

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE Wydział Biologii i Biotechnologii

Kierunek: Biologia

Anna Siemińska-Kuczer nr albumu: 983954

Humoralna odpowiedź odpornościowa gąsienic *Galleria mellonella* na zakażenie bakterią *Pseudomonas aeruginosa*

(Humoral immune response of *Galleria mellonella* to bacterial infection with *Pseudomonas aeruginosa*)

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Immunobiologii pod kierunkiem dr hab. Marioli Andrejko

LUBLIN 2019

Treści przedstawione w niniejszej pracy zostały opublikowane w poniższych artykułach:

Andrejko M., Siemińska A., 2016, The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in *Galleria mellonella* larvae, ISJ, 13: 269-280

Andrejko M., Siemińska-Kuczer A., Janczarek M., Janik E., Bednarczyk M., Gagoś M., Cytryńska M., 2019, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease exhibits a high renaturation capability, Acta Biochim Pol, 66: 91-100

Siemińska-Kuczer A., Vertyporokh L., Andrejko M., Wojda, I., Stączek S., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska, M., 2017, Metaloproteinazy i ich inhibitory: rola w patogenezie na wybranych przykładach, Postepy Biochem, 63: 269-276

Stączek S., Grygorczuk K., Zdybicka-Barabas A., Siemińska-Kuczer A., Vertyporokh L., Andrejko M., Wojda, I., Grygorczuk-Płaneta K., Cytryńska M., 2017, Różne oblicza oksydazy fenolowej u zwierząt, Postepy Biochem, 63: 315-325

Spis treści

	Wykaz stosowanych skrótów	6
	Streszczenie w języku polskim	9
	Streszczenie w języku angielskim	
1.	WSTĘP 15	
1.1.	Oportunistyczne patogeny na przykładzie bakterii Pseudomonas aer	ruginosa
		15
	1.1.1. Czynniki wirulencji związane z komórką	17
	1.1.2. Zewnątrzkomórkowe czynniki wirulencji	17
	1.1.3. Oporność na antybiotyki	
1.2.	Organizmy modelowe w badaniach patogenności drobnoustrojów	24
1.3.	Galleria mellonella - model badawczy	
1.4.	Odpowiedź odpornościowa owadów	
1.5.	Odpowiedź komórkowa	
1.6.	Odpowiedź humoralna	
1.7.	Oksydaza fenolowa	
1.8.	Układ oksydazy fenolowej owadów	
1.9.	Peptydy odpornościowe owadów	
1.10.	Peptydy przeciwdrobnoustrojowe G. mellonella	41
1.11.	Apolipoforyna III	
1.12.	Lizozym	45
1.13.	Indukowalny inhibitor metaloproteinaz	
2.	CELE PRACY	
3.	MATERIAŁY I METODY STOSOWANE W BADANIACH	50
3.1.	Stosowane odczynniki	50
3.2.	Stosowane bufory	
3.3.	Drobnoustroje użyte w doświadczeniach	54

3.4. Me	tody stos	sowane w badaniach 54
	3.4.1.	Hodowla owadów
	3.4.2.	Podłoża do hodowli drobnoustrojów 54
	3.4.3.	Oczyszczanie alkalicznej proteazy 55
	3.4.4.	Identyfikacja białek metodą LC-MS-MS/MS56
	3.4.5.	Przygotowanie pasty bakteryjnej 56
	3.4.6.	Zakażanie gąsienic
	3.4.7.	Immunizacja gąsienic
	3.4.8.	Otrzymywanie próbek hemolimfy pozbawionych hemocytów 58
	3.4.9.	Przygotowanie ekstraktów z hemolimfy58
	3.4.10.	Odtłuszczanie ekstraktów z hemolimfy58
	3.4.11.	Oznaczanie stężenia białka 59
	3.4.12.	Oznaczanie aktywności przeciw bakteriom Gram-ujemnym 59
	3.4.13.	Oznaczanie aktywności przeciw bakteriom Gram-dodatnim 60
	3.4.14.	Oznaczanie aktywności hemolimfy typu lizozymu60
	3.4.15.	Oznaczanie aktywności przeciwgrzybowej hemolimfy 61
	3.4.16.	Oznaczanie aktywności oksydazy fenolowej w warunkach
in vivo.		
	3.4.17.	Badania in vitro wpływu alkalicznej proteazy na proces
aktywad	cji profei	noloksydazy
	3.4.18.	Badania in vitro wpływu alkalicznej proteazy na aktywność
oksydaz	zy fenolo	owej 63
	3.4.19.	Elektroforeza glicynowa w warunkach denaturujących
(SDS-P	AGE)	
	3.4.20.	Elektroforeza glicynowa w warunkach natywnych
	3.4.21.	Elektroforeza trycynowa65
	3.4.22.	Zymografia67
	3.4.23.	Bioautografia
		3

5.4.24. Elektrololeza uwukielulikowa IEP 5D5-I AGE
3.4.25. Elektrotransfer białek z żelu na membranę
3.4.26. Western blot (immunoblotting)69
3.4.27. Analiza jakościowa i ilościowa białek/peptydów hemolimfy 70
3.4.28. Metody statystyczne
4. ANALIZA WYNIKÓW
4.1. Humoralna odpowiedź odpornościowa barciaka większego <i>G. mellonella</i> po zakażeniu bakteriami <i>P. aeruginosa</i>
4.1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hemolimfy gąsienic zakażonych72
4.1.2. Analiza profili białkowych hemolimfy gąsienic zakażonych79
4.1.3. Analiza jakościowa i ilościowa peptydów odpornościowych obecnych w hemolimfie zakażonych gąsienic
4.2. Rola alkalicznej proteazy <i>P. aeruginosa</i> w procesie indukowania /przełamywania humoralnej odpowiedzi odpornościowej gasienic
G. mellonella
<i>G. mellonella</i>
<i>G. mellonella</i>
G. mellonella 97 4.2.1. Oczyszczanie alkalicznej proteazy metodą chromatografii jonowymiennej 98 4.2.2. Wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy w badaniach <i>in vivo</i> 101 4.2.3. Wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej w badaniach <i>in vivo</i> 107
G. mellonella
G. mellonella 97 4.2.1. Oczyszczanie alkalicznej proteazy metodą chromatografii 97 jonowymiennej 98 4.2.2. Wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy w badaniach <i>in vivo</i> 101 4.2.3. Wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej w badaniach <i>in vivo</i> 101 4.2.4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hemolimfy gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą 110 4.2.5. Analiza profili białkowo-peptydowych hemolimfy owadów immunizowanych alkaliczną proteazą 115
G. mellonella

5.2.	Efekt działania alkalicznej proteazy P. aeruginosa na wybrane	aspekty
	humoralnej odpowiedzi odpornościowej G. mellonella	128
6.	WNIOSKI	135
7.	LITERATURA	138
8.	SPIS RYCIN	166
9.	SPIS TABEL	171

Wykaz stosowanych skrótów

AMPs - (ang. antimicrobial peptides) peptydy odpornościowe

AP – (ang. alkaline protease) alkaliczna proteaza

apoE – (ang. apolpoprotein E) apolipoproteina E

apoLp-III - (ang. apolipophorin III) apolipoforyna III

APS - (ang. ammonium persulfate) nadsiarczan amonu

Bakterie G (-) – bakterie Gram-ujemne

Bakterie G (+) – bakterie Gram-dodatnie

CFU – (ang. colony forming unit) jednostka tworząca kolonie

DAMPs – (ang. *damage-associated molecular patterns*) wzorce molekularne uszkodzonych komórek

DMF - (ang. N, N-dimethylformamide) N, N-dimetyloformamid

EWL – (ang. egg white lysozyme) lizozym białka jaja kurzego

GlcNac - (ang. N-acetylglucosamine) N-acetyloglukozamina

IEF SDS-PAGE – elektroforeza dwukierunkowa obejmująca ogniskowanie izoelektryczne (IEF, ang. *isoelectric focusing*) oraz rozdział według masy cząsteczkowej (SDS-PAGE)

IMPI – (ang. *insect metalloproteinase inhibitor*) owadzi inhibitor metaloproteinaz

LDLp – (ang. low-density lipophorin) lipoforyna niskiej gęstości

L-DOPA – (ang. *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*) 3,4-dihydroksyfenyloalanina

LPS - (ang. lipopolysaccharide) lipopolisacharyd

LTA – (ang. lipoteichoic acid) kwas lipotejchojowy

MMPs – (ang. *matrix metalloproteinases*) metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

MurNAc – (ang. *N-Acetyl-muramic acid*) kwas N-actylomuraminowy

PPAE – (ang. pro*phenoloxidase activating enzyme*) enzym aktywujący profenoloksydazę

PAMPs – (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) wzorce molekularne patogenów

PAGE – (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

PG - (ang. peptidoglycan) peptydoglikan

PO - (ang. phenoloxidase) oksydaza fenolowa

ProPO - (ang. prophenoloxidase) profenoloksydaza

Protfrags – (ang. *haemolymph protein fragments*) fragmenty peptydowe powstałe w wyniku degradacji białek gospodarza przez metaloproteinazy wytwarzane przez patogen

PRRs – (ang. *pattern recognition receptors*) receptory rozpoznające molekularne determinanty patogenów

PTU – (ang. phenylthiourea) fenylotiomocznik

ROS – (ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu

RP-HPLC – (ang. *reversed phase – high performance liquid chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconej fazie

RTX – (ang. repeat in toxin) toksyny z powtórzeniami

SD - (ang. standard deviation) odchylenie standardowe

SDS – (ang. sodium dodecyl sulfate) dodecylosiarczan sodu

TEMED – (ang. *tetramethylethylenediamine*) N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina

TLR – (ang. Toll-like receptor) receptory Toll-podobne

Streszczenie w języku polskim

Zwiększająca się lekooporność drobnoustrojów jest jednym z głównych zagrożeń dla zdrowia publicznego. Poszukiwanie nowych leków wymaga dokładnego poznania mechanizmów patogenezy bakterii opornych na antybiotyki. Jednym z takich patogenów jest Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej (Pseudomonas aeruginosa), która wytwarza liczne czynniki zjadliwości, m. in. enzymy proteolityczne. Gąsienice barciaka większego (Galleria mellonella) są coraz częściej stosowanym organizmem modelowym w badaniach dotyczących patogenezy i czynników wirulencji bakterii. Wrodzony układ odpornościowy owadów i ssaków wykazuje wysoki stopień strukturalnej i funkcjonalnej homologii. Warto wspomnieć, że wykazano pozytywną korelację w wirulencji P. aeruginosa modelach ssaków oraz bezkręgowców. W walce z drobnoustrojami organizm owada uruchamia mechanizmy odpowiedzi humoralnej, których ważną role odgrywaja W peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz układ oksydazy fenolowej.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe zwane peptydami odpornościowymi są syntetyzowane w odpowiedzi na zakażenie głównie w ciele tłuszczowym oraz w hemocytach. Do aktywacji układu oksydazy fenolowej dochodzi w wyniku konwersji zymogenu profenolooksydazy (proPO) do oksydazy fenolowej (PO) przeprowadzanej przez enzym aktywujący profenoloksydazę (PPAE, ang. *prophenoloxidase activating enzyme*). Produktem końcowym reakcji katalizowanej przez oksydazę fenolową jest melanina, która wspomaga organizm gospodarza w walce z patogenami.

Podjęte badania miały na celu prześledzenie wybranych aspektów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella* po zakażeniu gąsienic dwoma szczepami bakterii *P. aeruginosa* (entomopatogennym i izolatem klinicznym) oraz po iniekcji do hemocelu bakteryjnego czynnika wirulencji – alkalicznej proteazy. Stosowane w badaniach szczepy bakteryjne wytwarzają różny zestaw zewnątrzkomórkowych proteinaz. Alkaliczną proteazę oczyszczano z płynu pohodowlanego szczepu klinicznego bakterii *P. aeruginosa* metodą chromatografii jonowymiennej i potwierdzono jej obecność w otrzymanej frakcji chromatograficznej metodą LC-MS-MS/MS oraz metodą immunoblotting'u.

Za pomocą metody dyfuzji radialnej oraz metody bioautografii wykazano, że zakażenie owadów bakterią P. aeruginosa powoduje zwiększenie zarówno aktywności przeciwbakteryjnej, jak i przeciwgrzybowej w hemolimfie gasienic G. mellonella. Wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie był związany między syntezy niskocząsteczkowych peptydów odpornościowych. innymi z indukcja W badaniach przeanalizowano także profil białkowo-peptydowy w ekstraktach zastosowaniem hemolimfy zakażonych gasienic Z różnych technik elektroforetycznych (Tricine SDS-PAGE i IEF SDS-PAGE) oraz chromatografii RP-HPLC. Po raz pierwszy wykazano, że zakażenie owadów pałeczką ropy błękitnej powodowało indukcję syntezy sześciu peptydów odpornościowych, których ilość istotnie wzrastała wraz z rozwojem bakteriemii. Już po 8 godzinach od zainfekowania gąsienic zwiększał się poziom trzech peptydów, tj. Gm defensyny, peptydu anionowego-1 oraz peptydu bogatego w prolinę-2, natomiast po 15 godzinach wzrastała ilość trzech kolejnych peptydów a mianowicie cekropino-D-podobnego, moricyno-B-podobnego oraz peptydu bogatego w prolinę-1. Poziom konstytutywnie obecnych w hemolimfie peptydów, takich jak peptyd anionowy-2, apolipoforycyna oraz Gm gallerimycyna nie ulegał zmianie po zakażeniu owadów badanym patogenem. Ponadto po 15 godzinach od iniekcji bakterii w badanych ekstraktach wyraźnie zwiększyła się ilość dysmutazy ponadtlenkowej odgrywającej ważną rolę w zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych w organizmie.

Po immunizacji gasienic niewielką dawką alkalicznej proteazy P. aeruginosa obserwowano podobny zestaw peptydów w ekstraktach z hemolimfy, w porównaniu do peptydów zidentyfikowanych po zakażeniu owadów. Ponadto w wyniku przeprowadzonych badań z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej oraz elektroforetycznej zaobserwowano aktywację układu oksydazy fenolowej w hemolimfie gasienic G. mellonella immunizowanych alkaliczna proteaza w pierwszych godzinach od iniekcji. Jednak po około 15 godzinach dochodziło do zależnego od dawki, prawie całkowitego zahamowania aktywności oksydazy fenolowej. W badaniach in vitro stwierdzono, że alkaliczna proteaza nie wpływa na zaktywowaną oksydazę fenolową, ale wyraźnie hamuje proces aktywacji proPO. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że rola alkalicznej proteazy podczas zakażenia zależy od stanu zaawansowania infekcji. Z jednej strony enzym jest w stanie

zapoczątkować wystąpienie reakcji immunologicznych, a z drugiej przełamać humoralną odpowiedź odpornościową gąsienic *G. mellonella*.

Barciak większy *G. mellonella* okazał się przydatnym organizmem modelowym do badań reakcji składających się na odpowiedź odpornościową owadów oraz do testowania patogenności i czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*. Poznanie interakcji zachodzących w układzie gospodarz-oportunistyczny patogen może przyczynić się do odkrycia potencjalnego celu terapeutycznego do walki z zakażeniem wywołanym przez pałeczkę ropy błękitnej, tj. hamowanie aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych.

Słowa kluczowe: układ oksydazy fenolowej, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, *Galleria mellonella*, alkaliczna proteaza, *Pseudomonas aeruginosa*

Streszczenie w języku angielskim

The increasing drug resistance of microorganisms is one of the main threats to public health. The search for new drugs requires a thorough understanding of the pathogenesis mechanisms of bacteria resistant to antibiotics. One such pathogen is Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, which produces numerous virulence factors, among others proteolytic enzymes. Larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) are being increasingly used as model organism in studies of pathogenesis and bacterial virulence factors. The innate immune system of insects and mammals is characterized by a high degree of structural and functional homology. It is worth mentioning that a positive correlation between virulence of *P. aeruginosa* in mammalian and invertebrate models was found. In the fight against microorganisms, insect's organism triggers mechanisms of humoral response in which antimicrobial peptides and the phenoloxidase system play an important role.

Antimicrobial peptides, called immune peptides, are synthesized in response to infection, mainly in the fat tissue and in the hemocytes. Activation of the phenoloxidase system occurs as a result of the conversion of zymogen prophenoloxidase (proPO) to phenoloxidase (PO), carried out by prophenoloxidase activating enzyme (PPAE). The final product of the phenoloxidase-catalysed reaction is melanin, which helps the host organism to fight pathogens. The investigations were aimed at analyzing selected aspects of *G. mellonella*'s innate immune response after infection with two strains of *P. aeruginosa* (entomopathogenic and clinical isolates), as well as after injection of bacterial virulence factor – alkaline protease. The bacterial strains used in the studies produce a different set of extracellular proteinases. The alkaline protease was purified from the culture fluid of the clinical strain of *P. aeruginosa* by ion-exchange chromatography and confirmed in the obtained chromatographic fraction with LC-MS-MS/MS and with immunoblotting.

Using the radial diffusion method and bioautography method, it has been shown that infecting insects with *P. aeruginosa* bacteria increases both the antimicrobial and antifungal activity in the hemolymph of *G. mellonella* larvae. The increase in antimicrobial activity in hemolymph was associated with the induction of the synthesis of low molecular weight immune peptides. The studies also analyzed the protein-peptide profile in haemolymph extracts of infected larvae using different electrophoretic techniques (Tricine SDS-PAGE and IEF SDS-PAGE) and RP-HPLC chromatography. It was demonstrated for the first time that the infection of insects with the *P. aeruginosa* induced the synthesis of six immune peptides, the number of which increased significantly with the development of bacteraemia. After just 8 hours from infection of the larvae, the level of three peptides increased, i.e. Gm defensin, anionic peptide 1 and proline-rich peptide 2, and after 15 hours the amount of three constitutive peptides increased, namely cekropin D-like peptide, moricin-like peptide B and proline-rich peptide 1. The level of constitutively present peptides in the hemolymph, such as anionic peptide 2, apolipoforicin, and Gm gallerimycin did not change after infecting insects with the pathogen. In addition, 15 hours after the injection of the pathogen, the amount of superoxide dismutase, which plays an important role in the homeostasis of antioxidative processes in insect, has clearly increased in the extracts studied.

After the immunization of larvae with a small dose of the alkaline protease of *P. aeruginosa*, a similar set of peptides was observed in the extracts of hemolymph, compared to peptides identified after infection with bacteria. Moreover, as a result of the tests carried out using the spectrophotometric and electrophoretic methods, activation of the phenoloxidase system was observed in the hemolymph of G. *mellonella* larvae immunized with alkaline protease in the first hours after injection. However, after about 15 hours there was a dose-dependent, almost complete inhibition of phenoloxidase activity. *In vitro* studies have shown that the alkaline protease does not affect activated phenoloxidase, but clearly inhibits the proPO activation process. Based on the obtained results, it was found that the alkaline protease may play a different role during infection depending on the severity of the infection. On the one hand, it is able to initiate the occurrence of immunological reactions, while on the other hand, it is also able to overcome the humoral immune response of *G. mellonella* larvae.

The greater wax moth *G. mellonella* proved to be a useful model organism for studying the reactions constituting the immune response of insects and for testing the pathogenicity and virulence factors of *P. aeruginosa*. Understanding the interactions that occur in the host-opportunistic pathogen system may contribute to the discovery of a potential therapeutic target to fight the infection caused by *P. aeruginosa*, i.e. inhibiting the activity of extracellular proteolytic enzymes.

Keywords: phenolic oxidase system, antimicrobial peptides, *Galleria mellonella*, alkaline protease, *Pseudomonas aeruginosa*

1. WSTĘP

1.1. Oportunistyczne patogeny na przykładzie bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

Zakażenia oportunistyczne wywoływane są przez bakterie, wirusy, grzyby oraz pasożyty u osób z niedoborem odporności, co stwarza patogenom okazję do namnażania się i wywołania choroby. Termin patogen oportunistyczny wywodzi się od greckiego słowa "pathos" oznaczającego chorobę oraz od angielskiego słowa "oportunity", czyli okazja (Georgiev, 1998; Prokopowicz i in., 2005).

Z przewlekłych ran często izoluje się Gram-dodatnie ziarniaki *Staphylococcus* (np. *S. aureus*), *Enterococcus* (np. *E. faecalis*), a także Gram-ujemne pałeczki *P. aeruginosa* (Jawień i in., 2012). Na liście głównych patogenów wywołujących zakażenia w szpitalach (tzw. ESKAPE) znajdują się takie bakterie, jak *Acinetobacter baumannii, E. faecium, Enterobacter* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* oraz *P. aeruginosa* (Mylonakis i in., 2016).

Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej *P. aeruginosa*, należąca do rodziny *Pseudomonadaceae* ma małe wymagania odżywcze. Potrafi wzrastać w wodzie destylowanej, a także przy wysokim zasoleniu wód (na przykład w wodzie morskiej) lub w wodach głębinowych kopalni. Rośnie w szerokim zakresie temperatur od 4 do nawet 44°C. Często izoluje się ją od pacjentów, u których przez dłuższy czas założony był cewnik, czy też u pacjentów intubowanych lub poddawanych sztucznej wentylacji płuc. Charakteryzuje się także zdolnością do powodowania zakażenia układu oddechowego oraz układu moczowego. Pałeczka ta jest także czynnikiem etiologicznym owrzodzeń stopy cukrzycowej (Jawień i in., 2012). Szczególnie narażoną grupą ludzi są osoby chorujące na mukowiscydozę, czy też osoby z nowotworami, neutropenią oraz immunosupresją (Hauser i Sriram, 2005; Wolska i in., 2013). Ponadto *P. aeruginosa* jest częstą przyczyną zapaleń rogówki u osób z uszkodzoną rogówką lub użytkujących soczewki kontaktowe (Hazlett, 2004; Rusiecka-Ziółkowska i in., 2007). Infekcja *P. aeruginosa* rozpoczyna się od adhezji i kolonizacji gospodarza, po czym dochodzi do lokalnej inwazji. W ostatnim etapie ma

miejsce rozpowszechnianie się choroby ogólnoustrojowej. Jednak proces ten może zatrzymać się na każdym z przedstawionych etapów (Strateva i Mitay, 2011; Todar, 2009). Śmiertelność osób zainfekowanych tym patogenem jest bardzo duża i wiąże się z opornością pałeczki na wiele antybiotyków. Obecnie wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec wybranych szczepów tej bakterii wykazują takie antybiotyki, jak ureidopenicyliny, karboksypenicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy, fluorochinolony oraz aminoglikozydy (Dzierżanowska, 2001).

Bakteria *P. aeruginosa* wytwarza szereg czynników wirulencji, zarówno związanych z komórką, jak i zewnątrzkomórkowych, które wspomagają ją w kolonizacji, uszkodzeniu tkanek, czy też pokonywaniu odpowiedzi odpornościowej gospodarza. Pałeczka ropy błękitnej jest oporna na działanie ekstremalnych warunków środowiska, tworzy biofilm, a także posiada zdolność do poruszania się za pomocą rzęsek (ryc. 1).

P. aeruginosa należy do bakterii, u których produkcja czynników wirulencji regulowana jest przez mechanizm quorum sensing (wyczuwanie obecności). Proces ten służy do komunikacji między komórkami bakterii za pomocą cząsteczek sygnałowych (AI, autoinduktor), takich jak lakton N-acylohomoseryny (bakterie Gram-ujemne) oraz sygnałów oligopeptydowych powstałych w wyniku trawienia białkowych prekursorów (bakterie Gram-dodatnie), w odpowiedzi na gęstość populacji drobnoustrojów. Po przekroczeniu określonego stężenia AI, co związane jest z osiągnięciem przez bakterie odpowiedniej liczebności, dochodzi do zmiany ekspresji genów (np. kodujących czynniki wirulencji), koniecznej do skutecznego współdziałania całej populacji drobnoustrojów (Fuqua i in., 1994; Wu i in., 2001). W ten sposób regulowana jest wirulencja bakterii, w tym tworzenie biofilmu. Mechanizm ten u P. aeruginosa sprzyja zmianom patologicznym w tkankach, rozprzestrzenianiu się zakażenia prowadzacego do sepsy oraz do zwiększonej śmiertelności badanych zwierząt (Smith i Iglewski, 2003; Myszka i Czaczyk, 2010). Quorum sensing reaguje nie tylko na zmiany zachodzące w populacji, ale także na stres środowiskowy. Inhibitory quorum sensing są szeroko przebadaną grupą alternatywnych terapeutyków, wobec której pokłada się nadzieję na pokonanie rosnącej oporności bakterii na antybiotyki (Lee i Zhang, 2015).

1.1.1. Czynniki wirulencji związane z komórką

Właściwości chorobotwórcze pałeczki ropy błękitnej są uwarunkowane przez liczne substancje powiązane z komórką, w tym lipopolischaryd, otoczka alginianowa, rzęski i pile. Bakteria ta posiada zdolność do tworzenia biofilmu, który jest gęstym skupiskiem bakterii, przytwierdzonym do powierzchni (ożywionej lub nieożywionej) i otoczonym warstwa matriks zewnątrzkomórkowej. Otoczka ta zapewnia skuteczną barierę ograniczająca penetrację niektórych kationowych antybiotyków oraz peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Jednym z głównych składników biofilmu jest alginian, który bierze udział w adhezji do komórek gospodarza oraz dodatkowo chroni bakterie przed fagocytozą oraz antybiotykami (Schurek i in., 2012; Mishra i in., 2012; Alhazmi, 2015; Urbanowicz i Gniadowski, 2017). W skład biofilmu wchodzą także ramnolipidy, które dodatkowo biorą udział w utrzymaniu funkcjonalności kanałów transportowych oraz w wykluczaniu innych szczepów z biofilmu (Davey i O'Toole, 2000; Espinosa-Urgel, 2003; Ławniczak i in., 2011). Powstawanie biofilmu może być indukowane obecnością antybiotyku. Uporczywe infekcje powodowane przez biofilmy bakteryjne są związane z szeregiem schorzeń, w tym mukowiscydozą oraz bakteriemią. Jedną z charakterystycznych cech biofilmów bakteryjnych jest ich odporność na środki przeciwdrobnoustrojowe i składniki układu odpornościowego gospodarza, dlatego też choroby związane z biofilmami są na ogół przewlekłe i trudne do wyleczenia (Nickel i in., 1985; Drenkard, 2003).

Pile typu IV wspomagają bakterie *P. aeruginosa* w adhezji do komórek gospodarza, ale są także odpowiedzialne za tropizm tkankowy, czyli za wybór atakowanej tkanki (Jagusztyn-Krynicka, 2012; Alhazmi, 2015; Urbanowicz i Gniadowski, 2017). Pile umożliwiają komórkom bakteryjnym wykonywanie ruchów drgających (ang. *twitching*), natomiast rzęski pozwalają bakteriom pływać (Köhler i in., 2000; Déziel i in., 2003; Ławniczak i in., 2011). Uważa się, że do wykonywania ruchu rozpełzliwego przez pałeczkę ropy błękitnej konieczny jest udział, zarówno pili typu IV, jak i ramnolipidów (Köhler i in., 2000; Ławniczak i in., 2011).

1.1.2. Zewnątrzkomórkowe czynniki wirulencji

Zjadliwość pałeczki ropy błękitnej warunkowana jest także wydzielanymi zewnątrzkomórkowymi substancjami, takimi jak egzotokysyny, hemolizyna, barwniki



Ryc. 1 Mechanizmy wirulencji stosowane podczas infekcji przez pałeczkę ropy błękitnej (Lee i Zhang 2015, zmienione)

(piocyjanina) oraz proteazy. Piowerdyna bierze udział w chelatacji jonów żelaza, przez co umożliwia bakteriom namnażanie się w środowisku o niskiej zawartości żelaza, które uzyskują z białek wiążących żelazo gospodarza, takich jak laktroferyna i transferryna. Natomiast piocyjanina odgrywa ważną rolę w rozwoju zakażenia, powodując zajmowanie przez bakterie takich obszarów jak płuca, krwioobieg, układ moczowy i rany pooperacyjne (ryc. 2). Barwnik ten wyzwala produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w organizmie gospodarza, które w dużym stężeniu wywołują apoptozę neutrofili i innych komórek układu odpornościowego, co skutkuje hamowaniem odpowiedzi immunologicznej (Mittala i in., 2009; Wolska i in., 2010; Mishra i in., 2012; Urbanowicz i Gniadowski, 2017; Chatterjee i in., 2016).



Ryc. 2 Hodowla bakteryjna szczepu ATCC 27853 *P. aeruginosa* wytwarzającego niebiesko-zieloną piocyjaninę (opracowanie własne)

U *P. aeruginosa* opisano 5 białek efektorowych (egzotoksyn), tj. ExoS, Exo Y, ExoA, ExoT oraz ExoU. Egzotoksynę A wykryto w plwocinie osób chorujących na mukowiscydozę i zaobserwowano wzrost stężenia tej toksyny wraz z zaostrzaniem się choroby. Sugeruje się, że działa jak toksyna błoniczna, czyli działanie jej opiera się na procesie hamowania syntezy białek (Jenkins i in., 2004; Rusiecka-Ziółkowska i in., 2007). Szczepy *P. aeruginosa* wytwarzające ExoS i ExoT wywołują zapalenie rogówki oka, dzięki aktywności ADP-rybosylotransferazy, która odpowiedzialna jest za apoptozę neutrofili. W efekcie powoduje to osłabienie odpowiedzi odpornościowej gospodarza, co ułatwia przetrwanie bakterii i rozwój infekcji. Ponadto ExoY, dzięki aktywności cyklazy adenylanowej zwiększa przepuszczalność nabłonków, a ExoU poprzez aktywność fosfolipazy powoduje lizę komórek gospodarza (Sato i Frank, 2004; Hauser, 2009; Sun i in., 2012).

Podczas zakażenia *P. aeruginosa* wydziela enzymy proteolityczne, które są zaangażowane W degradacje białek gospodarza, co wspomaga bakterie w przełamywaniu odpowiedzi odpornościowej. Proteaza IV P. aeruginosa (nr S01.281 bazy MEROPS), zwana endoproteazą prpL jest proteazą serynową, należącą do rodziny chymotrypsyn S1. Proteaza ta jest syntetyzowana wewnątrzkomórkowo jako 48 kDa preproenzym, a następnie ulega translokacji przez błonę wewnętrzną bakterii do peryplazmy (za pomocą systemu sekrecji typu II). Po czym dochodzi do odcięcia peptydu sygnałowego, składającego się z 24 reszt aminokwasów. W peryplazmie propeptyd jest prawdopodobnie usuwany przez autoproteolize, uwalniając w ten sposób dojrzałe białko. Funkcja propeptydu jest nieznana, ale sugeruje się że działa jak międzycząsteczkowe białko opiekuńcze i pomaga w fałdowaniu dojrzałej proteazy, wydzielaniu enzymu i być może pełni funkcję inhibitorową (Traidej i in., 2003a; Traidej i in., 2003b; Rawlings i in., 2010; Hoge i in., 2010). W domenie katalitycznej enzymu znajduje się His-72, Asp-122 oraz Ser-198, które razem tworzą triadę katalityczną. Do Ser-198 przyłączona jest także Ser-167, która jest niezbędna do aktywności tego enzymu. Proteaza IV w warunkach in vitro hydrolizuje bydlęcy fibrynogen, który należy do układu krzepniecia krwi, co w efekcie może spowodować krwotok, który jest charakterystyczny dla zakażenia pałeczką ropy błękitnej. Ponadto proteaza IV degraduje plazminogen, przeciwciała IgG oraz niektóre składniki dopełniacza (C3, C1q). Proteaza ta jest znana głównie z udziału w zapaleniu rogówki wywołanego bakteriami P. aeruginosa, ale zaangażowana jest też w rozwój infekcji płuc degradując białka surfaktantu A, B i D (Engel i in., 1998; Malloy i in., 2005; Matsumoto in., 2006; Kipnis i in., 2006). Andrejko i współpracownicy (2005) wykazali, że substratem dla proteazy IV może być apolipoforyna III, która jest obecna w hemolimfie gasienic G. mellonella. Przy czym lizozym, który jest również białkiem biorącym udział w odpowiedzi odpornościowej tego owada nie jest podatny na działanie proteolityczne proteazy IV (Andrejko i in., 2005).

Do enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez bakterię *P. aeruginosa* zalicza się także metaloproteazy: elastazę A, elastazę B oraz alkaliczną proteazę. Metaloproteazy (EC 3.4.24.) należą do tzw. "cynkowej superrodziny" posiadają charakterystyczną sekwencję HEXXH (X – reszta dowolnego aminokwasu). Kluczową rolę w mechanizmie katalizy dokonywanej przez metaloproteazy odgrywa jon cynku (Zn²⁺), który aktywuje cząsteczkę wody, co umożliwia jej atak nukleofilowy na grupę karbonylową wiązania. Do bakteryjnych metaloproteaz zalicza się trzy rodziny enzymów, tj. termolizyny, serralizyny i neurotoksyny. Przedstawicielami bakterii wydzielających enzymy ze wspomnianych rodzin są odpowiednio bakterie *Bacillus thermoproteolytics, Serratia marcescens, Clostridium botulinum* lub *C. tetani* (Miyoshi i Shinoda, 2000; Siemińska-Kuczer i in., 2017).

Elastaza A (w bazie MEROPS nr M23.002) zwana LasA, jest metaloendoproteazą cynkową i należy do rodziny M23A (Rawlings i Barrett, 1995, Rawlings i in., 2010). Enzym ten zwany jest stafylolizyną, ze względu na zdolność do lizy peptydoglikanu zawartego w ścianie komórkowej bakterii S. aureus. Tę właściwość enzymu bakteria P. aeruginosa stosuje, podczas infekcji płuc u chorych na mukowiscydozę dla uzyskania przewagi nad innymi patogenami (Gustin i in., 1996). Elastaza A syntetyzowana jest przez bakterie w formie zymogenu o masie cząsteczkowej 40 kDa. Następnie wydzielana jest na zewnątrz komórki (system sekrecji typu II), gdzie ulega dojrzewaniu do 20 kDa białka z udziałem endopeptydaz wydzielanych przez P. aeruginosa (LasB, LysC i proteazy IV) (Schad i Iglewski, 1988; Gustin i in., 1996; Braun i in., 1998; Wilderman i in., 2001; Hoge i in., 2010). Elastaza A charakteryzuje się niską aktywność elastolityczną, ale wzmaga aktywność elastolityczną innych proteaz bakterii P. aeruginosa (np. LasB) oraz występujących w organizmie gospodarza (np. elastazy neutrofili, ludzkiej elastazy leukocytów). Dzięki tym właściwościom elastaza A bierze udział w rozwoju infekcji rogówki oka oraz w przewlekłych zakażeniach układu oddechowego (Kessler i in., 1993; Kessler i in., 1997; Peters i Galloway, 1990; Todar i in., 2009; Hoge i in., 2010).

