

PORÓWNANIE WŁASNOŚCI α -AMYLAZY Z LARW TRZECIEGO
I CZWARTEGO STADIUM *ANISAKIS SIMPLEX**

ELŻBIETA ŁOPIEŃSKA¹, KRYSZYNA ŻÓŁTOWSKA¹, JERZY ROKICKI²

¹ Zakład Biochemii, Wydział Biologii, UWM, 10-561 Olsztyn, ul. Żołnierska 14

² Katedra Zoologii Bezkręgowców, UG, Gdynia, al. Piłsudskiego 46

THE COMPARISON OF PROPERTIES OF α -AMYLASE FROM THE THIRD AND FOURTH
STAGE OF *ANISAKIS SIMPLEX* LARVAE

A b s t r a c t. α -Amylase is present in the third (L₃) and in the fourth-stage (L₄) of larvae from *Anisakis simplex*. The enzymes from both sources differ in some of their properties. α -Amylase from L₃ showed a maximum at pH 7,8, enzyme from L₄ stage at pH 6,5. The α -amylase from L₃ was mainly lysosomal enzyme. The enzyme from L₄ was located in the microsomal fraction. The L₃ α -amylase showed the inhibition by EDTA and by -SH reagent iodoacetic acid. These agents did not change the activity of L₄ enzyme. Both isoenzymes were unaffected by calcium and magnesium ions. Generally the α -amylase from L₄ stage had higher activity (3,71 u/mg) than L₃ one (2,29 u/mg).

WSTĘP

Badania biochemii i fizjologii *A. simplex* są nadal fragmentaryczne, dotyczą głównie proteaz trzeciego stadium larwalnego i ich inhibitorów, jako białek ważnych w procesach penetracji i zabezpieczenia form pasożytniczych w przewodzie pokarmowym żywicieli pośrednich i ostatecznych (SMITH i WOOTEN 1978, MATTHEWS 1984). W dostępnej literaturze nie znaleziono prac z zakresu biochemii dotyczących larw czwartego stadium *A. simplex*. Jest to stadium rozwojowe pasożyta, pojawiające się po linieniu zachodzącym w organizmie żywiciela ostatecznego.

Tylko nieliczne doniesienia dotyczą przemian cukrowców u trzeciego stadium larwalnego *A. simplex*. Tym zagadnieniem poświęcona była nasza wcześniejsza praca (ŻÓŁTOWSKA i wsp. 2000). Wykazano w niej występowanie, obok innych ważnych dla metabolizmu cukrowego enzymów, również dość wysokiej aktywności α -amylazy. Jej charakterystyka, porównanie niektórych własności tego samego enzymu występującego u kolejnych stadiów, jest interesujące z punktu widzenia biologii rozwoju tego pasożyta. Sądzymy, że

enzym ten może być jednym ze wskaźników zmian związanych z adaptacją stadiów rozwojowych nicienia do różniących się znacznie warunków środowiska ich bytowania. Sytuacja taka ma miejsce przy transferze stadium L_3 *A. simplex* z organizmu zmienno cieplnego (ryby) do stałociepłnego (ssaka morskiego), gdzie rozwija się larwa L_4 . Wydaje się, że powinna towarzyszyć temu przebudowa endogennych cukrów zapasowych oraz zmiana aktywności i własności enzymów związanych z ich metabolizmem. Potwierdzenie tej sugestii stało się celem niniejszej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były larwy trzeciego (L_3) i czwartego stadium (L_4) *A. simplex*. Larwy L_3 pasożyta izolowano ze świeżych śledzi bałtyckich (*Clupea harengus* L.). Larwy L_4 pozyskiwano z własnych hodowli *in vitro* prowadzonych wg GRABDY (1976) w inkubatorze f-my Fischer zapewniającym 5% CO_2 w atmosferze. Po 12 dniach hodowli w temp. $37^{\circ}C$ uzyskiwano larwy L_4 .

