مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۲۰۳-۱۹٤

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی نقش پروتئازهای همولنف بر فعالیت فنل اکسیداز لارو *Cydalima perspectalis* با استفاده از بازدارنده‌های اختصاصی

Determination the role of hemolymph proteases on phenoloxidase activity of *Cydalima perspectalis* larvae using specific inhibitors

لیلا یوسفی لرده و آرش زیبایی*

Leila Yousefi-Lardeh and Arash Zibaee*

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران.

Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arash.zibaee@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۱)

چکیده

جریان پروتئازی در همولنف حشرات نقش مهمی در پاسخ مناسب میزبان علیه میکروارگانیسم‌ها و پارازیتوییدهای مهاجم دارد. این سرین پروتئازها سبب القای مسیرهای مولکولی تولید پپتیدهای ضدمیکروبی و فنل‌اکسیداز در حشرات می‌شوند. در پژوهش حاضر تأثیر حداقل غلظت از سه بازدارنده اختصاصی سرین پروتئازها؛ AEBSF.HCl [4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride]، TLCK [tosyllysine chloromethyl ketone hydrochloride] و TPCK [tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone] بر فعالیت تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز و در نهایت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروهای شب‌پره شمشاد، *Cydalima perspectalis* Walker، ارزیابی شد. غلظت ۵ میکرومولار AEBSF.HCl سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و فنل اکسیداز در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵، ۳۰ و ٦۰ دقیقه پس از تزریق شد، اما ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه بعد از تزریق به مقدار شاهد رسید. این بازدارنده اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم الاستاز نشان نداد. غلظت ۵ میکرومولار بازدارنده TLCK نیز سبب کاهش فعالیت آنزیم تریپسین در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵، ۳۰ و ٦۰ دقیقه شد و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز را در همه بازه‌های زمانی به جز ۱۸۰ دقیقه کاهش داد که کمترین مقدار آن ۱۵ دقیقه پس از تزریق مشاهده شد. بازدارنده TPCK سبب کاهش فعالیت آنزیم کیموتریپسین در همه بازه‌های زمانی پس از تزریق به جز ۱۸۰ دقیقه شده و حداقل فعالیت ۱ دقیقه پس از تزریق ثبت شد. این بازدارنده فعالیت آنزیم فنل اکسیداز را در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تیمار کاهش داد و در سایر بازه‌های زمانی تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت سرین پروتئازها در القای فعالیت سامانه فنل‌اکسیداز در لاروهای شب‌پره شمشاد می‌باشند. بازدارنده‌های استفاده شده در این پژوهش می‌توانند با توقف روند سرین پروتئازی در همولمف حشرات از ایمنی کارآمد در برابر بیمارگران جلوگیری کنند و حساسیت لاروها را نسبت به بیمارگران افزایش دهند. به عبارت دیگر استفاده از این ترکیبات کنترل موثر آفات از طریق کنترل میکروبی را بهبود می‌بخشند.

واژه‌های کلیدی

سامانه ایمنی سلولی،
سرین پروتئاز،
شب‌پره شمشاد،
فنل‌اکسیداز

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

مقدمه

پروتئازها گروه بزرگی از آنزیم‌های موجود در حشرات هستند که در روندهای فیزیولوژیک متعددی همچون تغذیه، ایمنی، تولیدمثل، جنین‌زایی، تامین انرژی، مرگ سلولی وغیره نقش دارند. این آنزیم‌ها پیوندهای پپتیدی موجود در مولکول‌های پروتئینی را هیدرولیز کرده و بر اساس اینکه به پیوندهای داخلی حمله کنند یا اسیدهای آمینه را از انتهای مولکول جدا کنند، به دو گروه اندوپپتیدازها و اگزوپپتیدازها تقسیم می‌شوند (Kanost and Clem 2012). به جز پروتئازهای گوارشی که سبب تجزیه پروتئین‌های بلع‌شده توسط حشرات می‌شوند، سایر پروتئازهای موجود در بدن حشرات در القای جریان‌های فیزیولوژیک بهم پیوسته نقش دارند که طی آن یک پروتئاز فرم غیرفعال پروتئازی دیگر را فعال کرده و سبب سیگنال‌دهی برای شروع یک روند فیزیولوژیک می‌شود. صرف‌نظر از اهمیت فیزیولوژیک پروتئازها، تقسیم‌بندی آنها بر اساس گروهای شیمیایی است که نوع فعالیت آنها را تعیین می‌کنند. گروه هیدروکسیل موجود در زنجیر جانبی سرین پروتئازها به عنوان نوکلئوفیل عمل کرده و سبب هیدرولیز پیوند پپتیدی می‌شود اما در سیستئین پروتئازها، گروه سولفیدریل در این روند نقش دارد. در نهایت، مولکول آب موجود در مکان فعال آنزیم‌های آسپارتیک و متالوپروتئازها سبب تجزیه پیوند پپتیدی می‌شود (Kanost and Clem 2012). این تفاوت سازوکار آنزیمی سبب می‌شود که سرین پروتئازها در اسیدیته قلیایی، سیستئین پروتئازها و آسپارتیک پروتئازها در اسیدیته اسیدی و متالوپوتئازها در اسیدیته خنثی انواع مختلفی از سوبستراها را تجزیه کنند (Kanost and Gorman 2008).

