



UMCS
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

**UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii**

Sylwia Karina Stączek

**Indukcja odpowiedzi immunologicznej
Galleria mellonella przez α -1,3-glukan
wyizolowany ze ściany komórkowej
grzyba *Aspergillus niger***

Induction of the *Galleria mellonella* immune response
by α -1,3-glucan isolated from the cell wall
of the fungus *Aspergillus niger*

Praca doktorska

wykonana w Zakładzie Immunobiologii
pod kierunkiem
Prof. dr hab. Małgorzaty Cytryńskiej

LUBLIN 2019

Część badań, których wyniki zaprezentowano w niniejszej rozprawie, sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu: „ α -1,3-glukan, składnik ściany komórkowej grzybów, jako induktor wrodzonej odpowiedzi immunologicznej owadów” (numer 2013/09/N/NZ6/00838, konkurs PRELUDIUM 5, kierownik projektu mgr Sylwia Stączek)

Pragnę serdecznie podziękować
Prof. dr hab. Małgorzacie Cytryńskiej
za opiekę merytoryczną oraz cenne uwagi
otrzymane podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	4
WYKAZ SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE	11
SUMMARY	14
I. WSTĘP	17
I.1. Wykorzystanie <i>Galleria mellonella</i> jako organizmu modelowego	17
I.2. Odpowiedź odpornościowa owadów	21
I.2.1. Bariery anatomiczne i fizjologiczne	22
I.2.2. Rozpoznawanie patogenów i innych ciał obcych	23
I.2.2.1. Receptory rozpoznające determinanty molekularne drobnoustrojów	25
I.2.3. Odpowiedź komórkowa	34
I.2.4. Odpowiedź humoralna	41
I.2.4.1. Układ oksydazy fenolowej i proces melanizacji	41
I.2.4.2. Krzepnięcie hemolimy	43
I.2.4.3. Peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe owadów	45
I.3. Grzyby jako czynniki chorobotwórcze	55
I.3.1. Budowa ściany komórkowej grzybów	57
I.3.1.1. Rola α -1,3-glukanu ściany komórkowej w funkcjonowaniu komórek grzybów	61
II. CELE PRACY	67
III. MATERIAŁY I METODY	69
III.1. Materiały i odczynniki	69
III.2. Bufory	72
III.3. Podłoża hodowlane	74
III.4. Hodowla mikroorganizmów	74
III.4.1. Przygotowywanie zawiesiny zarodników <i>A. niger</i>	74
III.5. Immunolokalizacja, izolacja i charakterystyka α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	75
III.5.1. Immunolokalizacja α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej <i>A. niger</i> ...	75
III.5.2. Izolacja i charakterystyka α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	77
III.5.3. Obrazowanie α -1,3-glukanu <i>A. niger</i> z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych	78
III.6. Wykorzystanie gąsienic <i>Galleria mellonella</i> jako organizmu modelowego	79
III.6.1. Hodowla organizmu modelowego	79

III.6.2. Immunizacja gąsienic <i>G. mellonella</i>	79
III.6.3. Analiza przeżywalności gąsienic <i>G. mellonella</i>	80
III.6.4. Pobieranie hemolimfy	81
III.6.5. Pobieranie ciała tłuszczowego	81
III.6.6. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej hemolimfy	81
III.6.6.1. Aktywność przeciwbakteryjna wobec <i>E. coli</i> D31	82
III.6.6.2. Aktywność przeciwgrzybowa hemolimfy wobec <i>A. niger</i>	82
III.6.7. Bioautografia	83
III.6.8. Oznaczanie aktywności typu lizozymu w hemolimfie	83
III.6.9. Oznaczanie aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie	84
III.6.10. Oznaczanie stężenia białka	85
III.6.11. Ekstrakcja peptydów odpornościowych z hemolimfy	85
III.6.12. Odtłuszczanie metanolowych ekstraktów hemolimfy	85
III.6.13. Elektroforeza Tris-glicyna SDS-PAGE (ang. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	86
III.6.14. Elektroforeza Tris - trycyna SDS-PAGE	87
III.6.15. Elektroforeza dwukierunkowa	89
III.6.16. Elektrotransfer mokry białek z żelu na membranę	90
III.6.17. Immunodetekcja białek na membranie	90
III.6.18. Identyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie <i>G. mellonella</i>	92
III.6.19. Identyfikacja białek hemolimfy <i>G. mellonella</i> wiążących się do α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	92
III.6.20. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach gąsienic <i>G. mellonella</i>	94
III.6.21. Analiza ekspresji genów wybranych peptydów w ciele tłuszczowym <i>G. mellonella</i>	96
III.6.21.1. Izolacja RNA z ciała tłuszczowego <i>G. mellonella</i>	96
III.6.21.2. Odwrotna transkrypcja	96
III.6.21.3. Analiza Real-Time qPCR	97
III.6.22. Analiza zmian w hemocytogramie	98
III.6.23. Metody statystyczne	99
IV. ANALIZA WYNIKÓW	100
IV.1. Przeżywalność gąsienic <i>G. mellonella</i> po podaniu α -1,3-glukanu i zarodników <i>A. niger</i>	100
IV.2. Odpowiedź humoralna gąsienic <i>G. mellonella</i> na immunizację α -1,3-glukanem <i>A. niger</i>	103

IV.2.1. Aktywność przeciwgrzybowa w hemolimfie	103
IV.2.2. Aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie	107
IV.2.3. Analiza zmian w profilu białkowym hemolimfy	110
IV.2.4. Udział peptydów odpornościowych w odpowiedzi immunologicznej <i>G. mellonella</i> na α -1,3-glukan <i>A. niger</i>	115
IV.2.4.1. Identyfikacja i analiza poziomu wybranych peptydów odpornościowych w hemolimfie	115
IV.2.4.2. Poziom ekspresji peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym	117
IV.2.5. Aktywność lizozymu w hemolimfie	120
IV.2.6. Aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie	122
IV.2.7. Udział apolipoforyny III w odpowiedzi immunologicznej <i>G. mellonella</i> na α -1,3-glukan <i>A. niger</i>	126
IV.2.7.1. Poziom apolipoforyny III w hemolimfie	126
IV.2.7.2. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach	128
IV.3. Odpowiedź komórkowa gąsienic <i>G. mellonella</i> na podanie α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	134
IV.3.1. Analiza hemocytogramu hemolimfy	134
IV.3.2. Formowanie nodul w hemocelu gąsienic	140
IV.4. Identyfikacja białek hemolimfy <i>G. mellonella</i> oddziałujących z α -1,3-glukanem <i>A. niger</i>	143
V. DYSKUSJA	148
VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	169
VII. LITERATURA	171
SPIS RYCIN	209
SPIS TABEL	212

WYKAZ SKRÓTÓW

- ¹³C NMR - węglowy magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)
- ¹H NMR - wodorowy magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic rezonanse*)
- ACN - acetonitryl (ang. *acetonitrile*)
- AFM - mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*)
- Ags - syntaza α-1,3-glukanu *A. fumigatus*
- AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)
- AMP - peptyd przeciwdrobnoustrojowy (ang. *antimicrobial peptide*)
- AMPS - nadsiarczan amonu (ang. *ammonium persulfate*)
- AP - fosfataza alkaliczna (ang. *alkaline phosphatase*)
- apoLp-III - apolipoforyna III (ang. *apolipoporphin III*)
- BCIP - substrat dla fosfatazy alkalicznej (5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan) (ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*)
- BM - błona podstawna (ang. *basal membrane*)
- BSA - albumina surowicy wołowej (ang. *bovine serum albumine*)
- CAPS - kwas 3-(cykloheksyloamino)propanosulfonowy (ang. *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*)
- cDNA - komplementarny DNA, uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy mRNA (ang. *complementary DNA*)
- CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)-dimetyloamonio]-propano-sulfonian, (ang. *3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate*)
- CSαβ - motyw zawierający strukturę α-helisy i β-kartki, stabilizowany mostkami dwusiarczkowymi (ang. *cysteine-stabilized alpha beta motif*)
- DAMP - wzorzec molekularny związany z uszkodzeniem tkanek (ang. *damage-associated molecular pattern*)
- dFADD - białko z domeną śmierci (ang. *Fas-associated protein with death domain*)
- DHI - 5,6-dihydroksyindol (ang. *5,6-dihydroksyindole*)
- Dif - czynnik transkrypcyjny (ang. *Dorsal-related immune factor*)
- DMF - dimetyloformamid (ang. *dimethylformamide*)
- DMSO - dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)
- DOPA - 3-(3,4-dihydroksyfenylo)alanina (ang. *3-(3,4-dihydroxyphenyl) alanine*)
- DSCAM - receptor zawierający domeny immunoglobulinowe (ang. *Down syndrome cell adhesion molecule*)
- dTAK1 - *Drosophila* TAK1, kinaza (ang. *Drosophila transforming-growth-factor-β activating kinase*)
- DTP - deoksyrybonukleotyd (ang. *deoxyribonucleotide*)
- DTT - ditiotreitól (ang. *dithiothreitol*)

WYKAZ SKRÓTÓW

DUOX	-	oksydaza (ang. <i>dual oxidase</i>)
ECM	-	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
EDTA	-	kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	-	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EWL	-	lizozym białka jaja kurzego (ang. <i>egg white lysozyme</i>)
FITC	-	izotiocyanian fluoresceiny (ang. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FREP	-	białko podobne do fibrynogenu (ang. <i>fibrinogen-related protein</i>)
FTIR	-	analiza spektroskopowa w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. <i>Fourier transform infrared</i>)
GAG	-	galaktozaminogalakтан (ang. <i>galactosaminogalactan</i>)
GalXM	-	galaktoksylomannan (ang. <i>galactoxylomannan</i>)
GC-MS	-	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
GM	-	galaktomannan (ang. <i>galactomannan</i>)
GmPro	-	cząsteczka prekursorowa, z której wywodzą się dwa peptydy prolinowe <i>G. mellonella</i> oraz peptyd anionowy 1 <i>G. mellonella</i>
GNBP	-	białka wiążące bakterie Gram-ujemne (ang. <i>Gram-negative binding protein</i>)
GPI	-	glikozylofosfatydyloinozitol (ang. <i>glycosylphosphatidylinositol</i>)
GST	-	glutathiono-S-transferaza (ang. <i>glutathiono-S-transferase</i>)
GXM	-	glukuronoksylomannan (ang. <i>glucuronoxylomannan</i>)
HDLp	-	kompleks lipoforyn o wysokiej gęstości (ang. <i>high-density lipophorin particle</i>)
HIV	-	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
Hop	-	Hopscotch; kinaza białkowa w szlaku JAK/STAT
HPLC	-	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IEF	-	izoelektroogniskowanie (ang. <i>isoelectric focusing</i>)
IKK	-	kinaza białkowa inhibitora κB (ang. <i>IκB kinase</i>)
Imd	-	białko biorące udział w przekazywaniu sygnału w szlaku Imd u <i>D. melanogaster</i> (ang. <i>immune deficiency</i>)
IMPI	-	owadzi inhibitor metaloproteinaz (ang. <i>insect metalloproteinase inhibitor</i>)
IPS	-	roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>insect physiological saline</i>)
ISPI	-	indukowalny inhibitor proteaz serynowych (ang. <i>inducible serine protease inhibitor</i>)
JAK	-	kinaza tyrozynowa Janus (ang. <i>Janus kinase</i>)
LB	-	pożywka do hodowli bakterii (ang. <i>lysogeny broth</i>)
LDLp	-	kompleks lipoforyn o niskiej gęstości (ang. <i>low-density lipophorin particle</i>)
LPS	-	lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
LRRP	-	białko z powtórzeniami bogatymi w leucynę (ang. <i>leucine-rich</i>)

	<i>repeat protein)</i>
LRR	- powtórzenie bogate w leucynę (ang. <i>leucine-rich repeat</i>)
LTA	- kwas lipotejchojowy (ang. <i>lipoteichoic acid</i>)
MAPKKK	- kinaza białkowa (ang. <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>)
NBT	- błękit nitrotetrazolowy (substrat dla fosfatazy alkalicznej) (ang. <i>blue tetrazolium chloride</i>)
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	- czynnik transkrypcyjny (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAMP	- wzorzec molekularny związany z patogenami (ang. <i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PAP	- proteaza serynowa aktywująca profenolooksydazę (ang. <i>PPO-activating proteinase</i>)
PBS	- sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	- ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDA	- agar glukozowo-ziemniaczany, podłoże do hodowli grzybów (ang. <i>potato dextrose agar</i>)
PG	- peptydoglikan (ang. <i>peptidoglycan</i>)
PG-DAP	- peptydoglikan typu diaminopimelinowego
PG-Lys	- peptydoglikan typu lizynowego
PGRP	- białko rozpoznające peptydoglikan (ang. <i>peptidoglycan recognition protein</i>)
PO	- oksydaza fenolowa (ang. <i>phenoloxidase</i>)
PPAE	- proteaza serynowa - enzym aktywujący profenolooksydazę (ang. <i>PPO-activating enzyme</i>)
PPAF	- proteza serynowa - czynnik aktywujący profenolooksydazę (ang. <i>PPO-activating factor</i>)
Pr	- proteaza wytwarzana przez <i>Metarhizium anisopliae</i>
proPO	- profenolooksydaza (ang. <i>prophenoloxidase</i>)
PRR	- receptor rozpoznający wzorce molekularne związane z patogenami (ang. <i>pattern recognition receptor</i>)
PSP	- peptyd aktywujący plazmatocyty (ang. <i>plasmacyte spreading peptide</i>)
PTU	- fenylotiomocznik (ang. <i>phenylthiourea</i>)
PVDF	- polifluorek winylidenu (ang. <i>polyvinylidene fluoride</i>)
RNI	- reaktywne formy azotu (ang. <i>reactive nitrogen intermediates</i>)
ROI	- reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen intermediates</i>)
RP-HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa z układem faz odwróconych (ang. <i>reverse phase high-performance liquid chromatography</i>)
SDS	- siarczan dodecyłu sodu (ang. <i>dodecyl sulfate sodium salt</i>)

WYKAZ SKRÓTÓW

- SHSP - małe białko szoku cieplnego (ang. *small heat shock protein*)
- SPE - enzym dokonujący cięcia proteolitycznego białka pro-Spätzle (ang. *Spätzle processing enzyme*)
- SPH - białko będące homologiem proteaz serynowych (ang. *serine protease homolog*)
- STAT - czynnik transkrypcyjny (ang. *signal transducers and activators of transcription*)
- TBS - roztwór soli fizjologicznej zbuforowany za pomocą Tris (ang. *Tris buffered saline*)
- TEMED - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (ang. *N N N'N'-Tetramethylethylenediamine*)
- Tep - białko zawierające tioestry (ang. *thioester containing protein*)
- TFA - kwas trifluorooctowy (ang. *trifluoroacetic acid*)
- TIR - domena cytoplazmatyczna receptorów Toll (ang. *Toll/interleukin-1 receptor*)
- TNF- α - czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor- α*)
- Toll - receptor należący do grupy I receptorów transbłonowych
- Upd - cytokina w szlaku JAK/STAT (ang. *unpaired*)
- β GRP - białko rozpoznające β -1,3-glukan (ang. *β -1,3-glucan recognition protein*)

STRESZCZENIE

Składniki ściany komórkowej grzybów odgrywają kluczową rolę w interakcji pomiędzy patogenem a organizmem gospodarza. Część z nich stanowi struktury molekularne PAMPs (ang. *pathogen associated molecular patterns*), które rozpoznawane są przez odpowiednie receptory PRRs (ang. *pattern recognition receptors*) gospodarza. Jednym z polisacharydowych składników ściany komórkowej wielu gatunków grzybów patogennych dla człowieka, w tym z rodzajów: *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* i *Coccidioides*, jest α -1,3-glukan. Jego rola w indukcji odpowiedzi immunologicznej nie jest do końca wyjaśniona. Alfa-1,3-glukan opisywany jest jako cząsteczka, której obecność w ścianie komórkowej grzybów chroni je przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy gospodarza, poprzez maskowanie położonych w głębszych warstwach ściany cząsteczek uznawanych za PAMPs, ale nieliczne doniesienia naukowe wskazują na immunomodulacyjny charakter tego polisacharydu.

Z uwagi na fakt, że mechanizmy odporności wrodzonej ssaków i owadów wykazują wysoki stopień strukturalnego i funkcjonalnego podobieństwa, w badaniach dotyczących patogenów grzybowych, jak również odpowiedzi immunologicznej na składniki ich ściany komórkowej, wykorzystywane są owadzie organizmy modelowe. Jednym z nich jest barciak większy *Galleria mellonella*, stosowany w badaniach wirulencji grzybów, m. in.: *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, jak również w badaniach przebiegu odpowiedzi odpornościowej na podanie składników ich ściany komórkowej, np. β -1,3-glukanu.

Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących roli α -1,3-glukanu w indukcji odpowiedzi immunologicznej owadów, w ramach niniejszej pracy prześledzono reakcje odpornościowe gąsienic *G. mellonella* po podaniu tego polisacharydowego składnika ściany komórkowej *Aspergillus niger*. Celem badań było sprawdzenie, czy α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ immunologiczny *G. mellonella*, a także, czy jego obecność w hemocelu uruchamia odpowiedź komórkową oraz mechanizmy odpowiedzi humoralnej, takie jak aktywacja układu oksydazy fenolowej i synteza peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Białka hemolimfy gąsienic *G. mellonella*, które oddziaływały z α -1,3-glukanem *A. niger* identyfikowano po sekwencjonowaniu metodą degradacji Edmana, a także

stosując spektrometrię mas oraz immunoblotting z wybranymi przeciwciałami. W celu określenia, czy układ immunologiczny gąsienic reaguje na podanie α -1,3-glukanu, oceniano poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie metodą dyfuzji radialnej wobec *Escherichia coli* oraz *A. niger*. Aktywność przeciwbakteryjną potwierdzano metodą bioautografii. Celem wykazania różnic w profilach białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem, przeprowadzano jednokierunkowe i dwukierunkowe rozdziały elektroforetyczne białek i peptydów w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, 2D IEF/SDS-PAGE). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe pojawiające się w hemolimfie *G. mellonella* w odpowiedzi na α -1,3-glukan *A. niger* identyfikowano po sekwencjonowaniu metodą degradacji Edmana, a zmiany ich poziomu w hemolimfie określano po rozdzielach z wykorzystaniem chromatografii RP-HPLC. Indukcję ekspresji genów wybranych peptydów odpornościowych (galiomycyna, gallerimycyna, cekropina, owadzi inhibitor metaloproteaz) w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu analizowano z wykorzystaniem Real-Time qPCR. Oceniano ponadto udział białek konstytutywnie występujących w hemolimfie, lizozymu i apolipoporyny III (apoLp-III), w odpowiedzi na α -1,3-glukan *A. niger*. Wpływ immunizacji α -1,3-glukanem na poziom apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* określano metodą immunoblottingu, a lokalizację apoLp-III w hemocytach oceniano metodami immunocytochemicznymi z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko temu białku. Indukcję odpowiedzi komórkowej na podanie α -1,3-glukanu *A. niger* określano poprzez analizę zmian w hemocytogramie gąsienic *G. mellonella* oraz analizę procesu nodulacji.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, że α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ odpornościowy gąsienic *G. mellonella*, prawdopodobnie z udziałem receptorów rozpoznających β -1,3-glukan (β GRPs), które wiązały się do tego polisacharydu. Wśród białek hemolimfy *G. mellonella*, które oddziaływały z α -1,3-glukanem *A. niger*, zidentyfikowano ponadto: apolipoporynę I, apolipoporynę II, prooksydazę fenolową, czynnik aktywujący oksydazę fenolową, heksamerynę, arylforynę oraz proteazę serynową podobną do peptydaz innych przedstawicieli rzędu Lepidoptera. Wykazano, że w reakcji na rozpoznanie α -1,3-glukanu *A. niger* dochodzi do indukcji ekspresji genów peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym *G. mellonella*, a w szczególności do znacznego wzrostu ekspresji genów peptydów przeciwwgrzybowych, galiomycyny i gallerimycyny. Konsekwencją tego był wzrost poziomu peptydów przeciwwgrzybowych w hemolimfie, m. in. galiomycyny,

warunkujący pojawienie się aktywności przeciw *A. niger* w hemolimfie *G. mellonella*. Wykazano zahamowanie aktywności układu oksydazy fenolowej, jednego z pierwszych mechanizmów uruchamianych w odpowiedzi na zakażenie, w krótkim czasie po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu *A. niger*, prawdopodobnie na skutek wiązania profenolooksydazy oraz proteaz serynowych biorących udział w jej aktywacji, do tego polisacharydu. Stwierdzone zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu wskazują na jej udział w odpowiedzi na ten składnik ściany komórkowej grzybów, choć najprawdopodobniej nie jest ona zaangażowana w przekazywanie sygnału o obecności α -1,3-glukanu do hemocytów, gdyż nie wykazano wiązania się apoLp-III do tego polisacharydu. O uruchomieniu odpowiedzi komórkowej *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* świadczyły zmiany w całkowitej liczbie hemocytów oraz zmiany udziału hemocytów poszczególnych typów, a także formowanie nodul.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują, że α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ odpornościowy gąsienic *G. mellonella*, a w reakcji na ten składnik ściany komórkowej grzybów uruchamiana jest szczególnie odpowiedź przeciwgrzybowa. Alfa-1,3-glukan może zatem odgrywać rolę cząsteczki PAMP grzybów. Z drugiej strony, podanie α -1,3-glukanu *A. niger* powodowało przejściowe hamowanie reakcji odpornościowych owada, w tym aktywności oksydazy fenolowej, co może wskazywać, że pełni on rolę czynnika wirulencji *A. niger*.

SUMMARY

The components of the fungal cell wall play a key role in the interaction between the pathogen and the host organism. Some of them play a role of the molecular structures called pathogen associated molecular patterns (PAMPs), which are recognized by the appropriate pattern recognition receptors (PRRs) of the host. One of the polysaccharide components of the cell wall of many fungal species pathogenic for humans, including *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* and *Coccidioides*, is α -1,3-glucan. Its role in inducing the immune response is not entirely clear. Alpha-1,3-glucan is described as a molecule whose presence in the fungal cell wall protects against recognition by the host's immune system. This process occurs by masking the molecules considered as PAMPs which are located in the deeper cell wall layers. However, few scientific reports point to the immunomodulatory nature of this polysaccharide.

Due to the fact that the mechanisms of innate immunity of mammals and insects show a high degree of structural and functional similarity, insect-model organisms are used in the research on fungal pathogens, as well as on the immune response to their cell wall components. One of them is the greater wax moth *Galleria mellonella*, used in studies of fungal virulence, among others of *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, as well as in the study of the immune response to the components of their cell wall, e.g. β -1,3-glucan.

Due to the lack of literature data on the role of α -1,3-glucan in the induction of insect immune responses, this work investigates the immune responses of *G. mellonella* to this polysaccharide component of the *Aspergillus niger* cell wall. The aim of the study was to check if *A. niger* α -1,3-glucan is recognized by the *G. mellonella* immune system, and whether its presence in a hemocoel activates cellular response and mechanisms of humoral response, such as activation of the phenoloxidase system and antimicrobial peptides' synthesis.

G. mellonella haemolymph proteins that interacted with *A. niger* α -1,3-glucan were identified after sequencing by Edman degradation, as well as by mass spectrometry and immunoblotting with selected specific antibodies. In order to determine if the immune system of larvae reacts to the administration of α -1,3-glucan, the level of antimicrobial activity in haemolymph was assessed by radial diffusion assay against *Escherichia coli* and *A. niger*. Antimicrobial activity was confirmed by

bioautography. To demonstrate differences in *G. mellonella* haemolymph proteins-peptides profiles after immunization with α -1,3-glucan, one-dimensional and two-dimensional electrophoretic separations of proteins and peptides under denaturing conditions (SDS-PAGE, 2D IEF/SDS-PAGE) were performed. Antimicrobial peptides appearing in *G. mellonella* haemolymph in response to *A. niger* α -1,3-glucan were identified after sequencing by Edman degradation, and changes in their level in haemolymph were determined after resolution using RP-HPLC. Induction of gene expression of selected defence peptides (galiomycin, gallerimycin, cecropin, insect inhibitor of metalloproteinases) in *G. mellonella* fat body after administration of α -1,3-glucan was analyzed using Real-Time qPCR. The involvement of proteins constitutively present in haemolymph, lysozyme and apolipoprotein III (apoLp-III), was also assessed in response to *A. niger* α -1,3-glucan. The effect of immunization with α -1,3-glucan on the apoLp-III level in *G. mellonella* haemolymph was determined by immunoblotting, and the location of apoLp-III in haemocytes was assessed by immunocytochemistry using specific antibodies directed against this protein. The induction of a cellular response to *A. niger* α -1,3-glucan was determined by the analysis of changes in the haemocytogram of *G. mellonella* larvae, and the analysis of the nodulation process.

Studies carried out in this work have shown that *A. niger* α -1,3-glucan is recognized by the immune system of *G. mellonella* larvae, probably mediated by β -1,3-glucan recognition proteins β GRPs receptors that bind to this polysaccharide. Among the *G. mellonella* haemolymph proteins that interacted with *A. niger* α -1,3-glucan, were also identified the following: apolipoprotein I, apolipoprotein II, prophenoloxidase, phenoloxidase activating factor, hexamerin, arylphorin and serine protease similar to peptidases from other representatives of the Lepidoptera order. It has been shown that in the reaction to the recognition of *A. niger* α -1,3-glucan, the expression of defence peptide genes in the *G. mellonella* fat body was induced, in particular a significant increase in the expression of antifungal peptide genes, galiomycin and gallerimycin, was detected. The consequence of this was the increase in the level of antifungal peptides in haemolymph, galiomycin among others, leading to appearance of anti-*A. niger* activity in *G. mellonella* haemolymph. It has been shown that the activity of the phenoloxidase system, one of the first mechanisms triggered in response to infection, has been inhibited in a short time after immunization with *A. niger* α -1,3-glucan. It probably happened due to binding of prophenoloxidase and serine proteases involved in its activation to the polysaccharide. The observed changes in apoLp-III levels in *G.*

mellonella haemolymph after administration of α -1,3-glucan indicate its contribution in response to this component of the fungal cell wall, although this protein is unlikely to be involved in signalling the presence of α -1,3-glucan to the haemocytes, since apoLp-III binding to this polysaccharide has not been demonstrated. The activation of the cellular response of *G. mellonella* after immunization with *A. niger* α -1,3-glucan was evidenced by changes in the total haemocyte count (THC) and differential haemocyte count (DHC) as well as by the formation of nodules.

The results obtained in this study indicate that *A. niger* α -1,3-glucan is recognized by the immune system of *G. mellonella* larvae, and in response to this fungal cell wall component, a particularly an antifungal response is activated. Thus, α -1,3-glucan may play the role of a fungal PAMP molecule. On the other hand, administration of *A. niger* α -1,3-glucan caused a temporary inhibition of the immune response of the insect, including phenoloxidase activity, which may indicate that it plays the role of the *A. niger* virulence factor.

I. WSTĘP

I.1. Wykorzystanie *Galleria mellonella* jako organizmu modelowego

Barciak większy *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) jest szeroko rozpowszechnionym owadem należącym do rodziny omacnicowatych (Pyralidae) (Ryc. 1). Pierwotnie występował w Azji, skąd rozprzestrzenił się do wielu krajów Afryki, Europy i Ameryki Północnej. Obecnie spotykany jest na wszystkich kontynentach (Kwadha i in., 2017) i uważany za jednego z głównych szkodników występujących w ulach pszczelich, stąd bywa również nazywany molem woskowym. Jego bytowanie w ulach prowadzi do niszczenia plastrów woszczyny, stanowiących miejsce rozwoju czerwi pszczół (*Apis* sp.) (Ryc. 2). *G. mellonella* może być również wektorem przenoszącym drobnoustroje chorobotwórcze, co niesie dodatkowe zagrożenie dla życia pszczół (Charriere i Imdorf, 1999).

Systematyka *Galleria mellonella*

Królestwo: **zwierzęta** - Zoa

Podkrólestwo: **wielokomórkowce** - Metazoa

Typ: **stawonogi** - Arthropoda

Podtyp: **tchawkowce** - Tracheata

Gromada: **owady** - Insecta

Podgromada: **owady skrzydlate** - Pterygota

Rząd: **luskoskrzydłe** - Lepidoptera

Rodzina: **omacnicowate** – Pyralidae

Rodzaj: **barciak** - *Galleria*

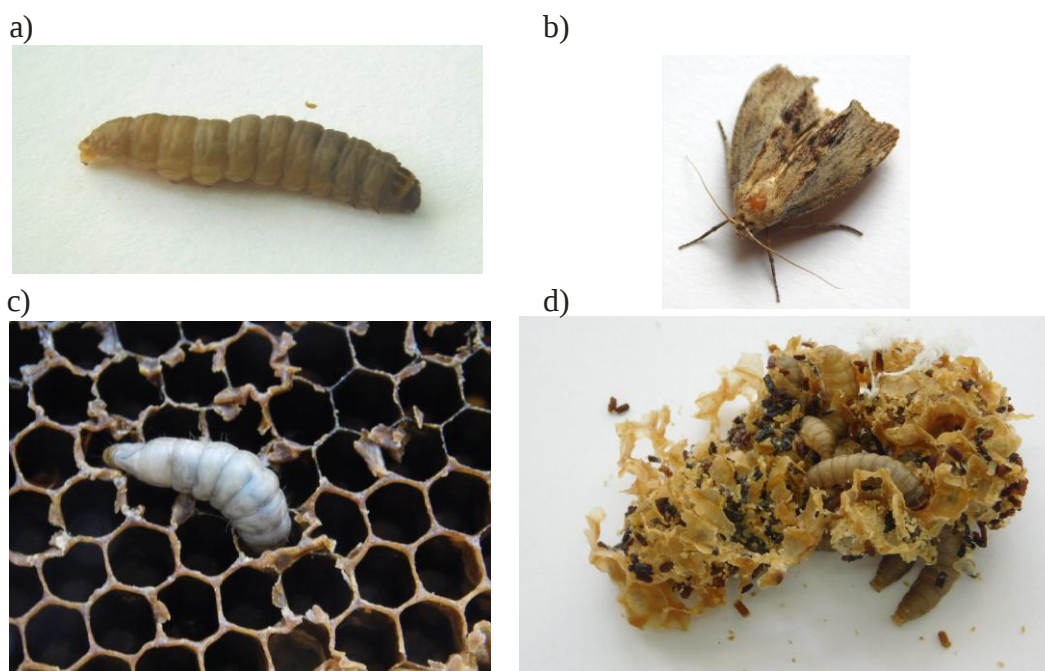
Gatunek: **barciak większy** - *Galleria mellonella*

Ryc. 1. Pozycja taksonomiczna barciaka większego *G. mellonella* (opracowano na podstawie: Jura, 2002).

