

Identification of proteases from leaf beetle (*Oulema* spp.) by selective protease inhibitors

Identyfikacja proteaz skrzypionek (*Oulema* spp.) za pomocą selektywnych inhibitorów proteaz

Beata Wielkopolan¹, Robert Nawrot², Felicyta Walczak¹

Summary

The aim of the study was the identification of gut proteases of leaf beetle *Oulema* spp. Leaf beetles like aphids or saddle gall midge belong to main cereal pests in Poland. Two species of leaf beetles are common in Poland: cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Linnaeus 1758) and grey leaf beetle (*Oulema gallaeciana*, Heydel 1870). The larvae of both species damage the assimilation surface of plant leaves.

Leaf beetles were collected from the fields. The larvae of leaf beetles were immobilized on ice and then homogenized. For identification of different gut proteases polyacrylamide gel separation (*in-gel protease assay* condition) and selective inhibitors E-64 (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane) for cysteine protease and PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) for serine protease were used.

Two kind of proteases: serine and cysteine were identified in guts of leaf beetles. This aspect is very important because insects utilize proteases to digest plant material and to gain exogenous amino acids.

Key words: leaf beetle, wheat, protease, *in-gel protease assay*, E-64, PMSF

Streszczenie

Celem badań była identyfikacja proteaz skrzypionek *Oulema* spp. W Polsce skrzypionki, obok mszyc i przyszcarka zbożowca, należą do głównych szkodników zbóż. W Polsce występują dwa gatunki skrzypionek: zbożowa (*Oulema melanopus*, Linnaeus 1758) i błękitka (*Oulema gallaeciana*, Heydel 1870). W szczególności larwy niszczą powierzchnię asymilacyjną liści.

Zebrane z pola larwy skrzypionki unieruchomiono na lodzie i poddano homogenizacji. Do identyfikacji różnych rodzajów proteaz owadów wykorzystano: rozdział w żelu poliakrylamidowym (w warunkach *in-gel protease assay*) oraz selektywne inhibitory: E-64 (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane) dla proteazy cysteinowej oraz PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) dla proteazy serynowej.

U skrzypionek zidentyfikowano dwa rodzaje proteaz: serynową i cysteinową. Tego rodzaju badania są ważne, ponieważ owady wykorzystują proteazy do trawienia materiału roślinnego i pozyskiwania egzogennej aminokwasów.

Słowa kluczowe: skrzypionki, pszenica, proteazy, *in-gel protease assay*, E-64, PMSF

¹Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Metod Prognozowania Agrofagów i Ekonomiki Ochrony Roślin
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
B.Wielkopolan@iorpib.poznan.pl

²Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
Umultowska 89, 61-614 Poznań
rnawrot@amu.edu.pl

Wstęp / Introduction

Rośliny dysponują szeregiem mechanizmów obronnych. Jednym z nich jest synteza inhibitorów skierowanych przeciw enzymom proteolitycznym owadów. Zablokowanie enzymów trawiennych przez inhibitory negatywnie wpływa na funkcjonowanie i rozwój owada.

W Polsce występują dwa gatunki skrzypionek: zbożowa (*Oulema melanopus*, Linnaeus 1758) i błękitka (*Oulema gallaeciana*, Heydel 1870). W szczególności larwy niszczą powierzchnię asymilacyjną liści. W Polsce skrzypionki, obok mszyc i przyszcarka zbożowca, należą do głównych szkodników zbóż. Ze względu na ich szkodliwe znaczenie gospodarcze oraz zmniejszenie liczby dostępnych środków ochrony roślin, warto przyjrzeć się im, nie tylko pod względem wizualnej oceny powodowanych przez nie uszkodzeń.

Celem badań było poznanie proteaz niezbędnych do trawienia materiału roślinnego oraz pozyskiwania aminokwasów egzogennych przez skrzypionki.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał biologiczny oraz przygotowanie materiału do badań

Odłowione larwy skrzypionki (o wielkości od 2 do 3 mm) zostały unieruchomione na lodzie, następnie poddane homogenizacji w wodzie milioporowanej (MQ). Otrzymany ekstrakt zwirowano, a zebrany supernatant przechowywano w temperaturze -20°C .

