Metaloproteazy ssaków i owadów

MILENA BAJDA, ALEKSANDRA ŁOŚ, MICHAŁ SCHULZ, KORNEŁ KASPEREK

Zakład Biologii Eksperymentalnej i Środowiskowej, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Otrzymano 04.03.2015

Zaakceptowano 18.05.2015

Bajda M., Łoś A., Schulz M., Kasperek K.
Mammalian and insect metalloproteases

Summary

Metalloproteases (metalloproteinases, MMP) digest extracellular matrix proteins. They have zinc ions (Zn^{2+}) in their active site. They are synthesized within cells as proenzymes, to be subsequently activated in the extracellular environment. MMP are active in a neutral or slightly alkaline pH in the presence of Ca^{2+} ions. Cells that synthesize metalloproteases also produce metalloprotease inhibitors. Until now, 4 of MMP inhibitors as well as 28 endometalloproteases have been discovered, out of which 22 occur in humans. On the other hand, these enzymes have not been well explored in insects, in which only 2 metalloproteases were identified (Ance and ECE). Their optimal activity ranges between pH 7.0 and 9.4. MMP inhibitors control the concentration of metalloproteases in physiological conditions. They fall within two types: specific tissue MMP inhibitors and non-specific plasma MMP inhibitors. Metalloproteases and their inhibitors play an important role in both physiological and pathological processes in the organism. Metalloproteases are cell growth promoters. They inhibit/induce apoptosis, stimulate the development of healthy cells and control the activity of neoplastic cells both in people and in insects. Their activity is increased in skin and periodontal diseases, in arthritis, arteriosclerosis or in the period following myocardial infarction. In insects the activity of MMPs is also increased by environmental pollution, by the use of antibiotics and varroacides. The insect MMPs participate in digestion, biosynthesis of peptide hormones and neurotransmitters, and melanisation. They also affect the development of the reproductive system and the development of larvae and pupae, as well as prevent pathogen invasions. Worthy of special attention is the insect cuticle defensive barrier associated with MMP. Activation of metalloproteases is dependent on the physiological state of the organism, as well as on environmental pressure. Analyzing activities of metalloproteases and their inhibitors enables better monitoring of the pathological conditions in both insects and mammals.

Keywords: metalloproteases, metalloprotease inhibitors, mammals, insects

Metaloproteazy są enzymami występującymi u ssaków i owadów. U ssaków są one dobrze poznane, natomiast u owadów wymagają dokładniejszej analizy. Wzrastająca aktywność metaloproteaz jest dobrym indykátorem inwazji patogenów, rozwoju różnych chorób oraz szkodliwej presji środowiska zarówno u owadów, jak i u ssaków. Monitorowanie aktywności metaloproteaz i ich inhibitorów stwarza możliwość wczesnego wykrywania stanów patologicznych.

Charakterystyka metaloproteaz ssaków

Metaloproteazy (MMPs, Metalloproteinases) stanowią rodzinę metalozależnych endopeptydaz degradujących macierz pozakomórkową. Uczestniczą one w procesach fizjologicznych, a ich zwiększona aktywność świadczy o patologicznych stanach organizmu. Podwyższoną aktywność tych enzymów zaobserwowano w chorobach skóry, przyzębia, przy zapaleniu stawów, miażdżycy, restenozie, po zawale mięśnia sercowego, w kardiomiopatii rozszerzeniowej oraz w rozrostach nowotworów i ich przerzutach (10, 36).

Metaloproteazy charakteryzują się obecnością jonów cynku (Zn^{2+}) w miejscu aktywnym oraz trawieniem białek macierzy zewnątrzkomórkowej, która tworzy rusztowanie dla komórek i stabilizuje strukturę tkanek budujących skórę. Jej składowe uczestniczą w procesach proliferacji komórek, różnicowania i migracji oraz wpływają na ich kształt i metabolizm. Stan dynamicznej równowagi między syntezą a degradacją zawartych w macierzy pozakomórkowej cząsteczek jest możliwy dzięki tym właśnie procesom (10, 33).

