

Aktywność inhibitorów proteaz na powierzchni ciała pszczoły miodnej

ANETA STRACHECKA, KRZYSZTOF GRZYWNOWICZ

Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UP,
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
Zakład Biochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin

Strachecka A., Grzywnowicz K.

Activity of protease inhibitors on the body surface of the honeybee

Summary

The proteolytic system of insects, both its protease activities, and protease inhibitors activities, in the hemolymph and digestive tract are poorly described. The authors present protease inhibitors activities in connection with the level of antifungal activities as a part of the honeybee body surface proteolytic system. The object of the study was to compare this in castes (the queen, workers and drones), in developmental stages (eggs, larvae, pupae and imagoes) and in seasons (spring, summer and autumn). The following methods were used: protease inhibitors activity testing by the Lee and Lin method and antifungal activity testing in the presence of marker fungi on the SABG substratum. The highest protease inhibitors activities were present on the workers and the lowest ones on the queen, according to exposure to pathogens. The highest protease inhibitors activities were present during the autumn and spring. The highest protease inhibitors activities were observed in the spring in the worker larvae (16.697 U/mg) and in the mature workers (17.605 U/mg). Surface protease inhibitors activity was not observed in the drone eggs and larvae for neutral pH and in the queen larvae and pupae for neutral and alkaline pH in the summer. The larvae and pupae were found to have higher acidic protease inhibitors activity than the imagoes. The obtained results of antifungal activity presented better entomopathogen protection in the workers and queens than in the drones. The authors have provided data connecting body surface inhibitors with antifungal cuticle protection. Our data present an initial pattern of the honeybee body surface proteolysis, and will pave the way for future biochemical studies of immunity in this insect.

Keywords: body surface proteolysis, proteases, protease inhibitors, antifungal substances, honeybee

Aktywności proteolityczne występują w organizmie pszczoły miodnej w przewodzie pokarmowym, gdzie służą do trawienia białkowych składników pszczelej diety, oraz w hemolimfie, gdzie są elementami układu odpornościowego. Dodatkowo potwierdzona jest obecność proteaz w płynie wylinkowym. Hemolimfa owadów zawiera zarówno peptydazy, jak i inhibitory enzymów proteolitycznych, które stanowią znaczącą część białek hemolimfy oraz są czynnikami chroniącymi owady przed atakiem pasożytniczych mikroorganizmów. Białkowe inhibitory enzymów proteolitycznych regulują aktywność endogennych proteaz i uczestniczą w mechanizmach obronnych organizmu przed patogenami zarówno bakteryjnymi, jak i grzybowymi, przeciwdziałając szkodliwej aktywności egzogennych proteaz (2, 3, 8). Inhibitory enzymów proteolitycznych owadów hamują aktywność proteinaz entomopatogennych grzybów, utrudniając ich wnikanie do wnętrza ciała owada. Po wniknięciu strzępek grzyba do hemolimfy inhibitory hamują jego proteinazy oraz wpływa-

ją na rozwój i rozmnażanie entomopatogena. Inhibitory zabezpieczają ciało owada przed przypadkowym uruchomieniem mechanizmów, takich jak przeobrażenie, aktywacja systemu oksydazy fenolowej oraz zymogenów. Inhibitory z hemolimfy owadów podzielono na dwie grupy – inhibitory wielkocząsteczkowe (około 45 kDa), należące głównie do rodziny serpin oraz inhibitory niskocząsteczkowe (poniżej 10 kDa), z reguły należące do rodziny inhibitorów typu Kunitza (4, 6, 9). W tych wszystkich badaniach systemów proteolizy u owadów brak jest badań poświęconych proteolizie powierzchni ciała.