سرین‌پروتئازهای مرتبط با ایمنی در حشرات به صورت جریانی آنزیمی سبب تنظیم سریع پاسخ‌های فیزیولوژیک به آلودگی و جراحت در حشرات می‌شوند که می‌توان به لخته‌شدن خون، کپسوله‌شدن ملانینی، فعال‌شدن سنتز پپتیدهای ضدمیکروبی و تنظیم عملکرد سلول‌های خونی اشاره کرد (Barillas-Mury 2007; Kanost and Gorman 2008; Cerenius *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2010). ملانیزه‌شدن کپسول و گره ایجاد شده اطراف بیمارگر یا پارازیتویید با فعال‌شدن سریع پروتئازها و در پی آن، فعال‌شدن پیش‌فنل‌اکسیداز سنتز شده توسط بافت چربی و سلول‌های خونی انجام می‌شود (Kanost and Gorman, 2008). اکسیدشدن فنل‌ها توسط فنل‌اکسیداز منجر به تولید کوئینون‌ها و در نهایت تشکیل ملانین‌می‌شود. نقش سرین پروتئازها در فعال‌کردن پیش‌فنل اکسیداز در کرم شاخدار توتون، کرم ابریشم، لمبه گندم و پشه *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) بررسی شده است (Kanost and Clem 2012). در همه موارد این پروتئازها بصورت غیرفعال سنتز شده وتوسط سایر واکنش‌های پروتئازی فعال می‌شوند. مثلا در کرم شاخدار توتون، پس از شناسایی ورود قارچ بیمارگر و باکتری گرم مثبت، پروتئازی به نام hemolymph protease 14 فعال شده و با القای روندهای سرین پروتئازی سبب فعال شدن پروتئازهای فعال‌کننده پیش‌فنل اکسیداز می‌شود (Gorman *et al.* 2007; Wang and Jiang 2007).

پروانه برگخوار *Cydalima perspectalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) از آفات مهم شمشاد محسوب می‌شود که به طور طبیعی در مناطق نیمه گرمسیری شرق آسیا (هند، چین، کره و شرق روسیه) پراکنش داشتهاست (Mally and Nuus 2010). بنابر بررسی‌هایی که روی میزبان‌های این آفت صورت گرفته است، سه خانواده گیاهی Aquifoliaceae، Buxaceae و Celastraceae از میزبان‌های اصلی این آفت هستند اما بیشتر روی گونه‌های جنس *Buxus* مثل *B. sinica* ، *B. microphylla* و *B. sempervirens* تغذیه می‌کند (Mally and Nuss 2010). تعداد نسل پروانه برگخوار شمشاد با توجه به دمای محیط بین ۱ تا ٤ نسل در سال متغیر بوده، لاروها به طور عمده از برگ تغذیه کرده و زمستان‌گذرانی به صورت لارو سنین مختلف به خصوص لارو سن سوم می‌باشد (Szekely *et al.* 2011; Nacambo 2014). با توجه به سطح گسترش این آفت در مناطق آلوده، استفاده از ترکیبات شیمیایی مخاطرات زیست‌محیطی خاص خود همچون آلودگی منابع آبی-خاکی و تاثیر روی موجودات غیر هدف را به همراه خواهد داشت. بنابراین استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک با حداقل اثرات جانبی می‌تواند جمعیت فزآینده این حشره را کنترل کند. در این بین، قارچ‌های بیمارگر حشرات به دلیل سازگاری با شرایط محیطی شمال کشور و ایجاد همه‌گیری می‌توانند سبب

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

کنترل مناسب شوند. اگرچه تعیین گونه/جدایه کارآمد و سازگار، تهیه فرمولاسیون مناسب و پاشش در نواحی آلوده از موارد مهم در حصول موفقیت هستند اما باید واکنش ایمنی حشره را نسبت به بیمارگر مدنظر قرار داد. واکنش‌های ایمنی سلولی و هیومرال حشرات هر دو به سامانه پیش‌فنل اکسیداز وابسته هستند که با تولید ملانین و قرار دادن آن در گره وکپسول ایجاد شده به دور عامل مهاجم یا تولید مولکول‌های سمی همچون رادیکال‌های آزاد سبب حذف آلودگی از بدن حشرات می‌شود (Nappi and Christensen 2005; Zhao *et al*. 2007). با توجه به اهمیت این سامانه در پاسخ‌های ایمنی حشرات، اعمال هر نوع روش یا ماده‌ای که بتواند سبب توقف نسبی یا کامل پروتئازهای فعال‌کننده یا آنزیم فنل‌اکسیداز شود، ممکن است در افزایش کارایی عوامل میکروبی استفاده شده در کاهش جمعیتی آفت هدف موثر باشد. در این پژوهش، *C. perspectalis* به عنوان یک مدل انتخاب شد تا بررسی اولیه‌ای در این خصوص باشد. نتایج حاصل از این پژوهش و پژوهش‌های مرتبط که تسط نویسندگان و سایر همکاران در حال انجام است می‌تواند دیدگاه تازه ومناسبی برای کنترل این آفت ایجاد کند. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، استفاده از حداقل غلظت بازدارنده‌های اختصاصی برای کاهش فعالیت سرین پروتئازهای همولنف لاروهای شب‌پره شمشاد و آنزیم فنل اکسیداز است. بدین منظور غلظت هدف از بازدازنده‌های AEBSF.HCl [4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride]، TLCK [tosyllysine chloromethyl ketone hydrochloride] و TPCK [tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone] تهیه شده و همراه با لاتکس بید به لاروهای سن پنجم شب‌پره شمشاد تزریق شد. سپس در بازه‌های زمانی مختلف فعالیت آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز و فنل‌اکسیداز در برابر شاهد اندازه‌گیری و مقایسه شد (Kanost and Clem 2012).