Metaloproteazy syntetyzowane są w komórkach w postaci proenzymu, a następnie aktywowane w środowisku zewnątrzkomórkowym. Metaloproteazy działają w pH obojętnym lub lekko zasadowym w obecności jonów Ca^{2+} . Brak jonów Ca^{2+} hamuje aktywację tych enzymów, natomiast dodanie tych jonów przywraca ich aktywność. Metaloproteazy są aktywowane przy pomocy mechanizmu nazywanego „włącznikiem cysteinowym” (*cysteine switch*). Polega on na utracie propeptydu o masie 10 kDa z N-terminalnego regionu białka oraz na rozerwaniu wiązania Zn^{2+} –cysteina pomiędzy grupą tiolową cysteiny

a atomem cynku, które blokują reaktywność centrum aktywnego enzymu. Niezbędnym warunkiem do pobudzenia komórek do syntezy metaloproteaz jest kolagen (46). Aktywacja tych enzymów może odbywać się na drodze zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej. Proces zewnątrzkomórkowego uczynienia dotyczy metaloproteaz niezwiązanych z błoną komórkową, jest wieloetapowy, a kolejno powstające produkty pośrednie katalizują kolejne jego etapy. W ten sposób prometaloproteazy są aktywowane przy udziale aktywnych form MMPs. W procesie tym uczestniczą też inne układy proteolityczne, głównie proteazy serynowe, takie jak np. tripsyna, tkankowy aktywator plazminogenu, katepsyna B, co pozwala na precyzyjną regulację aktywności metaloproteaz. Wewnątrzkomórkowa aktywacja dotyczy głównie metaloproteaz typu błonowego, MMP-11 (stromelizyny) i jest katalizowana przez enzym – furynę (24, 28, 33, 45).

Do chwili obecnej poznano 28 endometaloproteaz, w tym 22 wykryte u ludzi, u których także znaleziono 4 ich inhibitory. Endometaloproteazy różnią się między sobą substratami, wobec których wykazują właściwości trawienne. Częsteczki metaloproteaz zbudowane są z domen wspólnych dla całej ich rodziny oraz innych, charakterystycznych dla poszczególnych enzymów, decydujących o specyficznych właściwościach danego enzymu. Centralne miejsce zajmują dwie domeny: katalityczna oraz karboksyterminalna. W pierwszej z nich znajduje się centrum aktywne zawierające jon cynku oraz jony wapnia, które stabilizują enzym i uczestniczą w jego aktywacji. Druga domena łączy się z domeną katalityczną za pomocą krótkiego regionu zawiasowego. Jej funkcją jest rozpoznawanie substratów i wiązanie z ich inhibitorami. Region zawiasowy pomaga również w rozpoznawaniu substratów i w ten sposób determinuje orientację domeny karboksyterminalnej. Oprócz tego w budowie metaloproteaz uczestniczą jeszcze dwie domeny: a) peptydu sygnałowego, która bierze udział w transporcie cząsteczki enzymu przez siateczkę śródplazmatyczną oraz b) propeptydu, pełniącego funkcję swoistego inhibitora wewnętrznego, który po odcięciu prowadzi do aktywacji enzymu (10, 33, 46). Najprostszą w budowie cząsteczką jest MMP-7 (matrylizyna), zawierająca propeptyd, domenę katalityczną oraz peptyd sygnałowy (ryc. 1). W pozostałych metaloproteazach występują dodatkowe domeny, które warunkują specyficzne powinowac-

two do substratów oraz umożliwiają spełnianie funkcji biologicznych (33).

Na podstawie struktury biochemicznej, a także specyficzności substratowej metaloproteazy dzieli się na 6 grup: 1) matrylizyny – uczestniczące w procesach fizjologicznych, np. apoptozie komórki; 2) kolagenazy – degradujące kolagen typu I, II, III i VI; 3) stromelizyny – które mają duże spektrum działania, np. kolagen, fibronektyna; 4) żelatynazy – degradujące żelatynę i kolagen typu IV; 5) metaloproteazy typu błonowego – biorą udział w aktywacji innych metaloproteaz oraz w procesie angiogenezy; 6) „pozostałe metaloproteazy” – niezakwalifikowane w żadnej z wyżej wymienionych grup (ryc. 1) (24).

