 0,01 мкМ/мкг білка [5, 10]. Проводили реакцію зшивання вільних аміногруп за кімнатної температури впродовж 30 хв [9]. До 10 мл фільтрату додавали 10 мл 20% ПЕГ-3000, перемішували й здійснювали реакцію кріопреципітації з його кінцевою концентрацією 10% при 5°C впродовж 1,5 години, після чого суміш центрифугували 10 хв при 1800g.

Осад (~50 мкл) після кріопреципітації переносили в 0,6%-й розчин хлориду натрію на Na-фосфатному буфері 0,1 М (рН 7,4) об'ємом 300 мкл. Після цього брали аликвоту для електрофорезу. До розчину, який лишився, додавали ще 300 мкл буфера. Весь об'єм розчиненого осаду переносили в діалізний мішечок (плівка «Visking type 8/32» («Serva», Німеччина) діаметром 6 мм, довжиною ~5 см), який має межу відсікання речовин із м. м. 8–15 кДа. На першому етапі проводили діаліз у 0,6%-му розчині NaCl на Na-фосфатному буфері 0,1 М (рН 7,4) за кімнатної температури та при постійному перемішуванні впродовж 1,5 години з метою видалення ПЕГ. На другому етапі цей мішечок переносили в насичений розчин ПЕГ-40 000 та здійснювали концентруючий діаліз за кімнатної температури, постійно перемішуючи впродовж 1,5 години. Після двоетапного діалізу брали аликвоти для електрофорезу. В об'єм залишеного надосаду додавали ПЕГ-3000 для досягнення його кінцевої концентрації у розчині 20% й знову проводили реакцію кріопреципітації у тих самих умовах. Зразки центрифугували та розділяли на осад та надосадову рідину. Осад перерозчиняли та ще раз повторювали всі маніпуляції. SDS-електрофорез виконували у градієнтному (10–25%) поліакріламідному гелі (ПААГ) за стандартною методикою [1].

Результати аналізу електрофореграм гомогенатів неаклімованих личинок показали дві смуги з м. м. 227 та 208 кДа (рис. 1, доріжки 1, 2) та значно більше білка з м. м. 78 кДа. Після фільтрації відмінності в спектрах білків аклімованих та неаклімованих особин були ще помітніші: у фільтратах, отриманих із аклімованих личинок, відсутні білки з м. м. 65, 63, 60 та 52 кДа (рис. 1, доріжка 4).

Слід зазначити, що у 10%-му розчині ПЕГ-3000 відбулася кріопреципітація багатьох білків із тканин холодоаклімованих личинок великого борошняного хрущака. На електрофореграмі на відповідній доріжці можна розрізнити до 12 окремих смуг (рис. 2, доріжки 1, 2). Це свідчить про те, що не всі білки толерантних до холоду тварин виявляли стабільність в умовах нашого експерименту.

Відрізняється і якісний склад кріопреципітованих білків із аклімованих та неаклімованих особин вели-

риус, Germany) to remove cell detritus. The filtrate was supplemented with 2.5% glutaraldehyde solution, at the ratio of 0.01 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein [1, 7]. The cross-linking reaction of free amino groups was performed at room temperature for 30 min [6]. The filtrate of 10 ml was supplemented with 10 ml 20% PEG-3000, then mixed and the cryoprecipitation with the final concentration of 10% was performed at 5°C for 1.5 hrs, afterwards the mixture was centrifuged for 10 min at 1800g.

The post-cryoprecipitation sediment (~50 μl) was transferred into 0.6% sodium chloride solution with 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.4) of 300 μl volume. Then the aliquot was taken for electrophoresis. The remained solution was supplemented with 300 μl of buffer. The entire volume of dissolved precipitate was transferred into a dialysis bag (6 mm diameter and ~5 cm length film of Visking type 8/32 (Serva, Germany)), which had a molecular weight cut-off for 8–15 kDa substances. At the first stage the dialysis was carried out in 0.6% NaCl solution with 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.4) at room temperature and with a constant stirring within 1.5 hrs for PEG removal. At the second stage, this bag was transferred into a saturated PEG-40000 solution and a concentrating dialysis was performed at room temperature and with a constant stirring for 1.5 hrs. After a two-step dialysis the aliquots were taken for electrophoresis. The volume of remained supernatant was mixed with PEG-3000 to achieve its final concentration of 20% in the solution and the cryoprecipitation was carried-out again under the same conditions. Samples were centrifuged and separated into the sediment and supernatant fluid. The sediment was resuspended and all the manipulations were repeated once again. SDS-electrophoresis was done in a gradient (10–25%) polyacrylamide gel (PAAG) by the standard technique [8].