Kolejnym enzymem proteolitycznym wytwarzanym podczas infekcji przez pałeczkę ropy błękitnej jest alkaliczna proteaza, zwana aeruginolizyną lub AprA (EC 3.4.24.40.), która należy do rodziny serralizyn (podrodzina M10 A). Masa cząsteczkowa enzymu to około 50 kDa (w zależności od badanego szczepu

bakteryjnego), a optymalne pH do działania proteazy wynosi 9-10. Struktura alkalicznej proteazy wykazuje homologie do metaloproteazy wytwarzanej przez Dickeya dadantii oraz Serratia marcescens. Syntetyzowana jest w postaci nieaktywnego zymogenu, który po odcieciu dziewieciu reszt aminokwasowych od N-końca białka uzyskuje formę dojrzałego białka (480 reszt aa). W centrum aktywnym zawiera jon Zn^{2+} , który jest jej kofaktorem niezbednym do jej działania (www.chem.qmul.ac.uk; Okuda i in., 1990; Miyatake i in., 1995). Działanie alkalicznej proteazy opiera się na hydrolizie obecnego w białku wiązania peptydowego po stronie karboksylowej reszty proliny (Kipnis i in., 2006). Alkaliczna proteaza zbudowana jest z dwóch domen, C-końcowej zbudowanej z β-kartek i wiążącej jony wapnia oraz N-końcowej, pełniącej funkcję katalityczną. W części C-końcowej enzymu występuje charakterystyczny motyw RTX (ang. *repeat in toxin*) zawierający nonapeptydowe powtórzenia reszt glicyny i kwasu asparaginowego. Alkaliczna proteaza P. aeruginosa jest wydzielana zewnątrzkomórkowo za pomocą systemu sekrecji typu I. AprA do zachowania swojej stabilności oraz pełnionych funkcji, wymaga obecności ośmiu jonów wapnia (Thayer i in., 1991; Olson i Ohnman, 1992; Baumann i in., 1993). Proteaza ta wspomaga pałeczkę ropy błękitnej w rozwoju bakteriemii, wywołaniu choroby ucha środkowego oraz zakażenia układu oddechowego u osób chorujących na mukowiscydozę (Kipnis i in., 2006). Ponadto degradacja proteolityczna lamininy, syntetyzowanej przez komórki nabłonkowe, wywołana działaniem proteazy, skutkuje powstaniem martwicy krwotocznej. Alkaliczna proteaza trawiąc białka gospodarza może prowadzić do destrukcji tkanek i ułatwia rozprzestrzenianie się bakterii w zainfekowanym organizmie. Podobnie, jak w przypadku LasB, aktywność alkalicznej proteazy prowadzi do upośledzenia odpowiedzi odpornościowej gospodarza. Enzym odpowiedzialny jest za rozregulowanie kaskady dopełniacza, niszczenie przeciwciał (np. IgG) oraz receptorów komórek immunologicznych. Alkaliczna proteaza degraduje składniki dopełniacza C1q i C3, a także chemokiny i cytokiny, tj. interferon (INF- γ), interleukinę -2 i -6 (IL-2, IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworu α (TNF-α) (Kawalec i Jakubczak, 2006; Hoge i in., 2010). Biorac to pod uwagę można przypuszczać, że proteaza ta podczas zakażenia funkcjonuje jako środek immunomodulujący (Horvat i Parmely, 1988; Parmely i in., 1990; Hong i Ghebrehiwet, 1992; Leidal i in., 2003; Kharazmi, 1991; Kida i in., 2008). Zdolność modulacji immunologicznej AprA

obejmuje również zdolność do degradacji monomerów flageliny, aktywatora reakcji zapalnych, wskutek rozpoznawania receptora Toll-podobnego 5 (TLR5). Podczas gdy polimeryczna flagelina (zaangażowana w ruchliwość bakterii) nie jest degradowana, dzięki obecności inhibitora AprI (Bardoel i in., 2011; Casilag i in., 2015; Al-Wrafy i in., 2017). Natomiast zaburzenie chemotaksji neutrofili wywołane działaniem alkalicznej proteazy, wspomaga bakterie w uniknięciu fagocytozy i w rozprzestrzenianiu infekcji (Kipnis i in., 2006; Hoge i in., 2010).

Elastaza B P. aeruginosa (EC 3.4.24.26.) inaczej LasB lub pseudolizyna, jest metaloproteaza o masie 33 kDa, należącą do rodziny termolizyn M4 (Morihara i in., 1965; Morihara, 1995; Kessler i in. 1998) i wydzielaną przez bakterie P. aeruginosa do przestrzeni pozakomórkowej poprzez system sekrecji typu II. Elastaza B hydrolizuje wewnętrzne wiązanie peptydowe białek i peptydów, po stronie aminowej reszt hydrofobowych w pozycji P1 (Matthews, 1988; Miyoshi i Shinoda, 2000; Casilag i in., 2015). LasB, tak jak AprA do stabilności i pełnionej funkcji potrzebuje jonów wapnia, ale ma tylko jedno miejsce jego wiązania. Wapń jest konieczny do wydajnej transkrypcji LasB oraz podczas sekrecji białka (Thayer i in., 1991; Olson i Ohnman, 1992; Baumann i in., 1993). Elastaza B bierze udział w patogenezie bakterii poprzez degradację ludzkich, immunologicznie kompetentnych cząsteczek, takich jak składniki dopełniacza, cytokiny, lizozym ludzki dróg oddechowych, przeciwciała IgA i IgG, (Schultz i Miller, 1974; Parmely i in. 1990; Buret i Cripps, 1993; Maeda i Yamamoto, 1996; Jacquot i in., 1985; Andrejko i Mizerska-Dudka, 2012). Elastaza B może również zmniejszać skuteczność układu odpornościowego gospodarza w obrębie płuc poprzez degradację białek surfaktantu A i D (Mariencheck i in., 2003; Dulon i in., 2005). Ponadto bierze udział w infekcji dróg oddechowych wywołanej bakteriami P. aeruginosa poprzez degradację nabłonka oddechowego (Azghani i in., 1993; Azghani, 1996; Azghani i in., 2000). Zarówno elastaza B, jak i aeruginolizyna degradują fibrynę, co prowadzi do uszkodzenia rogówki oraz pozostałych tkanek zawierających wspomniane białko. Hamowanie działalności elastazy B za pomocą inhibitorów proteaz mogłoby być potencjalną strategia terapeutyczną (Kipnis i in., 2006).

1.1.3. Oporność na antybiotyki

Naturalna oporność patogenów na określone antybiotyki, jest związana z brakiem miejsca docelowego (koniecznego dla działania danego leku), obniżeniem przepuszczalności osłon patogena lub jest związana z aktywnością chromosomowo kodowanych strategii oporności. Poza opornością naturalna bakterie moga nabywać oporność na antybiotyki, co stanowi główny problem w walce z nimi. Dlatego też oporność niektórych bakterii oportunistycznych, takich jak Staphylococcus aureus może być związana ze zmianą polaryzacji błony patogena z anionowej na kationową, czy też z modyfikacją błony komórkowej, wskutek acylacji lipidu A lipopolisacharydu (Schmidtchen i in., 2002; Guo i in., 1997; Fedtke i in., 2004; Janiszewska, 2014). W przypadku P. aeruginosa, bakterie te nabywają oporność poprzez mutacje chromosomalnie kodowanych genów lub rekombinacje w obrębie chromosomowego DNA. Pałeczka ropy błękitnej broni się przed szkodliwym działaniem antybiotyku poprzez jego inaktywację dokonując modyfikacji chemicznej lub hydrolizy, czy też wyrzucając antybiotyk za pomocą systemu efflux (ryc. 1). Drugim sposobem nabywania oporności przez pałeczkę ropy błękitnej jest przekazywanie oporności poprzez horyzontalny transfer genów (HGT), który może prowadzić do kumulacji wielu genów oporności na antybiotyki (Wolska i in., 2013; Baptista i in., 2018).

1.2. Organizmy modelowe w badaniach patogenności drobnoustrojów

Wybór organizmu modelowego jest istotnym etapem podczas planowania doświadczeń mających na celu prześledzenie patogenezy drobnoustrojów. Należy wybierać taki model, który zapewni uzyskanie warunków przypominających rozwój infekcji u człowieka, czyli konieczny jest etap kolonizacji oraz odpowiedź odpornościowa organizmu. Do badań bardzo często stosuje się modele ssacze, w związku z podobieństwem immunologicznym oraz anatomicznym, m. in. króliki, świnki morskie, szczury oraz myszy. Taki wybór powoduje liczne problemy, tj. wysoki koszt hodowli, długi czas reprodukcyjny zwierząt laboratoryjnych, a także konieczność uzyskania zgody Krajowej Komisji Etycznej ds Doświadczeń na Zwierzętach.

W przypadku zastosowania modeli bezkręgowych nie jest wymagana zgoda Komisji Etycznej. Dodatkowym atutem są stosunkowo niskie koszty hodowli, krótki cykl rozwojowy i możliwość uzyskania wyników eksperymentów nawet w ciągu 48 godzin od rozpoczęcia doświadczenia. Oczywiście nie da się wyeliminować całkowicie potrzeby stosowania modeli ssaczych, ale na pewno pozwoli to ograniczyć ich liczbę do badań pilotażowych (Tsai i in., 2016). Na podstawie porównania genomów stwierdzono, że istnieje wiele owadzich homologów ludzkich genów kodujących białka, które mogą być zaangażowane w rozpoznanie mikroorganizmów, jak i w proces transdukcji sygnału (Mikulak i in., 2018). W badaniach patogenności i czynników wirulencji mikroorganizmów, odpowiedzi odpornościowej gospodarza oraz do oceny skuteczności antybiotyków stosowane są takie bezkręgowce, jak Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, Blattella germanica L., Culex quinquefasciatus S. oraz Galleria mellonella L. (Mikulak i in., 2018). Do badania interakcji żywiciel-patogen z szerokim wachlarzem patogennych bakterii, Cestoda, Sporozoa, roztoczy, nicieni, stosuje się także Tribolium castaneum (Coleoptera, Tenebrionidae) (Altincicek i in., 2008a). Natomiast dobrymi organizmami modelowymi do badania czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych okazały się żyjące w glebie ameby Acanthamoeba castellanii i Dictyostelium discoideum, jedwabnik Bombyx mori, komar Culex quinquefasciusus oraz prusak Blattella germanica (Wang i in., 2013).

1.3. Galleria mellonella - model badawczy

Obecnie za pomocą wyszukiwarki PubMed można znaleźć blisko 800 artykułów opisujących badania dotyczące przebiegu infekcji różnych drobnoustrojów z zastosowaniem *G. mellonella*, przy czym połowa z nich została opublikowana w ciągu ostatnich pięciu lat, co świadczy o rosnącej popularności tego owada jako organizmu modelowego. Barciak większy (*G. mellonella*) jest przedstawicielem rzędu Lepidoptera, należy do rodziny omacnicowatych (Pyralidae, tab. 1). Jest organizmem kosmopolitycznym, którego hodowla do celów doświadczalnych może być prowadzona na plastrach woszczyny pszczelej lub na sztucznych pożywkach. Przykładem takiej pożywki jest pożywka Sehnal'a zawierająca cukier, miód, mleko w proszku, drożdże, glicerynę, mąkę pszenną, razową i kukurydzianą, a także otręby i zarodki pszenne (Mikulak i in., 2018). W naturze barciaka można spotkać w ulach pszczelich, gdzie niepokoi czerwie, przenosi choroby, powoduje zamieranie poczwarek i niedorozwój pszczół. Ponadto gąsienice żywią się woskiem, miodem i pyłkiem, tym samym pozbawiając pszczoły zgromadzonych zapasów, dlatego też przy dużym zagęszczeniu owady te wywołują znaczne szkody w pasiekach (Ergin i in., 2006; Uçkan i in., 2010, Er i in., 2011, Demir i in., 2012).

Królestwo	Animalia
Gromada	Arthropoda
Klasa	Insecta
Rząd	Lepidoptera
Rodzina	Pyralidae
Rodzaj	Galleria (Fabricius, 1798)
Gatunek	Galleria mellonella (Linnaeus, 1758)

Tab 1. Taksonomia G. mellonella (www.gbif.org/species/1876542, zmienione)

W jednym cyklu rozwojowym, ściśle uzależnionym od temperatury hodowli (w optymalnych warunkach trwającym 6 tygodni), samica barciaka może złożyć aż do 1500 jaj. Po około tygodniu z jaj wylegają się gąsienice, które intensywnie żerują. Gąsienice będące pod koniec ostatniego stadium, osiągają długość około 2 cm i przestają żerować (ryc.3). Następnie przemieszczają się poza obszar woszczyny, tworzą jedwabny oprzęd, po czym przechodzą stadium poczwarki, które trwa od 1 do 2 tygodni. W wyniku przeobrażenia powstaje imago, motyl (Schmolz i Lamprecht, 2004; Ramarao i in., 2012; Wojda i Vertyporokh, 2017).



Ryc. 3 Gąsienica G. mellonella (opracowanie własne)

Waga gasienic stosowanych do badań wynosi około 250 do 300 mg, co znacznie ułatwia manipulacje laboratoryjne. Gąsienice można zakażać miejscowo, poprzez podanie drobnoustroju drogą pokarmową (force-feeding) lub przez bezpośrednie wprowadzenie patogena do hemocelu. Przy czym iniekcja owada jest dużo lepszym rozwiązaniem, ponieważ pozwala na aplikację znanej dawki danego immunogenu (Fuchs i in., 2010; Junqueira, 2012). Barciak stosowany jest do badania patogenezy, m in. takich bakterii, jak Yerinia pseudotuberculosis, P. aeruginosa oraz Bacillus thuringiensis (Champion i in., 2009; Wojda i Taszłow, 2013; Andrejko i in., 2014). Ponadto z powodzeniem jest wykorzystywany do analizowania patogenności grzybów Candida albicans, Beauveria bassiana oraz Conidiobolus coronatus (Wieloch i in., 2011; Vertyporokh i in., 2015; Oliveira i in., 2017). Gasienice barciaka większego stosowane są do wyznaczania krzywej przeżywalności, a także do śledzenia przebiegu odpowiedzi odpornościowej (poprzez kontrolę liczby hemocytów, obserwację ekspresji genów kodujących białka i peptydy odpornościowe oraz ich identyfikację). Ponadto G. mellonella może być przydatny do oceny histologicznej tkanek, czy też oceny toksyczności środków konserwujących żywność (Junqueira, 2012; Binder i in., 2016).

Warto wspomnieć, że wykazano pozytywną korelację między odpowiedzią gospodarza a wirulencją w modelach ssaków oraz bezkręgowców wielu drobnoustrojów, w tym *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* oraz *E. faecali* (Junqueira, 2012). Co ciekawe, znaleziono także analogie pomiędzy komórkami jelitowymi układu trawiennego ssaków a komórkami nabłonkowymi obecnymi w jelicie środkowym owadów (Lemaitre i Hoffmann, 2007; Ramarao i in., 2012). Ponadto układ odpornościowy gąsienic wykazuje duże podobieństwo do wrodzonej odporności ssaków (Jander i in., 2000). Genom *G. mellonella* nie został w pełni zsekwencjonowany, ale niedawno powstał zarys takiego genomu (Lange i in., 2018). Jako główny zarzut do stosowania tego rodzaju organizmów modelowych podaje się m. in. brak wystandaryzowanych procedur hodowli *G. mellonella*, co utrudnia porównywanie wyników uzyskanych w różnych laboratoriach (Binder i in., 2016). W tabeli 2 zestawiono zalety oraz wady stosowania jako organizmu modelowego barciaka większego.

Tab. 2 Barciak większy	jako organizm modelowy -	– zalety i wady (na podstawie Bine	der
i in., 2016; Lange i in., 2018)			

Barciak większy jako organizm modelowy			
Zalety	Wady		
 duży rozmiar gąsienic (250-300 mg), możliwość namnażania na sztucznych pożywkach, gatunek kosmopolityczny, temperatura hodowli 25-37°C, w optymalnych warunkach nie przechodzi w stan uśpienia, duża tolerancja na manipulacje laboratoryjne, możliwość uzyskania wyników w krótkim czasie (24 - 48 godzin), krótki cykl życiowy, zidentyfikowany transkryptom genów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. 	 brak odpowiednich mutantów umożliwiających funkcjonalne zbadanie reakcji gospodarza, jakość larw ulega zmianie - potrzeba licznych kontroli, brak standardowych procedur utrudnia porównywanie wyników badań do poszczególnych laboratoriów, nieznana sekwencja genomu, choć w 2018 roku zaproponowano jego zarys (izolat FT-Tue) na podstawie technologii Pac Biogenome. 		

1.4. Odpowiedź odpornościowa owadów

Pierwszą barierą, chroniącą owada przed infekcją są jego bariery anatomiczne i fizjologiczne. Ciało owada jest okryte twardym egzoszkieletem utworzonym z integumentu, który zapewnia ochronę organów i tkanek przed urazami oraz przed wniknięciem drobnoustrojów, pasożytów czy pestycydów. Służy także za podstawę do przyczepu mięśni i chroni przed nadmierną utratą wody. Typowy integument owada składa się z trzech elementów, tj. kutikuli, epidermy oraz błony podstawnej (ryc. 4). Pozbawiona komórek kutikula stanowi zewnętrzną, widoczną warstwę, która nadaje kolor i twardość egzoszkieletu owada. Kutikula pełni wiele funkcji, m. in. ułatwia poruszanie się, nadaje kształt owadowi, a organy sensoryczne obecne w kutikuli pozwalają na odbieranie bodźców ze środowiska zewnętrznego. Warstwa ta składa się z endokutikuli, egzokutikuli, które tworzą razem prokutikulę, zawierającą głównie białka i chitynę. Chityna to polisacharyd zbudowany z powtarzających się reszt N-acetyloglukozaminy, który nadaje kutikuli wytrzymałość, nie twardość. Trzecim elementem kutikuli jest epikutikula, która nie zawiera chityny, jest odporna na wodę i rozpuszczalniki. Wyróżnia się w niej wewnętrzną epikutikulę, zewnętrzną epikutikulę, oraz najbardziej zewnętrzną warstwę cementu, składającą się z lipidów i białek. Pomiędzy endokutikulą oraz epidermą znajduje się adhezyjna warstwa Shmidt'a. Poniżej kutikuli położona jest epiderma, która odpowiada za syntezę i uwalnianie różnych materiałów do kutikuli. Błona podstawna jest pozbawiona komórek. Zbudowana jest z amorficznego mukopolisacharydu i włókien kolagenowych. Stanowi barierę oddzielającą wnętrze owada od integumentu. Kutikula może ulegać procesowi sklerotyzacji, czyli stabilizacji poprzez włączanie związków fenolowych (Sanjayan, 2018).



Ryc. 4 Schemat integumentu owada (Sanjayan, 2018; zmienione)

Dodatkową ochronę owada zapewniają niekorzystne warunki panujące w tchawicy. Dzięki niskiej wilgotności oraz braku składników odżywczych organizm uniemożliwia kolonizację drobnoustrojów chorobotwórczych. Natomiast w jelicie funkcję ochronną pełni wysokie pH, obecność bakterii (odpowiedzialnych za trawienie pożywienia) oraz enzymów proteolitycznych (trawiennych).

Przerwanie ciągłości barier obronnych owada zaburza homeostazę organizmu, powoduje wypływ hemolimfy i stanowi potencjalne miejsce wtargnięcia patogena (Gliński i Kostro, 2004; Moussian, 2010; Wojda, 2017; Wojda i Vertyporokh, 2017; Singkum i in., 2019). W efekcie uruchamiany jest proces krzepnięcia hemolimfy oraz odpowiedź odpornościowa owada.

Odporność definiuje się jako umiejętność organizmu do zachowania homeostazy, dzięki zdolności do odróżniania tego co obce od tego co jest własne (ang. *non self/self*) (Cytryńska, 2009). Owady dysponują jedynie mechanizmami odporności wrodzonej. Jednak jak wynika z przeprowadzonych badań posiadają pamięć immunologiczną. W związku z tym po zetknięciu się z danym mikroorganizmem za kolejnym razem są bardziej odporne na powtórną infekcję i tę odporność mogą przekazywać następnym pokoleniom (Faulhaber i Karp, 1992; Cytryńska, 2009; Mikulak i in., 2018). Uważa się, że u owadów i pozostałych bezkręgowców funkcjonuje alternatywny rodzaj odporności nabytej, która jest oparta na innych mechanizmach niż te, które występują u kręgowców (Kurtz, 2005; Kurtz i Armitage, 2006; Płytycz, 2008; Cytryńska, 2009).

Biorąc pod uwagę brak odporności nabytej u owadów można stwierdzić, że największym wyzwaniem dla wrodzonego układu odpornościowego jest rozpoznanie patogena i innych ciał obcych (Lavine i Strand, 2008). Do induktorów odpowiedzi odpornościowej zaliczane są przede wszystkim mikroorganizmy, które są rozpoznawane dzięki charakterystycznym strukturom PAMPs (ang. *pathogen associated molecular patterns*). Do rozpoznania przez organizm gospodarza dochodzi dzięki obecności błonowych receptorów PRRs (ang. *pattern recognition receptors*), wśród których znajdują się receptory Toll-podobne (TLR) (Gliński, 2017; Sima i in., 2003).

Wrodzony układ odpornościowy owadów składa się, zarówno z odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej, które poprzedza aktywacja szlaków sygnałowych (Marmaras i Lampropoulou, 2009). Podział ten jest umowny ze względu na to, że wiele cząsteczek efektorowych humoralnej odpowiedzi odpornościowej wpływa na funkcjonowanie komórek hemolimfy, a te z kolei są ważnym źródłem wielu molekuł biorących udział w humoralnych mechanizmach odporności. W rozpoznawaniu ciał obcych nakładają się mechanizmy humoralne, jak i komórkowe. Hemocyty rozpoznają ciała obce albo poprzez bezpośrednie oddziaływanie receptorów powierzchniowych hemocytów z drobnoustrojami, albo pośrednio przez rozpoznanie receptorów humoralnych, które wiążą się i opsonizują powierzchnię intruza. Następnie szklaki sygnałowe koordynują reakcje efektorowe, takie jak fagocytoza lub enkapsulacja (Lavine i Strand, 2008).

1.5. Odpowiedź komórkowa

Hemocel (jama ciała) owada wypełniony jest hemolimfą, która pełni analogiczną funkcję do krwi ssaków. Odpowiada za transport składników odżywczych, zbędnych metabolitów oraz innych mikro- i makrocząsteczek. W hemolimfie można znaleźć krążące komórki pełniące funkcje odpornościowe (hemocyty), które wywodzą się z mezodermalnych komórek macierzystych (Satyavathi i in., 2014). Ilość hemocytów znacząco zmniejsza się podczas infekcji owada, jednocześnie tworzone są nowe hemocyty z tkanek hematopoetycznych, w celu zrównoważenia ilości utraconych hemocytów (Marmaras i Lampropoulou, 2009).

Podczas zakażenia owadów, po rozpoznaniu struktur powierzchniowych patogena, dochodzi do aktywacji odpowiedzi komórkowej. Komórki hemolimfy wytwarzają reaktywne formy tlenu, przeprowadzają proces fagocytozy i enkapsulacji, czyli tworzenia wielowarstwowych otoczek utworzonych z hemocytów wokół agregatów komórkowych (nodulacja) oraz wokół pasożytów (właściwa inkapsulacja), w celu ich uwięzienia i zabicia. Hemocyty posiadają także zdolność do wytwarzania enzymów o właściwościach litycznych, podobnie jak neutrofile u bezkręgowców (Cytryńska, 2009).

U *G. mellonella* występuje 5 typów hemocytów tj. prohemocyty, sferulocyty, enocytoidy, granulocyty i plazmatocyty, które różnią się morfologią oraz pełnioną funkcją (Ratcliffe i Gagen, 1977; Tomiotto-Pellissier i in., 2016; Singkum i in., 2019). Prohemocyty owadów zdolne są do podziałów mitotycznych i różnicują się w wyspecjalizowane hemocyty. Zarówno prohemocyty, sferulocyty, jak i enocytoidy nie posiadają właściwości adherentych w stosunku do ciał obcych. Jedynie plazmatocyty i granulocyty mają zdolność do opłaszczania ciał obcych i przeprowadzania procesu fagocytozy. Enocytoidy zawierają profenoloksydazę, która po aktywacji bierze udział w procesie melanizacji. Natomiast sferulocyty zaangażowane są w transport mukopolisacharydów do budowy kutikuli (Ribeiro i Brehélin, 2006; Wojda i Vertyporokh, 2017; Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014).

Warto wspomnieć, że zakażenie szczepem entomopatogennym *P. aeruginosa* gąsienic G. *mellonell*a wywołuje zmianę w żywotności oraz morfologii, zarówno

granulocytów, jak i plazmatocytów. Bakteria ta powoduje także zmiany w zdolności do rozprzestrzeniania się wspomnianych hemocytów, co może być związane ze zmianą w aranżacji cytoszkieletu aktynowego hemocytów (Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014).

1.6. Odpowiedź humoralna

Humoralna odpowiedź odpornościowa owadów obejmuje aktywację układu oksydazy fenolowej, indukcję syntezy peptydów odpornościowych, a także działanie przeciwdrobnoustrojowe apolipoforyny III, lizozymu oraz inhibitora metaloproteinaz (Bergin i in., 2006; Munoz-Gomez i in. 2014; Binder i in., 2016; Singkum i in., 2019).

1.7. Oksydaza fenolowa

Oksydaza fenolowa (PO) to enzym należący do klasy oksydoreduktaz, którego główną rolą jest utlenianie związków fenolowych. Wyróżnia się trzy typy oksydazy fenolowej, ze względu na ich aktywność, tj. tyrozynaze (EC 1.14.18.1.), katcholazę (EC 1.10.3.1.) oraz lakazę (EC 1.10.3.2.). Wszystkie typy oksydazy katalizuja utlenianie o-difenoli (aktywność katecholazy). Przy czym tylko tyrozynaza katalizuje ortohydroksylację monofenoli (aktywność krezolazy). Natomiast lakaza katalizuje utlenianie m- i p-difenoli oraz innych związków, takich jak aminy aromatyczne (aktywność lakazy). Ze względu na ich różne aktywności nie stosuje się nazw typów oksydazy fenolowej jako synonimów. Rozmiar i struktura oksydazy różnią się w zależności od rodzaju i od organizmu. Przykładowo u kręgowców, tyrozynazy występują w postaci dimerów, a u bezkregowców sa monomerami, czy też oligomerami. Masa cząsteczkowa oksydazy waha się w przedziale 10-400 kDa (Renwrantz i in., 1996; Luna-Acosta i in., 2017). U zwierząt bezkręgowych występują trzy typy PO, np. tyrozynaza u D. melanogaster, katecholaza u Charybdis japonica oraz lakaza u Procambrus clarkii (Chase i in., 2000; Gonzales-Santoyo i Cordoba-Aguilar, 2012; Stączek i in., 2017). Tyrozynaza, zawiera miedź i jest szeroko rozpowszechnionym enzymem w przyrodzie, który jest odpowiedzialny za melanizację u zwierząt i brązowienie roślin (Gowda i Paul 2002, Shelby i Popham, oksydazy można wykryć zarówno w 2006). Aktywność organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych (Ratcliffe i in., 1985; Götz, 1986; Kopacék i in., 1995).

1.8. Układ oksydazy fenolowej owadów

W odpowiedzi na infekcję drobnoustrojową owady uruchamiają kilka reakcji odpornościowych, w tym aktywują kaskadę enzymów proteolitycznych, zwaną układem oksydazy fenolowej (Cerenius i Söderhäll, 2004; Stączek i in., 2017). Do aktywacji układu dochodzi w wyniku zranienia oraz po rozpoznaniu przez receptory gospodarza charakterystycznych struktur molekularnych PAMPs obecnych w ścianie i błonie komórkowej drobnoustroju, m. in. lipopolisacharydu w przypadku bakterii Gram-ujemnych, peptydoglikanu występującego u bakterii Gram-dodatnich oraz β-1,3-glukanu u grzybów (Söderhäll i Cerenius, 1998; Cerenius i Söderhäll, 2004; Demir i in., 2012). U Lepidoptera rozpoznanie PAMPs skutkuje uwolnieniem składników systemu proPO z hemocytów (enocytoidów) do hemolimfy owada (Kanost i in., 2004; Lu i Jang, 2007; Cerenius i in., 2008; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010). Aktywację układu PO mogą powodować także wzorce molekularne występujące w uszkodzonych komórkach gospodarza, tzw. DAMPs (ang. damage-assosiated molecular patterns). Oprócz tego, do aktywacji układu oksydazy fenolowej może dojść w reakcji na obecność proteaz uwalnianych przez drobnoustroje, które powodują degradację białek gospodarza do krótkich fragmentów (tzw. protfrags) (Galko i Krasnow, 2004; Altincicek i Vilcinskas, 2006; Cerenius i in., 2008). Dokładny szlak molekularny układu PO wciąż nie jest do końca zdefiniowany, chociaż znaleziono szereg enzymów aktywujących proPO (Jiang i Kanost, 2000).

Fenoloksydaza występuje w hemolimfie owadów jako proenzym (nieaktywny zymogen), zwany profenoloksydazą (proPO). Masa cząsteczkowa proPO *G. mellonella* wynosi 300 kDa, a punkt izoelektryczny 6,2 (Kopacék i in., 1995). Metodą histochemiczną z użyciem L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny jako substratu dowiedziono, że proenzym PO *G. mellonella* znajduje się w enocytoidach oraz granulocytach (Schmit i in., 1977; Zdybicka-Barabas i in., 2014). Po uwolnieniu z hemocytów proPO prawdopodobnie jest modyfikowana potranslacyjnie i następnie jest transportowana przez naskórek, jak wykazano u *Bombyx mori* (Asano i Ashida, 2001a, 2001b; Cerenius i Söderhäll, 2004). ProPO jest aktywowana przez enzym aktywujący profenoloksydazę (PPAE, ang. *prophenoloxidase activating enzyme*), zależny od jonów wapnia, na drodze ograniczonej proteolizy.



Niekiedy do prawidłowego cięcia proPO do aktywnej oksydazy fenolowej konieczna jest obecność kofaktorów SPHs, homologów proteinaz serynowych, co wykazano w przypadku *M. sexta* (ryc.5; Rao i in., 2010). Do aktywacji proPO *G. mellonella* dochodzi w wyniku zakażeniu owadów, zarówno Gram-ujemną (*Legionella pneumophila* oraz *E. coli*), jak i Gram-dodatnią bakterią (*Listeria monocytogenes*), a także grzybem *A. oryzae* (Pye, 1974; Joyce i Gahan, 2010; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010; Harding i in., 2012; Zdybicka-Barabas i in., 2014). Istnieje także możliwość aktywacji proPO w warunkach *in vitro* bez proteolitycznego cięcia za pomocą różnych substancji chemicznych w zależności od gatunku owada. Do takich substancji zaliczany jest etanol, siarczan dodecylu sodu, chlorek cetylopirydyniowy, 2-propanol, chlorek dimetylobenzylometyloamoniowy (DBMA), Triton X-100 (Yamamoto i in., 2003; Hu i in., 2016; Luna-Acosta i in., 2017). Aktywację proPO mogą także powodować egzogenne proteazy, takie jak trypsyna i chymotrypsyna (Gonzales-Santovo i Coroba-Agilar, 2012; Luna-Acosta i in., 2017).

Aktywność układu oksydazy fenolowej jest ściśle regulowana z powodu dużej cytotoksyczności oraz reaktywności chinonów i innych związków pośrednich szlaku syntezy melaniny w stosunku do komórek pasożyta, mikroorganizmu, jak i gospodarza (Christensen i in., 2005; Cerenius i in., 2008; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010). W regulacji układu oksydazy fenolowej biorą udział m.in. wchodzące w skład układu PO inhibitory proteaz serynowych, inhibitory hamujące aktywność PO oraz białka hamujące melanizacje. U G. mellonella wraz z uwolnieniem proPO z hemocytów dochodzi do uwolnienia inhibitorów proteaz serynowych (serpin) regulujących działanie kaskady, zapobiegając w ten sposób przedwczesnej lub nadmiernej aktywacji (Daquinag i in., 1995; Cerenius i in., 2008; Zdybicka-Barabas i in., 2014). W regulację kaskady proPO oraz aktywność fenoloksydazy G. mellonella sa zaangażowane również białka hemolimfy, np. apolipoforyna III oraz Gm białko-24 (ang. Gm protein-24, Park i in., 2005). Niektóre drobnoustroje są wyspecjalizowane w zapobieganiu aktywacji proPO poprzez wytwarzanie inhibitorów lub innych czynników zakłócających proteolityczną aktywację profenoloksydazy (Daquinag i in., 1995; Cerenius i in., 2008; Zdybicka-Barabas i in., 2014).

Kaskady enzymów proteolitycznych odgrywają ważną rolę w reakcji odpornościowej owadów, ponieważ są indukowane znacznie szybciej niż odpowiedź
immunologiczna związana z ekspresją genów, czy odpowiedź komórkowa. Melanina jest zaangażowana w proces gojenia ran przez tworzenie wiązań kowalencyjnych w uszkodzonych tkankach, co skutkuje sklerotyzacją i twardnieniem oskórka. Ponadto melanina bierze udział w formowaniu noduli oraz enkapsulacji (Christensen i in., 2005; Cerenius i in., 2008; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010; Zdybicka-Barabas i in., 2014; Staczek i in., 2017). Wykazano, że po iniekcji grzybów nitkowatych do hemocelu gasienic G. mellonella dochodzi do aktywacji układu PO i wytworzenia melaniny, która bierze udział w melanizacji oskórka oraz w formowaniu noduli (Stączek i in., 2017). Ponadto oksydaza fenolowa pełni ważną funkcję w krzepnięciu hemolimfy G. mellonella. W 2011 roku wykorzystano reakcję in vitro krzepnięcia hemolimfy (pozbawionej komórek) do wyizolowania białek związanych z tym procesem u barciaka. W badanym materiale zidentyfikowano składniki kaskady aktywującej proPO, jak i systemu krzepnięcia. Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty wywnioskowano, że te dwie odpowiedzi współpracują razem, podczas tworzenia skrzepu (Bohn, 1986; Duvic i Brehélin, 1998; Li i in., 2002; Eleftherianos i Revenis, 2011).

1.9. Peptydy odpornościowe owadów

U zwierząt peptydy odpornościowe są uważane za pierwszą linię obrony, ponieważ biorą udział w hamowaniu rozwoju infekcji jeszcze przed rozwinięciem jej objawów. Sugeruje się, że w zależności od gatunku, owad wytwarza charakterystyczny zestaw peptydów przeciwdrobnoustrojowych różniących się właściwościami oraz mechanizmem działania, co wspomaga organizm w zwalczaniu różnorodnych patogenów (Hetru i in., 1998; Cytryńska, 2009).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs, ang. *antimicrobial peptides*) zwane peptydami odpornościowymi, to zwykle cząsteczki kationowe, co wiąże się z obecnością licznych reszt argininy oraz lizyny. Klasyczne AMPs mają zazwyczaj masy cząsteczkowe od 3 do 10 kDa. Obecnie do tej grupy zostały dołączone także białka i polipeptydy o znacznie większych masach cząsteczkowych (Otvos, 2002; Yuant i in., 2006; Mizerska-Dudka i in., 2011). Cechą charakterystyczną kationowych, owadzich peptydów jest to, że 50% domen składających się na peptyd ma charakter hydrofobowy oraz hydrofilowy, dzięki czemu mają zdolność do tworzenia amfipatycznych konformacji w kontakcie z membraną. Oprócz peptydów kationowych wyróżnia się również peptydy anionowe, których mechanizm działania jest nieznany i wymaga dalszych badań. Przypuszcza się, że peptydy anionowe hamują aktywność rybonukleaz i indukują tworzenie się agregatów w komórkach (flokulację). Peptydy anionowe bogate są zarówno w kwas asparaginowy, jaki i w kwas glutaminowy (Tang i in., 2008; Li i in., 2009; Mak i in., 2010; Baltzer i Brown, 2011; Zdybicka-Barabas i in. 2012; Yi i in. 2014; Mylonakis i in., 2016; Zdybicka-Barabas i in., 2017).

Owadzie peptydy przeciwdrobnoustrojowe, które syntetyzowane są w hemocytach oraz w ciele tłuszczowym (odpowiednik funkcjonalny wątroby u ssaków) wydzielane są do hemolimfy, gdzie biorą udział w systemowej odpowiedzi przeciw patogenom. Natomiast peptydy syntetyzowane w komórkach nabłonkowych uczestniczą w reakcjach miejscowych, obejmujących miejsce wtargnięcia drobnoustroju lub miejsce przerwania ciągłości warstwy okrywy ciała owada (Cytryńska, 2009). Niektóre peptydy są również eksprymowane w jelicie środkowym (Lehane i in., 1997; Lee i in., 2004). U bezkręgowców synteza peptydów może odbywać się konstytutywnie, ale może też być indukowana poprzez zranienie, czy zakażenie organizmu (Zdybicka-Barabas i in., 2017).

Biorąc pod uwagę sekwencję aminokwasową oraz strukturę przestrzenną cząsteczki, peptydy podzielono na 3 grupy, m. in. liniowe peptydy α-helikalne pozbawione reszt cysteiny (cekropiny, peptydy moricyno-podobne), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyny), peptydy o dużej zawartości reszt proliny (Gm peptydy bogate w prolinę-1 i -2) lub glicyny (gloweryny) (Cytryńska, 2009).

Mechanizm działania peptydów opiera się przede wszystkim na oddziaływaniu elektrostatycznym peptydu z powierzchnią błony komórkowej drobnoustroju. Kationowe peptydy przeciwbakteryjne najprawdopodobniej najpierw zostają przyciągnięte do ujemnie naładowanych składników występujących na zewnętrznej otoczce bakterii Gram-ujemnych, czyli do anionowych fosfolipidów i grup fosforanowych obecnych w lipopolisacharydzie (LPS). U bakterii Gramdodatnich takim miejscem są kwasy tejchojowe znajdujące się na powierzchni drobnoustroju. W przypadku bakterii Gram-ujemnych peptyd w celu interakcji 37 pomiędzy peptydem a lipidowymi składnikami błony zewnętrznej (LPS), przemieszcza się jedynie przez polisacharydową otoczkę. U bakterii Gram-dodatnich zanim peptyd zacznie wchodzić w interakcje z błoną cytoplazmatyczną przechodzi nie tylko przez polisacharydową otoczkę, ale także przez kwasy tejchojowe i lipotejchojowe. Jeżeli stosunek ilości peptydów do lipidów jest mały to peptydy ustawiają się równolegle do błony, a gdy ilość peptydów się zwiększa to ustawiają się do niej prostopadle. Następnie ma miejsce wstawienie peptydu do błony cytoplazmatycznej oraz utworzenie pora. Dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błony (permeabilizacja) oraz powstawania licznych pęknięć, które ostatecznie prowadzą do lizy komórek drobnoustroju (Brogden, 2005).