Stężenia i aktywność metaloproteaz regulowane są w tkankach przez wiele czynników:

- na poziomie transkrypcji przez cytokiny (IL-1, TNF- α); hormony (parathormon-PTH), produkty bakteryjne (lipopolisacharyd);
- na poziomie przechwytywania enzymów do pęcherzyków wewnątrzkomórkowych; przez aparat Golgiego;
- na poziomie aktywacji proenzymu; jony metali, detergenty, oksydanty, inne proteazy, plazmina;

Grupa metaloproteaz	Numer	Budowa
matrylizyny	MMP-7	
kolagenazy	MMP-1, MMP-8, MMP-13	
stromelizyny	MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-18	
żelatynazy	MMP-2, MMP-9	
błonowe MMPs	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24	
	MMP-17, MMP-25	
inne MMPs	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-28, MMP-23	

Objaśnienie symboli:

	Peptyd sygnałowy		Domena hemopeksyny
	Propeptyd		Motyw fibronektyny
	Domena katalityczna		Domena przezbłonowa
	Fragment furynowy		Domena cytoplazmatyczna
	Region zawiasowy		Domena glikofosfatydyloinozytolowa
	Domena podobna do immunoglobulin		Motyw cystynowy

Ryc. 1. Podział i budowa metaloproteaz

– na poziomie specyficzności substratu; poprzez pH środowiska oraz tkankowe inhibitory proteaz (TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases) lub inhibitory proteaz serynowych – serpiny.

Charakterystyka inhibitorów metaloproteaz u ssaków

Inhibitory metaloproteaz w warunkach fizjologicznych regulują stężenie metaloproteaz. Dzielą się one na dwa typy: specyficzne tkankowe i niespecyficzne osoczowe inhibitory metaloproteaz. Inhibitory produkowane są przez te same komórki, które syntetyzują metaloproteazy.

Specyficzne tkankowe inhibitory tych enzymów są rodziną czterech strukturalnie spokrewnionych ze sobą białek: TIMP-1 do TIMP-4, sprawujących podwójną kontrolę nad MMPs. Po pierwsze, hamują aktywację prometaloproteaz oraz inaktywują aktywne już enzymy poprzez utworzenie kompleksu TIMP-MMP (24). Tkankowe inhibitory posiadają również inne właściwości biologiczne, np. TIMP-1 i TIMP-2 są promotorami wzrostu komórek oraz hamują apoptozę, TIMP-3 indukuje apoptozę (5). TIMP-1 pobudza rozrost komórek z linii prekursorowych erytrocytów, keratynocytów, chondrocytów, fibroblastów, komórek śródbłonna naczyń, z kolei w stanach patologicznych inhibitor ten powoduje rozrost fibroblastów w przebiegu twardziny oraz komórek nowotworowych wątroby, piersi, kości, mięśni i innych nowotworów złośliwych (47). TIMP-2 bierze udział w procesach proliferacji komórek mięsaków, włókniaków i osteoblastów oraz fibroblastów w różnych tkankach (16).

Wszystkie inhibitory metaloproteaz charakteryzują się znacznym, bo 44-52% podobieństwem struktury (3). Zbudowane są z dwóch domen – N-końcowej, składającej się ze 125 aminokwasów i wiążącej z centrum aktywnym MMPs oraz domeny C-końcowej, wpływającej na połączenie TIMP z fragmentem podobnym do domeny hemopeksyny metaloproteinaz, zbudowanej z około 65 aminokwasów (24, 27). TIMPs łączą się w stosunku stechiometrycznym 1 : 1 z aktywnymi formami metaloproteaz, poprzez wiązania niekowalencyjne tworząc dwucząsteczkowe kompleksy z aktywną formą enzymów i w ten sposób blokują łączenie z substratem lub łączą się z letalnymi ich prekursorami (2, 3). TIMP-1 i TIMP-2 produkowane są w formie rozpuszczalnej i wykrywane w surowicy krwi, z kolei TIMP-3 obecne są w przestrzeniach międzykomórkowych w formie nierozpuszczalnej (22). Mimo iż każdy z tych inhibitorów reguluje aktywność wszystkich metaloproteaz, to zauważalne jest powinowactwo pomiędzy nimi a metaloproteazami, np. TIMP-1 wykazuje powinowactwo do MMP-1 i MMP-9, TIMP-2 najsilniej blokuje MMP-2. Najlepiej poznanym inhibitorem metaloproteaz jest produkowana przez większość tkanek glikoproteina o masie 30 kDa – TIMP-1, a drugim – nieglikozylowana proteina TIMP-2 wytwarzana przez fibroblasty i komórki endotelialne. Ekspresja TIMP regulowana jest przez różne czynniki: dla TIMP-1 są to głównie cytokiny, przede wszystkim interleukina 1 (IL-1) oraz czynnik martwicy