The results of electrophoregram analysis of non-acclimated larva homogenates showed two bands with MW of 227 and 208 kDa (Fig. 1, lanes 1 and 2) and much more 78 kDa protein. After filtration the differences in the proteins patterns of both cold-acclimated and non-acclimated insects were much more pronounced: there were no 65, 63, 60 and 52 kDa proteins in the filtrates obtained from cold-acclimated larvae (Fig. 1, lane 4).

Of note is the fact, that the cryoprecipitation of many proteins from the tissues of cold-acclimated mealworms occurred in 10% PEG-3000 solution. In the electrophoregram on a corresponding track we can distinguish up to 12 separate bands (Fig. 2, lanes 1 and 2). This attests to the fact, that not all the proteins of cold-tolerant insects showed the stability in our experiments.

A qualitative composition of cryoprecipitated proteins from cold-acclimated and non-acclimated mealworms was also different (Fig. 2). In the cold-acclimated larva in cryoprecipitate there were found no 252, 228, 65 and

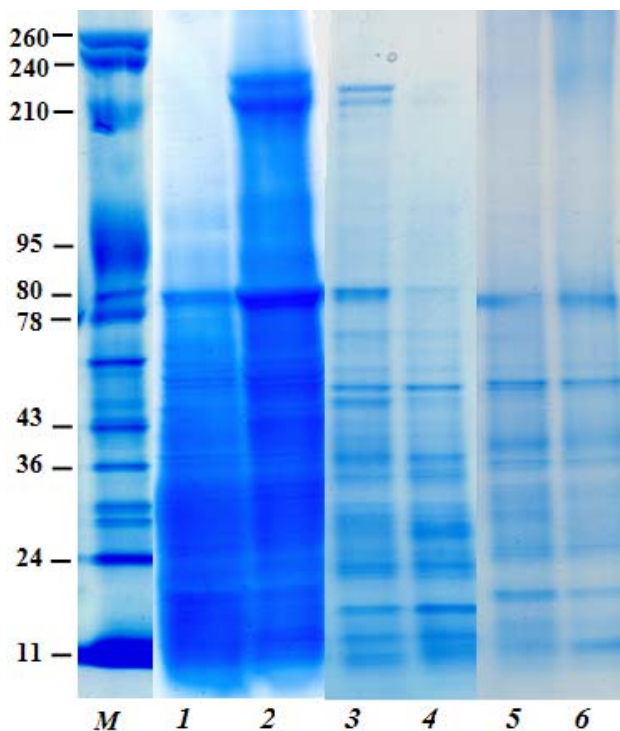


Рис. 1. Спектр білків до та після холодової аклімації *T. molitor* (3 тижні при 5...7°C): **M** – маркери молекулярної маси; **1, 2** – гомогенат; **3, 4** – фільтрат; **5, 6** – фільтрат після зшивання вільних аміногруп глутаровим альдегідом; **1, 4, 6** – аклімовані личинки; **2, 3, 5** – неаклімовані личинки.

Fig. 1. The protein pattern prior to and after cold acclimation of *T. molitor* (3 weeks at 5...7°C): **M** – molecular weight markers; **1, 2** – homogenate; **3, 4** – filtrate after crosslinking of free aminogroups by glutaraldehyde; **1, 4, 6** – cold-acclimated larvae; **2, 3, 5** – non-acclimated larvae.

кого борошняного хрущака (рис. 2). У аклімованих личинок у кріопреципітаті не виявлено білків із м. м. 252, 228, 65 та 60 кДа, які випадають в осад у пробах із тканин неаклімованих *T. molitor* (рис. 2, доріжки 1, 2). У той самий час у кріопреципітаті з аклімованих личинок присутні білки з м. м. 240, 32, 21, 19 і 16 кДа, яких немає у неаклімованих. Тобто, у аклімованих личинок *T. molitor* більше білків із низькими молекулярними масами. Ці білки випадають у осад в низькотемпературних умовах під впливом 10% ПЕГ-3000.

Ступінь преципітації білків залежить від багатьох параметрів, одним із яких є концентрація полімеру [5, 7, 8], але підвищення концентрації ПЕГ-3000 до 20% не призводило до подальшої преципітації білків (рис. 3).