Według modelu dywanowego (ang. *carpet model*), zaproponowanego przez Shai (Gazit i in., 1996). Peptydy kumulują się na powierzchni błony komórkowej układając się równolegle do jej płaszczyzny. Po czym są przyciągane elektrostatycznie do anionowych głów fosfolipidów, powodując ścisłe przykrycie błony w sposób podobny do dywanu. Po osiągnięciu stężenia progowego peptydy przyczyniają się do destabilizacji membrany, zmniejszenia potencjału błonowego i uwolnienia elementów składowych cytoplazmy na zewnątrz komórki bakteryjnej. W wyniku zerwania wiązań lipidowych dochodzi do naruszenia warstwy lipidowej i utworzenia miceli, zawierającej fragmenty błony lipidowej (Ostolaza i in., 1993; Brogden, 2005; Mizerska-Dudka i in., 2011; Janiszewska, 2014).

W modelu pierścieniowym (ang. *toroidal model*) peptydy agregują i indukują błonę do zginania się, aż do momentu utworzenia pora (Ludtke i in., 1996; Huang i in., 2004; Qian i in., 2008; Wimley i Hristova, 2011). Hydrofilowe regiony peptydów oddziałują z resztami fosfolipidowymi błony, a regiony hydrofobowe z lipidami. Wnętrze pora wyściela błona komórkowa (Jenssen i in., 2006; Mizerska-Dudka i in., 2011).

Model klepek beczki (ang. *barrel-stave model*) został zaproponowany przez Rapaport i Shai w 1991 roku (Wimley i Hristova, 2011). W tym modelu przyłączone peptydy agregują i wbudowują się prostopadle do błony komórkowej. Peptydy te ściśle przylegają do siebie tak, że regiony hydrofobowe peptydu asocjują z lipidami błonowymi, a regiony hydrofilowe peptydu skierowane są do światła uformowanego kanału (Brogden, 2005; Mizerska-Dudka i in., 2011). W badaniach wykazano, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów odpornościowych może być związana z zaburzeniem różnych istotnych procesów komórkowych, np. replikacji, transkrypcji i translacji (Nguyen i in., 2011). Ponadto niektóre peptydy mogą być zaangażowane w hamowanie procesu tworzenia przez bakterie biofilmu, redukując jego masę o połowę w porównaniu do kontroli. Takie właściwości sprzyjają ich interakcjom z ujemnie naładowanymi lipofilowymi membranami komórek bakteryjnych i w konsekwencji bezpośredniej destrukcji mikroorganizmów.

Owadzie peptydy wykazują szerokie spektrum działania, przeciw bakteriom, wirusom, grzybom oraz pasożytom. Biorą również udział w wiązaniu i neutralizowaniu endotoksyn oraz immunomodulacji poprzez wywoływanie migracji, proliferacji komórek, a także mogą wywołać uwalnianie cytokin i chemokin (Kruse i Kristensen, 2008; Mylonakis i in., 2016). Co więcej, peptydy odpornościowe posiadają zdolność do stymulacji procesu gojenia ran, a także ochrony organizmu przed degradacją tkanek, poprzez hamowanie aktywności enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy (Boman, 2003; Hancock i Diamond, 2000). Peptydy odpornościowe mogą także powodować aktywację fosfolipaz degradujących fosfolipidy błony komórkowej oraz aktywować autolizyny (Brogden, 2005). Niektóre peptydy charakteryzują się działaniem przeciwnowotworowym, z czym wiąże się duże nadzieje, gdyż mogą wykazywać mniej skutków ubocznych od dotychczas stosowanych substancji (Józefiak i Engberg, 2017).

Owadzie peptydy odpornościowe posiadają duży potencjał do zastosowania ich w medycynie. Zaletą ich jest mały rozmiar, szybkość działania, szerokie spektrum działania wobec bakterii oraz małe prawdopodobieństwo rozwinięcia oporności drobnoustroju (Hancock i Sahl, 2006; Peschel i Sahl, 2006; Wimley i Hristova, 2011). Peptydy nie mogą być przyjmowane doustnie, jednak wciąż mogą być podawane miejscowo lub poprzez iniekcję (Wimley i Hristova, 2011). Co ciekawe naukowcy sugerują, że znakowane radioizotopem peptydy odpornościowe, podczas tomografii komputerowej mogą uwidaczniać skupiska bakteryjne, świadczące o rozwoju stanu zapalnego (Kamysz i in., 2005; Janiszewska, 2014). Peptydy odpornościowe mogą być stosowane zamiast antybiotyków w ektopowych terapiach oraz w połączeniu z antybiotykiem, w celu przywrócenia podatności szczepów wielolekoopornych patogenów. Dodatkowo peptydy mogą służyć jako szablony do projektowania peptydomimetyków (Mylonakis i in., 2016). Co więcej, mogą być również stosowane jako immunomodulatory, czy też jako czynniki neutralizujące endotoksyny (Marr i in., 2006). Peptydy owadzie są badane również pod kątem zastosowania ich jako związków przeciwpasożytniczych, ponieważ owady dysponują mechanizmami nabytymi w procesie ewolucji przezwyciężającymi infekcje pasożytnicze (Pretzel i in., 2013).

Przy wprowadzaniu peptydów do przemysłu można napotkać liczne ograniczenia, m. in. potrzebne są duże ilości peptydów do badań wstępnych, co wiąże się ze znacznym nakładem finansowym przeznaczonym na ich produkcję. Dzięki poznaniu mechanizmu działania peptydów byłoby możliwe zaprojektowanie cząsteczek charakteryzujących się silnym działaniem, prostą budową i krótką sekwencją, co znacznie obniżyłoby koszty produkcji. Ponadto istotna kwestia jest stabilność peptydów (szczególnie linearnych), ponieważ często proteazy gospodarza mogą przeprowadzać ich proteolizę. Kolejnym utrudnieniem jest aktywność przeciwbakteryjna peptydów W komórkach bakterii, podczas produkcji heterologicznej, co skutkuje niepoprawnym fałdowaniem peptydów i zaburzeniem ich funkcji (Mylonakis i in., 2016; Wimley i Hristova, 2011). Dodatkowo brak parametryzacji ważnych czynników regulujących i determinujących aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych utrudnia ich racjonalne projektowanie (Wimley i Hristova, 2011). Obecnie nie ma danych potwierdzających korelację struktury peptydów odpornościowych, a ich mechanizmem działania i poziomem aktywności (Bahar i Ren, 2013; Jenssen i in., 2006). Również do wdrożenia peptydów konieczne jest poznanie ich struktury drugorzędowej, co pozwoli na określenie ich funkcji i mechanizmu działania (Gottler i Ramamoorthy, 2009). Kolejnymi ograniczeniami, na które należy zwrócić uwage jest toksyczność w stosunku do ssaczych komórek oraz możliwość wywoływania alergii (Hancock i Sahl, 2006; Baltzer i Brown, 2011). Mniejsze peptydy wykazują niższą toksyczność w stosunku do komórek eukariotycznych, są bardziej stabilne oraz charakteryzują się większą aktywnością, co potencjalnie również obniża koszty produkcji. W celu poprawienia stabilności i zmniejszenia toksyczności rozważa się podawanie peptydów zamkniętych w liposomach w wyniku procesu enkapsulacji (McPhee i in., 2005).

1.10. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe G. mellonella

System odpornościowy *G. mellonella* jest zdolny do odróżniania różnych klas drobnoustrojów. W immunizowanej hemolimfie gąsienic barciaka większego *G. mellonella* zidentyfikowano kilkanaście peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Oczyszczone peptydy były badane pod kątem ich aktywności skierowanej przeciw bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, a także przeciw drożdżom i grzybom nitkowatym. Zaobserwowano, że peptydy odpornościowe syntetyzowane przez barciaka różnią się pI, sekwencją aminokwasów i aktywnością, co sugeruje złożoność odpowiedzi odpornościowej u tego owada (Cytryńska i in., 2007).

Gallerimycyna, czyli peptyd defensyno-podobny wykazuje podobieństwo do dwóch peptydów przeciwgrzybiczych, tj. do drosomycyny *D. melanogaster* oraz heliomycyny *Heliothis virescens*. Rekombinowany peptyd gallerimycyny wykazuje aktywność przeciw grzybowi *Metarhizium anisopliae*, ale nie wykryto aktywności skierowanej w stosunku do drożdży oraz bakterii (Schuhmann i in., 2003). Ekspresja tego peptydu zwiększa się w ciele tłuszczowym owada po immunizacji *C. albicans*, *B. bassiana*, a także w wyniku rozpoznania LPS (Schuhmann i in., 2003; Bergin i in., 2006; Wojda i in., 2009).

Galiomycyna (Gm defensyna) o masie cząsteczkowej 4,7 kDa, była po raz pierwszy oczyszczona przez Lee i współpracowników w 2004 roku z hemolimfy gąsienic *G. mellonella* immunizowanych Gram-ujemną bakterią *E. coli*. Peptyd ten składa się z 43 reszt aminokwasów, w tym z 6 cystein. Co ciekawe, ekspresja galiomycyny zwiększała się, nie tylko w ciele tłuszczowym, ale także w jelicie środkowym (Lee i in., 2004; Zdybicka-Barabas i in., 2017). Dodatkowo ekspresja peptydu zwiększa się pod wpływem B. *bassiana* oraz *C. albicans* (Bergin i in., 2006; Wojda i in., 2009). Badania *in vitro* ujawniły jej aktywność przeciw grzybom nitkowatym, drożdżom oraz niektórym bakteriom (Lee i in., 2004; Bergin i in., 2006; Cytryńska i in., 2007). Pierwotna struktura peptydu wykazuje około 90,7% podobieństwa do wspomnianej już heliomicyny *H. virescens* (Lee i in., 2004; Zdybicka-Barabas i in., 2017).

U G. mellonella opisano dwie cekropiny, zasadową cekropinę A o masie cząsteczkowej 4, 16 kDa i pI 10,38, a także neutralną cekropinę D o masie 4,2 kDa

i pI 6,47. Cekropina A została wykryta w hemolimfie po zakażeniu owadów bakteriami *E. coli*. Udowodniono, że peptyd ten syntetyzowany jest w formie prepropeptydu, a dojrzała cząsteczka składa się z 37 reszt aminokwasów. Cekropina ta jest aktywna przeciw Gram-ujemnej bakterii *E. coli*, Gram-dodatniej bakterii *B. subtilis* oraz grzybowi *A. niger* (Kim i in., 2004; Cytryńska i in., 2007). Cekropina D (peptyd cekropino-D-podobny) wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec licznych bakterii, zarówno Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także działa przeciw *A. niger* (Cytryńska i in., 2007; Zdybicka-Barabas i in., 2019). Niedawno wykazano, że cekropina D *G. mellonella* bardzo szybko wiąże się z komórkami *E. coli*. Oddziałuje głównie z LPS bakterii, ale przypuszczalnie także z innymi składnikami lipidowymi otoczek bakterii. Pod wpływem peptydu obserwowano efekt uporządkowania się łańcuchów lipidowych. Interakcja z peptydem powodowała zmianę w topografii komórek, permeabilizację błony komórkowej *E. coli* oraz skutkowała uszkodzeniami wewnątrzkomórkowymi (Zdybicka-Barabas i in., 2019).

Gm peptyd bogaty w prolinę-1 o masie cząsteczkowej 4,3 kDa zawiera w swojej strukturze pięć reszt proliny (13,5%), a Gm peptyd bogaty w prolinę-2 o masie 4,9 kDa ma ich więcej (26,2%). Przy czym peptyd bogaty w prolinę-2 ma unikalną sekwencję aminokwasową, dlatego też nie znaleziono jego homologów. Owadzie peptydy bogate w prolinę zwykle zawierają charakterystyczny dla krótkołańcuchowych peptydów tej grupy motyw typu PRP, którego brak u tych peptydów. Jednak można je zaklasyfikować do długołańcuchowych, gdyż zawierają motyw PR oraz KP. Gm peptydy prolinowe wykazują aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich oraz wobec grzybów (Casteels, 1998; Bulet i in., 1999; Mak i in., 2001; Cytryńska i in., 2007). Na podstawie teoretycznego punktu izoelektrycznego stwierdzono, że peptyd bogaty w prolinę-1 (pI 11,0) i bogaty w prolinę-2 (pI 9,97) mogą należeć do peptydów kationowych (Cytryńska i in., 2007).

Po raz pierwszy moricynę wyizolowano z hemolimfy gąsienic *Bombyx mori* (Zdybicka-Barabas i in., 2017). U barciaka większego odkryto 8 genów kodujących 7 różnych peptydów moricyno-podobnych. Peptydy te działają zwłaszcza przeciw grzybom nitkowatym. Dodatkowo w mniejszym stopniu przeciw drożdżom oraz bakteriom (Brown i in., 2008; Wojda, 2017). Pośród transkryptów tego owada zidentyfikowano 5 gloweryn indukowanych immunologicznie (Vogel i in., 2011;

Wojda, 2017). Warto podkreślić, że gloweryny i moricyny zostały zidentyfikowane jedynie u *Lepidoptera* (Yi i in., 2014).

Oprócz peptydów kationowych u *Galleria* zidentyfikowano peptydy anionowe. Gm peptyd anionowy-1, o masie cząsteczkowej 4,8 kDa i punkcie izoelektrycznym 4,51, zawiera w swojej strukturze 5 reszt proliny (11,9%). Natomiast Gm peptyd anionowy-2 ma masę cząsteczkowa 6,9 kDa, a jego pI wynosi 4,79. Wymienione peptydy są aktywne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich oraz grzybów (Mak i in., 2001; Lee i in., 2004; Cytryńska i in., 2007; Brown i in., 2008 Nguyen i in., 2011). W badaniach opublikowanych w 2012 roku zauważono, że peptyd anionowy-2 jest syntetyzowany konstytutywnie na bardzo wysokim poziomie (10-12 μ M), jednak wykazuje niską aktywność przeciwbakteryjną. Udowodniono, że peptyd anionowy-2 i lizozym mogą działać synergistycznie wobec bakterii Gram-ujemnych. Dzięki tym czynnikom immunologicznym występującym w hemolimfie, gąsienice są chronione przed zakażeniem wywołanym przez bakterie Gram-ujemne we wczesnych etapach infekcji (Zdybicka-Barabas i in., 2012).

Gm apolipoforycyna to C-końcowy fragment apolipoforyny III, o masie cząsteczkowej 5,7 kDa i pI 9,6. Spośród badanych patogenów peptyd ten hamuje w niewielkim stopniu wzrost jednej bakterii (*L. monocytogenes*). Może to sugerować, że peptyd ten nie bierze udziału w bezpośrednim zabijaniu drobnoustrojów.

Wiele z opisanych peptydów jest wykrytych jedynie na poziomie peptydu, bez identyfikacji ich transkryptów. Dotyczy to apolipoforycyny, peptydu anionowego-1, peptydu heliocyno-podobnego oraz peptydu cekropino-D-podobnego (Cytryńska i in., 2007; Brown i in., 2009; Mak i in., 2010; Wojda, 2017).

1.11. Apolipoforyna III

Jednym z ważnych składników odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* jest apolipoforyna III (apoLp-III), która występuje w dużym stężeniu w hemolimfie owada. Białko należy do rodziny wymiennych apolipoprotein opisanych zarówno u kręgowców, jaki u bezkręgowców. Cechą wspólną tych białek jest obecność w strukturze cząsteczki amfipatycznych α -helis (Narayanaswami i Ryan, 2000).

Apolipoforyna III jest białkiem termostabilnym, rozpuszczalnym w wodzie, o masie cząsteczkowej od 17 do 20 kDa w zależności od gatunku owada. U *G. mellonella* zidentyfikowano ją zarówno na poziomie genowym, jak i białkowym (Niere i in., 1999, 2001). ApoLp-III *G. mellonella*, o masie około 18 kDa, występuje w trzech izoformach różniących się wartościami punktu izoelektrycznego, ale o bardzo zbliżonych masach cząsteczkowych (Chino i Yazawa, 1986; Van der Horst i in., 1991; Wiesner i in., 1997; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011, 2013). Apolipoforyny owadów są homologiczne pod względem strukturalnym i funkcjonalnym z ssaczą apolipoproteiną E (apo E), która wchodzi w skład LDL (lipoprotein o niskiej gęstości) (Wiesner i in., 1997; Whitten i in., 2001; Andrejko i in., 2005).

Apolipoforyna III owadów jest białkiem wielofunkcyjnym i występuje w dwóch różnych stanach konformacyjnych, tj. postaci globularnej (nie związanej z lipidami) oraz formie związanej z lipidami (Dettloff i in., 2001; Whitten i in., 2004). W 1997 roku zauważono, że zmiana konformacji apoLp-III może stanowić sygnał do aktywacji odpowiedzi odpornościowej lub jej wzmocnienia (Wiesner i in., 1997). Zasugerowano także, że białko to przyczynia się do odpowiedzi odpornościowej owada tylko po utworzeniu kompleksu z lipidem (Halwani i in., 2001). Co więcej, apolipoforyna III uczestniczy w metabolizmie lipidów, a związane jest to z tym, że wraz lipoforyną, która zaangażowana jest w transport lipidów w hemolimfie owadów, tworzy kompleks LDL. Po przyłączeniu się do wspomnianego kompleksu diacylogricelolu (pochodzącego z ciała tłuszczowego), jest on transportowany do mięśni, gdzie ulega hydrolizie do wolnych kwasów tłuszczowych (Wiesner i in., 1997; Niere i in., 2001; Weers i Ryan, 2006). Oba procesy, transport lipidów i reakcje odpornościowe, w których uczestniczy apoLp-III są ze sobą powiązane i konkurują o białko (Adamo i in., 2007; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013).

Ponadto uważa się, że apoLp-III jest jednym z receptorów rozpoznających molekularne determinanty patogenów (PRRs), czyli ma zdolność wiązania się do składników powierzchniowych ściany komórkowej drobnoustrojów, takich jak LPS, kwasy lipotejchojowe (LTA) oraz β -1,3-glukan. Cecha ta wskazuje na jej udział w opsonizacji i detoksykacji toksyn patogenów (Halwani i in., 2000; Whitten i in., 2004; Leon i in., 2006; Ma i in., 2006). ApoLp-III bierze udział w odpowiedzi komórkowej poprzez oddziaływanie, zarówno z powierzchnią komórek

drobnoustrojów, jak i z powierzchnią hemocytów (granulocytów i plazmatocytów) modyfikując ich właściwości adhezyjne, co może wpływać na przebieg procesu fagocytozy (Wiesner i in., 1997; Whitten i in. 2004; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013).

ApoLp-III uznawana jest za cząsteczkę "sygnałową", ponieważ uczestniczy w przekazywaniu informacji o infekcji w organizmie. ApoLp-III G. *mellonella* ma zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi uwalnianymi z uszkodzonych komórek i tkanek. Po połączeniu zewnątrzkomórkowe kwasy nukleinowe są sygnałem zagrożenia w reakcjach obronnych owadów dla ochrony przed zainfekowaniem organizmu bakteriami (Altancicek i in., 2008).

Ponadto apoLp-III odpowiada za indukcję ekspresji peptydów i białek odpornościowych. Stymuluje ich aktywność przeciwdrobnoustrojową, uczestniczy w regulacji krzepnięcia hemolimfy oraz działania układu oksydazy fenolowej. W obecności apoLp-III wzrasta aktywność muramidazy lizozymu oraz wzmagana jest aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy gąsienic *G. mellonella* (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013). Warto wspomnieć, że apoLp-III *G. mellonella* zwiększa aktywność lityczną EWL przeciw *Micrococcus luteus*, a także aktywność syntetycznej cekropiny A wobec Gram-ujemnej bakterii *E. coli* (Halwani i Dunphy, 1999; Park i in., 2005; Cytryńska i in., 2007).

1.12. Lizozym

Owadzi lizozym (EC 3.2.1.17) po raz pierwszy zidentyfikowany u pszczoły miodnej (Mohrig i Messner, 1968; Kanost i in., 1990) należy zwykle do typu c podobnie jak lizozym białka jaja kurzego, rzadko do typu i, który również występuje u bezkręgowców (Hultmark, 1996; Sowa-Jasiłek i in., 2016). Białko to odgrywa ważną rolę w układzie odpornościowym zarówno kręgowców, jak i bezkręgowców, szczególnie u motyli (Lepidoptera), m. in. u *G. mellonella*, *H. cecropia* oraz *M. sexta*, (Chadwick i Aston, 1991; Hultmark, 1996; Cytryńska i in., 2007). U Lepidoptera lizozym jest obecny w hemolimfie na niskim poziomie, natomiast po immunizacji bakteriami lub grzybami jego poziom oraz aktywność wyraźnie wzrasta (Cytryńska i in., 2007; Mak i in., 2010; Sowa-Jasiłek i in., 2014).

Lizozym G. mellonella (14,03 kDa; pI 9,28) występuje konstytutywnie w hemolimfie na poziomie 0,76 μ M (± 0,17), a po immunizacji owadów bakteriami E. coli wzrasta do 4,41 µM. Lizozym ten zawiera 121 aminokwasów i wykazuje aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich oraz stosunkowo niska aktywność wobec wybranych bakterii Gram-ujemnych, np. E. coli, Salmonella paratyphi, S. choleraesuis (Yu i in., 2002; Mak i in., 2010; Zdybicka-Barabas i in., 2012; Sowa-Jasiłek, 2014). Działanie przeciwbakteryjne lizozymu jest związane z enzymatyczną aktywnością muramidazy i polega na hydrolizie wiązania β-1,4-glikozydowego obecnego w peptydoglikanie ściany komórkowej bakterii, pomiędzy kwasem N-acetylomuraminowym i N-acetyloglukozaminą (GlcNAc), co prowadzi do lizy bakterii. Ponadto działanie skierowane przeciw bakteriom może wiązać się z aktywnością nieenzymatyczną lizozymu, która podobna jest do aktywności kationowych peptydów odpornościowych (Cytryńska, 2007; Sowa-Jasiłek, 2014). Opisano także działanie przeciwgrzybicze lizozymu G. mellonella przeciw Saccharomyces cerevisiae oraz C. albicans (Sowa-Jasiłek, 2014). Sugeruje się, że działanie przeciwgrzybowe wynika z bezpośredniego wiązania się lizozymu do mannanów obecnych w ścianie komórkowej drożdży, co prowadzi do zmniejszenia ich żywotności oraz do aktywacji lub rozregulowania enzymów autolitycznych grzybów (Marquis i in., 1982, 1991, 1993; Nishiyama i in., 2001; Sowa-Jasiłek i in., 2016). Ponadto u owadów lizozym zaangażowany jest w aktywację szlaku Toll oraz układu oksydazy fenolowej (Park i in., 2007; Freitak i in., 2007; Povey i in., 2009; Cotter i in., 2008; Rao i in., 2010).

1.13. Indukowalny inhibitor metaloproteinaz

Indukowalny inhibitor metalopeptydaz (*G. mellonella*) (nr I08.006 w bazie MEROPS) znany także pod skrótem IMPI, czy też jako indukowalny inhibitor metaloproteinaz (*G. mellonella*) lub owadzi inhibitor metalopeptydaz ma masę cząsteczkową 8,36 kDa i należy do klanu IA, do rodziny I8 (zawierającej inhibitory serynowych i metaloendopeptydaz). Jest cząsteczką odporną na działanie temperatury. IMPI został zidentyfikowany u barciaka większego w 1998 roku przez Wedde i współpracowników (Wedde i in., 1998). Obecnie jest jedynym specyficznym inhibitorem metaloproteinaz drobnoustrojów, opisanym u zwierząt. Hamuje działanie

termolizyny, bacillolizyny, pseudolizyny oraz ludzkie metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP1 oraz MMP3, www.uniprot.org).

W 2004 w wyniku badań potwierdzono, że podczas humoralnej odpowiedzi odpornościowej gąsienic *G. mellonella* dochodzi do indukcji ekspresji IMPI. Uzyskana sekwencja IMPI nie wykazywała podobieństwa do sekwencji inhibitorów tkankowych metaloproteinaz (TIMPs) lub innych naturalnych inhibitorów metaloproteinaz. Natomiast rekombinowany IMPI swoiście hamował metaloproteazy termolizyno-podobne, ale nie metaloproteinazy macierzy. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki stwierdzono, że IMPI jest nowym typem białka immunologicznego, które jest indukowane podczas humoralnej odpowiedzi odpornościowej barciak większego. Jego działanie ma na celu inaktywację wydzielanych przez drobnoustroje metaloproteaz termolizyno-podobnych (Wedde i in., 1998; Clermont i in., 2004).

2. CELE PRACY

Uruchomienie humoralnych reakcji odpornościowych gospodarza ma na celu przezwyciężenie infekcji. Do takich procesów u bezkręgowców zalicza się m.in. aktywację układu oksydazy fenolowej oraz indukcję syntezy peptydów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. U owadów peptydy syntetyzowane są głównie w ciele tłuszczowym i hemocytach, skąd w dalszym etapie uwalniane są do hemolimfy, gdzie biorą udział w systemowej odpowiedzi odpornościowej organizmu. Stwierdzono, że po zakażeniu gąsienic *G. mellonella* różnymi bakteriami i grzybami obserwowane są różnice w zestawie peptydów i kinetyce ich pojawiania się w hemolimfie (Mak i in., 2010). W ostatnich latach gąsienice *G. mellonella* są z powodzeniem stosowane jako model badawczy w badaniach patogenności i czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka w tym, bakterii *P. aeruginosa*.

Badania *in vivo* realizowane w Zakładzie Immunobiologii dowiodły, że zakażenie gąsienic bakteriami *Pseudomonas* powoduje indukcję syntezy peptydów odpornościowych, podobnie jak iniekcja do hemocelu owada komórek bakterii saprofitycznej *E. coli*. Ponadto zaobserwowano, że szczepy *Pseudomonas* charakteryzujące się odmiennym profilem enzymów proteolitycznych wywołują zróżnicowaną reakcję układu odpornościowego *G. mellonella* na infekcję (Andrejko i in., 2014).

Podjęte badania przedstawione w niniejszej pracy, stanowiące kontynuację wcześniejszych wstępnych doświadczeń, miały na celu prześledzenie wybranych aspektów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella* po zakażeniu gąsienic dwoma szczepami bakterii *P. aeruginosa* (entomopatogennym oraz izolatem klinicznym) oraz po iniekcji do hemocelu bakteryjnego czynnika wirulencji – alkalicznej proteazy (aeruginolizyny).

Celem niniejszej pracy było:

• przeanalizowanie poziomu (analiza ilościowa) oraz zidentyfikowanie (analiza jakościowa) peptydów przeciwdrobnoustrojowych pojawiających się w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych badanymi szczepami *P. aeruginosa*, z uwzględnieniem badań porównawczych aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz profili białkowo-peptydowych hemolimfy zakażonych gąsienic.

 prześledzenie humoralnych reakcji odpornościowych owada w odpowiedzi na iniekcję niewielkiej dawki proteazy alkalicznej jako induktora odpowiedzi immunologicznej. Wśród analizowanych parametrów hemolimfy należy wymienić: aktywność przeciwdrobnoustrojową, aktywność układu oksydazy fenolowej w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*, profil białkowo-peptydowy oraz identyfikację peptydów/białek odpornościowych.

3. MATERIAŁY I METODY STOSOWANE W BADANIACH

3.1. Stosowane odczynniki

Odczynniki i materiały	Producent
akrylamid, albumina surowicy wołowej (bovine serum albumin),	Sigma-Aldrich,
amfoterycyna B, barwnik Coomasie Brilliant Blue G, BCIP (5-bromo-4-	Niemcy, Stany Ziednoczone
chloro-3-indolilofosforan), cekropina B, CHAPS (C32H58N2O7S), chlorek	Zjeunoczone
magnezu (MgCl ₂), chlorek wapnia (CaCl ₂), dichlorometan (CH ₂ Cl ₂), DMF	
(N,N-dimetyloformamid), EDTA (edetic acid), jodoacetamid (C2H4INO),	
ksylen (C ₈ H ₁₀), kolumna chromatograficzna (Discovery Bio Wide Pore	
C18 300A), L-DOPA (L-3,4-dihydroksyfenyloalanina), liofilizat	
Micrococcus lysodeikticus ATCC 4698, lizozym białka jaja kurzego (EWL,	
egg white lyzozyme), n-heksan (C ₆ H ₁₄), octan etylu (C4H8O2), przeciwciała	
antykrólicze sprzęgnięte z alkaliczną fosfatazą (Anti-Rabbit IgG (whole	
molecule) – Alkaline Phosphatase), siarczan streptomycyny (streptomycin	
sulfate salt), strzykawka Hamilton®, TFA (trifluoroacetic acid, C2HF3O2),	
Tris (ang. <i>Trizma</i> ® <i>hydrochloride</i>), trycyna (C ₆ H ₁₃ NO ₅),	
alkohol etylowy (C2H5OH), błękit bromofenolowy (C19H10O5Br4S),	POCh S.A., Polska
diwodorofosforan (V) potasu (KH2PO4), diwodorofosforan (V) sodu	
(NaH2PO4), wodofosforan di-sodu (Na2HPO4), glicerol (CH2OH-CHOH-	
CH2OH), kwas solny (HCl), metanol (CH3OH), siarczan amonu (NH4)2SO4,	
glutaminian sodu	
bis-akrylamid (N,N'-metyleno-bis-akrylamid), SDS (dodecylosiarczan sodu),	MP Biomedicals,
nadsiarczan amonu ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Francja
membrany PVDF Immobilon®-P, Triton® X-100	Merck-Millipore,
	Niemcy
bibuła Whatman, DE52 Whatman (diethyloaminoethylo cellulose)	GE Healthcare
	Life Sciences, UK
błękit Coomasie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250), N-	Fluka, Szwajcaria
fenylotiomocznik (C7H8N2S), chlorek amonu (NH4Cl)	
chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), glicyna (kwas aminooctowy,	Firma Chempur,
$C_2H_5NO_2$), kwas octowy (CH ₃ COOH), mocznik (CH ₄ N ₂ O), sacharoza	Polska
$(C_{12}H_{22}O_{11})$	
agar bakteriologiczny	BTL Spółka z o.o.,
	Polska
amfolity (Bio-Lyte® 6/8 Ampholyte), białka markerowe Polypeptide SDS-	Bio-Rad, Stany
PAGE Molecular Weight Standards Low Range, białka markerowe Precision	Zjednoczone
Plus Protein Standards All Blue, odczynnik Bradford (Bio-Rad Protein Assay	

Dye Reagent Concentrate), olej mineralny, żele do ogniskowania	
izoelektrycznego (ReadyStrip™ IPG Strips)	
NBT (chlorek nitrobłękitu tetrazolowego)	Biomol GmbH,
	Niemcy
pożywka LB	BIOCORP Spółka
	z o.o., Polska
TEMED (N,N,N',N'-tetrametylo-etylenodiamina)	Thermo Fisher
	Scientific, Stany
	Zjednoczone
2-merkaptoetanol	MP Biomedicals,
	Francja

3.2. Stosowane bufory

Bufor do równoważenia I:

- 0,375 M Tris-HCl pH 8,8
- 6 M mocznik
- 20% glicerol
- 2% SDS
- 0,13M DTT

Bufor do równoważenia II:

- 0,135 M jodoacetamid
- 0,375 M Tris-HCl pH 8,8
- 6 M mocznik
- 20% glicerol
- 2% SDS

Bufor do żelu (elektroforeza trycynowa):

- 3M Tris-HCl pH 8,45
- 0,3% SDS

Bufor elektrodowy do elektroforezy glicynowej:

• 1,44% glicyna

- 0,3% Tris
- 0,1% SDS

Bufor elektrodowy do elektroforezy natywnej/ do transferu:

- 25 mM Tris
- 192 mM glicyna

Bufor fosforanowy pH 6,5:

- 50 mM Na₂HPO₄
- 50 mM NaH₂PO₄

Bufor katodowy:

- 0,1M Tris-HCl pH 8,3
- 0,1% SDS
- 0,1M trycyna

Bufor próbkowy redukujący do elektroforezy glicynowej:

- 125 mM bufor Tris-HCl pH 6,5
- 20% glicerol
- 4% SDS
- 3% DTT
- 0,002% błękit bromofenolowy

Bufor próbkowy nieredukujący (do zymografii):

- 125 mM Tris-HCl pH 65
- 20% glicerol
- 4% SDS
- 0,16% błękit bromofenolowy

Bufor próbkowy do elektroforezy trycynowej:

- 50 mM Tris-HCl pH 6,8
- 12% glicerol

- 4% SDS
- 2% 2-merkaptoetanol
- 0,01% Coomasie Brilliant Blue G

Bufor Sörrensena:

- 66 mM Na₂HPO₄
- 66 mM KH₂PO₄

Bufor TBS:

- 10 mM Tris-HCl pH 7,4
- 0,9% NaCl

3.3. Drobnoustroje użyte w doświadczeniach

- bakterie *P. aeruginosa* ATCC 27853 (szczep entomopatogenny) pochodzące z kolekcji drobnoustrojów Zakładu Immunobiologii UMCS Lublin,
- bakterie *P. aeruginosa* 02/18 (szczep kliniczny) z Departamentu Mikrobiologii i Epidemiologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie,
- bakterie *E. coli* K12, szczep D31 streptomycyno- i ampicylino-oporny (CGSC565, *E. coli* Genetic Stock Centre, New Haven, Stany Zjednoczone, Boman i in., 1974),
- bakterie *B. circulans* ATCC 61 pochodzące z kolekcji drobnoustrojów Zakładu Immunobiologii UMCS Lublin,
- grzyb A. niger 71 pochodzący z kolekcji drobnoustrojów Zakładu Immunobiologii UMCS Lublin.

3.4. Metody stosowane w badaniach

3.4.1. Hodowla owadów

Modelem doświadczalnym stosowanym w badaniach odpowiedzi immunologicznej były gąsienice barciaka większego *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), które pochodziły z hodowli prowadzonej w Zakładzie Immunobiologii w sposób ciągły, w ściśle kontrolowanych warunkach. Larwy barciaka większego hodowano w termostatach w temperaturze 28 °C, w ciemności, przy wilgotności powietrza wynoszącej 60-80%, na plastrach pszczelich pozbawionych miodu i czerwi (woszczynie pszczelej). W doświadczeniach stosowano larwy z siódmego stadium wylinkowego o wadze 250-300 mg.

3.4.2. Podłoża do hodowli drobnoustrojów

Podłoże Luria-Bertani Broth (LB) stosowane do hodowli bakterii przygotowywano zgodnie z zaleceniami producenta. Podłoże LB rozpuszczano w wodzie dejonizowanej (20 g/ l), rozlewano po 5 ml do probówek i jałowiono przez 15 minut w 121°C. W pożywce źródłem azotu, węgla, siarki, składników mineralnych i witamin potrzebnych do wzrostu bakterii był pepton kazeinowy (trypton 10g/l) oraz

ekstrakt drożdżowy (5 g/l). Natomiast odpowiednie stężenie elektrolitów zapewniał chlorek sodu (5g/l). Bakterie namnażano w pożywce LB w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przy 120 rpm.

Pożywka minimalna (M9) składa się z minimalnej ilości soli, która może być suplementowana dodatkowymi źródłami węgla i aminokwasów. Do wzrostu bakterii *Pseudomonas* stosowano pożywkę zawierającą minerały Na₂HPO₄ (0,04 M), KH₂PO₄ (0,02 M), NaCl (0,008 M) oraz NH₄Cl (0,02 M). Dodatkowo pożywkę wzbogacano glutaminianem sodu (0,13 M), chlorkiem wapnia (0,01 M) oraz glicerolem (0,1 M). Składniki pożywki poddawano sterylizacji przez 30 minut w 121°C za pomocą autoklawu. Bakterie hodowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przy 120 rpm.