nowotworów (TNF- α), czynnik wzrostu nowotworów (TGF- β), interleukina-6 i -10 (IL-6 i IL-10) (25, 31, 32). Rola inhibitora TIMP-2 uzależniona jest od jego stężenia: w mniejszych stężeniach aktywuje on enzymy, podczas gdy w wyższych blokuje aktywność MMP-2 (16). Z kolei TIMP-3 regulowany jest przez czynniki pobudzające mitozę, np. czynnik wzrostu nowotworów β (TGF- β), a hamowany przez czynnik martwicy nowotworów (TNF- α). Ekspresja TIMP-3 w skórze następuje tylko w mieszkach włosowych i komórkach otaczających gruczoły potowe (1). Ekspresja TIMP-4 jest kontrolowana podczas różnicowania i rozwoju tkanek. Białko to odgrywa szczególną rolę w procesach kształtowania i rozwoju mózgu, serca, jajników i mięśni szkieletowych (23).

Główne osoczowe, niespecyficzne inhibitory metaloproteaz to α 2-makroglobulina oraz α 1-antyproteaza (10). Produkowana przez wątrobę α 2-makroglobulina jest dużą proteiną o masie 750 kDa, co sprawia, że ma obniżone zdolności do penetracji pozanaczyniowej, a co za tym idzie, zdolności do efektywnego hamowania metaloproteaz. Białko to pod wpływem przyłączonej cząsteczki MMP zmienia swoją strukturę i zamyka enzym w klatce swojej cząsteczki (21).

Metaloproteazy i ich inhibitory u owadów

Metaloproteazy i ich inhibitory nie były szczegółowo opisywane u owadów. Pierwsze prace na ten temat pojawiły się dopiero w latach 90. ubiegłego wieku (29). Metaloproteazy i ich inhibitory odkryto w hemolimfie larw *Galleria mellonella* (48) oraz u *Drosophila melanogaster* (6). Wykazano, że pełnią one wraz z innymi proteazami i inhibitorami bardzo ważną funkcję, włączając się w mechanizmy odporności nieswoistej owadów (15, 34, 39).

Pierwszą owadzią metaloproteazę, homologiczną do ACE u ssaków, nazwano Ance, jako skrót wyjaśniający jej działanie z acetylocholinoesterazą. Ten owadzi homolog zwierzęcych ACE jest do nich bardzo podobny strukturalnie. Zbudowany jest z dwóch funkcjonalnych domen katalitycznych (N- oraz C-terminalna) charakteryzujących się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji aminokwasów. Dochodzi ono do prawie 90%, biorąc pod uwagę 40 reszt kluczowych do tworzenia centrów aktywnych poszczególnych domen. Dlatego też domeny Ance wykazują niezwykle zbliżoną specyficzność substratową, a jednym z niewielu przykładów peptydu hydrolizowanego specyficznie (około 50 razy szybciej przez N-końcową domenę) jest Ac-Ser-Asp-Lys-Pro-OH. W porównaniu z metaloproteazami ssaków, w strukturze owadzich homologów brak jest ciężkiego glikozylowanego N-terminalnego t-ACE specyficznego regionu oraz regionu transmembranowego od strony C-końca. Metaloproteazy owadów są zdolne do odcinania TIMP z oligopeptydów posiadających na C-końcu fragment Gly-Lys-Arg i Gly-Arg-Arg. Jon cynku (Zn^{2+}) wiązany jest przez aminokwasy w centrum aktywnym (E^{395} , H^{367} , H^{371}) oraz dwie cząsteczki wody. D^{399} pośrednio koordynuje przyłączenie Zn^{2+} poprzez