Celem badań było określenie: a) wpływu różnych okresów rozwoju (jaja, larwy, poczwarki, imago) w kasty (matki, robotnice, trutnie) oraz pór roku (wiosna, lato, jesień) na naturalną aktywność inhibitorów enzymów proteolitycznych na powierzchni ciała pszczoły miodnej; b) aktywności przeciwgrzybowej inhibitorów enzymów proteolitycznych w zależności od kasty pszczoł, okresu ich rozwoju i pory roku.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na pszczole miodnej (*Apis mellifera*). Materiał do badań pochodził z Katedry Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej UP w Lublinie oraz ze Związku Pszczelarzy Polskich. Matki (40 sztuk), trutnie (100 sztuk) i robotnice (300 sztuk) pobierano w następujących okresach: wrzesień/październik, listopad/grudzień, styczeń/luty, kwiecień/maj, lipiec/sierpień i przechowywano w temperaturze -20°C . Następnie, po rozmrożeniu, owady umieszczano na sączku (Miracloth) i przepłukiwano wodą

destylowaną (dla usunięcia luźno związanych zanieczyszczeń), popłuczyny wylewano, po czym umieszczano ponownie w probówce i wytrząsano przez 3 min. w wodzie destylowanej, a następnie w 1% roztworze detergentu (Triton X-100, Serva), za każdym razem przesączając preparat. Po przesączeniu preparat zamrażano w probówkach Eppendorfa.

Oznaczanie poziomu naturalnych inhibitorów proteinaz wykonano według metody Lee i Lin (7), stosowanej w enzymologii do określania poziomu aktywności tych białek.

Oznaczanie aktywności przeciwgrzybiczej – przeciwpleśniowej i przeciwdrożdżowej preparatów z faz rozwojowych – kast – pór roku wobec grzybów markerowych wykonano na podłożu SABG (Sabouraud glucose agar). Do podłoża dodawano roztwory grzybni *Aspergillus fumigatus* lub *Candida albicans* i wylano je na płytki Petriego. W zestalonej pożywce wycinano studzienki, do których nanoszono zliofilizowane próbki. Po trzech dniach wykonano dokumentację fotograficzną i opisywano zmiany. Skrótly zastosowane w tabelach podano w tabeli 1.

Tab. 1. Skrótly używane w tabelach (tab. 2, 3)

Robotnice	Matki	Trutnie
JP – jaja robotnice	LK – larwy matki	JT – jaja trutni
LP – larwa robotnice	PK – poczwarki matki	LMT – larwa mała trutowa
LMP – larwa mała robotnic	DK – dorosłe matki	LDT – larwa duża trutowa
LDP – larwa duża robotnic	DKS – dorosłe żywe matki	PTS – poczwarka żywa trutowa
PP – poczwarka mała robotnic	DKM – dorosłe martwe matki	PTM – poczwarka martwa trutowa
DP – dorosłe robotnice		DT – dorosłe trutnie
DPS – dorosłe robotnice żywe		DTS – dorosłe trutnie żywe
DPM – dorosłe robotnice martwe		DTM – dorosłe trutnie martwe

Tab. 2. Powierzchniowa aktywność inhibitorowa proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych poszczególnych faz rozwojowych różnych kast pszczół w okresie wiosny, lata i jesieni