1. Otrzymywanie wyciągów enzymatycznych

Larwy, po przepłukaniu w 0,65% roztworze NaCl, homogenizowano w szklanym homogenizatorze Pottera z roztworem soli w proporcji 1:15 w/v. Homogenat wirowano przez 15 min. przy $2\ 500\times g$. W uzyskanym supernatancie oznaczano aktywność α -amylazy metodą Carawaya (za KARPIAKIEM 1974) i białko metodą BRADFORDA (1976). Aktywność enzymu wyrażano w jednostkach (u) przeliczonych na mg białka. Jedna jednostka odpowiada ilości enzymu rozkładającej 1 mg skrobi do zaniku reakcji jodowo-skrobiowej w temp. $37^{\circ}C$ w czasie 2h inkubacji.

2. Określanie niektórych własności α -amylazy

W celu określenia optymalnego pH dla działania α -amylazy inkubowano wyciągi enzymatyczne z larw w 0,07 M buforze weronalowo-octanowym o zakresie pH 5,46- 9,00.

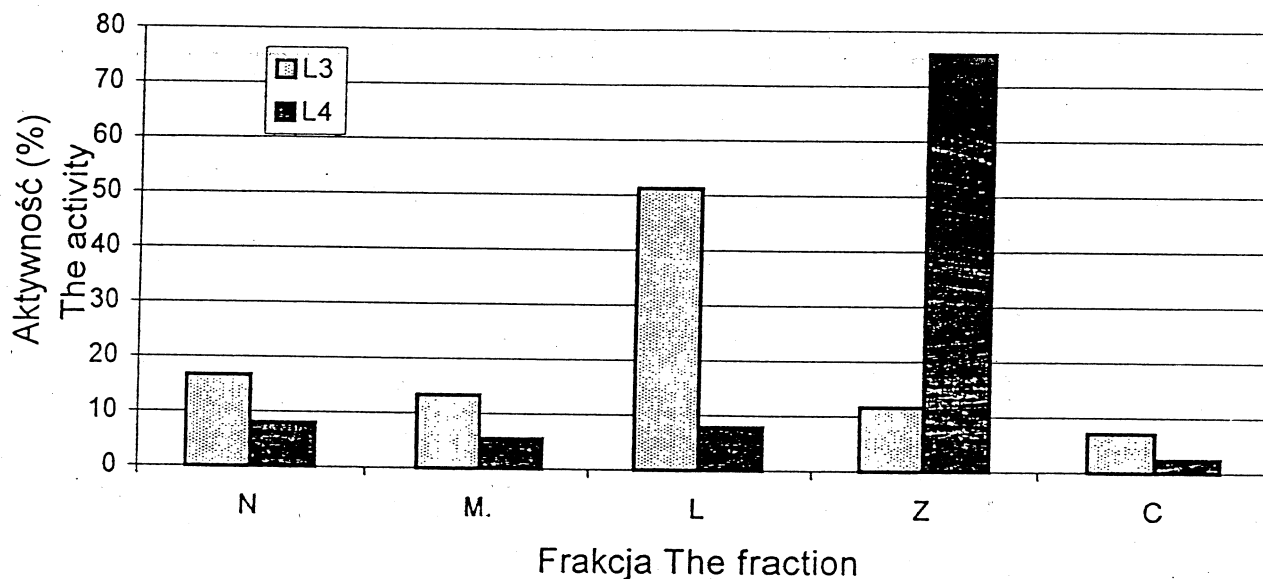
Badano wpływ 0,01 M roztworów następujących związków: $MgCl_2$, $CaCl_2$, CH_2JCOOH , EDTA i 0,001 M $ZnCl_2$. Wyciągi enzymatyczne preinkubowano z nimi przez 15 min., po czym rozpoczynano właściwą reakcję enzymatyczną dodając roztwór substratu (1% skrobi).