Barciak większy należy do owadów holometabolicznych. W trakcie jego rozwoju można wyróżnić cztery stadia: jajo, larwa, poczwarka oraz imago. Czas trwania poszczególnych stadiów rozwojowych uzależniony jest od czynników biotycznych, takich jak współzawodnictwo o pokarm i związany z tym kanibalizm, obecność w ulu pasożytów oraz innych owadów, między innymi pszczół. Spośród

czynników abiotycznych kluczową rolę podczas całego cyklu rozwojowego odgrywają właściwa temperatura i wilgotność powietrza. Optymalne warunki do rozwoju zapewnia temperatura 29-33°C i wilgotność około 70%. Istotnym czynnikiem wpływającym na prawidłowy rozwój larw i funkcjonowanie układu odpornościowego owadów jest również odpowiednia dieta, bogata w niezbędne składniki pokarmowe (Kwadha i in., 2017).

Samice *G. mellonella* składają jaja w pakietach liczących 50-150 sztuk w szczelinach ula, co minimalizuje ich wykrycie i zwiększa szanse larw na przeżycie (Charriere i Imdorf, 1999). Preferują przy tym ule, które zasiedlają silne rodziny pszczele. Jaja mają kształt sferoidalny i szorstką powierzchnię. Są zróżnicowane pod względem wielkości i barwy, która może być biała, biało-kremowa bądź różowa. Średnia wielkość jaja wynosi 0,478 mm długości oraz 0,394 mm szerokości (Ellis i in., 2013; Kwadha i in., 2017). Po 3-30 dniach z jaj wylęgają się gąsienice - larwy motyli, które rozpoczynają żerowanie na woszczynie, niszcząc jej strukturę (Ryc. 2). Gąsienice *G. mellonella* początkowo są barwy kremowej, a ciemnieją wraz z przechodzeniem kolejnych siedmiu stadiów wylinkowych. Ostatecznie osiągają długość 25-30 mm i średnicę 5-7 mm. Na tułowie gąsienic znajdują się trzy pary odnóży. Natomiast na odwłoku, na każdym z segmentów od trzeciego do szóstego, znajduje się para posuwek, umożliwiających gąsienicom przemieszczanie się w poszukiwaniu pokarmu. Po około 6-7 tygodniach (przy zapewnieniu temperatury 29-32°C) gąsienice otaczają się oprzędem i przechodzą w stadium poczwarki, podczas którego nie pobierają pokarmu i pozostają unieruchomione. Poczwarki mają długość 12-20 mm i 5-7 mm średnicy, przy czym samice są większe od samców. Stadium imago wykształca się po około 2 tygodniach. Postaci dorosłe wykazują wyraźny dymorfizm płciowy. Samice osiągają 15-20 mm długości i 31 mm rozpiętości skrzydeł oraz ważą około 170 mg. Samce są mniejsze i jaśniejsze w porównaniu z samicami. Na intensywność zabarwienia wpływa dieta gąsienic oraz czas trwania poszczególnych stadiów rozwojowych. Postaci dorosłe nie pobierają pokarmu, na co wskazuje zredukowany aparat gębowy. Samce żyją dłużej niż samice, odpowiednio, średnio 21 i 12 dni (Charriere i Imdorf, 1999; Ellis i in., 2013; Kwadha i in. 2017).



Ryc. 2. Gąsienica (a) oraz postać dorosła (b) barciaka większego *G. mellonella* (nie zachowano skali). Larwy żerują na plastrach woszczyny (c), co prowadzi do zniszczenia ich struktury (d) (opracowanie własne).

Ze względu na szereg zalet, barciak większy jest uznawany za bardzo dobry organizm modelowy do badań nad mechanizmami odporności wrodzonej. Do najczęściej wymienianych korzyści przemawiających za wykorzystaniem *G. mellonella* jako organizmu modelowego należą:

- łatwość hodowli i jej niski koszt,
- krótki cykl życiowy,
- duża liczba potomstwa,
- stosunkowo duży rozmiar gąsienic,
- łatwość oceny żywotności gąsienic,
- podatność na manipulacje doświadczalne,
- możliwość prowadzenia hodowli w 37°C,
- wykorzystanie owadów jako modelu doświadczalnego nie budzi

sprzeciwu natury etycznej.

Gąsienice można z łatwością hodować na pożywce naturalnej (plastry woszczyny), bądź sztucznej, złożonej między innymi z miodu, płatków zbóż oraz glicerolu (Cytryńska i in., 2007; Ellis i in., 2013; Jorjão i in., 2018; Wu i Yi, 2015). Zapewnienie odpowiednich warunków (temperatura 28-30°C, 70% wilgotności, zaciemnienie) pozwala na uzyskanie gąsienic z siódmego stadium wylinkowego w

ciągu ok. 5 tygodni (Ramarao i in., 2012). Mają one wtedy masę ok. 250 mg, co umożliwia podanie każdej gąsienicy ściśle zdefiniowanej dawki immunogenu bądź substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wielkość gąsienic pozwala również na pobranie wystarczającej ilości materiału do dalszych badań, np. hemolimfy, hemocytów czy ciała tłuszczowego. Gąsienice *G. mellonella* mogą być z powodzeniem wykorzystywane w badaniach nad przebiegiem zakażenia patogenami ludzkimi, z uwagi na możliwość prowadzenia hodowli w temperaturze 37°C, która stanowi odzwierciedlenie warunków panujących w organizmie człowieka. Temperatura ta jest niezbędna do syntezy czynników wirulencji przez wiele patogenów (Kanost i in., 2004; Perdoni i in., 2014; Ramarao i in., 2012; Trevijano-Contador i Zaragoza, 2019; Wu i in., 2016). Wykorzystanie owadów jako organizmów modelowych, nie wymaga zgody odpowiedniej instytucji (Mukherjee i in., 2011), którą w Polsce jest Krajowa Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (zgodnie z art. 44 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych; Dz. U. poz. 266).

Ze względu na fakt, że mechanizmy odpowiedzi immunologicznej u owadów wykazują podobieństwo do mechanizmów wrodzonej odporności uruchamianych w organizmach ssaków, gąsienice *G. mellonella* znajdują szerokie zastosowanie, na przykład:

- w badaniach patogenezy infekcji i czynników wirulencji bakterii, np. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, a także grzybów chorobotwórczych dla człowieka: *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Paracoccidioides lutzii*, *Histoplasma capsulatum* (Andrejko i in., 2014; Aperis i in., 2007; Benaducci i in., 2016; Desalermos i in., 2015; Fedhila i in., 2006; Killiny, 2018; Miyata i in., 2003; Reeves i in., 2004; Silva i in., 2017; Thomaz i in., 2013),
- do oceny skuteczności *in vivo* nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Kavanagh i Sheehan, 2018),
- jako źródło związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, np. peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Sowa-Jasiłek i in., 2016; Zdybicka-Barabas i in., 2018),

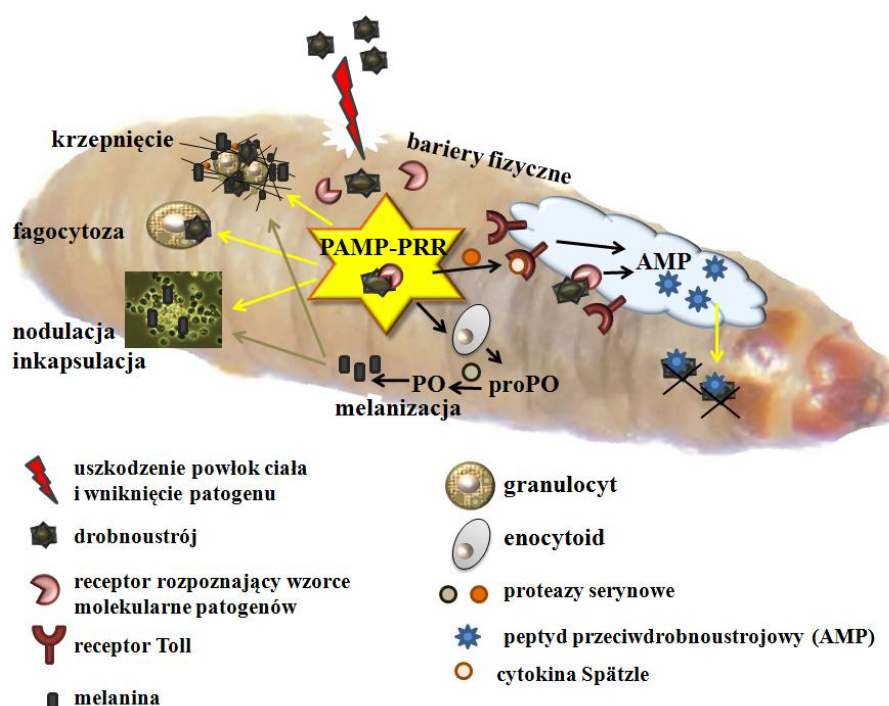
- testowania różnych związków pod kątem ich toksycznego działania, np. konserwantów żywności (Maguire i in., 2016).

I.2. Odpowiedź odpornościowa owadów

Wszystkie organizmy żywe narażone są na atak ze strony drobnoustrojów i pasożytów. Układ odpornościowy bezkręgowców do walki z nimi ma do dyspozycji jedynie mechanizmy odporności wrodzonej, w odróżnieniu od kręgowców, które ponad 500 milionów lat temu rozwinęły dodatkowo odporność nabytą, opartą na funkcjonowaniu przeciwciał i limfocytów wyposażonych w receptory rozpoznające specyficznie antygeny patogenów. Dodatkowo, zjawisko pamięci immunologicznej funkcjonujące u kręgowców umożliwia szybszą reakcję na powtórny kontakt z patogenem (Cooper i Alder, 2006; Flajnik i Kasahara, 2010).

Owady, pomimo braku odporności nabytej, nie pozostają bezbronne wobec zagrożenia ze strony patogenów. Sprawnie działające mechanizmy odporności wrodzonej pozwalają im na skuteczną walkę z drobnoustrojami. Do reakcji układu odpornościowego owadów uruchamianych w odpowiedzi na zakażenie należą procesy fagocytozy, nodulacji i inkapsulacji, składające się na odpowiedź komórkową, oraz odpowiedź humoralna, obejmująca m.in. procesy krzepnięcia i melanizacji, wytwarzanie molekuł sygnałnych oraz peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Ryc. 3) (Hoffmann i in., 1999).

Pierwszą linię obrony owadów stanowią bariery mechaniczne w postaci okrywy ciała i wyściółki jelita i tchawek, ale również, w przypadku ich uszkodzenia, szybka reakcja krzepnięcia hemolimfy w miejscu zranienia, wraz z towarzyszącym temu procesowi wytwarzaniem cząsteczek o aktywności cytotoksycznej (Lavine i Strand, 2002). Mikroorganizmy, którym udało się sforsować tę linię obrony, narażone są na odpowiedź komórkową ze strony hemocytów, obejmującą fagocytozę i nodulację, oraz odpowiedź humoralną, która opiera się na aktywności peptydów przeciwdrobnoustrojowych, działaniu reaktywnych form tlenu i azotu oraz produktów aktywacji procesów krzepnięcia hemolimfy i melanizacji (Bogdan i in., 2000; Lemaitre i Hoffman, 2007; Lowenberger, 2001; Meister i in., 2000). Poszczególne reakcje wrodzonej odpowiedzi immunologicznej wzajemnie się uzupełniają. Wiele czynników zaangażowanych w odpowiedź humoralną wpływa na aktywność hemocytów, będących jednocześnie źródłem cząsteczek biorących udział w odpowiedzi humoralnej (Elrod-Erickson i in., 2000; Pech i Strand, 1996) (Ryc. 3).



Ryc. 3. Reakcje odpornościowe *G. mellonella* uruchamiane w odpowiedzi na zakażenie. Naruszenie ciągłości powłok ciała owada wiąże się z ryzykiem dostania się patogenów do hemocelu. Rozpoznanie struktur charakterystycznych dla drobnoustrojów (PAMPs) przez receptory rozpoznające wzorce molekularne (PRRs) prowadzi do uruchomienia szeregu reakcji odpornościowych. Należy do nich między innymi aktywacja odpowiedzi komórkowej (fagocytozy, nodulacji bądź inkapsulacji), w którą zaangażowane są hemocyty. Granulocyty, wraz z innymi czynnikami obecnymi w hemolimfie, biorą również udział w procesie krzepnięcia hemolimfy, która prowadzi do gojenia ran i unieruchomienia mikroorganizmów. W obu procesach istotną rolę odgrywa melanina, która wytwarzana jest po aktywacji układu oksydazy fenolowej (PO), uwalnianej z entocytoidów w formie nieaktywnej (proPO). Rozpoznanie patogenu prowadzi również do aktywacji odpowiedzi humoralnej. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) wytwarzane są w komórkach ciała tłuszczowego lub hemocytach, w wyniku aktywacji szlaków przekazywania sygnałów Toll, Imd bądź JAK/STAT. Ich uruchomienie następuje po bezpośrednim związaniu PAMP do receptora PRR znajdującego się w błonie, bądź, jak w przypadku szlaku Toll, poprzez aktywację cytokiny Spätzle (opracowanie własne). Szczegółowy opis w tekście.

I.2.1. Bariery anatomiczne i fizjologiczne

Owady wykorzystują bariery anatomiczne i fizjologiczne do ochrony przed uszkodzeniem mechanicznym oraz przed wtargnięciem do hemocelu ciał obcych. Ciało owadów pokryte jest pojedynczą warstwą nabłonka oraz kutikulą, która stanowi hydrofobowy egzoszkielet (Lundgren i Jurat-Funentes, 2012). Kutikula zbudowana jest z dwóch warstw: wewnętrznej, w skład której wchodzi białka i chityna oraz

zewnętrznej, zbudowanej z kutikuliny. Kutikula wyściela również jelito przednie i tylne oraz tchawki (Hillyer, 2016). W tchawkach, poza obecnością twardniejącej z wiekiem chityny, panują warunki niesprzyjające rozwojowi mikroorganizmów, takie jak niska wilgotność oraz brak substancji odżywczych (Moussian, 2010; Wojda, 2017). Infekcjom, których źródłem mógłby być spożywany przez owady pokarm, zapobiega budowa i środowisko biochemiczne panujące w jelicie. Jak wspomniano, jelito przednie i tylne pokrywa warstwa chityny, natomiast w jelicie środkowym występuje błona perytroficzna, której zadaniem jest odseparowanie treści pokarmowej od nabłonka jelitowego. Dodatkowo, panujące w jelicie wysokie pH oraz obecność enzymów trawiennych stwarzają niekorzystne warunki dla rozwoju mikroorganizmów. Istotną rolę w utrzymaniu homeostazy jelitowej pełni mikroflora fizjologiczna, która przyczynia się do redukcji ilości drobnoustrojów spożywanych wraz z pokarmem (Hegedus i in., 2009; Wojda, 2017).

Badania dowodzą, że nabłonek wyścielający tkanki narażone na kontakt ze środowiskiem zewnętrznym, a więc drogi oddechowe, układ pokarmowy oraz rozrodczy, nie jest tylko bierną barierą chroniącą organizm owada przed infekcją, ale stanowi aktywny składnik odporności wrodzonej. Wykazano, że u *Drosophila melanogaster* dochodzi w nim do ekspresji peptydów przeciwdrobnoustrojowych, w tym o aktywności przeciwgrzybowej (drosomycyny), na drodze niezależnej od szlaku Toll (Ferrandon i in., 1998).

I.2.2. Rozpoznawanie patogenów i innych ciał obcych

Identyfikacja obcej cząstki przez układ immunologiczny owada jest kluczowym etapem w interakcji gospodarz-patogen, niezbędnym do podjęcia dalszych działań, mających na celu eliminację zagrożenia i przywrócenie homeostazy organizmu. Wykrycie patogenów polega na rozpoznaniu charakterystycznych, konserwatywnych struktur komórek drobnoustrojów, zwanych wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMPs, ang. *pathogen associated molecular patterns*) przez odpowiednie receptory rozpoznające te wzorce (PRRs, ang. *pattern recognition receptors*) (Dubovskiy i in., 2016; Fearon, 1997). Rolę determinant strukturalnych drobnoustrojów rozpoznawanych przez układ odpornościowy owadów mogą pełnić między innymi składniki ściany komórkowej bakterii: peptydoglikan (PG), kwasy lipoteichoiczne (ang. *lipoteichoic acids*, LTA), lipopolisacharyd (LPS), a także flagellina wici bakteryjnych,

polisacharydy ściany komórkowej grzybów (β -1,3-glukan) oraz kwasy nukleinowe (DNA oraz dwuniciowy RNA) (Royet i Reichhart, 2003).

W badaniach z wykorzystaniem *D. melanogaster* wykazano, że układ odpornościowy owadów jest w stanie rozróżnić cząsteczki PAMPs pochodzące od różnego typu drobnoustrojów. Na skutek rozpoznania bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów czy wirusów, w komórkach ciała tłuszczowego, hemocytach, a także komórkach nabłonkowych, uruchamiane są odpowiednie szlaki sygnałowe, prowadzące do wytworzenia molekuł efektorowych najskuteczniejszych wobec danego typu patogenu. Geny kodujące składniki zaangażowane w przebieg tych szlaków zidentyfikowano również w genomach innych gatunków owadów, między innymi *Bombyx mori* czy *G. mellonella* (Vogel i in., 2011). Wykazano, że w odpowiedzi na infekcje bakteriami Gram-dodatnimi oraz grzybami uruchamiany jest szlak Toll. Bakterie Gram-ujemne aktywują szlak Imd (ang. *immune deficiency*), natomiast wirusy szlak JAK/STAT (ang. *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) (Ryc. 4).

Poza komórkami bakterii czy grzybów, układ odpornościowy owadów potrafi wykrywać obecność innych ciał obcych, takich jak: pierwotniaki, nicienie, pasożyty oraz przeszczepy ksenobiotyczne tkanek od innych gatunków owadów. Rozpoznanie opiera się prawdopodobnie na detekcji zaburzeń w integralności błony podstawnej (ang. *basal membrane*, BM), otaczającej wszystkie narządy (Gillespie i in., 1997; Karacali i in., 2000; Lackie, 1988; Rizki i Rizki, 1980; Strand i Pech, 1995). Hemocyty nie ulegają adhezji do nieuszkodzonej powierzchni BM, ale zaburzenie lub uszkodzenie jej struktury prowadzi do adhezji hemocytów oraz aktywacji szlaku JAK/STAT w hemocytach, a także w komórkach ciała tłuszczowego (Nardi i in., 2001; Pastor-Pareja i in., 2008). Błona podstawna u owadów zbudowana jest między innymi z kolagenu IV, lamininy i glikoprotein (Yurchenco, 2011), a w jej wytwarzaniu i regeneracji biorą udział hemocyty. Badania na *Drosophila* wykazały, że kluczowym składnikiem w utrzymywaniu integralności tej struktury jest laminina, a jej obecność zapobiega reakcji autoimmunologicznej (Kim i Choe, 2014). Kulki Sephadex pokryte lamininą podlegają słabszej inkapsulacji przez hemocyty komarów (Warburg i in., 2007). Wykazano, że różnice w składzie BM zwiększają się wraz z odległością filogenetyczną pomiędzy gatunkami owadów. Tkanki przeszczepione od przedstawicieli tego samego gatunku zazwyczaj nie są otaczane kapsułami. Natomiast przeszczepy tkanek pochodzących od

gatunków odległych filogenetycznie są szybko izolowane w procesie inkapsulacji (Lackie, 1988; Rizki i Rizki, 1980; Rizki i Rizki 1983).

Odpowiedź immunologiczna może być również indukowana w reakcji na fragmenty uszkodzonych tkanek (kolagen, glikolipidy, glikoproteiny) lub cząsteczki pojawiające się w wyniku uszkodzenia komórek (reaktywne formy tlenu, jony wapnia) określane jako DAMPs (ang. *damage-associated molecular patterns*) (Razzell i in., 2013). Enzymy wytwarzane przez entomopatogeny, np. metaloproteiny, mogą być zaangażowane w uwalnianie molekuł pełniących rolę DAMPs, m.in. niskocząsteczkowych fragmentów białek hemolimfy u *G. mellonella* (Altincicek i in., 2007; St Leger i in., 1994). Za rozpoznanie składników własnych tkanek, które w warunkach fizjologicznych nie są ekspozowane na powierzchni, odpowiadają m. in. lektyny, ze specyficznym motywem wiążącym polisacharydy (Vijayan i Chandra, 1999). U *G. mellonella* dochodzi do szybkiej inkapsulacji własnych tkanek, po uprzednim potraktowaniu ich neuraminidazą. Wskutek jej działania z glikoprotein błony komórkowej usuwane są reszty kwasu sialowego, w wyniku czego dochodzi do odsłonięcia motywów uznawanych za obce, albo też glikoproteiny są zmienione w takim stopniu, że mogą się do nich wiązać receptory rozpuszczalne bądź związane z hemocytami (Karacali i in., 2000). Cząstki DAMPs mogą aktywować w komórkach każdy z wymienionych wyżej szlaków sygnałowych.

I.2.2.1. Receptory rozpoznające determinanty molekularne drobnoustrojów

Białka rozpoznające peptydoglikan

Zdolność układu odpornościowego *Drosophila* do odróżniania infekcji bakteriami Gram-dodatnimi od infekcji bakteriami Gram-ujemnymi polega na rozpoznaniu określonego typu peptydoglikanu wchodzącego w skład ściany komórkowej bakterii przez odpowiednie receptory. Ściana komórkowa większości bakterii Gram-dodatnich zbudowana jest z peptydoglikanu typu lizynowego (PG-Lys), który jest ekspozowany na powierzchni wraz z cząsteczkami kwasów lipotejchowych. U bakterii Gram-ujemnych, peptydoglikan typu diaminopimelinowego (PG-DAP) oddziela od środowiska błona zewnętrzna, w skład której wchodzi lipopolisacharyd (LPS) (Kurata, 2014).

Białko rozpoznające peptydoglikan (ang. *peptidoglycan recognition protein*, PGRP) zidentyfikowano po raz pierwszy w hemolimfie *B. mori* jako 19 kDa cząsteczkę, wykazującą silne powinowactwo do peptydoglikanu bakterii Gram-dodatnich (nie

wiążącą się do LPS czy chityny) (Yoshida i in., 1996). Analiza genetyczna wykazała, że geny kodujące PGRPs są ewolucyjnie konserwatywną rodziną, występującą między innymi w genomach owadów (m. in. Lepidoptera i Diptera) i ssaków (np. myszy i człowieka) (Dziarski, 2004; Kurata, 2014; Werner i in., 2000). W genomie *Drosophila* wyróżnić można geny kodujące 13 białek PGRPs, ulegające ekspresji w komórkach ciała tłuszczowego i hemocytach. Można je podzielić na dwie podrodziny. Pierwszą grupę stanowi siedem małych PGRPs (ang. *small*, S), o długości ok. 200 reszt aminokwasów, będących ortologami białka o masie 19 kDa zidentyfikowanego u *B. mori*. Zawierają jedną domenę PGRP i peptyd sygnałny, co wskazuje, że są białkami wydzielanymi z komórek. Przedstawiciele drugiej podrodziny białek PGRPs, PGRP-L (ang. *long*, L) mają długość od 200 do 600 reszt aminokwasów i są białkami transbłonowymi (PGRP-LC, -LD, -LA, -LF) lub cytoplazmatycznymi (PGRP-LB, -LE). Wykazano, że niektóre białka PGRP-L mają więcej niż jedną domenę PGRP. Dzięki procesowi alternatywnego splicingu mogą powstawać różne receptory PGRP-LC (np. PGRP-LCa, -LCx, -LCy) o takich samych domenach cytoplazmatycznych, ale różniące się domenami zewnątrzkomórkowymi (Choe i in., 2002; Werner i in., 2003).

Białka β GRP/GNBP

W rozpoznanie zakażenia grzybowego zaangażowane są białka z rodziny β GRP/GNBP (białka rozpoznające β -1,3-glukan/białka wiążące bakterie Gram-ujemne, ang. *β -1,3-glucan recognition proteins/Gram-negative bacteria binding proteins*) (Rao i in., 2018). W większości przypadków, geny kodujące GNBP ulegają ekspresji, podobnie jak geny dla PGRPs, w tkankach owada zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną, takich jak ciało tłuszczowe i hemocyty (Kim i in., 2000; Ma i Kanost, 2000). Po raz pierwszy białka te zidentyfikowano w hemolimfie *B. mori* (Lepidoptera). U owadów będących przedstawicielami różnych rzędów, za wiązanie β -1,3-glukanu odpowiadają homologiczne białka. U *D. melanogaster* (Diptera) jest to GNBP3, które wykazuje znaczne podobieństwo do białka rozpoznającego β -1,3-glukan (β GRP) występującego u Lepidoptera, np. *B. mori* czy *G. mellonella*. Receptory β GRP/GNBP mają dwie domeny wiążące struktury powierzchniowe mikroorganizmów. N-końcową domenę zbudowaną z około 100 reszt aminokwasowych, która jest odpowiedzialna za wiązanie β -1,3-glukanu oraz C-końcową domenę (ok. 350 reszt aminokwasowych), która u *B. mori* wykazuje wysokie powinowactwo zarówno do β -1,3-glukanu, jak i LPS

(Lee i in., 1996; Ma i Kanost, 2000; Ochiai i Ashida, 2000). Część C-końcowa wykazuje homologię do domeny katalitycznej bakteryjnych β -1,3-glukanaz (Hughes, 2012). Brak jednak w niej kluczowych dla aktywności katalitycznej reszt aminokwasowych, co sugeruje brak aktywności enzymatycznej. Obecność peptydu sygnałnego wskazuje, że β GRP/GNBP funkcjonują jako białka zewnątrzkomórkowe. Mutanty *D. melanogaster*, które nie wytwarzają receptorów GNBP3, nie są w stanie aktywować szlaku Toll, przez co są wrażliwe na infekcje grzybowe (Ma i Kanost, 2001; Ochiai i Ashida, 1988).

Do rodziny białek GNBP3 należy również białko GNBP1 *Drosophila*, które, w odróżnieniu od GNBP3, bierze udział w rozpoznawaniu bakterii Gram-dodatnich. Kotwica glikozylofosfatydyloinozytolowa (ang. *glycosylphosphatidylinositol*, GPI), obecna w GNBP1 *Drosophila*, wskazuje na możliwość zakotwiczenia tego receptora w błonie komórkowej (Kim i in., 2000). Mutanty *D. melanogaster* pozbawione GNBP1 nie rozpoznawały bakterii Gram-dodatnich, natomiast na bakterie Gram-ujemne i grzyby reagowały podobnie jak muszki typu dzikiego (Gobert i in., 2003).

Inne białka pełniące rolę receptorów PRRs

Poza receptorami PGRPs oraz β GRP/GNBP3, w rozpoznaniu ciał obcych u owadów zaangażowane są również inne białka. U *Drosophila* w rozpoznaniu struktur PAMPs biorą również udział lektyny typu C, galektyny, białka z powtórzeniami bogatymi w leucynę (ang. *leucine-rich repeat proteins*, LRRPs), białka Nimrod i Eater (zawierające powtórzenia domeny naskórkowego czynnika wzrostu, ang. *epidermal growth factor-like*, EGF-like), białka podobne do fibrynogenu (ang. *fibrinogen-related proteins*, FREPs), białka Teps (ang. *thioester containing proteins*) oraz receptory DSCAM (ang. *Down syndrome cell adhesion molecule*) i Reeler (Hillyer, 2016; Wang i Ligoxygakis, 2006).

Do białek, które u *Manduca sexta* pełnią rolę receptorów PRRs, poza PGRPs i β GRP3, należą również hemolina i lektyny typu C (Cao i in., 2015; Rao i in., 2015; Wang i in., 2011; Zhang i in., 2015; Zhu i in., 2010). W genomie *M. sexta* zidentyfikowano sekwencje wykazujące podobieństwo do sekwencji PRRs opisanych u innych stawonogów, np. białka zawierające domeny LRR czy EGF/Nim (EGF/Nim-domain proteins), galektyny, białka Teps, Reeler oraz białka zawierające domeny immunoglobulinowe (Zhang i in., 2015). Podobnie, w hemolimfie *G. mellonella*,

potwierdzono obecność między innymi PGRPs i β GRP/GNBPs, hemoliny i białka Reeler (Vogel i in., 2011). Wykazano również, że apolipoforyna III (opis w dalszej części pracy), może wiązać się do struktur PAMPs, takich jak LTA, LPS oraz β -1,3-glukan, pełniąc tym samym rolę białka opsonizującego (Halwani i in. 2000; Oztug i in., 2012; Whitten i in., 2004).

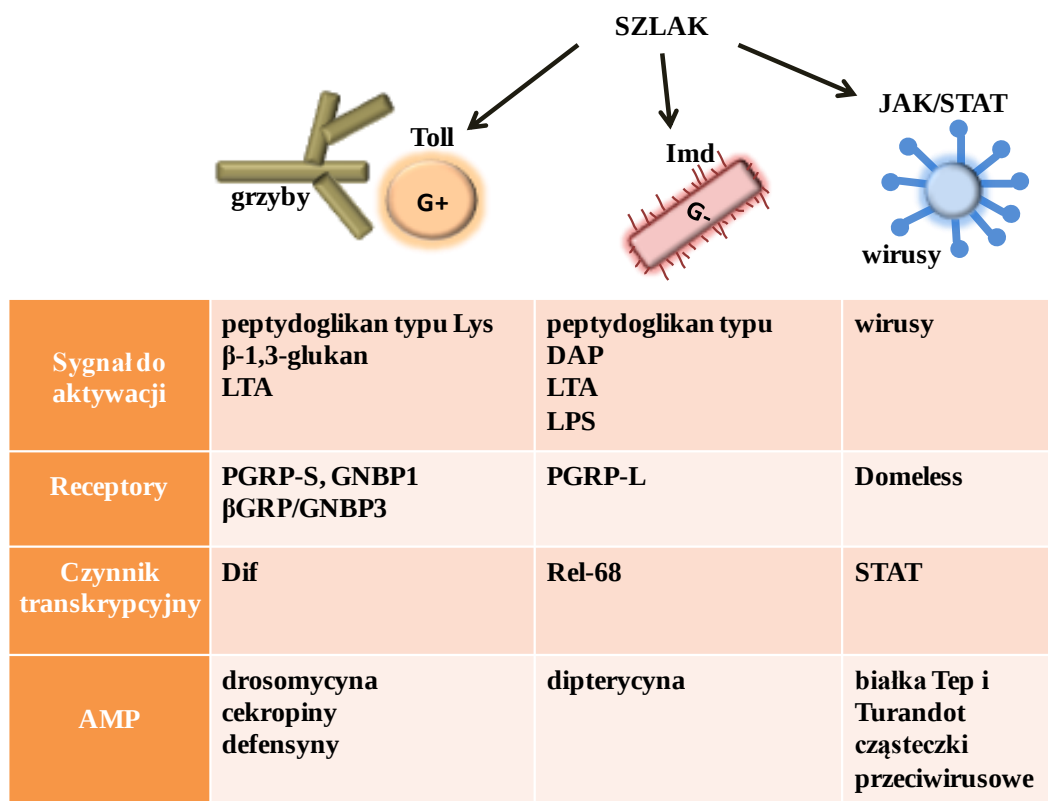
Lektyny typu C stanowią ważną grupę białek zależnych od jonów wapnia, które występują zarówno u bezkręgowców, jak i kregowców (Pendland i in., 1988, Yu i Kanost, 2000). Zawierają w cząsteczce jedną lub większą liczbę domen wiążących reszty cukrowe. U *M. sexta* zidentyfikowano cztery lektyny typu C z dwoma domenami wiążącymi polisacharydy i określono je mianem immunolektyn (Yu i in., 1999). Do ekspresji immunolektyn dochodzi w ciele tłuszczowym po rozpoznaniu patogenu. Immunolektyny *M. sexta* wiążą różne składniki ściany komórkowej drobnoustrojów, m. in. LTA, LPS, mannozę i laminarynę naśladującą β -glukany grzybów (Rao i in., 2015; Zhang i in., 2015). Wykazano, że lektyny typu C zaangażowane są w wiązanie reszt cukrowych zarówno na powierzchni komórek mikroorganizmów, jak i hemocytów, co prowadzi do ich agregacji (Koizumi i in., 1999). Badania pokazały również, że są niezbędne do aktywacji układu oksydazy fenolowej po rozpoznaniu LPS (Yu i Kanost, 2000).