Do badania aktywności przeciwgrzybowej hemolimfy owadów za pomocą metody dyfuzyjnej stosowano podłoże PDA. Do utartych ziemniaków (50g) dodawano 11 wody dejonizowanej i otrzymany roztwór jałowiono przez 30 min w temperaturze 121°C w autoklawie. Następnie po przefiltrowaniu przez gazę dodawano glukozę (5g/l) oraz agar (1,6%), po czym ponownie poddawano sterylizacji. Na koniec przygotowywano skosy w próbówkach szklanych i dokonywano pasażu. Wzrost grzyba *A. niger* odbywał się w temperaturze 28°C.

3.4.3. Oczyszczanie alkalicznej proteazy

Hodowlę bakteryjną *P. aeruginosa* (szczep 02/18) w objętości 200 µl przesiewano do 300 ml pożywki minimalnej M9. Po czym prowadzono hodowlę wgłębną z wytrząsaniem przy 120 rpm w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po tym czasie hodowlę wirowano (15 minut, 4°C, 8000 rcf), w celu usunięcia bakterii z płynu pohodowlanego. Białka wydzielane do pożywki hodowlanej wytrącano z supernatantu siarczanem amonu (0-90% nasycenia). Osad, który zbierał się po zwirowaniu (10 minut, 4 °C, 8000 rcf), rozpuszczano w 12 ml 50 mM buforu Tris-HCl o pH 8,0 i poddawano całonocnej dializie, wobec tego samego buforu. Dializowany roztwór frakcjonowano stosując chromatografię anionowymienną na złożu DEAE-celuloza (DE 52, Whatman). Po przejściu materiału przez kolumnę i przepłukaniu jej buforem Tris-HCl pH 8, zbierano frakcję zawierającą białka niezwiązane ze złożem, następnie z kolumny eluowano białka związane z DEAE-celulozą z zastosowaniem zbuforowanych roztworów NaCl 0,2 M i 0,7 M. Zebrane frakcje ponownie dializowano w celu pozbycia się soli i liofilizowano. Obecność alkalicznej proteazy

55

sprawdzano metodą zymografii, metodą Western blot oraz metodą LC-MS-MS/MS (podrozdział 3.4.25, 3.4.26. oraz 3.4.4.; Andrejko i Siemińska, 2016; Andrejko i in., 2019).

3.4.4. Identyfikacja białek metodą LC-MS-MS/MS

Klasyczna procedura identyfikacji białek z zastosowaniem spektrometrii mas rozpoczyna się od uzyskania mieszaniny peptydów poprzez degradację białka (z wykorzystaniem trypsyny), po uprzedniej redukcji i zablokowaniu zredukowanych mostków dwusiarczkowych.

Do zliofilizowanej próby dodawano 100 mM NH₄HCO₃, do uzyskania stężenia 10 mM i poddawano 30-minutowej inkubacji w 57 °C. Następnie dodawano 0,5M jodoacetamid w celu alkilacji, do uzyskania stężenia 50mM i ponownie inkubowano bez dostępu do światła przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Kolejno dodawano 100mM NH₄HCO₃, aż do uzyskania stężenia 50mM i ponownie poddawano inkubacji, jak poprzednio. Próbę zawierającą białka poddawano trawieniu trypsyną (100 ng/µl) w stosunku 10:1 i pozostawiano na noc w 37°C. Po czym, do mieszaniny peptydów dodawano 5% TFA do uzyskania pH 4 i przechowywano w 4°C (www.mslab-ibb.pl).

W kolejnym etapie rozdzielano peptydy za pomocą chromatografii cieczowej (LC) i dokonywano pomiaru mas peptydów oraz ich fragmentów w spektrometrze mas Orbitrap (Thermo). Następnie porównano masy uzyskanych peptydów i ich fragmentów z bazą danych sekwencji białkowych (NCBI) za pomocą programu MASCOT (www.matrixscience.com).

3.4.5. Przygotowanie pasty bakteryjnej

Bakterie przenoszono za pomocą ezy ze skosów agarowych do probówek z jałowym podłożem LB lub M9 (5ml). Hodowlę prowadzono przez 24 godziny (w podłożu LB) oraz 48 godziny (w podłożu M9) w temperaturze 37 °C, po czym dokonywano pomiaru gęstości optycznej zawiesiny wobec stosowanej pożywki przy długości fali 600 nm. Hodowlę rozcieńczano do wartości OD ₆₀₀ wynoszącej 0,3. Następnie 2 ml hodowli wirowano (8000 rpm, 8 min) i odrzucano supernatant, a osad komórek bakteryjnych przemywano 2-krotnie jałową wodą i ponownie wirowano

(8000 rpm, 8 minut). Tak otrzymaną pastę bakteryjną stosowano do zakażania gąsienic *G. mellonella*.

3.4.6. Zakażanie gąsienic

Do badania odpowiedzi immunologicznej gąsienice zakażano bakteriami *P. aeruginosa* (szczepem klinicznym oraz entomopatogennym), rosnącymi w pożywce minimalnej lub bulionowej. Gąsienice umieszczano w jałowych szalkach Petriego i odkażano 70% roztworem etanolu. Następnie zanurzano sterylną igłę w paście bakteryjnej przygotowanej według opisu (podrozdział 3.4.5.) i nakłuwano gąsienice w ostatnie odnóże odwłokowe. Po zakażeniu owady przechowywano w ciemności w temperaturze 28 °C.

Ilość bakterii wprowadzanych do hemocelu owada określano zanurzając igłę w paście bakteryjnej, a następnie osadzone bakterie na igle przenoszono do jałowej wody (1 ml). Po czym wykonywano rozcieńczenia i wysiewano bakterie na płytce z podłożem LB (1,6% agar). Po 24-godzinnej inkubacji płytek w temperaturze 37°C zliczano kolonie bakteryjne.

3.4.7. Immunizacja gąsienic

Do immunizacji gąsienic stosowano alkaliczną proteazę otrzymywaną z płynu pohodowlanego bakterii *P. aeruginosa* (szczep 02/18) rosnących w podłożu M9 (podrozdział 3.4.2.). Iniekcji dokonywano za pomocą strzykawki Hamiltona, w ostatnie odnóże odwłokowe owada. W niektórych doświadczeniach gąsienice immunizowano zabitymi ogrzewaniem bakteriami *P. aeruginosa* (szczep 02/18) rosnącymi w pożywce M9. W tym celu 24-godzinną hodowlę bakterii poddawano działaniu wysokiej temperatury (98°C, 30 minut), po czym przygotowywano pastę bakteryjną zgodnie z opisem zamieszczonym w podrozdziale 3.4.5. Wyjątkowo do pobudzania układu odpornościowego gąsienic stosowano pastę bakteryjną zawierającą żywe bakterie *E. coli* (podrozdział 3.4.6.). Po immunizacji gąsienice przetrzymywano w szalkach Petriego w temperaturze 28°C, w ciemności, do czasu pobierania hemolimfy.

3.4.8. Otrzymywanie próbek hemolimfy pozbawionych hemocytów

Hemolimfę pobierano z gąsienic nieimmunizowanych, immunizowanych i zakażonych po określonym czasie od iniekcji. Procedurę rozpoczynano od sterylizacji powierzchni brzusznej owada 70% roztworem etanolu. Po nacięciu sterylnym skalpelem ostatniego odnóża odwłokowego gąsienicy, pobierano hemolimfę za pomocą pipety. Następnie hemolimfę umieszczano w probówce typu Eppendorf trzymanej w lodzie, zawierającej kilka kryształów fenylotiomocznika (PTU, ang. *N-phenylothiourea*) zapobiegając w ten sposób melanizacji. Hemolimfę wolną od hemocytów uzyskiwano poprzez odwirowanie (200 ×g, 5 minut, 4°C). Po czym pozbywano się osadu i ponownie wirowano supernatant przy obrotach 14 000 rpm przez 10 minut w 4 °C. Otrzymane próbki hemolimfy przechowywano w temperaturze -20 °C.

3.4.9. Przygotowanie ekstraktów z hemolimfy

Białka i peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 30 kDa izolowano z hemolimfy wolnej od hemocytów metodą ekstrakcji (Schoofs i in., 1990). Sporządzano mieszaninę ekstrakcyjną zawierającą metanol: kwas octowy: wodę (90: 1: 9, v/v/v) i dokładnie mieszano. Hemolimfę rozcieńczano 10-krotnie roztworem ekstrakcyjnym. Wytrącone białka osadzano przez wirowanie (14000 rpm, 30 minut, 4°C). Uzyskany supernatant zbierano, chłodzono w temperaturze -80°C, po czym liofilizowano i przechowywano w -20°C. W ostatnim etapie liofilizat rozpuszczano w wodzie dejonizowanej w ilości stanowiącej 2/3 objętości próbki i dokonywano pomiaru stężenia białka (podrozdział 3.4.11.).

3.4.10. Odtłuszczanie ekstraktów z hemolimfy

W celu odtłuszczenia ekstraktów uzyskanych ze 100 µl hemolimfy, liofilizat rozpuszczano w 0,1% kwasie trifluorooctowym (TFA) w objętości 67 µl, kolejno dodawano tę samą objętość n-heksanu. Następnie próby mieszano na wytrząsarce typu Vortex i odwirowywano przy obrotach 14 000 rpm przez 15 minut w temperaturze 4 °C. Górną frakcję zawierającą lipidy (wraz z żółtym pierścieniem) odrzucano i dodawano octanu etylu (67 µl) do dolnej frakcji wodnej. Po zmieszaniu i ponownym odwirowaniu frakcję wodną zawierającą peptydy liofilizowano i przechowywano w temperaturze -20 ° C. Po odtłuszczaniu sprawdzano czy nie doszło do zmian

w profilu białkowo-peptydowy badanych ekstraktów za pomocą elektroforezy trycynowej (podrozdział 3.4.21.).

3.4.11. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano metodą Bradford (1976), która wykorzystuje zdolność białek do wiązania się z CBB (Coomasie Brilliant Blue) za pomocą wiązań jonowych oraz hydrofobowych. W wyniku powyższej reakcji dochodzi do zmiany zabarwienia roztworu z brązowego na niebieski.

Procedurę prowadzono z wykorzystaniem 5-krotnie rozcieńczonego odczynnika Bradford (Bio-Rad). W celu określenia stężenia białka w próbach sporządzano mieszaninę reakcyjną do ilościowego oznaczenia białka zawierającą 1ml odczynnika Bradford z 20 µl preparatu białkowego oraz próbę odczynnikową zawierającą 1 ml odczynnika Bradford z 20 µl wody dejonizowanej. Po 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono ekstynkcję dla długości fali 595 nm próby eksperymentalnej wobec próby odczynnikowej za pomocą nanofotometru (Implen). Stężenie białka oznaczano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla albuminy surowicy bydlęcej (BSA).

3.4.12. Oznaczanie aktywności przeciw bakteriom Gram-ujemnym

Aktywność przeciw bakteriom gram-ujemnym badano stosując metodę dyfuzji radialnej na płytkach z zestalonym agarem podłożem LB (Hoffmann i in., 1981).

Po ogrzaniu i rozpuszczeniu sterylnego podłoża z 0,7 % agarem dodawano przesączony przez filtr bakteriologiczny lizozym białka jaja kurzego (2 mg/ ml), w celu zwiększenia podatność bakterii na działanie przeciwbakteryjne badanych substancji (Chalk i Suliaman, 1998; Cytryńska i in., 2001). W dalszej kolejności do podłoża dodawano nasycony roztwór PTU (1 µl/ml podłoża) zapobiegający melanizacji hemolimfy oraz streptomycynę (0,14 mg/ml) uniemożliwiającą wzrost innych drobnoustrojów. Następnie przesiewano 24-godzinną hodowlę bakterii *E. coli* D31 (1 µl hodowli/ml podłoża) do tak uzyskanego podłoża. Podłoże z bakteriami dokładnie mieszano, rozlewano na płytki w objętości 10 ml i po zastygnięciu formowano studzienki korkoborem przy pomocy aparatu próżniowego. Do studzienek nanoszono po 5 µl badanej hemolimfy/ekstraktu i płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Po tym czasie za pomocą suwmiarki mierzono średnice stref

zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowej i obliczano poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej za pomocą algorytmu (Hultmark i in., 1982). Jako standard do oceny aktywności przeciwbakteryjnej stosowano syntetyczną cekropinę B.

3.4.13. Oznaczanie aktywności przeciw bakteriom Gram-dodatnim

W celu oznaczenia aktywności przeciw bakteriom Gram-dodatnim stosowano płytki Petriego z zestalonym podłożem LB zawierającym bakterie *B. circulans*. Procedurę rozpoczynano od ogrzania sterylnego podłoża z agarem (0,7%) do momentu uzyskania płynnej konsystencji. W dalszej kolejności do podłoża dodawano nasycony roztwór PTU (1 μ l/ml). Po ostudzeniu podłoża do temperatury 40°C dodawano 18-godzinną hodowlę bakterii wskaźnikowej. Wymieszane podłoże rozlewano po 10 ml na płytki Petriego i po zestaleniu wycinano studzienki o średnicy 2,9 mm, do których nanoszono hemolimfę lub jej ekstrakt w objętości 5 μ l. Po 24godzinnej inkubacji płytek w temperaturze 37°C dokonywano pomiaru stref zahamowania wzrostu *B. circulans*. W związku z wykrywalną w hemolimfie owadów nieimmunizowanych aktywnością przeciw *B. circulans*, uzyskane wartości przedstawiano jako relatywny poziom aktywności.

3.4.14. Oznaczanie aktywności hemolimfy typu lizozymu

Aktywność przeciwbakteryjną lizozymu obecnego w hemolimfie określano na podstawie pomiaru stref rozkładu peptydoglikanu znajdującego się w ścianie komórkowej *Micrococcus lysodeikticus*.

W gorącym buforze Sörrensena rozpuszczano agarozę (1%), liofilizat Gramdodatnich bakterii *M. lysodeikticus* (0,75 mg/ml) oraz streptomycynę (0,07 mg/ml) przeciwdziałającą rozwojowi zakażenia bakteryjnego (Mohrig i Messner, 1968). Następnie tak uzyskaną mieszaninę dokładnie mieszano i rozlewano po 10 ml na płytki Petriego. Po zestaleniu podłoża tworzono studzienki korkoborem, na które nanoszono po 5 µl hemolimfy lub ekstraktu. Płytki z próbami inkubowano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Po tym czasie dokonywano pomiaru stref za pomocą suwmiarki. Zmierzone średnice (mm) przeliczano na ekwiwalent lizozymu białka jaja kurzego-EWL (µg/ml) opierając się na krzywej kalibracyjnej uzyskanej na podstawie pomiaru wielkości stref po zastosowaniu wzorcowych stężeń oczyszczonego lizozymu.

3.4.15. Oznaczanie aktywności przeciwgrzybowej hemolimfy

Aktywność przeciwgrzybową hemolimfy i jej ekstraktu wykrywano za pomocą metody dyfuzyjnej mierząc strefy zahamowania wzrostu grzyba strzępkowego *A. niger* rosnącego na pożywce PDA (podrozdział 3.4.2.). W pierwszym etapie do 2-dniowej hodowli *A. niger* prowadzonej na skosie agarowym dodawano jałową wodę (5 ml), w celu zmycia konidiów. Powstałą zawiesinę przesączano przez jałową watę i następnie zliczano konidia *A. niger* w komorze Bürkera. W dalszej kolejności do płynnego po ogrzaniu podłoża dodawano zawiesinę konidiów w ilości 1,6 x 10⁶/8 ml PDA. Następnie podłoże wylewano po 8 ml na jałowe płytki Petriego. W zestalonej pożywce formowano studzienki za pomocą korkoboru i pompy próżniowej, a do każdej z nich wprowadzano 4 µl hemolimfy/ekstraktu. Płytki z próbami poddawano inkubacji (28°C, 24 godziny), a pojawiające się strefy zahamowania wzrostu *A. niger* mierzono suwmiarką. Poziom aktywności przeciwgrzybowej przeliczano na ekwiwalent amfoterycyny B (µg/ml) na podstawie sporządzonej krzywej kalibracyjnej.

3.4.16. Oznaczanie aktywności oksydazy fenolowej w warunkach in vivo

Do wizualizacji oraz określenia aktywności fenoloksydazy wykorzystywano zdolność enzymu do utleniania L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA) do melaniny. W wyniku reakcji dochodzi do zmiany zabarwienia mieszaniny reakcyjnej z bezbarwnej na brązową.

W celu zbadania aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic poddanych immunizacji, jak i nieimmunizowanych sporządzano próby spektrofotometryczne na 96-dołkowej płytce NUNC. Do 2 µl hemolimfy owadów (10krotnie rozcieńczonej) dodawano 18 µl buforu (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl) z 5 mM CaCl₂ i próby poddawano inkubacji w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Po tym czasie do prób dodawano 180 µl L-DOPA (2mM) rozpuszczonej w 50 mM buforze fosforanowym pH 6,5. Po czym bezzwłocznie mierzono absorbancję przy długości fali 490 nm przez 90 minut w 15-minutowych interwałach za pomocą czytnika mikropłytek firmy Bio-Rad (Park i in., 2005; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010). Dodatkowo hemolimfę gąsienic, którym aplikowano do hemocelu alkaliczną proteazę separowano za pomocą elektroforezy glicynowej w warunkach natywnych (podrozdział 3.4.20.). Po czym żele inkubowano z substratem L-DOPA (2 mM) w buforze fosforanowym o pH 6,5 (50 mM).

3.4.17. Badania *in vitro* wpływu alkalicznej proteazy na proces aktywacji profenoloksydazy

W doświadczeniach *in vitro* mających na celu zbadanie wpływu alkalicznej proteazy na proces aktywacji proPO stosowano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych zbieraną do Eppendorfa bez dodatku PTU. Reakcję prowadzano w 96-dołkowej płytce umieszczonej na lodzie, aby zapobiec procesowi melanizacji hemolimfy.

Próba eksperymentalna składała się z 2 µl hemolimfy inkubowanej z 10 µl alkalicznej proteazy (6 µg) rozpuszczonej w buforze TBS (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl) z 10 mM CaCl₂. Natomiast próba kontrolna zawierała zamiast proteazy wspomniany bufor Tris-Ca²⁺. Mieszaniny reakcyjne poddawano 50-minutowej inkubacji w temperaturze 4°C. Następnie dodawano 180 µl L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (2 mM) w buforze fosforanowym o pH 6,5 (50 mM) i bezzwłocznie mierzono absorbancję A ₄₉₀ za pomocą czytnika płytek (Rao i in., 2010).

W niektórych doświadczeniach w celu ujednolicenia czasu inkubacji hemolimfy alkaliczną równocześnie Z proteaza, wykonano próbę spektrofotometryczną oraz próbę do rozdziału elektroforetycznego, o tym samym składzie. Do 5 µl badanej hemolimfy gąsienic dodawano alkaliczną proteazę w objętości 10 µl (3 µg), po czym prowadzano 30-minutową inkubację w 37°C z wytrząsaniem przy 120 rpm. Próba kontrolna zawierała bufor, w którym rozpuszczono proteazę. Po tym czasie próbę przeznaczoną do rozdziału elektroforetycznego rozdzielano w warunkach natywnych (podrozdział 3.4.20.). Po zakończonym rozdziale żele inkubowano z substratem (2mM M L-DOPA w 50 mM buforze fosforanowym pH 6,5) przez 60 minut i dokonywano archiwizacji obrazu elektroforetycznego. Natomiast w tym samym czasie próbę przeznaczoną do pomiaru absorbancji inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie do mieszaniny dodawano 180 μ l 2mM dopaminy w 50 mM w buforze fosforanowym pH 6,5. Aktywność fenoloksydazy mierzono dla λ =490 nm od razu po dodaniu substratu przez czas 60 minut, w 15 minutowych interwałach. W testach wykorzystano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych oraz gąsienic immunizowanych zabitymi bakteriami *P. aeruginosa*.

3.4.18. Badania *in vitro* wpływu alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej

W badaniach sprawdzających wpływ alkalicznej proteazy na reakcję katalizowaną przez oksydazę fenolową, stosowano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych w której badany enzym był aktywowany laminaryną. Reakcję przeprowadzano na 96-dołkowej płytce.

Do 2 µl hemolimfy pobieranej bez PTU dodawano 10 µl laminaryny (4 mg/ml) w buforze TBS (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl) z 10 mM CaCl₂. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej do próby eksperymentalnej dodawano 9 µl alkalicznej proteazy (5 µg) rozpuszczonej w wyżej wspomnianym buforze Tris-Ca²⁺, a do próby kontrolnej bufor. W dalszej kolejności mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C. Następnie do prób dodawano 180 µl L-DOPA (2mM) w buforze fosforanowym pH 6,5 (50 mM). Aktywność fenoloksydazy mierzono dla λ =490 nm od razu po dodaniu substratu (czas 0) oraz po 15 minutach (Rao i in., 2010).

W przypadku doświadczeń *in vitro* mających na celu wizualizację aktywności oksydazy fenolowej zastosowano metodę elektroforetyczną w warunkach natywnych (podrozdział 3.4.20.) Do badań stosowano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych oraz immunizowanych bakteriami zabitymi ogrzewaniem. Do badanej hemolimfy (5 μl) dodawano z 10 μl alkalicznej proteazy (0,172 μg/ μl) rozpuszczonej w buforze TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl) z 5mM CaCl₂. Następnie próbę eksperymentalną zawierającą alkaliczną proteazę oraz próbę kontrolną zawierającą bufor Tris-Ca²⁺ poddawano inkubacji w temperaturze 37°C przez 40 minut. Próby separowano za pomocą rozdziału elektroforetycznego, po czym żele inkubowano z substratem L-DOPA (2 mM) w buforze fosforanowym o pH 6,5 (50 mM).

3.4.19. Elektroforeza glicynowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę glicynową SDS-PAGE (ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) prowadzono w układzie nieciągłym. Oznacza to, że wartość pH oraz siła jonowa buforów żelowych i buforu elektrodowego była różna (Laemmli, 1970).

Po uprzednim wykonaiu prób zawierających określoną ilość białka z 1/4 objętością buforu próbkowego, poddawano je denaturacji w temperaturze 98 °C przez 7 minut w termobloku (Eppendorf). W dalszej kolejności uzupełniano aparat do elektroforezy Mini Protean II Cell (Bio-Rad) buforem elektrodowym do elektroforezy glicynowej (podrozdział 3.2.) i nanoszono próby do studzienek w żelu przygotowanym według proporcji zamieszczonych w tab. 3. Rozdział prowadzono przy napięciu 120 V przez około 1 godzinę.

Nazwa odczynnika	Żel separujący 10%	Żel zagęszczający 6%
30% akrylamid + 1% bisakrylamid	3,34 ml	1 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25 ml
H ₂ O dejonizowana	4 ml	2,6 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
10% APS (sporządzane w dniu polimeryzacji żeli)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tab. 3 Skład mieszaniny na 10% żel separujący i 6% żel zagęszczający do elektroforezy glicynowej SDS-PAGE

Po rozdziale w celu uwidocznienia prążków białkowych żele umieszczano na kołysce laboratoryjnej i barwiono przez 1 godzinę roztworem barwiącym zawierającym CBB R-250 (0,25%), metanol (50%,) i kwas octowy (10%). Następnie żele odbarwiano 10% roztworem kwasu octowego do uwidocznienia prążków białkowych i archiwizowano. Barwienie to pozwala wykryć 0,1 µg białka/prążek w żelu, dzięki niespecyficznemu wiązaniu barwnika (Sasse i Gallagher, 2009). Masy cząsteczkowe rozdzielanych białek w żelu określano na podstawie mas białek markerowych (SDS-PGE Molecular Weight Standards Low Range, Bio–Rad): fosforylaza 97,4 kDa, albumina surowicy bydlęcej 66,2 kDa, albumina jaja kurzego

45,0 kDa, anhydraza węglanowa 31,0 kDa, sojowy inhibitor trypsyny 21,5 kDa; lizozym białka jaj kurzego 14,4 kDa.

3.4.20. Elektroforeza glicynowa w warunkach natywnych

Elektroforeza natywna pozwala na rozdział białek z zachowaniem ich aktywności biologicznej. Dlatego też w technice tej nie poddaje się prób inkubacji w wysokiej temperaturze, która powoduje denaturację białek. W pierwszym etapie sporządzano 7,5% żel separujący według proporcji podanych w tab. 4 oraz żel zagęszczający bez dodatku SDS (podrozdział 3.4.19.).

Tab. 4 Skład żelu separującego (7,5%) stosowanego do elektroforezy glicynowej PAGE w warunkach natywnych

Nazwa odczynnika	Żel separujący 7,5%
30% akrylamid/ bisakrylamid (29:1)	3,75 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O dejonizowana	7,35 ml
10% APS (sporządzane w dniu polimeryzacji żeli)	150 µl
TEMED	15 µl

W dalszej części procedury przygotowywano próby do rozdziału elektroforetycznego poprzez dodanie do 500 µg białka 1µl roztworu błękitu bromofenolowego (1%) oraz ¼ objętości 80% roztworu sacharozy. Po czym próby nanoszono na żel i rozdzielano w buforze elektrodowym do elektroforezy natywnej (podrozdział 3.2.) przy napięciu 120 V przez około 1 godzinę. Po rozdziale żele inkubowano w L-3,4-dihydroksyfenyloalaninie (5 mM) rozpuszczonej w buforze fosforanowym pH 6,5 (50mM, podrozdział 3.2.) do momentu zaobserwowania pojawiających się skupisk melaniny.

3.4.21. Elektroforeza trycynowa

Elektroforezę ekstraktów z hemolimfy owadów (podrozdział 3.4.9. oraz 3.4.10.) przeprowadzano za pomocą metody SDS-PAGE z trycyną (Tricine SDS-PAGE) według Schägger i Jagow (1987). W przeciwieństwie do glicyny, trycyna jako

jon końcowy w układzie nieciągłym umożliwia rozdział białek o małej masie cząsteczkowej przy zastosowaniu niskich stężeń akrylamidu. Zastosowanie tej metody pozwala na wizualizację prążków peptydowych o niskiej masie cząsteczkowej.

Przygotowanie żeli poliakrylamidowych do elektroforezy trycynowej rozpoczynano od wylania żelu separującego do wysokości 5 cm, a żelu przejściowego o wysokości 1 cm (tab. 5). Na koniec wylewano żel zagęszczający do końca płytki i umieszczono grzebień w celu uformowania studzienek.

Odczynnik	Żel separujący	Żel przejściowy	Żel zagęszczający
48% akrylamid z 1,5% bisakrylamidem	3,33 ml	1 ml	400 µl
Bufor do żelu	3,33 ml	1,67 ml	1,24 ml
100% glicerol	1,07 ml	-	-
H ₂ O dejonizowana	2,23 ml	2,33 ml	3,32 ml
10% APS	34 µl	17 µl	40 µl
TEMED	3,5 µl	2 µl	4 µl

Tab. 5 Skład żelu zagęszczającego, przejściowego i separującego do elektroforezy trycynowej

W kolejnym etapie sporządzano próby do rozdziału elektroforetycznego. W tym celu metanolowe ekstrakty z hemolimfy gąsienic rozpuszczano w wodzie dejonizowanej w 2/3 wyjściowej objętości hemolimfy stosowanej do ekstrakcji. Po czym oznaczano w próbach stężenie białka metodą Bradford (podrozdział 3.4.11.). Następnie przygotowano próbki zawierające 20 µg białka z 1/4 objętością buforu próbkowego (podrozdział 3.2.). Po denaturacji białek (98°C, 7 minut) wprowadzano je na żel, następnie separowano w obecności buforu katodowego (podrozdział 3.2.) i anodowego (0,2 M bufor Tris-HCl pH 8,9) przez 1 godzinę przy napięciu 30 V. Po tym czasie zmieniano wartość napięcia na 90V do końca trwania elektroforezy (około 4 godzin).

Po zakończonym rozdziale żele utrwalano w 50% roztworze metanolu w 10% kwasie octowym przez 30 min (grubość żelu 0,75 mm) lub 60 min (grubość żelu 1,5 mm). Następnie żele barwiono 0,025% roztworem Coomasie Brilliant Blue G w 10% kwasie octowym. W końcowym etapie żele odbarwiano 10% roztworem kwasu octowego do momentu uwidocznienia prążków białkowych i peptydowych.

3.4.22. Zymografia

Zymografia jest techniką umożliwiającą badanie enzymów proteolitycznych z wykorzystaniem ich zdolności do degradacji substratu. Do wizualizacji aktywności proteaz zastosowano 10% żel separujący z dodatkiem żelatyny (tab. 6), a żel zagęszczający przygotowywano zgodnie z opisem zamieszczonym w podrozdziale 3.4.19.

Nazwa odczynnika	10% żel
	separujący
30% akrylamid/	3.34 ml
bisakrylamid (29:1)	·
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
H ₂ O dejonizowana	4 ml
10% SDS	100 µl
10% APS (sporządzane w dniu przygotowywania żeli)	100 µl
TEMED	10 µl
żelatyna	25 mg

Tab. 6 Skład 10% żelu separującego do zymografii

W tej procedurze próby badane (0,5-5 µg białka) łączono z ¼ objętością buforu próbkowego (podrozdział 3.2.) i bezpośrednio nanoszono na żel. Rozdział prowadzono w obecności buforu elektrodowego do elektroforezy glicynowej (podrozdział 3.2.) przy napięciu 120 V. Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym żele 2-krotnie przepłukiwano 2,5% roztworem Tritonu przez 30 minut i pozostawiano na kołysce laboratoryjnej przez 24 godziny w 50mM buforze Tris-HCl pH 7,5. Po upływie tego czasu żele barwiono przez 40 minut 0,2% roztworem czerni amidowej w 10% kwasie octowym i odbarwiano za pomocą 10% kwasu octowego do momentu uwidocznienia aktywności enzymatycznej. Po wybarwieniu żeli obserwowano obszary degradacji substratu widoczne jako przejaśnienia na ciemnym tle i dokonywano archiwizacji żeli.

3.4.23. Bioautografia

Aktywność przeciwbakteryjną *in situ* hemolimfy owadów wykrywano za pomocą metody bioautografii. Procedurę rozpoczynano od przygotowania 13,8% żelu separującego (tab. 7) i 6% żelu zagęszczającego (podrozdział 3.4.19.). Po połączeniu

hemolimfy owadów (100 µg białka) z buforem próbkowym (3:1) bezpośrednio wprowadzano je do studzienek i prowadzono rozdział w buforze elektrodowym do elektroforezy glicynowej (podrozdział 3.2.) przy napięciu 120V.

Nazwa odczynnika	Żel separujący 13,8%
30% akrylamid/ bisakrylamid (29:1)	4,6 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2, 5 ml
H ₂ O dejonizowana	2,7 ml
10% SDS	100 µl
10% APS (sporządzane w dniu przygotowywania żeli)	100 µl
TEMED	10 µl

Tab. 7 Skład 13,8% żelu separującego do bioautografii

Po rozdziale elektroforetycznym w celu renaturacji polipeptydów umieszczano żele na 30 minut na kołysce laboratoryjnej w 2,5% roztworze Tritonu Następnie przez kolejne 30 min płukano żele najpierw 50 mM buforem Tris-HCl pH 7.4, a potem pożywką LB (podrozdział 3.4.2.). Na koniec żele pokrywano cienką warstwą podłoża LB z 0,7% agarem z dodatkiem bakterii *E. coli* szczepu D31 (1 μ l hodowli/1 ml pożywki), lizozymu (5mg/ml) oraz streptomycyny (0,14 mg/ml). Po 24-godzinnej inkubacji płytek z żelami w 37°C obserwowano pojawienie się stref zahamowania wzrostu bakterii *E. coli*, świadczących o przeciwbakteryjnych właściwościach hemolimfy.

3.4.24. Elektroforeza dwukierunkowa IEF SDS-PAGE

Pierwszym etapem elektroforezy dwuwymiarowej jest ogniskowanie izoelektryczne. Próbkę zawierającą 200 µg ekstraktu z hemolimfy zawieszano w 250 µl buforu do rehydratacji składającym się z 8,8 M mocznika, 2% CHAPS (w/v), 70 mM DTT oraz 0,2% amfolitów Bio-Lytes (w/v). Tak przygotowaną próbkę nakładano na płytę do ogniskowania, następnie umieszczano 70 mm paski Ready Strip TM IPG pH 3-10 (Bio-Rad), które powlekano warstwą oleju mineralnego w celu uniknięcia ich wysuszenia. Następnie płytę umieszczano w systemie do ogniskowania Protean IEF® (Bio-Rad) i dalej programowano sprzęt zgodnie z zaleceniami producenta (www.imbb.forth.gr/imbb-eople/images/Profi/pdf/protean_ief.pdf). Przed rozpoczęciem procesu ogniskowania izoelektrycznego dokonywano rehydratacji aktywnej, podczas której po przyłożeniu napięcia dochodziło do przemieszczenia próbek w głąb pasków. Następnie miał miejsce etap przygotowawczy, który służył pozbyciu się jonów soli i kontaminacji obdarzonych ładunkiem. Po etapie wzrostu napięcia dochodziło do ogniskowania izoelektrycznego, po czym w celu uniknięcia dyfuzji białek lub przeogniskowania artefaktów sprzęt utrzymywał napięcie na stałym poziomie. W kolejnym etapie paski równoważono przez 15 min w buforze równoważącym I i II (podrozdział 3.2.). Separacje białek w drugim wymiarze przeprowadzano z zastosowaniem elektroforezy trycynowej SDS-PAGE zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.4.21. lub 3.4.24.

3.4.25. Elektrotransfer białek z żelu na membranę

Po rozdziale elektroforetycznym (SDS-PAGE, native PAGE lub IEF / SDS-PAGE) żele płukano przez 10 min w buforze elektrodowym do transferu (podrozdział 3.4.20.). Następnie zanurzano we wspomnianym buforze bibuły i gąbki do transferu. Przy czym membranę PVDF (Millipore) tuż przed użyciem zanurzano w metanolu.

W dalszej kolejności składano zestaw Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad), według zaleceń producenta (www.bio-rad.com). Na gąbkę nakładano bibułę, następnie żel, potem membranę, bibułę oraz ponownie gąbkę. Po czym umieszczano w zestawie, który uzupełniano wyżej wspomnianym buforem i prowadzono transfer przez 90 minut przy natężeniu 350 mA. Membrany po zakończeniu transferu suszono i przechowywano.

3.4.26. Western blot (immunoblotting)

W celu immunodetekcji alkalicznej proteazy membranę po elektrotransferze zanurzano w metanolu przez 60s dla obniżenia hydrofobowości membrany. Następnie blokowano miejsca niespecyficznego wiązania się przeciwciał poprzez 1-godzinną inkubację membrany w buforu TBS (podrozdział 3.4.25., podrozdział 3.4.26. podrozdział 3.2.) z dodatkiem 5 % odtłuszczonego mleka. Kolejno membranę płukano (przez 1 godzinę) w buforze TBS z 5 % mlekiem odtłuszczonym zawierającym z przeciwciałami przeciw AprA (1: 1000) (dostarczonej przez dr. R. Voulhouxa). Następnie membranę odpłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w 1% roztworze Tritonu X-100 rozpuszczonym w buforze TBS, aby usunąć przeciwciała niezwiązane oraz

przeciwciała związane niespecyficznie. W dalszej kolejności dokonywano związania przeciwciał II-rzędowych poprzez 1-godzinną inkubację w buforze TBS z 5 % mlekiem odtłuszczonym i antykróliczych przeciwciał sprzęgniętych z alkaliczną fosfatazą (kozie antykrólicze IgG, 1: 30000, Sigma-Aldrich). Po czym 2-krotnie przez 10 minut umieszczano membranę w buforze TBS oraz w buforze AP (podrozdział 3.2.) przez 10 minut. Immunoreaktywne prążki wizualizowano, aż do momentu pojawienia się barwnych produktów reakcji przez inkubację w buforze AP (23 ml) z NBT i BCIP (Blake i in., 1984). Substraty fosfatazy alkalicznej rozpuszczano następująco: 9 mg NBT rozpuszczono w 0,3 ml wody oraz w 0,7 ml DMF. Natomiast BCIP (4,5 mg) rozpuszczonego w 1 ml DMF.