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات: طی بهار ۱۳۹۸، افراد بالغ از درختان شمشاد *Buxux hyrcana* L. واقع در لاهیجان (مختصات: ۳۷°۱۲′۲۶″) جمع‌آوری شدند. افراد نر و ماده در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۸۰ درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶ به ۸ ساعت درون ظروف دایره‌ای پلاستیکی به قطر ۲۹ و ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر نگهداری و با محلول آب–عسل ۵ درصد تغذیه شدند. پس از تخمگذاری روی برگ‌های گیاه میزبان تعبیه شده در ظروف و سپری‌شدن دوره انکوباسیون، لاروهای تازه تفریخ شده توسط قلم‌مو به آرامی از دیواره ظرف جمع‌آوری شده وروی برگ‌های گیاه میزبان در ظرف جدید قرار داده شدند. لاروها در شرایط آزمایشگاهی یاد شده تا سن پنجم لاروی پرورش داده شدند. به طور یک روز در میان، غذای جدید تهیه شده و ظروف پرورش تمیز شدند (Kawazu *et al*. 2010).

تیمار لاروها: بر مبنای آزمون‌های اولیه در شرایط غیرزنده و برای حداقل کردن اثرات جانبی احتمالی از غلظت ۱ میلی‌مولار AEBSF (Sigma-Aldrich, A8456)، TLCK (Sigma-Aldrich, T7254) و TPCK (Sigma-Aldrich, T4376) استفاده شد. برای گروه شاهد و تیمارها (هر بازدارنده یک تیمار در نظر گرفته شد) جداگانه ۶۰ لارو سن پنجم ۲۴ ساعته در نظر گرفته شد تا برای هر بازه زمانی ۱۰ لارو قابل ارزیابی بیوشیمیایی باشد. لاروهای شاهد با ۱ میکرولیتر محلول لاتکس‌بید (LB3, 0.3 µm, Sigma-Aldrich) در توین– ۸۰ (به نسبت ۱ به۱۰) تزریق شدند. لاروهای تیمار نیز با ۱ میکرولیتر محلول لاتکس‌بید با توین–۸۰ تزریق شدند که حاوی ۵ میکرولیتر از هر بازدارنده بطور جداگانه بودند. تزریق پس از ضدعفونی محل تزریق با الکل اتانول ۷۰ درصد (بند سوم قفس سینه) با سرنگ همیلتون انجام شد و محل آن با پارافین مایع پوشانده شد تا خونریزی لارو متوقف شود. در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از تزریق، همولنف هر لارو به‌طور جداگانه با بریدن یکی از پاهای کاذب درون تیوب اپندورف ۱/۵ ملی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس–هیدروکلراید (اسیدیته ۸ و غلظت ۲۰ میلی‌مولار) ریخته شده و بلافاصله با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. از آنجایی که جمع‌آوری همولنف ، سانتریفیوژ و سنجش آنزیمی با حداقل فاصله زمانی انجام شد، ماده ضد انعقاد خونی استفاده نشد تا اثرات جانبی بر فعالیت پروتئازها به حداقل برسد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

سنجش پروتئازها: فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز (به‌عنوان سه زیر گروه از سرین پروتئینازها) با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار از BApNA (Nabenzoyl- L- arginine- p- nitroanilide; Sigma-Aldrich, 19362) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین، SAAPPpNA (N- succinyl- alanine- alanine- proline- phenylalanine- p- nitroanilide; Sigma-Aldrich, S7388) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی کیموتریپسین و SAAApNA (N- succinyl- alanine- alanine- alanine- p- nitroanilide; Sigma-Aldrich, S4760) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر از بافر تریس–هیدروکلراید ، ۱۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی ذکر شده و ۵ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و جذب در طول موج ٤٠٥ نانومتر اندازه‌گیری شد (Oppert *et al*. 1997).

سنجش فنل‌اکسیداز: برای سنجش فعالیت فنل اکسیداز، ۱۰ میکرولیتر از مایع آنزیمی به ۲۰ میکرولیتر سوبسترا (L–دهیدروکسی فنیل‌آلانین) L-DOPA (L-dihydroxyphenyalanin; Sigma-Aldrich, 333786) (۱۰ میلی‌مولار) و ۵۰ میکرولیتر بافر تریس–هیدروکلراید اضافه شد (Wilson *et al*. 2001). فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در طول موج ٤٩٠ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی در ۱۰ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها بین بازه‌های زمانی با آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

استفاده از بازدارنده‌های اختصاصی پروتئازها برای تثبیت حضور آنها در یک محیط بیولوژیک و شناخت رفتار آنها در محیط‌های بیولوژیک بویژه پارامترهای آنزیمی اهمیت زیادی دارد. مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که سرین پروتئازها پس از ایجاد آلودگی در همولنف نقش اساسی را در شروع پاسخ‌های دفاعی و حتی مشارکت در تکمیل آنها را به عهده دارند (Kanost and Gorman 2008; Kanost and Clem 2012). اگرچه ساختار ژنتیکی این آنزیم‌ها و بازدارنده‌های داخلی آنها به خوبی بررسی شده است اما زمان فعال‌سازی آنها با استفاده از حشرات زنده تاکنون بررسی نشده است. در پژوهش حاضر، سه بازدارنده اختصاصی در فواصل زمانی محدود و نزدیک بهم انتخاب شدند تا کلیاتی از زمان فعال‌سازی و نوع سرین‌پروتئازهای (از نظر بیوشیمیایی) مؤثر در ملانیزه‌شدن را مشخص کرده ونقش آنها را بر فعالیت فنل‌اکسیداز نشان دهند. شکل ۱ تاثیر AEBSF.HCl را بر فعالیت پروتئازهای تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز و فنل‌اکسیداز نشان می‌دهد. در بازه‌های زمانی ۱ تا ٦٠ دقیقه، فعالیت تریپسین در لاروهای تزریق‌شده با AEBSF.HCl کاهش معنی‌داری را نسبت شاهد نشان داد. این کاهش در دو بازه زمانی ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه به سطح شاهد بازگشت (شکل ۱، $Pr>F$: 79.58, D_f: 5, 12, $p\leq0.0001$).