wiązanie wodorowe z H³⁶⁷. Silne przyłączenie substratu do Ance zachodzi od strony N-końca enzymu. Z kolei słabsze połączenie tworzy się od strony C-terminalnej, w wyniku czego substrat zostaje uwięziony w cząsteczce enzymu. Substratem dla metaloproteaz są zazwyczaj krótkie 9-, 10-aminokwasowe białka. Z kolei inhibitory wiążą się z miejscem H⁴⁹⁷. Krystalograficzna struktura Ance wykazała również, że wysoko konserwatywne reszty Q²⁶⁵, L⁴⁹⁵ i Y⁵⁰⁴ chwytają karboksylowy koniec inhibitora i substratu. Reszty te zapobiegają również „ślizganiu” się substratu w centrum aktywnym (26). Inhibitory metaloproteaz w hemolimfie larw *G. mellonella* mają charakterystyczną N-terminalną sekwencję aminokwasową: Ile-Arg-Cys-Asn-Asp-Lys-His-Tyr-Cys-Glu-Asp-Gly-Tyr-Ala-Arg-Asp-Val-Asn-Gly-Lys-Cys-Ile-Pro-Ile-Lys-Asp. Ich masa waha się pomiędzy 161 a 146 Da (48). Metaloproteazy wykryte w przewodzie pokarmowym *Tineola bisselliella* mają optimum pH działania 9,4, a ich masa wynosi 24 kDa oraz charakteryzują się obecnością łańcucha S-karboksymetylu A i B w swojej cząsteczce (46).

U owadów zidentyfikowano jeszcze inne izoformy metaloproteaz, mające skrót ECE (endoteliny). Są to transmembranowe białka typu II złożone z 727 aminokwasów. Aminoterminalny odcinek enzymu złożony z 9 aminokwasów zakotwiczony jest w domenie cytoplazmatycznej, natomiast hydrofobowy region złożony z 23 reszt zawieszony jest na granicy błony komórkowej. Największą pozakomórkową część enzymu stanowią pozostałe 695 aminokwasy. Odległość pomiędzy miejscem aktywnym a trzema jonami cynku wynosi 64 aminokwasy. Owadzie metaloproteazy ECE były bardzo konserwatywne podczas ewolucji, jednakże nastąpiła spora redukcja reszt cysteinowych, których w ogóle nie zawierają enzymy u *Drosophila* i *Anopheles* (26).

Wysoki poziom aktywności metaloproteaz zaobserwowano w tkankach przewodu pokarmowego (w endokrynnych komórkach) u Diptera, gdzie wpływają one na procesy trawienne poprzez regulację wydzielania hormonów trawiennych (20). Wykazano również, iż metaloproteazy wpływają na rozwój systemu rozrodczego poprzez różnicowanie i prawidłowy rozwój/dojrzewanie spermatyd (19). Z kolei u żeńskich osobników *Anopheles stephensi* dodanie inhibitora metaloproteaz do krwi spowodowało zmniejszenie liczby składanych jaj (12). U *Neobellieria bullata* metaloproteazy regulują procesy pęcherzyka żółtkowego w jajniku (18). Silne mutacje w genie ance, objawiające się niestabilnością aktywności metaloproteaz, wpływają na śmiertelność larw i poczwerek u *A. stephensi*, ponieważ te enzymy zamiast regulować białka podczas rozwoju i embriogenezy, akumulują się w pęcherzyku żółtkowym i go blokują (11). Z tego wynika, że aktywacja metaloproteaz zachodzi zarówno przed, jak i podczas rozwoju poczwarki u owadów (np. u *D. melanogaster* (50), u *L. oleracea* (13)). Wewnątrzkomórkowa kolokalizacja z peptydami lokuostamytotropinowymi odgrywa szczególną rolę w biosyntezie hormonów peptydowych i neurotransmiterów. Takie działanie metaloproteaz zachodzi w głowach