Ilość białka w próbce określono za pomocą metody Bradforda. Albuminę surowicy wołu (BSA – bovine serum albumin) użyto jako standard.

Rozdział elektroforetyczny w warunkach *in-gel protease assay*

Do detekcji i identyfikacji proteaz owadzych wykorzystano elektroforezę jednokierunkową w żelu poliakryloamidowym, w warunkach *in-gel protease assay* (Saitoh i wsp. 2007, zmodyfikowano). W 15% żelu rozdzielającym zawieszono żelatynę (substrat) w końcowym stężeniu 0,2%. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temperaturze 4°C , napięciu 100 V. Aktywność proteolityczna enzymów trawiennych skrzypionek została sprawdzona w pH 4,0 oraz 6,8.

Identyfikacja proteazy cysteinowej i serynowej – pH 6,8 i 4,0

Do identyfikacji proteazy cysteinowej użyto inhibitor E-64 (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, Sigma-Aldrich) w końcowym stężeniu 10 μM , natomiast do identyfikacji proteazy serynowej zastosowano inhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich) w końcowym stężeniu 1 mM. Do obciążenia prób użyto barwnik o składzie: glicerol, błękit bromofenolowy, SDS (dodecylosiarczan sodu), Tris pH 6,8. Po zakończeniu elektroforezy żel płukano w roztworze izopropanolu w celu wypłukania SDS, a następnie umieszczono na noc w odpowiednim buforze rozwija-

jącym (ang. zymography developing buffer). Dla pH 6,8 zastosowano bufor o składzie: 0,1 M trisodu fosforan, 0,01 M Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, natomiast dla pH 4,0: 50 mM octan sodu, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Próby inkubowano w 37°C , temperaturze optymalnej dla aktywności proteaz. Następnie wykonano barwienie żelu z wykorzystaniem barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250. Po wybarwieniu aktywność proteolityczna była widoczna w postaci białych plam (miejsca rozkładu żelatyny przez proteazy) na niebieskim tle. Masy cząsteczkowe poszczególnych proteaz określono w odniesieniu do markera białkowego (Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas).

Wpływ L-cysteiny i E-64 na aktywność proteolityczną proteazy cysteinowej – pH 6,8 i 4,0

Wszystkie próby po inkubacji przez 10 minut w temperaturze 37°C nałożono na żel. W każdej kieszonce żelu rozdzielano tę samą próbę. Podobnie, jak w przypadku identyfikacji proteaz, do obciążenia prób użyto barwnik bez żadnych związków redukujących typu DTT (ditiotreitol) czy β -merkaptotanol. Po zakończeniu elektroforezy żel płukano w roztworze izopropanolu, a następnie umieszczono na noc w odpowiednim buforze rozwijającym o takim samym składzie, jak w przypadku identyfikacji proteaz z tym, że do buforu dodano odpowiednio L-cysteinę (5 mM, Sigma-Aldrich) lub inhibitor E-64.