Wewnątrzkomórkową dystrybucję enzymu wyznaczano drogą wirowania różnicowego za VAN DEN BOSSCHE i BORGERS (1973).

WYNIKI I DYSKUSJA

U larw L_3 i L_4 *A. simplex* stwierdzono występowanie α -amylazy. Jej aktywność u larw trzeciego stadium wahała się od 0,44 do 2,93 u/mg i wynosiła średnio $2,19 \pm 0,68$ u/mg. U stadium czwartego aktywność enzymu była wyższa niż u L_3 i wynosiła $3,71 \pm 1,03$ u/mg.

Enzym z obu stadiów różnił się dystrybucją wewnątrzkomórkową (ryc.1). α -Amylaza z larw L_3 zlokalizowana była głównie we frakcji lizosomalnej, z L_4 w mikrosomalnej. W cytozolu z obu stadiów aktywność enzymu była niska i nie przekraczała 10%.



Ryc. 1. Wewnątrzkomórkowa dystrybucja α -amylazy. Frakcje N-jądrowa, M-mitochondrialna, L-lizosomalna, Z-mikrosomalna, C-cytozolowa

Fig.1. The subcellular distribution of α -amylase. The fractions: N-nuclear, M-mitochondrial, L-lysosomal, Z-microsomal, C-cytosolic

Enzymy z obu stadiów w nieco odmienny sposób niż α -amylazy z innych źródeł odpowiadają na niskocząsteczkowe związki znane jako efekторы α -amylaz (Tabela). Nie reagują na obecność jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , które są istotne dla wielu α -amylaz (BUISSON i wsp. 1987, FERRER i wsp. 1999). EDTA jest, podobnie jak w przypadku α -amylaz z *Ascaris suum* i *Ascaridia galli* (ŻÓŁTOWSKA 1990, 1995), inhibitorem amylazy z L_3 *A. simplex*. Związek ten nie blokuje natomiast enzymu ze stadium czwartego pasożyta. Odmiennie reagują obie larwalne amylazy na kwas jodoctowy (Tabela). Jest on silnym inhibitorem enzymu z L_3 , a praktycznie nie zmienia aktywności amylazy ze stadium czwartego. Świadczy to o braku w tym ostatnim enzymie grup -SH

istotnych dla jego funkcji katalitycznych. Podobnie zachowywała się α -amylaza z *A. galli* (ŻÓLTOWSKA 1990).