نتایج مشابهی در مورد فعالیت کیموتریپسین در لاروهای تزریق شده به دست آمد اما نکته قابل توجه این بود که در مورد تریپسین ۱ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق فعالیت تریپسین کمترین مقدار خود را نشان داد اما در مورد کیموتریپسین ۱ دقیقه پس از تزریق کمترین فعالیت آنزیم مشاهده شد (شکل ۱، Pr>F: 66.73, D_f: 5, 12, $p\leq0.0001$). این بازدارنده هیچ تاثیری بر فعالیت آنزیم الاستاز در تمام بازه‌های زمانی نداشت (شکل ۱، Pr>F: 0.7166, D_f: 5, 12, $p\leq0.51$). تزریق لاروهای شب‌پره شمشاد با AEBSF.HCl سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همه بازه‌های زمانی نسبت به شاهد شد اگرچه فعالیت این آنزیم ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از تزریق نسبت به بازه‌های دیگر افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱، Pr>F: 50.99, D_f: 5, 12, $p\leq0.0001$). AEBSF.HCl ترکیبی محلول در آب است که سبب مهار برگشت‌پذیر پروتئازهای سرین به ویژه تریپسین و کیموتریپسین می‌شود. این ماده به دلیل داشتن گروه عاملی سولفونیل فلوراید با گروه هیدروکسیل موجود در مکان هدف پروتئازهای سرین واکنش نشان داده و سبب مهار آنها می‌شود (Powers *et al*. 2002). در پژوهش حاضر مشخص شد که لاروهای تزریق شده با AEBSF.HCl فعالیت تریپسینی وکیموتریپسینی کمتری نسبت به لاروهای شاهد داشتند که نشان‌دهنده نقش این دو آنزیم در فعال‌شدن سامانه پیش‌فنل

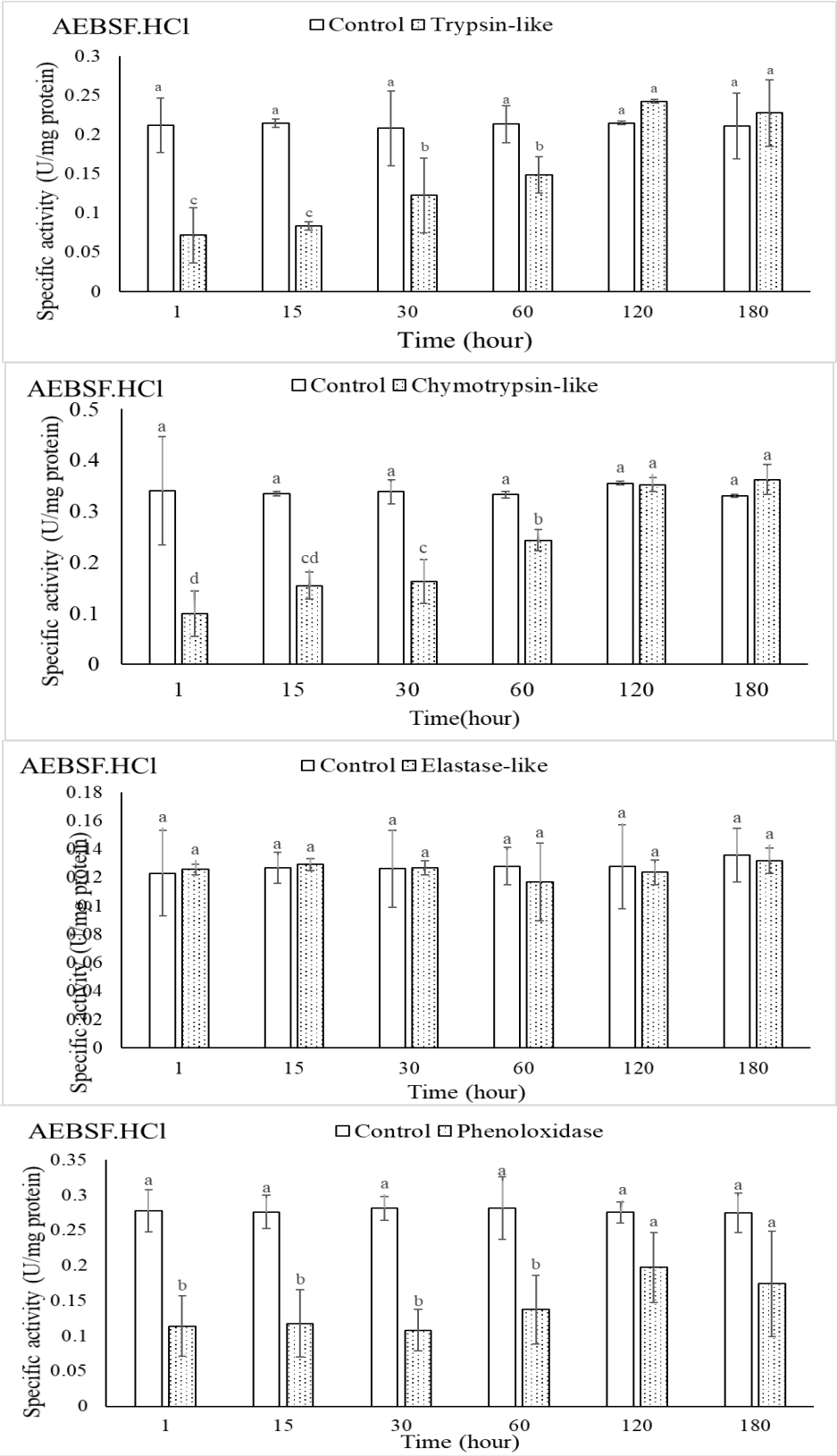
[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

