

Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys

Marcela Bucekova & Ivana Valachova & Lenka Kohutova & Emanuel Prochazka & Jaroslav Kloudiny & Juraj Majtan

Introduction

La vasta maggioranza della popolazione dell'alveare consiste di api operaie che svolgono diversi compiti all'interno dello stesso. Un particolare compito è usualmente svolto da operaie di una particolare età: pulizia delle celle e opercolazione delle stesse sono compiti delle adulte più giovani, nutrizione della covata e della regina sono compiti svolti da operaie di età fra i 4 e i 16 giorni, elaborazione del nettare e costruzione dei favi sono compiti delle api di mezza età mentre ventilazione, guardia e bottinamento sono svolti dalle operaie più vecchie e di età tra 15 e 30 giorni (Winston 1987). Uno dei compiti più importanti è il bottinamento del nettare da parte delle bottinatrici e il suo trasferimento alle consorelle che si occupano nell'alveare di trasformarlo in miele. Sono le api di mezza età dette processers (e in italiano suona bene mielatrici). Il nettare può essere direttamente usato a scopo di nutrimento o "lavorato" dopo essere stato rigurgitato distribuendolo tra le api processor (che lo mischiano agli enzimi da loro secreti) fino ad essere stoccato nelle cellette. Qui, dopo una finale evaporazione d'acqua è tramutato in miele, il quale rappresenta un cibo glucidico conservabile, dotato di proprietà nutrizionali (in senso ampio essendo dotato di antiossidanti ndt) e antimicrobiche (De Grandi-Hoffman and Hagler 2000; Seeley 1992). Il perossido di idrogeno (H₂O₂) è uno dei maggiori contribuenti alla capacità antibatterica dei mieli e viene a essere prodotto a partire dalla glucosio ossidasi (GOX)-mediante conversione di glucosio in acido gluconico (White et al. 1963). Sebbene H₂O₂ alla concentrazione rinvenibile nei mieli non può uccidere i batteri, è però in grado di interagire coi segnali di proliferazione di questi, e con ciò inibire la moltiplicazione dei batteri [effetto batteriostatico ndt] (Brudzynski 2006). In aggiunta è stato recentemente dimostrato che H₂O₂ presente nel miele esercita attività di degradazione del DNA delle cellule batteriche (svolgendo con ciò azione battericida ndt) (Brudzynski et al. 2011).

GOX (FAD oxidoreductase, EC 1.1.3.4) è un enzima che viene espresso dalle ghiandole ipofaringee delle api processor e delle bottinatrici e secreto da queste nel nettare durante la preparazione del miele. Recenti studi (Li et al. 2008; Santos et al. 2005) hanno mostrato che GOX è espresso anche nelle ghiandole ipofaringee delle nutrici e delle api invernali. Da ciò, GOX è secreto nel nettare e ovviamente anche nel cibo larvale nel quale agisce come mezzo di sterilizzazione dello stesso. In questo modo, GOX può provvedere protezione immunologica a livello di alveare e prevenire diverse patologie (Yang and Cox-Foster 2005). Il livello di presenza di GOX nel miele può essere uno dei fattori partecipanti alla prevenzione di infezioni da batteri e funghi nell'alveare (e finora non è stata studiata l'attività virucida ndt).

Il livello di presenza di H_2O_2 nel miele differisce da miele a miele senza nessuna relazione con la sua origine botanica e geografica (Brudzynski et al. 2011). I seguenti fattori sono stati proposti come in grado di condizionare la concentrazione totale di H_2O_2 nel miele : (i) inattivazione di GOX dovuta a esposizione a eccesso di calore o luce (White et al. 1963), (ii) attività chimica di scavenging di H_2O_2 (White et al. 1963) [con questo termine si intende il rimuovere impurità indesiderate nei **prodotti** di reazioni fisiologiche , con particolare riferimento alla “ distruzione “ di ossidanti (ROS)], (iii) distruzione di H_2O_2 da parte di catalasi possibilmente presente in nettare e polline (Brudzynski 2006), (iv) modificazione di GOX da parte di methylglyoxal (Majtan et al. 2014) e (v) auto ossidazione di polifenoli/flavonoidi (Brudzynski 2006) [meccanismo che sembra culminare con la capacità di alterare il DNA dei batteri uccidendoli (Brudzynski 2011) n.d.t.]. Un'altra plausibile spiegazione alle variazioni di contenuto di H_2O_2 del miele può derivare dalle differenze di quantità di GOX prodotto dalle api o di attività enzimatica di GOX che potrebbe essere influenzata da composti presenti nel miele o diete ricche di proteine (Alaux et al. 2010).