Hemolinę, białko o masie cząsteczkowej 48 kDa, zawierające cztery niezmiennie domeny immunoglobulinowe (ang. *immunoglobulin-like domain*) zidentyfikowano w hemolimfie przedstawicieli rzędu Lepidoptera (*M. sexta*, *H. cecropia*, *G. mellonella*). Oddziałuje ona zarówno z LTA, LPS, jak również β -1,3-glukanem, odpowiednio, bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów, co prowadzi do ich agregacji (Bettencourt i in., 1997; Daffre i Faye, 1997; Shaik i Sehna, 2009; Yu i Kanost, 2002). Wykazano również, że hemolina stanowi istotny czynnik w odpowiedzi owada na infekcje wirusowe (Terenius, 2008).

Receptory DSCAM zawierają domeny immunoglobulinowe, których zmienność warunkowana jest alternatywnym splicingiem. Proces ten potencjalnie pozwala uzyskać aż 38000 izoform receptora DSCAM kodowanych przez pojedynczy gen u *D. melanogaster*. Uważa się, że taka zmienność umożliwia rozróżnianie typów mikroorganizmów, np. u komarów *Anopheles gambiae* infekcję bakteriami od infekcji pierwotniakami *Plasmodium*, a dodatkowo pomiędzy różnymi ich gatunkami, np. *P. berghei* i *P. falciparum* (Smith i in., 2011; Dong i in., 2006a).

I.2.2.2. Szlaki sygnałowe uruchamiane w wyniku rozpoznania patogenów

W efekcie oddziaływania receptorów PRRs z cząsteczkami PAMPs/DAMPs następuje aktywacja szeregu reakcji i uruchomienie odpowiedzi komórkowej i humoralnej (Ryc. 4). W ramach odpowiedzi humoralnej zachodzi aktywacja określonych szlaków sygnałowych (Toll, Imd lub JAK/STAT), co prowadzi do indukcji transkrypcji licznych genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną (Ryc. 4) (Choe i in., 2002; Lemaitre i Hoffmann, 2007; Stokes i in., 2015). Wytwarzane są peptydy i białka, które działają przeciwdrobnoustrojowo, bądź pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych, mogących indukować i wzmacniać procesy inkapsulacji i nodulacji (Lemaitre i Hoffmann, 2007; Marmaras i Lampropoulou, 2009; Myllymaki i Ramet, 2014).



Ryc. 4. Porównanie szlaków sygnałowych Toll, Imd i JAK/STAT.

Szlak Toll uruchamiany jest w odpowiedzi na rozpoznanie większości bakterii Gram-dodatnich i grzybów, natomiast szlak Imd - bakterii Gram-ujemnych. Szlak JAK/STAT jest aktywowany głównie przez wirusy. Wszystkie szlaki mogą ponadto być uruchamiane w reakcji na rozpoznanie cząstek DAMPs (opracowanie własne na podstawie: Agaisse i Perrimon, 2004; de Gregorio i in., 2002; Lindsay i Wasserman, 2014; Myllymaki i in., 2014). Szczegółowy opis w tekście.

Szlak Toll

Receptory z rodziny Toll (Toll i Toll-podobne) należą do grupy I receptorów transbłonowych. W cząsteczce receptorów Toll wyróżnić można domenę zewnątrzkomórkową zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (ang. *leucine-rich repeats*, LRRs), domenę transbłonową oraz domenę cytoplazmatyczną Toll/IL-1R (ang. *Toll/interleukin-1 receptor*, TIR). Pierwszy receptor Toll opisano u *D. melanogaster*. Receptory te zostały zidentyfikowane również w genomach innych owadów, m. in. komarów czy u przedstawiciela Lepidoptera, *G. mellonella* (Luo i Zheng, 2000). U barciaka większego zidentyfikowano transkrypty trzech receptorów Toll (Vogel i in., 2011). Receptory z rodziny Toll odgrywają kluczową rolę w odporności wrodzonej zarówno owadów, jak i ssaków. To właśnie podobieństwo receptorów Toll aktywnych w szlakach sygnałowych *D. melanogaster* i ssaków, predestynowało muszkę owocową do wykorzystania jako organizmu modelowego w badaniach nad mechanizmami odporności wrodzonej (Lemaitre i Hoffman, 2007). Homologia w budowie receptorów Toll-podobnych ssaków oraz Toll *Drosophila* dotyczy domeny cytoplazmatycznej TIR (Imler i Zheng, 2004; Zhang i Ghosh, 2001). Receptor Toll u *Drosophila* nie funkcjonuje jednak jako PRR, w przeciwieństwie do receptorów Toll-podobnych u kręgowców, ze względu na fakt, że jego aktywacja następuje po związaniu cytokiny Spätzle (opis poniżej), a nie PAMPs mikroorganizmów (Lemaitre i Hoffmann, 2007; Silverman i Maniatis, 2001; Valanne i in., 2011). W odpowiedzi na rozpoznanie patogenów przez receptory Toll-podobne u ssaków dochodzi do wytworzenia cytokin i innych molekuł, co skutkuje aktywacją limfocytów T (Akira i Hemmi, 2003).

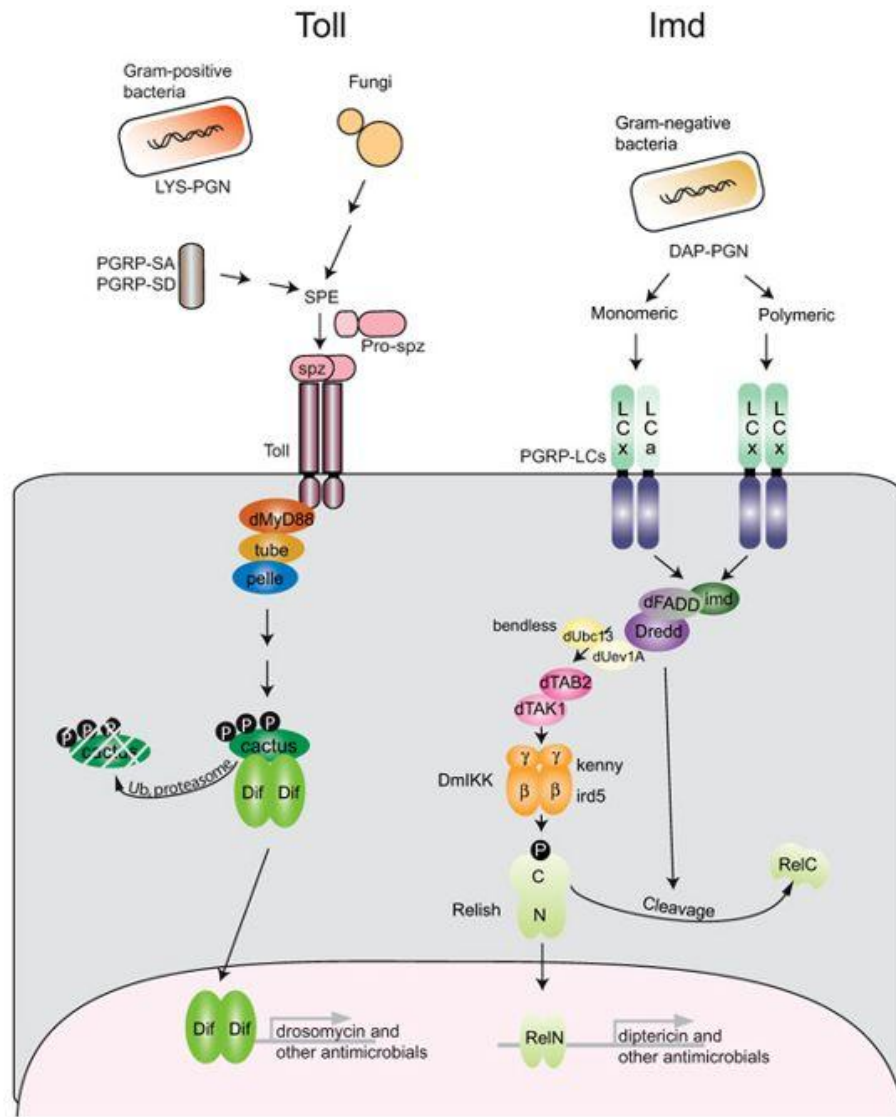
Aktywacja szlaku Toll u *D. melanogaster* następuje w wyniku rozpoznania peptydoglikanu typu lizynowego obecnego w ścianie komórkowej większości bakterii Gram-dodatnich, przez receptory PGRP-SD, PGRP-SA oraz GNBP1 (Leulier i in., 2003). Wielkość cząstki niezbędna do rozpoznania i aktywacji szlaku Toll u *B. mori*, a następnie indukcji syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, to dwa powtórzenia jednostki budującej peptydoglikan: *N*-acetyloglukozamina/kwas *N*-acetylmuraminowy, z bocznymi łańcuchami peptydowymi (Iketani i in., 1999). Wykazano, że kwas lipotejchojowy, będący składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, jest również aktywatorem szlaku Toll poprzez wiązanie z PGRP-SA/GNBP1 (Ryc. 5) (Werner i in., 2003). Rolę PAMP ściany komórkowej grzybów, aktywującego szlak

Toll, pełni β -1,3-glukan, który u *D. melanogaster* jest rozpoznawany przez receptor GNB3.

Oddziaływanie pomiędzy receptorem a odpowiadającym mu ligandem prowadzi do aktywacji odpowiedniej kaskady proteaz serynowych w hemolimfie. Ostatnia z nich aktywuje enzym SPE (ang. *Spätzle processing enzyme*), który dokonuje cięcia proteolitycznego białka pro-Spätzle. Dojrzałe białko Spätzle, pełniące rolę cytokiny, wiąże się jako dimer do receptora Toll w błonie komórkowej hemocytów i komórek ciała tłuszczowego. W efekcie dochodzi do dimeryzacji receptora Toll i uruchomienia szlaku przekazywania sygnału wewnątrz komórki. Domena cytoplazmatyczna zaktywowanego receptora Toll wiąże kompleks białek zawierających domenę śmierci: MyD88, Tube i Pelle, co skutkuje fosforylacją inhibitorowego białka Cactus (homolog I κ B) i dysocjacją kompleksu jaki tworzy to białko z czynnikiem Dif (ang. *Dorsal-related immune factor*), będącym homologiem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*). Uwolniony czynnik Dif ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywuje ekspresję genów określonych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, np. drosomycyny, wykazującej aktywność przeciwgrzybową (Ryc. 5) (Werner i in., 2003).

U owadów funkcjonuje dodatkowo równoległy sposób aktywacji szlaku Toll uruchamiany w odpowiedzi na patogeny grzybowe i bakteryjne. Obecna w hemolimfie owadów nieaktywna proteaza serynowa podobna do trypsyny, *Persephone*, ulega aktywacji poprzez ograniczoną proteolizę na skutek działania czynników wirulencji grzybów, takich jak np. proteaza Pr1 *Metarhizium anisopliae*, czy bakterii, np. subtilyzyna *Bacillus subtilis*. Aktywna *Persephone* uczestniczy w aktywacji enzymu SPE, co prowadzi do uwolnienia cytokiny Spätzle i uruchomienia szlaku Toll (Gottar, 2006; Issa i in., 2018; Ligoxygakis i in., 2002). Aktywacja szlaku Toll podczas infekcji może więc być wynikiem zarówno rozpoznania składników ściany komórkowej patogenów, jak i efektem działania ich czynników wirulencji (El Chamy i in., 2008).

U *Drosophila* aktywacja szlaku Toll zachodzi również w trakcie embriogenezy i wiąże się z kontrolą rozwoju osi grzbietowo-brzuszej owada (Lemaitre i Hoffmann, 2007). Najnowsze badania pokazują, że w wyniku uszkodzenia okrywy ciała, za pośrednictwem szlaku Toll dochodzi do aktywacji genów odpowiedzialnych za jej regenerację (Capilla i in., 2017).



Ryc. 5. Regulacja syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych w szlaku Toll i Imd u *Drosophila* (źródło: Cherry i Silverman, 2006). Opis w tekście.

Szlak Imd

Rozpoznanie peptydoglikanu typu DAP ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych oraz niektórych bakterii Gram-dodatnich, np. *Bacillus*, prowadzi do aktywacji szlaku Imd (Takehana i in., 2002). Peptydoglikan w postaci monomerycznej lub polimerycznej wiąże się z receptorami, odpowiednio, PGRP-LCx/PGRP-LCa i PGRP-LCx/PGRP-LCx, obecnymi w błonie komórek ciała tłuszczowego, co powoduje rekrutację białka IMD do domeny cytoplazmatycznej receptora. Prowadzi to do aktywacji kompleksu białka dFADD (ang. *Fas-associated protein with death domain*) z proteazą Dredd oraz kinazy białkowej MAPKKK (ang. *mitogen-activated protein*

kinase kinase kinase) *Drosophila* TAK1 (ang. *Drosophila transforming-growth-factor- β activating kinase*, dTAK1). Następnie kinaza IKK (ang. *I κ B kinase*) wspólnie z kompleksem proteazy Dredd aktywują czynnik transkrypcyjny Relish (homolog NF- κ B) poprzez, odpowiednio, fosforylację oraz odcięcie części inhibitorowej zawierającej powtórzenia ankirynowe. Następnie Rel-68, N-końcowa domena Relish, ulega translokacji do jądra komórkowego i aktywuje ekspresję genów dla odpowiednich AMPs, m. in. dipterycyny (Ertürk-Hasdemir i in., 2009) (Ryc. 5).

Mutanty *Drosophila*, u których zaburzone jest funkcjonowanie szlaku Imd, są wysoce wrażliwe na infekcje bakteriami Gram-ujemnymi. Ich wrażliwość na zakażenia grzybowe i bakteriami Gram-dodatnimi pozostaje jednocześnie na poziomie obserwowanym u typu dzikiego. Mutanty *Drosophila* w obu szlakach, Toll i Imd, są wrażliwe na infekcje zarówno bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi, jak i grzybami (Khush i in., 2001).

Szlak Imd wykazuje podobieństwo do funkcjonującego u ssaków szlaku TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*). Końcowym etapem zarówno szlaku TNF- α , jak również Imd, jest aktywacja homologicznych czynników transkrypcyjnych, odpowiednio NF- κ B i Relish (Kleino i Silverman, 2014). U ssaków, szlak TNF- α jest zaangażowany w regulację wytwarzania cytokin prozapalnych oraz procesy apoptozy komórek (Ting i Bertrand, 2016).

Szlak JAK/STAT

U *D. melanogaster* aktywacja szlaku JAK/STAT jest kluczowa dla prawidłowego przebiegu rozwoju embrionalnego i determinacji płci. Szlak ten jest też zaangażowany w regulację hematopoezy oraz w reakcjach odpornościowych. Uruchomienie szlaku następuje w odpowiedzi na infekcję bakteryjną, grzybową lub wirusową. Zewnątrzkomórkowa cytokina Upd (Unpaired) (homolog IL-6 kręgowców), wiąże się i aktywuje receptor Domeless, co prowadzi do aktywacji kinazy Janus (JAK), Hopscotch (Hop). Aktywowana kinaza Hop fosforyluje związany do receptora czynnik transkrypcyjny STAT, co powoduje jego dimeryzację. W takiej formie wnika on do jądra i aktywuje transkrypcję genów kodujących białka z rodziny Teps (Tep2 jest homologiem białka układu dopełniacza kręgowców) i Turandot, ulegających ekspresji w warunkach stresowych oraz genu dla syntazy tlenku azotu. Wykazano, że mutanty *D. melanogaster* z wyłączonym szlakiem JAK/STAT są odporne na infekcje grzybowe i

bakteryjne w stopniu zbliżonym do muszek typu dzikiego, jednak są wrażliwe na infekcje wirusowe (Bier i Guichard, 2012; Bina i Zeidler, 2009).

Wszystkie opisane szlaki sygnałowe są ściśle regulowane. Obecność wewnątrzkomórkowych białek, takich jak: Cactus, Caspar oraz Socs/Pias odpowiada za negatywną regulację aktywności szlaku, odpowiednio, Toll, Imd oraz JAK/STAT (Hillyer, 2016).

I.2.3. Odpowiedź komórkowa

Reakcje odpowiedzi komórkowej owadów wymagają zaangażowania hemocytów. W zależności od rodzaju patogenu uruchamiany jest proces fagocytozy, nodulacji bądź inkapsulacji.

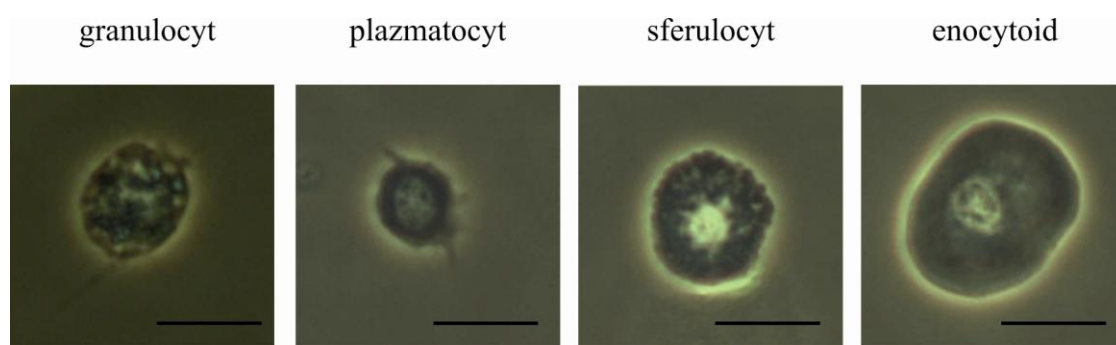
Hemocyty

Hemocyty są elementami morfotycznymi hemolimfy, które biorą bezpośredni udział w procesie krzepnięcia hemolimfy oraz odpowiedzi komórkowej. Ze względu na lokalizację, hemocyty podzielić można na krążące w hemolimfie oraz osiadłe, przytwierdzone luźno do powierzchni narządów wewnętrznych owada, m.in. ciała tłuszczowego i przewodu pokarmowego (Blanco i in., 2017; Hillyer i Strand, 2014). Pod względem cech morfologicznych i histochemicznych hemocyty Lepidoptera można podzielić na pięć typów (Blanco i in., 2017; Boguś i in., 2018; Tan i in., 2013; Vogelweith in., 2016; Wojda, 2017; Wu i in., 2016):

- prohemocyty - komórki o średnicy 6-8 μm , z dużym jądrem, uważane za komórki multipotencjalne, zdolne do różnicowania w inne typy hemocytów,
- plazmatocyty - hemocyty pleomorficzne, zawierają duże, centralnie położone jądro; okrągły kształt krążących w hemolimfie plazmatocytów (o średnicy 8-10 μm) ulega zmianie po adhezji komórek do różnych powierzchni, wskutek wytwarzania długich wypustek - mogą wtedy osiągać rozmiary 10-15 μm szerokości i 20-30 μm długości; uczestniczą w odpowiedzi komórkowej,
- granulocyty - hemocyty kuliste, o średnicy 8-12 μm , mające małe jądro i liczne granule obecne w cytoplazmie; podobnie jak plazmatocyty, mają zdolność adhezji, jednak wytwarzane przez nie wypustki są krótsze; uczestniczą w procesie fagocytozy, nodulacji i inkapsulacji oraz w procesie krzepnięcia hemolimfy; w odpowiedzi na rozpoznanie ciała obcego materiał zawarty w granulach ulega egzocytozie, pełniąc rolę opsonizującą ciała obce oraz atraktanta względem innych

hemocytów (Lapointe i in., 2012; Salem i in., 2014); prawdopodobnie biorą też udział w transporcie składników odżywczych w hemolimfie (Vogelweith i in., 2016),

- sferulocyty - okrągłe hemocyty o średnicy 10-15 μm , kształtem przypominają grudkę, ze względu na obecność licznych okrągłych i owalnych sferul związanych do błony komórkowej; są komórkami nieadherentnymi; przypisuje się im udział w transporcie składników kutikuli; u niektórych gatunków Lepidoptera nie stwierdzono obecności sferulocytów w hemolimfie,
- enocytoidy - komórki o średnicy 12 - 20 μm , kształtu okrągłego lub owalnego, z małym jądrem; zawierają składniki układu oksydazy fenolowej, stąd są zaangażowane w proces melanizacji; mogą również uwalniać kwasy nukleinowe, które stanowią sygnał alarmowy informujący o zakażeniu (Ryc. 6).



Ryc. 6. Typy hemocytów *G. mellonella*.

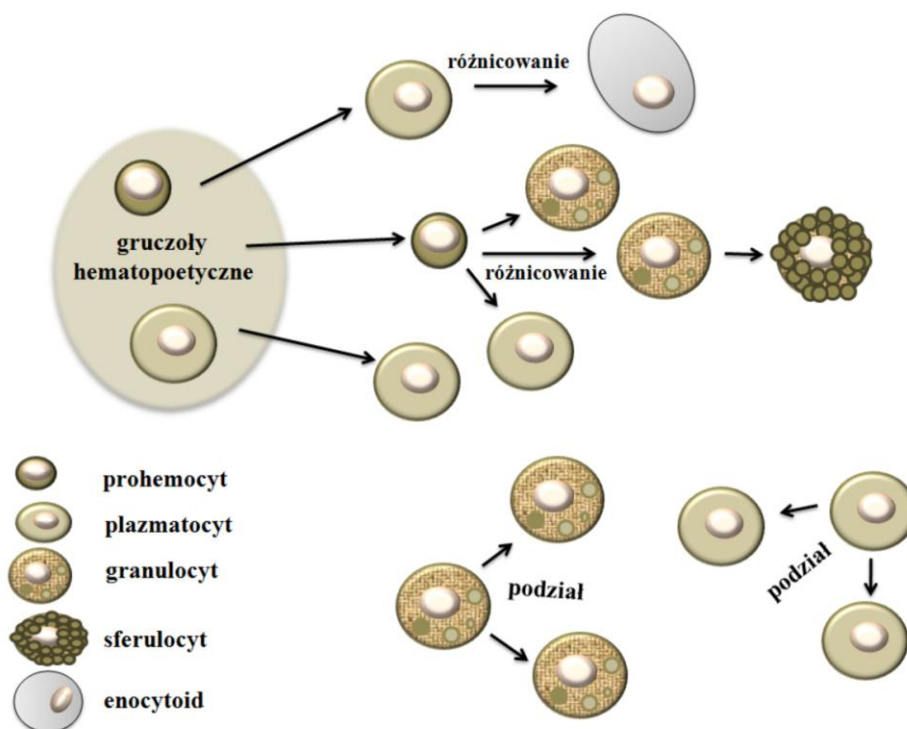
Reprezentatywny obraz hemocytów krążących w hemolimfie *G. mellonella* wykonany w mikroskopie kontrastowo-fazowym (opracowanie własne). Skala – 10 μm .

Całkowita liczba hemocytów oraz liczba poszczególnych typów hemocytów uzależniona jest od stadium rozwojowego owada, jak również od warunków środowiskowych, w tym diety i czynników stresowych (Blanco i in., 2017; Boguś i in., 2018; Vogelweith i in., 2016). W stadium larwalnym Lepidoptera granulocyty i plazmatocyty stanowią większość hemocytów krążących w hemolimfie i są jedynymi hemocytami zdolnymi do adhezji (Strand, 2008).

Hemocyty obecne w organizmie gąsienic Lepidoptera mają dwojakie pochodzenie. Część stanowią hemocyty, które powstały w trakcie rozwoju embrionalnego i ulegają kolejnym podziałom mitotycznym. Kwestią dyskusyjną pozostaje zdolność enocytoidów do podziałów (Beaulaton, 1979; Wu i in., 2016). Drugą grupę stanowią hemocyty wytwarzane przez gruczoły hematopoetyczne (Nakahara i in.,

2010; Tan i in., 2013). U Lepidoptera w gruczołach tych obecne są prohemocyty oraz plazmatocyty, w przeciwieństwie do populacji krążącej w hemolimfie, w której wyróżnić można wszystkie opisane wcześniej typy hemocytów (Nardi i in., 2003; Gardiner i Strand, 2000). Może to sugerować, że prohemocyty różnicują się w gruczołach hematopoetycznych jedynie w plazmatocyty, natomiast pozostałe typy hemocytów różnicują się dopiero po uwolnieniu do hemolimfy. Hodowla *in vitro* prohemocytów *B. mori* wykazała, że 60% tych komórek nie dzieliło się, ale różnicowało się w plazmatocyty i granulocyty. Część granulocytów przekształcała się następnie w sferulocyty. Spośród dzielących się prohemocytów 59,2% ich komórek potomnych różnicowało się w plazmatocyty, granulocyty i sferulocyty. Pozostałe dzieliły się, w wyniku czego powstawały potomne prohemocyty. Stwierdzono tym samym, że prohemocyty wykazują właściwości komórek macierzystych, a część granulocytów może być przekształcana w sferulocyty. W przywołanym doświadczeniu nie zaobserwowano enocytoidów, co może sugerować, że podlegały one różnicowaniu przed uwolnieniem z gruczołów hematopoetycznych (Yamashita i Iwabuchi, 2001). Inne badania wykazały, że plazmatocyty krążące w hemolimfie mogą różnicować się w enocytoidy, granulocyty i sferulocyty (Beaulaton, 1979; Gardiner i Strand, 2000; Gillespie i in., 1997; Nakahara i in., 2010; Yamashita i Iwabuchi, 2001).

Dodatkowo, w badaniach z użyciem przeciwciał wobec różnych antygenów obecnych na hemocytach *Pseudoplusia includens*, stwierdzono występowanie wielu antygenów wspólnych dla granulocytów i sferulocytów oraz plazmatocytów i enocytoidów (Gardiner i Strand, 1999). Prawdopodobny model różnicowania poszczególnych typów hemocytów Lepidoptera przedstawiono na rycinie 7.



Ryc. 7. Prawdopodobny przebieg procesu hematopoezy u Lepidoptera (opracowanie własne na podstawie danych literaturowych: Beaulaton, 1979; Gardiner i Strand, 2000; Nakahara i in., 2010; Yamashita i Iwabuchi, 2001). Szczegółowy opis w tekście.

Fagocytoza

Proces fagocytozy jest wykorzystywany zarówno przez bezkręgowce, jak i kręgowce do szybkiej eliminacji cząstek zakaźnych o niewielkich rozmiarach, np. pojedynczych komórek bakterii czy zarodników grzybów (Ryc. 8). Fagocytozie podlegają mogą zarówno cząstki biotyczne, jak bakterie, grzyby, ciała apoptotyczne, ale również małe elementy abiotyczne, np. kulki lateksowe (Lamprou i in., 2007).

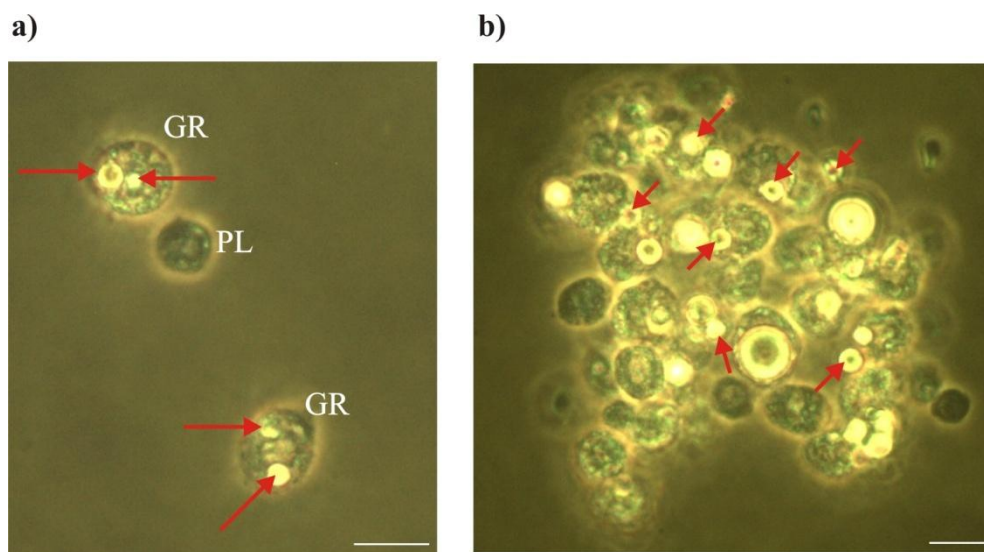
Fagocytoza inicjowana jest rozpoznaniem wzorców molekularnych PAMP obecnych na powierzchni ciała obcego przez wolne PRRs lub receptory związane z powierzchnią hemocytów (Lavine i Strand, 2002; Ohta i in., 2006). Do receptorów zaangażowanych w proces fagocytozy u *D. melanogaster* należą: cząsteczki podobne do składników układu dopełniacza (ang. *complement-like molecules*), np. białka Teps (ang. *thioester-containing proteins*), receptory Scavenger, np. Croquemort i Peste, receptory z domeną EGF-podobną (ang. *epidermal growth factor-like*), np. Nimrod, Eater, a także receptory DSCAM, integryny oraz PGRPs (Dong i in., 2006; Kurucz i in., 2007; Levashina i in., 2001; Mamali i in., 2009; Ramet i in., 2002; Rosales, 2011). Wykazują one specyficzność względem rozpoznawanego patogenu, np. PGRP-LC u *D.*

melanogaster inicjuje fagocytozę bakterii *Escherichia coli*, ale nie *Staphylococcus aureus* (Ramet i in., 2002), natomiast białko NimC1 rozpoznaje głównie *S. aureus* (Kurucz i in., 2007). Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe prowadzące do fagocytozy patogenu u owadów nie są dokładnie zbadane, w przeciwieństwie do ssaków. Wykazano jednak, że przeciwciała skierowane przeciwko tyrozynowej kinazie FAK (ang. *focal adhesion kinase*) regulującej fagocytozę u ssaków, rozpoznają białka obecne w lizatach hemocytów muszki *Ceratitis capitata*, co może wskazywać na konserwatywny przebieg tych szlaków u ssaków i owadów (Foukas i in., 1998; Metheniti i in., 2001; Rosales, 2011).

Fagocytoza przeprowadzana jest zarówno przez hemocyty krążące, jak i osiadłe (Hillyer i Strand, 2014). W zależności od gatunku owada w procesie tym biorą udział różne typy hemocytów. U *B. mori* aktywność fagocytarną wykazują jedynie granulocyty (Wago, 1983, Wu i in., 2015). Z kolei w badaniach *in vitro* wykazano, że u *G. mellonella* w proces fagocytozy zaangażowane są granulocyty oraz plazmatocyty (Rowley i Ratcliffe, 1978; Tojo i in., 2000). U niektórych gatunków owadów, np. *Aedes aegypti*, również enocytoidy mogą być *in vivo* zdolne do fagocytozy (Hillyer i in., 2003; Wu i in., 2016).