اکسیداز است. کاهش فعالیت آنزیم‌ها در بازه‌های زمانی ۱ تا ۶۰ دقیقه نشان‌دهنده واکنش سریع آنها با پروتئازهای همولنف است اما بازگشت فعالیت آنها در بازه‌های زمانی ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه می‌تواند به دلیل سنتز مضاعف پروتئازها توسط لارو برای پیش‌برد پاسخ‌های دفاعی باشد. از آنجایی که این دو آنزیم در فعال شدن سامانه پیش‌فنل اکسیداز نقش دارند، کاهش فعالیت فنل اکسیداز در لاروهای تزریق شده با AEBSF.HCl نشان‌دهنده مهار سرین پروتئازهاست بویژه اینکه بازه‌های زمانی کاهش فعالیت فنل اکسیداز نیز منطبق با کاهش فعالیت تریپسین و کیموتریپسین است. عدم مهار آنزیم الاستاز در این پژوهش نیز می‌تواند به تفاوت ساختاری الاستاز تولیدی در همولنف شب‌پره شمشاد و عدم کارایی AEBSF.HCl برای مهار این آنزیم باشد که مورد اخیر با یافته‌های Gold and Fahrney (1964) و Powers *et al.* (2002) در کارایی مهار آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، کالیکرین، پلاسمین و ترومبین مطابقت دارد.

دو ترکیب TLCK و TPCK به ترتیب بازدارنده اختصاصی پروتئازهای تریپسین وکیموتریپسین هستند که به اسیدآمینه هیستیدین در سایت فعال این دو آنزیم متصل شده و با آلکیله کردن آن سبب مهار برگشت ناپذیر آنزیم می‌شوند (Malthouse and Scott 1983). در پژوهش حاضر، تزریق لاروهای شب‌پره بید با غلظت ۵ میکرومول هر کدام از این بازدارنده‌ها، سبب مهار آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و در نهایت فنل اکسیداز شد (شکل ۲ و ۳). ترکیب TLCK باعث کاهش فعالیت آنزیم تریپسین در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از تیمار شد اما در دو بازه زمانی ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از تزریق به سطح شاهد رسید (شکل ۲، $Pr>F: 17.1, D_f: 5, 12, p\leq0.0001$). بطور مشابه، فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تزریق شده با TLCK نیز در این بازه‌های زمانی بطور معنی‌داری کاهش یافت اما حداقل فعالیت آنزیم ۱۵ دقیقه پس از تزریق مشاهده شد اما در بازه زمانی ۱۸۰ دقیقه به مقدار شاهد بازگشت (شکل ۲، $Pr>F: 84.89, D_f: 5, 12, p\leq0.0001$).

تزریق TPCK سبب کاهش معنی‌دار فعالیت کیموتریپسین در همه بازه‌های زمانی پس از تزریق به جز ۱۸۰ دقیقه شد اما کمترین فعالیت آنزیمی ۱ دقیقه پس از تیمار مشاهده شد (شکل ۳، $Pr>F: 33.16, D_f: 5, 12, p\leq0.0001$). فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز نیز در لاروهای تزریق شده با TPCK در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تیمارمشاهده شد اما در سه بازه زمانی دیگر به مقدار شاهد بازگشت (شکل ۳، $Pr>F: 35.11, D_f: 5, 12, p\leq0.0001$). این نتایج نشان می‌دهند که هر دو بازدارنده به طور موفقیت‌آمیزی قادر به مهار فعالیت سرین پروتئازی و به طور خاص تریپسین و کیموتریپسین در همولنف لاروهای شب‌پره شمشاد بوده ودر زمان‌های ابتدایی پس از تزریق می‌توانند سبب مهار آنها و در پی آن فنل‌اکسیداز شوند. اما بازگشت فعالیت آنزیم در بازه‌های زمانی انتهایی به ویژه ۱۸۰ دقیقه پس از تزریق می‌تواند به دلیل افزایش سنتز این پروتئازها توسط لارو جهت تکمیل فرآیند ملانیزاسیون باشد. با توجه به مهار آنزیم تریپسین در فواصل زمانی بیشتر نسبت به کیموتریپسین می‌توان استنباط کرد که در میان انواع سرین‌پروتئازهایی که از نظر مولکولی در همولنف شناسایی شده‌اند، آنهایی که از نظر بیوشیمیایی به تریپسین‌ها نزدیکترند، نقش پررنگ‌تری در پاسخ‌های دفاعی لارو شب‌پره شمشاد دارند. از طرف دیگر بیشترین مهار آنزیم کیموتریپسین در بازه زمانی ۱ دقیقه پس از تیمار می‌تواند بیانگر اهمیت این آنزیم در فعال کردن جریان پروتئازی در همولنف لاروها باشد. نقش گروهی از سرین پروتئازهای پروانه‌ها در القای روند پروتئازی همولنف توسط Gorman *et al.* (2007) و Wang and Jiang (2007) مشخص شده است. در این حشرات، پروتئاز تنظیم‌کننده HP14 پس از ورود قارچ‌های بیمارگر به هموسل فعال شدن و سبب فعال شدن پروتئاز HP21 و پروتئازهای فعال‌کننده پیش فنل‌اکسیداز می‌شود.