3.4.27. Analiza jakościowa i ilościowa białek/peptydów hemolimfy

Ekstrakty po odtłuszczaniu separowano za pomocą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej w odwróconej fazie (RP-HPLC, ang. reversed phase - high performance liquid chromatography) stosowanej zwykle do rozdziału i oczyszczania białek na podstawie hydrofobowości. Liofilizaty zawierające białka niskocząsteczkowe rozpuszczano w 0,1% roztworze kwasu tricfluorooctowego (TFA) z dodatkiem PTU (bufor A) do uzyskania stężenia 1mg/ml i nakładano 50 µl ekstraktu (co odpowiadało 100 µl hemolimfy) na kolumnę Discovery Bio Wide Pore C18 300A. Podczas rozdziału chromatograficznego stosowano liniowy gradient 0-70% buforu B (0,07% TFA z 80% acetonitrylem, v/v) z szybkością przepływu 1 ml/minutę przez 50 minut. Detekcję spektrofotometryczną prowadzono dla 220 nm,

Następnie frakcje zbierano i poddawano procesowi liofilizacji i frakcje zawierające peptydy po rozpuszczeniu w wodzie rozdzielano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (podrozdział 3.4.19.). Po czym białka i peptydy transferowano na membranę PVDF (podrozdział 3.4.25.). Kolejno barwiono za pomocą CBB R-250. Uzyskane paski wycinano za pomocą skalpelu ze wspomnianej membrany. Następnie w celu identyfikacji polipeptydy poddawano sekwencjonowaniu od N-końca za pomocą Procise ® 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems) zgodnie z instrukcją producenta (www.tools.thermofisher.com).

3.4.28. Metody statystyczne

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu Statistica 12. Do analizy istotności statystycznej danych zawartych na ryc. 21, 22, 25-28, 34 A, 37 A, 39, 41-43 stosowano test ANOVA oraz test post hoc Tuckey'a. Dla rozkładów nieparametrycznych stosowano test ANOVA rang Kruskal'a – Wallis'a, co dotyczyło danych zamieszczonych na ryc. 6-9, 17-20, 23, 24. Poziom istotności ustalano dla p<0,05. Doświadczenia wykonywano kilkukrotnie, zwykle w trzech powtórzeniach.
4. ANALIZA WYNIKÓW

4.1. Humoralna odpowiedź odpornościowa barciaka większego *G. mellonella* po zakażeniu bakteriami *P. aeruginosa*

4.1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hemolimfy gąsienic zakażonych

W badaniach zastosowano dwa szczepy *P. aeruginosa*, entomopatogenny ATCC 27853 oraz izolat kliniczny 02/18. Ze względu na fakt, że bakterie wytwarzały różne czynniki wirulencji w zależności od podłoża w jakim były hodowane, badane szczepy namnażano w pożywce bogatej (LB) oraz minimalnej (M9). Szczep entomopatogenny wytwarzał w podłożu LB trzy enzymy: elastazę A, elastazę B oraz proteazę serynową, a w podłożu M9 alkaliczną proteazę. Natomiast szczep kliniczny wydzielał elastazę B i alkaliczną proteazę odpowiednio w podłożu LB oraz M9 (Andrejko i in., 2013b). Gąsienice *G. mellonella* zakażano pastą bakteryjną uzyskaną z hodowli bakteryjnej o OD₆₀₀ równym 0,3, według procedury zamieszczonej w podrozdziale 3.4.6., wprowadzając do hemocelu owada około 1,4 x 10⁵ bakterii/ gąsienicę. Następnie hemolimfę pobierano po 8, 15 oraz 18 godzinach od infekcji (podrozdział 3.4.8.).

W pierwszej serii doświadczeń, stosując metodę dyfuzji radialnej, oceniano aktywność przeciwdrobnoustrojową w hemolimfie oraz ekstraktach uzyskanych z hemolimfy (podrozdział 3.4.9.) wobec drobnoustrojów wskaźnikowych: *E. coli* (aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych), *B. circulans* (aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich), *M. lysodeikticus* (aktywność typu lizozymu) oraz *A. niger* (aktywność przeciwgrzybowa) (podrozdziały 3.4.12. – 3.4.15.). W badaniach zastosowano następujące próby eksperymentalne:

- hemolimfę gąsienic zakażonych szczepem klinicznym rosnącym w bulionie (18B) lub w podłożu M9 (18M);
- hemolimfę gąsienic zakażonych szczepem entomopatogennym hodowanym w bulionie (ATCC B) lub w podłożu M9 (ATCC M).

Kontrolę w doświadczeniach stanowiła hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych oraz nakłutych sterylną igłą.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że po zakażeniu gąsienic bakteriami *Pseudomonas* dochodzi do wzrostu aktywności skierowanej przeciw bakteriom Gram-ujemnym w hemolimfie, jak również w ekstraktach z hemolimfy zarówno po 8, 15, jak i 18 godzinach od iniekcji, w stosunku do hemolimfy gąsienic kontrolnych (ryc. 6). Maksymalny jej poziom w większości prób zawierających hemolimfę zakażonych gąsienic zanotowano po 15 godzinach. Należy zaznaczyć, że aktywność w hemolimfie, przedstawiona jako ekwiwalent cekropiny B (μM), była prawie 3-krotnie wyższa w porównaniu do aktywności ekstraktów. W próbach zawierających hemolimfę gąsienic kontrolnych, nieimmunizowanych oraz nakłutych, obserwowano śladową aktywność wobec *E. coli*.

W hemolimfie zainfekowanych owadów wykazano także zwiększenie się aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do bakterii G (+) *B. circulans* (ryc. 7). W badanych próbach eksperymentalnych zawierających ekstrakt notowano zaledwie śladową aktywność.

Metodą dyfuzyjną testowano również dynamikę zmian aktywności przeciwbakteryjnej typu lizozymu obecnego w hemolimfie, dokonując pomiaru stref rozkładu peptydoglikanu znajdującego się w ścianie komórkowej *M. lysodeikticus* (podrozdział 3.4.14.). Stwierdzono, że w odniesieniu do prób kontrolnych, zarówno w hemolimfie zainfekowanych gąsienic, jak i w ekstraktach niskocząsteczkowych obserwowano wyraźny wzrost aktywności typu lizozymu po 15 i 18 godzinach od iniekcji (ryc. 8).

Dodatkowo hemolimfę i ekstrakty z hemolimfy otrzymane po zakażeniu owadów *P. aeruginosa* badano pod kątem aktywności przeciwgrzybowej na podstawie stref zahamowania wzrostu grzyba strzępkowego *A. niger* (podrozdział 3.4.15.). Z uzyskanych danych wynika, że aktywność przeciwgrzybowa była nieobecna w próbach hemolimfy po 8 godzinach od iniekcji bakterii, podobnie jak w próbach kontrolnych (ryc. 9). Jednak po 15 godzinach od zakażenia gąsienic obserwowano pojawianie się aktywności przeciw *A. niger*, która utrzymywała się na podwyższonym poziomie do 18 godziny. W tym czasie maksymalny poziom aktywności notowano po zakażeniu szczepem entomopatogennym pochodzącym z LB, oraz szczepem klinicznym rosnącym w M9. Warto wspomnieć, że działanie przeciwgrzybowe ekstraktów stwierdzono jedynie po 18 godzinach od zakażenia gąsienic badanymi szczepami bakterii.





Ryc. 6 Kinetyka zmian w poziomie aktywności przeciw bakteriom G (-) w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) bakterii *P. aeruginosa* hodowanych w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH) i naklutych igłą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie/ekstrakcie z hemolimfy owadów zakażonych w porównaniu do kontroli





Ryc. 7 Kinetyka zmian w poziomie aktywności przeciw bakteriom G (+) w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym 02/18 (18) bakterii *P. aeruginosa* hodowanych w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH) i naklutych igłą (I). Aktywność przeciw *B. circulans* hemolimfy owadów przedstawiano jako relatywny poziom aktywności. Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie/ekstrakcie z hemolimfy owadów zakażonych w porównaniu do kontroli





Ryc. 8 Aktywność typu lizozymu w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) bakterii *P. aeruginosa* hodowanych w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH) i nakłutych igłą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie/ ekstrakcie z hemolimfy owadów zakażonych w porównaniu do kontroli





Ryc. 9 Poziom aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) bakterii *P. aeruginosa* hodowanych w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH) i nakłutych igłą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli

W nawiązaniu do wyników uzyskanych metodą dyfuzyjną wskazujących na wyraźny wzrost aktywności przeciw *E. coli* w hemolimfie owadów po zakażeniu *P. aeruginosa*, w kolejnym etapie aktywność przeciwbakteryjną badano za pomocą metody bioautografii *in situ* (podrozdział 3.4.23.).



Ryc. 10 Bioautografia – wizualizacja aktywności przeciwbakteryjnej białek i peptydów hemolimfy po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem klinicznym (18) bakterii *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Fotografia żelu obrazującego wyraźne (jaśniejsze) strefy zahamowania wzrostu *E. coli*, strzałka wskazuje dodatkowe strefy na wysokości około 20kDa



Ryc. 11 Bioautografia – wizualizacja aktywności przeciwbakteryjnej białek i peptydów hemolimfy po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem entomopatogennym (ATCC) bakterii *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Fotografia żelu obrazującego wyraźne (jaśniejsze) strefy zahamowania wzrostu *E. coli*, strzałka wskazuje dodatkowe strefy na wysokości około 20kDa

Na obrazach elektroforetycznych po rozdziale polipeptydów hemolimfy zakażonych gąsienic (ryc. 10 i 11) zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu *E. coli* zlokalizowane na żelu poliakrylamidowym w obszarze migracji syntetycznej cekropiny B (3,8 kDa). Wynik ten sugeruje, że aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy była uwarunkowana działaniem peptydów niskocząsteczkowych. Należy zaznaczyć, że we wszystkich próbach eksperymentalnych, z wyjątkiem hemolimfy gąsienic zakażonych szczepem ATCC rosnącym w pożywce M9, pojawiła się także aktywność na wysokości około 20 kDa. Może to wskazywać na występowanie w hemolimfie dodatkowego czynnika o właściwościach przeciwbakteryjnych. Omawiana aktywność w hemolimfie zakażonych gąsienic występowała zarówno po 15, jak i po 18 godzinach od iniekcji (ryc. 10 i 11). We wszystkich próbach zawierających hemolimfę gąsienic zakażonych poziom obserwowanej aktywności przeciwbakteryjnej na wysokości około 3,8 kDa, po 15 i 18 godzinach był wyższy w porównaniu do poziomu obserwowanego po 8 godzinach. Wyniki te są zgodne z rezultatami otrzymanymi metoda dyfuzyjną (ryc. 6). W przypadku prób kontrolnych, czyli hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych i gąsienic nakłutych sterylną igłą zaobserwowano niewielką aktywność przeciwbakteryjną, jedynie na wysokości migracji cekropiny B (ryc. 12).



Ryc. 12 Bioautografia – wizualizacja aktywności przeciwbakteryjnej białek i peptydów hemolimfy gąsienic kontrolnych po 8 i 15 godzinach od początku doświadczenia. Hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH); hemolimfa gąsienic naklutych sterylną igłą (I). Fotografia żelu obrazującego wyraźne (jaśniejsze) strefy zahamowania wzrostu *E. coli*

4.1.2. Analiza profili białkowych hemolimfy gąsienic zakażonych

W kolejnym etapie przeprowadzono szereg badań mających na celu analizę profili białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic po zakażeniu zarówno szczepem entomopatogennym, jak i klinicznym *P. aeruginosa* hodowanych w pożywce minimalnej lub w bulionie odżywczym. Hemolimfę pobierano po 8 i 15 godzinach od

zakażenia owadów, czyli po czasach, w których wykazano najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Następnie hemolimfę pozbawiano wysokocząsteczkowych białek zgodnie z opisaną procedurą w podrozdziale 3.4.9. Próbami kontrolnymi w doświadczeniach była hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych oraz nakłutych igłą. Otrzymane ekstrakty zawierające niskocząsteczkowe białka i peptydy separowano za pomocą elektroforezy trycynowej (podrozdział 3.4.21.). Dzięki zastosowaniu powyższej techniki możliwa była wizualizacja prążków peptydowych o niskiej masie cząsteczkowej.



Ryc. 13 Profile białkowo-peptydowe ekstraktów z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B) - elektroforeza trycynowa. Gwiazdki (*) wskazują poziom peptydów o masie poniżej 6,5 kDa



Ryc. 14 Profile białkowo-peptydowe ekstraktów z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B) - elektroforeza trycynowa. Gwiazdki (*) wskazują poziom peptydów o masie poniżej 6,5 kDa

Po przeanalizowaniu uzyskanych elektroforegramów stwierdzono, że we wszystkich próbach zawierających hemolimfę gąsienic zakażonych bakteriami *Pseudomonas* pojawiły się dwa wyraźne prążki peptydowe o masie poniżej 6,5 kDa,

które nie występowały u gąsienic kontrolnych (ryc. 13 – 15). Ilość peptydów we wspomnianych próbach była zdecydowanie większa po 15 godzinach od zakażenia gąsienic niż w próbach uzyskanych po 8 godzinach. Uzyskane wyniki wskazują, że po zakażeniu gąsienic badanymi szczepami *P. aeruginosa* dochodzi do indukcji syntezy peptydów niskocząsteczkowych odpowiedzialnych za wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykrywanej w hemolimfie i w ekstraktach z hemolimfy metodą dyfuzyjną (ryc. 6) oraz metodą bioautografii (ryc. 10 i 11).





4.1.3. Analiza jakościowa i ilościowa peptydów odpornościowych obecnych w hemolimfie zakażonych gąsienic

Celem kolejnych badań była analiza ilościowa oraz identyfikacja peptydów odpornościowych syntetyzowanych przez gąsienice *G. mellonella* po zakażeniu badanymi szczepami bakterii *P. aeruginosa*. Ekstrakty z hemolimfy pobranej po 8 i 15 godzinach od zakażenia owadów poddawano odtłuszczaniu (podrozdział 3.4.10.). Następnie tak uzyskane ekstrakty nanoszono na kolumnę i rozdzielano metodą RP-HPLC, która pozwoliła na uzyskanie 13 frakcji zawierających głównie białka i peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 20 kDa (podrozdział 3.4.27.). Po elektroforezie SDS-PAGE uzyskanych frakcji i elektrotransferze na membranę, sekwencjonowano od N-końca białka i peptydy wycięte z membrany (ryc. 16).

W badanych frakcjach chromatograficznych uzyskanych po rozdziale ekstraktów z hemolimfy gąsienic po zakażeniu bakteriami *Pseudomonas*

zidentyfikowano obecność następujących peptydów przeciwdrobnoustrojowych: peptydu anionowego-1, Gm defensyny, peptydu bogatego w prolinę-2, peptydu bogatego w prolinę-1, peptydu anionowego-2, peptydu cekropino-D-podobnego, Gm peptydu moricyno-B-podobnego, Gm gallerimycyny oraz Gm apolipoforycyny (C-końcowy fragment apolipoforyny III). Ponadto potwierdzono obecność takich białek, jak apolipoforyna III oraz lizozym. Poziom każdego białka i peptydu zidentyfikowanego w hemolimfie zainfekowanych gąsienic określano w porównaniu do poziomu u gąsienic poddanych nakłuciu sterylną igłą, na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 220 nm. Wyniki badań przedstawiono na wykresach (ryc.17-28), jako wartości średnie ± SD.

Na podstawie przytoczonych danych można stwierdzić, że spośród badanych peptydów w największej ilości występował w hemolimfie peptyd anionowy-2, którego poziom nie zmieniał się istotnie po zakażeniu *P. aeruginosa*. Podobnie nie zaobserwowano różnic w ilości apolipoforycyny oraz Gm gallerimycyny, pomiędzy próbami eksperymentalnymi i kontrolnymi, ale poziom tych peptydów był prawie 7-krotnie mniejszy w porównaniu do poziomu peptydu anionowego-2.



Ryc. 16 Profil białek i peptydów ekstraktów z hemolimfy gąsienic zakażonych bakteriami *Pseudomonas* – obraz elektroforetyczny po rozdziale SDS-PAGE i elektrotransferze na membranę PVDF. Zidentyfikowane białka i peptydy: peptyd bogaty w prolinę-1 (1); Gm gallerimycyna (2); Gm peptyd moricyno-B-podobny (3); lizozym (4); peptyd bogaty w prolinę-2 (5); Gm defensyna (6); apolipoforycyna (7); peptyd bogaty w prolinę-2 (8); peptyd anionowy-2 (9); peptyd cekropino-D-podobny (10); apolipoforyna III (11) Natomiast proporcjonalnie w czasie wzrastała ilość pozostałych badanych peptydów. Już po 8 godzinach od zakażenia w hemolimfie owadów istotnie zwiększył się poziom trzech peptydów, a mianowicie peptydu anionowego-1, Gm defensyny oraz peptydu bogatego w prolinę-2. Należy zaznaczyć, że po 15 godzinach poziom wymienionych peptydów jeszcze wzrósł. Warto zwrócić uwagę na niski poziom wspomnianych peptydów w próbach kontrolnych, jakie stanowiła hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych oraz gąsienic nakłutych sterylną igłą. Dopiero po 15 godzinach od zakażenia znacząco zwiększyła się ilość peptydu moricyno-B-podobnego, cekropino-D-podobnego oraz peptydu bogatego w prolinę-1. Na przykład ilość peptydu cekropino-D-podobnego wzrosła ponad 4-krotnie w porównaniu do gąsienic kontrolnych. Ponadto zakażenie gąsienic bakteriami rosnącymi w podłożu bulionowym (ATCC B oraz 18 B) oraz szczepem klinicznym hodowanym w pożywce minimalnej (18M), skutkowało 5-krotnym zwiększeniem poziomu Gm peptydu moricyno-B-podobnego po 15 godzinach od iniekcji bakterii.

Na podstawie wykonanych analiz można stwierdzić, że najwyższy (blisko 10krotny) przyrost ilości peptydu miał miejsce po 15 godzinach od iniekcji bakterii *Pseudomonas* w przypadku peptydu bogatego w prolinę-2. Natomiast w tym samym czasie od zakażenia w najmniejszym stopniu, tylko 3-krotnie, zwiększył się poziom peptydu bogatego w prolinę-1. Warto wskazać, że peptyd ten jest drugim w kolejności peptydem występującym w największej ilości w hemolimfie gąsienic kontrolnych.

Otrzymane wyniki wskazują, że po zakażeniu owadów bakteriami *P. aeruginosa* dochodzi do pojawienia się w hemolimfie barciaka peptydów o zróżnicowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zarówno przeciwbakteryjnych (przeciw bakteriom Gram-ujemnym i Gram-dodatnim), jak i przeciwgrzybowych.

Dodatkowo w badaniach rejestrowano poziom dwóch białek obecnych w ekstraktach z hemolimfy zakażonych owadów, tj. lizozymu oraz apolipoforyny III. Jeśli chodzi o lizozym, lepszym stymulatorem jego poziomu okazał się szczep kliniczny. Po 15 godzinach od podania owadom tej bakterii zanotowano odpowiednio 4-krotny (18M) oraz 3-krotny (18B) wzrost ilości lizozymu (ryc. 23). Poziom białka apolipoforyny III pozostawał na stałym poziomie zarówno w próbach kontrolnych jak i eksperymentalnych (ryc. 27).

Oprócz tego przeprowadzono dodatkowe analizy po których stwierdzono, że po 15 godzinach od iniekcji w badanych frakcjach zwiększała się ilość dysmutazy ponadtlenkowej (ryc. 28) w odpowiedzi na zakażenie gąsienic bakteriami *P. aeruginosa* (szczep 18 i ATCC) rosnącymi w pożywce bulionowej oraz w pożywce minimalnej (szczep ATCC).

Podsumowując wykonane analizy należy stwierdzić, że nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie badanych białek i peptydów w hemolimfie owadów po zakażeniu szczepami *P. aeruginosa* różniącymi się profilem wywarzanych podczas zakażenia proteaz. Warto jednak wspomnieć, że maksymalne ilości badanych peptydów obserwowano po 15 godzinach w hemolimfie gąsienic zakażonych szczepem klinicznym pochodzącym z podłoża M9. Efekt taki notowano w przypadku czterech spośród sześciu zidentyfikowanych peptydów, których poziom zwiększył się u zakażonych owadów tj. peptydu anionowgo-1, Gm defensyny, peptydu bogatego w prolinę-2 oraz Gm peptydu moricyno-B-podobnego. Szczep kliniczny wytwarzający elastazę (w LB) oraz alkaliczną proteazę (w M9) efektywniej też wpływał na zwiększenie poziomu lizozymu w hemolimfie zakażonych owadów, w porównaniu do szczepu entomopatogennego.



Ryc. 17 Analiza ilościowa peptydu anionowego-1 w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic nakłutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości peptydu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 18 Analiza ilościowa defensyny w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic nakłutych sterylną igłą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości peptydu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 19 Analiza ilościowa peptydu bogatego w prolinę-2 w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic naklutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości peptydu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 20 Analiza ilościowa peptydu bogatego w prolinę-1 w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic naklutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości peptydu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 21 Analiza ilościowa peptydu cekropino-D-podobnego w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic naklutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości peptydu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 22 Analiza ilościowa Gm peptydu moricyno-B-podobnego w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic naklutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości peptydu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 23 Poziom lizozymu w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic naklutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości białka w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli



Ryc. 24 Analiza ilościowa peptydu anionowego-2 w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic nakłutych sterylną igłą (I)



Ryc. 25 Analiza ilościowa Gm gallerimycyny w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic nakłutych sterylną igłą (I)



Ryc. 26 Analiza ilościowa apolipoforycyny w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic naklutych sterylną igłą (I)



Ryc. 27 Poziom apolipoforyny III w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic nakłutych sterylną igłą (I)



Ryc. 28 Analiza ilościowa dysmutazy ponadtlenkowej w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18) *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub bulionie odżywczym (B). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych (NH) oraz gąsienic nakłutych sterylną iglą (I). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost ilości enzymu w hemolimfie zakażonych owadów w porównaniu do kontroli

4.2. Rola alkalicznej proteazy *P. aeruginosa* w procesie indukowania /przełamywania humoralnej odpowiedzi odpornościowej gąsienic *G. mellonella*

Ważnym czynnikiem wirulencji bakterii *P. aeruginosa* jest alkaliczna proteaza, wytwarzana zarówno podczas zakażenia, jak i podczas wzrostu bakterii w podłożu hodowlanym (Andrejko i in., 2013b). Pomimo tego, że nie udało się wykazać zdecydowanych różnic jakościowych i ilościowych pomiędzy peptydami syntetyzowanymi po zakażeniu owadów badanymi szczepami, zaobserwowano jednak, że izolat kliniczny, wytwarzający podczas zakażenia alkaliczną proteazę, okazał się skutecznym induktorem odpowiedzi immunologicznej owada. Dlatego też w kolejnym etapie pracy skupiono się, na sprawdzeniu jaki wpływ na wybrane elementy układu odpornościowego gąsienic barciaka może mieć iniekcja alkalicznej proteazy do hemocelu owada.

W tej serii doświadczalnej analizowano indukcję syntezy peptydów odpornościowych oraz aktywność układu oksydazy fenolowej w hemolimfie owadów immunizowanych alkaliczną proteazą szczepu klinicznego 02/18, charakteryzującego się obniżonym poziomem ekspresji enzymów proteolitycznych.

Biorąc pod uwagę fakt, że alkaliczna proteaza należy do enzymów zewnątrzkomórkowych, w pierwszym etapie prześledzono kinetykę pojawiania się enzymu, podczas wzrostu bakterii w pożywce minimalnej. Próby pobierano po 6, 18, 24 i 30 godzinach od przesiania bakterii do pożywki (podrozdział 3.4.2.). Następnie bakterie odwirowywano (15 minut, 8000 rcf, 4°C), osad odrzucano a supernatant poddawano dalszej analizie. W celu potwierdzenia obecności alkalicznej proteazy w badanym materiale stosowano elektroforezę SDS-PAGE i transfer białek na membranę PVDF, którą następnie inkubowano z przeciwciałami przeciw alkalicznej proteazie (podrozdział 3.4.19., 3.4.25. oraz 3.4.26.). Dodatkowo stosowano metodę zymografii w celu wizualizacji aktywności proteolitycznej badanego enzymu (podrozdział 3.4.22.).

Na podstawie uzyskanych wyników badań zamieszczonych na ryc. 29A można stwierdzić, że alkaliczna proteaza była obecna w badanych próbach supernatantu, co wykazano metodą immunoblotting'u. Ilość enzymu stopniowo rosła osiągając maksymalny poziom po 24 godzinach. Po tym samym czasie obserwowano też największą aktywność proteolityczną alkalicznej proteazy, o czym świadczy wyraźne przejaśnienie widoczne na żelu poliakrylamidowym z żelatyną (ryc. 29 B). Dlatego też jako materiał wyjściowy przeznaczony do pozyskiwania oczyszczonego enzymu - alkalicznej proteazy wybrana została 24-godzinna hodowla bakterii *P. aeruginosa* w podłożu minimalnym M9.



Ryc. 29 Identyfikacja alkalicznej proteazy w płynie pohodowlanym po 6, 18, 24, 30 godzinach od przesiania *P. aeruginosa*. A. Aktywność proteolityczna alkalicznej proteazy (0,5-1 μg) w płynie pohodowlanym - analiza zymograficzna. B. Detekcja alkalicznej proteazy (0,5-1μg) w płynie pohodowlanym za pomocą metody immunoblotting'u

4.2.1. Oczyszczanie alkalicznej proteazy metodą chromatografii jonowymiennej

W badaniach mających na celu określenie roli alkalicznej proteazy podczas zakażenia, enzym otrzymywano z płynu pohodowlanego bakterii *P. aeruginosa* (szczep kliniczny 02/18), jak opisano w podrozdziale 3.4.3. W pierwszym etapie 24-godzinną hodowlę bakteryjną, prowadzoną w pożywce minimalnej odwirowywano (8000 rcf, 15 minut, 4°C), w celu pozbycia się bakterii. Następnie supernatant wysalano siarczanem amonu (0-90%) i osadzano białka poprzez wirowanie przy powyższych parametrach. Zebrany osad rozpuszczano w 50 mM buforze Tris-HCl pH 8 i dializowano, wobec tego samego buforu. Następnie mieszaninę białek rozdzielano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-celuloza, po czym zbierano uzyskane frakcje chromatograficzne, których aktywność proteolityczną badano metodą zymografii (podrozdział 3.4.22.).

Na podstawie uzyskanego obrazu elektroforetycznego (ryc. 30) stwierdzono, że badany enzym był eluowany ze złoża po zastosowaniu 50 mM buforu Tris-HCl pH 8 z 0,2 M NaCl (frakcja 0,2). Dodatkowo otrzymaną frakcję (2 μg białka) poddano analizie zymograficznej z zastosowaniem elektroforezy dwuwymiarowej (2D). Analiza elektroforetyczna uwidoczniła aktywność proteolityczną białka o masie około 52 kDa (ryc. 31).



Ryc. 30 Analiza zymograficzna frakcji (2 μg) uzyskanych w wyniku rozdziału za pomocą chromatografii jonowymiennej. NZ-frakcja zawierająca białka niezwiązane ze złożem; 0,2- frakcja zawierająca białka eluowane ze złoża po zastosowaniu buforu Tris-HCl pH 8 z 0,2 M NaCl; 0,7- frakcja zawierająca białka uzyskane po zastosowaniu buforu Tris-HCl pH 8 z 0,7 M NaCl



Ryc. 31 Aktywność proteolityczna alkalicznej proteazy (2 μg) we frakcji chromatograficznej (0,2) - metoda zymografii po elektroforezie 2D

W celu potwierdzenia obecności alkalicznej proteazy we frakcji chromatograficznej w kolejnym etapie dokonywano detekcji enzymu metodą immunoblotting'u, po rozdziale frakcji metodą SDS-PAGE oraz 2D. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że przeciwciała przyłączały się do białka o masie około 52 kDa i pI około 4,5, co wskazywało na obecność w badanej próbie alkalicznej proteazy. Należy zaznaczyć, że na podstawie sekwencji aminokwasów alkalicznej proteazy wyliczono, że teoretyczny punkt izoelektryczny tego białka wynosi 4,28 (ryc. 32 A i B, Andrejko i in., 2019). Dodatkowo obecności alkalicznej proteazy we frakcji chromatograficznej (0,2 M) potwierdzono metodą LC-MS-MS/MS, poddając analizie prążek (przejaśnienie) wycięty z żelu poliakrylamidowego po zymografii (ryc.30, podrozdział 3.4.4.).

 $AP \xrightarrow{PI} 10$

Ryc. 32 Detekcja alkalicznej proteazy (5 μg białka) metodą immunoblotting'u A. Elektroforeza jednokierunkowa B. Elektroforeza dwukierunkowa

Warto zaznaczyć, że alkaliczna proteaza wytwarzana przez szczep kliniczny *P. aeruginosa* wykazuje wyjątkową zdolność do renaturacji. Zaobserwowano, że po 30 minutowej inkubacji frakcji zawierającej alkaliczną proteazę w zakresie temperatur od 60 do 95°C aktywność enzymu osiągała poziom zbliżony do poziomu aktywności próby kontrolnej, nawet po denaturacji w najwyższych stosowanych temperaturach. Zdolność do renaturacji została potwierdzona przez wykonane analizy fluorescencyjne. Różnica pomiędzy intensywnością fluorescencji zdenaturowanego, a następnie zrenaturowanego białka enzymu a intensywnością fluorescencji natywnego białka wynosiła około 80%. Ponadto za pomocą spektroskopu w podczerwieni (FTIR) wykazano, że inkubacja

В.

A.

100

alkalicznej proteazy w temperaturach 60°C oraz 90°C wywierała tylko nieznaczny wpływ na intensywność absorbancji oraz kształt pasma amidu I, który jest wyznacznikiem zmian w II-rzędowej strukturze białka (ryc. 33; Andrejko i in, 2019). Zaobserwowana właściwość alkalicznej proteazy została wykorzystana w wybranych eksperymentach opisanych w dalszej części pracy, na przykład w badaniach dotyczących wpływu enzymu na indukcję syntezy peptydów odpornościowych w hemolimfie barciaka większego.



Ryc. 33 Zdolność do renaturacji alkalicznej proteazy szczepu klinicznego *P. aeruginosa*. Frakcję chromatograficzną (1 μg) zawierającą alkaliczną proteazę inkubowano w temperaturze 60-95°C przez 30 minut. Aktywność enzymu określono z wykorzystaniem metody zymografii. K - frakcja nie poddana ogrzewaniu

W związku z tym, że frakcję chromatograficzną zawierającą alkaliczną proteazę planowano wykorzystać w badaniach reakcji odpornościowych owada, w pierwszym etapie sprawdzono przeżywalność gąsienic po iniekcji do hemocelu oczyszczonego enzymu w dawkach 0,8; 1,2; 1,6; oraz 2 µg białka/gąsienicę. Śmiertelność oceniano przez 72 godziny. Gąsienice traktowane proteazą w dawkach 1,2; 1,6; oraz 2 µg/gąsienicę wykazywały odpowiednio 30, 50 i 80 % śmiertelność. Dlatego też do dalszych doświadczeń, wybrana została dawka 0,8 µg/gąsienicę alkalicznej proteazy, po której otrzymano prawie 100% przeżywalność gąsienic w badanym czasie (Andrejko i Siemińska, 2016).

4.2.2. Wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy w badaniach *in vivo*

Aktywacja układu oksydazy fenolowej jest jedną z najszybszych reakcji odpornościowych owadów i jest uruchamiana w momencie zranienia czy rozpoznania przez receptory gospodarza charakterystycznych struktur molekularnych obecnych w ścianie komórkowej drobnoustrojów, np. lipopolisacharydu (LPS), peptydoglikanu (PG) oraz β-1,3-glukanu. Końcowym produktem reakcji katalizowanej przez fenoloksydazę jest melanina. Proces melanizacji wspomaga organizm w gojeniu ran, twardnieniu oskórka, tworzeniu skrzepu, a także w utrzymaniu homeostazy jelita (Cerenius i in., 2008; Kanost i in., 2004; Lu i Jang, 2007; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010). Zarówno melanina, jak i cytotoksyczne produkty pośrednie wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe i zapobiegają rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów chorobotwórczych w organizmie gospodarza (Sugumaran, 2002; Lee i Miura, 2014).

Jak wynika z badań przeprowadzonych w Zakładzie Immunobiologii u gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych bakteriami *P. aeruginosa* dochodzi do aktywacji układu oksydazy fenolowej. W przypadku szczepów bakteryjnych wytwarzających alkaliczną proteazę zanotowano wyraźny wzrost aktywności oksydazy w pierwszych 6 godzinach od zakażenia, po czym wraz z rozwojem bakteriemii w hemolimfie następował stopniowy spadek aktywności enzymu (Andrejko i in., 2014). W związku z tym w pracy podjęto badania mające na celu sprawdzenie, czy aplikacja alkalicznej proteazy *P. aeruginosa*, istotnego czynnika wirulencji tej bakterii może odpowiadać za uzyskane zmiany aktywności fenoloksydazy w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*.

Owadom aplikowano alkaliczną proteazę (AP) pozyskaną z płynu pohodowlanego szczepu klinicznego 02/18 bakterii *P. aeruginosa* rosnących w pożywce minimalnej, według procedury zamieszczonej w podrozdziale 3.4.3. Do hemocelu gąsienic wprowadzano proteazę w dawce 0,8 μg/ gąsienicę. Dla porównania, owady immunizowano bakteriami *P. aeruginosa* (szczep 02/18) zabitymi ogrzewaniem (podrozdział 3.4.7.). Następnie pobierano hemolimfę po 2, 4, 8, 15 i 24 godzinach od iniekcji (podrozdział 3.4.8.). Jako grupę kontrolną w doświadczeniu stosowano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych. Oznaczanie poziomu aktywności oksydazy fenolowej (PO) przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziałe 3.4.16. Wyniki eksperymentów uzyskane po 90-minutowej inkubacji mieszaniny reakcyjnej z substratem L-3,4-dihydroksyfenyloalaniną przedstawiono na wykresie (ryc. 34 A).





Ryc. 34 Zmiany poziomu aktywności fenoloksydazy w hemolimfie gąsienic G. mellonella. Aktywność PO była mierzona w hemolimfie pobieranej po 2, 4, 8, 15 i 24 godzinach po iniekcji alkalicznej proteazy (AP) lub bakterii zabitych ogrzewaniem (zPa). Kontrolę stanowiła hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH). A. Aktywność fenoloksydazy po 90 minutach od momentu dodania substratu do mieszaniny reakcyjnej. Każdy punkt reprezentuje średnią ± SD. ^{a,b} Różne litery wskazują istotną różnicę wartości aktywności oksydazy fenolowej dla poszczególnych wariantów doświadczenia; B. Hamowanie procesu tworzenia melaniny w hemolimfie gąsienic. Fotografia fragmentu 96-dołkowej płytki stosowanej do oznaczania aktywności PO przedstawionej w postaci wykresów A

Jak wynika z przeprowadzonych badań, immunizacja gąsienic zabitymi ogrzewaniem bakteriami *P. aeruginosa* powodowała stymulację aktywności fenoloksydazy w hemolimfie gąsienic po upływie 8, 15 i 24 godzin od podania immunogenu. Aktywność PO w hemolimfie gąsienic, niezależnie od czasu pomiaru, była przynajmniej 5-krotnie większa niż w przypadku gąsienic nieimmunizowanych, stanowiących kontrolę w doświadczeniu.

Po aplikacji gąsienicom alkalicznej proteazy, istotny statystycznie przyrost aktywności PO w hemolimfie notowano po 8 godzinach od iniekcji, podobnie jak w przypadku immunizacji bakteriami. Należy zaznaczyć, że po tym czasie zmierzona aktywność kształtowała się na zbliżonym poziomie zarówno po iniekcji proteazy, jak i zabitych bakterii (A₄₉₀ = 6-7). Natomiast po 15 oraz 24 godzinach od wprowadzenia alkalicznej proteazy do hemocelu owada aktywność oksydazy okazała się prawie 5-krotnie mniejsza w porównaniu do poziomu obserwowanego po 8 godzinach, tym samym osiągając wartość porównywalną do aktywności PO w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych. Na uwagę zasługuje fakt, że zahamowanie aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic, którym podano alkaliczną proteazę miało charakter trwały, co potwierdza zdjęcie płytki z mieszaniną reakcyjną stosowaną do oznaczania aktywności fenoloksydazy wykonane po 24 godzinach od zakończenia doświadczenia. W próbach hemolimfy pobranych po 15 oraz 24 godzinach po aplikacji AP zwraca uwagę brak melaniny (ryc. 34 B).