Musca domestica, *Leucophea maderae* i *Lacanobia oleracea* (26). Wiadomo, że metaloproteazy produkowane przez każdą z grup patogenów wpływają na indukcję humoralnej reakcji obronnej u owadów. Wydzielane są wówczas u owadów inhibitory skierowane przeciwko proteazom bakterii, grzybów i pasożytów (14, 35). Z kolei poziom ekspresji mRNA metaloproteaz regulowany jest poziomem lipopolisacharydu (LPS) po inwazji bakteryjnej. Dodatkowo włączane są inne procesy obronne organizmu, tj. hemocyty czy antymikrobiologiczne białka (26). Udowodniono również, że system metaloproteaz i ich inhibitorów wydzielany jest u owadów w przypadku pojawienia się komórek rakowych i o zmienionej strukturze po inwazjach patogenów (46, 49).

Alkaliczne metaloproteazy odkryto również w przewodzie pokarmowym larw *Bombyx mori* oraz u dorosłych pszczoł *Apis mellifera*. Jeśli chodzi o pszczoły, to najprawdopodobniej enzymy te w ich przewodzie pokarmowym pochodzą z pyłku (4, 46). Metaloproteazy i ich inhibitory wykryto również na powierzchni ciała pszczoł (15, 36-38, 43). Związki te w stanie homeostazy organizmu występują tylko u matek we wszystkich stadiach rozwojowych i w różnych porach roku, a ich optimum pH działania zawiera się pomiędzy 7,0 a 9,4 (39). Z kolei u robotnic cały zestaw tych białek zaczyna być aktywny po poddaniu ich presji wielu niekorzystnych czynników środowiskowych np.: zanieczyszczenia środowiska (38), antybiotyków (34), chemioterapeutyków używanych do zwalczania warrozy (42, 44), przetrzymywania pszczoł w klatkach podczas badań biomedycznych, a także inwazji patogenów (39). Na jakość bariery proteolitycznej kutikuli pszczoł można wpływać korzystnie np. poprzez suplementację m.in.: koenzymem Q10 (41), kofeiną (40), fenyloacetylglutaminianem sodu (PG) (30). Przy braku czynnika stresogennego lub patogennego metaloproteazy występują na kutikuli robotnic w postaci proenzymów. Interakcja enzym MMP–inhibitor MMP jest uzależniona od warunków atmosferycznych (sezonowa zmiana metabolizmu) oraz od wydzielania feromonów pszczelich (7, 39). Najprawdopodobniej u pszczoł, podobnie jak u mrówek (8, 9) metaloproteazy tworzą wraz z innymi elementami systemu proteolitycznego ochronny biofilm na powierzchni ciała (15, 35, 36). U *Manduca sexta* po infekcji patogenami, głównie bakteriami, następuje wzmożona synteza metaloproteaz, które włączane są również w mechanizmy melanizacji (17).

Metaloproteazy oraz ich inhibitory odgrywają ważną rolę, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych ustroju. Enzymy te pełnią funkcje: promotorów wzrostu komórek, pobudzają rozrost komórek prawidłowych, hamują/indukują apoptozę, regulują aktywność komórek nowotworowych, zarówno u człowieka, jak i u owadów. U ludzi ich aktywność jest zwiększona w chorobach np.: przyzębia, skóry, stawów, serca. Z kolei u owadów uczestniczą w procesach trawiennych, w biosyntezie hormonów peptydowych i neurotransmiterów, w melanizacji, wpływają na rozwój systemu rozrodczego oraz prawidłowy rozwój larw i poczwerek oraz zabezpieczają przed atakiem patogenów. Ich aktywacja

jest uzależniona od stanu fizjologicznego organizmu oraz od czynników atmosferycznych i/lub stresowych.