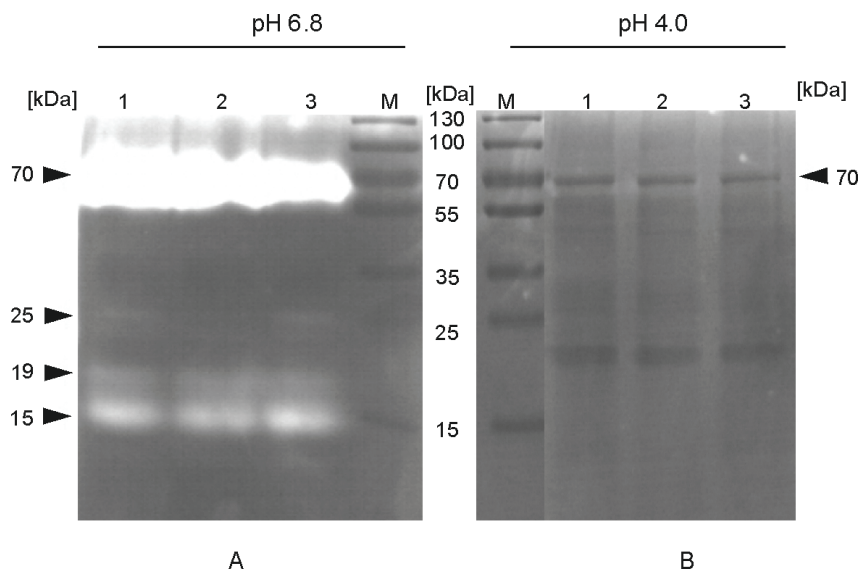
Inkubacja odbywała się w temperaturze 37°C . Następnie wykonano barwienie żelu z wykorzystaniem barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Chrzęszcze skrzypionki należą do rzędu Coleoptera, rodziny stonkowatych (Chrysomelidae). Wyniki badań wykazały, iż skrzypionki trawia materiał roślinny dzięki obecności dwóch rodzajów proteaz: serynowej i cysteinowej. Analiza metodą *in-gel protease assay* wykazała, że w badanych ekstraktach obecne były proteazy cysteinowe o różnych masach cząsteczkowych. W pH 6,8 zidentyfikowano proteazy cysteinowe o masie cząsteczkowej około 15, 19 i 25 kDa (rys. 1A), a w pH kwaśnym (4,0) o masie cząsteczkowej 25 i 70 kDa (rys. 2B). Natomiast w obu badanych warunkach pH zidentyfikowano proteazę serynową o masie cząsteczkowej 70 kDa (rys. 1A, 1B, 2A). Aktywność badanych proteaz jest znacznie mniejsza w pH 4,0 niż w 6,8 (rys. 1, 2). Może to być związane z różną aktywnością proteaz w danym pH oraz różnicach w powinowactwie proteaz do substratu. Zmiana powinowactwa proteaz do substratu może być bezpośrednio powiązana ze zmianą kwasowości środowiska. Wyniki wykazały, że proteaza cysteinowa o masie cząsteczkowej 15 kDa, która jest aktywna proteolitycznie w pH 6,8 (rys. 1A), nie wykazuje aktywności w pH 4,0 (rys. 1B).

W genomach wielu gatunków owadów obecne są geny kodujące izoformy proteaz, wykazujące różną wrażliwość wobec określonych inhibitorów (Broadway 1997).

Jelito środkowe wielu owadów zawiera duże ilości enzymów proteolitycznych odgrywających centralną rolę



Rys. 1. Identyfikacja proteazy cysteinowej i serynowej metodą *in-gel protease assay*. Próby: 1 – ekstrakt z larw około 2 mm; 2 – ekstrakt z larw około 2 mm + inhibitor proteazy cysteinowej E-64 w końcowym stężeniu 10 μ M; 3 – ekstrakt z larw około 2 mm + inhibitor proteazy serynowej PMSF w końcowym stężeniu 1 mM

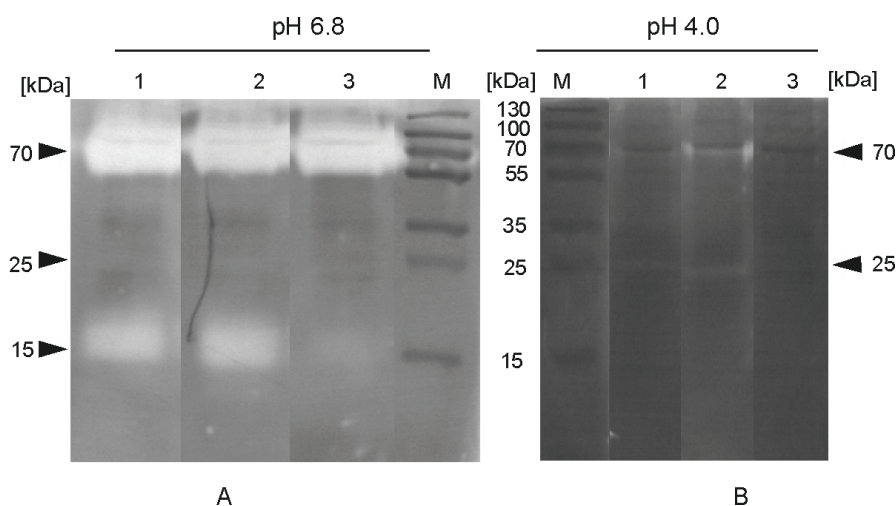
A – w pH 6,8 widoczna aktywność proteolityczna proteazy cysteinowej o masie cząsteczkowej 15, 19 i 25 kDa oraz proteazy serynowej o masie cząsteczkowej 70 kDa