W celu uwidocznienia zmian aktywności oksydazy fenolowej po iniekcji gąsienicom alkalicznej proteazy, próby hemolimfy poddano rozdziałowi elektroforetycznemu w warunkach niedenaturujących (podrozdział 3.4.20.). Podobnie jak w przypadku wcześniejszych doświadczeń *in vivo* gąsienicom aplikowano alkaliczną proteazę (0,8 µg/gąsienicę) oraz zabite bakterie *P. aeruginosa*. Jako kontrolę przyjęto hemolimfę owadów nieimmunizowanych. Hemolimfę pobierano po 2, 4, 8, 15 i 24 godzinach od iniekcji, po czym pozbawiano hemocytów poprzez wirowanie i dokonywano rozdziału hemolimfy za pomocą elektroforezy (podrozdział 3.4.8. i 3.4.20.). Następnie, żele inkubowano w obecności L-DOPA do momentu pojawienia się melaniny (podrozdział 3.4.16.).

Na obrazie elektroforetycznym obserwowano zwiększoną aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic, którym zaaplikowano alkaliczną proteazę (ryc. 35). W porównaniu do hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych po 2, 4 i 8 godzinach od iniekcji do hemocelu gąsienic proteazy spostrzeżono pojawiające się skupiska melaniny, świadczące o działaniu oksydazy fenolowej. Natomiast po 15 i 24 godzinach od aplikacji AP, w badanych próbach hemolimfy były obecne jedynie śladowe ilości melaniny, podobnie jak w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych (NH).



Ryc. 35 Aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic po 2, 4, 8, 15, 24 godzinach od iniekcji alkalicznej proteazy, AP (0,8 μg/gąsienicę). Kontrola- hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH). Ramką wskazano obszar występowania skupisk melaniny

wyższą Znacznie aktywność fenoloksydazy zaobserwowano na elektroforegramie W przypadku prób zawierających hemolimfe gasienic immunizowanych bakteriami zabitymi ogrzewaniem, w szczególności po 8, 15 i 24 godzinach od iniekcji, co wnioskowano na podstawie widocznych skupisk melaniny (ryc. 36).



Ryc. 36 Detekcja aktywności oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic po 2, 4, 8, 15, 24 godzinach od immunizacji bakteriami zabitymi ogrzewaniem (zPa). Kontrola- hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH)

W badaniach wstępnych sprawdzono wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie owadów po 30 oraz 60 minutach od podania proteazy. Gąsienicom aplikowano alkaliczną proteazę w dawce standardowej stosowanej w wyżej opisanych eksperymentach tj. 0,8 µg/gąsienicę oraz w dawce ponad 3-krotnie wyższej tj. 3 µg/gąsienicę. Na podstawie wyników zamieszczonych na ryc. 37 A można stwierdzić, że już po 30 minutach od podania proteazy w obydwu stosowanych dawkach doszło do aktywacji układu PO w hemolimfie. Nieznacznie wyższy poziom oksydazy fenolowej zanotowano po iniekcji AP w dawce 3 µg/gąsienicę. Jednak, po 60 minutach od iniekcji dalszy wzrost aktywności oksydazy zanotowano jedynie u owadów, którym podano mniejszą dawkę proteazy. Poziom aktywności w tym czasie był zbliżony do obserwowanego w hemolimfie po 2 godzinach (ryc. 37 A).



0	0			0
NH	30 min	60 min	30 min	60 min
	0,8 µg AP		3 µg AP	

Ryc. 37 Zmiany poziomu aktywności oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic po 30 i 60 minutach od aplikacji do hemocelu alkalicznej proteazy (AP) w dawkach 0,8 μg/gąsienicę oraz 3 μg/gąsienicę. Kontrolę stanowiła hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH). A. Aktywność oksydazy fenolowej po 90 minutach od momentu dodania substratu do mieszaniny reakcyjnej. Doświadczenie wykonano jednokrotnie w 4 powtórzeniach. Każdy punkt reprezentuje średnią ± SD. ^{a,b,c,d} Różne litery wskazują znaczącą różnicę wartości aktywności oksydazy fenolowej dla poszczególnych wariantów doświadczenia, B. Hamowanie tworzenia melaniny w hemolimfie gąsienic. Fotografia fragmentu 96-dołkowej płytki stosowanej do oznaczania aktywności PO przedstawionej w postaci wykresu A

Natomiast po iniekcji owadom alkalicznej proteazy w dawce 3 µg/gąsienicę, aktywność fenoloksydazy po 60 minutach nie zmieniła się istotnie w stosunku do tej uzyskanej po 30 minutach. W próbach hemolimfy wyraźnie zauważalny jest brak melaniny na zamieszczonej fotografii na ryc. 37 B.

Na ryc. 38 przedstawiono aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic, którym aplikowano alkaliczną proteazę w dawce (0,8 µg/gąsienicę) oraz dawce 3 µg/gąsienicę. Analizując powyższy obraz elektroforetyczny można stwierdzić, że po wprowadzeniu proteazy do hemocelu owada już po 30 minutach dochodzi do wzrostu aktywności fenoloksydazy, w porównaniu do hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych. Jednak różnice w aktywności fenoloksydazy

obserwowane na elektroforegramie nie są tak wyraźne, jak w przypadku wyników pokazanych na wykresie (ryc. 37 A), uzyskanych za pomocą metody spektrofotometrycznej.



Ryc. 38 Obraz elektroforetyczny aktywności oksydazy fenolowej po aplikacji do hemocelu owada alkalicznej proteazy w dawkach 0,8 μg/gąsienicę i 3 μg/gąsienicę. Hemolimfę pobierano po 30 i 60 minutach od iniekcji. Kontrola- hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH)

Podsumowując wyniki eksperymentów *in vivo* otrzymane metodą spektrofotometryczną oraz elektroforetyczną można stwierdzić, że aplikacja gąsienicom alkalicznej proteazy, podobnie jak w przypadku zabitych bakterii *P. aeruginosa* powoduje wyraźny wzrost aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie owadów (w czasie od 30 minut do 8 godzin). Następnie, poziom aktywności PO znacząco spada w wyniku działania alkalicznej proteazy (po około 15 godzinach). Natomiast w hemolimfie gąsienic zakażonych bakteriami utrzymuje się na podwyższonym poziomie. Wyniki wstępnych badań wskazują, że hamowanie aktywności PO przez alkaliczną proteazę jest reakcją wyraźnie zależną od dawki. Alkaliczna proteaza użyta w dawce 3 µg/ gąsienicę skutecznie hamuje aktywność oksydazy już po 60 minutach od podania, tym samym wpływając negatywnie na proces tworzenia melaniny w hemolimfie gąsienic.

4.2.3. Wpływ alkalicznej proteazy na aktywność oksydazy fenolowej w badaniach *in vitro*

Oksydaza fenolowa występuje u owadów w hemolimfie i hemocytach w formie nieaktywnej, określanej jako profenoloksydaza (proPO). Uruchomienie kaskady proteaz serynowych, prowadzi do konwersji profenoloksydazy do formy aktywnej oksydazy fenolowej, co odbywa się na drodze ograniczonej proteolizy
przeprowadzanej przez proteinazę aktywującą proPO (Park i in., 2007). W związku z zaobserwowanym w warunkach *in vivo* skutecznym hamowaniem aktywności oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic po 15 godzinach od iniekcji proteazy, celem badań *in vitro* była próba określenia mechanizmu działania alkalicznej proteazy.

Do badań *in vitro* stosowano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych z nieaktywną oksydazą fenolową. W celu sprawdzenia wpływu alkalicznej proteazy na reakcję katalizowaną przez oksydazę fenolową aktywowano ją laminaryną, następnie prowadzono 30-minutową inkubację hemolimfy z alkaliczną proteazą w temperaturze pokojowej (próba eksperymentalna) lub bez (próba kontrolna). W kolejnym etapie dodawano L-DOPA i mierzono absorbancję spektrofotometrem (podrozdział 3.4.18.).



Ryc. 39 Wpływ alkalicznej proteazy na działanie zaktywowanej oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic. Próba eksperymentalna składała się z aktywowanej laminaryną PO hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych oraz alkalicznej proteazy (AP). Próba kontrolna nie zawierała AP. Każdy punkt reprezentuje średnią ± SD. ^{a,b} Różne litery oznaczają istotne różnice w wartości aktywności oksydazy fenolowej dla poszczególnych wariantów doświadczenia

Z przedstawionych danych na wykresie (ryc. 39) wynika, że doszło do wzrostu aktywności oksydazy fenolowej w obu próbach, zarówno w czasie 0 jak i po 15 minutach inkubacji z substratem.

W kolejnych badaniach *in vitro* w celu ujednolicenia czasu inkubacji hemolimfy z alkaliczną proteazą, wykonano równocześnie próbę spektrofotometryczną oraz próbę do rozdziału elektroforetycznego, o tym samym składzie (podrozdział 3.4.16.). W testach wykorzystano hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych oraz gąsienic immunizowanych zabitymi bakteriami *P. aeruginosa* (podrozdział 3.4.7.).

A.



NH zPa NH+AP zPa+AP



Ryc. 40 Hamowanie procesu melanogenezy w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* w warunkach *in vitro*. Próby eksperymentalne zawierały hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych (NH) lub gąsienic immunizowanych bakteriami zabitymi ogrzewaniem (zPa) inkubowaną z alkaliczną proteazą (AP). Próby kontrolne nie zawierały AP. A. Obraz elektroforetyczny aktywności oksydazy fenolowej po inkubacji AP z hemolimfą gąsienic NH i zPa. B. Zdjęcie fragmentu 96-dołkowej płytki stosowanej do pomiaru aktywności fenoloksydazy po inkubacji AP z hemolimfą gąsienic NH i zPa

Na obrazie elektroforetycznym (ryc. 40 A) w próbach kontrolnych nie zawierających alkalicznej proteazy wyraźnie widoczna jest obecność melaniny, co wskazuje na aktywność PO w hemolimfie. Natomiast w próbie zawierającej hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych inkubowaną z AP, nie obserwowano wytworzenia melaniny, najprawdopodobniej na skutek zahamowania aktywności PO. W hemolimfie gąsienic immunizowanych bakteriami, czyli zawierającej zaktywowaną PO, alkaliczna proteaza mniej skutecznie hamowała aktywność badanego enzymu. Należy wspomnieć, że po 24 godzinach od zakończenia eksperymentu, wciąż obserwowano zahamowanie aktywności oksydazy fenolowej w próbie zawierającej hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych z dodatkiem alkalicznej proteazy. Fakt ten potwierdza wykonana fotografia (ryc. 40 B) fragmentu płytki 96-dołkowej wykorzystywanej do oznaczania aktywności oksydazy fenolowej.

W przypadku badań dotyczących procesu aktywacji proPO, hemolimfę owadów nieimmunizowanych inkubowano bezpośrednio z alkaliczną proteazą (próba

В.

eksperymentalna) lub bez (próba kontrolna) przez 50 minut w temperaturze 4°C. Po tym czasie dodawano substrat L-3,4-dihydroksyfenyloalaninę i bezzwłocznie mierzono absorbancję za pomocą spektrofotometru, jak opisano w podrozdziale 3.4.17.





Z analizy uzyskanych danych wynika, że w próbie zawierającej alkaliczną proteazę doszło do spadku (o 50%) poziomu aktywności oksydazy fenolowej w badanej hemolimfie gąsienic w stosunku do kontroli (ryc. 41).

W oparciu o otrzymane wyniki eksperymentów przeprowadzonych w warunkach *in vitro* należy przypuszczać, że alkaliczna proteaza skutecznie hamuje aktywację proPO. Natomiast nie działa lub działa w znacznie mniejszym stopniu na reakcję utleniania L-DOPA przez oksydazę fenolową.

4.2.4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa hemolimfy gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą

Celem kolejnych badań było sprawdzenie czy po aplikacji alkalicznej proteazy do hemocelu owada dochodzi do indukcji syntezy peptydów odpornościowych i tym samym do wzrostu aktywności przeciwdrobnoustrojowej hemolimfy. Enzym otrzymywano standardowo z płynu pohodowlanego bakterii *P. aeruginosa* (szczep 02/18) według procedury opisanej w podrozdziale 3.4.3.

Gąsienicom podawano frakcję chromatograficzną zawierającą alkaliczną proteazę w dawce 0,8 µg białka/gąsienicę. Dla porównania, kolejną grupę owadów immunizowano zabitymi ogrzewaniem bakteriami P. aeruginosa (szczep 02/18) (podrozdział 3.4.7.). Grupe kontrolna stanowiła hemolimfa gasienic nieimmunizowanych. Po 4, 8, 15, 24 i 48 godzinach ze wszystkich owadów pobierano próbki hemolimfy (podrozdział 3.4.8.). Dodatkowo w doświadczeniach zastosowano ekstrakty z hemolimfy, zawierające białka i peptydy o masie poniżej 30 kDa (podrozdział 3.4.9.). Aktywność przeciwdrobnoustrojową w hemolimfie gasienic G. mellonella immunizowanych alkaliczną proteazą określano na podstawie stref zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowej E. coli (aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych) oraz grzyba A. niger (aktywność przeciwgrzybowa) metoda dyfuzji radialnej (podrozdział 3.4.12. i 3.4.15.).

Istotny wzrost aktywności przeciwbakteryjnej wykazano w hemolimfie owadów po 15 godzinach od iniekcji alkalicznej proteazy (ryc. 42A). Natomiast maksymalny poziom, odpowiadający około 4 μ M cekropiny B, notowano po 24 godzinach. Aktywność ta porównywalna była do poziomu uzyskanego po tym samym czasie w hemolimfie owadów immunizowanych bakteriami. W badanych ekstraktach z hemolimfy aktywność przeciwbakteryjna była zdecydowanie mniejsza w porównaniu do hemolimfy pełnej (ryc. 42B). Należy zaznaczyć, że kinetyka pojawiania się badanej aktywności po aplikacji owadom alkalicznej proteazy miała podobny przebieg, jak w przypadku hemolimfy otrzymanej z gąsienic immunizowanych zabitymi bakteriami *P. aeruginosa* (Andrejko i Siemińska, 2016).

Aktywność przeciwgrzybowa oceniana na podstawie stref zahamowania wzrostu *A. niger* była obserwowana w hemolimfie i w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 15 godzinach od aplikacji alkalicznej proteazy (ryc. 43). Aktywność hemolimfy utrzymywała się na wysokim poziomie, odpowiadającym około 140 μm amfoterycyny B, nawet po 48 godzinach od iniekcji. W hemolimfie gąsienic immunizowanych bakteriami *P. aeruginosa* aktywność pojawiała się dopiero po 24

godzinach i była prawie 2-krotnie niższa w porównaniu do aktywności gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą (ryc. 43).



A.

Β.



Ryc. 42 Kinetyka zmian w poziomie aktywności przeciw bakteriom G(-) w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 4, 8, 15, 24 oraz 48 godzinach od immunizacji bakteriami zabitymi ogrzewaniem (zPa) oraz alkaliczną proteazą (AP). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie immunizowanych owadów w porównaniu do kontroli



Β.



Ryc. 43 Kinetyka zmian w poziomie aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 4, 8, 15, 24 oraz 48 godzinach od immunizacji bakteriami zabitymi ogrzewaniem (zPa) oraz alkaliczną proteazą (AP). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH). Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie immunizowanych owadów w porównaniu do kontroli

W kolejnych doświadczeniach poziom aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy gąsienic *G. mellonella*, którym aplikowano alkaliczną proteazę oceniano metodą bioautografii, po uprzednim rozdziale białek i peptydów za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (podrozdział 3.4.19. i 3.4.23.). Strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* pojawiały się na żelu poliakrylamidowym w okolicy migracji syntetycznej cekropiny B o masie 3,8 kDa, co może wskazywać na obecność

A.

w hemolimfie niskocząsteczkowych peptydów odpornościowych, wykazujących właściwości przeciwbakteryjne (Andrejko i Siemińska, 2016). Następnie metodą bioautografii oceniano poziom aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy gąsienic *G. mellonella*, które immunizowano dwoma różnymi dawkami alkalicznej proteazy, tj. 0,8 oraz 1,6 µg białka/ gąsienicę oraz proteazą (0,8 µg) poddaną denaturacji (98°C, 30 min.). Dla porównania w doświadczeniach użyto również hemolimfy gąsienic nakłutych saprofitycznymi bakteriami *E. coli*, standardowo stosowanymi do pobudzania układu odpornościowego owada (kontrola pozytywna).



Ryc. 44 Bioautografia – wizualizacja aktywności przeciwbakteryjnej białek i peptydów hemolimfy po 24 godzinach od iniekcji alkalicznej proteazy (AP 24h) w dawce 0,8 μg/gąsienicę i 1,6 μg/gąsienicę oraz po iniekcji alkalicznej proteazy w dawce 0,8 μg/gąsienicę poddanej 30-minutowej inkubacji w 98°C (0,8 μg 98°C). Hemolimfa gąsienic immunizowanych bakterią *E. coli* (*E. coli* 24h). Fotografia żelu obrazującego wyraźne (jaśniejsze) strefy zahamowania wzrostu *E. coli*

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych na ryc. 44 stwierdzono, że iniekcja gąsienicom *G. mellonella* alkalicznej proteazy spowodowała pojawianie się aktywności przeciwbakteryjnej we wszystkich badanych próbach. Strefy zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowej, obecnej w podłożu pokrywającym żel, były zlokalizowane na podobnej wysokości jak strefa powstała w wyniku immunizacji gąsienic bakteriami *E. coli*. Należy zaznaczyć, że największą aktywność odnotowano w hemolimfie owadów, którym zaaplikowano proteazę poddaną ogrzewaniu (98°C).

Dodatkowo wykonano rozdział elektroforetyczny białek pełnej hemolimfy owadów po aplikacji alkalicznej proteazy w dawce 0,8 µg/gąsienicę (ryc.45). Hemolimfę pobierano po 15 i 24 godzinach od wstrzyknięcia enzymu (podrozdział 3.4.8.). Grupę kontrolną stanowiła hemolimfa gąsienic, którym podano przez iniekcję jałową wodę (3 µl). Analiza uzyskanego obrazu elektroforetycznego zamieszczonego na ryc. 45 wykazała, że w wyniku iniekcji alkalicznej proteazy w obu wariantach czasowych doszło do degradacji białek hemolimfy o masach cząsteczkowych w zakresie 38 - 45 kDa, oraz około 14,4 kDa. Zaobserwowano także pojawienie się nowych prążków białkowych o masach cząsteczkowych w zakresie 31-35 kDa, które mogą być produktami degradacji białek o wyższej masie.



Ryc. 45 Degradacja białek i peptydów hemolimfy gąsienic poddanych immunizacji alkaliczną proteazą (AP, 0,8 μg/ gąsienicę). Hemolimfę pobierano po 15 i 24 godzinach. Grupę kontrolną (K) stanowiła hemolimfa gąsienic po iniekcji jałowej wody (3 μl). Ramkami zaznaczono obszary, w których doszło do zmian ilościowych i/ lub jakościowych białek hemolimfy

4.2.5. Analiza profili białkowo-peptydowych hemolimfy owadów immunizowanych alkaliczną proteazą

W celu uwidocznienia zmian w profilach białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic traktowanych alkaliczną proteazą w porównaniu do hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych wykonano ekstrakty metanolowe według procedury zamieszczonej w podrozdziale 3.4.9. Następnie dokonano separacji polipeptydów ekstraktów za pomocą jednokierunkowej elektroforezy trycynowej (podrozdział 3.4.21.). Analizując uzyskane elektroforegramy (ryc. 46) zauważono, że po aplikacji do hemocelu owada proteazy w dawkach 0,8 µg oraz 1,6 µg/gąsienicę dochodzi do pojawienia się dodatkowych prążków peptydowych o masie poniżej 6,5 kDa, których nie obserwowano w kontroli. Szczególnie wyraźne prążki odpowiadające peptydom niskocząsteczkowym zaobserwowano w próbie zawierającej ekstrakt z hemolimfy owadów po aplikacji alkalicznej proteazy poddanej denaturacji.



Ryc. 46 Profile białkowo-peptydowe hemolimfy gąsienic po 24 godzinach od iniekcji alkalicznej proteazy - elektroforeza trycynowa. Ekstrakty z hemolimfy gąsienic po iniekcji: alkalicznej proteazy w dawce 0,8 μg/gąsienicę; 1,6 μg/gąsienicę oraz alkalicznej proteazy w dawce 0,8 μg/gąsienicę po 30-minutowej inkubacji w 98°C (0,8 μg 98°C). Gwiazdki (*) wskazują poziom peptydów o masie poniżej 6,5 kDa

W kolejnych doświadczeniach sprawdzano, czy na indukcję syntezy peptydów ma wpływ dawka alkalicznej proteazy stosowana do immunizacji oraz czas, który upłynął od iniekcji do pobrania hemolimfy. W tym celu metodą elektroforezy trycynowej analizowano zmiany w profilach białkowo-peptydowych ekstraktów otrzymanych z hemolimfy gąsienic immunizowanych proteazą użytą w następujących dawkach: 0,3; 0,6; 1,6; 2,4 oraz 3,2µg białka/gąsienicę (podrozdział 3.4.9. i 3.4.21.). Hemolimfę pobierano po 48 i 72 godzinach od iniekcji (podrozdział 3.4.7. i 3.4.8.).

Na podstawie uzyskanego obrazu elektroforetycznego (ryc. 47) można stwierdzić, że wprowadzenie do hemocelu owada alkalicznej proteazy w dawkach od 0,3 µg do 1,6 µg białka/gąsienicę skutkowało pojawieniem się peptydów niskocząsteczkowych, których podwyższony poziom utrzymywał się do 72 godzin. Ponadto na analizowanych elektroforegramach zaobserwowano, że w hemolimfie gąsienic, które otrzymały najwyższe stosowane w doświadczeniu dawki enzymu (2,4 i 3,2 µg) zaobserwowano śladową ilość peptydów, podobnie jak u gąsienic kontrolnych. Powyższa obserwacja może świadczyć o zachodzącym w hemolimfie procesie degradacji peptydów przeprowadzanym przez alkaliczną proteazę.

W celu bardziej szczegółowej analizy profili białkowo-peptydowych przeprowadzono rozdział wybranych ekstraktów hemolimfy gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą za pomocą elektroforezy dwukierunkowej (podrozdział 3.4.24. oraz 3.4.21.).



Ryc. 47 Wpływ różnych dawek alkalicznej proteazy na pojawianie się peptydów niskocząsteczkowych w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* - elektroforeza trycynowa. Ekstrakty wykonano z hemolimfy pobieranej po 48 i 72 godzinach od iniekcji. K - ekstrakt z hemolimfy gąsienic po nakluciu. Gwiazdki (*) wskazują poziom peptydów o masie poniżej 6,5 kDa

Technika elektroforezy 2D pozwala na separację białek zależnie od ich punktów izoelektrycznych w pierwszym wymiarze, a następnie na podstawie ich masy cząsteczkowej w drugim wymiarze. Rozdziałowi poddano 100 µg białka ekstraktu z hemolimfy gąsienic immunizowanych: alkaliczną proteazą w dawce 0,8 µg i 1,6 µg; alkaliczną proteazą (0,8 µg) poddaną 30-minutowej inkubacji w temperaturze 98°C lub zabitymi ogrzewaniem komórkami *P. aeruginosa* (podrozdział 3.4.7. – 3.4.9.). Kontrolę stanowiły ekstrakty z hemolimfy gąsienic nieimmunizowanych. Uzyskane obrazy elektroforetyczne zamieszczono na ryc. 48 i 49.

Analiza elektroforegramów ujawniła liczne różnice jakościowe i ilościowe w profilach białkowo-peptydowych ekstraktów z hemolimfy gąsienic po aplikacji alkalicznej proteazy, w odniesieniu do gąsienic nieimmunizowanych (NH).

Zastosowanie proteazy w dawce 0,8 µg/gąsienicę spowodowało zmianę poziomu niektórych polipeptydów o masach cząsteczkowych od 17 do 26,6 kDa

i punkcie izoelektrycznym o wartości około 5 (ramka nr 1). Warto zwrócić uwagę na pojawienie się kilku nowych białek o masach powyżej 14,4 kDa i pI 4 – 6 po wstrzyknięciu gąsienicom 1,6 µg proteazy/gąsienicę (ramka nr 2).

Analizując wpływ aplikacji gąsienicom różnych dawek alkalicznej proteazy na białka i peptydy hemolimfy stwierdzono brak dużej liczby plamek w zakresie pI 3,5 – 6 oraz masach cząsteczkowych w przedziale 6,5 – 14,4 kDa, w porównaniu do hemolimfy gąsienic kontrolnych (NH) (ryc. 42 A, ramka nr 3). Poza tym po aplikacji proteazy poddanej ogrzewaniu odnotowano pojawianie się dodatkowego białka o pI 9 i masie cząsteczkowej 24 kDa (ramka nr 6).

Stwierdzono również, że po użyciu do immunizacji owadów alkalicznej proteazy w dawce niższej tj. 0,8 µg w hemolimfie obserwowano zdecydowanie mniejszą ilość polipeptydów w porównaniu zarówno do gąsienic immunizowanych wyższą dawką AP, jak również do gąsienic kontrolnych (NH).

Dodatkowo spostrzeżono zmianę ilości białka o masie molekularnej 14 kDa i punkcie izoelektrycznym 9 w badanych próbach eksperymentalnych, w porównaniu do kontroli. Opierając się na ocenionych parametrach należy przypuszczać, że tym białkiem jest lizozym. Po iniekcji alkalicznej proteazy w dawce 0,8 µg/gąsienicę jak również po immunizacji gąsienic zabitymi bakteriami dochodzi do wyraźnego zmniejszenia ilości, a nawet całkowitego zaniku tego białka (ramka nr 4). W próbach po aplikacji proteazy w dawce 1,6 µg/ gąsienice oraz proteazy poddanej denaturacji zaobserwowano jedynie zmniejszanie się ilości wspomnianego białka, w porównaniu do gąsienic nieimmunizowanych (ramka nr 5).

Ponadto we wszystkich próbach eksperymentalnych zwrócono uwagę na różnice w intensywności wybarwienia białka o masie cząsteczkowej około 18 kDa. Masa powyższego białka wskazuje na konstytutywnie obecną w hemolimfie owadów apolipoforynę III (Vertyporokh i in., 2015). Na przykład, w hemolimfie gąsienic którym aplikowano alkaliczna proteazę w dawce 0,8 µg/gąsienicę oraz w hemolimfie owadów immunizowanych zabitymi bakteriami ilość apolipoforyny III była mniejsza w porównaniu do próby kontrolnej.

W próbach zawierających hemolimfę gąsienic immunizowanych zarówno alkaliczną proteazą, jak i zabitymi bakteriami obserwowano pojawienie się peptydów



NH





AP 1,6 µg

Ryc. 48 Różnice w profilach polipepetydowych ekstraktów z hemolimfy owadów po 24 godzinach od iniekcji - elektroforeza trycynowa 2D. Ekstrakty z hemolimfy gąsienic: nieimmunizowanych (NH); po iniekcji alkalicznej proteazy w dawce 0,8 μg/gąsienicę (AP 0,8 μg) oraz 1,6 μg/gąsienicę (AP 1,6 μg). Za pomocą ramek (1-7) oznaczano obszary zmian ilościowych/jakościowych plamek



Ryc. 49 Różnice w profilach polipepetydowych ekstraktów z hemolimfy owadów po 24 godzinach od iniekcji - elektroforeza trycynowa 2D. Ekstrakty z hemolimfy gąsienic po iniekcji alkalicznej proteazy w dawce 0,8 μg/gąsienicę poddanej 30-minutowej inkubacji w 98°C (AP 0,8 μg 98°C) oraz po immunizacji bakteriami zabitymi ogrzewaniem (zPa). Za pomocą ramek (1-7) oznaczano obszary zmian ilościowych/jakościowych plamek

o masie cząsteczkowej około 4 kDa i pI 4,5 (ramka nr 6). Wyznaczone parametry wskazanego peptydu wskazują na peptyd anionowym-1 o masie cząsteczkowej 4,8 kDa i pI 4,51, który wykazuje działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe w stosunku do grzybów strzępkowych (Cytryńska i in., 2010). Oprócz tego odnotowano pojawianie się białka o masie około 4 kDa i pI 10 we wszystkich próbach eksperymentalnych (ramka nr 7). Na podstawie powyższej obserwacji można przypuszczać, że dochodzi do zwiększenia poziomu peptydu bogatego w prolinę-1 w hemolimfie owadów po iniekcji alkalicznej proteazy i zabitych bakterii (Cytryńska i in., 2007; Lee i in., 2004; Mak i in., 2001).

Podsumowując można stwierdzić, że dwuwymiarowy rozdział SDS-PAGE próbek hemolimfy gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą *P. aeruginosa*

ujawnił liczne zmiany w profilach białek i peptydów związanych z odpowiedzią immunologiczną. Niewykluczone, że wśród niezidentyfikowanych białek mogą występować produkty degradacji białek hemolimfy powstałe na skutek aktywności proteolitycznej badanego enzymu (alkalicznej proteazy).

Dodatkowo wykonano wstępne eksperymenty z zastosowaniem metody RP-HPLC do separacji białek i peptydów hemolimfy (obecnych w ekstraktach niskocząsteczkowych) po immunizacji gąsienic alkaliczną proteazą w dawce 0,8 µg/ gasienice. Hemolimfe pobierano po 15 i 24 godzinach (podrozdział 3.4.8.), po czym dokonywano ekstrakcji białek i peptydów niskocząsteczkowych (podrozdział 3.4.9.) oraz poddawano procesowi odtłuszczania (podrozdział 3.4.10.). W dalszej kolejności wykonywano rozdział chromatograficzny (podrozdział 3.4.27.). Próbę kontrolną stanowiły ekstrakty hemolimfy gąsienic, którym wstrzyknięto 3 µl jałowej wody. Porównując uzyskane wyniki, z topografią pików uzyskanych po rozdziale chromatograficznym ekstraktów po zakażeniu owadów bakteriami P. aeruginosa, wstępnie stwierdzono obecność 8 peptydów w badanych ekstraktach: peptydu anionowego-1, peptydu anionowego-2, peptydu bogatego w proline-1, peptydu bogatego w proline-2, peptydu cekropino-D-podobnego, gallerimycyny, peptydu moricyno-B-podobnego oraz defensyny. Ponadto zaobserwowano obecność dwóch białek, tj. lizozymu oraz apolipoforyny III. Wstępnie można stwierdzić, że zarówno po zakażeniu badanymi szczepami bakterii, jak i po podaniu alkalicznej proteazy, w hemolimfie gasienic zaobserwowano pojawienie się podobnego zestawu peptydów/ białek odpornościowych. W kolejnych badaniach przeprowadzona zostanie identyfikacja za pomocą sekwencjonowania od N-końca oraz szczegółowa analiza ilościowa tych polipeptydów.

5. DYSKUSJA

5.1. Indukcja syntezy białek i peptydów odpornościowych w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu owadów bakteriami *P. aeruginosa*

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) zwiększająca się lekooporność drobnoustrojów jest jednym z głównych zagrożeń dla zdrowia publicznego. Poszukiwanie nowych leków wymaga dokładnego poznania mechanizmów patogenezy bakterii opornych na antybiotyki. Jednym z takich patogenów jest Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* wywołująca zakażenia szpitalne u pacjentów z obniżoną odpornością. Bakteria ta wytwarza liczne czynniki zjadliwości, m. in. zewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne, tj. proteazę IV, alkaliczną proteazę, elastazę A oraz elastazę B.

Jako organizm modelowy do badań interakcji pomiędzy patogenem a wrodzonym układem odpornościowym gospodarza stosowany jest barciak większy *Galleria mellonella*. Pomimo dużego zainteresowania jakim w ostatnich latach cieszy się ten owad, niewiele jest prac opisujących rolę poszczególnych czynników wirulencji, szczególnie enzymów proteolitycznych bakterii *P. aeruginosa* w indukowaniu, czy też przełamywaniu reakcji obronnych owada podczas infekcji.

We badaniach wcześniejszych przeprowadzonych w Zakładzie Immunobiologii UMCS zaobserwowano odmienny wpływ zakażenia różnymi szczepami Gram-ujemnej bakterii P. aeruginosa na wybrane reakcje układu odpornościowego gąsienic G. mellonella (Andrejko i in., 2014). W ramach niniejszej pracy kontynuowano podjętą problematykę badawczą wybierając do dalszych eksperymentów dwa szczepy bakterii P. aeruginosa, entomopatogenny ATCC 27853 oraz szczep kliniczny 02/18. Bakterie te różnią się profilem enzymów proteolitycznych wytwarzanych podczas infekcji oraz podczas hodowli w podłożu. Szczep entomopatogenny wytwarza w bulionie odżywczym (LB) proteazę IV, elastazę A i elastaze B, a w pożywce minimalnej (M9) alkaliczną proteaze. Natomiast szczep kliniczny produkuje w pożywce LB elastazę B, a w pożywce M9 - alkaliczną proteazę. Obecność genu *lasB* kodującego elastazę B oraz genu *aprA* kodującego alkaliczną proteazę w genomach badanych szczepów *P. aeruginosa* została potwierdzona za pomocą metody PCR (Andrejko i in., 2013a).

W niniejszej pracy skupiono się na prześledzeniu humoralnej odpowiedzi odpornościowej związanej z indukcją syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, uwalnianych do hemolimfy podczas zakażenia owadów bakteria P. aeruginosa. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że zainfekowanie owadów badanym patogenem wywołuje pojawienie się zróżnicowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie barciaka, zarówno przeciwbakteryjnej wobec bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich, jak i przeciwgrzybowej. Po raz pierwszy wykazano, że zakażenie gąsienic G. mellonella pałeczką ropy błękitnej powodowało indukcję syntezy sześciu peptydów odpornościowych, których ilość wzrastała wraz z rozwojem bakteriemii. Już po 8 godzinach od zainfekowania owadów zwiększał się poziom trzech peptydów, tj. Gm defensyny, peptydu anionowego-1 oraz peptydu bogatego w proline-2, natomiast po 15 godzinach istotnie rosła ilość trzech pozostałych zidentyfikowanych peptydów, a mianowicie cekropino-D-podobnego, moricyno-B-podobnego oraz peptydu bogatego w proline-1. Poziom konstytutywnie obecnych w hemolimfie peptydów takich jak peptyd anionowy-2, apolipoforycyna oraz Gm gallerimycyna nie ulegał zmianie po zakażeniu owadów badanym patogenem.

Należy zaznaczyć, że u gąsienic *G. mellonella* immunizowanych Gramujemną bakterią *E. coli* nie stwierdzono obecności w hemolimfie peptydu moricyno-B-podobnego oraz Gm gallerimycyny (Cytryńska i in., 2007). Jak tłumaczy Mak i współautorzy (2010) różnice w poziomie wykrytych w hemolimfie peptydów mogą być związane z aktywacją w ciele tłuszczowym *G. mellonella* różnych szlaków sygnałowych regulujących ekspresję genów kodujących peptydy, o których niewiele wiadomo. Największy przyrost ilości peptydu zaobserwowano po zakażeniu gąsienic bakteriami *P. aeruginosa* w przypadku peptydu bogatego w prolinę-2. Natomiast po zainfekowaniu owadów bakterią *E. coli* najwyższy poziom w hemolimfie osiągnął peptyd cekropino-D-podobny, ale drugi w kolejności pod tym względem był również peptyd bogaty w prolinę-2 (Mak i in., 2010).

Warto podkreślić, że w wyniku badań wykonanych w ramach niniejszej pracy zaobserwowano, że aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy zainfekowanych

owadów skierowana była nie tylko przeciw bakteriom Gram-ujemnym na co zwrócono uwagę we wcześniejszych badaniach (Andrejko i in., 2014), ale również przeciw bakteriom Gram-dodatnim. Opierając się na danych literaturowych należy przypuszczać, że obserwowana aktywność wobec wskaźnikowej bakterii *E. coli* była wynikiem działania peptydu cekropino-D-podobnego oraz peptydu moricyno-Bpodobnego (Cytryńska i in., 2007; Brown i in., 2008). Poziom tych peptydów odpornościowych istotnie wzrastał po 15 godzinach od zainfekowania owadów *P. aeruginosa*. Ostatnio wykazano, że peptyd cekropino-D-podobny wiąże się z komórkami *E. coli* oddziałując głównie z LPS bakterii, ale też z innymi składnikami lipidowymi błony komórkowej. Interakcja ta skutkuje permeabilizacją błony komórkowej bakterii oraz uszkodzeniami wewnątrzkomórkowymi, takimi jak powiększenie przestrzeni peryplazmatycznej, utarta wielowarstwowej struktury osłon bakteryjnych i tworzenie pęcherzyków błonowych, co prowadzi do śmierci drobnoustroju (Zdybicka-Barabas i in., 2019).

