

Instytut Biologii UMCS
Zakład Patologii Owadów

MARIOLA ANDREJKO, MAŁGORZATA STEFANIAK

Proteinaza typu InA w gąsienicach *Galleria mellonella*
zakażonych *Serratia marcescens*

Exoproteinase of the type InA in *Galleria mellonella* larvae infected with *Serratia marcescens*

WSTĘP

Spośród wielu czynników wpływających na działanie chorobotwórcze bakterii enzymy, działające destrukcyjnie na tkanki owada lub blokujące jego układ obronny, kształtują ogólną zjadliwość niektórych bakteryjnych patogenów owadów. Ostatnie osiągnięcia w dziedzinie immunologii owadów wykazały, że bardzo ważnymi czynnikami zjadliwości bakterii entomopatogennych (2) są inhibitory niszczące selektywnie aktywność bakteriobójczą hemolimfy uwarunkowaną obecnością cekropin i attacyn.

Po raz pierwszy obecność inhibitora immunologicznego typu proteinaz, który nazwano inhibitorem typu A (InA), wykazano u bakterii entomopatogennej *Bacillus thuringiensis* (8). Egzoproteinaza o aktywności inhibitora typu A *B. thuringiensis* występuje u wielu entomopatogennych bakterii. Jej obecność wykazano u *Serratia marcescens* (3), *Pseudomonas aeruginosa* (7), *Bacillus larvae* (4). Inhibitory odporności o działaniu zbliżonym do inhibitora InA produkują także nicienie entomopatogenne *Steinernema feltiae* (5) i *Heterorhabditis bacteriophora* (6) oraz związane z nimi symbiotyczne bakterie *Xenorhabdus* (1).

MATERIAŁ I METODY

Jako owady modelowe w badaniach posłużyły poczwarki barciaka większego, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) oraz poczwarki w diapauzie bielinka kapustnika *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). Do indukowania odpowiedzi przeciwbakteryjnej u owadów zastosowano żywe komórki bakterii saprofitycznej *Escherichia coli* D31 w dawce ok. 10^5 komórek/owad.

Otrzymywanie inhibitorów immunologicznych typu A. Proteinyzyny produkowane w gąsienicy *G. mellonella* zakażonej przez entomopatogenną bakterię *S. marcescens*, szczepy CCM 2221, 2222 lub 2223, przygotowano z gąsienic będących w stanie śmierci oraz z owadów po 24 godz. od momentu padnięcia. Owady homogenizowano w jałowej wodzie destylowanej (1 owad/1 ml wody) przy użyciu młynka bakteriologicznego. Tkanki owada oddzielono z homogenatów przez wirowanie w czasie 15 min. przy 12000 obr./min. Klarowny supernatant jałowiono na sączku bakteriologicznym typu Schott G-5. Filtryaty przechowywano w stanie zamrożonym do czasu użycia.

Otrzymywanie filtratów bulionowych. Szczepy CCM 2221, 2222 i 2223 *S. marcescens* namnażano w hodowli stacjonarnej w bulionie odżywczym w temp. 28°C przez okres 3 dni, tj. do czasu zakończenia fazy wzrostu logarytmicznego bakterii. Hodowle bulionowe jałowiono przez sączek bakteriologiczny Schott G-5 i przechowywano w stanie zamrożonym.

Oznaczanie aktywności proteolitycznej. Aktywność proteolityczną zarówno w ekstraktach z gąsienic *Galleria* porażonych badanymi szczepami *S. marcescens*, jak i w filtratach bulionowych tych bakterii, oceniano metodą basenikowo-dyfuzyjną w podłożu agarowym zawierającym 5 mg Hide Powder Azure, 10 mg agarozы oraz 0,3 mg streptomycyny w 10 ml 0,066 M buforu Sørensen, pH 6,8. Do baseników w podłożu (średnica 2,7 mm) wprowadzono odpowiednie próbki proteinazy. Średnica strefy proteolizy wokół baseników, oceniana po 24 godz. inkubacji w 28°C, wskazywała na obecność enzymów proteolitycznych, przy czym w zakresie niskich stężeń (do 50 µg) była proporcjonalna do ich stężenia w badanej próbce. Poziom aktywności proteinaz kalkulowano z krzywej kalibracyjnej wykreślonej ze znanych stężeń trypsyny i wyrażano w µg/ml badanego filtratu w przeliczeniu na aktywność trypsyny (E.C. 3.4.4.4.).