Слід зазначити, якщо застосовувати глутаровий альдегід для зшивання білків, які випали в осад після кріопреципітації ПЕГ-3000 (рис. 2, доріжки 3, 4), то, перш за все, у преципітаті з аклімованих личинок глутаровий альдегід зшиває майже всі білки, окрім тих, що мають м. м. 75 та 11 кДа. Виявлено, що смуга з м. м. 75 кДа відсутня у спектрах білків кріопреципі-

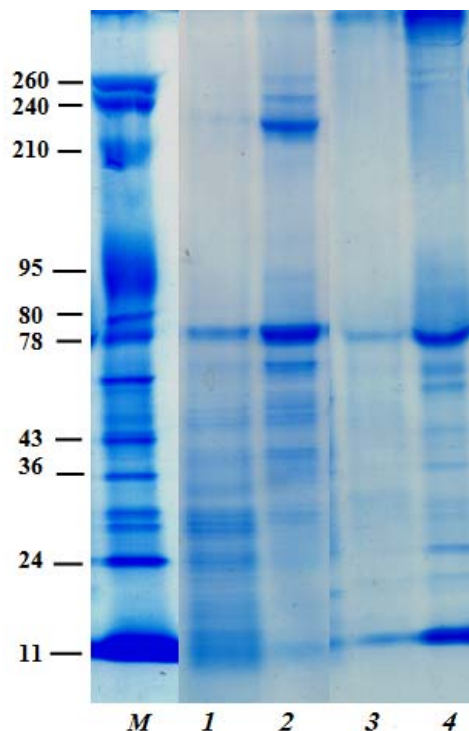


Рис. 2. Спектр кріопреципітованих за допомогою 10% ПЕГ-3000 із фільтрату личинок *T. molitor* білків до та після холодової аклімації: **M** – маркери молекулярної маси; **1, 2** – осад кріопреципітованих білків; **3, 4** – осад після зшивання вільних аміногруп глутаровим альдегідом; **1, 3** – аклімовані; **2, 4** – неаклімовані личинки.

Fig. 2. Pattern of 10% PEG-3000 cryoprecipitated proteins from filtrate of *T. molitor* larvae prior to and after cold acclimation: **M** – markers of molecular weight; **1, 2** – sediment of cryoprecipitated proteins; **3, 4** – sediment after cross-linking of free amino groups with glutaraldehyde; **1, 3** – acclimated; **2, 4** – non-acclimated larvae.

60 kDa proteins, which precipitated in the samples from non-acclimated *T. molitor* tissues (Fig. 2, lanes 1 and 2). At the same time, the 240, 32, 21, 19 and 16 kDa proteins were present in the cryoprecipitate from cold-acclimated larvae, and absent in non-acclimated ones. So, in cold-acclimated *T. molitor* larvae there were more proteins with low molecular weights. These proteins were precipitated under low temperature conditions when affected by 10% PEG-3000.

Precipitation rate of proteins depended on many parameters, one of them was polymer concentration [1, 3, 4], but the rise in the concentration of PEG-3000 up to 20% did not result in following precipitation of proteins.

It should be noted that if to apply glutaraldehyde for cross-linking of proteins sedimented after cryoprecipitation with PEG-3000 (Fig. 2, lanes 3 and 4), the glutaraldehyde primarily cross-links quite all the proteins in the precipitate from acclimated larvae excluding those with molecular weight of 75 and 11 kDa. It has been revealed that the band 75 kDa was absent in the spectra of proteins of acclimated *T. molitor* cryoprecipitates. This could be explained with the fact that the band 75 kDa is the



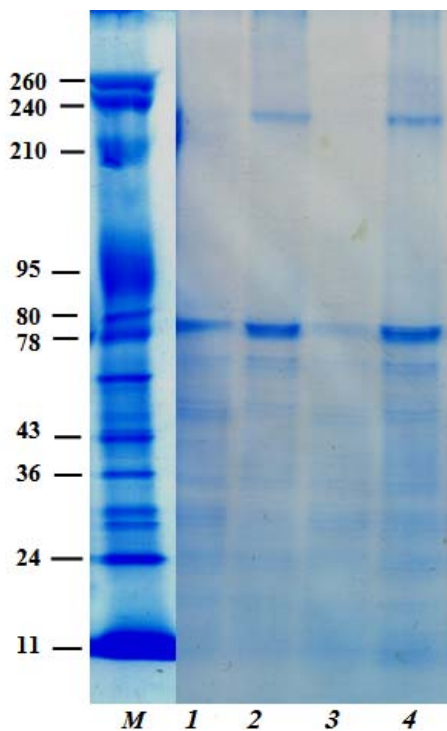


Рис. 3. Спектр криопреципітованих за допомогою 20% ПЕГ-3000 з фільтрату личинок *T. molitor* білків до та після холодової аклімації: **М** – маркери молекулярної маси; **1, 2** – осад криопреципітованих білків; **3, 4** – осад після зшивання вільних аміногруп глутаровим альдегідом; **1, 3** – аклімовані; **2, 4** – неаклімовані личинки.