Peptyd cekropino-D-podobny oraz peptyd moricyno-B-podobny obecne w hemolimfie zakażonych owadów odpowiadały także za aktywność przeciw bakteriom Gram-dodatnim, co wnioskowano na podstawie udowodnionego działania przeciwdrobnoustrojowego skierowanego wobec *B. circulans* (Brown i in., 2008). Należy zaznaczyć, że w hemolimfie immunizowanych gąsienic *G. mellonella* wykazano obecność dwóch cekropin, wykazujących aktywność bakteriolityczną wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (Kim i in., 2004, Cytryńska i in., 2007, Bolouri i in., 2016). Natomiast moricyny *G. mellonella* charakteryzują się właściwościami przeciwbakteryjnymi oraz przeciwgrzybowymi (Brown i in., 2008).

Poza tym w hemolimfie owadów po 15 godzinach od zakażenia zarówno szczepem entomopatogennym, jak i klinicznym *P. aeruginosa* wykryto pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej skierowanej przeciw *A. niger*. Jak podaje literatura takie działanie w hemolimfie gąsienic barciaka wykazuje peptyd anionowy-1, defensyna oraz peptyd cekropino-D-podobny (Cytryńska i in., 2007). Należy zaznaczyć, że w przypadku defensyny oraz peptydu anionowego-1, ich zwiększony poziom zaobserwowano już po 8 godzinach od infekcji, czyli znacznie wcześniej od zarejestrowanego wzrostu aktywności. W tym punkcie czasowym również doszło do

wzrostu ilość peptydu moricyno-B-podobnego, który potencjalnie może być odpowiedzialny za aktywność przeciwgrzybową hemolimfy (Brown i in., 2008).

Warto wspomnieć, że po zainfekowaniu gąsienic barciaka większego pałeczką ropy błękitnej, poziom konstytutywnie obecnego w hemolimfie peptydu anionowego-2 był wysoki i nie ulegał istotnym zmianom w porównaniu do gąsienic niezakażonych. W literaturze opisano, że poziom tego peptydu nie zmieniał się także w przypadku wstrzyknięcia owadom bakterii Gram-ujemnej *E. coli*, Gram-dodatniej *Micrococcus luteus*, czy też grzybów *C. albicans* i *Fusarium oxysporum* (Mak i in., 2010). Peptyd anionowy-2 wykazuje niską aktywność przeciwdrobnoustrojową w warunkach *in vitro*, a mechanizm działania tego peptydu jest wciąż nieznany (Cytryńska i in., 2007).

W hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakteriami *P. aeruginosa* zidentyfikowano również peptydy prolinowe o masach cząsteczkowych 4,3 kDa (prolinowy-1) oraz 4,9 kDa (prolinowy-2) wykazujące zdolność do hamowania wzrostu drożdży (Mak i in. 2001; Cytryńska i in., 2007), ale również bakterii Gramdodatniej *M. luteus* (Cytryńska i in., 2007). Ich poziom wyraźnie zwiększał się podczas infekcji po 8 i 15 godzinach, odpowiednio w przypadku peptydu prolinowego-2 i prolinowego-1.

Z danych literaturowych wiadomo, że u gąsienic *G. mellonella* po zainfekowaniu pałeczką ropy błękitnej dochodzi do wzrostu poziomu lizozymu w ciele tłuszczowym, w hemolimfie oraz w hemocytach, co jest skorelowane z wyraźnym zwiększeniem aktywności tego bakteriolitycznego enzymu (Andrejko i in., 2008; Andrejko i in., 2014). Lizozym *G. mellonella* charakteryzuje się niską, nieenzymatyczną aktywnością przeciw niektórym Gram-ujemnym bakteriom, związaną z kationowymi właściwościami białka lub jego kationowymi fragmentami peptydowymi. Białko to wykazuje przeciwbakteryjne działanie przeciw *E. coli*, S. *paratyphi*, *S. choleraesuis* (Yu i in., 2002, Zdybicka-Barabas i in., 2012). Natomiast aktywność przeciw bakteriom Gram-dodatnim lizozymu, opiera się na enzymatycznej aktywności muramidazy (Zdybicka-Barbas i in., 2012; Sowa-Jasiłek i in., 2014). Dostępne są również dane świadczące o właściwościach przeciwgrzybowych lizozymu (Vilcinskas i in., 1997b; Yu i in., 2002). W doświadczeniach, w których użyto EWL stwierdzono, że lizozym *G. mellonella* wykazuje synergistyczne działanie

z niektórymi peptydami przeciwbakteryjnymi. Wykazano, że działanie lizozymu na perforację błony komórkowej *E. coli* jest wzmacniane w obecności peptydu anionowego-2 (Zdybicka-Barabas i in., 2012). Inni autorzy podają, że w obecności lizozymu bakterie *E. coli* stają się bardziej wrażliwe na attacyny, cekropiny i defensyny (Engström i in., 1984).

Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują na wyraźny wzrost aktywności lizozymu w hemolimfie owadów zainfekowanych badanymi szczepami *P. aeruginosa*. Na podstawie znanych właściwości przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybowych lizozymu należy sądzić, że enzym ten wraz z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi bierze udział w próbie ograniczenia negatywnych skutków rozprzestrzeniania się infekcji bakteryjnej, w tym infekcji bakterią *P. aeruginosa*.

Białko apolipoforyna III (apoLp-III) pełni u owadów ważne funkcje immunologiczne, m. in. indukuje ekspresję białek i peptydów pełniących funkcje odpornościowe oraz stymuluje ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ponadto uczestniczy w regulacji aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie owadów. Oprócz tego, apoLp-III zaangażowana jest w komórkową odpowiedź odpornościową, wpływając na proces fagocytozy oraz adhezję hemocytów (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013). Sugeruje się także, że jedną ze strategii stosowanych przez bakterie entomopatogenne jest obniżanie poziomu apolipoforyny III, zarówno poprzez tłumienie ekspresji tego białka, jak i poprzez hydrolizę apoLp-III pod wpływem proteaz wytwarzanych przez bakterie w trakcie infekcji (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013). Z danych literaturowych wynika, że apolipoforyna III G. mellonella jest substratem dla elastazy B i proteazy IV P. aeruginosa (Andrejko i in., 2005; Andrejko i in., 2009; Andrejko i Mizerska-Dudka, 2012). Co ciekawe, w wyniku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy wykazano, że infekcja owadów P. aeruginosa nie wpływała znacząco na poziom białka apolipoforyny III w hemolimfie owadów po 8 i 15 godzinach od zakażenia. Należy zaznaczyć, że badane szczepy wytwarzają podczas infekcji głównie aeruginolizynę niewykluczone więc, że enzym ten ma mniejszy wpływ na poziom apoLp-III w porównaniu do wcześniej badanych proteaz.

Griesch i współpracownicy w 2000 roku wykazali, że metaloproteazy wytwarzane przez bakterie patogenne powodują powstawanie małych fragmentów białek hemolimfy (tzw. protfrags), które indukują humoralną odpowiedź odpornościową u owadów. Jedną ze stosowanych przez entomopatogeny taktyk może być ograniczanie syntezy zewnątrzkomórkowych proteaz podczas infekcji. Wydaje się to być uzasadnione, ze względu na fakt, że synteza proteaz jest regulowana dostępnością węgla i azotu. Ta teoria wyjaśnia także dlaczego w początkowych etapach infekcji grzybiczej owadów zazwyczaj nie obserwuje się degradacji białek hemolimfy. Białka gospodarza zwykle są degradowane w intensywny sposób dopiero po przełamaniu odpowiedzi odpornościowej gospodarza lub po jego śmierci (Vilcinskas i in., 1997a; Vilcinskas i in., 1997b; Griesch i in., 2000).

Infekcja bakteryjna powoduje zachwianie równowagi organizmu gospodarza. W zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych ważną rolę odgrywa między innymi dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), której ilość zwiększała się w hemolimfie owadów zakażonych bakterią P. aeruginosa wraz z rozwojem bakteriemii. Nagromadzenie się cytotoksycznych wolnych rodników, mobilizuje aktywność systemów protekcyjnych. Jedna ze strategii redukcji stresu oksydacyjnego jest zwiększanie poziomu endogennych przeciwutleniaczy (Poljsak, 2011). SOD stanowi pierwszą linię obrony przed stresem ponadtlenkowym poprzez przekształcenie anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^{\bullet}) w nadtlenek wodoru (H_2O_2) i tlen, chroniąc w ten sposób komórki gospodarza przed toksycznym działaniem reaktywnej formy tlenu (www.uniprot.pl). Przypuszcza się, że wzrost ilość dysmutazy ponadtlenkowej w hemolimfie może być wynikiem występującego w komórkach owada stresu oksydacyjnego, który ma na celu powstrzymanie postępującej infekcji. Reaktywne formy tlenu mogą działać na niekorzyść patogena, poprzez uszkadzanie ich kwasów nukleinowych, białek oraz błony komórkowej. Także patogeny posiadają skuteczne szlaki enzymatyczne prowadzace do inaktywacji reaktywnych form tlenu, w tym katalizowane przez dysmutazę ponadtlenkową, katalazę lub peroksydazę (Hassett i Cohen, 1989; Haas i Goebel, 1992; Iiyama i in., 2007).

Przeprowadzona analiza jakościowa próbek hemolimfy otrzymanych po 8 i 15 godzinach od iniekcji bakterii, nie ujawniła istotnych różnic w zestawie peptydów odpornościowych syntetyzowanych w hemolimfie owadów w odpowiedzi na zakażenie gąsienic G. mellonella szczepami bakteryjnymi P. aeruginosa (entomopatogennym ATCC 27853 i klinicznym 02/18), różniącymi się rodzajem wytwarzanych podczas infekcji proteaz. Obserwowane we wcześniejszych opublikowanych wynikach badań różnice w przebiegu odpowiedzi odpornościowej zależne od szczepu dotyczyły przede wszystkim aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy. Rezultaty te nie muszą przekładać się na różnice w zestawie syntetyzowanych peptydów odpornościowych. Z całą pewnością za aktywność przeciwdrobnoustrojową w hemolimfie odpowiadają białka/peptydy, które nie zostały do tej pory zidentyfikowane. Na przykład po zakażeniu gasienic badanym patogenem obserwowano dwie strefy zahamowania wzrostu E. coli na żelu poliakrylamidowym (metoda bioautografii), jedną wynikającą z aktywności znanych peptydów niskocząsteczkowych (o masie poniżej 6,5 kDa) oraz drugą na wysokości około 20 świadczącą o występowaniu w hemolimfie dodatkowego czynnika kDa, przeciwbakteryjnego. Do tej pory nie opisano w hemolimfie G. mellonella substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych o takich parametrach. Należy też zaznaczyć, że opisane w pracy badania były przeprowadzane w stosunkowo krótkim czasie od iniekcji bakterii (do 18 godziny), co potwierdza teorię, że w początkowych etapach zakażenia enzymy proteolityczne powodują przede wszystkim aktywację układu odpornościowego. Natomiast w tym czasie zazwyczaj nie obserwuje się wcale albo tylko w niewielkim stopniu przełamywania reakcji obronnych, które obserwowane są w hemolimfie po znacznie dłuższym czasie trwania infekcji tj. po około 30 godzinach.

5.2. Efekt działania alkalicznej proteazy *P. aeruginosa* na wybrane aspekty humoralnej odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella*

Po zakażeniu gąsienic badanymi szczepami *P. aeruginosa* zaobserwowano pojawienie się niskocząsteczkowych peptydów odpowiedzialnych za aktywność przeciwdrobnoustrojową hemolimfy. Zauważono też, że bardzo skutecznym induktorem odpowiedzi odpornościowej okazał się izolat kliniczny tej bakterii produkujący podczas zakażenia alkaliczną proteazę. Dlatego też w kolejnych badaniach testowano wpływ alkalicznej proteazy, która jest ważnym czynnikiem wirulencji, na indukcję syntezy peptydów odpornościowych oraz na aktywność układu oksydazy fenolowej (PO). Alkaliczną proteazę otrzymywano z płynu pohodowlanego

bakterii *P. aeruginosa* (szczep kliniczny 02/18) metodą chromatografii jonowymiennej.

Alkaliczna proteaza wytwarzana podczas infekcji *P. aeruginosa* u ludzi odpowiedzialna jest za degradację licznych białek, m. in. cytokin (interleukiny-6 i interferonu), białek układu dopełniacza, receptorów komórek immunologicznych i przeciwciał co prowadzi do upośledzenia mechanizmów obronnych gospodarza (Laarman i in., 2012). Enzym ten odgrywa istotną rolę w rozwoju zapalenia rogówki, bakteriemii, infekcji ucha środkowego oraz zakażeń układu oddechowego u pacjentów cierpiących na mukowiscydozę (Caballero i in., 2001).

We wcześniejszych badaniach Zakładu Immunobiologii UMCS badano reakcję układu oksydazy fenolowej owadów zakażonych różnymi szczepami bakterii P. aeruginosa. W przypadku użycia szczepów wytwarzających alkaliczną proteazę odnotowano wyraźny wzrost aktywności oksydazy fenolowej hemolimfy w pierwszych 6 godzinach od zainfekowania owadów, po czym wraz z rozwojem bakteriemii następował stopniowy spadek aktywności oksydazy (Andrejko i in., 2014). Niewykluczone, że obniżenie aktywności enzymu może być związane z hamującym działaniem polipeptydów odpornościowych, co wykazano w warunkach in vitro inkubując hemolimfę immunizowanych owadów w obecności oczyszczonych peptydów (defensyny, peptydu bogaty w prolinę-1, peptydu anionowego-2) lub lizozymu (Zdybicka-Barabas i in., 2014). Wysnuto jednak przypuszczenie, że obserwowany efekt podczas zakażenia patogenem, może być spowodowany bezpośrednim wpływem na oksydazę fenolową obecnej w hemolimfie owada alkalicznej proteazy P. aeruginosa. W literaturze dostępnych jest wiele danych dotyczących aktywowania układu oksydazy fenolowej owadów przez egzogenne proteazy m. in. trypsyne, chymotrypsyne, a także proteazy wydzielane przez patogeny (Kopacék i in., 1995). Natomiast u gasienic G. mellonella zainfekowanych nicieniem Steinernema feltiae obserwowano zmniejszenie aktywności układu profenolooksydazy (Brivio i in., 2002).

Do uruchomienia układu oksydazy fenolowej (PO) dochodzi po rozpoznaniu przez receptory charakterystycznych struktur znajdujących się w ścianie komórkowej bakterii i grzybów (PAMPs). Układ ten podlega ścisłej regulacji, w której biorą udział m.in. wchodzące w skład układu PO inhibitory proteaz serynowych, białka hamujące melanizację, oraz inhibitory hamujące aktywność PO, z uwagi na toksyczne działanie powstających produktów pośrednich, zarówno na komórki patogenów, jaki i komórki własne. Proces melanizacji wspomaga organizm owada w walce z patogenami, w gojeniu się ran, twardnieniu oskórka, tworzeniu skrzepu oraz w zachowaniu homeostazy jelita (Gonzales-Santovo i Coroba-Agilar, 2012; Cerenius i Söderhäll, 2012). Oksydaza fenolowa (PO) syntetyzowana jest u *G. mellonella* w enocytoidach w formie nieaktywnej określanej jako profenoloksydaza (proPO).

Analiza wyników badań in vivo uwidoczniła aktywację układu oksydazy fenolowej pod wpływem alkalicznej proteazy *P. aeruginosa* w pierwszych godzinach od immunizacji, jednak po 15 godzinach dochodziło do zależnego od dawki, prawie całkowitego zahamowania aktywności badanego układu. W celu dokładniejszego prześledzenia obserwowanego efektu i ustalenia mechanizmu działania enzymu podjęto badania w warunkach in vitro. Udało się udowodnić, że alkaliczna proteaza nie wpływa na już skonwertowaną, aktywną oksydazę fenolową, ale hamuje aktywację profenoloksydazy. Taka właściwość alkalicznej proteazy może być przejawem mechanizmu kontroli stosowanego przez patogena, polegającego na hamowaniu aktywności fenoloksydazy, która działa na niekorzyść atakującego drobnoustroju (Eleftherianos i in., 2007). Przekształcenie proPO w formę aktywną następuje w wyniku działania kaskady proteaz serynowych, na drodze ograniczonej proteolizy. Końcowa reakcja systemu przeprowadzana jest przez enzym aktywujący proPO (PPAE). Jak wynika z danych literaturowych podobny efekt do uzyskanego dzięki aktywności alkalicznej proteazy zaobserwowano w przypadku lizozymu Manduca sexta, który hamuje konwersję proPO do PO w hemolimfie owadów nieimmunizowanych poprzez bezpośrednie oddziaływanie z enzymem. Dlatego też obserwowane zahamowanie aktywacji proPO pod wpływem alkalicznej proteazy może być wynikiem zaburzenia procesu aktywacji proteinazy aktywującej proPO lub kofaktorów SPHs (homologów proteinaz serynowych), niezbędnych do prawidłowego cięcia proPO do aktywnej oksydazy fenolowej (Rao i in., 2010). Na obecnym etapie badań nie można wskazać na konkretny mechanizm odpowiadający za uzyskany rezultat, wymaga to podjęcia bardziej szczegółowych badań, na przykład z użyciem specyficznych przeciwciał przeciw proPO, co pozwoliłoby na sprawdzenie czy alkaliczna proteaza zapobiega konwersji proPO do PO poprzez bezpośrednia interakcję z profenoloksydazą.

Innym ważnym zagadnieniem, które podjęto w pracy było sprawdzenie jaki wpływ na syntezę peptydów odpornościowych owada ma obecność w hemocelu alkalicznej proteazy. Stwierdzono, że podobnie jak po zakażeniu bakteriami, również immunizacja owadów alkaliczną proteazą użytą w niewielkiej dawce powoduje zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy wobec bakterii Gramujemnych oraz pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej. Aktywność ta była skorelowana z obecnością w hemolimfie peptydów przeciwdrobnoustrojowych o masie poniżej 6,5 kDa. Taki sam efekt uzyskano w wyniku aplikacji gąsienicom *G. mellonella* innej metaloproteazy *P. aeruginosa* elastazy B w subletalnej dawce (Andrejko i Mizerska-Dudka, 2011).

Należy zaznaczyć, że maksymalny poziom aktywności przeciw *E. coli* notowano w hemolimfie gąsienic immunizowanych proteazą po 24 godzinach, natomiast po zakażeniu bakteriami wytwarzającymi alkaliczną proteazę już po 15 godzinach od iniekcji. Jeśli chodzi o aktywność przeciwgrzybową wobec *A. niger*, po aplikacji zarówno alkalicznej proteazy jak i żywych bakterii *P. aeruginosa* aktywność pojawiała się po 15 godzinach, natomiast po aplikacji zabitych ogrzewaniem bakterii *P. aeruginosa* dopiero po 24 godzinach. Zwiększenie dawki alkalicznej proteazy powyżej 2,4 µg /gąsienicę stosowanej do immunizacji spowodowało spadek ilości peptydów niskocząsteczkowych już po 48 godzinach. W przypadku immunizacji mniejszymi dawkami enzymu podwyższony poziom peptydów utrzymywał się nawet do 72 godzin. Obserwowany efekt mógł być skutkiem procesu degradacji peptydów hemolimfy owadów pod wpływem alkalicznej proteazy. Wiadomo, że enzymy proteolityczne patogenów powodują destrukcję tkanek gospodarza i w konsekwencji ułatwia to bakteriom rozprzestrzenianie się w organizmie (Kawalec i Jakubczak, 2006).

Na podstawie analizy elektroforetycznej (2D) oraz topografii pików uzyskanych w wyniku chromatografii RP-HPLC, w porównaniu do uzyskanych po zakażeniu owadów bakteriami, wstępnie stwierdzono obecność 8 peptydów w ekstraktach z hemolimfy gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą. Do wspomnianej grupy peptydów należał: peptyd anionowy-1 i -2, peptyd bogaty w prolinę-1 i -2, peptyd cekropino-D-podobny, gallerimycyna, peptyd moricyno-B-podobny oraz defensyna. Dodatkowo zaobserwowano obecność dwóch białek, tj.

lizozymu oraz apolipoforyny III. W odniesieniu do wyników uzyskanych po zakażeniu *P. aeruginosa* stwierdzono taki sam zestaw peptydów i białek odpornościowych, jak po immunizacji gąsienic alkaliczna proteazą.

Po aplikacji do hemocelu owada metaloproteazy, może dochodzić do degradacji białek hemolimfy do mniejszych fragmentów o masach cząsteczkowych poniżej 3 kDa. Te małe fragmenty (tzw. portfrags) są rozpoznawane przez układ odpornościowy owada jako sygnał zagrożenia (model danger) i skutkują aktywacją szlaków sygnałowych, co w rezultacie prowadzi do indukcji syntezy peptydów odpornościowych (Griesch i in., 2000; Matzinger, 2002, Altincicek i Vilcinskas, 2006, 2008b; Altincicek i in., 2007).

W jednej z publikacji przedstawiono, że iniekcja gąsienicom *G. mellonella* elastazy B *P. aeruginosa* powoduje indukcję syntezy inhibitorów hamujących aktywność metaloproteaz na porównywalnym poziomie do termolizyny. Po podaniu owadom letalnej dawki termolizyny zaobserwowano także wzrost przeżywalności gąsienic, co potwierdza obecność w hemolimfie czynników hamujących aktywność metaloproteaz (Andrejko i Mizerska-Dudka, 2011). W hemolimfie *G. mellonella* wykazano obecność inhibitorów, które są aktywne przeciw metaloproteazom (IMPI) wytwarzanym przez patogenne bakterie (Wedde i in, 1998; Clermont i in., 2004). W związku z tym sprawdzenie czy po aplikacji alkalicznej proteazy, dzięki pojawieniu się protfrags może dochodzić do ekspresji genów kodujących indukowalny inhibitor metaloproteinaz, wydaje się być interesującym kierunkiem dalszych badań.

W badaniach wstępnych *in vitro* wykazano, że po inkubacji alkalicznej proteazy z hemolimfą immunizowanych gąsienic *G. mellonella* dochodzi do zaniku aktywności przeciwbakteryjnej co sugeruje, że proteaza ta może być odpowiedzialna za degradację peptydów niskocząsteczkowych (Andrejko i Siemińska, 2016). Jak wynika z danych literaturowych elastaza B również degraduje indukowalne peptydy odpornościowe *G. mellonella* (Andrejko i in., 2009; Andrejko i Mizerska-Dudka, 2012). Takie enzymy proteolityczne, jak elastaza B i alkaliczna proteaza przyczyniają się nie tylko do degradacji białek, lecz także mają zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Andrejko, 2016).

Ciekawym wątkiem, na który warto zwrócić uwagę są wyniki uzyskane metodą elektroforetyczną, wskazujące, że proteaza poddana denaturacji (98°C), a następnie użyta jako czynnik immunizujący skuteczniej indukowała syntezę peptydów w porównaniu do natywnego enzymu. W ekstraktach z hemolimfy obserwowano większą ilość (jak również aktywność) peptydów odpornościowych o masie poniżej 6,5 kDa. Biorąc pod uwagę fakt, że aktywność alkalicznej proteazy traktowanej wysoką temperaturą stanowiła około 80% aktywności enzymu nie poddanego denaturacji, jest prawdopodobne, że enzym w takiej formie skutecznie indukował syntezę, ale mniej efektywnie przeprowadzał degradację peptydów odpornościowych, w porównaniu do proteazy nie poddanej denaturacji (Andrejko i in., 2019).

W ramach niniejszej pracy prześledzono wybrane aspekty humoralnej odpowiedzi odpornościowej gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu *P. aeruginosa* oraz po immunizacji owadów alkaliczną proteazą. Przeprowadzone badania nie wyczerpują całokształtu podjętej problematyki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno po zakażeniu badanymi szczepami bakteryjnymi, jak i po immunizacji alkaliczną proteazą dochodziło do indukcji peptydów odpornościowych o zróżnicowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto wykazano, że alkaliczna proteaza jest w stanie zapoczątkować wystąpienie reakcji immunologicznej oraz przełamać humoralną odpowiedź odpornościową gąsienic *G. mellonella*. Poznanie interakcji zachodzących w układzie gospodarz-oportunistyczny patogen może przyczynić się do odkrycia potencjalnego celu terapeutycznego do walki z zakażeniem wywołanym przez pałeczkę ropy błękitnej, tj. hamowanie aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych.

Podsumowanie zaobserwowanych interakcji zachodzących pomiędzy humoralną odpowiedzią odpornościową gąsienic *G. mellonella* a bakteriami *P. aeruginosa* przedstawiono w postaci schematu na ryc. 50.



6. WNIOSKI

- Zakażenie gąsienic *G. mellonella* bakteriami *P. aeruginosa* powoduje zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej (w stosunku do bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich), aktywności przeciwgrzybowej oraz aktywności lizozymu w hemolimfie owadów.
- Wyniki uzyskane metodą elektroforetyczną wykazały, że za wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wykrywanej w hemolimfie i ekstraktach z hemolimfy zakażonych gąsienic, odpowiedzialne są indukowalne peptydy niskocząsteczkowe (o masie poniżej 6,5 kDa). Należy sądzić, że lizozym wraz z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi bierze udział w próbie ograniczenia infekcji bakteryjnej wywołanej przez *P. aeruginosa*.
- W większości prób zawierających hemolimfę zakażonych gąsienic obserwowano również aktywność przeciw bakteriom *E. coli* na wysokości około 20 kDa, co może wskazywać na występowanie w hemolimfie dodatkowego czynnika o właściwościach przeciwbakteryjnych.
- ekstraktach uzyskanych z hemolimfy zakażonych gąsienic W zidentyfikowano zróżnicowanej aktywności peptydy 0 przeciwdrobnoustrojowej, tj. peptyd bogaty w prolinę-1 i -2, peptyd anionowy-1 i -2, peptyd moricyno-B-podobny, defensynę, gallerimycynę, apolipoforycynę oraz peptyd cekropino-D-podobny. Ponadto, w materiale zidentyfikowano hydrofobowe białko - apolipoforynę III oraz lizozym, które pełnią istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej owadów przeciwko bakteriom i grzybom.
- Poziom trzech peptydów tj. Gm defensyny, peptydu anionowego-1 oraz peptydu bogatego w prolinę-2 zwiększał się po 8 godzinach od zainfekowania owadów, natomiast dopiero po 15 godzinach istotnie wzrastała ilość trzech pozostałych zidentyfikowanych peptydów, a mianowicie cekropino-D-podobnego, moricyno-B-podobnego oraz peptydu bogatego w prolinę-1. Poziom konstytutywnie obecnych w hemolimfie peptydów, takich jak peptyd anionowy-2, apolipoforycyna oraz Gm gallerimycyna nie ulegał zmianie. Wykazano także, że infekcja

owadów *P. aeruginosa* nie wpływała znacząco na poziom białka apolipoforyny III.

- W hemolimfie zakażonych owadów zaobserwowano wzrost ilości dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), co może być wynikiem występującego w komórkach owada stresu oksydacyjnego, który ma na celu powstrzymanie postępującej infekcji.
- Immunizacja owadów alkaliczną proteazą, uzyskaną z płynu pohodowlanego szczepu klinicznego *P. aeruginosa*, powodowała indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz zmianę aktywności oksydazy fenolowej.
- Alkaliczna proteaza aktywowała układ oksydazy fenolowej owada w pierwszych godzinach (4-8 godzin) od immunizacji, a następnie po około 15 godzinach aktywność PO gwałtownie spadała do poziomu obserwowanego u gąsienic nieimmunizowanych. W eksperymentach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* stwierdzono, że alkaliczna proteaza powoduje zahamowanie aktywacji profenoloksydazy, natomiast nie wpływa na już skonwertowaną, aktywną oksydazę fenolową.
- Obecność w hemocelu gąsienic alkalicznej proteazy skutkowała zwiększeniem aktywności hemolimfy przeciw bakterii Gram-ujemnej (*E. coli*) oraz aktywności przeciwgrzybowej (*A. niger*), co było skorelowane z pojawieniem się niskocząsteczkowych peptydów odpornościowych. Działanie proteazy było wyraźnie zależne od dawki enzymu użytej do immunizacji. W wyniku aplikacji owadom alkalicznej proteazy w dawce większej niż 2,4 µg/gąsienicę dochodziło prawdopodobnie do degradacji peptydów.
- Analizy elektroforetyczne ujawniły liczne różnice jakościowe oraz ilościowe w profilu białek i peptydów hemolimfy związanych z odpowiedzią odpornościową gąsienic immunizowanych alkaliczną proteazą. Stwierdzono, że alkaliczna proteaza jest w stanie zapoczątkować wystąpienie reakcji immunologicznej, a także przełamać humoralną odpowiedź odpornościową gąsienic *G. mellonella*.
- Na podstawie wstępnej analizy jakościowej stwierdzono, że w hemolimfie owadów immunizowanych alkaliczną proteazą

syntetyzowane były peptydy o zróżnicowanej aktywności, zarówno przeciwbakteryjne, jak i przeciwgrzybowe, podobnie jak po zakażeniu bakteriami.

• Gąsienice *G. mellonella* okazały się przydatnym modelem do badań przebiegu patogenezy oraz roli poszczególnych czynników wirulencji, na przykład enzymów proteolitycznych bakterii *P. aeruginosa*

7. LITERATURA

Adamo S.A., Roberts J.L., Easy R.H., Ross N.W., 2007, Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipophorin III leads to stress-induced immunosuppression in crickets, J Exp Biol, 211: 531-538

Alhazmi A., 2015, *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic mechanisms, Int J Biol, 7: 44-67

Altincicek B., Knorr E., Vilcinskas A., 2008a, Beetle immunity: Identification of immune- inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*, Dev Comp Immunol, 32: 585-595

Altincicek B., Linder M., Linder D., Preissner K.T., Vilcinskas A., 2007, Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*, Infect Immun, 75: 175-183

Altincicek B., Stötzel S., Wygrecka M., Preissner K.T., Vilcinskas, A., 2008b, Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects, J Immunol, 181: 2705–2712

Altincicek B., Vilcinskas A., 2006, Metamorphosis and collagen-IVfragments stimulate innate immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, Dev Comp Immunol, 30: 1108-1118

Altincicek B., Vilcinskas A., 2008, Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity, Dev Comp Immunol, 32: 400-409

Al-Wrafy F., Brzozowska E., Górska S., Gamian A., 2017, Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy, Postepy Hig Med Dosw, 70: 78-91 Andrejko M., 2016, Modulation of the humoral immune response in *Galleria mellonella* larvae by proteolytic enzymes produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Postepy Microb, 55: 255-267

Andrejko M., Cytryńska M., Jakubowicz T., 2005, Apolipophorin III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*, FEMS Microbiol Lett, 243: 331-337

Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T., 2009, Antibacterial *activity in vivo* and *in vitro* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 152: 118-123

Andrejko M., Mizerska-Dudka M., 2012, Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase B on level and activity of immune proteins/peptides of *Galleria mellonella* hemolymph, J Insect Sci, 12: 1-14

Andrejko M., Siemińska A., 2016, The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in *Galleria mellonella* larvae, ISJ, 13: 269-280

Andrejko M., Siemińska-Kuczer A., Janczarek M., Janik E., Bednarczyk M., Gagoś M., Cytryńska M., 2019, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease exhibits a high renaturation capability, Acta Biochim Pol, 66: 91-100

Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., 2014, Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, J Invertebr Pathol, 115: 14-25

Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Janczarek M., Cytryńska M., 2013a, Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles, Acta Biochim Polonica, 60: 83-90

Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Wawrzoszek M., Cytryńska M., 2013b, Diverse susceptibility of *Galleria mellonella* humoral immune response factors to the exoproteinase activity of entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, Zool Sci, 30: 345-351 Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T., 2008, Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection, Folia microbiol, 53: 147-151

Asano T., Ashida M., 2001a, Cuticular prophenoloxidase of the silk worm, *Bombyx mori*, J Biol Chem, 276: 11100-11112

Asano T., Ashida M., 2001b, Transepithelially transported prophenoloxidase in the cuticle of the silk worm, *Bombyx mori*, J Biol Chem, 276: 1113-11125

Azghani A.O., 1996, *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: Role Role of virulence factors elastase and exotoxin A, Am J Respir Cell Mol Biol, 15: 132-40

Azghani A.O., Gray L.D., Johnson A.R., 1993, A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture, Infect Immun, 61: 2681-2686

Azghani A.O., Miller E.J., Peterson B.T., 2000, Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability, Lung; 178: 261-269

Bahar A.A., Ren D., 2013, Antimicrobial Peptides, Pharmaceut, 6: 1543-1575

Baltzer S.A., Brown M.H., 2011, Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics, JMMB, 20: 228-35

Baptista P., McCusker M., Carvalko A., Ferreira D., Mohan N., Martins M., Fernndes A., 2018, Nano-strategies to fight multi drug resistant bacteria- "A battle of the titans", Front Microbiol, 9: 1-26

Bardoel B.W., van der Ent S., Pel M.J., Tommassen J., Pieterse C.M., van Kessel K.P., van Strijp J.A., 2011, *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants, PLoS Pathog, 7: 1-11

Baumann U., Wu S., Flaherty K.M., McKay D.B., 1993, Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two- domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif, EMBO J, 12: 3357-3364

Bergin D., Murphy L., Keenan J., Clynes M., Kavanagh K., 2006, Preexposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides, Microbes Infect, 8: 2105-2112

Binder U., Maurer E., Lass-Flörl C., 2016, *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species, Fung Biol, 120: 288-295

Bohn H., 1986, Haemolymph clotting in insects; W: Brehélin M., Cells, Molecules and Defense Reactions, Springer, Berlin, 188-207

Bolouri M.M.R., Tonk M., Schreiber C., Salzig D., Czermak P., Vilcinskas A., Rahnamaeian M., 2016, The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides, Biol Chem, 397: 939-945

Boman H.G., 2003, Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts, J Intern Med, 254: 197-215

Boman H.G., Nilsson-Faye I., Paul K., Rasmuson Jr.T., 1974, Insect immunity, characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cythia* pupae, Infect Immun, 10: 136-145

Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72: 248-254

Braun P., de Groot A., Bitter W., Tommassen J., 1998, Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*, J Bacteriol, 180: 3467-3469

Brivio M.F., Pagani M., Restelli S., 2002, Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle, Exp Parasitol, 101: 149-156

Brogden K.A., 2005, Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, Nat Rev Microbiol, 3: 238-250

Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D., 2008, The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*, Insect Biochem Molec, 38: 201-212

Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D., 2009, A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*, Insect Biochem Molec, 39: 792-800

Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.-L., Hoffmann D., 1999, Antimicrobial peptides in insects; structure and function, Dev Comp Immunol, 23: 329-344

Buret A., Cripps A.W., 1993, The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*: relevance for cystic fibrosis, Am Rev Respir Dis, 148: 793-805

Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O'Callaghan R.J., 2001, *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases, Anal Biochem, 290: 330-3379

Casilag F., Lorenz A., Krueger J., Klawonn F., Weiss S., Häussler S., 2016, The LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition, Infect Immun, 84: 162-171

Casteels P., 1998, Immune response in Hymenoptera, W: Brey PT, Hultmark D., Molecular mechanisms of immune responses in insects, Chapman & Hall, London 92–110

Cerenius L., Lee B., Söderhäll K., 2008, The proPO system: pros and cons for its role in invertebrate immunity, Trends Immunol, 29: 263-271

Cerenius L., Söderhäll K., 2004, The prophenoloxidase-activating system in invertebrates, Immunol Rev, 198: 116-126

Cerenius L., Söderhäll K., 2012, Crustacean immune responses and their implications for disease control, W: *Infectious Disease in Aquaculture*, Woodhead Publishing, Cambridge, 69-87

Chadwick J.S., Aston W.P., 1991, Antibacterial immunity in Lepidoptera. W: Gupta A.P., Immunology of insects and other arthropods, CRC Press, Boca Raton, 347-70

Chalk R., Townson H., Natori S., Desmond H., Ham P.J., 1994, Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*, Insect Biochem Molec, 24: 403-410

Champion O.L., Cooper I., James S.L., Ford D., Karlyshev A., Wren B., Duffield M., Oyston P., Titball R., 2009, *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*, Microbiol, 155: 1516-1522

Chase M.R., Raina K., Bruno J., Sugumaran M., 2000, Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*, Insect Biochem Mol Biol, 30: 953-967

Chatterjeea M., Anjua C.P., Biswasa L., Anil Kumarb V., Mohana C.G., Biswasa R., 2016, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options, IJMM, 48-58

Chino H., Yazawa M., 1986, Apolipophorin III In locust: purification and characterization, J Lipid Res, 27: 377-385