Próbki	Wiosna						Lato						Jesień					
	pH = 2,4	± se	pH = 7	± se	pH = 11,2	± se	pH = 2,4	± se	pH = 7	± se	pH = 11,2	± se	pH = 2,4	± se	pH = 7	± se	pH = 11,2	± se
JT	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	7,638	0,009	0	0,002	1,620	0,020	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
LMT	3,839	0,02	4,440	0,009	1,258	0,009	7,449	0,008	0	0,000	0	0,002	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
LDT	4,442	0,009	1,210	0,008	0,614	0,008	7,478	0,009	0	0,001	0,260	0,009	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
PTS	0	0,002	0,640	0,040	0,230	0,020	7,144	0,009	0	0,002	0	0,000	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
PTM	0,603	0,009	2,170	0,009	1,190	0,009	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
DT	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	7,414	0,006	0	0,001	0	0,001	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
DTS	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	7,544	0,009	0	0,001	7,110	0,050	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
DTM	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	7,399	0,008	3,920	0,009	0	0,002	7,207	0,009	8,500	0,06	3,289	0,02
LK	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	1,014	0,009	0	0,002	0	0,001	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
PK	0,432	0,01	0,610	0,009	0	0,003	0	0,002	0	0,001	0	0,002	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
DK	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	1,278	0,009	0	0,00	0	0,001	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
DKS	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	1,705	0,03	n.a.	-	0,839	0,009	2,308	0,020	4,883	0,030
DKM	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	1,690	0,009	n.a.	-	0,582	0,008	1,493	0,009	0	0,001
JP	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	8,409	0,030	2,337	0,040	9,690	0,040	8,089	0,040	0	0,020	0,837	0,030
LP	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	8,219	0,030	13,34	0,030	0	0,001
LMP	12,032	0,030	3,680	0,009	0,870	0,010	8,468	0,009	3,168	0,009	5,070	0,005	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
LDP	16,697	0,009	6,500	0,020	4,017	0,009	8,181	0,008	3,005	0,03	4,990	0,009	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
PP	14,084	0,008	5,290	0,008	2,032	0,008	8,159	0,009	4,635	0,009	0	0,001	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-
DP	0	0,002	17,605	0,009	7,690	0,020	8,323	0,006	7,060	0,008	8,447	0,009	7,925	0,009	2,610	0,009	6,690	0,009
DPS	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	9,325	0,009	11,300	0,007	8,445	0,020	7,489	0,008	1,434	0,030	2,300	0,008
DPM	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	10,213	0,009	9,990	0,020	8,652	0,030	7,695	0,010	9,450	0,020	3,300	0,009

Objaśnienia: Nieanalizowane próbki (n.a.) są wynikiem braku materiału biologicznego.

Wyniki i omówienie

Najwyższe aktywności inhibitorowe zaobserwowano dla robotnic zebranych na wiosnę (tab. 2.). Wyższe wartości aktywności inhibitorowej wykazują trutnie z okresu lata i jesieni. Poszczególne fazy rozwojowe trutni z tych pór roku wykazują bardzo zbliżone wartości aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych. Matki wykazują najwyższą aktywność inhibitorową w lecie. Szczególną uwagę zwraca ogromna aktywność inhibitorowa robotnic zebranych na wiosnę. Robotnice z przełomu czerwca i lipca oraz z września charakteryzowały się zbliżonymi wartościami aktywności inhibitorowej.

Na początku okresu wegetacyjnego aktywność inhibitorowa proteaz kwaśnych jest największa u robotnic. Może to wskazywać na ich ochronną rolę dla tej kasty przed pasożytniczymi mikroorganizmami, grzybami i wirusami. Robotnice czyszczą na wiosnę stare komórki, usuwają martwy czerw i imago, które nie przeżyły okresu zimy i stykają się z entomopatogenami. Wysoka aktywność inhibitorowa hamuje aktywność proteinaz pasożytniczych grzybów, utrudniając ich wnikanie do wnętrza ciała owada (1, 12, 14).

Latem najniższą aktywność inhibitorową zaobserwowano u matek. Przypuszcza się, że taki stan wynika z pozycji, jaką pełni matka w rodzinie pszczoły i szczególnego traktowania (karmienie i czyszczenie matki przez robotnice). Matka nie opuszcza ula przez cały okres wegetacyjny. Wylatuje z gniazda jedynie podczas lotów godowych, aby zebrać nasienie na całe życie. Po takim locie rozpoczyna składanie jaj w komórkach lęgowych, o które dbają robotnice, regulując ich wilgotność, temperaturę, przepływ powietrza oraz czystość i stan młodego pokolenia. Dlatego matka nie jest narażona na kontakt z patogenami w zbyt dużym stopniu (1, 12). W tej porze roku zauważono u trutni i robotnic wysoką aktywność inhibitorową proteaz kwaśnych, co może wskazywać na ich pozycję i pełnione przez nie funkcje w rodzinie pszczoły. Podobną cechę na powierzchni ciała zauważyli badacze niemieccy u karaluchów (11, 15). Robotnice wykonują podczas swojego sześciotygodniowego życia coraz bardziej skomplikowane czynności: od czyszczenia starych komórek, poprzez karmienie larw, odbieranie i magazynowanie pyłku, czyszczenie innych pszczół, pełnienie funkcji strażniczych, aż po zbieranie pyłku (13). W czasie wykonywania tych prac robotnice wymagają ochrony przed atakiem entomopatogenów, w postaci inhibitorów proteaz kwaśnych (1, 12).