Fagocytoza jest bardzo szybką reakcją. U komarów *A. aegypti* hemocyty krążące i osiadłe inicjują proces fagocytozy drobnoustrojów w ciągu kilku minut po ich wprowadzeniu do organizmu (Hillyer, 2016; Hillyer i in., 2003; King i Hillyer, 2012; Sigle i Hillyer, 2016). Po rozpoznaniu, patogen ulega internalizacji do wnętrza hemocytu. Uformowany fagosom po połączeniu z lizosomem tworzy fagolizosom, w którym działanie enzymów hydrolitycznych i reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen intermediates*, ROI) i azotu (ang. *reactive nitrogen intermediates*, RNI) prowadzi do zniszczenia patogenu (Hillyer, 2016). ROI i RNI wykryto w hemolimfie i hemocytach wielu owadów, m. in. u karalucha *Blaberus discoidalis*, gdzie poziom tych związków wzrastał po immunizacji *E. coli*, LPS czy laminaryną (Whitten i Ratcliffe, 1999). Podanie komarom *A. stephensi* pierwotniaków *Plasmodium* powodowało wzrost ekspresji genu syntazy tlenu azotu (Luckhart i in., 1998; Luckhart i Rosenberg, 1999). Poza bezpośrednim działaniem cytotoksycznym, ROI i RNI mogą odgrywać również rolę cząsteczek sygnałowych, podobnie jak nadtlenek wodoru oraz tlenek azotu u ssaków (Kaul i Forman, 1996). Wykazano, że H₂O₂ powoduje wzrost ekspresji przeciwdrobnoustrojowego polipeptydu, attacyny, u *Hyalophora cecropia* (Sun i Faye,

1995). Udział H_2O_2 oraz NO potwierdzono również w odpowiedzi komórkowej u *Drosophila* (Nappi i in., 2000).



Ryc. 8. Zaangażowanie hemocytów gąsienic *G. mellonella* w odpowiedź komórkową na zarodniki *A. niger in vivo*. Proces fagocytozy bądź adhezji zarodników do powierzchni hemocytów (a) oraz nodulacji zarodników przez hemocyty (b). Czerwonymi strzałkami oznaczono zarodniki *A. niger*. Skala – 10 μm . GR – granulocyty, PL – plazmatocyty (opracowanie własne).

Nodulacja i inkapsulacja

Gdy rozmiar lub liczba ciał obcych uniemożliwia ich fagocytozę, uruchamiany jest proces nodulacji bądź inkapsulacji (Ryc. 8). Nodule powstają w odpowiedzi na dużą liczbę ciał obcych niewielkich rozmiarów, np. komórek bakterii, natomiast inkapsulacja dotyczy dużych ciał obcych, zwłaszcza nicieni oraz jaj składanych przez pasożytnicze osy.

Wykazano, że pomimo różnicy w rodzaju ciała obcego sekwestrowanego w tych procesach, struktura przestrzenna nodul i kapsuł jest podobna (Ratcliffe i Gagen, 1976; Ratcliffe i Gagen, 1977). U Lepidoptera w tworzenie noduli/kapsuły zaangażowane są granulocyty i plazmatocyty, które w zależności od gatunku owada rozmieszczone są przypadkowo, bądź w ściśle określony sposób.

Badanie procesu inkapsulacji różnego rodzaju immunogenów abiotycznych w postaci kulek (ang. *beads*) przez hemocyty *P. includens* wykazało, że część z nich była rozpoznawana przez granulocyty, a później otaczana przez plazmatocyty. Inne, po opsonizacji przez czynniki humoralne, były otaczane przez plazmatocyty, a jeszcze inne w ogóle nie były rozpoznawane. Wykazano również, że szybkość procesu inkapsulacji

zależna była między innymi od obecności grup funkcyjnych na powierzchni kulek, np. grupy sulfonowe przyspieszały proces inkapsulacji, podczas gdy cząstki z resztami węglowodanowymi na powierzchni (dekstran, agarosa, *N*-acetyloglukozamina, *N*-acetylogalaktozamina) ulegały wolniejszej inkapsulacji. Ponadto, dodatnio naładowane cząstki były szybciej zamykane w kapsuły niż naładowane ujemnie czy neutralne. Stwierdzono też, że odpowiedź na dany rodzaj kulek może różnić się znacząco w zależności od gatunku *Lepidoptera* (Lavine i Strand, 2001).

Granulocyty są zazwyczaj pierwszymi komórkami, które oddziałują z ciałem obcym i je otaczają. Ulegają jednocześnie degranulacji, czemu towarzyszy unieruchomienie drobnoustrojów (Pech i Strand, 1996; Wiegand i in., 2000). Istotnym składnikiem uwalnianym wtedy z granul jest cytokina - peptyd aktywujący plazmatocyty (ang. *plasmatocyte spreading peptide*, PSP). Ten 23-aminokwasowy peptyd, jest odpowiedzialny za zmianę właściwości hemocytów krążących z formy nieadherentnej w adherentną, umożliwiającą im zarówno agregację, jak i adhezję do ciał obcych (Satayavathi i in., 2014). PSP jest wytwarzany w formie 142-aminokwasowego propeptydu, który aktywowany jest przez ograniczoną proteolizę. Homologi PSP zidentyfikowano u przedstawicieli różnych gatunków *Lepidoptera* (Strand, 2008; Wang i in., 1999). Udowodniono, że PSP wiąże się z receptorem na powierzchni plazmatocytów, co indukuje przenoszenie cząsteczek adhezyjnych magazynowanych w cytoplazmie na powierzchnię komórki (Strand i Clark, 1999). U ssaków rolę receptorów pełnią m. in. integryny, kadheryny oraz selektyny. U owadów, skorupiaków i mięczaków, w rozpoznaniu drobnoustrojów lub cząstek abiotycznych oraz regulacji właściwości adhezyjnych hemocytów biorą udział integryny (Johansson, 1999; Lavine i Strand, 2001). Wykazano, że w odpowiedzi na infekcję bakteryjną istotną rolę w tworzeniu nodul u *Antheraea mylitta* pełni Noduler, białko wykazujące podobieństwo do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM). Ortolog tego białka, Reeler1 zidentyfikowano u *B. mori* i *G. mellonella*. Jego rola w procesie nodulacji wiąże się prawdopodobnie z możliwością oddziaływania równocześnie z komórkami bakterii, jak i hemocytami (Satayavathi i in., 2014, Vogel i in., 2001).

Zakończenie procesu nodulacji/inkapsulacji następuje w momencie, gdy stężenie PSP jest na tyle niskie, że nie powoduje rekrutacji kolejnych plazmatocytów. Na powierzchni powstałej struktury formowana jest wówczas błona podstawna, której składniki wytwarzane są przez granulocyty (Pech i Strand, 1996; Pech i Strand, 2000). Sygnał aktywacyjny dla tych hemocytów nie jest do końca zidentyfikowany (Pech i

Strand, 1996). Po utworzeniu kapsuły/noduli zamknięty w jej wnętrzu patogen jest uśmiercany wskutek braku dostępu tlenu, w wyniku działania reaktywnych form tlenu i azotu, peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz chinonów, będących produktami aktywacji oksydazy fenolowej (Gillespie i in., 1997, Nappi i in., 2000). W zależności od gatunku owada, w nodulach/kapsułach, może być odkładana melanina (Hillyer, 2016).

I.2.4. Odpowiedź humoralna

I.2.4.1. Układ oksydazy fenolowej i proces melanizacji

Melanizacja jest procesem enzymatycznym uruchamianym w organizmie owadów, m. in. podczas gojenia ran oraz eliminacji ciał obcych drogą nodulacji i inkapsulacji. Pośrednie produkty procesu melanizacji, takie jak chinony, reaktywne formy tlenu i azotu działają cytotoksycznie na komórki drobnoustrojów (González-Santoyo i Córdoba-Aguilar, 2012). Poza patogenami, proces melanizacji może być również uruchamiany przez wiele związków pochodzenia endo- i egzogenne, np. składniki uszkodzonych błon komórkowych (fosfatydyloseryna) czy proteazy patogenów, jak również przez niekorzystne warunki środowiskowe.

Synteza melaniny, końcowego produktu procesu melanizacji, jest uzależniona od aktywności oksydazy fenolowej (ang. *phenoloxidase*, PO), enzymu z grupy tyrozynaz, których cechą wspólną jest występowanie dwóch atomów miedzi w centrum aktywnym cząsteczki, otoczonych trzema resztami histydyny (Aguilera i in., 2013). PO *G. mellonella* wytwarzana jest w formie nieaktywnego prekursora – profenolooksydazy (proPO) będącej kompleksem o masie cząsteczkowej ok. 300 kDa, w skład którego wchodzi dwa rodzaje podjednostek: o masie cząsteczkowej 80 kDa i 83 kDa. Wskutek cięcia proteolitycznego z udziałem chymotrypsyny *in vitro* uzyskano dwa polipeptydy o masach 67 kDa i 50 kDa (Kopáček i in., 1995).

Profenolooksydaza syntetyzowana jest u Lepidoptera głównie w enocytydach, choć ostatnie doniesienia wskazują na obecność tego enzymu również w granulocytach i plazmatocytach *G. mellonella*, a także w hemocytach obecnych w gruczołach hematopoetycznych oraz w komórkach nabłonka jelita tylnego *B. mori* (Shao i in., 2012; Wu i in., 2016). Cząsteczka proPO nie zawiera peptydu sygnałowego, co wskazuje, że jest uwalniania z hemocytów wskutek ich rozpadu. Proces ten jest regulowany u *D. melanogaster* przez szlak JNK, a dodatkowo przez eikosanoidy (Lu i in., 2014).

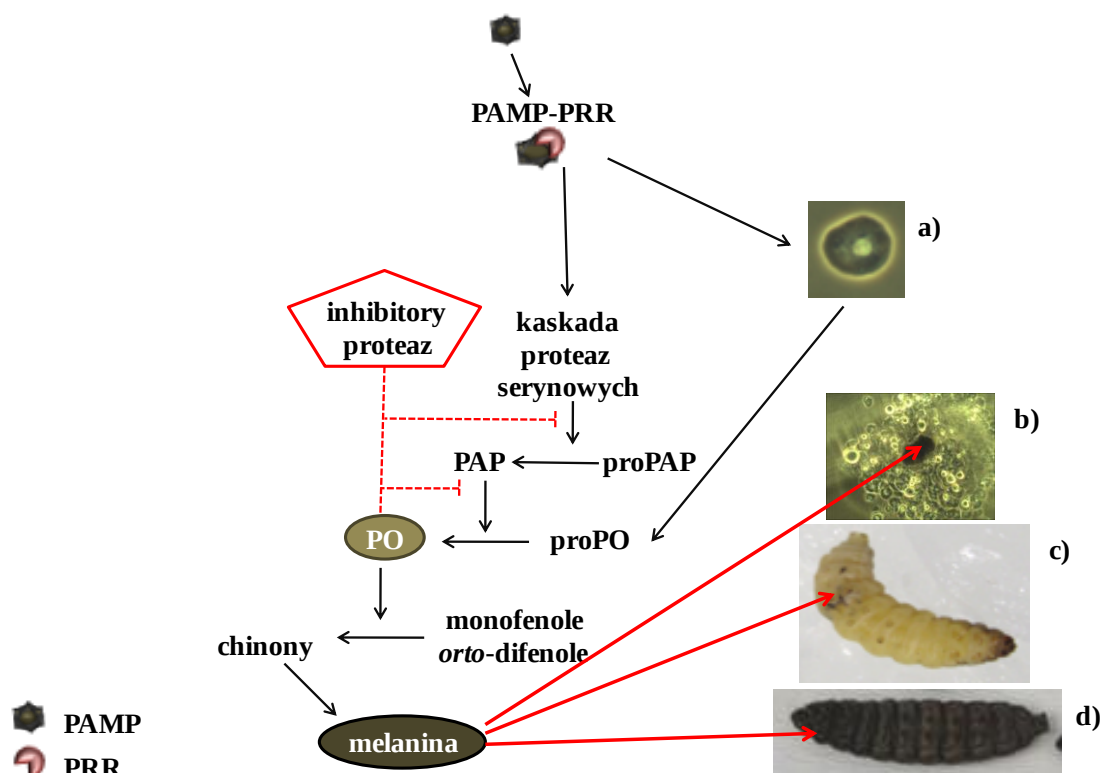
W odpowiedzi na rozpoznanie struktur PAMPs/DAMPs przez receptory PRRs (β GRPs, GNBPs oraz lektyny typu C) uruchamiana jest kaskada protez serynowych,

której przebieg różni się w zależności od gatunku owada. Końcowym etapem kaskady proteaz serynowych jest aktywacja ostatniej proteazy w kaskadzie, określanej jako PAP (ang. *PPO-activating proteinase*), PPAE (ang. *PPO-activating enzyme*) lub PPAF (ang. *PPO-activating factor*), zidentyfikowanej m. in. w hemolimfie *M. sexta*, *Holotrichia diomphalia* czy *B. mori* (González-Santoyo i Córdoba-Aguilar, 2012; Hedstrom, 2002). Główną rolą proteazy PAP/PPAE/PPAF jest przeprowadzenie ograniczonej proteolizy proPO do aktywnej formy PO (Cerenius i in., 2008). U niektórych owadów, np. u *M. sexta*, w aktywację proPO zaangażowane są dodatkowo białka będące homologami proteaz serynowych (ang. *serine protease homologs*, SPHs), jednakże pozbawione aktywności proteolitycznej (Yu i in., 2003).

Oksydaza fenolowa hydroksyluje tyrozinę do formy 3-(3,4-dihydroksyfenylo)alaniny (DOPA), która jest następnie utleniana tworząc dopachinon, ulegający szybkiej konwersji do dopachromu. Jego dekarboksylacja prowadzi do powstania 5,6-dihydroksyindolu (DHI). PO utlenia DHI do indolo-5,6-chinonu, który polimeryzując tworzy ciemny barwnik, melaninę. Melanina wraz z białkami hemolimfy i hemocytami przyczynia się do eliminacji patogenów w procesie nodulacji i inkapsulacji (González-Santoyo i Córdoba-Aguilar, 2012; Hillyer, 2016; Stączek i in., 2017) (Ryc. 9).

Aktywne proteazy stanowią zagrożenie dla organizmu owada, z tego względu kaskada proteaz prowadząca do aktywacji proPO podlega ścisłej kontroli, między innymi poprzez udział inhibitorów proteaz serynowych (serpin), uwalnianych jednocześnie z innymi składnikami układu, które również zapobiegają nadmiernej melanizacji (Meekins i in., 2017).

Należy tu wspomnieć, że aktywność układu oksydazy fenolowej ma istotny wpływ również na mikrobiom jelita tylnego roślinożernych gąsienic *B. mori*. Wykazano, że melanizacja treści przewodu pokarmowego skutkuje zmniejszeniem ogólnej liczby bakterii w odchodach gąsienic, w tym bakterii potencjalnie patogennych, które mogłyby stanowić zagrożenie dla innych owadów żerujących na tej samej roślinie (Shao i in., 2012). Aktywność układu oksydazy fenolowej wpływa również na długość życia owadów. Stwierdzono, że mutanty *D. melanogaster* nie wytwarzające proPO, żyją krócej niż dziki typ muszek (Binggeli i in., 2014; Lu i in., 2014).



Ryc. 9. Schematyczny przebieg reakcji kaskadowej prowadzącej do melanizacji u owadów. Rozpoznanie struktur PAMPs przez receptory PRRs uruchamia kaskadę proteaz serynowych. Ostatnia z nich (PAP), aktywuje profenolooksydazę uwolnioną z encytoidów (a). Aktywna forma enzymu - oksydaza fenolowa (PO), przeprowadza proces utleniania fenoli do chinonów, które polimeryzują tworząc melaninę, odkładaną w miejscu zranienia (c), bądź towarzyszy tworzeniu kapsuł i nodul (b). Makroskopowo efekt melanizacji widoczny jest w postaci miejscowego zaciemnienia małego obszaru ciała gąsienicy (c), bądź całego ciała (d), co obserwowane jest w przypadku śmierci gąsienicy na skutek silnego zakażenia (opracowanie własne).

1.2.4.2. Krzepnięcie hemolifmy

Otwarty układ krążenia owadów sprawia, że nawet niewielkie uszkodzenie powłok ciała może doprowadzić do śmierci na skutek utraty dużej ilości hemolifmy. Istotną rolę w szybkim zasklepieniu rany pełni proces krzepnięcia powiązany z procesem melanizacji. Ograniczone jest również tym samym ryzyko dostania się do wnętrza ciała patogenów bądź rozprzestrzenienia się infekcji (Haine i in., 2007).

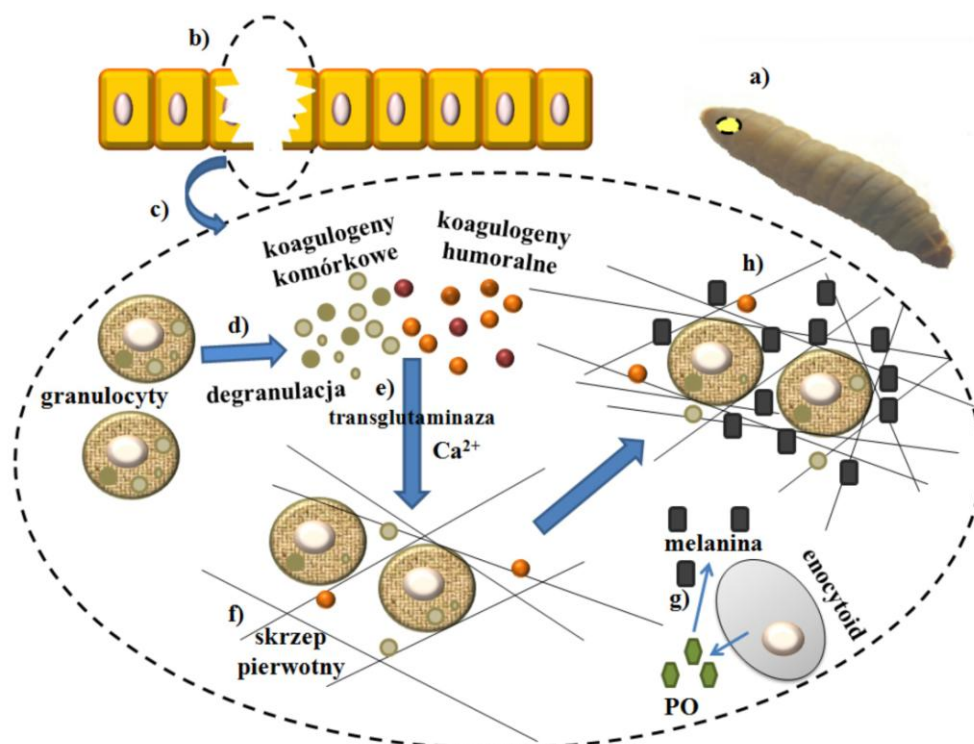
Proces krzepnięcia zachodzi u owadów w kilku etapach. Sygnałem inicjującym ten proces są molekuly uwolnione z uszkodzonych tkanek (DAMPs), np. kolagen oraz kwasy nukleinowe, również te pochodzące z rozpadających się encytoidów (Altincicek i in., 2008; Krautz i in., 2014). Najwcześniejszym sygnałem wysyłanym z miejsca

zranienia jest najprawdopodobniej wpływ jonów Ca^{2+} . W badaniach na *D. melanogaster* wykazano, że „wybuch wapniowy” (ang. „calcium flash”) aktywuje oksydazę DUOX, która wytwarza H_2O_2 będący atraktantem dla hemocytów (Moreira i in., 2010; Razzell i in., 2013) i stanowi równocześnie sygnał do aktywacji odpowiedzi komórkowej (Dubovskii i in., 2010, Krautz i in., 2014). W efekcie rozpoznania molekuł sygnałnych w ciągu kilku minut dochodzi do nacieku hemocytarnego w obrębie zranienia (Ryc. 10). W przypadku gąsienic *G. mellonella* granulocyty przemieszczają się w pobliże rany (Razzell i in., 2013; Rowley i Ratcliffe 1978), gdzie dochodzi do uwolnienia zawartości granul. Częsteczki uwolnione z granul odgrywają z jednej strony rolę atraktantów dla kolejnych hemocytów, z drugiej, pełnią funkcję „koagulogenu komórkowego”. Wraz z fragmentami ciała tłuszczowego przedostającymi się w obręb rany, „koagulogen komórkowy” tworzy macierz, do której przytwierdzają się hemocyty (Ratcliffe i Gagen, 1977; Rowley i Ratcliffe, 1978; Theopold i in., 2002). Za główne substraty procesu krzepnięcia obecne w hemolimfie owadów uważane są lipoforyny. W skrzepie *G. mellonella* poza nimi zidentyfikowano również białka zapasowe - heksameryny, przedstawiciela rodziny małych białek szoku cieplnego - ulegającą łatwo agregacji α - krystalinę (ang. *small heat shock proteins*, SHSP), glutationo-S-transferazę (ang. *glutathione-S-transferase*, GST) - enzym detoksyfikujący, uwalniany również z trombocytów kręgowców w procesie krzepnięcia, proteazę podobną do trypsyny (ang. *trypsin-like protease*), białko podobne do mucyny (ang. *mucin-like protein*) oraz profenolooksydazę (Li i in., 2002; Vogel i in., 2011).

Wspomniane białka stanowią substraty dla transglutaminazy, głównego enzymu sieciującego, którego aktywność uzależniona jest od obecności jonów Ca^{2+} . Koagulacja hemolimfy polega na enzymatycznej przemianie rozpuszczalnych cząsteczek w nierozpuszczalny żel. Aktywowana zranieniem lub infekcją transglutaminaza katalizuje tworzenie krzyżowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy lizyną a glutaminą dwóch różnych łańcuchów białkowych, co prowadzi do formowania skrzepu (Altincicek i in., 2008; Li i in., 2002; Lindgren i in., 2008). Transglutaminazy zaangażowane są w proces tworzenia skrzepu zarówno u owadów, jak i ssaków. Owadzie transglutaminazy wykazują homologię do ludzkiego czynnika krzepnięcia XIIIa (Theopold i in., 2014)

Obecność profenolooksydazy wśród białek tworzących skrzep u owadów związana jest z procesem melanizacji. Uwolniona z enocytoidów proPO ulega aktywacji proteolitycznej, w wyniku czego powstaje aktywny enzym oksydaza fenolowa, która zapoczątkowuje proces tworzenia melaniny, co opisano w rozdziale

I.2.4.1. Melanina jest odkładana w obrębie rany, formując skrzep twardy, na którym utworzona zostaje następnie błona podstawna i odtworzony nabłonek (Ryc. 10) (Dushay, 2009; Eleftherianos i Revenis, 2011; Nagai i Kawabata, 2000; Rowley i Ratcliffe, 1978).



Ryc. 10. Proces krzepnięcia hemolimfy zaangażowany w gojenie ran u *G. mellonella*. W efekcie uszkodzenia powłok ciała gąsienicy (a,b) dochodzi do indukcji procesu krzepnięcia hemolimfy, w wyniku którego tworzony jest skrzep (c). Uwolniony z granulocytów „koagulogen komórkowy” (d) wraz z określonymi białkami hemolimfy stanowią substraty dla transglutaminazy (e). Katalizuje ona sieciowanie białek, co prowadzi do powstania tzw. skrzepu pierwotnego (f). Profenolooksydaza uwalniania z enocytoidów ulega aktywacji proteolitycznej i zapoczątkowuje proces melanizacji, w wyniku którego syntetyzowana jest melanina (g). Melanina działa przeciwdrobnoustrojowo, a dodatkowo utwardza skrzep (h) (opracowanie własne).

I.2.4.3. Peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe owadów

Peptydy odpornościowe

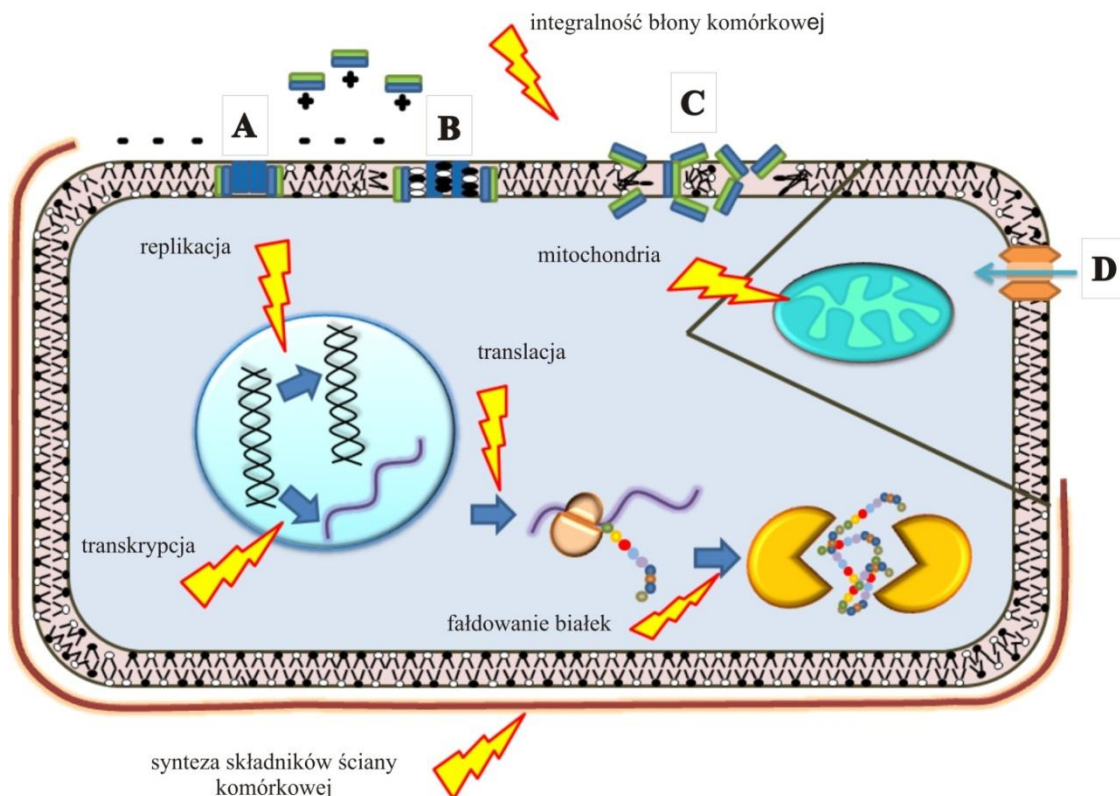
Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMPs), określane również jako peptydy odpornościowe, wykorzystywane są przez wszystkie organizmy żywe do bezpośredniej walki z patogenami. Wykazują one szerokie spektrum działania, od przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybowego, po przeciwpierwotniacze i przeciwwirusowe (Cytryńska i in., 2007; Wiesner i Vilcinskas,

2010). Większość AMPs to amfipatyczne cząsteczki kationowe, zbudowane z 12-50 reszt aminokwasów. U owadów wytwarzane są w komórkach ciała tłuszczowego, hemocytach i komórkach nabłonkowych (Yi i in., 2014).

Mechanizm działania wielu AMPs opiera się na ich interakcji z błoną komórek drobnoustrojów, co może prowadzić do destabilizacji jej struktury, a w konsekwencji do wzrostu przepuszczalności błony i śmierci komórki. Peptydy mogą również zaburzać procesy wewnątrzkomórkowe, takie jak replikacja, transkrypcja, biosynteza białka, czy wytwarzanie składników ściany komórkowej (van der Weerden i in., 2013) (Ryc. 11).

Ze względu na amfipatyczną budowę peptydów, które zawierają zarówno część hydrofilową, jak i hydrofobową, mają one zdolność do oddziaływania z lipidami w błonie komórkowej. Interakcje te opisują różne modele, m. in. (Alba i in., 2012; Maróti i in., 2011):

- model kanałowy („klepek beczki”, ang. *barrel-stave model*) - po związaniu do błony fosfolipidowej peptydy agregują ze sobą, formując transbłonowe kanały, których ściany zbudowane są tylko z cząsteczek peptydów; prowadzi to do zaburzenia gradientu jonowego po obu stronach błony,
- model kanałów toroidalnych (ang. *toroidal pore model*) - peptydy wbudowują się w błonę powodując zagięcie monowarstwy lipidowej; w odróżnieniu od modelu “*barrel-stave*”, ściany powstających kanałów tworzone są zarówno przez cząsteczki peptydów, jak i głowy fosfolipidów błony,
- model dywanowy (ang. *carpet model*) - peptydy wiążą się do głów fosfolipidów poprzez oddziaływania elektrostatyczne i układają się równolegle do powierzchni błony, tworząc strukturę przypominającą dywan; następuje rotacja cząsteczek peptydów, która prowadzi do reorientacji ich grup hydrofobowych w stronę części hydrofobowych fosfolipidów błonowych, co skutkuje dezintegracją struktury błony (Ryc. 11).



Ryc. 11. Wybrane mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Oddziaływanie naładowanych dodatnio peptydów z ujemnie naładowaną błoną komórkową drobnoustrojów prowadzi do zaburzenia jej integralności, wskutek tworzenia w niej kanałów typu „klepek beczki” (A), bądź kanałów toroidalnych (B). Peptydy mogą również prowadzić do destabilizacji błony według modelu dywanowego (C). Kluczowe dla funkcjonowania komórki procesy, takie jak replikacja, transkrypcja, translacja, fałdowanie białek czy synteza składników ściany komórkowej mogą ulec zaburzeniu w wyniku działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Niekiedy peptydy dostają się do wnętrza komórek patogenów przy wykorzystaniu odpowiednich transporterów (D). W komórkach patogenów eukariotycznych peptydy mogą zaburzać funkcjonowanie mitochondriów (Zdybicka-Barabas i in., 2017).

Analizy proteomiczne i transkryptomyczne wykazały, że u *G. mellonella* występuje szereg peptydów i białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Brown i in., 2008; Brown i in., 2009; Cytryńska i in., 2007; Mak i in., 2010; Schuhmann i in., 2003). Ze względu na ładunek, sekwencję aminokwasową oraz strukturę przestrzenną peptydy odpornościowe *G. mellonella* można podzielić na:

- peptydy kationowe:
 - liniowe peptydy α -helikalne (cecropiny i morycyny),
 - peptydy zawierające reszty cysteiny, których struktura stabilizowana jest przez mostki dwusiarczkowe (defensyna *G. mellonella* (galiomycyna), peptyd podobny do galiomycyny, gallerimycyna),

- peptydy bogate w reszty glicyny (gloweryny),
- peptydy bogate w reszty proliny (peptyd prolinowy-1 i peptyd prolinowy-2),
- peptydy anionowe (peptyd anionowy-1 i peptyd anionowy-2).