B – w pH 4,0 słabo widoczna aktywność proteolityczna proteazy serynowej o masie cząsteczkowej 70 kDa, brak widocznej aktywności proteazy cysteinowej

Fig. 1. Identification of cysteine and serine proteases using *in-gel protease assay*. Samples: 1 – extract from larvae leaf beetle of 2 mm; 2 – extract from larvae leaf beetle of 2 mm with cysteine protease inhibitor E-64 in final concentration of 10 μ M; 3 – extract from larvae leaf beetle of 2 mm with serine protease inhibitor PMSF in final concentration of 1 mM

A – pH 6.8 proteolytic activity of cysteine protease of MWs 15, 19 and 25 kDa and serine protease of MW 70 kDa

B – pH 4.0 poorly visible proteolytic activity of serine protease of MW 70 kDa and lack of visible proteolytic activity of cysteine protease



Rys. 2. Wpływ L-cysteiny i inhibitora E-64 na aktywność proteazy cysteinowej. W każdej kieszonce (1–3) rozdzielano tę samą próbę – ekstrakt z larw skrzypionek około 3 mm. Następnie odpowiednie skrawki żelu inkubowano (przez noc w 37°C) w buforze rozwijającym z dodatkiem L-cysteiny lub E-64: 1 – bufor rozwijający, 2 – bufor rozwijający + L-cysteina, 3 – bufor rozwijający + inhibitor E-64

A – w pH 6,8 widoczna aktywność proteolityczna proteazy cysteinowej o masie cząsteczkowej około 15 kDa, a serynowej około 70 kDa

B – w pH 4,0 słabo widoczna aktywność proteazy cysteinowej o masie cząsteczkowej 25 i 70 kDa

Fig. 2. Effect of L-cysteine and E-64 inhibitor on the activity cysteine protease. In each well (1–3) the same sample was separated – extract of leaf beetle larvae (3 mm). Then respective parts of the gel were incubated (overnight in 37°C) in developing buffer with addition of L-cysteine or E-64: 1 – zymography developing buffer, 2 – zymography developing buffer + L-cysteine, 3 – zymography developing buffer + E-64 inhibitor

A – pH 6.8 proteolytic activity of cysteine protease of MWs 15, 25 kDa and serine protease of MW 70 kDa

B – pH 4.0 poorly visible proteolytic activity of cysteine protease of MWs 25 and 70 kDa

w pozyskiwaniu aminokwasów niezbędnych do normalnego wzrostu i rozwoju (Baker 1982).

Proteazy owadzie pełnią bardzo ważną funkcję, ponieważ katalizują rozkład białek podczas trawienia, celem dostarczenia aminokwasów potrzebnych dla wzrostu i rozwoju. Do endopeptydaz czyli proteinaz zaliczono: proteazy serynowe, cysteinowe, aspartylowe oraz metalo-proteinazy (Neurath 1982). Rośliny w odpowiedzi na enzymy proteolityczne owadów ewaluowały, przez syntezę inhibitorów inaktywujących pewne proteinazy. Zablokowanie proteaz przez inhibitory skutkuje m.in. ograniczeniem dostępności potrzebnych aminokwasów dla owada (Cervone i wsp. 1987).