Oznaczanie aktywności bakteriobójczej hemolimfy. Aktywność bakteriobójczą hemolimfy poczwarek *G. mellonella* i *P. brassicae*, uwarunkowaną obecnością cekropin, oceniano metodą basenikowo-dyfuzyjną. Szczep indykatorowy *E. coli* D31, wrażliwy na działanie cekropin, zawieszono w miękkim (0,7%) agarze odżywczym, zawierającym streptomycynę i ślady fenylotiomocznika. Średnica stref przejaśnienia wokół baseników (średnica 2,7 mm) wypełnionych hemolimfą owadów była proporcjonalna do stężenia cekropin w badanych próbkach.

Hamowanie aktywności przeciwbakteryjnej typu cekropin przez inhibitory typu InA. W celu wykazania aktywności inhibitorowej egzoproteinaz produkowanych przez szczepy CCM 2221, 2222 oraz 2223 bakterii *S. marcescens* na aktywność bakteriobójczą typu cekropin w immunizowanej hemolimfie poczwarek *Galleria* lub *Pieris*, zastosowano test *in vitro*. Mieszanina reagująca zawierała w każdym przypadku 25% badanej hemolimfy oraz 50; 25; 12,5; 6,25 i 3,1% surowego preparatu egzoproteinazy preparowanej z larw *G. mellonella* 24 godz. po padnięciu owadów, natomiast 50; 25 i 12,5% jałowego filtratu z hodowli bulionowej poszczególnych szczepów *S. marcescens*. Każdą próbkę uzupełniano jałową wodą destylowaną do 100 µl. Aktywność typu cekropin w mieszaninie reagującej, a tym samym blokowanie bakteriobójczego działania hemolimfy przez inhibitory typu A, oceniano po 45 min. preinkubacji mieszaniny w probówkach Eppendorfa (1,5 ml) w temp. 23°C.

W przypadku obecności inhibitora, który inaktywował częściowo lub całkowicie niszczył aktywność bakteriobójczą typu cekropin, obserwowano redukcję strefy bakteriolizy *E. coli* wokół

basenika, aż do całkowitego jej zaniku w przypadku wysokiej aktywności inhibitora immunologicznego typu A.

WYNIKI

W cyklu doświadczalnym badano zdolność wytwarzania proteinaz przez różne szczepy bakterii entomopatogennej *Serratia marcescens*.

Jak wykazano (tab. 1), poziom aktywności proteolitycznej wzrasta wraz z rozwojem bakteremii *S. marcescens* w gąsienicach *Galleria* do 24 godziny po padnięciu owadów. Wyraźne podwyższenie się aktywności proteolitycznej obserwowano w przypadku szczepów CCM 2221 oraz CCM 2222 *S. marcescens*. W ekstraktach uzyskanych z gąsienic będących w punkcie śmierci po zakażeniu szczepem CCM 2221 notowano 10-krotnie niższą aktywność aniżeli w ekstraktach preparowanych z owadów 24 godz. po padnięciu. Natomiast wraz z rozwojem bakteremii *S. marcescens* CCM 2222 obserwowano 5-krotny wzrost aktywności proteolitycznej. W przypadku zakażenia owadów szczepem CCM 2223 nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem aktywności proteolitycznej a rozwojem bakteremii w gąsienicach *G. mellonella*. Ekstrakty uzyskane z owadów w punkcie śmierci oraz po 24 godz. od ich padnięcia charakteryzowały się niską i zbliżoną aktywnością proteolityczną.

Tab. 1. Aktywność proteolityczna w ekstraktach z gąsienic *Galleria mellonella* porażonych bakterią *Serratia marcescens* oraz w hodowli bulionowej tej bakterii
Proteolytic activity in extracts from *Galleria mellonella* larvae infected with *Serratia marcescens* and in bacterial broth culture

Szczep <i>S. marcescens</i> <i>S. marcescens</i> strain	Aktywność proteolityczna ($\mu\text{g/ml}$) Proteolytic activity ($\mu\text{g/ml}$)		
	Ekstrakt z gąsienic* Larval extract*		Hodowla bulionowa Broth culture
	0	24	
CCM 2221	1,4	14,8	0
CCM 2222	5,6	28,4	1,1
CCM 2223	6,5	7,4	0

* Ekstrakt z gąsienic *Galleria* zakażonych *S. marcescens* (CCM 2221, 2222 lub 2223) preparowany z owadów w punkcie śmierci oraz 24 godziny po śmierci owadów.

* Crude larval extract from *Galleria* infected with *S. marcescens* (CCM 2221, 2222 or 2223) prepared from moribund larvae and 24 h after insect's death.