Cekropiny to amfipatyczne, α -helikalne peptydy zbudowane z 31-39 reszt aminokwasowych, aktywne głównie wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (Vogel i in. 2011; Wu i in., 2018b). Występują u przedstawicieli różnych rzędów owadów. Po raz pierwszy wyizolowane zostały z hemolimfy *H. cecropia*, reprezentanta rzędu Lepidoptera, u którego zidentyfikowano sześć tego typu peptydów (A – F) liczących 35-37 reszt aminokwasów (Hultmark i in., 1982). Peptydy te syntetyzowane są w postaci prekursorów zawierających 62-64 reszty aminokwasowe, spośród których fragmenty obejmujące 23-26 reszt aminokwasów z N-końca nie występują w dojrzałych cząsteczkach. W strukturze przestrzennej wyróżnić można dwie α -helisy połączone ruchomym zawiasem. Do C-końca większości cekropin przyłączona jest grupa amidowa pełniąca istotną rolę w ich oddziaływaniu z błonami fosfolipidowymi (Hetru i in., 1998). Analiza transkryptomu *G. mellonella* wykazała obecność transkryptów czterech różnych cekropin, w tym cekropiny D (Vogel i in., 2011). Cekropina D (39 reszt aminokwasowych, 4,3 kDa) ma *in vitro* aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich - *M. luteus*, Gram-ujemnych - *E. coli* D31 oraz grzybów strzępkowych *A. niger* (Cytryńska i in., 2007). Z hemolimfy *G. mellonella* wyizolowano także peptyd podobny do cekropiny A, zbudowany z 37 reszt aminokwasowych (4,16 kDa), aktywny wobec bakterii Gram-dodatnich – *Bacillus subtilis* i Gram-ujemnych – *E. coli* (Kim i in., 2004b).

Morycyny, podobnie jak cekropiny, syntetyzowane są w formie propeptydów. Dojrzałe peptydy zbudowane są z 42 reszt aminokwasów i formują pojedynczą α -helisę o ośmiu skrętach. N-końcowy fragment α -helisy jest amfipatyczny, podczas gdy C-końcowy, niezbędny do aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jest hydrofobowy (Yi i in., 2014). Morycyny po raz pierwszy wyizolowano z hemolimfy gąsienic *B. mori* immunizowanych *E. coli*. Jak dotąd peptydy te opisano jedynie u przedstawicieli rzędu Lepidoptera (Hara i Yamakawa, 1995). W transkryptomie *G. mellonella* zidentyfikowano sekwencje siedmiu peptydów podobnych do morycyny (Brown i in., 2008). Morycyny mają *in vitro* aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz drożdży i grzybów strzępkowych. Wykazano, że zwiększają

przepuszczalność ich błony komórkowej (Brown i in., 2008; Hara i Yamakawa 1995; Zhong i in., 2012).

Owadzie defensyny są kationowymi AMPs o długości 34-51 reszt aminokwasowych. Charakterystyczna jest obecność 6 konserwatywnych reszt cysteiny w cząsteczce, tworzących trzy mostki dwusiarczkowe. W skład struktury przestrzennej owadzych defensyn wchodzi N-końcowa pętla oraz struktura α -helisy i β -kartki, które stabilizowane są mostkami dwusiarczkowymi tworząc motyw CS $\alpha\beta$ (ang. *cysteine-stabilized alpha beta motif*) (Wu i in., 2018). Defensyny zidentyfikowano u przedstawicieli różnych rzędów owadów, m. in. Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera, Odonata oraz Lepidoptera, a nazwy poszczególnych defensyn różnią się w zależności od gatunku owada. Pierwszą opisaną defensyną Lepidoptera była galiomycyna *G. mellonella* (ang. *galiomycin*), peptyd zbudowany z 43 reszt aminokwasów, o masie cząsteczkowej 4,7 kDa. U *G. mellonella* zidentyfikowano również peptyd podobny do galiomycyny (ang. *Galleria defensin-like peptide*), o masie 4,9 kDa, zbudowany z 44 reszt aminokwasów. Oba peptydy różnią się jedynie dwoma resztami aminokwasowymi (Cytryńska i in., 2007; Lee i in., 2004).

Owadzie defensyny wykazują aktywność wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich: *Aerococcus viridians*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *M. luteus* oraz *S. aureus*, bakterii Gram-ujemnych, np. *E. coli* oraz grzybów (Lee i in., 2004; Lowenberger i in., 1995; Vizioli i in., 2001). Galiomycyna *G. mellonella* jest aktywna wobec grzybów strzępkowych i drożdży; peptyd podobny do galiomycyny charakteryzuje się silniejszym działaniem przeciwgrzybowym, m.in. wobec *A. niger*, a dodatkowo działa wobec bakterii Gram-dodatnich, np. *Sarcina lutea* (Cytryńska i in., 2007; Lee i in., 2004). Przeciwbakteryjne działanie owadzych defensyn opiera się na tworzeniu kanałów w błonie komórek bakterii (Cociancich i in., 1993). Badania z użyciem sapecyny *Sarcophaga peregrina*, peptydu o wysokim powinowactwie do kardiolipiny, wykazały, że za tę aktywność może odpowiadać region α -helisy, natomiast pozostałe regiony cząsteczki mogą być zaangażowane w wiązanie peptydu do powierzchni mikroorganizmów (Yamada i Natori, 1994). Gallerimycyna *G. mellonella*, zbudowana z 57 reszt aminokwasowych, należy do grupy peptydów podobnych do defensyny i wykazuje podobieństwo do działającej przeciwgrzybowo drosomycyny *D. melanogaster* oraz heliomycyny *Heliothis virescens*. Gallerimycyna ma aktywność wobec entomopatogenicznego grzyba *Metarhizium anisopliae*, natomiast nie stwierdzono jej aktywności przeciwbakteryjnej. Niemniej jednak wykazano, że

działając synergistycznie z cekropiną A wobec *E. coli*, hamuje wzrost tych bakterii (Bolouri i in., 2016; Seitz i in., 2003; Schuhmann i in., 2003).

Analiza transkryptomu *G. mellonella* wykazała także obecność innych potencjalnie przeciwdrobnoustrojowych cząsteczek zawierających motyw CSaβ, m.in. cząsteczkę podobną do kobatoksyny (ang. *cobatoxin-like*), peptydu o aktywności blokującej kanały potasowe w błonach komórkowych, który występuje w jadzie skorpiona *Centruroides noxius*. Ponadto, zidentyfikowano białko Gall-6-tox (Vogel i in., 2001), które zawiera sześć konserwatywnych powtórzeń motywu CSaβ. Homologi Gall-6-tox, różniące się ilością powtórzeń motywu CSaβ, zostały również zidentyfikowane u innych przedstawicieli Lepidoptera, takich jak *B. mori* czy *Spodoptera exigua*. Białka te przypisano do nowej rodziny nazwanej X-tox, która grupuje atypowe białka odpornościowe specyficzne dla Lepidoptera, ewolucyjnie pochodzące od defensyn (d'Alencon i in., 2013). Białka z rodziny X-tox zawierają zmienną liczbę (X) motywów CSaβ, nie wykazują jednak aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Destoumieux-Garzon i in., 2009).

Gloweryny to silnie kationowe polipeptydy o masie około 14 kDa, bogate w reszty glicyny, które stanowią powyżej 18% zawartości wszystkich aminokwasów. W ich sekwencji aminokwasowej nie stwierdzono reszt cysteiny. Gloweryny charakteryzują się wysoką termostabilnością. Podobnie jak morycyny, opisano je do tej pory tylko u przedstawicieli rzędu Lepidoptera. Po raz pierwszy wyizolowano je z hemolimfy poczwarek *Hyalophora gloveri*. W transkryptomie *B. mori* zidentyfikowano sekwencje dla co najmniej 7 gloweryn. Wykazano, że do indukcji ekspresji gloweryn u tych owadów dochodzi w wyniku infekcji bakteriami *E. coli* (Cheng i in., 2006; Seitz i in., 2003; Yi i in., 2013). Gloweryny mogą wykazywać aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich oraz grzybów, a także, jak np. gloweryny *Trichoplusia ni*, aktywność przeciwwirusową (Moreno-Habel i in., 2012). Gloweryna *M. sexta*, wiążąca się do LPS, LTA, PG i laminaryny, jest aktywna wobec *Bacillus cereus* i dwóch gatunków grzybów, *Saccharomyces cerevisiae* i *Cryptococcus neoformans*. Stwierdzono, że oddziaływanie gloweryn z LPS prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej oraz zahamowania syntezy błony zewnętrznej u bakterii (Xu i in., 2012; Yi i in., 2014).

W hemolimfie *G. mellonella* zidentyfikowano ponadto peptydy bogate w reszty proliny: peptyd prolinowy-1 oraz peptyd prolinowy-2. Pierwszy z nich zawiera 5 reszt proliny, które stanowią 13,5% zawartości wszystkich aminokwasów, natomiast w

peptydzie prolinowym-2 reszty prolina stanowią 26,2% (Cytryńska i in., 2007). Oba te peptydy, ze względu na obecność charakterystycznych motywów lizyna-prolina i prolina-arginina, mogą być zaklasyfikowane do grupy długłańcuchowych peptydów bogatych w prolinę (ang. *long-chain proline-rich peptides*). Do tej grupy należą również 34 aminokwasowa abecyna *Apis mellifera* (Hymenoptera) oraz 32 aminokwasowa lebecyna *B. mori* (Cytryńska i in., 2007). Wykazano, że oba peptydy prolinowe wraz z peptydem anionowym-1 *G. mellonella* wywodzą się z jednej cząsteczki prekursorowej (GmPro) (Brown i in., 2009). Peptyd anionowy-1 *G. mellonella* zawiera pięć reszt prolina, stanowiących 11,9% zawartości wszystkich aminokwasów. Wykazuje podobieństwo do sekwencji aminokwasowej prekursorów lebecyny 3 i 4 *B. mori* (Cytryńska i in., 2007). Oba peptydy bogate w prolinę *G. mellonella* nie mają aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych, działają natomiast na bakterie Gram-dodatnie. Ponadto, peptyd prolinowy-1 charakteryzuje się aktywnością przeciwgrzybową wobec różnych gatunków drożdży oraz grzybów nitkowatych *Fusarium graminearum* (Brown i in., 2009; Cytryńska i in., 2007; Mak i in., 2010).

Poza wspomnianym wyżej peptydem anionowym-1, w hemolimfie *G. mellonella* zidentyfikowano peptyd anionowy-2, o masie cząsteczkowej 6,98 kDa. W sekwencji tego 60 aminokwasowego peptydu zidentyfikowano 8 reszt kwasu glutaminowego oraz 3 reszty kwasu asparaginowego. Jego sekwencja jest unikatowa. Nie udało się dotychczas znaleźć podobieństwa do sekwencji znanych peptydów lub białek. Peptyd anionowy-2 obecny jest w hemolimfie *G. mellonella* konstytutywnie, w stosunkowo wysokim stężeniu 12 μ M (Mak i in., 2010). Wykazuje aktywność *in vitro* wobec wybranych gatunków bakterii Gram-dodatnich oraz drożdży z rodzaju *Pichia* (Cytryńska i in., 2007). Działa synergistycznie z lizozymem *G. mellonella* wobec bakterii Gram-ujemnych (Zdybicka-Barabas i in., 2012) oraz drożdżaków *C. albicans* (Sowa-Jasiłek i in., 2014).

Inhibitory proteaz

Inną grupą peptydów obecnych w hemolimfie owadów są inhibitory proteaz. Pełnią one istotną rolę w odporności owadów, z uwagi na fakt, że zapobiegają niekontrolowanej degradacji białek owada, jak również chronią przed działaniem proteinaz wydzielanych przez patogeny.

U gąsienic *G. mellonella* zidentyfikowano trzy indukowalne inhibitory proteaz serynowych (ang. *inducible serine protease inhibitors*, ISPI): ISPI-1, ISPI-2 oraz ISPI-

3, o masach cząsteczkowych, odpowiednio, 9,2 kDa, 6,3 kDa i 8,2 kDa. ISPI-2 reprezentuje inhibitory typu Kunitza, natomiast ISPI-1 i ISPI-3 nie wykazują podobieństwa do znanych białek. Wszystkie trzy inhibitory były syntetyzowane przez gąsienice *G. mellonella* w odpowiedzi na podanie zymosanu (preparatu zawierającego składniki ściany komórkowej grzybów *S. cerevisiae*). Hamują one aktywność proteaz serynowych, takich jak tripsyna, czy proteazy Pr1 i Pr2 wytwarzane przez entomopatogenicznego grzyba *Metarhizium anisopliae* (Fröblius i in., 2000; Vogel i in., 2011).

Innym przedstawicielem grupy inhibitorów proteaz jest owadzi inhibitor metaloproteinaz (ang. *insect metalloproteinase inhibitor*, IMPI) zidentyfikowany u *G. mellonella* po iniekcji LPS do hemocelu (Vogel i in., 2001). Wykazano, że produktami genu *IMPI* są dwa peptydy: IMPI-1 i IMPI-2. IMPI-1 wyizolowany z hemolimfy *G. mellonella* jest cząsteczką glikozylowaną, o masie cząsteczkowej 8,6 kDa. Charakteryzuje się wysoką odpornością na temperaturę i działanie kwasów, co związane jest z obecnością 5 mostków dwusiarczkowych stabilizujących cząsteczkę. IMPI-1 jest zaangażowany w reakcje odpornościowe, a jego ekspresja zachodzi w ciele tłuszczowym oraz hemocytach i jest indukowana po rozpoznaniu bakterii lub grzybów (Vilcinskas i Wedde, 2002). Działanie IMPI-2 związane jest ze zmianami rozwojowymi, do których dochodzi w trakcie przeobrażenia owada. Peptyd ten bierze wówczas udział w regulowaniu aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Nie stwierdzono podobieństwa sekwencji aminokwasowej IMPI do znanych białek czy peptydów. Jak dotąd jest jedynym opisanym u zwierząt inhibitorem metaloproteinaz, zdolnym do zahamowania aktywności termolizyny *Bacillus thermoproteolyticus*, należącej do rodziny metaloproteinaz M4, do której zalicza się również wiele proteaz wytwarzanych przez bakterie patogenne dla człowieka (Wedde i in., 2007).

Wybrane białka odpornościowe

Lizozym

Lizozym jest jednym z białek, które pełni istotną rolę w humoralnej odpowiedzi immunologicznej u owadów. U zwierząt wyróżnić można trzy typy lizozymu: kurzy (ang. *chicken*, c), gęsi (ang. *goose*, g) oraz typ i (ang. *invertebrate*). Ze względu na podobieństwo sekwencji aminokwasowej i właściwości do lizozymu białka jaja kurzego (ang. *egg white lysozyme*, EWL), większość lizozymów zidentyfikowanych u owadów

reprezentuje typ c, podobnie jak lizozymy innych stawonogów oraz strunowców (Gajda i Bugła-Płoskońska, 2014; Vogel i in., 2011).

Aktywność przeciwbakteryjna lizozymów typu c opiera się na enzymatycznej hydrolizie wiązania β -1,4-glikozydowego pomiędzy *N*-acetyloglukozaminą, a kwasem *N*-acetylomuraminowym w peptydoglikanie ściany komórkowej bakterii. Szczególnie wrażliwe na jego działanie są więc bakterie Gram-dodatnie, których peptydoglikan eksponowany jest na powierzchni komórki. Jednakże, ze względu na swój kationowy charakter, lizozym może też działać nieenzymatycznie w sposób podobny do kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Ragland i Criss, 2017; Sowa-Jasiłek i in., 2014).

W transkryptomie *G. mellonella* zidentyfikowano cztery homologi lizozymu typu c oraz jeden lizozym typu i. Lizozym typu c *G. mellonella*, o masie około 14 kDa i $pI=9,28$, występuje w hemolimfie konstytutywnie (Hultmark, 1996; Yu i in., 2002). Wykazano jednakże, że jego poziom i aktywność w hemolimfie wzrasta w odpowiedzi na infekcję bakteryjną, grzybową oraz pierwotniaczą (Kajla i in., 2011; Sowa-Jasiłek i in., 2014). Lizozym *G. mellonella* jest aktywny wobec bakterii Gram-dodatnich, ale także Gram-ujemnych oraz grzybów. Jego działanie przeciw *C. albicans* oparte jest na indukowaniu apoptozy w komórkach tego drożdżaka (Yu i in., 2002; Sowa-Jasiłek i in., 2014; Sowa-Jasiłek i in., 2016; Zdybicka-Barabas i in., 2012). Udowodniono, że lizozym może działać synergistycznie z innymi białkami i peptydami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, takimi jak: cekropina B, defensyna, peptyd anionowy-2 czy apolipoforyna III, zarówno wobec bakterii, jak i grzybów (Sowa-Jasiłek i in., 2014; Zdybicka-Barabas i in., 2012; Zdybicka-Barabas i in., 2013). Stwierdzono ponadto, że lizozym *G. mellonella* może regulować proces melanizacji – jego obecność obniża aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie immunizowanych gąsienic *G. mellonella* (Zdybicka-Barabas i in., 2014). W badaniach z wykorzystaniem lizozymu *M. sexta* wykazano, że oddziałuje on z profenolooksydazą, co uniemożliwia jej aktywację (Rao i in., 2010).

Apolipoforyna III

Apolipoforyna III (apoLp-III) to wielofunkcyjne białko o masie cząsteczkowej 18 kDa, występujące obficie przede wszystkim w hemolimfie, ale wykrywane jest także w hemocytach, ciele tłuszczowym i gruczołach przednich *G. mellonella*. Wraz z

apolipoforyną I (250 kDa) i apolipoforyną II (75 kDa) uczestniczy w transporcie lipidów z ciała tłuszczowego do mięśni. Częsteczką apoLp-III zawiera pięć α -helis ułożonych naprzemianlegle, tworzących cylindryczną strukturę, z hydrofilową częścią zewnętrzną i hydrofobowym wnętrzem. ApoLp-III może występować w hemolimfie w formie wolnej lub związanej z lipidami i lipoforynami. Oddziaływanie apoLp-III z kompleksem HDLp (ang. *high-density lipophorin particles*), zawierającym apolipoforynę I i apolipoforynę II, związane jest z otwarciem jej struktury i przyłączeniem lipidów. Efektem związania apoLp-III i lipidów do HDLp jest powstanie kompleksu LDLp (ang. *low-density lipophorin particles*) (Wen i in., 2016; Weers i Ryan, 2006; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013).

Wykazano, że w odpowiedzi na zakażenie, poziom apoLp-III w różnych tkankach gąsienic *G. mellonella* zmienia się, w zależności od typu patogenu i czasu po immunizacji, co świadczy o jej zaangażowaniu w reakcje odpornościowe (Stączek i in., 2018; Wen i in., 2016; Zdybicka i Cytryńska, 2011).

Udowodniono, że apoLp-III wiąże składniki ściany komórkowej bakterii i grzybów, takie jak LTA, LPS i β -1,3-glukan, pełniąc rolę receptora PRR (Halwani i in., 2000; Pratt i Weers, 2004; Whitten i in., 2004). Wykazano ponadto, że w odpowiedzi na infekcję bakteryjną apoLp-III oddziałuje z lipidami i formuje kompleksy LDLp, które pobierane są następnie przez granulocyty (Dettloff i in., 2001). Podobnie, apoLp-III podawana gąsienicom *G. mellonella* do hemocelu wiązała się z lipidami i ulegała endocytozie do wnętrza hemocytów (Dettloff i in., 2001; Niere i in., 2001). Dane te wskazują, że apoLp-III może pełnić funkcję cząsteczki sygnałnej przekazującej sygnał o infekcji do hemocytów. Stwierdzono również, że apoLp-III wzmacnia aktywność przeciwdrobnoustrojową hemolimfy: podanie gąsienicom *G. mellonella* oczyszczonej apoLp-III skutkowało wzrostem aktywności wobec *E. coli* oraz aktywności lizozymu, porównywalnie do iniekcji bakterii (Halwani i Dunphy, 1999; Wiesner i in., 1997). Z kolei po wstrzyknięciu apoLp-III obserwowano indukcję ekspresji genów kodujących lizozym i cekropiny w ciele tłuszczowym *Hyphantria cunea* (Kim i in., 2004a). Badania *in vitro* z wykorzystaniem apoLp-III *G. mellonella* wykazały jej działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium* oraz Gram-dodatnich, *Bacillus circulans*, jak również grzybów strzępkowych *Fusarium oxysporum* i drożdżaków *C. albicans* (Zdybicka-Barabas i in., 2011; Zdybicka-Barabas i in., 2012). ApoLp-III może również działać synergistycznie z innymi składnikami hemolimfy, np. lizozymem, wobec bakterii Gram-dodatnich i

Gram-ujemnych (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011, Zdybicka-Barabas i in., 2013), bierze udział w detoksyfikacji endotoksyn bakteryjnych (Halwani i Dunphy, 1997, Oztug i in., 2012), wykazuje właściwości aglutynujące (Iimura i in., 1998) oraz jest zaangażowana w regulację aktywności układu oksydazy fenolowej (Cerenius i Söderhäll, 2004; Wen i in., 2016). Wykazano ponadto, że apolipoforyna III jest czynnikiem modulującym odpowiedź komórkową. Wpływając na właściwości adherentne hemocytów wspomaga fagocytozę komórek drożdży przez plazmatocyty *G. mellonella* (Whitten i in., 2004, Zakarian i in., 2002), a po związaniu z lipidami wzmaga proces inkapsulacji oraz nodulacji (Whitten i in., 2004).

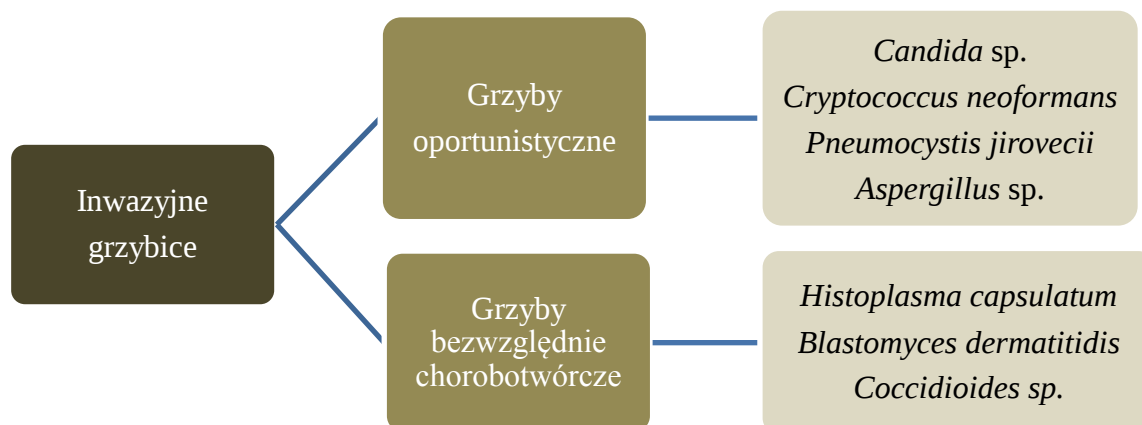
I.3. Grzyby jako czynniki chorobotwórcze

Infekcje grzybicze stanowią zagrożenie zarówno dla roślin, jak i zwierząt, w tym człowieka. Choć nie są czynnikiem zakaźnym zdolnym spowodować wyginięcie danego gatunku, są w stanie znacznie ograniczyć liczebność populacji w krótkim czasie, a epidemie chorób grzybiczych roślin uprawnych wywierały ogromny wpływ na dzieje ludzkości, prowadząc do klęski głodu i upadku gospodarczego (Fisher i in., 2012).

Spośród około półtora miliona gatunków grzybów, kilkaset stanowi czynnik etiologiczny chorób człowieka (Wierzbicka, 2000; Hawksworth, 2001). Grzybicę powierzchniową skóry i paznokci, wywołowaną głównie przez dermatofity, dotyczą ok. 25% populacji światowej ludzi (około 1,7 miliarda) (Havlickova i in., 2008). Mniejsza ilość zachorowań dotyczy grzybic układowych (inwazyjnych). Wiążą się one jednak ze znacznie większą śmiertelnością, która sięga 1,5 miliona osób rocznie. Pomimo rosnącego dostępu do leków przeciwgrzybiczych, rokowania pacjentów z inwazyjną grzybicą pozostają stale na niskim poziomie. Dane wskazują, że porównywalna liczba zgonów dotyczy zarówno grzybic układowych, jak i malarii czy gruźlicy (Brown i in., 2012). Za 90% zgonów spowodowanych grzybicą układową odpowiadają grzyby należące do kilku rodzajów: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma* i *Pneumocystis* (Kim, 2016; Patterson i in., 2000) (Ryc. 12). Spośród nich, jedynie *C. albicans* stanowi składnik naturalnej mikroflory człowieka. Rezerwuarem pozostałych gatunków jest środowisko (Reedy i in., 2007).

Układ odpornościowy zwierząt wyposażony jest w skuteczne mechanizmy do walki z grzybami. Pomimo tego, od wielu lat obserwuje się stały wzrost liczby osób cierpiących na grzybicę układową. Jest to spowodowane wieloma czynnikami, które prowadzą do osłabienia układu odpornościowego człowieka. Na zakażenia grzybicze

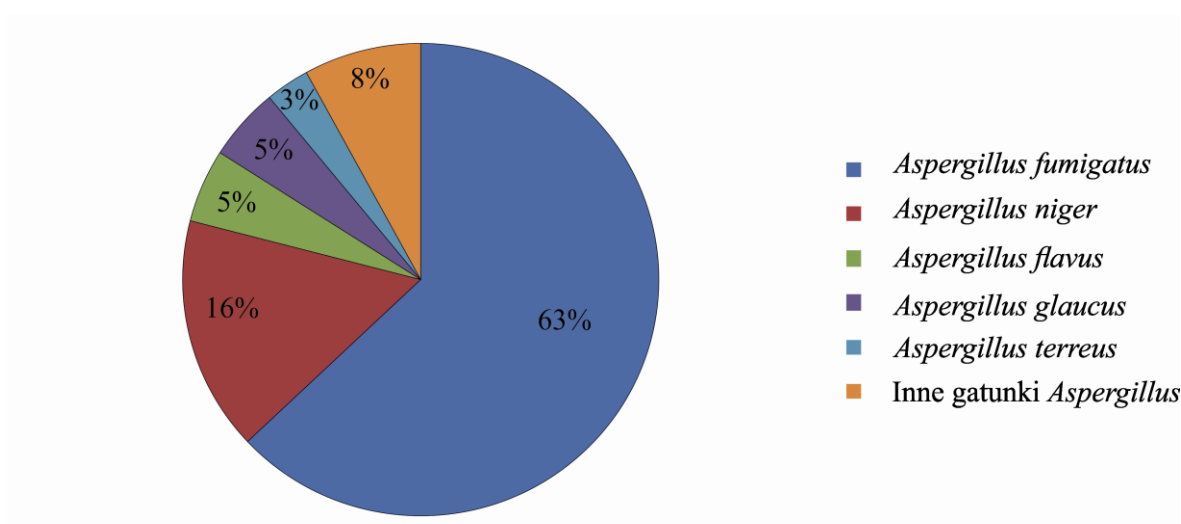
narażeni są w szczególności nosiciele wirusa HIV, chorzy na AIDS, nowotwory oraz osoby poddawane terapii sterydami. W grupie pacjentów zagrożonych grzybicą są również biorcy przeszczepów. Szybko rozwijająca się transplantologia, poza oczywistymi korzyściami dla życia i zdrowia, niesie ze sobą zagrożenie wynikające ze stosowania leczenia immunosupresyjnego (Denning, 1998; Patterson i in., 2000; Brown in., 2012).



Ryc. 12. Epidemiologia inwazyjnych grzybic u ludzi.

Grzyby oportunistyczne, w odróżnieniu od bezwzględnie chorobotwórczych, atakują jedynie osoby z deficytami w funkcjonowaniu układu odpornościowego (opracowano na podstawie: Pfaller i Diakema, 2010).

Zarodniki grzybów z rodzaju *Aspergillus*, które wraz z powietrzem dostają się do płuc, są u zdrowych ludzi szybko rozpoznawane i eliminowane. U osób z upośledzonym funkcjonowaniem układu odpornościowego zarodniki kiełkują, prowadząc do rozwoju grzybicy (Kim, 2016; Patterson i in., 2000). Szacuje się, że każdego roku pojawia się ponad 200 tysięcy nowych przypadków aspergillozy układowej, powodowanej głównie przez *A. fumigatus*, co ze względu na trudności diagnostyczne odpowiada ok. 50-65% faktycznej liczby zachorowań (Ryc. 13) (Denning i in., 2013). Śmiertelność w grupie pacjentów ze zdiagnozowaną i leczoną aspergillozą układową wynosi ok. 50%. Brak właściwej diagnozy lub opóźnienie w podjęciu leczenia skutkuje niemal 100% śmiertelnością (Denning i in., 2013).



Ryc. 13. Epidemiologia inwazyjnych aspergilloz u ludzi.

Głównym czynnikiem epidemiologicznym aspergilloz u ludzi jest *A. fumigatus*. *A. niger* odpowiada za 7-16% przypadków zachorowań (Patterson, 2000; Vazquez i in., 2016).

Ze względu na duże zagrożenie epidemiologiczne, jakie niesie ze sobą kontakt z grzybami chorobotwórczymi, wiele uwagi poświęca się badaniom dotyczącym czynników wirulencji grzybów. Komponenty ściany komórkowej grzybów odgrywają rolę wzorców molekularnych związanych z patogenami, rozpoznawanych przez układ odpornościowy gospodarza. Stanowią zatem kluczowy czynnik biorący udział w interakcjach gospodarz-patogen. Składniki te, niezbędne grzybom do przeżycia, nie są obecne w organizmie człowieka, przez co mogą być celem działania leków przeciwczybniczych (Lee i Sheppard, 2016).

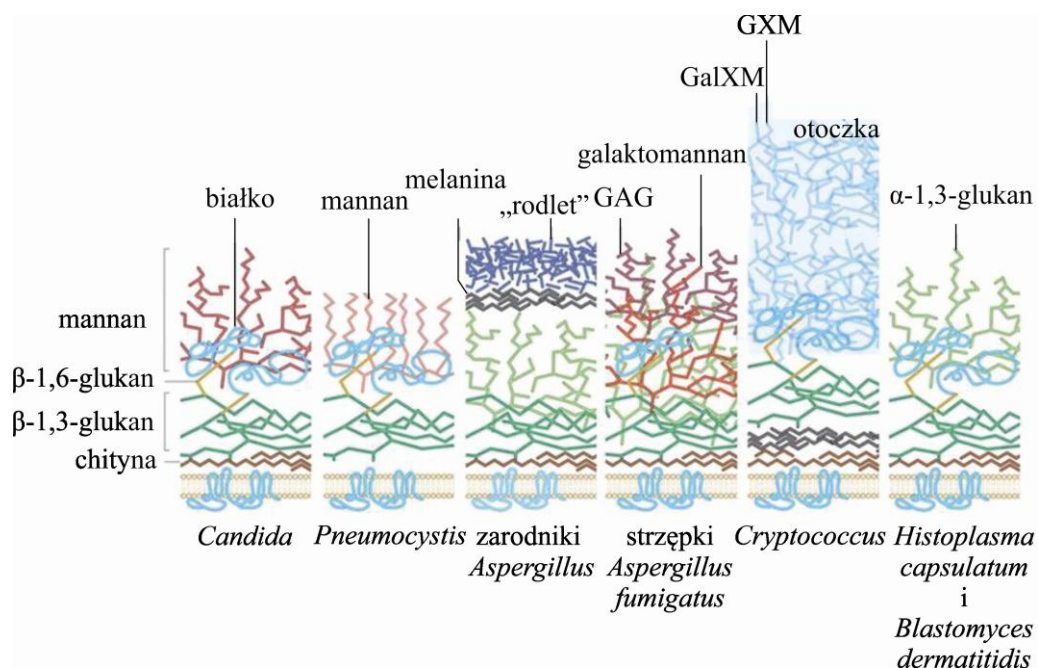
I.3.1. Budowa ściany komórkowej grzybów

Ściana komórkowa wszystkich grzybów jest strukturą odgrywającą kluczową rolę w utrzymaniu integralności komórek, ochronie przed wpływami środowiska zewnętrznego oraz w morfogenezie i patogenezie grzyba. Działa jak sito, regulując selektywny transport cząsteczek do i z komórki. Jest miejscem, skąd uwalniane są toksyny i cząsteczki o aktywności hydrolitycznej, które pozwalają grzybom na zasiedlanie określonych nisz (Latgé, 2007). Ściana komórkowa pośredniczy również w adhezji komórek grzyba do różnych powierzchni, co przyczynia się do tworzenia biofilmu (Lee i Sheppard, 2016).