Lo scopo di questo studio è stato (i) valutare simultaneamente il contenuto di GOX e H_2O_2 in diversi mieli ; (ii) localizzare l'espressione di *gox* nelle operaie addette a diversi compiti ; (iii) esaminare l'espressione di *gox* in operaie durante il loro sviluppo comportamentale e (iv) caratterizzare l'attività antibatterica di diversi mieli .

Results

Localizzazione dell'espressione di *Gox* in operaie addette a distinti compiti

L'enzima è stato rinvenuto solo nelle ghiandole ipofaringee di tutte le api analizzate . Nessuna presenza nelle altre ghiandole . Il livello di espressione in questo tipo di ghiandole rimane consistente attraverso tutto lo sviluppo comportamentale ,da addetta alle pulizie a bottinatrice . Nessuna espressione è stata rinvenuta nelle ghiandole mandibolari, salivari della testa ,salivari del torace delle operaie . Similmente, nessuna espressione di *gox* è stata rinvenuta nei corpi grassi e nello stomaco .

Espressione di *Gox* nella testa di operaie di varie età

Nelle due famiglie studiate la modalità di espressione è risultata simile in relazione alla divisione del lavoro. L'espressione risulta progressivamente aumentare con l'aumentare dell'età dell'ape, raggiungendo il massimo livello nelle api mielatrici (processor) e bottinatrici che mostrano una quantità di espressione 4,5 volte più alta di quella osservabile nelle api adulte di 2 giorni di età .

Comparazione del contenuto di GOX e produzione di H_2O_2 in campioni di miele

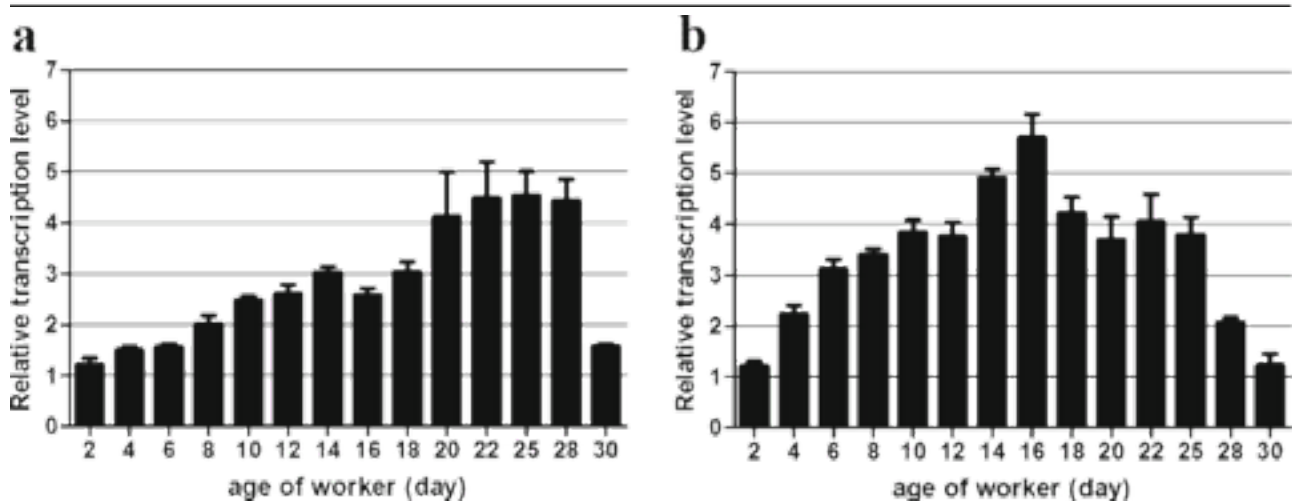


Fig. 3 Relative transcription levels of gox in pooled head samples of workers of various ages from colony A (a) and colony B (b). Three reference genes (cyclophilin, psa1 and gapdh) were used for

I 20 mieli analizzati di varie origini geografiche e botaniche mostrano differenze nel contenuto di GOX (Fig. 4a) anche relativamente a mieli della stessa origine botanica oltre che ovviamente a differenti origini botaniche e geografiche e periodo di raccolta. Queste osservazioni indicano che la quantità di GOX presente nel miele dipende dalla capacità di produzione di GOX da parte delle api dell'alveare. È rilevata una significativa correlazione tra presenza di GOX e livello di H₂O₂ generato quasi in tutti i mieli. Due campioni di melata pur contenendo bassa presenza di GOX si sono mostrati in grado di produrre alto livello di H₂O₂ (~200 μM) (Fig. 4a). Il livello di H₂O₂ in mieli scaldati è risultato significativamente ridotto in tutti i mieli suggerendo che GOX è il principale fattore responsabile della generazione di H₂O₂.