W stacjonarnych hodowlach bulionowych badanych szczepów *S. marcescens* strefę proteolizy w podłożu z Hide Powder Azure obserwowano jedynie w przypadku szczepu CCM 2222 (tab. 1).

Przy zastosowaniu systemu *in vitro*, złożonego z immunizowanej hemolimfy poczwarek *Pieris* lub *Galleria* i preparatów egzoproteiny z gąsienic *G. mellonella* porażonych *S. marcescens*, badano zdolność blokowania aktywności bakteriobójczej hemolimfy owadów, uwarunkowanej obecnością cekropin przez egzoproteiny uwalniane podczas porażenia owada (tab. 2).

Tab. 2. Hamowanie aktywności bakteriobójczej typu cekropin w hemolimfie poczwarek *Pieris brassicae* i *Galleria mellonella* przez egzoproteiny typu InA z *Serratia marcescens*
Inhibition of cecropin antibacterial activity in haemolymph of *Pieris brassicae* and *Galleria mellonella* pupae by *Serratia marcescens* exoproteinasen of the type InA

Inhibitor (%)	<i>Pieris brassicae</i>			<i>Galleria mellonella</i>		
	Średnica strefy bakteriolizy <i>E. coli</i> D31 (mm) Zone diameter of <i>E. coli</i> D31 lysis (mm)					
	S.m. 2221	S.m. 2222	S.m. 2223	S.m. 2221	S.m. 2222	S.m. 2223
50,00	6,5	0	6,5	6,0	4,5	6,0
25,00	6,5	śl (Tr)	6,5	6,0	4,5	6,0
12,50	7,0	śl (Tr)	6,5	6,0	5,0	6,0
6,25	7,0	5,0	6,5	6,0	5,0	6,0
3,12	7,0	5,0	6,5	6,0	6,0	6,0
Kontrola Control	6,5	6,5	6,0	6,0	6,0	6,0

Kontrolę stanowił 25% roztwór immunizowanej hemolimfy *P. brassicae* lub *G. mellonella* bez dodatku egzoproteiny.

Control mixture contained 25% *P. brassicae* or *G. mellonella* immune haemolymph without exoproteinasen.

Śl: strefa bakteriolizy *E. coli* D31 < 4,0 mm.

Tr: trace *E. coli* D31 lysis less than 4,0 mm.

Ekstrakt larwalny uzyskany z gąsienic *Galleria* zakażonych *S. marcescens*, szczep CCM 2222, preparowany po 24 godzinach od czasu padnięcia gąsienic, wyraźnie hamował aktywność bakteriobójczą typu cekropin, zarówno w hemolimfie *P. brassicae*, jak i *G. mellonella*. Inhibitor dostrzegalnie hamował aktywność cekropin w hemolimfie poczwarek *Galleria* już w stężeniu 6,25% ekstraktu w układzie doświadczalnym, natomiast obniżenie aktywności przeciwbakteryjnej u poczwarek *Pieris* notowano już po ekspozycji hemolimfy na stężenie 3,12% badanego ekstraktu. W stężeniach wyższych obserwowano zaledwie śladową aktywność typu cekropin w immunizowanej hemolimfie, a zastosowanie 50% stężenia ekstraktu larwalnego całkowicie zablokowało aktywność przeciwbakteryjną.

Ekstrakty larwalne otrzymane z gąsienic porażonych szczepem CCM 2221 lub CCM 2223 *S. marcescens* nie wywierały wpływu na aktywność cekropin, zarówno w hemolimfie poczwarek *Galleria*, jak i poczwarek *Pieris*. Notowano

strefy bakteriolyzy *E. coli* porównywalne ze strefami otrzymanymi po nałożeniu na podłoże indykatorowe próbek kontrolnych.

W teście *in vitro*, w którym do hamowania aktywności bakteriobójczej hemolimfy zastosowano jałowe filtry z hodowli bulionowych bakterii *S. marcescens*, wykazano współzależność pomiędzy aktywnością proteolityczną filtratów i ich zdolnością do blokowania aktywności cekropin (tab. 3 i tab. 1). Nieznaczne obniżenie aktywności notowano po ekspozycji hemolimfy *Galleria* i hemolimfy *Pieris* na działanie filtratu bulionowego szczepu CCM 2222. Podobnie jak w przypadku ekstraktów z gąsienic porażonych *S. marcescens*, cekropiny *P. brassicae* okazały się bardziej wrażliwe na działanie egzoproteinazy produkowanej w hodowli bulionowej przez szczep CCM 2222, aniżeli cekropiny *G. mellonella*.