Kompozycja ściany komórkowej zmienia się dynamicznie pod wpływem warunków środowiskowych. Ciągła synteza składników ściany komórkowej i ich rearanżacja jest niezbędna do przetrwania grzyba podczas wzrostu, namnażania,

kolonizacji i inwazji powierzchni komórek gospodarza (Lee i Sheppard, 2016). Jak istotną rolę odgrywa ściana komórkowa grzybów świadczy fakt, że około 20% genomu drożdży *S. cerevisiae* stanowią geny kodujące cząsteczki zaangażowane w biosyntezę i regulację syntezy składników ściany komórkowej (de Groot i in., 2001; Gow i in., 2017).

Ściana komórkowa większości grzybów ma budowę warstwową. Zbudowana jest w ponad 90% z polisacharydów, tworzących trójwymiarową sieć. Najgłębiej położoną warstwę szkieletową stanowi rozgałęziony β -1,3/1,6-glukan wraz z chityną. Oba składniki mają zdolność do tworzenia wiązań wodorowych i formowania mikrofibrili, które oplatając komórkę, tworzą szczelną sieć, na tyle silną, aby utrzymać wysokie hydrostatyczne ciśnienie wewnątrzkomórkowe wywierane na ścianę przez cytoplazmę i błonę komórkową. Rozgałęziony β -1,3/1,6-glukan jest związany do białek i/lub innych polisacharydów. Warstwa zewnętrzna ściany komórkowej jest bardziej heterogenna, jej składowe są charakterystyczne dla poszczególnych gatunków grzybów (Latgé, 2007; Erwig i Gow, 2016; Gow i in., 2017; Hernandez-Chavez i in., 2017) (Ryc. 14).



Ryc. 14. Porównanie budowy ściany komórkowej wybranych gatunków grzybów (Erwig i Gow, 2016, zmieniono). GAG – galaktozaminogalaktan, GalXM – galaktoksylomanan, GXM – glukuronoksylomanan. Szczegółowy opis w tekście.

Warstwa zewnętrzna ściany komórkowej u drożdży, np. z rodzaju *Candida* i *Saccharomyces*, jak również u *Pneumocystis jiroveci*, gatunku patogennego dla człowieka, zawiera mannozylowane glikoproteiny, które poprzez

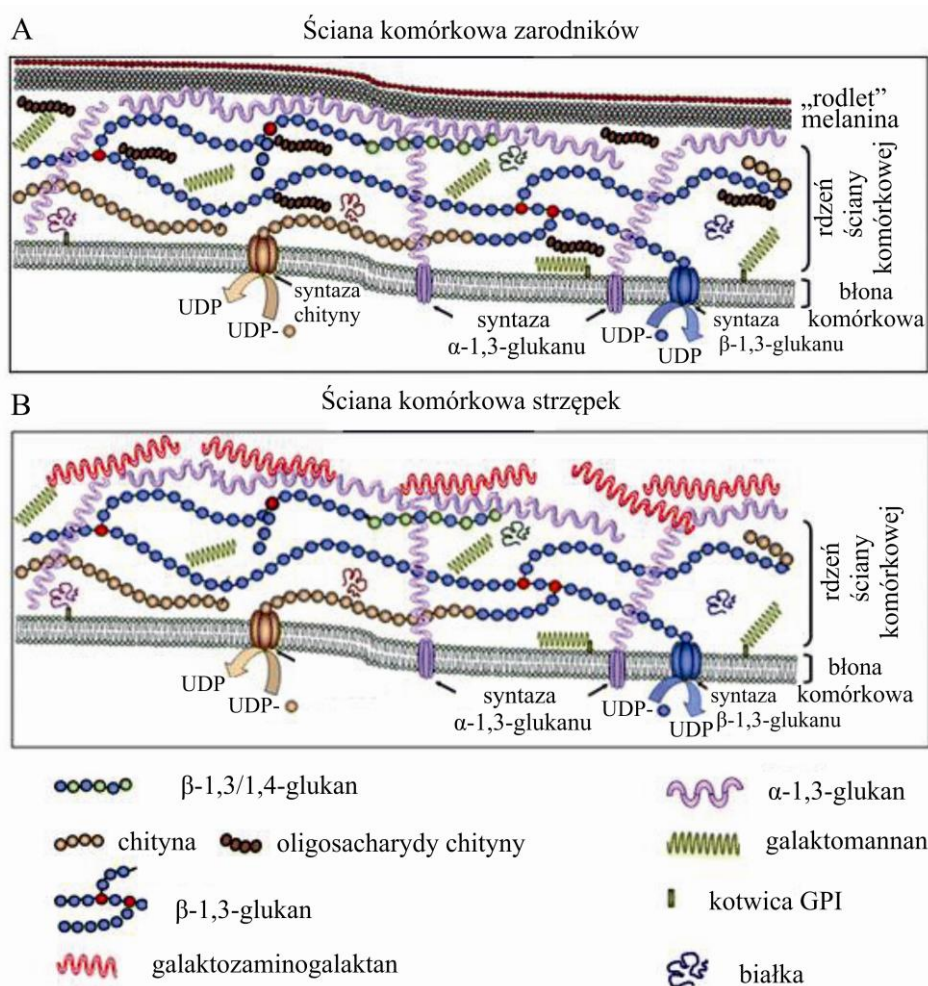
glikozylofosfatydyloinozitol (ang. *glycosylphosphatidylinositol*, GPI) łączą się z β -1,3/1,6-glukanem (Gow i in., 2017). Charakterystycznym składnikiem ściany komórkowej polimorficznych grzybów patogennych dla człowieka, *Histoplasma capsulatum* oraz *Blastomyces dermatitidis*, jest α -1,3-glukan (Rappleye i in., 2007). Podobnie, u grzybów z rodzaju *Cryptococcus*, α -1,3-glukan obecny jest w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej, gdzie stanowi element mocujący otoczkę, zbudowaną z glukuronoksylomannanu i galaktoksylomannanu. Dodatkowo, w ścianie komórkowej *C. neoformans* znajduje się melanina, która prawdopodobnie ulokowana jest w pobliżu chityny lub jej deacetylowanej formy - chitosanu (Ryc. 14) (Erwig i Gow, 2016).

Rdzeń ściany komórkowej u wszystkich gatunków z rodzaju *Aspergillus*, podobnie jak u innych grzybów, stanowi β -1,3-glukan oraz chityna. Oba składniki występują zarówno u form wegetatywnych – w strzępkach, jak również u form przetrwalnikowych – w zarodnikach. Obserwowane różnice w budowie, rozmieszczeniu i zawartości poszczególnych polisacharydów ściany komórkowej wynikają z różnych funkcji pełnionych przez oba morfotypy (Ryc. 15) (Beauvais i Latgé, 2018; Beauvais i in., 2014). Ściana komórkowa *A. fumigatus*, oprócz polisacharydów, zawiera również białka, które stanowią 2-3% jej zawartości (Bernard i Latgé, 2001; de Groot i in., 2007).

Warstwa wewnętrzna ściany komórkowej zarodników *Aspergillus* zawiera nierozpuszczalne w zasadach β -1,3-glukany (38%), galaktomannan (26%) oraz chitynę/chitosan (5,6%). Polisacharydy te, wspólnie z białkami, tworzą sztywną i wytrzymałą strukturę. Warstwa zewnętrzna ściany komórkowej zarodników zawiera rozpuszczalne w zasadach α -1,3-glukany (14%), galaktomannan (13%), β -1,3-glukany (5%) oraz chitynę/chitosan (0,5%), tworzące, w przeciwieństwie do warstwy wewnętrznej, luźną sieć (Ryc. 15) (Fontaine i in., 2000; Mouyna i Fontaine, 2009; Latgé, 2010, Lee i Sheppard, 2016).

Zarodniki *Aspergillus* okryte są dodatkowo dwoma warstwami ochronnymi zbudowanymi z hydrofobin i melaniny. Najbardziej zewnętrzną stanowi wysoce hydrofobowa warstwa (ang. *rodlet*) zbudowana z hydrofobin (ang. *hydrophobins*), białek bogatych w cysteinę, o masie cząsteczkowej 14-16 kDa. Białka te chronią zarodniki przed odpowiedzią immunologiczną organizmu gospodarza (Paris i in., 2003). Hydrofobiny są również zaangażowane w proces adhezji patogenów grzybowych do komórek gospodarza, m. in. u owadów i roślin (Gow i in., 2017). Poniżej warstwy „rodlet” znajduje się warstwa zawierająca melaninę (Gow i in., 2017). Obie warstwy zapewniają zarodnikom ochronę przed niekorzystnym wpływem czynników

środowiskowych, takich jak: promieniowanie UV, temperatura, wysokie stężenie soli, skrajne wartości pH czy ciśnienia osmotycznego, jak również cząsteczek o aktywności przeciwgrzybowej wydzielanych przez organizm gospodarza. Rola ochronna hydrofobin i melaniny kończy się w momencie kiełkowania zarodników, kiedy dochodzi do pęknięcia warstwy zewnętrznej i uwidocznienia struktur PAMPs, takich jak β -1,3-glukan oraz α -mannan (Carrion Sde i in., 2013; Paris i in., 2003; Dague i in., 2008). Ściana zarodników staje się wówczas przepuszczalna dla wody, jonów i związków przeciwgrzybowych (Beauvais i Latgé, 2018).



Ryc. 15. Porównanie budowy ściany komórkowej zarodników (A) oraz strzępek (B) *A. fumigatus* (Beauvais i in., 2014, zmienione).

Składniki ściany komórkowej strzępek *A. fumigatus* stanowią 20-40% suchej masy grzybni (Mouyna i Fontaine, 2009). Podobnie jak w przypadku zarodników, ściana komórkowa strzępek *Aspergillus* zbudowana jest z dwóch warstw. W skład warstwy wewnętrznej wchodzi polisacharydy nierozpuszczalne w zasadach: β -1,3-glukany (30%), chityna/chitosan (17%), galaktomannany (β -1,5galakto- α -1,2/1,6-

mannan) (5%), galaktozoaminogalakatan (4%) oraz β -1,3/1,4-glukany (3%). Zewnętrzna warstwa ściany komórkowej zbudowana jest z rozpuszczalnych w zasadach polisacharydów: α -1,3-glukanu (42%), galaktozaminogalakatanu (GAG) (2,3%) oraz galaktomannanów (GM) (1,4%) (Fontaine i in., 2000; Latgé, 2010; Yoshimi i in., 2016; Beauvais i in., 2014). Na powierzchni strzępek wytwarzana jest amorficzna macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM), nie obserwowana na zarodnikach. W jej skład wchodzi galaktozaminogalakatan, galaktomannany oraz α -1,3-glukan (Ryc. 15) (Yoshimi i in., 2017).

Ze względu na fakt, że α -1,3-glukan jest jednym z głównych komponentów ściany komórkowej patogennych dla człowieka grzybów strzępkowych oraz dimorficznych, w dalszej części pracy przedstawiono rolę tego składnika w funkcjonowaniu komórek grzybów oraz przypisywane mu znaczenie w oddziaływaniu gospodarz-patogen.

I.3.1.1. Rola α -1,3-glukanu ściany komórkowej w funkcjonowaniu komórek grzybów

Alfa-1,3-glukan pełni istotną rolę w organizacji ściany komórkowej u wielu grzybów patogennych dla człowieka. Jego obecność wpływa na prawidłową morfologię komórek grzyba, ich wrażliwość na enzymy lityczne i reaktywne formy tlenu. Składnik ten może również pełnić rolę materiału zapasowego, czynnika aglutynującego oraz czynnika wirulencji.

Analiza genomu grzybów z rodzaju *Aspergillus* wykazała, że w zależności od gatunku, wyróżnić można od dwóch (*A. nidulans*) do pięciu (*A. niger*) genów *ags* kodujących syntazy α -1,3-glukanu. U *A. fumigatus* synteza α -1,3-glukanu odbywa się przy udziale trzech syntez: *Ags1*, *Ags2* oraz *Ags3*. *Ags1* oraz *Ags2* są białkami błonowymi. *Ags3* jest również prawdopodobnie związane z błoną komórkową (Yoshimi in., 2016) (Henry i in., 2012).

Składnik strukturalny ściany komórkowej

Wykazano, że mutacje w genach *ags2* oraz *ags3* *A. fumigatus* nie miały wpływu na ilość α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej, natomiast mutanty *ags1* miały o 50% zredukowaną zawartość tego polisacharydu (Beauvais i in., 2005). Delecja genu *ags1* lub *ags2* skutkowała zmianą w morfologii strzępek oraz osłabieniem zarodnikowania (Beauvais i in., 2005). Mutanty z delecją wszystkich trzech genów charakteryzowały się

prawidłowym wzrostem strzępek i zarodnikowaniem, a ich ściana komórkowa była całkowicie pozbawiona α -1,3-glukanu (Beauvais i in., 2013). Brak tego polisacharydu skutkował zmianą w organizacji ściany komórkowej zarodników, polegającą na kompensacyjnym zwiększeniu ilości β -1,3-glukanu. Dodatkowo, na powierzchni zarodników pojawiała się glikoproteinowa macierz zewnątrzkomórkowa pokrywająca hydrofobową warstwę „rodlet” (Beauvais i in., 2013). W badaniach na myszach wykazano, że szczepy *A. fumigatus* z wyłączonym genem *ags3*, u których ekspresja genu *ags1* była zwiększona, charakteryzowały się większą zjadliwością, związaną z nadmierną melanizacją zarodników i szybszym kiełkowaniem oraz zmniejszoną wrażliwością na reaktywne formy tlenu (Beauvais i in., 2005; Maubon i in., 2006).

Z kolei Polacheck i Rosenberger wykazali, że podobnie jak *A. fumigatus*, mutant *A. nidulans* niewytwarzający melaniny i większości α -1,3-glukanu, zawierał większą ilość β -1,3-glukanu w ścianie komórkowej. Jednocześnie zewnętrzna warstwa jego ściany komórkowej była niedostrzegalna w mikroskopie elektronowym. Stwierdzono, że brak α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej zwiększał wrażliwość komórek grzyba na działanie enzymów litycznych (Polacheck i Rosenberger, 1977).

U *C. neoformans* α -1,3-glukan odgrywa kluczową rolę w mocowaniu otoczki do ściany komórkowej. Mutanty pozbawione α -1,3-glukanu rosły wolniej i nie były zdolne do utworzenia otoczki, pomimo, że jej składniki były wytwarzane. Brak α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej kompensowany był zwiększoną ilością chityny/chitosanu oraz redystrybucją β -glukanu pomiędzy obie warstwy ściany komórkowej. Ponadto, mutant pozbawiony α -1,3-glukanu nie wykazywał zjadliwości na modelu mysim (Reese i Doering, 2003; Reese i in., 2007).

Materiał zapasowy

Alfa-1,3-glukan może pełnić funkcję polisacharydu zapasowego. Zgromadzenie odpowiedniej ilości α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej jest niezbędne podczas formowania klejstotecjów u *A. nidulans* (Zonneveld, 1972). Wykazano, że α -1,3-glukan obecny w ścianie komórkowej *A. oryzae* może stanowić dla grzyba źródło węgla w sytuacji braku składników odżywczych w podłożu (Yoshimi i in., 2017; Zhang i in., 2017).

Czynnik sprzyjający agregacji

Kielkowanie zarodników wielu gatunków grzybów strzępkowych, w tym z rodzaju *Aspergillus*, wiąże się z ich pęcznieniem i agregacją (Lemarre, 2008; Lin i in., 2008). W momencie kiełkowania warstwa „rodlet” i melanina zanikają, a na powierzchni ściany komórkowej zarodników ekspozycyjny jest α -1,3-glukan. Wykazano, że jest on jedynym składnikiem ściany komórkowej odpowiedzialnym za zjawisko aglutynacji kiełkujących zarodników *A. fumigatus* (Beauvais i in., 2014; Fontaine i in., 2010). Potwierdzeniem udziału α -1,3-glukanu w agregacji zarodników było zahamowanie tego zjawiska po dodaniu do hodowli α -1,3-glukanazy. Stwierdzono również, że napęczniałe zarodniki mają zdolność przylegania do nierozpuszczalnych cząsteczek α -1,3-glukanu. Zdolnością do agregacji charakteryzują się zarodniki gatunków, które w swoim genomie mają geny *ags*, kodujące syntazę α -1,3-glukanu, odpowiedzialną za syntezę tego polisacharydu (Fontaine i in., 2010).

Funkcja α -1,3-glukanu jako czynnika aglutynującego dotyczy zarówno zarodników, jak i strzępek grzybów z rodzaju *Aspergillus* (Fontaine i in., 2010; Henry i in., 2012). Poziom tej aktywności uzależniony jest od gatunku grzyba. Strzępki szczepu *A. nidulans* pozbawione α -1,3-glukanu były całkowicie rozproszone w płynnym podłożu, natomiast u analogicznego szczepu *A. oryzae* stwierdzono jedynie tworzenie mniejszych osadów grzybni (Yoshimi i in., 2017).

Alfa-1,3-glukan, dzięki swoim właściwościom aglutynacyjnym, bierze udział w tworzeniu biofilmu *A. fumigatus* zarówno *in vivo*, jak również *in vitro*. Alfa-1,3-glukan znajduje się w tych warunkach na powierzchni ściany komórkowej strzępek grzyba oraz stanowi razem z GM oraz GAG składową macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (Loussert i in., 2010).

Aktywność aglutynacyjną α -1,3-glukanu potwierdzono również u *C. neoformans*. Polisacharyd ten jest odpowiedzialny za mocowanie otoczki do ściany komórkowej. Mutanty *C. neoformans* niewytwarzające otoczki, a tym samym ekspozycyjne α -1,3-glukan na powierzchni komórki, wykazują tendencję do agregacji (Chang i in., 1996; Reese i Doering, 2003).

Obecność α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej wywiera również wpływ na morfologię oraz zdolności aglutynacyjne *H. capsulatum*. Dwa szczepy zróżnicowane pod względem wirulencji charakteryzowały się odmiennym wyglądem kolonii podczas wzrostu na podłożu stałym i zdolnością do agregacji. W podłożu płynnym agregował

jedynie szczep wirulentny, który zawierał znacznie większą ilość α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej (Klimpel i Goldman, 1987).

Czynnik wirulencji

Obecność α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej opisuje się również w kontekście jego wpływu na wirulencję grzyba. Dane literaturowe wskazują, że α -1,3-glukan utrudnia rozpoznanie komórek grzyba przez układ immunologiczny gospodarza. Szczep *A. fumigatus*, którego zarodniki pozbawione były α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej, wykazywał mniejszą zjadliwość w przebiegu aspergillozy u myszy. Zarodniki były szybko rozpoznawane i likwidowane przez układ odpornościowy gospodarza. Brak tego polisacharydu wiązał się z modyfikacją ściany komórkowej zarodników, polegającą na wytwarzaniu amorficznej, glikoproteinowej macierzy na powierzchni warstwy „rodlet”, co skutkowało efektywniejszą fagocytozą zarodników przez mysie makrofagi pęcherzykowe. Badania histopatologiczne tkanki płucnej myszy nie wykazały obecności strzępek grzyba, zaobserwowano jedynie niekiełkujące zarodniki. W sytuacji braku α -1,3-glukanu, moment kiełkowania zarodników wiązał się z szybką indukcją przeciwgrzybowej odpowiedzi immunologicznej w organizmie gospodarza, która była najprawdopodobniej efektem ekspozycji na β -1,3-glukan i chityny na powierzchni ściany komórkowej. Większa przeżywalność myszy zakażonych tym mutantem *A. fumigatus* wynikała zatem z deficytu α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej grzyba, co wiązało się z osłabionym kiełkowaniem *in vivo* oraz efektywniejszym rozpoznaniem zarodników mutantu (Beauvais i in., 2013; Beauvais i in., 2014).

U patogennych grzybów dimorficznych, takich jak *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* i *B. dermatitidis*, α -1,3-glukan odgrywa również rolę czynnika zaangażowanego w wirulencję. Wykazano, że kluczową rolę w utrzymaniu pełnej wirulencji tych grzybów odgrywają produkty trzech genów: *ags1*, *ugp1* i *amy1* (Edwards i in., 2010). Największe znaczenie ma syntaza α -1,3-glukanu kodowana przez geny *ags* (Rappleye i in., 2004). Gen *ags1* ulegał ekspresji u patogennej, drożdżakowej formy *H. capsulatum*, w przeciwieństwie do występującej w środowisku formy strzępkowej (Edwards i in. 2013; Inglis i in., 2013). Potwierdzono również udział dwóch innych genów: *ugp1* kodującego UTP-glukozo-1-fosfouridylylotransferazę, oraz *amy1* kodującego α -1,4-amylazę, w wytwarzaniu α -1,3-glukanu i utrzymaniu wirulencji *H. capsulatum* i *P. brasiliensis* (Marion i in., 2006). Mutacja genu *amy1* skutkowała

utrata zdolności *H. capsulatum* do zabijania makrofagów i kolonizacji płuc myszy. U *P. brasiliensis* poziom ekspresji genu *amy1* wzrastał u form drożdżakowych, co było skorelowane z wyższym poziomem α -1,3-glukanu w ich ścianie komórkowej i zwiększoną wirulencją (Marion i in., 2006; Camacho i in., 2012). Dowiedziono również, że poziom α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej *P. brasiliensis* jest regulowany przez czynniki zewnętrzne, m. in. obecne w organizmie gospodarza (San-Blas i in., 1977 a,b,c; Yoshimi i in., 2017).

Udział α -1,3-glukanu w patogenezie *H. capsulatum* polega najprawdopodobniej na pełnieniu funkcji maskującej wobec β -1,3-glukanu, dobrze poznanego wzorca molekularnego związanego z patogenami, który jest rozpoznawany przez komórki odpornościowe, m. in. makrofagi (Rappleye i in., 2007). Ze względu na zawartość α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej u formy drożdżopodobnej, *H. capsulatum* podzielono na dwie grupy (chemotypy). Chemotyp I pozbawiony jest α -1,3-glukanu, natomiast chemotyp II zawiera α -1,3-glukan w ścianie komórkowej. Do typu II należy większość grup filogenetycznych *H. capsulatum*, jak również inne grzyby dimorficzne: *Blastomyces* sp. czy *Paracoccidioides* sp.

Chemotyp II *H. capsulatum* zawiera w ścianie komórkowej α -1,3-glukan, który uniemożliwia rozpoznanie β -1,3-glukanu przez fagocyty, co wpływa na jego wysoką wirulencję. Pozbawienie tego chemotypu α -1,3-glukanu skutkuje sprawną likwidacją zakażenia przez immunokompetentne komórki gospodarza. Niemniej jednak, chemotyp I, pomimo braku α -1,3-glukanu, charakteryzował się również silną wirulencją na modelu mysim *in vivo*. Wyniki badań wskazują, że β -1,3-glukan w komórkach *H. capsulatum* chemotypu I nie jest całkowicie eksponowany na zewnątrz, co sugeruje wykorzystanie innego mechanizmu blokującego rozpoznanie grzyba przez fagocyty (Edwards i in., 2010; Edwards i Rappleye, 2011; Woods, 2016).

Klimpel i Goldman wyizolowali dwa szczepy *H. capsulatum* zróżnicowane pod względem zjadliwości. Wykazano, że awirulentny szczep *H. capsulatum* miał 1000-krotnie mniejszą zawartość α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej niż szczep wirulentny (Klimpel i Goldman, 1987). Podobne zależności wykazano w przypadku *B. dermatitidis*. Pozbawiony wirulencji mutant oraz szczep charakteryzujący się wirulencją 10 000-krotnie niższą od szczepu wirulentnego były niemal zupełnie pozbawione α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej (Hogan i Klein, 1994).

Obecność α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej grzybów atakujących rośliny tłumaczona jest również swoistą strategią uniknięcia rozpoznania przez komórki układu

odpornościowego gospodarza. Alfa-1,3-glukan maskuje obecność chityny i β -1,3-glukanu, obecnych w głębszych warstwach ściany komórkowej (Geoghegan I., 2017).

Kluczowym elementem patogenezы fitopatogennych gatunków grzybów, takich jak: *Magnaporthe oryzae*, *Cochlioborus miyabeanus* oraz *Rhizoctonia solani* jest obecność α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej. Alfa-1,3-glukan jest u tych grzybów zaangażowany w utrzymywanie struktury strzępek infekujących rośliny. W badaniach *in vitro* wykazano fragmentację strzępek infekcyjnych *R. solani* po dodaniu α -1,3-glukanazy (Fujikawa i in., 2012). Mutanty *M. oryzae* pozbawione aktywności syntazy α -1,3-glukanu, a co za tym idzie α -1,3-glukanu w ich ścianie komórkowej, są niepatogenne i nie przeżywają na liściach ryżu (*Oryza* sp. L.), gdyż zachodzi szybka aktywacja odpowiedzi immunologicznej u roślin, m.in. wzmożona ekspresja peptydów przeciwdrobnoustrojowych gospodarza (Fujikawa i in., 2012, Geoghegan i in., 2017). Transgeniczny ryż, wytwarzający α -1,3-glukanazę, cechowała wysoka odporność na infekcje grzybicze wywoływane przez grzyby odległe filogenetycznie, takie jak *M. oryzae*, *C. miyabeanus*, czy *R. solani*. Wykazano również, że brak α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej lub częściowa jego degradacja, zwiększały wrażliwość grzyba na chitynazę, enzym rozkładający chitynę, uważaną za istotny element obrony roślin przed patogenami grzybowymi (Fujikawa i in., 2012).

Przytoczone przykłady wskazują na kluczową rolę α -1,3-glukanu w patogenezie infekcji wywołanych przez wiele gatunków grzybów. Przypisuje mu się cechy cząsteczki neutralnej, której obecność pozwala uniknąć rozpoznania przez układ immunologiczny gospodarza, poprzez maskowanie składników ściany komórkowej położonych w jej głębszych warstwach, między innymi β -1,3-glukanu oraz chityny, które uważane są za induktory odpowiedzi immunologicznej.

Nieliczne doniesienia wskazują na działanie immunomodulacyjne oczyszczonego α -1,3-glukanu. Polisacharyd ten, wyizolowany ze ściany komórkowej grzyba *Rhizoctonia*, indukował odpowiedź immunologiczną w kielkach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.), chroniąc tym samym roślinę przed chorobą spowodowaną przez patogenne szczepy *Rhizoctonia solani* AG-3 oraz *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*. Po podaniu α -1,3-glukanu, jak również niepatogennego szczepu *Rhizoctonia*, wykazano indukcję aktywności β -1,3-glukanazy oraz chitynazy, które zaangażowane są w reakcje odpornościowe u roślin (Wolski i in., 2007).

II. CELE PRACY

W odpowiedzi na infekcje grzybicze układ immunologiczny zwierząt uruchamia szereg reakcji odpornościowych, które warunkują eliminację patogena. Rozpoznanie *non-self* jest kluczowym etapem, w którym układ immunologiczny gospodarza wykorzystuje receptory PRRs do identyfikacji obecności struktur PAMPs w organizmie. Najczęściej opisywaną determinantą molekularną patogenów grzybowych jest β -1,3-glukan. Rola α -1,3-glukanu obecnego w ścianie komórkowej *A. niger*, jak i wielu innych gatunków grzybów patogennych dla człowieka, nie jest dostatecznie wyjaśniona. Jak dotąd, nie ma także danych literaturowych dotyczących reakcji układu odpornościowego owadów na ten składnik ściany komórkowej grzybów.

Celem pracy było zatem prześledzenie reakcji układu odpornościowego owadów, na przykładzie organizmu modelowego *G. mellonella*, na podanie α -1,3-glukanu wyizolowanego ze ściany komórkowej *A. niger*. Wzięto pod uwagę możliwość rozpoznania tego polisacharydu w hemolimfie gąsienic, oraz przebieg reakcji komórkowych i humoralnych, uruchamianych w odpowiedzi na ten składnik ściany komórkowej grzybów. Dla porównania, przeprowadzono analizę odpowiedzi komórkowej i humoralnej owadów po immunizacji zarodnikami *A. niger* oraz β -1,3/1,6-glukanem (laminaryną).

Szczegółowe cele niniejszej pracy:

- ocena przeżywalności gąsienic *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*,
- identyfikacja białek hemolimfy *G. mellonella* wiążących się do α -1,3-glukanu *A. niger*,
- analiza odpowiedzi komórkowej gąsienic *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*, poprzez określenie zmian w hemocytogramie oraz obserwacje tworzenia nodul,
- ocena odpowiedzi humoralnej gąsienic *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*:
 - analiza zmian w aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie,
 - analiza zmian w profilach białkowych hemolimfy,

- identyfikacja i analiza zmian poziomu peptydów odpornościowych w hemolimfie,
 - określenie zmian w ekspresji genów kodujących wybrane peptydy odpornościowe w ciele tłuszczowym,
- ocena udziału białek obecnych konstytutywnie w hemolimfie *G. mellonella*, lizozymu i apolipoforyny III, w reakcjach odpornościowych na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*.