Attività antibatterica dei campioni di miele

I mieli testati sono risultati diversamente attivi nei confronti del Gram-negativo *P. aeruginosa*. I campioni numero 17, 18 e 19 di non specificata origine poliflorale sono risultati possedere la più forte capacità antibatterica fra quanto testato. La comparazione statistica tra il livello di H₂O₂ e attività antibatterica di ogni miele ha rivelato una correlazione concentrazione-dipendente tra la produzione di H₂O₂ e l'attività anti batterica contro *P. aeruginosa*

Discussione

In questo lavoro si è dimostrato che GOX è espresso esclusivamente nella ghiandola ipofaringea di api che si dedicano a vari compiti. L'espressione minima si osserva nelle api spazzine e la più alta in mielatrici (processors) e bottinatrici. Da queste due categorie di api GOX è secreto nel nettare durante la sua elaborazione in miele. Da ciò, i risultati indicano che GOX è secreto dalle nutrici nella pappa proteica con cui vengono nutrite le larve. Le api vecchie lo inseriscono nel miele, del quale GOX risulta con regolarità un componente. Si è poi mostrato che la quantità di GOX e la sua attività enzimatica determinano la quantità generata di H₂O₂ che di conseguenza varia significativamente come quantità di presenza.

La variazione di presenza quantitativa di GOX nel miele sembra dipendere da una molteplicità di fattori. Il contenuto di GOX varia tra mieli di differente origine floreale, ma varia anche tra mieli della stessa origine floreale provenienti da diverse origini geografiche. Interessante che la maggior presenza di GOX è rinvenuta in mieli poliflorali. Una delle possibili spiegazioni è che il contenuto di GOX nel miele sia determinato dalla nutrizione pollinica dell'alveare. È stato mostrato che dieta pollinica poliflorale aumenta alcune funzioni immunitarie rispetto a diete polliniche monoflorali, in particolare l'attività di GOX nella testa delle api suggerendo che diversità nella disponibilità floreale possa avere in effetto diretto sulla espressione di fattori immunitari e antibatterici GOX incluso (Alaux et al. 2010). D'altra parte, la variazione nel contenuto di GOX può essere associata a diversità genetica delle api (vari genotipi). Precedenti studi mostrano che il livello di presenza del peptide antimicrobico defensin-1 varia sia nella pappa da operaia che nel miele a seconda di fattori genetici (Klaudiny et al. 2012; Majtan et al. 2012). Anche variazioni nella quantità della proteina 1 del gruppo delle proteine maggiori della pappa reale sono state descritte (Bilikova and Simuth 2010). È probabile che i livelli di presenza nel miele di molte proteine e peptidi derivati dalle api, inclusi quelli che contribuiscono all'attività antibatterica (es. GOX), possano essere influenzati da fattori genetici ed epigenetici (Majtan et al. 2012), mostra che il peptide antibatterico derivato dalle api defensin-1 è regolarmente presente nel miele e contribuisce significativamente all'attività antibatterica contro i batteri gram positivi (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*)

Due campioni di melata hanno mostrato un'alta produzione di H_2O_2 (over 180 μM) pur disponendo di una bassa quantità di GOX. Le melate sono note per il loro alto contenuto di acidi fenolici e flavonoidi, i quali possiedono capacità antiossidanti e pro ossidanti (Alvarez-Suarez et al. 2013). In presenza di metalli di transizione i polifenoli si sono mostrati coinvolti nella generazione di consistenti quantità di H_2O_2 (Akagawa et al. 2003; Long et al. 2010). Perciò, specifici polifenoli derivati dalle piante e presenti nel miele possono costituire una sorgente addizionale di H_2O .

Commento - questo lavoro sembra dare l'ennesima conferma della dipendenza dalla raccolta di polline della parte dell'immunità sociale dedicata alla disinfezione. Di come per fare il miele serva il polline. È piuttosto verosimile che miele prodotto in situazioni di ristrettezza di disponibilità di polline, di suo raccolto, di problematiche che riducono la sintesi di glucosio ossidasi diano luogo a mieli dotati di scarsa capacità disinfettante e da lì si genera esposizione maggiore ai patogeni. Purtroppo non ci sono ancora studi che descrivano lo "stato di benessere" di spore di *Nosema* e virus che si trovano a nuotare nel miele prodotto dalle "processors" infette. Particolari nettari potrebbe rivelarsi in grado di accoppiare anche questi patogeni, ma non se ne sa nulla. È un ulteriore tipo di "mondo" che si spalanca, da esplorare.

Anche questo studio presenta il prodotto di una situazione di polifloralità (miele poliflora verosimilmente prodotto in situazione di polline poliflora) come il più dotato dal punto di vista batteriostatico a ennesima dimostrazione di come la variabilità qualitativa delle risorse alimentari giovi alla salute delle api