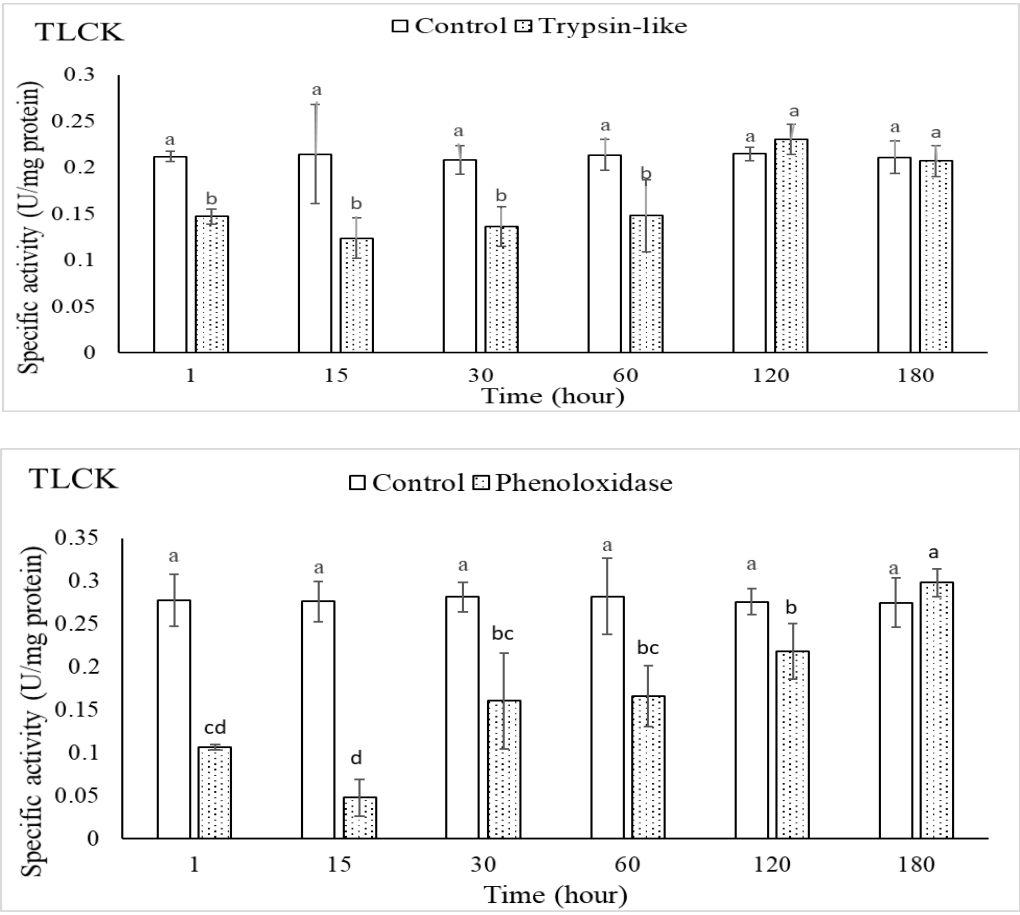
[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]



شکل ۱- تاثیر تزریق AEBSF.HCl [4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride] بر فعالیت سرین پروتئازها و فنل‌اکسیداز همولنف لاروهای *Cydalima perspectalis*. تفاوت‌های آماری در بین مقادیر مشخص شده در هر بازه زمانی با حروف مختلف نشان داده شده‌اند.

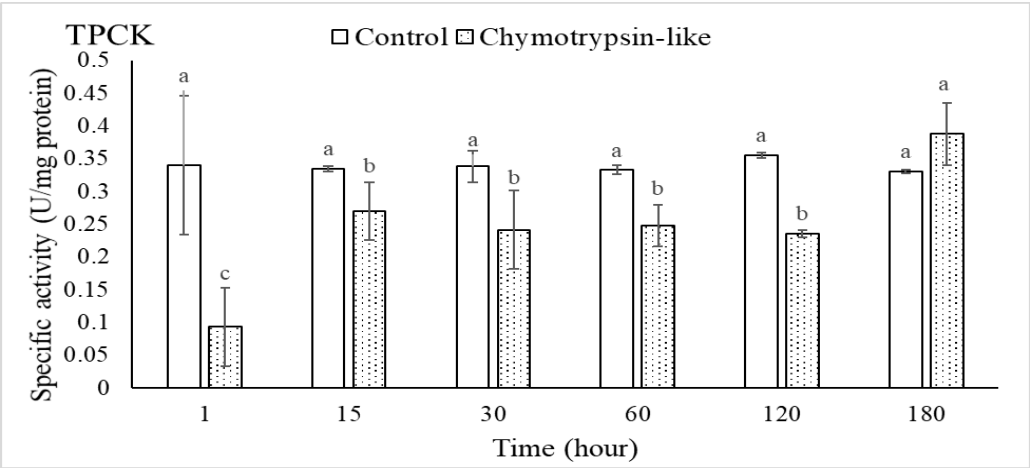
Fig. 1. The effect of AEBSF.HCl [4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride] injection on the activities of serine proteases and phenoloxidase in the hemolymph of *Cydalima perspectalis* larvae. Statistical differences have been marked with different letters among values give in time intervals (Tukey's test, $p \leq 0.05$).