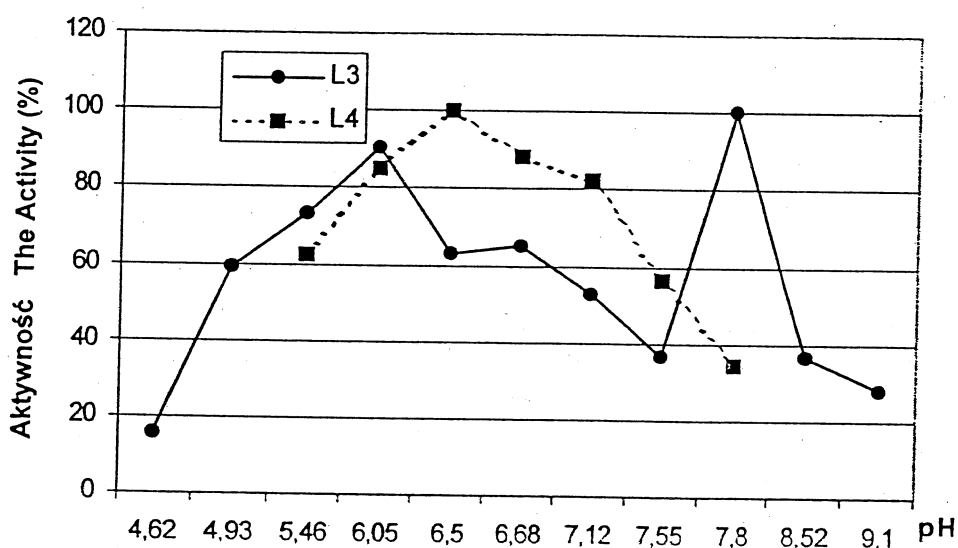
TABELA

Wpływ związków chemicznych na aktywność α -amylazy

TABLE

The influence of chemical agents on the activity of α -amylase

Czynnik (Stężenie) Agent (Concentrate)	Aktywność		Activity	
	L ₃		L ₄	
	u/mg	%	u/mg	%
-	1,44	100	4,22	100
MgCl ₂ (0,01 M)	1,54	106,8	4,14	98,2
CaCl ₂ (0,01 M)	1,38	95,8	4,32	102,4
EDTA (0,01 M)	0,75	52,4	3,92	92,8
CH ₂ J COOH (0,01 M)	0,49	33,9	4,46	105,8
ZnCl ₂ (0,001 M)	0,37	25,5	0,71	16,9



Ryc. 2. Wpływ pH na aktywności α -amylazy z *Anisakis simplex*.

Fig. 2. The influence of pH on the activity of α -amylase from *Anisakis simplex*.

Odmienne jest również optimum pH działania obu α -amylaz (ryc. 2).

Krzywa zależności α -amylazy z larw L₃ od pH wykazuje dwa maksima w pH 6,05 i pH 7,8. Enzym ma najwyższą aktywność w pH 7,8. Optimum działania α -amylazy stadium czwartego jest przesunięte w stronę środowiska lekko kwaśnego i przypada na pH 6,5.

Konkludując można powiedzieć, że po trzecim linieniu u larw *A. simplex* obecna jest α -amylaza o własnościach odmiennych niż te, które charakteryzują enzym z trzeciego stadium. Enzymy te różnią się lokalizacją wewnątrzkomórkową, optimum pH i reakcją na efekторы ważne dla α -amylaz.

*Praca finansowana z grantu KBN 6BO4B02616

LITERATURA

- BRADFORD J. 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BUISSON G., DUEE E., HASER R., PAYAN F. 1987. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2,9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.* 6: 3909-3916
- FERRER A., HOEBEKE J., BOUT D. 1999. Purification and characterization of two α -amylases from *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* 92: 64-72.
- GRABDA J. 1976. Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (*Nematoda: Anisakidae*) cultured in vitro. *Acta Ichthyol. Pisc.* 6: 119-141.
- KARPIAK S. 1974. Hydrolazy działające na związki glikozydowe. W: *Enzymologia kliniczna* (Szczeklik E. red.), PZWL, Warszawa, s. 332-337.
- MATTHEWS B. E. 1984. The source, release and specificity of proteolytic enzyme activity produced by *Anisakis simplex* larvae (*Nematoda: Ascaridida*) in vitro. *J. Helminthol.* 58: 175-185.
- SMITH J., WOOTTEN R. 1978. *Anisakis* and anisakiasis. *Adv. Parasitol.* 16: 93-163.
- VAN DEN BOSSCHE H., BORGERS M. 1973. Subcellular distribution of digestive enzymes in *Ascaris suum* intestine. *Int. J. Parasitol.* 3: 59-65.
- ŻÓŁTOWSKA K. 1990. Enzymes hydrolysing starch and glycogen from intestine and body wall of *Ascaridia galli* (*Nematoda*). *Acta Parasitol. Pol.* 36: 61-65.
- ŻÓŁTOWSKA K. 1995. Amylasy w układzie pasożyt-żywiciel. WSP, Olsztyn.
- ŻÓŁTOWSKA K., ŁOPIEŃSKA E., ROKICKI J. 2000. Content of carbohydrates and activity of sugar metabolism enzymes present in stage III larvae of *Anisakis simplex*. *Acta Parasitol.* 45: 186.