Proteolityczne enzymy trawienne owadów zbadano, jak dotąd, głównie w rzędach Coleoptera i Lepidoptera, obejmujących szereg szkodników upraw. Proteinaza serynowa jest enzymem proteolitycznym powszechnie występującym w przewodzie pokarmowym Lepidoptera (optymalne pH działania 9–11). Natomiast owady należące do Coleoptera, do trawienia materiału roślinnego wykorzystują głównie proteinazę cysteinową (Ryan 1990). pH przewodu pokarmowego owadów należących do Coleoptera jest bardzo różne, poczynając od bardzo kwaśnego (pH 3–4) u Chrysomelids i Meloids, do zasadowego (pH 8,0–10,9) u Scaraboidea (Wolfson i Murdock 1990). Wynika stąd, że u Coleoptera można znaleźć różne klasy proteinaz, zarówno te działające w środowisku kwaśnym (proteinaza cysteinowa, aspartylowa), jak i zasadowym (serynowa) (Johnson i Robosky 2000). Obecność proteinazy cysteinowej stwierdzono w następujących rodzinach Coleoptera: Tenebrionidae, Chrysomelidae, Coccinellidae, Curculionidae, Meloi-

dae, Silphidae (Murdock i wsp. 1987; Wolfson i Murdock 1990). Powszechna obecność proteinazy cysteinowej wśród przedstawicieli różnych rodzin Coleoptera wskazuje, że jest ona głównym enzymem trawiennym wykorzystywanym przez owady z tego rzędu (Murdock i wsp. 1987).

U skrzypionek zidentyfikowano zarówno proteinazę serynową, jak i cysteinową. Spektrum pH działania tych enzymów jest zróżnicowane, co stanowi podstawę do planowanych dalszych badań, mających na celu poznanie mechanizmu obronnego pszenicy (*Triticum aestivum*) w odpowiedzi na żerowanie skrzypionek.

Wnioski / Conclusions

1. Skrzypionki do pozyskiwania aminokwasów z materiału roślinnego wykorzystują proteazy serynową oraz cysteinową.
2. W badanych ekstraktach obecne były proteazy cysteinowe o różnych masach cząsteczkowych około 15, 19, 25 i 70 kDa oraz proteaza serynowa o masie cząsteczkowej 70 kDa.
3. Aktywność badanych proteaz jest znacznie mniejsza w pH 4,0 niż w 6,8.
4. L-cysteina zwiększa aktywność proteazy cysteinowej, PMSF po dodaniu do próby zmniejsza aktywność proteazy serynowej, natomiast E-64 dodatkowo dodany do buforu efektywnie zmniejsza aktywność proteazy cysteinowej (rys. 2A, ścieżka 3).

Literatura / References

- Baker J.E. 1982. Digestive proteases of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) and their response to inhibitors from wheat and corn flour. *Can. J. Zool.* 60: 3206–3214.
- Broadway R.M. 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43: 855–874.
- Cervone F., DeLorenzo G., Degri L., Salvi G., Bergami M. 1987. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 85, p. 631.
- Dow J.M., Clarke B.R., Miligan D.E., Tang J.L., Daniels M. 1990. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, p. 2994.
- Johnson K.S., Robosky D. 2000. Phylogenetic distribution of cysteine proteinases in beetles: evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive strategy in Cerambycidae. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 609–619.
- Murdock L.L., Brookhart G., Dunn P.E., Shukle R.H., Wolfson J.L. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 783–787.
- Neurath H. 1982. The diversity of proteolytic enzymes. p. 1–23. In: „Proteolytic Enzymes, a Practical Approach” (R.J. Beynon, J.S. Bond, eds.). IRL Press, Oxford, 340 pp.
- Ryan C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, p. 425.
- Saitoh E., Yamamoto S., Okamoto E., Hayakawa Y., Hoshino T., Sato R., Isemura S., Ohtsubo S., Taniguchi M. 2007. Identification of cysteine proteases and screening of cysteine protease inhibitors in biological samples by a two-dimensional gel system of zymography and reverse zymography. *Analytical Chemistry Insight* 2: 51–59.
- Wolfson J.L., Murdock L.L. 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16: 1089–1102.