Christensen B.M., Li J., Chen C.C., Nappi A.J., 2005, Melanization immune responses in mosquito vectors, Trends Parasitol, 21: 192-199

Clermont A., Wedde M., Seitz V., Podsiadlowski L., Lenze D., Hummel M., Vilcinskas A., 2004, Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity, Biochem J, 382: 315-322

Cotter S.C., Myatt J.P., Benskin C.M., Wilson K., 2008, Selection for cuticular melanism reveals immune function and life-history tradeoffs in *Spodoptera littoralis*, J Evol Biol, 21: 1744-1754

Cytryńska M., 2009, O odporności bez przeciwciał, Postępy Biol Komorki, 36: 309-324
Cytryńska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Suder P., Jakubowicz T., 2007, Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph, Peptides, 28: 533-46

Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Jabłoński P., Jakubowicz T., 2001, Detection of antibacterial polypeptide activity *in situ* after sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis, Anal Biochem, 299: 274-276

Daquinag A.C., Satoko N., Toshifumi T., Yasutsugu S., Takuji T., 1995, Primary structure of a potent endogenous Dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*, Proc Natl Acad Sci USA, 92: 2964-2968

Davey M.E., O'Toole G.A., 2000, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, Microbiol Mol Biol Rev, 64: 847-867

Demir D., Gencer N., Er A., 2012, Purification and characterization of prophenoloxidase from *Galleria mellonella L.*, Artif Cell Blood Sub, 40: 391-393

Dettloff M., Wittwer D., Weise C., Wiesner A., 2001, Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*, Cell Tissue Res, 306: 449-458

Déziel E., Lépine F., Milot S., Villemur R., 2003, RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxy-alkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids, Microbiol, 149: 2005-2013

Drenkard E., 2003, Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, Microbes Infect, 5: 1213-1219

Dulon S., Leduc D., Cottrell G.S., D'Alayer J., Hansen K.K., Bunnett N.W., Hollenberg M.D., Pidard D., Chignard M., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells, Am J Resp Cell Mol, 32: 411-419 Duvic B., Brehélin M., 1998, Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a β -1,3-glucan, Insect Biochem Molec, 28: 959-967

Dzierżanowska D., 2001, Antybiotykoterapia praktyczna, Alfa-Medica, Press Bielsko-Biała, 1-752

Eleftherianos I., Revenis C., 2011, Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis, J Innate Immunol, 3: 28-33

Engel L.S., Hill J.M., Caballero A.R., Green L.C., O'Callaghan R.J., 1998, Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*, J Biol Chem, 273: 16792-16797

Engström P., Carlsson A., Engström A., Tao Z.J., Bennich H., 1984, The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of Escherichia coli, EMBO J, 3: 3347-3351

Er A, Uçkan F., Rivers D.B., Sak O., 2011, Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*, J Appl Entomol, 135: 225-236

Ergin E., Uçkan F., Rivers D.B., Sak O., 2006, *In vivo* and *in vitro* activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (*L*.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), Arch Insect Biochem, 61: 87-97

Espinosa-Urgel M., 2003, Resident Parking Only: Rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms, J Bacteriol, 185: 699-700

Faulhaber L., Karp R., 1992, A diphasic immune response against bacteria in the american cockroach, Immunol, 5: 378-381

Fedtke I., Gotz F., Peschel A., 2004, Bacterial evasion of innate host defenses the *Staphylococcus aureus* lesson, Int J Med Microbiol, 294: 189-194

Freitak D., Wheat C.W., Heckel D.G., Vogel H., 2007, Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia* ni, BMC Biol, 21: 5-56

Fuchs B.B., O'Brien E., Khoury J.B., Mylonakis E., 2010, Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis, Virulence, 1: 475-482

Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P., 1994, Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, J Bacteriol, 176: 269-275

Galko M.J., Krasnow M.A., 2004, Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae, PLoS Biol, 2: 1114-1126

Gazit E., Boman A., Boman H.G., Shai Y., 1995, Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles, Biochem, 34: 11479-11488

Georgiev V.S., 1998, Infectious diseases in immuocompromised hosts, CRS Press, Boca Raton, 1-1232

Gliński Z., 2017, Peptydy odpornościowe zwierząt, Życie weteryn, 92: 545-49

Gliński Z., Kostro S., 2004, Immunobiologia, Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1-340

Gonzales-Santoyo I., Cordoba-Aguilar A., 2012, Phenoloxidase: a key komponent of insect immune system, Entomol Exp Appl, 142: 1-16

Gottler L.M., Rammoorthy A., 2009, Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan- a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin, Biochim Biophys Acta, 1788: 1680-1686

Götz P., 1986, Encapsulation in arthropods, in immunity in invertebrates, Springer-Verlag, Berlin, 153-170

Gowda L.R., Paul B., 2002, Diphenol activation of the monophenolase and diphenolase activities of field bean (*Dolichos lablab*) polyphenoloxidase, J Agrie Food Chem, 50: 1608-1616

Griesch J., Wedde M., Vilcinskas A., 2000, Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses, Insect Biochem Mol Biol, 30: 461-472

Guo L., Lim K.B., Gunn J.S., Bainbridge B., Darveau R.P., Hackett M., Miller S.I., 1997, Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ, Science, 276: 250-253

Gustin J.K., Kessler E., Ohman D.E., 1996, A substitution at His-120 in the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* blocks enzymatic activity without affecting propeptide processing or extracellular secretion, J Bacteriol, 178: 6608-6617

Haas A., Goebel W., 1992, Microbial strategies to prevent oxygendependent killing by phagocytes, Free Radic Res Commun, 16: 137-157

Halwani A.E., Dunphy G.B., 1999, Apolipophorin-III in *Galleria mellonella* potentiates hemolymph lytic activity, Dev Comp Immunol, 23: 563-570

Halwani A.E., Niven D.F., Dunphy G.B., 2001, Apolipophorin III in the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), Arch Insect Biochem Physiol; 48: 135-43

Hancock R.E.W., Diamond G., 2000, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, Trends Mirobiol, 8: 402-410

Hancock R.E.W., Sahl H.G., 2006, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, Nat Biotechnol, 24: 1551-1557

Harding C.R., Schroeder G.N., Reynolds S., Kosta A., Collins J.W., Mousnier A., Frankel G., 2012, *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model, Infect Immun, 80: 2780-2790

Hassett, D.J., Cohen M.S., 1989, Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells, FASEB J, 3: 2574-2582 Hauser A.R., Sriram P., 2005, Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. tackling the conundrum of drug resistance, Postgrad Med, 117: 41-48

Hazlett L.D., 2004, Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection, Prog Retin Eye Res; 23: 1-30

Hetru C., Hoffmann D., Bulet P., 1998, Antimicrobial peptides from insects, W: Brey P.T., Hultmark D., Molecular mechanisms of immune responses in insects, Chapman & Hall, London, 40-66

Hoffmann D., Hultmark D., Boman, H.G., 1981, Insect immunity: *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropia-P9-like factors active against Gram negative bacteria, Insect Biochem, 11: 537-548

Hoge R., Pelzer A., Rosenau F., Wilhelm S., 2010, Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, Current Research, Technol Edu Topics App Microbiol Microbial Biotechnol, 45: 383-395

Hong Y.Q., Ghebrehiwet B., 1992, Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3, Clin Immunol Immunopathol, 62: 133–138

Horvat R.T., Parmely M.J., 1988, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity, Infect Immunol, 56: 2925-2932

Hu Y., Wang Y., Deng J., Jiang H., 2016, The structure of a prophenoloxidase (PPO) from *Anopheles gambiae* provides new insights into the mechanism of PPO activation, BMC biology, 14: 1-13

Huang H.W., Chen F.Y., Lee M.T., 2004, Molecular mechanism of peptideinduced pores in membranes, Phys Rev Lett, 92: 1-4

Hultmark D., 1996, Insect lysozymes, EXS, 75: 87-102

Hultmark D., Engström A., Bennich H., Kapur R., Boman H.G., 1982, Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*, Eur J Biochem, 127: 207-217 Hurley M.N., Cámara M., Smyth A.R., 2010, Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis, ERJ, 40: 1014-1023

Iiyama K., Chieda Y., Lee J.M., Kusakabe T., Yasunaga-Aoki C., Shimizu S., 2007, Effect of Superoxide Dismutase Gene Inactivation on Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the Silkworm, *Bombyx mori*, Appl Environ Microbiol, 73: 1569-1575

Jacquot J., Tournier J.M., Puchelle E., 1985, *In vitro* evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase, Infect Immunity, 47: 555-560

Jagusztyn-Krynicka E.K., 2012, Molekularne podstawy bakteryjnej patogenezy,W: Biologia molekularna bakterii, Warszawa, 510-605

Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M., 2000, Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects, J Bacteriol, 182: 3843-3845

Janiszewska J., 2014, Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych, Polimery, 59: 699-707

Jawień G.R, Bartoszewicz A., Przondo-Mordarska M., Szewczyk A., Kaszuba M.T. i in., 2012, Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji, Lecz Ran, 9: 59-75

Jenkins C.E., Swiatoniowski A., Issekutz A.C., Lin T.J., 2004, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induced human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism, J Biol Chem, 279: 37201-37207

Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E., 2006, Peptide antimicrobial agents, Clin Microbiol Rev, 19: 491-511

Joyce S.A., Gahan C.G., 2010, Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*, Microbiol, 156: 3456-3468

Józefiak A., Engberg R.M., 2017, Insect proteins as potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review, J Anim Feed Sci, 26: 87-99

Kamysz W., Krolicka A., Bogucka K., Ossowski T., Lukasiak J., Lojkowska E., 2005, Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species, J Phytopathol, 153: 313-317

Kanost M., Jiang H., Yu X., 2004, Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*, Immunol Rev, 198: 97-105

Kanost M.R., Kawooya J.K., Law J.H., Ryan R.O., Van Heusden, M.C., Ziegler R., 1990, Insect haemolymph proteins, Adv Insect Physiol, 22: 299-380

Kawalec M., Jakubczak A., 2006, Proteinases of *Enterococcus faecalis* and their role in pathogenicity, Advan Clin Exp Med, 15: 857-869

Kessler E., Safrin M., Abrams W.R., Rosenbloom J., Ohman D.E., Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA, J Biol Chem, 1997, 272: 9884-9889

Kessler E., Safrin M., Gustin J.K., Ohman D., 1998, Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides, J Biol Chem, 273: 30225-30231

Kessler E., Safrin M., Olson J.C., Ohman D.E., 1993, Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease, J Biol Chem; 268: 7503-7508

Kharazmi A., 1991, Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*, Immunol Lett, 30: 201-205

Kida Y., Higashimoto Y., Inoue H., Shimizuand T., Kuwano K., 2008, A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kB through protease-activated receptors, Cell Microbiol, 10: 1491-1504

Kim C.H., Lee J.H., Kim I., Seo S.J., Son S.M., Lee K.Y., Lee I.H., 2004, Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*, Mol Cell, 17: 262-266 Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J., 2006, Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis, Med Mal Infect, 36: 78-81

Köhler T., Curty L.K., Barja F., Van Delden C., PechÈre J.C., 2000, Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili, J Bacteriol, 182: 5990-5996

Kopacék P., Weise C., Götz P., 1995, The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme, Insect Biochem Molec, 25: 1081-1091

Kruse T., Kristensen H.H., 2008, Using antimicrobial host defense peptides as anti-infective and immunomodulatory agents, Expert Rev Anti Infect Ther, 6: 887-895.

Kurtz J., Armitage S., 2006, Alternative adaptive immunity in invertebrates, Trends Immunol, 27: 493-496

Kurtz J., 2005, Specific memory within innate immune systems, Trends Immunol; 26: 186-192

Laarman A. J., Bardoel B.W., Ruyken M., Fernie J., Milder F.J., van Strijp J.A., Rooijakkers S.H., 2012, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways, J Immunol, 188: 386-393

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 277: 680-685

Lange A., Beier S., Huson D.H., Parusel R., Iglauer F., Frick J.-S., 2018, Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth), Am Soc Microbiol, 6: 1-2

Lavine M.D., Strand M.R., 2008, Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochem Molec Biol, 32: 1295-1309

Ławniczak Ł., Czaczyk K., Owsianiak M., Chrzanowski Ł., 2011, Rola ramnolipidów w środowisku naturalnym, Postepy Mikrobiol, 50: 17-30

Lee W.J., Miura M., 2014, Mechanisms of systemic wound response in *Drosophila*, Curr Top Dev Biol, 108: 153-183

Lee Y.S., Yun E.K., Jang W.S., Kim I., Lee K.H., Park S.Y. i in., 2004, Purification cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*, Insect Mol Biol, 13: 65-72

Lee W.J., Zhang L., 2015, The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, Protein Cell, 6: 26-41

Lehane M. J., Wu D., Lehane S.M., 1997, Midgut-specific immune molecules are produuced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*, Proc Natl Acad Sci USA, 94: 11502-11507

Leidal, K.G., Munson, K.L., Johnson, M.C., and Denning, G.M., 2003, Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78, J Interferon Cytokine Res, 23: 307-318

Lemaitre B., Hoffmann J., 2007, The host defense of *Drosophila melanogaster*, Annu Rev Immunol, 25: 697-743

Li D., Scherfer C., Korayem A.M., Zhao Z., Schmidt O., Theopold U., 2002, Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade, Insect Biochem Molec, 32: 919-928

Li S.S., Wu C., 2009, Using peptide array to identify binding motifs and interaction networks for modular domains, Methods Mol Biol, 570: 67-76

Lu Z., Jiang H., 2007, Regulation of phenoloxidase activity by high- and lowmolecular-weight inhibitors from the larval hemolymph of *Manduca sexta*, Insect Biochem Molec, 37: 478-485

Ludtke S.J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., 1996, Membrane pores induced by magainin, Biochem, 35: 13723-13728

Luna-Acosta A., Breitwiesera M., Renaultb T., Thomas-Guyona H., 2017, Recent findings on phenoloxidases in bivalves, Mar Pollut Bull, 122: 5-16 Maeda H, Yamamoto T, 1996, Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections, J Biol Chem, 377: 217-226

Mak P., Chmiel D., Gacek G.J., 2001, Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*, Acta Biochim Pol, 48: 1191-95

Mak P., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., 2010, A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi, Dev Comp Immunol, 34: 1129-1136

Malloy J.L., Veldhuizen R.A., Thibodeaux B.A., O'Callaghan R.J., Wright J.R., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* protease iv degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 288: L409-L418

Mariencheck W.I., Alcorn J.F., Palmer S.M., Wright J.R., 2003, *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D, Am J Resp Cell Molec Biol, 38: 528-537

Marmaras V.J., Lampropoulou M., 2009, Regulators and signalling in insect haemocyte immunity, Cell Signal, 21: 186-195

Marquis G., Garzon S., Strykowski H., Auger P., 1991, Cell walls of normal and lysozyme-damaged blastoconidia of *Candida albicans*: localization of surface factor 4 antigen and vicinal-glycol staining, Infect Immun, 59: 1312-1318

Marquis G., Garzon S., Strykowski H., Auger P., Benhamou N., 1993, Muramidase-mediated damage to *Candida* yeast cells: histochemical and immunochemical characterization of accumulating wall-like material, J Submicrosc Cytol Pathol, 25: 347-355

Marquis G., Montplaisir S., Garzo S., Strykowski H., Auger P., 1982, Fungitoxicity of muramidase: ultrastructural damage to *Candida albicans*, Lab Invest, 46: 627-636

Marr A.K., Gooderham W. J., Hancock R.E., 2006, Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook, Curr Opin Pharmacol, 6: 468-472

Matthews B.W., 1988, Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases, Acc Chem Res, 21: 333-340

Matsumoto T., Nakamura A.M., Takahashi K.G., 2006, Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 145: 325-330

Matzinger P., 2002, The danger model: a renewed sense of self, *Science*, 296: 301-305

McPhee J.B., Scott M.G., Hancock R.E.W., 2005, Design of host de-fence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities, Comb Chem High T Scr, 8: 257-272

Mikulak E., Gliniewicz A., Przygodzka M., Solecka J., 2018, *Galleria mellonella L.* as model organism used in biomedical and other studies, Przegl Epidemiol, 72: 57-73

Mishra M., Byrd M.S., Sergeant S., Azad A.K., Parsek M.R., McPhail L., Schlesinger L.S., Wozniak D.J., 2012, *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complementmediated opsonization, Cell Microbiol, 14: 95-106

Mittala R., Aggarwalc S., Sharmab S., Chhibberb S., Harjaib K., 2009, Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview, J Infect Public Health, 2: 101-111

Miyatake H., Hata Y., Fujii T., Hamada K., Morihara K., Katsube Y., 1995, Crystal structure of the unliganded alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* IF03O8O and its conformational changes on ligand binding, J Biochem, 118: 474-479

Miyoshi S.-I., Shinoda S., 2000, Microbial metalloproteases and pathogenesis, Microb Infect, 2: 91-98

Mizerska-Dudka M., Andrejko M., 2014, *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*, J Basic Microbiol, 54: 232-246

Mizerska-Dudka M., Andrejko M., Kandefer-Szerszeń M., 2011, Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów, Postepy Mikrobiol, 50: 209-2016

Mohrig W., Messner B., 1968, Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozyme als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen, Abwehrgeschehen, Biol Zentralbl, 87: 439-47

Morihara K., 1995, Pseudolysin and other pathogen endopeptidases of thermolysin family, Meth Enzymol, 248: 242-253

Morihara K., Tsuzuki H., Oka T., Ebata M., 1965, *Pseudomonas aeruginosa* elastase isolation, crystallization and preliminary characterization, J Biol Chem, 240: 3295-3304

Moussian B., 2010, Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation, Insect Biochem Molec, 40: 363- 375

Muñoz-Gómez A., Corredor M., Benitez-Paez A., Pelaez C., 2014, Development of quantitative proteomics using iTRAQ based on the immunological response of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Fusarium oxysporum* microconidia, PLoS One, 9: 1-16

Mylonakis E., Podsiadlowski L., Muhammed M., Vilcinskas A., 2016, Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides, PhilosophTrans R Soc Lond B Biol Sci, 371: 1-11

Myszka K., Czaczyk K., 2010, Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych, Postepy Hig Med Dosw, 64: 582-589

Narayanaswami V., Ryan R.O., 2000, Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function, Biochim Biophys Acta, 1483: 15-36

Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J., 2011, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, Trends Biotechnol, 29: 464-472 Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B., Costerton J.W., 1985, Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material, Antimicrob Agents Ch, 27: 619-624

Niere M., Dettloff M., Maier T., Ziegler, M., Wiesner A., 2001, Insect immune activation by apolipoprotein III is correlated with the lipid-binding properties of this protein, Biochem, 40: 11502-11508

Niere M., Meisslitzer C., Dettloff M., Weise C., Ziegler M., Wiesner A., 1999, Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipophorin III, Biochim Biophys Acta, 1433: 16-26

Nishiyama Y., Nakaoka C., Hiratani T., Abe S., Uchida K., Yamaguchi H., 2001, Synergy of lysozyme and lanoconazole on the morphology of *Candida albicans*, J Electron Microsc, 50: 41-49

Okuda K., Morihara K., Atsumi Y., Takeuchi H., Kawamoto S., Kawasaki H., Suzuki K., Fukushima J., 1990, Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO3455, Infect Immun, 58: 4083-4088

Oliveira F.E., Rossoni R.D., de Barros P.P., Begnini B.E., Junqueira J.C., Jorge A.O.C., Oliveira L.D., 2017, Immunomodulatory effects and anti-*Candida* activity of lactobacilli in macrophages and in invertebrate model of *Galleria mellonella*, Microb pathogen, 110: 603-611

Olson J.C., Ohman D.E., 1992, Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions, J Bacteriol, 174: 4140-4147

Otvos L. Jr., 2002, The short proline-rich antimicrobial peptide family, Cell Mol Life Sci, 59: 1138-1150

Park J.W., Kim C.H., Kim J.H., Je B.R., Roh K.B., Kim S.J., i in., 2007, Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptido- glycan in insects, Proc Natl Acad Sci USA,104: 6602-6607 Park S.Y., Kim C.Y., Jeong W.H., Lee J.H., Seo S. J., Han Y. S., Lee I.H., 2005, Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*, Develop Immunol, 29: 43-51

Parmely M., Gale A., Clabaugh M., Horvat R., Zhou W.W., 1990, Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*, Infect Immun, 58: 3009-3014

Peschel A., Sahl H.G., 2006, The coevolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance, Nat Rev Microbiol, 4: 529-536

Peters J.E., Galloway D.R., 1990, Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity, J Bacteriol, 172: 2236-2240

Płytycz B., 2008, Convergent evolution of acquired immunity, Centr Eur J Immunol, 33: 83-86

Poljsak B., 2011, Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress, Oxid Med Cell Longev, 2011: 1-15

Povey S., Cotter S.C., Simpson S.J., Lee K.P., Wilson K., 2009, Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour?, J Anim Ecol, 78: 437-46

Pretzel J., Mohring F., Becker K., 2013, Antiparasitic peptides, Adv Biochem Eng Biotechnol, 135: 157-92

Prokopowicz D., Wasiluk A., Rogalska M., 2005, Oportunistyczne inwazje pasożytnicze zagrażające człowiekowi, Kosmos, 54: 109-113

Pye A.E., 1974, Microbial activation of prophenoloxidase from immune insect larvae, Nature, 251: 610-613

Qian S., Wang W., Yang L., Huang H.W., 2008, Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: Evidence for lipidic pores, Proc Natl Acad Sci USA, 105: 17379-17383 Ramarao N., Nielsen-Leroux C., Lereclus D., 2012, The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis, J Vis Exp, 70: 1-7

Rao X.-J., Ling E., Yu X.-Q, 2010, The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: An *in vitro* approach, Develop Immunol, 34: 264-271

Ratcliffe N.A., Gagen S.J., 1977, Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*, Tissue Cell, 9: 73-85

Rawlings N.D., Barrett A.J., 1995, Evolutionary families of metallopeptidases, Method Enzymol, 248: 183-228

Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A., 2010, MEROPS: the peptidase database, Nucleic Acids Res, 38: D227-D233

Renwrantz L., Schmalmack W., Redel R., Friebel B., Scneeweib H., 1996, Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract, J Comp Biochem Physiol, 165B: 647-658

Ribeiro C., Brehélin M., 2006, Insect hemocytes: What type of cell is that?, J Insect Physiol, 52: 417-429

Rusiecka-Ziółkowska J., Fleischer M., Staroszczyk J., 2007, Immunological properties of the Gram-negative bacilli *Pseudomonas aeruginosa*, Postepy Hig Med Dosw, 61: 95-8

Sanjayan K. P., 2018, Insect Physiology (21st Century Biology and Agriculture: Textbook Series), Scientific Publishers, Jodhpur

Sasse, J., Gallagher S.R., 2009, Staining proteins in gels, Curr Protoc Molec Biol, 85: 10-6

Sato H., Frank D.W., 2004, ExoU is a potent intracellular phospholipase, Mol Microbiol, 53: 1279-1290 Satyavathi V., Minz A., Nagaraju J., 2014, Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects, Cell Signal, 26: 1753-1763

Schad P.A., Iglewski B.H., 1988, Nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of the *Pseudomonas aeruginosa* lasA gene, J Bacteriol; 170: 2784-2789

Schägger H, Jagow G., 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem, 166: 368-379

Schmidtchen A., Frick I.M., Andersson E., Tapper H., Bjorck L., 2002, Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37, Mol Microbiol, 46: 157-168

Schmit A.R., Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1977, The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation, J Invert Path, 29: 232-234

Schmolz E., Lamprecht I., 2004, Thermal investigations on social insects. W: Lörinczy D., The nature of biological systems as revealed by thermal methods, Kluwer Academic Publishers, Dordecht, 250-283

Schoofs L., Holman G.M., Hayes T.K., Nachman R.J., De Loof A., 1990, Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides from the vertebrate tachykinin family, FEBS Lett, 261: 397-401

Schuhmann B., Seitz V., Vilcinskas A., Podsiadlowski L., 2003, Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*, Arch Insect Biochem Physiol, 53:125-133

Schultz D.R., Miller K.D., 1974, Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors, Infect Immun, 10: 128-135

Schurek K.N., Breidenstein E.B.M., Hancock R.E.W., 2012, *Pseudomonas aeruginosa*: A persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections.

W: Dougherty T.J., Pucci M.J., Antibiotic Discovery and Development, Springer, 679-715

Shelby K.S., Popham H.J.R., 2006, Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal, J Insect Sci, 13: 2442-2448

Siemińska-Kuczer A., Vertyporokh L., Andrejko M., Wojda, I., Stączek S., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska, M., 2017, Metaloproteinazy i ich inhibitory: rola w patogenezie na wybranych przykładach, Postepy Biochem, 63: 269-276

Sima P., Trebichavsky I., Sigler K., 2003, Mammalian antibiotic peptides, Folia Microbiol (Praha), 48: 123-137

Singkum P., Suwanmanee S., Pumeesat, P., Luplertlop N., 2019, A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*, Acta Microbiol Immun Hungarica, 66: 1-25

Smith R.S., Iglewski B.H., 2003, *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence, Curr Opinion Microbiol, 6: 56-60

Söderhäll K., Cerenius L., 1998, Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity, Curr Opin Immunol, 10: 23-28

Sowa-Jasilek A., Zdybicka-Barabas A., Staczek S., Wydrych J., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M., 2014, Studies on the role of insect hemolymph polypeptides, *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme, Peptides, 53: 194-201

Sowa-Jasiłek A., Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Wydrych J., Skrzypiec K., Mak P., Deryło K., Tchórzewski M., Cytryńska M., 2016, *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells, Microbiol Res, 193: 121-31

Stączek S., Grygorczuk K., Zdybicka-Barabas A., Siemińska-Kuczer A., Vertyporokh L., Andrejko M., Wojda, I., Grygorczuk-Płaneta K., Cytryńska M., 2017, Różne oblicza oksydazy fenolowej u zwierząt, Postepy Biochem, 63: 315-325 Strateva T., Mitov I., 2011, Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections, Ann Microbiol, 61: 717-732

Sugumaran M., 2002, Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects, Pigment Cell Res, 15: 2-9

Sun Y., Karmakar M., Taylor P.R., Rietsch A., Pearlman E., 2012, ExoS and ExoT ADP Ribosyltransferase Activities Mediate *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis by Promoting Neutrophil Apoptosis and Bacterial Survival, J Immunol, 188: 1884-1895

Tang M., Waring A.J., Hong M., 2008, Arginine dynamics in a membranebound cationic beta-hairpin peptide from solid-state NMR, Chembiochem, 9: 1487-92

Thayer M.M., Flaherty K.M., McKay D.B., 1991, Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-A resolution, J Biol Chem, 266: 2864-2871

Todar K, 2009, Opportunistic infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, W: Kenneth Todar's Online Textbook of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, Wisconsin

Tomiotto-Pellissier F., Cataneo A.H.D., Orsini T.M., dos Santos Thomazelli A.P.F., Dalevedo G.A., de Oliveira A.G., i in., 2016, *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for Leishmania (Viannia) braziliensis, J Microbiol Methods, 131: 45-50

Traidej M., Caballero A.R., Marquart M.E., Thibodeaux B.A., O'Callaghan R.J., 2003a, Molecular Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV Expressed in *Pseudomonas putida*, Invest Ophthalmol Vis Sci, 44: 190-196

Traidej M., Marquart M.E., Caballero A.R., Thibodeaux B.A., O'Callaghan R.J., 2003b, Identification of the Active Site Residues of *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV, J Biol Chem, 278: 2549-2553

Tsaia C., Loha J., Profta T., 2016, *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing, Virulence, 7: 214-229

Uçkan F., Er A., Ergin E., 2010, Levels of encapsulation and melanization in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Iehneumonidae), J Appl Entomol, 134: 718-726

Urbanowicz P., Gniadowski M., 2017, "Ciężkozbrojny" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne, Kosmos, 66: 11-29

Van der Horst D.J., Van Doorn J.M., Voshol H., Kanost M.R., Zieger R., Beenakkers A.M., 1991, Different isoforms of an apoprotein (apolipophorin III) associate with lipophorins in *Locusta migratoria*, Eur J Biochem, 196: 509-517

Vertyporokh L., Taszłow P., Samorek-Pieróg M., Wojda I., 2015, Shortterm heat shock affects the course of immune response in *Galleria mellonella* naturally infected with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, 130: 42-51

Vilcinskas A., Matha V., Götz P., 1997a, Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites, J Insect Physiol, 43: 475-483

Vilcinskas A., Matha V., Götz P., 1997b, Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth *Galleria mellonella*, J Insect Physiol, 43: 1149-1159

Vilcinskas, A., Wedde M., 2002, Insect inhibitors of metalloproteinases, IUBMB Life, 54: 339-343

Vogel H., Altincicek B., Glockner G., Vilcinskas A., 2011, Acomprehensive transcriptome and immunegene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*, BMC Genomics, 12: 1-19

Wedde M., Weise C., Kopacék P., Franke P., Vilcinskas A., 1998, Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*, Eur J Biochem, 255: 535-543

Weers P., Ryan R., 2006, Apolipophorin III: Role model apolipoprotein, Insect Biochem Molec, 36: 231-240

Whitten M.M.A., Tew I.F., Lee B.L., Ratcliffe N.A., 2004, A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in b- 1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions, J Immunol, 172: 2177-2185

Wieloch W., Boguś M., Ligęza M., Koszela-Piotrowska I., Szewczyk A., 2011, Coronatin-1 isolated from entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* kills *Galleria mellonella* hemocytes in vitro and forms potassium channels in planar lipid membrane, Toxicon, 58: 369-379

Wiesner A., Losen S., Kopacék P., Weise C., Götz P., 1997, Isolated apolipophorin III from *Galleria mellonella* stimulates the immune reactions of the insect, J Insect Physiol, 43: 383-391

Wilderman P.J., Vasil A.I., Johnson Z., Wilson M.J., Cunliffe H.E., Lamont I.L., Vasil M.L., 2001, Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a pvdsregulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*, Infect Immun, 69: 5385-5394

Wimley W.C., Hristova K., 2011, Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions, J Membr Biol, 239: 27-34

Wojda I., 2017, Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*, Insect Sci, 24: 342-57

Wojda I., Kowalski P., Jakubowicz T., 2009, Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions, J Insect Physiol, 55: 525-531

Wojda I., Taszłow, P., 2013, Heat shock affects host-pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis*, J Insect Physiol, 59: 894-905

Wojda I., Vertyporokh L., 2017, Układ odpornościowy owadów w obronie integralności organizmu, Kosmos, 66: 541-551

Wolska K.I., Grudniak A.M., Kraczkiewicz-Dowjat A., Kurek A., 2010, Various functions of selected bacterial pigments, Postepy Mikrobiol, 49: 105-114

Wolska K., Kot B., Piechota M., Frankowska A., 2013, Oporność *Pseudomonas aeruginosa* na antybiotyki, Postepy Hig Med Dosw, 67: 1300-1311

Wu H., Song Z., Givskov M., Doring G., Worlitzsch D., Mathee K., Rygaard J., Hoiby N., 2001, *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infections, Microbiol, 147: 1105-1113

www.chem.qmul.ac.uk

www.gbif.org/species/1876542

www.imbb.forth.gr/imbb-eople/images/Profi/pdf/protean_ief.pdf

www.matrixscience.com

www.mslab-ibb.pl

www.tools.thermofisher.com

www.uniprot.pl

Yamamoto K., Fujii H., Banno Y., Aso Y., Ishiguro M., 2003, Polymorphism of prophenoloxidase in the Silkworm, *Bombyx mori*, J Fac Agr, 47: 319-324

Yi H.Y., Chowdhury M., Huang Y.D., Yu X.Q., 2014, Insect antimicrobial peptides and their applications, Appl Microbiol Biotechnol, 98: 5807-22

Yu X.Q., Zhu Y..F, Ma C., Fabrick J.A., Kanost M.R., 2002, Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma, Insect Biochem Mol Biol, 32: 1287-1293

Yuant N.Y., Bayer A.S., Xiong Y.Q., Yeaman M.R., 2006, Advances in antimicrobial peptide immunology, Biopolymers, 84: 435-458

Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., 2010, Phenoloxidase activity in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Aspergillus oryzae*, Ann UMCS C (Biologia), 65: 49-57 Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., 2011, Involvement of apolipophorin III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 158: 90-98

Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., 2013, Apolipophorins and insects immune response, ISJ, 10: 58-68

Zdybicka-Barabas A., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M., 2014, Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*, Insect Biochem Physiol, 87: 1-12

Zdybicka-Barabas A., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiołka M.J., Cytryńska M., 2012, Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria, Biochim Biophys Acta, 1818: 2623-2635

Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Cytryńska M., 2017, Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców, Kosmos, 66: 563-574

Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Cytryńska M., 2013, Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria, (BBA)-Biomembr, 1828: 1449-1456

Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Pawlikowska-Pawlęga B., Mak P., Luchowski R., Skrzypiec K., Mendyk E., Wydrych J., Gruszecki W.I., Cytryńska M., 2019, Studies on the interactions of neutral *Galleria mellonella* cecropin D with living bacterial cells, Amino acids, 51: 175-191

Zdybicka-Barabas A., Mak, P., Jakubowicz, T., Cytryńska, M., 2014, Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*, Arch Insect Biochem Physiol, 87: 1-12

8. SPIS RYCIN

Ryc. 1 Mechanizmy wirulencji stosowane podczas infek (Lee i Zhang 2015, zmienione)	cji przez pałeczkę ropy błękitnej 18
Ryc. 2 Hodowla bakteryjna szczepu ATCC 27853 <i>P. aerug</i> zieloną piocyjaninę (opracowanie własne)	g <i>inosa</i> wytwarzającego niebiesko-
Ryc. 3 Gąsienica G. mellonella (opracowanie własne)	
Ryc. 4 Schemat integumentu owada (Sanjayan, 2018; zmie	enione)

Ryc. 7 Kinetyka zmian w poziomie aktywności przeciw bakteriom G (+) w hemolimfie (A.)/ekstrakcie (B.) po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gasienic szczepem entomopatogennym (ATCC) klinicznym 02/18 (18)bakterii Р. aeruginosa hodowanych i w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym (B). Hemolimfa/ ekstrakt gąsienic nieimmunizowanych (NH) i nakłutych igłą (I). Aktywność przeciw B. circulans hemolimfy owadów przedstawiano jako relatywny poziom aktywności. Gwiazdkami (*) oznaczono istotny wzrost aktywności w hemolimfie/ekstrakcie z hemolimfy owadów zakażonych w porównaniu do

Ryc. 11 Bioautografia – wizualizacja aktywności przeciwbakteryjnej białek i peptydów hemolimfy po 8, 15 oraz 18 godzinach od zakażenia gąsienic szczepem entomopatogennym (ATCC) bakterii *P. aeruginosa* hodowanym w pożywce minimalnej (M) lub w bulionie odżywczym

Ryc. 21 Analiza ilościowa peptydu cekropino-D-podobnego w ekstraktach z hemolimfy gąsienic po 8 i 15 godzinach od zakażenia szczepem entomopatogennym (ATCC) i klinicznym (18)

Ryc. 35 Aktywność oksydazy fenolowej hemolimfy gąsienic po 2, 4, 8, 15, 24 godzinach od iniekcji alkalicznej proteazy, AP (0,8 µg/gąsienicę). Kontrola- hemolimfa gąsienic nieimmunizowanych (NH). Ramką wskazano obszar występowania skupisk melaniny...... 105

Ryc. 47 Wpływ różnych dawek alkalicznej proteazy na pojawianie się peptydów niskocząsteczkowych w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* - elektroforeza trycynowa. Ekstrakty wykonano z hemolimfy pobieranej po 48 i 72 godzinach od iniekcji. K - ekstrakt z hemolimfy gąsienic po nakłuciu. Gwiazdki (*) wskazują poziom peptydów o masie poniżej 6,5 kDa...... 117

9. SPIS TABEL

Tab. 1 Taksonomia G. mellonella (www.gbif.org/species/1876542, zmienione)	26
Tab.2 Barciak większy jako organizm modelowy – zalety i wady (na podstawie Binde 2016; Lange i in., 2018)	r i in., 28
Tab. 3 Skład mieszaniny na 10% żel separujący i 6% żel zagęszczający do elektrof glicynowej SDS-PAGE.	forezy 64
Tab. 4 Skład żelu separującego (7,5%) stosowanego do elektroforezy glicynowej PA warunkach natywnych.	GE w 65
Tab. 5 Skład żelu zagęszczającego, przejściowego i separującego do elektrof trycynowej	forezy 66
Tab. 6 Skład 10% żelu separującego do zymografii	67
Tab. 7 Skład 13,8% żelu separującego do bioautografii	68