Pod koniec sezonu wegetacyjnego robotnice wykazują również wysoką wartość aktywności inhibitorowej proteaz kwaśnych (ryc. 3). Przed zimą robotnice zbierają pyłek i nektar, i gromadzą je w komorach. Rośliny, z których pochodzą te produkty, wytwarzają toksyny. Adaptacja owadów do toksycznych składników pokarmu może przybierać różne formy i jest jedną z podstawowych teorii koewolucji. Pszczoły zare-

agowały na niesprzyjające warunki detoksyfikacją tych związków i wytworzeniem odpowiednich barier ochronnych w postaci powierzchniowej aktywności inhibitorów (5, 8).

W wynikach badań aktywności przeciwgrzybiczych (tab. 3) można zauważyć, iż lepsze zabezpieczenie przeciwgrzybicze posiadają robotnice i matki niż trutnie (różne fazy rozwojowe). Jednak w okresie lata i jesieni imago trutni wykazuje aktywność przeciwko grzybom pleśniowym (*A. fumigatus*), co można po-

Tab. 3. Aktywność przeciwgrzybowa dla poszczególnych kast *Apis mellifera* w różnych porach roku wobec grzybów markerowych *Aspergillus fumigatus* i *Candida albicans*

Pora roku	Faza rozwojowa	Aktywność przeciwpleśniowa	Aktywność przeciwdrożdżowa
Wiosna	LMT	+	-
	LDT	+	-
	PTS	-	-
	PTM	+	-
	PK	+	-
	LMP	+	+
	LDP	+	+
	PP	+	+
	DP	+	+
Lato	JT	-	-
	LMT	-	-
	LDT	-	-
	PTS	-	-
	DT	+	-
	DTS	+	+
	DTM	+	+
	LK	+	-
	PK	+	+
	DK	+	+
	JP	+	+
	LMP	+	-
	LDP	+	-
PP	+	-	
DP	+	+	
Jesień	DTM	+	+
	DKS	+	+
	DKM	+	+
	JP	+	+
	LP	+	+
	DP	+	+
	DPS	+	+
DPM	+	+	

Objaśnienia: + występowanie aktywności; - brak aktywności

wiązać z wysoką aktywnością inhibitorową w tych porach roku, która zabezpiecza owady przed czynnikami patogennymi w okresie największej aktywności osobników męskich (loty godowe) (1, 8). Zaobserwowano również większą aktywność przeciwgrzybową dorosłych osobników w porównaniu z pozostałymi fazami rozwojowymi rodziny pszczolej. U pszczoł wykazano lepszą ochronę przeciwpleśniową przeciwko *A. fumigatus* (pleśń) niż przeciwdrożdżową przeciwko *C. albicans* (drożdże). Ochrona matek może wynikać z ich pozycji w społeczeństwie oraz szczególnego traktowania przez kastę robotnic (mycie, karmienie, itp.). Wnioski te można powiązać z aktywnością inhibitorową proteaz kwaśnych występującą u matek (9, 12).

W okresie wiosennym i na początku lata pszczoły wykazują małą aktywność przeciw entomopatogenom i narażone są na zakażenie grzybicami, wywołanymi przez grzyby chorobotwórcze, które mają małe wymagania bytowe. Dla *Apis mellifera* najbardziej niebezpieczna jest grzybica kropidlakowa wywołana przez *Aspergillus fumigatus*, która atakuje czerw i imago. Pszczoły zarażają się zarodnikami lub strzępkami grzybnymi wnikającymi do organizmu przez oskórek lub przewód pokarmowy (13, 16). Duży wpływ na stan zdrowotny i przeżywalność rodziny pszczolej (na wiosnę) ma dokarmianie i wilgotność w gnieździe w okresie zimy. Zbyt rozległe gniazdo zimowe społeczeństwa pszczoł przyczynia się do pleśnienia plastrów. W takim przypadku robotnice niszczą i usuwają wiosną spleśniałe plastry lub pokrywają je grubą warstwą propolisu, ulegając przy tym (bardzo często) zakażeniu grzybami z rodzaju *Aspergillus* (12, 13).