Fig. 3. Patterns of 20% PEG-3000-cryoprecipitated proteins from filtrate of *T. molitor* larvae prior to and after cold acclimation: **M** – markers of molecular weight; **1, 2** – sediment of cryoprecipitated proteins; **3, 4** – sediment after cross-linking of free amino groups with glutaraldehyde; **1, 3** – acclimated; **2, 4** – non-acclimated larvae.

татів із аклімованих *T. molitor*. Це може пояснюватись тим, що смуга з м. м. 75 кДа є результатом зшивання більш легких білків. Усі інші білки в такому випадку зшиті з утворенням дуже великих агрегатів, які не здатні увійти в 10% ПААГ. У спектрах, зшитих глутаровим альдегідом білків криопреципітатів із неаклімованих личинок, присутній ряд білкових смуг із м. м. 78, 65, 60, 36, 32, 28, 24, 21, 19 та 11 кДа. Спектри білків криопреципітату з неаклімованих *T. molitor* до та після зшивання мають багато відмінностей; далеко не всі білки в цих зразках зшиті у великі агрегати, про що свідчить присутність смуг із м. м. 80..100 кДа.

Оскільки постачальниками вільних аміногруп, які можуть бути мішенню для дії глутарового альдегіду, є аргінін та лізин [5, 10], то відмінності в спектрах білків, зшитих глутаровим альдегідом, свідчать про різницю у вмісті цих амінокислот. Не виключено також, що відмінності в індукованій глутаровим альдегідом агрегації між білками аклімованих та неаклімованих личинок зумовлені різним ступенем експонованості цих амінокислот у розчин, що пов'язано з особливостями третинної та четвертинної структури білків, яка зумовлює доступність реакційних груп для зшиваючого агента.

Отримані результати підтверджують факт існування генетично зумовлених змін спектрів білків після холодової аклімації личинок *T. molitor*. Білки з аклімованих та неаклімованих комах мають різну структуру, яка обумовлена особливостями їх гідратної оболонки, що забезпечує стабільність за низьких температур і дії дегідратуючих факторів.

result of cross-linking of lighter proteins. All other proteins in such a case are cross-linked with forming quite large aggregates which are not able to enter 10% PAAG. The spectra of glutaraldehyde-cross-linked proteins of the cryoprecipitates from non-acclimated larvae exhibit some proteins bands with m. w. of 78, 65, 60, 36, 32, 28, 24, 21, 19 and 11 kDa. The spectra of the cryoprecipitate proteins from non-acclimated *T. molitor* prior to and after cross-linking have lots of differences; not all the proteins in these samples are cross-linked into large aggregates, which is confirmed by the presence of bands with m. w. of 80..100 kDa.

Since the suppliers of free amino groups which can be the target for glutaraldehyde are arginine and lysine [1, 7] then the differences in the spectra of proteins cross-linked with glutaraldehyde attest to the difference in the content of these amino acids. It is not also excluded that the distinctions in glutaraldehyde induced aggregation between the proteins from acclimated and non-acclimated larvae are determined with various exposure levels of these amino acids to the solution, which is related to the peculiarities of tertiary and quaternary structures of proteins, determining the availability of reactive groups for the cross-linking agent.

The findings support the fact of existence of genetically determined changes in protein spectra after cold acclimation of *T. molitor* larvae. The proteins from acclimated and non-acclimated insects are of various structure, which is determined by the features of their hydrate coat, providing the stability at low temperatures and dehydrating factors.

При застосуванні глутарового альдегіду для зшивання білків, які випали в осад після кріопреципітації з ПЕГ-3000, у кріопреципітаті з аклімованих комах глутаровий альдегід зшиває майже всі білки, окрім білків із м. м. 75 та 11 кДа, тоді як в спектрах, отриманих із неаклімованих особин, присутній цілий ряд білкових смуг у цьому ж діапазоні молекулярних мас. Оскільки мішенями для дії глутарового альдегіду є аргінін та лізин, то відмінності в спектрах білків, зшитих глутаровим альдегідом, свідчать про різницю у вмісті цих амінокислот або у ступені їх доступності до зшиваючого агента у білках, отриманих із тканин холодоаклімованих та неаклімованих личинок *T. molitor*.