III. MATERIAŁY I METODY

III.1. Materiały i odczynniki

Nazwa	Producent, kraj pochodzenia
pepton	A&A Biotechnology, Polska
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina)	ACROS Organics, USA, Belgia
przeciwciała anty-apoLp-III <i>G. mellonella</i> (zamówienie komercyjne)	Agrisera, Szwecja
mieszanina do qPCR (<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>)	Applied Biosystem, USA
agar bakteriologiczny (<i>Bacteriological Lab-AgarTM</i>), ekstrakt drożdżowy (<i>Yeast Extract</i>), pożywka LB (<i>Lysogeny Broth</i>)	BIOCORP sp. z o.o., Polska
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan), NBT (błękit nitrotetrazolowy $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$)	Biomol GmbH, Niemcy
amfolyty (<i>Bio-Lyte 3-10 Buffer</i>), białka markerowe (<i>Polypeptide SDS-PAGE, Molecular Weight Standards</i>), białka markerowe (<i>Precision Plus Protein Dual Color Standards</i>), membrana PVDF do sekwencjonowania (<i>Sequi-Blot PVDF Membrane for Protein Sequencing 0,2 μm</i>), odczynnik Bradford (<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>), olej mineralny, paski do elektroforezy dwukierunkowej (<i>ReadyStrip IPG Strips, pH 3 - 10, 7 cm</i>), Triton X-100	Bio-Rad, USA
agar bakteriologiczny	BTL sp. z o.o., Polska
chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), mocznik (CH_4N_2O)	Chempur, Polska
podłoże silikonowe Sylgard [®] 184	Dow Corning [®] , USA
glicyna (kwas aminooctowy, $C_2H_5NO_2$)	Eurochem BGD Sp. z o.o., Polska
DTT (ditiotretitol)	Fermentas, Kanada
barwnik Coomassie Brilliant Blue R 250, PTU (fenylotiomocznik,	Fluka Analytical,

C₇H₈N₂S)	Szwajcaria
bibula Whatman 3MM	GE Healthcare Life Sciences, Wielka Brytania
acetonitryl (gradient grade)	JT Baker, Holandia
komora Bürkera	Marienfeld, Niemcy
membrana PVDF (<i>Immobilon-P 0,45 μm</i>), probówki wirówkowe (<i>Ultrafree-MC HV Centrifugal filter 0,45μm</i>), Triton X-100, Tween® 20	Merck Milipore, Niemcy
2-merkaptotanol (C₂H₆OS), AMPS (nadsiarczan amonu), bisakrylamid (N,N'-metylenobisakrylamid), CAPS (C₉H₁₉NO₃S), SDS (siarczan dodecyłu sodu)	MP Biomedicals, Francja
szkiełka 8-dolkowe (<i>Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide System</i>)	Nunc, USA
aceton (C₃H₆O), alkohol etylowy (C₂H₅OH), alkohol metylowy (CH₃OH), błękit bromofenolowy (C₁₉H₁₀Br₄O₅S), borowodorek sodu (NaBH₄), chlorek magnezu (MgCl₂), chloroform (CHCl₃), diwodorofosforan potasu (KH₂PO₄), glicerol (gliceryna bezwodna, C₃H₈O₃), glukoza (C₆H₁₂O₆), siarczan magnezu (MgSO₄×7 H₂O), jodek metylu (CH₃I), kwas octowy (CH₃COOH), kwas solny (HCl), nadtlenek fosforu V (P₂O₅), siarczan sodu (Na₂SO₄), węglan dimetylu (C₃H₆O₃)	POCH S.A., Polska
trypsyna	Promega
plytki Petriego (<i>Polystyrene Petri dish</i>)	Sarstedt, Niemcy
agaroza (<i>Agarose SERVA high EEO</i>)	SERVA, Niemcy
akrylamid (C₃H₅NO), amfoterycyna B (<i>Amphotericin B from Streptomyces</i>), barwnik Hoechst 32258, BSA (albumina surowicy wołowej), cekropina B (<i>Cecropin B</i>), CHAPS (C₃₂H₅₈N₂O₇S·H₂O), chlorek wapnia (CaCl₂), Coomassie Brilliant Blue G-250, cytrynian sodu (C₆H₈O₇), diwodorofosforan (V) sodu (NaH₂PO₄), DMF (dimetyloformamid, C₃H₇NO), DMSO (dimetylosulfotlenek, (CH₃)₂SO), DOPA (3,4-dihydrokso-L-fenyloalanina), EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), EWL (lizozym białka jaja kurzego, ang. <i>egg white lysozyme</i>), formaldehyd, heksan (C₆H₁₄), homogenizator elektryczny (<i>Pellet</i>	Sigma-Aldrich, USA, Niemcy

<i>pestle</i>), kwas cytrynowy ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$), laminaryna z <i>Laminaria digitata</i>, liofilizat <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC No. 4698, octan etylu ($CH_3COOC_2H_5$), paraformaldehyd ($HO(CH_2O)_nH$), przeciwciała anty-α-1,3-glukan (mysie IgM MOPC-104E), przeciwciała II-rzędowe znakowane FITC (<i>Goat Anti-rabbit IgG Antibody, FITC Conjugate</i>), przeciwciała II-rzędowe kozie anty-królicze sprzężone z fosfatazą alkaliczną (<i>Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase Antibody Produced in Goat</i>), przeciwciała II-rzędowe kozie anty-mysie znakowane Alexa Fluor 488 (<i>Alexa Fluor 488 Goat Anti-mouse IgM (μ-chain specific)</i>), sacharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$), siarczan streptomycyny, TFA (kwas trifluorooctowy, $C_2HF_3O_2$), Tris (<i>Trizma® base</i>, $C_4H_{11}NO_3$), trycyna ($HOCH_2)_3CNHCH_2CO_2H$), wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4), wodorotlenek sodu (NaOH), wodorowęglan sodu ($NaHCO_3$), zestaw do izolacji RNA (<i>GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit</i>)	
mleko w proszku odtłuszczone, granulowane	Spółdzielnia Mleczarska w Gostyniu, Polska
szkiełka Nunc LAB-TEK, TURBO DNA-free™ Kit, zestaw do odwrotnej transkrypcji (<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor</i>)	Thermo Fisher Scientific, USA

III.2. Bufory

Numer	Nazwa	Skład
Bufor 1	IPS (ang. <i>insect physiological saline</i>)	0,1 M Tris-HCl pH 6,9 150 mM NaCl 5 mM KCl
Bufor 2	Bufor Ringer'a pH 6,1	172 mM KCl 68 mM NaCl 5 mM NaHCO ₃
Bufor 3	Bufor Sörensena pH 6,4	66 mM KH ₂ PO ₄ 66 mM Na ₂ HPO ₄
Bufor 4	Bufor A pH 7,4	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM CaCl ₂
Bufor 5	Bufor B pH 6,5	50 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O
Bufor 6	Bufor próbkowy do elektroforezy Tris-glicyna SDS-PAGE	0,125 M Tris-HCl pH 6,8 20% glicerol 4% SDS 0,2 M DTT 0,002% błękit bromofenolowy
Bufor 7	Bufor elektrodowy do elektroforezy Tris-glicyna SDS-PAGE	1,44% glicyna 0,3% Tris 0,1% SDS
Bufor 8	Bufor do transferu 1	1,44% glicyna 0,3% Tris
Bufor 9	Bufor TBS pH 7,4 (ang. <i>Tris-buffered saline</i>)	10 mM Tris-HCl pH 7,4 0,9% NaCl
Bufor 10	Bufor AP pH 9,5	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Bufor 11	Bufor próbkowy do elektroforezy Tris-trycyna SDS-PAGE	50 mM Tris-HCl pH 6,8 12% glicerol 4% SDS 2% 2-merkaptoetanol

		0,01% barwnik Coomassie Brilliant Blue G-250
Bufor 12	Bufor katodowy pH 8,3	0,1 M Tris 0,1 M trycyna 0,1% SDS
Bufor 13	Bufor anodowy pH 8,9	0,2 M Tris
Bufor 14	Bufor żelowy „gel buffer”	3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3% SDS
Bufor 15	Bufor do rehydratacji	8,8 M mocznik 32,5 mM CHAPS 50 mM DTT 0,2% amfolity
Bufor 16	Bufor do równoważenia I	0,375 M Tris-HCl pH 8,8 6 M mocznik 130 mM DTT 20% glicerol 2% SDS
Bufor 17	Bufor do równoważenia II	0,375 M Tris-HCl pH 8,8 6 M mocznik 135 mM jodoacetamid 20% glicerol 2% SDS
Bufor 18	Bufor PBS pH 7,4 (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
Bufor 19	Bufor do transferu 2	5 mM CAPS pH 11 (NaOH) 10% metanol
Bufor 20	Antykoagulant pH 4,6	100 mM glukoza 93 mM NaCl 30 mM cytrynian sodu 26 mM kwas cytrynowy 10 mM EDTA

III.3. Podłoża hodowlane

Nazwa	Skład
Podłoże do hodowli grzybów według Martin'a (Martin, 1950)	1% glukoza 0,5% pepton 0,5% ekstrakt drożdżowy 0,1% KH_2PO_4 0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
Podłoże PDA do hodowli grzybów (agar glukozowo-ziemniaczany, ang. <i>Potato Dextrose Agar</i>)	5% wyciąg ziemniaczany 0,5% glukoza 1,6% agar
Podłoże LB do hodowli bakterii (ang. <i>Lysogeny Broth</i>)	1% pepton 0,5% ekstrakt drożdżowy 0,5% NaCl

III.4. Hodowla mikroorganizmów

- *Escherichia coli* D31 (CGSC 5165) - szczep oporny na działanie streptomycyny (Boman i inni, 1974); pochodzenie: *E. coli* Genetic Stock Centre, New Haven, USA.

Hodowlę bakterii prowadzono w płynnym podłożu LB (warunki sterylizacji podłoża: 121°C przez 15 minut przy 1 atm.), w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Bakterie przechowywano w płynnym podłożu LB w 4°C.

- *Aspergillus niger* CBS 554.65

Hodowlę grzyba prowadzono na skosach z podłoża PDA (ang. *potato dextrose agar*) zestalonego 1,6% dodatkiem agaru, w temperaturze 28°C do uzyskania zarodników. Po pojawieniu się zarodników skosy przechowywano w temperaturze 4°C.

III.4.1. Przygotowywanie zawiesiny zarodników *A. niger*

Zawiesinę zarodników *A. niger* otrzymywano zalewając skos z hodowlą grzyba 5 ml wody apyrogennej. Zarodniki uwalniano z powierzchni grzybni przy użyciu ezy. Przesącz, będący oczyszczoną z resztek podłoża zawiesiną zarodników, uzyskiwano przez filtrowanie na jałowych kolumnkach wypełnionych włóknami bawełnianymi.

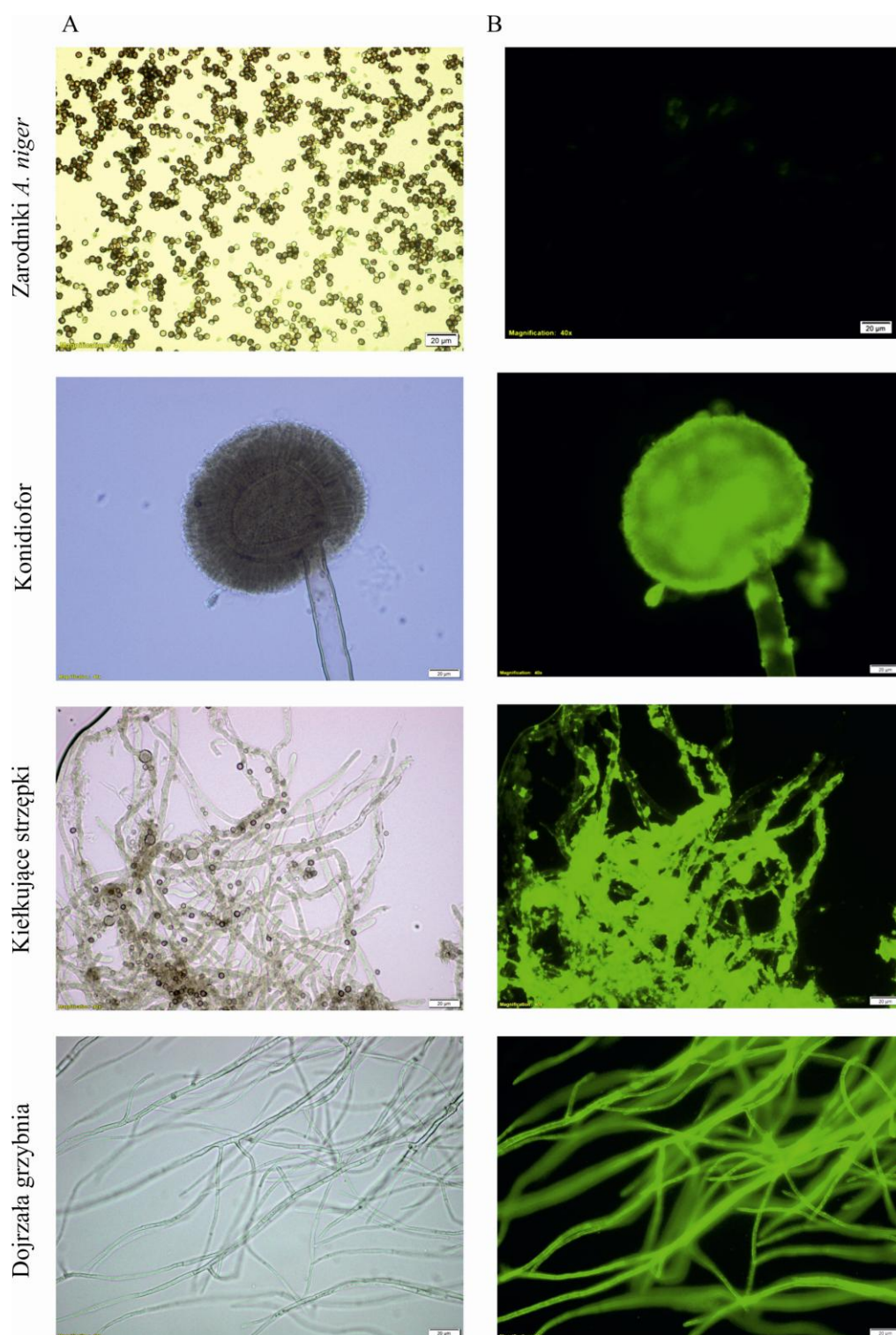
Liczbę zarodników określano z wykorzystaniem komory Bürkera i mikroskopu kontrastowo-fazowego Olympus 061 (USA).

III.5. Immunolokalizacja, izolacja i charakterystyka α -1,3-glukanu *A. niger*

III.5.1. Immunolokalizacja α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej *A. niger*

Immunodetekcję α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej zarodników, konidioforów, kiełkujących strzępkach oraz dojrzałej grzybni *A. niger* przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciał I-rzędowych skierowanych przeciwko α -1,3-glukanowi oraz II-rzędowych znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym Alexa-Fluor 488.

Grzybnię oraz zarodniki *A. niger* po umieszczeniu na szkiełkach podstawowych (Nunc LAB-TEK) utrwalano przy użyciu 3% roztworu formaldehydu w 65°C przez 30 minut. Preparat przemywano trzykrotnie buforem PBS (bufor 18) przez 2 minuty, inkubowano z 1% roztworem Tween 20 w PBS przez 5 minut, po czym przemywano trzykrotnie buforem PBS. W celu uwidocznienia α -1,3-glukanu, preparat inkubowano ze 150 μ l mysich przeciwciał I-rzędowych skierowanych przeciwko α -1,3-glukanowi (0,1 mg/ml) przez 24 godziny w 4°C, a następnie ze 150 μ l przeciwciał II-rzędowych, kozich, anty-mysich, znakowanych Alexa-Fluor 488 (0,1 mg/ml) w 37°C przez 2 godziny, bez dostępu światła. Preparat przepłukano trzykrotnie buforem PBS. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus BX 51, USA) przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 470/500$ nm i długości fali emisji $\lambda = 525/550$ nm (Fujikawa i in., 2009). Uzyskane obrazy mikroskopowe potwierdziły obecność α -1,3-glukanu w ścianach komórkowych konidioforów, kiełkujących strzępek, jak również w dojrzałej grzybni *A. niger*, a także w mniejszym stopniu, uwidoczniły α -1,3-glukan w zarodnikach (Ryc. 16).



Ryc. 16. Immunodetekcja α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej *A. niger*. Kolumna A – obrazy uzyskane w świetle przechodzącym, kolumna B – obrazy uwidaczniające obecność α -1,3-glukanu (zielona fluorescencja) (opracowanie własne). Skala – 20 μ m.

III.5.2. Izolacja i charakterystyka α -1,3-glukanu *A. niger*

Alfa-1,3-glukan *A. niger* wykorzystywany w badaniach w niniejszej pracy został wyizolowany i scharakteryzowany przez dr. hab. Adriana Wiatera, prof. UMCS (Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie).

Badany polisacharyd wyizolowano z grzybni *A. niger* według metody opracowanej przez Kiho (Kiho i in., 1994). W tym celu skosy agarowe porośnięte grzybnią *A. niger* zalewano 7 ml jałowej wody destylowanej i pobierano 2 ml inokulum, którym zaszczepiano 200 ml płynnego podłoża według Martin'a. Hodowlę prowadzono przy 150 RPM (ang. *revolution per minute*), w temperaturze 28°C przez 24 godziny. Z hodowli pobierano 12 ml inokulum, które przenoszono do 500 ml płynnego podłoża według Martin'a. Hodowlę kontynuowano przez 72 godziny. Otrzymaną hodowlę sączone na filtrze z tkaniny bawełnianej. Uzyskaną grzybnię *A. niger* wysuszone w liofilizatorze (Labconco, USA), a następnie zmielono.

Zliofilizowaną i zmieloną grzybnię *A. niger* ekstrahowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, kolejno, metanolem, 0,9% roztworem NaCl, gorącą wodą z 5% dodatkiem Na₂SO₄. Otrzymaną nierozpuszczalną w wodzie frakcję ściany komórkowej *A. niger* zawieszono w 1 M NaOH z 0,1% dodatkiem NaBH₄. Po 24 godzinach mieszaninę odwirowano przy 9600 RPM przez 45 minut (Sigma, Niemcy, rotor 12500). Supernatant neutralizowano przy użyciu 1 M HCl, wirowano (9600 RPM, 20 minut), a otrzymany osad przepłukiwano czterokrotnie wodą destylowaną i ponownie odwirowywano. Osad (α -1,3-glukan), stanowiący frakcję rozpuszczalną w zasadach, nierozpuszczalną w wodzie, zamrożono, a następnie wysuszone w liofilizatorze. Badany α -1,3-glukan stanowił 9,93% suchej masy grzybni *A. niger*.

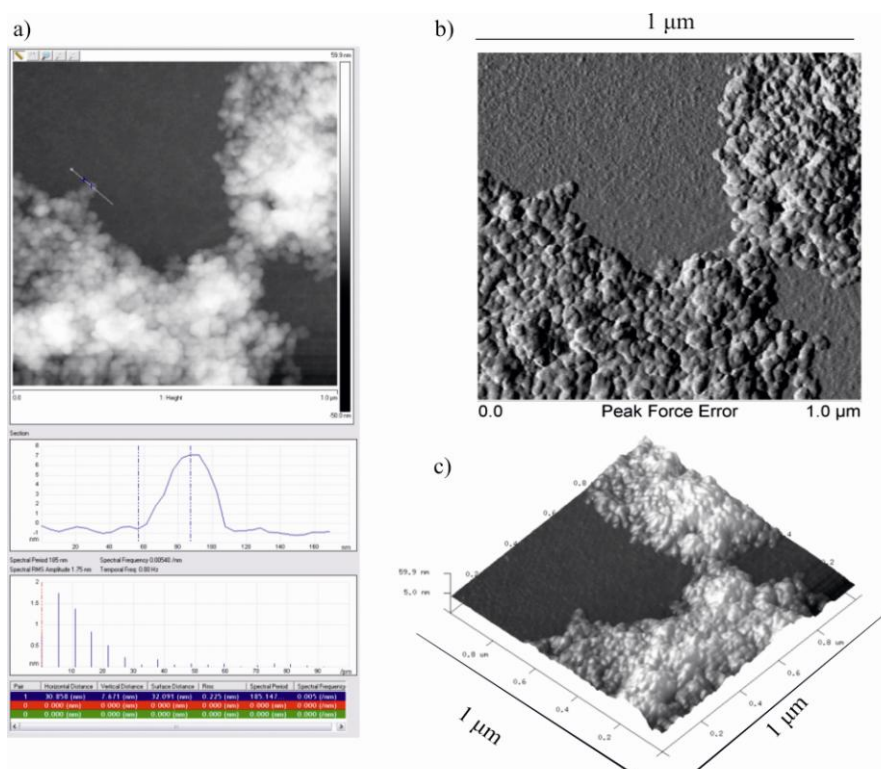
W celu scharakteryzowania otrzymanego polisacharydu przeprowadzono analizy cukrów obojętnych techniką GC-MS (ang. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), analizę metylacyjną, analizy z wykorzystaniem wodorowego magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic rezonanse*, ¹H NMR) oraz węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (¹³C NMR), analizy spektroskopowe Ramana i w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier transform infrared*, FTIR). Analizy te potwierdziły, że badany biopolimer jest glukanem zbudowanym w 98,7% z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem α -1,3-glukozydowym (Wiater i in., 2012).

III.5.3. Obrazowanie α -1,3-glukanu *A. niger* z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych

Zawiesinę α -1,3-glukanu obrazowano przy użyciu mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM), w której do uzyskania obrazu powierzchni próbki wykorzystuje się oddziaływania międzyatomowe pomiędzy sondą mikroskopu, a atomami na powierzchni próbki. AFM umożliwia uzyskanie rozdzielczości obrazu rzędu kilku nanometrów.

Zawiesinę α -1,3-glukanu w 30% DMSO naniesiono na krążki miki i suszono przez noc w eksykatorze. Próbki obrazowano przy użyciu mikroskopu sił atomowych NanoScope V (Veeco, USA) znajdującego się w Laboratorium Analitycznym Wydziału Chemii UMCS w Lublinie. Pomiarów dokonano w trybie PeakForce QNM, z użyciem sondy RTESPA. Skanowano trzy pola o wymiarach $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. Do analizy obrazów użyto oprogramowania NanoScope Analysis 1.4 (Veeco, USA).

Stwierdzono, że α -1,3-glukan, przeznaczony do podawania gąsienicom w drodze iniekcji, miał postać kulistych cząstek o średnicy ok. 7 nm ($\pm 0,5$) (Ryc. 17).



Ryc. 17. Cząstki α -1,3-glukanu *A. niger* obrazowane przy użyciu AFM. Przedstawiono obraz wysokościowy (a), topografię powierzchni (b), obraz trójwymiarowy (c) cząstek α -1,3-glukanu w zawieszynie. Dolna część panelu (a) przedstawia profil powierzchni odpowiadający białej linii na obrazie wysokościowym (opracowanie własne).

III.6. Wykorzystanie gąsienic *Galleria mellonella* jako organizmu modelowego

III.6.1. Hodowla organizmu modelowego

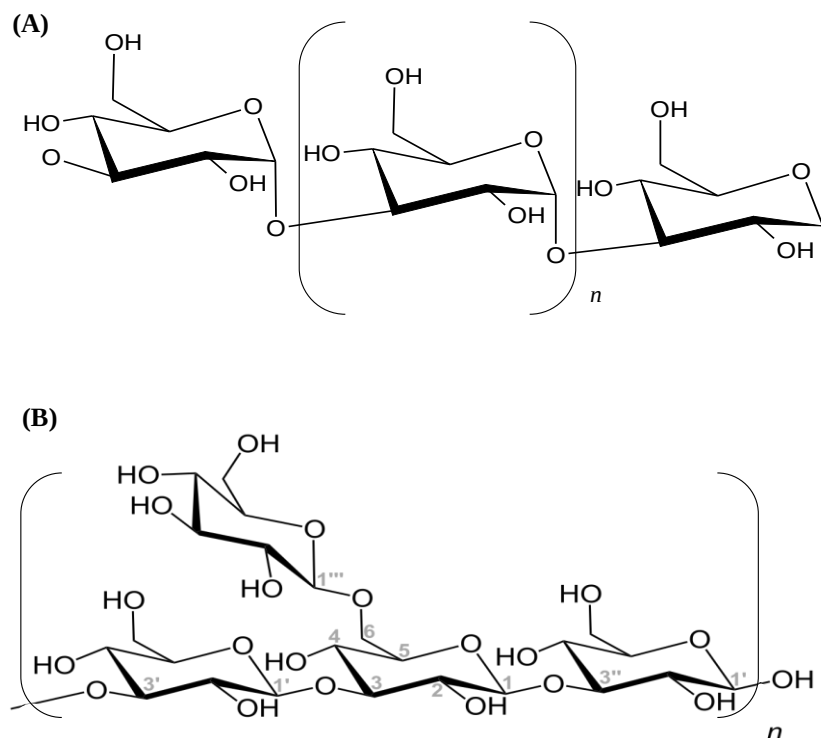
Barciaka większego *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) hodowano w temperaturze 28°C, bez dostępu światła, przy wilgotności na poziomie ok. 70%. Gąsienice karmiono woszczyną pszczelą. Do doświadczeń wykorzystywano gąsienice z ostatniego stadium wylinkowego.

III.6.2. Immunizacja gąsienic *G. mellonella*

Powierzchnię brzuszną gąsienic jałowiono wacikiem nasączonym 70% etanolem. Gąsienicom podawano 3 µl zawiesiny/roztworu określonego immunogenu w formie iniekcji do hemocelu przy użyciu strzykawki Hamiltona o pojemności 25 µl. W zależności od immunogenu, gąsienice kontrolne immunizowano taką samą objętością 30% DMSO lub wody apyrogennej. Nakłucia dokonywano w jedną z ostatniej pary posuwek. Po immunizacji gąsienice przetrzymywano w temperaturze 28°C, bez dostępu światła.

W badaniach wykorzystano immunogeny:

- α -1,3-glukan *A. niger* (Ryc. 18A) – zliofilizowany polisacharyd, otrzymany według opisu w punkcie III.5.2., zawieszano w 30% DMSO, sonikowano (wzmocnienie 4×50%, 4×275 W przez 5 minut), a następnie przygotowywano rozcieńczenia zawierające 1 µg, 5 µg, 10 µg lub 20 µg w 3 µl, które przeznaczone były do podawania gąsienicom,
- laminarynę z brunatnic *Laminaria digitata* (Ryc. 18B) – preparat komercyjny rozpuszczano w wodzie apyrogennej; gąsienicom podawano dawkę 5 µg, 10 µg lub 50 µg w 3 µl wody apyrogennej,
- zarodniki *A. niger* – gąsienicom podawano zawiesinę zarodników zawierającą 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 lub 1×10^7 zarodników w 3 µl wody apyrogennej, przygotowaną według opisu w punkcie III.4.1.



Ryc. 18. Wzory strukturalne: (A) α -1,3-glukanu oraz (B) laminaryny (rozgałęziony β -1,3/1,6-glukan) (opracowanie własne).

III.6.3. Analiza przeżywalności gąsienic *G. mellonella*

W celu oceny potencjalnego działania toksycznego α -1,3-glukanu *A. niger* na organizm owadów, określono prawdopodobieństwo ich przeżycia po podaniu 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g oraz 20 μ g α -1,3-glukanu zawieszonego w 3 μ l 30% DMSO. Ponadto, ustalono dawkę zarodników *A. niger*, która po podaniu gąsienicom, nie prowadziła do ich śmierci po 120 godzinach od immunizacji. Zastosowano dawki 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 lub 1×10^7 zarodników w 3 μ l wody apyrogennej. Owady kontrolne immunizowano, odpowiednio, 30% DMSO lub wodą apyrogeną. Obserwacje prowadzono w określonych punktach czasowych od 24 do 120 godzin po podaniu immunogenów, a zakończono w momencie śmierci badanych gąsienic bądź przeobrażenia poczwarek w imago. Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie, wykorzystując każdorazowo 30 osobników na grupę.

III.6.4. Pobieranie hemolimfy

Gąsienice schładzano przez 5 minut na szklanej szalce Petriego umieszczonej na lodzie. Powierzchnię brzuszną gąsienicy jałowiono wacikiem nasączonym 70% etanolem. Jałowym skalpelem nacinano delikatnie okolice ostatniej lub przedostatniej pary posuwek. Pipetą automatyczną pobierano 30 μ l wypływającej hemolimfy i przenoszono ją do umieszczonych w lodzie jałowych probówek typu Eppendorf, zawierających kryształki fenylotiomocznika (PTU). Zastosowanie niskiej temperatury oraz PTU miało na celu zahamowanie procesu melanizacji hemolimfy. Hemolimfę z 12 gąsienic pobierano do puli. Zawartość probówek odwirowywano przy sile odśrodkowej $200 \times g$ przez 5 minut w 4°C. Pozbawiony hemocytów supernatant przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf, po czym odwirowywano przy $20\,000 \times g$ przez 10 minut. Hemolimfę oczyszczoną z pozostałości komórkowych dzielono na porcje po 20 μ l i zamrażano w -20°C (Cytryńska i inni, 2006).

III.6.5. Pobieranie ciała tłuszczowego

Gąsienice usypiano własnym CO₂, w zlewce wypełnionej wodą. Po odkażeniu powierzchni ciała gąsienicy 70% etanolem, jałowymi nożyczkami chirurgicznymi odcinano puszkę głowową oraz koniec odwłoka. Powierzchnię brzuszną przecinano ostrożnie wzdłuż ciała, nie naruszając narządów wewnętrznych. Rozciętą gąsienicę mocowano szpilkami na płytce Petriego z podłożem silikonowym Sylgard, wypełnionej 10 ml buforu Ringer'a (bufor 2) o temperaturze 4°C. Jamę ciała larwy przemywano trzykrotnie buforem i ciało tłuszczowe pobierano pęsetą do probówki z 1 ml buforu Ringer'a. Po zebraniu całości tkanki, bufor odciągano pipetą automatyczną, a probówkę umieszczano w ciekłym azocie na 10 minut, po czym przechowywano w temperaturze -20°C.

III.6.6. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej hemolimfy

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej hemolimfy przeprowadzano metodą dyfuzji radialnej, opierając się na założeniu, że związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, dyfundując do podłoża zawierającego żywe mikroorganizmy, hamują ich wzrost.

III.6.6.1. Aktywność przeciwbakteryjna wobec *E. coli* D31

Do rozpuszczonego podłoża LB z 0,7% dodatkiem agaru dodawano nasycony roztwór PTU (1 µl/ml), w celu zahamowania procesu melanizacji. Aby zwiększyć czułość metody dodawano lizozym białka jaja kurzego (EWL) do końcowego stężenia 2 mg/ml. Zastosowanie antybiotyku - streptomycyny (0,2 µg/ml), przeciwdziałało wzrostowi niepożądanych mikroorganizmów. Po ochłodzeniu podłoża do temperatury ok. 40°C dodawano 24-godzinnej hodowli bakterii *E. coli* D31 (1 µl/ml). Podłoże z bakteriami wylewano po 10 ml na jałowe plastikowe płytki Petriego. Po zastygnięciu podłoża wycinano dołki o średnicy 2,9 mm.

Do dołków nanoszono po 4 µl czterokrotnie rozcieńczonej hemolimfy (rozdział III.6.4). Po 24 - godzinnej inkubacji mierzono suwmiarką strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* D31 pojawiające się wokół dołków z naniesioną hemolimfą. Aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy określano przy użyciu algorytmu Hultmarka, który pozwala wyrazić wielkość stref zahamowania wzrostu bakterii jako aktywność przeciwbakteryjną określonego stężenia cekropiny B (Hultmark i inni, 1982). Do opracowania wyników wykorzystano krzywą kalibracyjną sporządzoną na podstawie wielkości średnic stref zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* D31 wokół dołków z naniesionymi wzorcowymi stężeniami cekropiny B (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011).