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

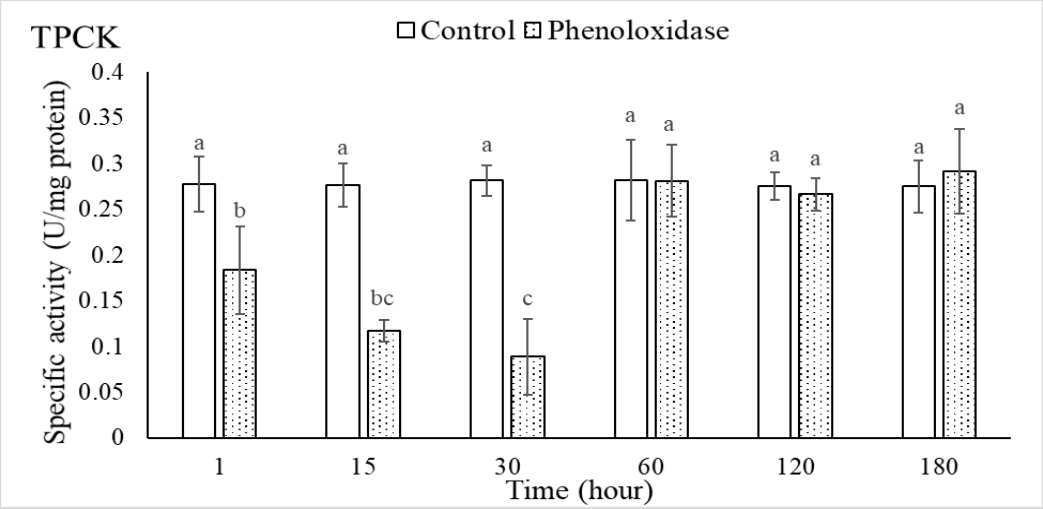


شکل ۲- تاثیر تزریق TLCK [tosyllysine chloromethyl ketone hydrochloride] بر فعالیت تریپسین و فنل‌اکسیداز همولنف لاروهای *Cydalima perspectalis*. تفاوت‌های آماری در بین مقادیر مشخص شده در هر بازه زمانی با حروف مختلف نشان داده شده‌اند.

Fig. 2. The effect of TLCK [tosyllysine chloromethyl ketone hydrochloride] injection on the activities of trypsin-like protease and phenoloxidase in the hemolymph of *Cydalima perspectalis* larvae. Statistical differences have been marked with different letters among values give in time intervals (Tukey's test, $p \leq 0.05$).



[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]



شکل ۳- تاثیر تزریق TPCK [tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone] بر فعالیت کیموتریپسین و فنل‌اکسیداز همولنف لاروهای *Cydalima perspectalis*. تفاوت‌های آماری در بین مقادیر مشخص شده در هر بازه زمانی با حروف مختلف نشان داده شده‌اند.

Fig. 3. The effect of TPCK [tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone] injection on the activities of chymotrypsin-like protease and phenoloxidase in the hemolymph of *Cydalima perspectalis* larvae. Statistical differences have been marked among values give in time intervals (Tukey's test, $p \leq 0.05$).

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده کارایی سه بازدارنده سنتزی سرین پروتئازها در مهار فعالیت پروتئازی و در پی آن فنل‌اکسیدازی لاروهای شب‌پره شمشاد بود. البته باید ذکر کرد که این پروتئازها توسط بازدارنده‌های داخلی موجود در همولنف نیز مهار می‌شوند تا از اثرات مضر فنل‌اکسیداز در مواقعی که آلودگی در بدن وجود ندارد اجتناب کنند. این بازدارنده‌ها به سرپین مشهورند که در کرم شاخدار توتون سرپین‌های ۱ تا ٦ شناسایی شده‌اند که تعدادی از آنها سبب مهار مستقیم سرین پروتئازها و تعدادی سبب مهار عوامل پروتئنی فعال‌کننده سرین پروتئازها می‌شوند (Jiang *et al*. 2003a, 2003b; Zhu *et al*. 2003; Wang and Jiang 2004; Kanost and Clem 2012). اما از دیدگاه کاربردی بویژه در کنترل میکروبی آفات، مهار این پروتئازها حایز اهمیت است. چنانچه بتوان از این بازدارنده‌ها یا بازدارنده‌های اختصاصی درگیر با منشأ طبیعی تهیه کرد و همراه عامل میکروبی وارد بدن حشره هدف کرد، به دلیل اختلال در سامانه پروتئازی همولنف ، میزبان قادر به پاسخ ایمنی مناسب نبوده و بسیاری از سازوکارهای ایمونولوژیک آن همچون ملانیزاسیون، انتقال سیگناهای ایمنی و سنتز پپتیدهای ضد میکروبی دچار اختلال خواهند شد. بنابراین لازم است پژوهش‌های زیادی در این خصوص انجام گیرد و ضمن معرفی یک عامل میکروبی کارآمد چنین بازدارنده‌هایی را به فرمولاسیون آن اضافه کرد تا به کنترل پایدار و کارآمد شب‌پره شمشاد دست یافت.