Tab. 3. Hamowanie aktywności bakteriobójczej typu cekropin w hemolimfie poczwarek *Galleria mellonella* i *Pieris brassicae* przez egzoproteinazę produkowaną przez *Serratia marcescens* w hodowlach bulionowych

Inhibition of cecropin antibacterial activity in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* pupae by exoproteinase from *Serratia marcescens* broth cultures

Szczep <i>S. marcescens</i> <i>S. marcescens</i> strain	Stężenie filtratów (%) Filtrates concentration (%)	Średnica strefy bakteriolyzy <i>E. coli</i> D31 (mm) Zone diameter of <i>E. coli</i> D31 lysis (mm)	
		<i>Galleria mellonella</i>	<i>Pieris brassicae</i>
CCM 2221	50,0	6,5	6,0
	25,0	6,5	6,0
	12,5	6,5	6,0
CCM 2222	50,0	6,0	5,0
	25,0	6,5	5,5
	12,5	6,5	5,5
CCM 2223	50,0	6,5	6,0
	25,0	6,5	6,0
	12,5	6,5	6,0
Kontrola Control		6,5	6,0

Kontrolę stanowiła 25% hemolimfa poczwarek *G. mellonella* lub *P. brassicae* bez dodatku egzoproteinazy.
Control mixture contained 25% *P. brassicae* or *G. mellonella* immune haemolymph without exoproteinase.

WNIOSKI

1. Poziom aktywności proteolitycznej wzrasta wraz z rozwojem bakteremii *S. marcescens* w gąsienicach *G. mellonella*. Wysoką aktywność proteolityczną

notowano w przypadku szczepu CCM 2222, który jednocześnie charakteryzował się zdolnością do blokowania aktywności bakteriobójczej typu cecropin zarówno w hemolimfie *Pieris brassicae*, jak i *Galleria mellonella* (tab. 1 i tab. 2).

2. Niski poziom aktywności proteolitycznej, stwierdzony w stacjonarnych hodowlach bulionowych jedynie w przypadku szczepu CCM 2222 *S. marcescens* (tab. 1), jest skorelowany ze słabą zdolnością tego szczepu do blokowania aktywności przeciwbakteryjnej typu cecropin w hemolimfie *Pieris* oraz *Galleria* (tab. 3).

3. Wydaje się, że egzoproteinaza uwalniana przez szczep CCM 2222 w zakażonym owadzie jest funkcjonalnie identyczna z inhibitorem immunologicznym typu InA, opisanym u *Bacillus thuringiensis* (8).

PIŚMIENNICTWO

1. Akhurst R. J.: Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *Int. J. Syst. Bact.*, **33**, 38–45 (1983).
2. Boman H. G.: Humoral immunity in insect and the counter defence of some pathogens. *Fortschr. Zool.*, **27**, 211–222 (1982).
3. Flyg C., Kenne K., Boman H. G.: Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.*, **120**, 173–181 (1980).
4. Gliński Z., Jarosz J.: Exoproteinase of *Bacillus larvae* suppresses the *in vitro* antibacterial activity of cecropins of lepidopteran insects and antibacterial response peptides from the honeybee. *J. Apicult. Res.*, w druku (1995).
5. Götz P., Boman A., Boman H. G.: Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc., London*, **212 B**, 333–350 (1981).
6. Jarosz J.: Immune inhibitor of cecropin-like activity from cadavers of the greater wax moth parasitized with *Heterorhabdits bacteriophora*. [w:] Society for Invertebrate Pathology, XX Annual Meeting, University of Florida, Gainesville, 81–82 (1987).
7. Jarosz J.: An extracellular proteinase of *Pseudomonas aeruginosa* as a counter defence of the pathogen. Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, 76 (1990).
8. Sidén I., Dalhammar G., Teleander B., Boman H. G., Somerville H.: Virulence factors in *Bacillus thuringiensis*. Purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 45–52 (1979).

SUMMARY

The authors wanted to answer the question if exoproteinase released during parasitism in *Galleria mellonella* larvae by entomopathogenic bacteria *Serratia marcescens*, strains CCM 2221, 2222 and 2223, operates as inhibitor of cecropin-like activity in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* pupae. Only *S. marcescens* strain CCM 2222, released in parasitized insects exoproteinase, which inhibited cecropins in *Pieris* and *Galleria* haemolymph. The exoproteinase seems to be similar to immune inhibitor of the type A from *Bacillus thuringiensis* (8).