When using glutaraldehyde to cross-link the proteins, sedimented after cryoprecipitation with PEG-3000, in the cryoprecipitate from acclimated insects the glutaraldehyde cross-links quite all the proteins except the ones with m. w. of 75 and 11 kDa, meanwhile in the spectra obtained from non-acclimated individuals there are many protein bands within the same range of molecular weights. Since the targets for the effect of glutaraldehyde are arginine and lysine, the distinctions in the spectra of proteins cross-linked with glutaraldehyde attest to the difference in the content of these amino acids or in the level of their availability to cross-linking agent in proteins derived from the tissues of cold acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae.

Література

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
2. Русанов В.М., Скобелев Л.И. Фракционирование белков плазмы в производстве препаратов крови. – М.: Медицина, 1983. – 224 с.
3. Шинкаренко А.А. Особенности взаимодействия полиэтиленгликоля с белками плазмы крови и возможности использования этого полимера для фракционирования: Автореф. дис. ... док. биол. наук. – К., 1972. – 31 с.
4. Пат. № 2112799 РФ, МПК C12N5/02. Способ получения ростовых протеинов из сывороток крови различных видов животных / Г.А. Костина, И.Ф. Радаева, С.Б. Шмелева, М.А. Андреева; заявл. 16.02.1996; опубл. 10.06.1998.
5. Armbrust T.S., Chitnis P.R., Guikema J.A. Organization of photosystem I polypeptides examined by chemical cross-linking // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 111, №4. – P. 1307–1312.
6. Atha D.H., Ingham K.C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume // J. Biol. Chem. – 1981. – Vol. 256, №23. – P. 12108–12117.
7. Hardin J.A. Cryoprecipitogogue from normal serum: Mechanism for cryoprecipitation of immune complexes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – Vol. 78, №7. – P. 4562–4565.
8. Johansen A.S., Steensgaard J., Jacobsen C. Solubility properties of IgG immune complexes. Comparison between the effects of low molecular weight solvents and polyethylene glycols // Immunology. – 1980. – Vol. 41, №3. – P. 695–704.
9. Middaugh C.R., Tisel W.A., Haire R.N., Rosenberg A. Determination of the apparent thermodynamic activities of saturated protein solutions // J. Biol. Chem. – 1979. – Vol. 254, №2. – P. 367–370.
10. Moutin M.J., Rapin C., Miras R. et al. Autonomous folding of the recombinant large cytoplasmic loop of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase probed by affinity labeling and trypsin digestion // Eur. J. Biochem. – 1998. – Vol. 251. – P. 682–690.

References

1. Armbrust T.S., Chitnis P.R., Guikema J.A. Organization of photosystem I polypeptides examined by chemical cross-linking. Plant Physiol 1996; 111(4): 1307–1312.
2. Atha D.H., Ingham K.C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. J Biol Chem 1981; 256(23): 12108–12117.
3. Hardin J.A. Cryoprecipitogogue from normal serum: Mechanism for cryoprecipitation of immune complexes. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(7): 4562–4565.
4. Johansen A.S., Steensgaard J., Jacobsen C. Solubility properties of IgG immune complexes. Comparison between the effects of low molecular weight solvents and polyethylene glycols. Immunology 1980; 41(3): 695–704.
5. Kostina G.A., Radaeva I.F., Shmeleva S.B., Andreeva M.A. A method for extraction of growth proteins from blood sera of different animal species. Patent of Russian Federation N2112799 IPC C12N5/02. 1998 October 6.
6. Middaugh C.R., Tisel W.A., Haire R.N., Rosenberg A. Determination of the apparent thermodynamic activities of saturated protein solutions. J Biol Chem 1979; 254(2): 367–370.
7. Moutin M.J., Rapin C., Miras R. et al. Autonomous folding of the recombinant large cytoplasmic loop of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase probed by affinity labeling and trypsin digestion. Eur J Biochem 1998; 251: 682–690.
8. Osterman L.A. Methods of investigating proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation. Moscow, Nauka; 1981.
9. Rusanov V.M., Skobelev L.I. Fractionation of plasma proteins in the manufacture of blood products. Moscow, Medicine; 1983.
10. Shinkarenko A.A. Features of interaction of polyethylene glycol to blood plasma proteins and possibilities of using this polymer for fractionation [dissertation]. Kiev; 1972.