Podsumowanie

Na powierzchni pszczoł istnieją bariery ochronne w postaci systemu proteolitycznego, składającego się z proteaz i inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych, które zabezpieczają przed zakażeniami, a jednocześnie pomagają w utrzymaniu homeostazy. Najwyższą aktywnością inhibitorową proteaz, praktycznie przez cały okres wegetacyjny, charakteryzowały się robotnice, co wskazuje na szczególną ochronę tej kasty przed patogenami. Uzyskane wyniki badań potwierdzają współzależności pomiędzy inhibitorami proteaz i aktywnością przeciwgrzybową: im wyższa aktywność inhibitorowa proteaz tym lepsze zabezpieczenie entomopatogenne u tych owadów.

Piśmiennictwo

1. Bania J., Polanowski A.: Bioinsektycydy a mechanizmy obronne owadów. Postępy Biochemii 1999, 45, 143-149.
2. Bode W., Fernandez-Catalan C., Nagase H., Maskos K.: Endoproteinase – protein inhibitor interaction. AMPIS 1999, 107, 3-10.
3. Bode W., Huber R.: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem. 1992, 204, 433-451.
4. Gawlik K., Poreba W., Rutowicz J.: Cystatyny, tyropiny i inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych. Postępy Biochemii 2005, 51 (3), 317-327.
5. Harborne J. B.: Ekologia biochemiczna. PWN, Warszawa 1997.

6. Kanost M. R.: Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Develop. Comp. Immunol. 1999, 23, 291-301.
7. Lee Tse-Min, Lin Yaw-Huei: Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air – or submergence – grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. Plant Sci. 1995, 106, 43-54.
8. Locht A., Van de, Lamba D., Bauer M., Huber R., Friedrich T., Kroger B., Hoffken W., Bode W.: Two heads are better than one: crystal structure of insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with trombin. Eur. Mol. Biol. Organ. J. 1995, 14, 5149-5157.
9. Malone L. A., Todd J. H., Burgess E., Christeller J. T.: Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. Apidologie 2004, 35, 655-664.
10. Nirmala X., Kodrik D., Žurovec M., Sal F.: Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. Eur. J. Biochem. 2001, 268, 2064-2073.
11. Page K., Hughes V. S., Odoms K. K., Dunsmore K. E., Hershenson M. B.: German Cockroach Proteases Regulate Interleukin – 8 Expression via Nuclear Factor for Interleukin – 6 in Human Bronchial Epithelial Cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2005, 32, 229-231.
12. Paleolog J.: Podział pracy w roju pszczoł jako szczytowe osiągnięcie ewolucji. Referat na BiNoZ (Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej AR w Lublinie), UMCS 2006.
13. Prabucki J.: Pszczelnictwo. Wyd. Promocyjne Albatros, Szczecin 1998.
14. Tabor A.: Badanie aktywności proteolitycznej obojętnej i zasadowej oraz odpowiadającej jej aktywności inhibitorowej powierzchni ciała pszczoły miodnej *Apis mellifera*. Praca mgr, Zakład Biochemii UMCS, Lublin 2006.
15. Wünschmann S., Gustchina A., Chapman M. D., Pomés A.: Cockroach allergen Bla g2: An unusual aspartic proteinases. J. Allergy Clin. Immunol. 2005, 116, 140-145.
16. Yamamoto Y., Watabe S., Kageyama T., Takahashi S. Y.: A novel inhibitor protein for Bombox cysteine proteinase is homologous to propeptide region of cysteine proteinases. Fed. Eur. Biochem. Soc. J. 1999, 448, 257-260.

Adres autora: mgr Aneta Strachecka, ul. Ułanów 1/35, 20-554 Lublin; e-mail: aneta.ciolek@up.lublin.pl