Piśmiennictwo

- Airola K., Ahonen M., Johansson N.: Human timp-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle and cancer progression. *J. Histochem. Cytochem.* 1998, 46, 437-447.
- Birkedal H. H.: Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J. Periodontol.* 1993, 64, 474-484.
- Bode W., Fernandez-Catalan C., Nagase H., Maskos K.: Endoproteinase – protein inhibitor interaction. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1999, 107, 3-10.
- Borsuk G., Olszewski K., Strachecka A., Paleolog J., Gagoś M.: The interaction of worker bees which have increased genotype variance. II. Cage tests of sugar syrup collecting and mortality. *J. Api. Sci.* 2011, 55, 59-65.
- Cawston T. E., Mercer E.: Preferential binding of collagenase to alpha 2-macroglobulin in the presence of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *FEBS Lett.* 1986, 209, 9-12.
- Cornell M. J., Williams T. A., Lamango N. S., Coates D., Corvol P., Soubrier F., Hoheisel J., Lehrach H., Isaac R. E.: Cloning and expression of an evolutionary conserved single domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 13613-13619.
- Cornette R., Farine J., Quennedy B., Riviere S., Brossut R.: Molecular characterization of Lma-p45, a new epicuticular surface protein in the cockroach *Leucophaea maderae* (Dictyoptera, oxyhaloinea). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002, 32, 1635-1642.
- Currie C. R.: A community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 357-380.
- Currie C. R., Scott J. A., Summerbell R. C., Malloch D.: Fungus – growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 1999, 398, 701-704.
- Dziankowska-Bartkowiak B., Waszczykowska E., Żebrowska A.: Udział metaloprotein i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry. *Immun. Klin.* 2004, 9, 71-79.
- Ekbote U., Coates D., Isaac R. E.: A mosquito (*Anopheles stephensi*) angiotensin I-converting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. *FEBS Lett.* 1999, 455, 219-222.
- Ekbote U., Looker M., Isaac R. E.: ACE inhibitors reduce fecundity in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003, B134, 593-598.
- Ekbote U., Weaver R. J., Isaac R. E.: Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: changes in levels of activity during developmental and after copulation suggest roles during metamorphosis and reproduction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2003, 33, 989-998.
- Frączek R., Żółtowska K., Lipiński Z., Dmitryjuk M.: The mutual influence of proteins from Varroa destructor extracts and from honeybee haemolymph on their proteolytic activity – in vivo study. *Acta Parasitol.* 2013, 58, 17-23.
- Grzywnowicz K., Ciolek A., Tabor A., Jaszek M.: Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie* 2009, 40, 4-19.
- Hayakawa T., Yamashita K., Ohuchi E., Shinagawa A.: Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell. Sci.* 1994, 107, 2373-2379.
- Held K. G., LaRock C. N., D'Argenio D. A., Berg C. A., Collins C. M.: A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photobacterium luminescens* induces melanization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 7622-7628.
- Hens K., Vandingenen A., Macours N., Baggerman G., Karaoglanovic A. C., Schoofs L., De Loof A., Huybrechts N. R.: Characterization of four substrates emphasizes kinetic similarity between insect and human C-domain angiotensin-converting enzyme. *Europ. J. Biochem.* 2002, 269, 3522-3530.
- Hurst D., Rylett C. M., Isaac R. E., Shirras A. D.: The *Drosophila* angiotensin-converting enzyme homologue Ance is required for spermiogenesis. *Develop. Biol.* 2003, 254, 238-247.
- Isaac R. E., Coates D., Williams T. A., Schoofs L.: Insect angiotensin-converting enzyme: comparative biochemistry and evolution. *Sci. Exp. Biol.* 1998, 65, 357-378.
- Kołomecki K.: Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego. *Onkol. Pol.* 2000, 3, 163-167.
- Leco K., Khokha R., Pavloff N.: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cell and tissues. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 9352-9360.
- Leco K. J., Apte S. S., Taniguchi G. T., Hawkes S. P., Khokha R., Schultz G. A., Edwards D. R.: Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett.* 1997, 401, 213-217.
- Lipka D., Boratyński J.: Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2008, 62, 328-336.
- Lohmander L. S.: Metalloproteinases, tissue inhibitor and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993, 36, 181-189.