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گیلان به سبب تامین منابع مالی کمال تشکر را دارند.

منابع

Barillas-Mury C. 2007. CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. Trends in Parasitology 23: 297–299.

Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, Nonaka M, Söderhäll K. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends in Biochemical Science 35: 575–583.

Gorman MJ, Wang Y, Jiang H, Kanost MR. 2007. *Manduca sexta* hemolymph proteinase 21 activates prophenoloxidase activating proteinase 3 in an insect innate immune response proteinase cascade. Journal of Biological Chemistry 282: 11742–11749.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

Jiang H, Vilcinskas A, Kanost MR. 2010. Immunity in Lepidopteran insects. In K. Söderhäll (Ed.). Invertebrate Immunity: Landes Bioscience http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/4692/2010.

Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR. 2003a. Prophenoloxidase- activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. Journal of Biological Chemistry 278: 3552–3561.

Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Zhu Y, Kanost MR. 2003b. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: A clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33: 1049–1060.

Kanost MR, Clem RJ. 2012. Insect proteases. InL Gilbert, L. I. (Ed.): Insect molecular biology and biochemistry. London: Academic Press; p. 346–364.

Kanost MR, Gorman MG. 2008. Phenoloxidases in insect immunity. In N. Beckage (Ed.). Insect Immunology (pp. 69–96). San Diego, CA: Academic Press/Elsevier.

Kawazu K, Nakamura S, Adati T. 2010. Rearing of the box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis*, larvae using an artificial diet. Applied Entomology and Zoology 45: 163–168.

Mally R, Nuss M. 2010. Phylogeny and nomenclature of the box-tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) comb. n., which was recently introduced into Europe (Lepidoptera: Pyralidae: Crambidae: Spilomelinae). European Journal of Entomology 107: 393-400.

Malthouse JP, Scott AI. **1983**. Cryoenzymology of trypsin. A detailed kinetic study of the trypsin-catalysed hydrolysis of N-alpha-benzyloxycarbonyl-L-lysine p-nitrophenyl ester at low temperatures. Biochemistry Journal 215: 555–563.

Nacambo S, Leuthardt FLG, Wan H, Li H, Haye T, Baur B, Weiss RM, Kenis M. 2014. Development characteristics of the boxtree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. Journal of Applied Entomology 138: 14-26.

Nappi AJ, Christensen BM. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35: 443–459.

Oppert B, Kramer KJ, McGaughey WH. 1997. Rapid microplate assay of proteinase mixtures. Biotechniques 23: 70–72.

Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE. 2002. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. Chemical Reviews 102: 4735–4736.

Szekely L, Dincă V, Juhasz I. 2011. Macrolepidoptera from the steppes of Dobrogea (south-eastern Romania). Phegea 39: 85-106.

Wang Y, Jiang H. 2004. Prophenoloxidase (proPO) activation in *Manduca sexta*: An analysis of molecular interactions among proPO, proPO-activating proteinase-3, and a cofactor. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34, 731–742.

Wang Y, Jiang H. 2007. Reconstitution of a branch of the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation cascade *in vitro*: snake-like hemolymph proteinase 21 (HP21) cleaved by HP14 activates prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37: 1015–1025.

Wilson K, Cotter SC, Reeson AF, Pell JK. 2001. Melanism and disease resistance in insects. Ecology Letters 4: 637-649.

Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H. 2007. Broad spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37: 952–959.

Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, Jiang H, Kanost MR. 2003. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. Journal of Biological Chemistry 278: 46556–46564.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Determination the role of hemolymph proteases on phenoloxidase activity of *Cydalima perspectalis* larvae using specific inhibitors

Leila Yousefi-Lardeh and Arash Zibaee*

Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran
*Corresponding Author, Email: arash.zibaee@guilan.ac.ir

Abstract

Protease cascade in insect hemolymph is important in proper response against invading microorganisms and parasitoids. Serine proteases lead to the induction of antimicrobial peptide syntheses and phenoloxidases. In the current study, the effects of the least concentration of the three specific inhibitors of serine proteases including AEBSF.HCl [4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride], TLCK [tosyllysine chloromethyl ketone hydrochloride] and TPCK [tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone] were evaluated on the activities of trypsin, chymotrypsin, elastase and phenoloxidase of *Cydalima perspectalis* larvae. The 5 µM concentration of AEBSF.HCl lead to the significant decrease of trypsin, chymotrypsin and phenoloxidase activities at the time intervals of 1, 15, 30- and 60-min post-injection while the activities reached to the value of control after 120 and 180 min. The inhibitor showed no significant effect on elastase activity. The 5 µM concentration of TLCK also decreased the activity of trypsin at the time intervals of 1, 15, 30- and 60-min while the activity of phenoloxidase decreased at all-time intervals except for 180 min post-injection which the least value was obtain after 15 min of injection. TPCK decreased the activity of chymotrypsin at all-time intervals following injection except for 180 min in which the least activity was recorded after 1 min. This inhibitor decreased the activity of phenoloxidase at the time intervals of 1, 15 and 30 min after injection while no significant differences were observed at other time intervals. These results demonstrate the important role of serine proteases in induction of phenoloxidase within *C.perspectalis* larvae. Inhibitors used in this study can prevent effective immunity of insects by stopping the serine protease process in insect hemolymph and increase the sensitivity of larvae against pathogen. In other words, the use of these compounds improves the effective control of pests through microbial control.

Keywords: Cellular immune system, *Cydalima perspectalis*, Phenoloxidase, Serine protease

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.12.7]