- Macours N., Hens K.: Zinc-metalloproteinases in insects: ACE and ECE. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2004, 34, 501-510.
- Murphy G., Houbrechts A., Cockett M. I., Williamson R. A., O'Shea M., Docherty A. J.: The treminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochem.* 1991, 30, 8097-8102.
- Nagase H.: Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 1997, 378, 151-160.
- Overton L. K., Patel I., Becherer J. D., Chandra G., Kost T. A.: Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases by recombinant baculovirus-infected insect cells cultured in an airlift fermentor. *Meth. Mol. Biol.* 1995, 39, 225-242.
- Paleolog J., Strachecka A., Burzyński S. R., Olszewski K., Borsuk G.: The larval diet supplemented with sodium phenylacetylglutamine influences the worker cuticle proteolytic system in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Api. Sci.* 2011, 55, 67-77.
- Reynolds J. J.: Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv. Dent. Res.* 1994, 8, 312-319.
- Ruhul A. A., Senga T., Oo M. L.: Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signaling pathways. *Akt. Erk. Gen. Cel.* 2003, 8, 515-523.
- Stettner R., Bogusiewicz M., Rechberger T.: Rola metaloproteaz macierzowych i ich inhibitorów w progresji raka jajnika – implikacje diagnostyczne i terapeutyczne. *Ginek. Pol.* 2009, 80, 47-53.
- Strachecka A., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J., Gagoś M., Chobotow J.: The effect of amphotericin B on the lifespan, body-surface protein concentrations, and DNA methylation levels of honey bees (*Apis mellifera*). *J. Api. Sci.* 2012, 56, 107-113.
- Strachecka A., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J., Lipiński Z.: Proteolysis on the body surface of pyrethroid-sensitive and resistant *Varroa destructor*. *Acta Parasitol.* 2013, 58, 64-69.
- Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J.: Body-surface metalloprotease activity in *Apis mellifera* L. workers relative to environmental pollution. *Med. Weter.* 2012, 68, 406-410.
- Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Bajda M., Chobotow J.: Body-surface compounds in Buckfast and Caucasian honey bee workers (*Apis mellifera*). *J. Api. Sci.* 2014, 58, 5-15.
- Strachecka A., Gryzinska M., Krauze M.: Influence of environmental pollution on the protective proteolytic barrier of the honey bee *Apis mellifera* mellifera. *Pol. J. Envir. Stud.* 2010, 19, 855-859.
- Strachecka A., Gryzińska M., Krauze M., Grzywnowicz K.: Profile of the body surface proteolytic system in *Apis mellifera* queens. *Czech J. Anim. Sci.* 2011, 56, 15-22.
- Strachecka A., Krauze M., Olszewski K., Borsuk G., Paleolog J., Merska M., Chobotow J., Bajda M., Grzywnowicz K.: Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochem. (Mosc.)* 2014, 79, 1192-1201.
- Strachecka A., Olszewski K., Paleolog J., Borsuk G., Bajda M., Krauze M., Merska M., Chobotow J.: Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2014, 86, 165-179.
- Strachecka A., Paleolog J., Borsuk G., Olszewski K.: The influence of formic acid on the body surface proteolytic system at different developmental stages in *Apis mellifera* L. workers. *J. Api. Res.* 2012, 51, 252-262.
- Strachecka A., Paleolog J., Grzywnowicz K.: The surface proteolytic activity in *Apis mellifera*. *J. Api. Sci.* 2008, 52, 57-68.
- Strachecka A., Paleolog J., Olszewski K., Borsuk G.: Influence of amitraz and oxalic acid on the cuticle proteolytic system of *Apis mellifera* L. workers. *Insects* 2012, 3, 821-832.
- Visse R., Nagase H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 2003, 92, 827-839.
- Walter R. T., Clélia F.: Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Com. Biochem. Physiol.* 1994, 109B, 1-62.
- Wang T., Yamashita K., Iwata K., Hayakawa T.: Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 296, 201-205.
- Wedde M., Weise C., Kopacek P., Franke P., Vilcinskas P.: Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* 1998, 255, 535-543.
- Wedde M., Weise C., Nuck R., Altincicek B., Vilcinskas A.: The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. *Biol. Chem.* 2007, 388, 119-127.
- Wilson C. L., Shirras A. D., Isaac R. E.: Extracellular peptidases of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 2002, 23, 2007-2014.

Adres autora: mgr inż. Milena Bajda, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin;
e-mail: milena.bajda@wp.pl