III.6.6.2. Aktywność przeciwgrzybowa hemolimfy wobec *A. niger*

Do rozpuszczonej i schłodzonej do około 40°C pożywki PDA z 0,7% dodatkiem agaru dodano zawiesinę zarodników *A. niger* (2×10^5 /ml). Na jałowe płytki Petriego wylewano po 8 ml podłoża. Po zastygnięciu podłoża wycinano jałowym korkoborem dołki o średnicy 2,9 mm, do których nanoszono po 4 µl hemolimfy (rozdział III.6.4). Strefy przejaśnienia obserwowane wokół dołków po 24-godzinnej inkubacji w 28°C świadczyły o zahamowaniu wzrostu *A. niger*. Pomiaru średnicy stref dokonywano za pomocą suwmiarki. Aktywność przeciwgrzybową hemolimfy określano jako ekwiwalent aktywności przeciwgrzybowej amfoterycyny B. Do opracowania wyników użyto krzywej kalibracyjnej sporządzonej na podstawie wielkości średnic stref zahamowania wzrostu *A. niger* wokół dołków z naniesionymi wzorcowymi stężeniami amfoterycyny B (Mak i in., 2010).

III.6.7. Bioautografia

Bioautografia pozwala na wykrycie aktywności przeciwdrobnoustrojowej białek i peptydów rozdzielonych uprzednio w żelu poliakrylamidowym. Pierwszym etapem jest rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE białek i peptydów zawartych w badanym preparacie. Po zakończonej elektroforezie usuwany jest z żelu czynnik denaturujący, co umożliwia renaturację białek. Przejawem aktywności przeciwbakteryjnej rozdzielonych cząsteczek są strefy zahamowania wzrostu bakterii obserwowane w miejscach, gdzie na żelu lokalizowały się poszczególne białka i peptydy.

Próbki zawierające 150 µg białka hemolimfy przygotowywano w odpowiednio rozcieńczonym buforze próbkowym (bufor 6). Jako peptyd kontrolny wykorzystywano cekropinę B (1 µg). Próbek nie poddawano ogrzewaniu. Przeprowadzano rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE z wykorzystaniem żeli z 13,8% zawartością akrylamidu (rozdział III.6.13) w obecności buforu elektrodowego (bufor 7), przy napięciu 100 V. Rozdział przerywano zanim czoło migracji białek osiągnęło koniec żelu separującego.

Żel po rozdziale elektroforetycznym płukano dwukrotnie w 2,5% Triton X-100 (Bio-Rad, USA) przez 20 minut, w celu usunięcia czynnika denaturującego, a potem dwukrotnie w 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Następnie żel przemywano płynnym podłożem LB przez 15 minut. W końcowym etapie żel nawarstwiano upłynnionym podłożem LB z 0,7% agarem z dodatkiem EWL (2 mg/ml), streptomycyny (0,14 mg/ml) oraz 24-godziną hodowlą *E. coli* D31 (1 µl/ml podłoża) (Cytryńska i inni, 2001).

Po zastygnięciu podłoża zawierającego żywe bakterie, całość inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Po tym czasie w podłożu obserwowano strefy przejaśnienia, świadczące o zahamowaniu wzrostu bakterii. Lokalizacja stref odpowiadała umiejscowieniu peptydów odpornościowych w żelu.

III.6.8. Oznaczanie aktywności typu lizozymu w hemolimfie

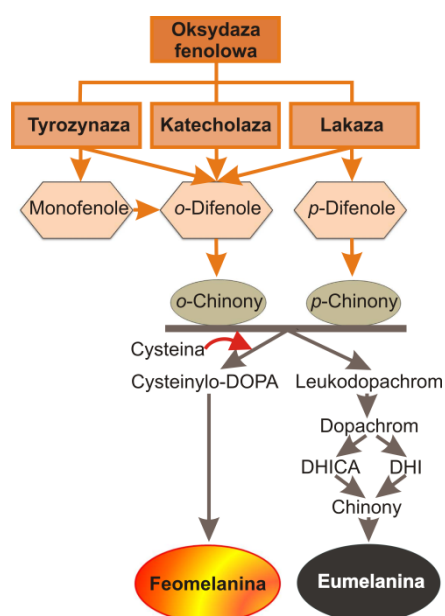
Do oceny aktywności typu lizozymu w hemolimfie wykorzystano metodę dyfuzji radialnej na płytkach z podłożem zawierającym liofilizat bakterii Gram-dodatnich *Micrococcus lysodeikticus*. Stanowią one bogate źródło peptydoglikanu, będącego substratem dla lizozymu.

Do gorącego buforu Sörensena pH 6,4 (bufor 3) z 1% dodatkiem agarozы, dodawano liofilizat *M. lysodeikticus* (0,75 mg/ml). Po ochłodzeniu podłoża do 70°C dodawano streptomycynę (0,07 mg/ml). Podłoże mieszano, po czym wylewano po 10 ml na jałowe plastikowe płytki Petriego. W zestalonym podłożu wycinano dolki o

średnicy 2,9 mm, do których наносzono po 4 μ l rozcieńczonej czterokrotnie hemolimfy. Płytki inkubowano 24 godziny w temperaturze 28°C. Strefy przejaśnienia wokół dołków mierzono suwmiarką. Aktywność lizozymu w hemolimfie określano jako ekwiwalent aktywności EWL. Do opracowania wyników użyto krzywej kalibracyjnej sporządzonej na podstawie wielkości średnic stref rozkładu peptydoglikanu *M. lysodeikticus* wokół dołków z naniesionymi wzorcowymi stężeniami EWL (Jarosz, 1995).

III.6.9. Oznaczanie aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie

Aktywność oksydazy fenolowej prowadzi do powstania melaniny (Ryc. 19). W obecności jonów wapnia enzym ten utlenia substrat, dihydroksyfenyloalaninę (L-DOPA), do Dopachinonu, będącego prekursorem melaniny. Powstawanie brązowo-czarnego barwnika można ocenić spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 490$ nm.



Ryc. 19. Rola oksydazy fenolowej w melanogenezie (Stączek i inni, 2017).

Oznaczanie aktywności przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych. Do 2 μ l rozcieńczonej 10-krotnie hemolimfy (rozdział III.6.4) dodawano 18 μ l buforu A (bufor 4). Mieszaninę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 180 μ l 2 mM roztworu DOPA w buforze B (bufor 5). Płytkę umieszczano w spektrofotometrze (BenchmarkPlus, Bio-Rad, USA), zawartość dołków intensywnie

mieszano przez 15 sekund, po czym mierzono absorbancję przez 90 minut, w odstępach 5-minutowych, przy długości fali $\lambda = 490$ nm.

III.6.10. Oznaczanie stężenia białka

W celu określenia stężenia białka wykorzystano zdolność barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 do tworzenia barwnych kompleksów z białkiem. Utworzenie kompleksów, manifestujące się zmianą barwy z brunatnej na niebieską, prowadzi do przesunięcia maksimum absorpcji barwnika z $\lambda = 465$ nm do $\lambda = 595$ nm. Oznaczenie polega na spektrofotometrycznym pomiarze absorbancji próby badanej i kontrolnej, przy długości fali $\lambda = 595$ nm. Wartość stężenia białka określa się na podstawie wyznaczonej krzywej wzorcowej dla danych stężeń białka wzorcowego (Bradford, 1976).

Do 1 ml pięciokrotnie rozcieńczonego odczynnika Bradford dodawano 20 μ l odpowiednio rozcieńczonego roztworu hemolimfy, lizatu ciała tłuszczowego lub ekstraktów metanolowych hemolimfy. Do próby kontrolnej dodawano 20 μ l wody lub odpowiedniego buforu. Mieszaniny inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy $\lambda=595$ nm. Stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej dla różnych stężeń albuminy surowicy bydlęcej (BSA). Oznaczenia stężenia białka dla każdej z prób badanych dokonywano w trzech powtórzeniach.

III.6.11. Ekstrakcja peptydów odpornościowych z hemolimfy

Pozbawioną hemocytów hemolimfę (rozdział III.6.4) mieszano w proporcji 1 : 9 (v:v) ze schłodzoną mieszaniną ekstrakcyjną zawierającą metanol, wodę i kwas octowy w stosunku 90 : 9 : 1 (v:v:v). Po odwirowaniu ($20\,000 \times g$, 30 minut, 4°C), supernatant zawierający białka o masach poniżej 30 kDa oraz peptydy, przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf i liofilizowano (liofilizator Beta 108 LD plus, Christ, Niemcy) (Cytryńska i inni, 2007).

III.6.12. Odtłuszczanie metanolowych ekstraktów hemolimfy

Zliofilizowany ekstrakt hemolimfy (rozdział III.6.11) rozpuszczano w 0,1% wodnym roztworze kwasu trifluorooctowego (TFA), w objętości odpowiadającej 2/3 wyjściowej objętości hemolimfy. Z ekstraktu usuwano następnie lipidy stosując rozpuszczalniki organiczne. W pierwszym etapie ekstrakt mieszano z *n*-heksanem (1 : 1; v:v), po czym odwirowywano ($20\,000 \times g$, 15 minut, 4°C). Po odwirowaniu usuwano

górną warstwę zawierającą lipidy. W drugim etapie do warstwy dolnej dodawano objętość octanu etylu równą objętości dodanego uprzednio *n*-heksanu. Po wymieszaniu odwirowywano ($20\,000 \times g$, 15 minut, 4°C) i usuwano górną warstwę. Dolną warstwę przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf, zamrażano w -80°C i liofilizowano (Cytryńska i inni, 2007).

III.6.13. Elektroforeza Tris-glicyna SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Rozdziały elektroforetyczne białek przeprowadzano przy użyciu zestawu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA), z wykorzystaniem żeli poliakrylamidowych: 13,8% żelu separującego oraz 6% żelu zagęszczającego, przygotowanych według przepisu uwzględniającego zawartość procentową poszczególnych składników (Tab. 1). Przygotowany żel separujący wylewano pomiędzy odtłuszczone acetonem płytki szklane na wysokość ok. 6 cm, po czym nawarstwiano 200 µl wody dejonizowanej. Po spolimeryzowaniu żelu separującego, wodę usuwano, a na żel wylewano żel zagęszczający i umieszczano w nim plastikowy grzebień, który umożliwiał utworzenie studzienek w polimeryzującym żelu. Przygotowany żel pozostawiano na 24 godziny w 4°C.

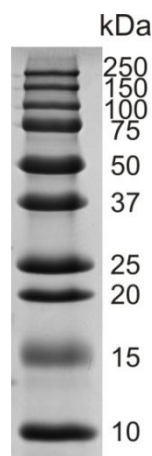
Tab. 1. Skład żeli do elektroforezy Tris-glicyna SDS-PAGE (opracowanie własne).

Żel separujący	Stężenie końcowe (%)	Żel zagęszczający	Stężenie końcowe (%)
akrylamid	13,8	akrylamid	6
bisakrylamid	0,37	bisakrylamid	0,16
0,38 M Tris-HCl pH 8,8	-	0,13 M Tris-HCl pH 6,8	-
SDS	0,1	SDS	0,1
AMPS	0,1	AMPS	0,1
TEMED	0,1	TEMED	0,1

Próbki białek przeznaczone do rozdziału przygotowywano w odpowiednio rozcieńczonym buforze próbkowym (bufor 6). W zależności od potrzeb doświadczenia

zawierały one 15 µg lub 3 µg białka, odpowiednio, na żel przeznaczony do barwienia lub do transferu na membranę (rozdział III.6.16). Przygotowane próbki ogrzewano w temperaturze 98°C przez 10 minut w celu denaturacji białek. Dodatkowo na żel nakładano białkowe markery mas cząsteczkowych (Ryc. 20).

Komorę aparatu do elektroforezy wypełniano buforem elektrodowym (bufor 7). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100 V przez 10 minut, a następnie 120 V, do momentu osiągnięcia przez czoło migracji białek końca żelu separującego.



Ryc. 20. Obraz elektroforetyczny SDS-PAGE markerowych białek rekombinowanych (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, Bio-Rad) w 13,8% żelu poliakrylamidowym (opracowanie własne).

Po rozdzieleniu białka w żelach barwiono przez 25 minut w 0,1% roztworze barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250 w 50% metanolu i 10% kwasie octowym. Płukanie żeli w 10% kwasie octowym pozwalało usunąć barwnik z tła, uwidaczniając tym samym prążki białkowe (Fazekas i inni, 1963).

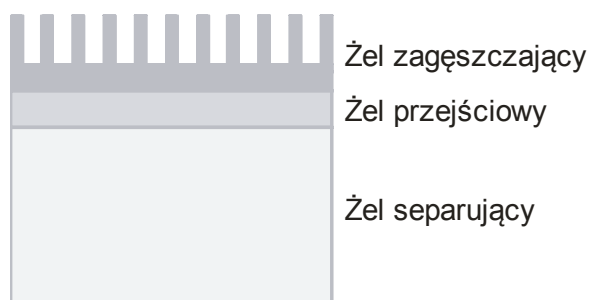
III.6.14. Elektroforeza Tris - trycyna SDS-PAGE

Tris-trycyna SDS-PAGE to metoda elektroforetyczna pozwalająca na skuteczny rozdział w żelu poliakrylamidowym polipeptydów i peptydów o masach 5 - 20 kDa (Schägger i von Jagow, 1987). Żele do rozdzielania elektroforetycznego Tris-trycyna SDS-PAGE przygotowano według przepisu umieszczonego w Tabeli 2.

Przygotowane roztwory wylewano kolejno pomiędzy szklane szybki według schematu przedstawionego na Ryc. 21. Warstwy żelu separującego i przejściowego nawarstwiono 200 µl wody dejonizowanej, którą usuwano po spolimeryzowaniu żelu.

Tab. 2. Skład procentowy żeli do elektroforezy Tris-trycyna SDS-PAGE
(opracowanie własne).

Żel separujący	Stężenie końcowe (%)	Żel przejściowy	Stężenie końcowe (%)	Żel zagęszczający	Stężenie końcowe (%)
akrylamid	16	akrylamid	9,5	akrylamid	3,8
bisakrylamid	0,5	bisakrylamid	0,3	bisakrylamid	0,12
bufor żelowy „gel buffer” (bufor 14)	33,3	bufor żelowy „gel buffer” (bufor 14)	33,3	bufor żelowy „gel buffer” (bufor 14)	24,8
Glicerol	10,7	AMPS	0,03	AMPS	0,08
AMPS	0,03	TEMED	0,04	TEMED	0,08
TEMED	0,03				



Ryc. 21. Schemat przygotowania żelu do elektroforezy Tris-trycyna SDS-PAGE
(opracowanie własne).

Metodą tą analizowano profil peptydów i białek w ekstraktach metanolowych otrzymanych z 5 μ l hemolimfy *G. mellonella*, które po liofilizacji zawieszano w 20 μ l buforu próbkowego (bufor 11). Równolegle z próbkami badanymi, na żel наносono markery mas cząsteczkowych (Ryc. 22).

Elektroforezę prowadzono w obecności buforu katodowego (bufor 12) oraz anodowego (bufor 13) przy napięciu 30 V przez pierwszą godzinę, a następnie 90 V, do momentu osiągnięcia przez czoło migracji białek końca żelu separującego. Po zakończonej elektroforezie żele utrwalano przez 30 minut w roztworze 50% metanolu i 10% kwasu octowego, a następnie barwiono przez 1 godzinę w 0,025% roztworze

barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 w 10% kwasie octowym. W celu uwidocznienia prążków białkowych i peptydowych żele odbarwiano 10% kwasem octowym przez 30 minut, a następnie wodą dejonizowaną.



Ryc. 22. Obraz elektroforetyczny Tris-trycyna SDS-PAGE białek markerowych (*Polypeptide SDS-PAGE, Molecular Weight Standards, Bio-Rad*) (opracowanie własne).

III.6.15. Elektroforeza dwukierunkowa

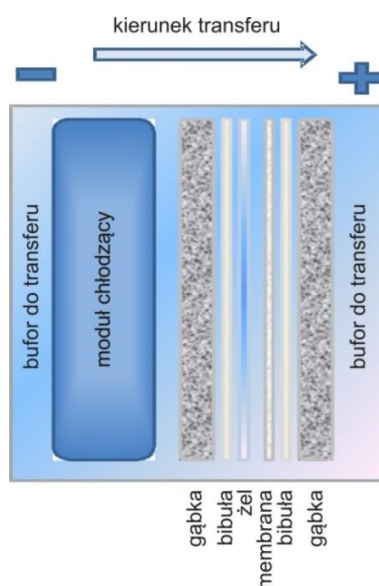
Elektroforeza dwukierunkowa (ang. *Two-dimensional SDS-PAGE*; 2D IEF/SDS-PAGE) to metoda analizy białek, w której rozdział badanej mieszaniny odbywa się dwuetapowo. Białka rozdzielane są najpierw według ich punktu izoelektrycznego, po którym następuje rozdział względem masy cząsteczkowej, z wykorzystaniem metody SDS-PAGE.

Izoelektroogniskowanie prowadzono z użyciem komercyjnie dostępnych żelowych pasków o gradiencie pH 3 - 10 w aparacie Protean IEF (Bio-Rad, USA). Do próbek zawierających 200 µg białka dodawano 250 µl buforu do rehydratacji (bufor 15). Rynienkę tacki hydratacyjnej wypełniano przygotowaną próbką, na którą nakładano pasek z żelem skierowanym ku dołowi. Całość nawarstwiano 1 ml oleju mineralnego. Rehydratację żelu prowadzono po wybraniu parametrów: aktywna, 20°C, 12 h, a ogniskowanie izoelektryczne z zastosowaniem szybkiego wzrostu napięcia, w czterech krokach: 250 V przez 15 minut, 4 000 V przez 2 godziny, do osiągnięcia 10 000 Vh, po czym końcowo utrzymywano napięcie 500 V. Po zakończeniu rozdziału usuwano olej mineralny, a pasek umieszczano w rynience tacki rehydratacyjnej żelem skierowanym ku górze i inkubowano w buforach do równoważenia I i II po 15 minut (bufory 16 i 17). Tak przygotowany pasek umieszczano na powierzchni żelu

poliakrylamidowego 13,8% (rozdział III.6.13), nakładano białka markerowe (Ryc. 20) i prowadzono rozdział w drugim kierunku przy napięciu 100 V przez 10 minut, a następnie 120 V z wykorzystaniem zestawu Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, USA). Po zakończeniu rozdziału białka w żelu barwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250 (rozdział III.6.13) (Zdybicka i Cytryńska, 2011).

III.6.16. Elektrotransfer mokry białek z żelu na membranę

Transfer białek z żelu na membranę przeprowadzano z użyciem zestawu Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad, USA). Żel po elektroforezie umieszczano na 5 minut w buforze do transferu 1 (bufor 8). W plastikowych kasetach układano kolejno warstwy: gąbka, bibuła Whatman, żel, membrana z polifluorku winylidenu (PVDF) zwilżona w metanolu, bibuła Whatman, gąbka (Ryc. 23). Każdą warstwę zwilżano buforem do transferu 1 (bufor 8). Zamkniętą kasetę umieszczano w komorze z elektrodami. Złożony zestaw przekładano do pojemnika wypełnionego buforem do transferu. Transfer prowadzono przy stałym natężeniu prądu 350 mA przez 90 minut. Po zakończonym transferze membranę pozostawiano do wyschnięcia.

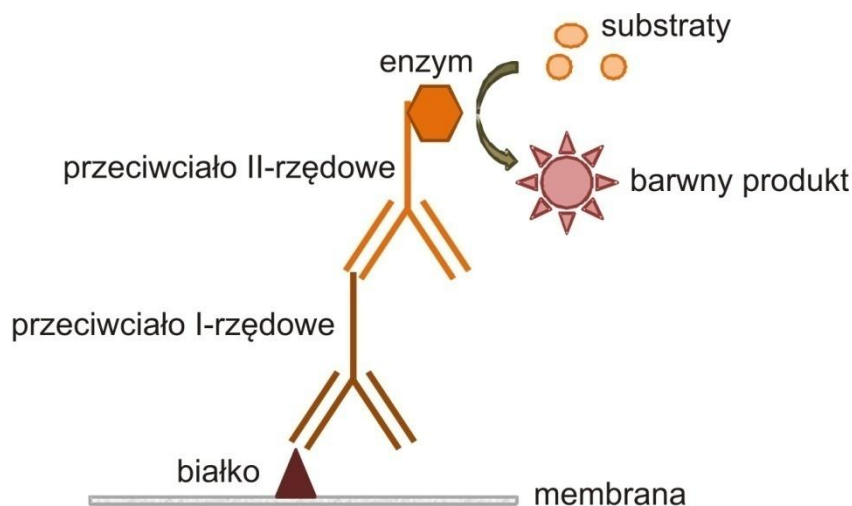


Ryc. 23. Zestaw do elektrotransferu białek z żelu na membranę (opracowanie własne).

III.6.17. Immunodetekcja białek na membranie

Białka po rozdziale elektroforetycznym, przeniesione z żelu na membranę, uwiadczniano z wykorzystaniem technik immunoenzymatycznych. Użyte przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznawały specyficznie poszukiwane białko. Dzięki zastosowaniu

przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z enzymem - fosfatazą alkaliczną, obserwowano pojawienie się barwnego produktu w miejscu odpowiadającym lokalizacji białka na membranie (Ryc. 24).



Ryc. 24. Zasada wykrywania białek na membranie z użyciem przeciwciał (opracowanie własne).

Membranę przeznaczoną do immunoblottingu zwilżano w metanolu, po czym inkubowano przez 1 godzinę w buforze TBS (bufor 9) z 5% dodatkiem odtłuszczonego mleka, w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania się przeciwciał. Membranę inkubowano następnie przez 1 godzinę z króliczymi przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi przeciwko apolipoforynie III *G. mellonella* (1 : 2500) zawieszonymi w TBS z 5% dodatkiem mleka odtłuszczonego. Po tym czasie membranę płukano trzykrotnie po 10 minut w TBS z 1% Triton X-100. Membranę inkubowano przez 1 godzinę z przeciwciałami II-rzędowymi, kozimi anty-króliczymi, sprzęgniętymi z fosfatazą alkaliczną, przygotowanymi w TBS z 5% mlekiem odtłuszczonym (1 : 30000). Następnie membranę płukano dwukrotnie w buforze TBS przez 10 minut oraz kolejne 10 minut w buforze AP (bufor 10). Przy użyciu mieszaniny wywołującej, zawierającej substraty dla fosfatazy alkalicznej: NBT (0,9 mg/ml w 70% roztworze wodnym DMF) oraz BCIP (4,5 mg/ml w DMF) w buforze AP, uwidacziano białka na membranie. Membranę suszono przez 24 godziny. Obrazy uzyskane na membranach dokumentowano przy użyciu systemu dokumentacji ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad, USA). Analizę densytometryczną prążków białkowych przeprowadzano wykorzystując program Image Lab Software (Bio-Rad, USA).

III.6.18. Identyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie *G. mellonella*

Z każdej z 30 gąsienic przypadających na badaną grupę, pobrano do puli po 30 μ l hemolimfy (rozdział III.6.4). Z jednakowych objętości hemolimfy przygotowano odtłuszczone ekstrakty metanolowe (rozdziały III.6.11, III.6.12).

Rozdziały chromatograficzne, a następnie identyfikację peptydów i białek wykonał dr hab. Paweł Mak (Zakład Biochemii Analitycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie).

Zliofilizowane odtłuszczone ekstrakty metanolowe hemolimfy (rozdziały III.6.11, III.6.12) rozpuszczono w 0,1% kwasie trifluorooctowym (TFA). Rozdziały peptydów i białek obecnych w badanych preparatach przeprowadzono z użyciem systemu Dionex P680 HPLC (Dionex, USA) i kolumny Discovery Bio Wide Pore C18 4,6 mm $\times$ 250 mm (Sigma-Aldrich, USA), stosując jako solwent A 0.1% TFA, a jako solwent B 0.07% TFA : 80% acetonitryl (v:v). Umieszczenie pików na chromatogramie pozwoliło na wstępną identyfikację, a ocena ich wysokości umożliwiła analizę ilościową peptydów i białek przeciwdrobnoustrojowych. W celu potwierdzenia identyfikacji, sekwencjonowano pięć reszt aminokwasowych od N-końca (degradacja Edmana) przy użyciu automatycznego sekwenatora Procise 491 (Applied Biosystems, USA), po uprzednim rozdzieleniu peptydów i białek w żelu metodą Tris-trycyna SDS-PAGE i transferze ich na membranę PVDF (Cytryńska i in., 2007; Mak i in., 2010).

III.6.19. Identyfikacja białek hemolimfy *G. mellonella* wiążących się do α -1,3-glukanu *A. niger*

W celu określania, które białka hemolimfy gąsienic *G. mellonella* mają zdolność wiązania się do α -1,3-glukanu, zawiesinę polisacharydu inkubowano z hemolimfą pobraną od nieimmunizowanych gąsienic. W każdej z 75 probówek typu Eppendorf wymieszano, w stosunku 3 : 2 (v:v), zawiesinę zawierającą 100 μ g α -1,3-glukanu w 30% DMSO, z 300 μ g białek hemolimfy. Mieszaninę inkubowano przez 30 minut w 4°C, umożliwiając związanie się białek hemolimfy do α -1,3-glukanu. Zawartość probówek odwirowano przy sile odśrodkowej $10\,000 \times g$ przez 5 minut. Osad z kolejnych dwóch probówek zawieszano w 80 μ l 1% Triton X-100, redukując tym samym ilość probówek o połowę. Po 5 minutach inkubacji mającej na celu usunięcie niespecyficznie związanych białek, osad odwirowano ($10\,000 \times g$, 5 minut) oraz

płukano trzykrotnie w 200 µl buforu PBS (bufor 18). Każdorazowo redukowano liczbę próbek o połowę i odwirowywano w warunkach jak podano wyżej. Każdy z osadów, znajdujących się końcowo w trzech próbkach, zawieszano w odpowiednio rozcieńczonym buforze próbkowym (bufor 6).

Próbki ogrzewano w 98°C przez 8 minut, ochładzano do temperatury pokojowej i wirowano przy sile odśrodkowej $20\,000 \times g$ przez 15 minut. Supernatanty łączono i filtrowano z użyciem próbek wirówkowych z membraną PVDF o średnicy porów 0,45 µm ($12\,000 \times g$, 4 minuty). Następnie próbki ogrzewano w temperaturze 98°C do momentu zredukowania objętości do 20 µl i poddawano rozdzielni elektroforetycznemu SDS-PAGE w 13,8% żelu poliakrylamidowym (rozdział III.6.13). Po zakończonym rozdziale, żełe umieszczano w buforze do transferu 2 (bufor 19) i przeprowadzano transfer białek z żelu na membranę PVDF do sekwencjonowania, zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale III.6.16. Membrany po transferze płukano wodą, metanolem i barwiono w 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w 40% metanolu i 10% kwasie octowym) przez 1 minutę. Membrany odbarwiano w 50% metanolu do momentu usunięcia niebieskiej barwy tła, po czym przemywano wodą dejonizowaną i suszono.

Do identyfikacji białek *G. mellonella* wiążących się do α -1,3-glukanu *A. niger* wykorzystano sekwencjonowanie od N-końca metodą degradacji Edmana oraz spektrometrię mas. Identyfikację przeprowadzono dzięki uprzejmości dr hab. Pawła Maka (Zakład Biochemii Analitycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie) oraz dr hab. Piotra Sudera (Katedra Biochemii i Neurobiologii, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie).

Sekwencjonowanie białek metodą degradacji Edmana prowadzono przy użyciu automatycznego sekwenatora Procise 491 (Applied Biosystems, USA), po uprzednim wycięciu wybarwionych prążków białkowych z membrany, a uzyskane sekwencje porównywano do sekwencji peptydów i białek znajdujących się w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI) *Galleria mellonella* Annotation Release 100 (Software version 8.1).

Do identyfikacji białek metodą spektrometrii mas prążki białkowe wycięte z żeli barwionych Coomassie Brilliant Blue odbarwiano przez wielokrotne przemywanie, kolejno: 50 mM NH_4HCO_3 (pH 7,5) i acetonitrylem (ACN). W zależności od intensywności wybarwienia prążków, procedurę powtarzano co najmniej 2-3-krotnie, w końcowym etapie pozostawiając w ACN do całkowitego odwodnienia. Redukcję

wiązań dwusiarczkowych przeprowadzono stosując 50 mM ditiotritol (DTT) w 50 mM NH_4HCO_3 , a proces redukcji/alkilowania stosując jodoacetamid do końcowego stężenia 5 mM. Odwodnione w ACN i wysuszone kawałki żelu inkubowano w 15 μl roztworu trypsyny (Promega, 10 ng/ μl w 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0) przez 15 minut, a następnie dodawano 50 μl 25 mM NH_4HCO_3 , aby całkowicie pokryć fragmenty żelu. Trawienie prowadzono przez noc w 37°C. W celu ekstrakcji peptydów supernatant przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf, a fragmenty żelu pokrywano roztworem ekstrakcyjnym (kwas mrówkowy : 50 mM NH_4HCO_3 : ACN, 5:45:50, v:v:v) i inkubowano 5 minut w 37°C z wytrząsaniem. Końcowy preparat liofilizowano i zawieszano w 25 μl roztworu kwas mrówkowy : ACN : woda (0,1:2:97,9; v:v:v). Peptydy analizowano za pomocą spektrometru mas AmaZon SL (Bruker Daltonics, Niemcy) połączonego z systemem nanoHPLC UltiMate 3000 RS LCnanoSystem (Dionex, USA). Peptydy wstrzyknięto na kolumnę wstępną C18 (Acclaim PepMap Nano Trap Column, 3 μm , 100 Å, 2 cm $\times$ 75 μm , Thermo), a następnie rozdzielano przez 45 min na kolumnie RP 15 cm $\times$ 75 μm (Acclaim PepMap 75 μm , 100 Å Nano Series TM Column, C18, Thermo) z zastosowaniem gradientu 5-50% ACN z 0,1% kwasem mrówkowym (v:v). Spektrometr mas pracował w trybie standardowej akwizycji danych (DDA; Data Dependent Acquisition) z fragmentacją dwóch najbardziej intensywnych jonów prekursorowych. Format Mascot Generic (.mgf) wygenerowano przez wstępne przetworzenie surowych danych za pomocą oprogramowania Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Niemcy) i przeszukano za pomocą wewnętrznego serwera Mascot (v.2.3.0, Matrix Science) wobec bazy danych białek NCBI z ograniczeniem taksonomicznym "Eukaryota". Parametry wyszukiwania: specyficzność enzymu - trypsyna; brakujące rozszczepienia - 1; stała modyfikacja - karbamidometylacja (C); zmienne modyfikacje - utlenianie (M), tolerancja masy peptydu - $\pm 1,2$ Da; tolerancja masy fragmentów - $\pm 0,6$ Da, $^{13}\text{C} = 1$, ładunek peptydu: +2, +3 i +4, instrument: ESI-TRAP.

III.6.20. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach gąsienic *G. mellonella*

Lokalizację apolipoforyny III (apoLp-III) badano w hemocytach gąsienic nieimmunizowanych oraz immunizowanych α -1,3-glukanem *A. niger* (w dawce 5 μg w 3 μl 30% DMSO) lub zarodnikami *A. niger* (1×10^5 w 3 μl wody apyrogennej). Hemocyty otrzymywano po 0,25 - 24 godzinach od podania immunogenów jak opisano

poniżej. Eksperyment przeprowadzono na co najmniej 8 osobnikach w każdej badanej grupie. Rozmieszczenie apoLp-III w hemocytach analizowano metodą immunocytochemiczną z wykorzystaniem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko apolipoporynie III *G. mellonella* oraz drugorzędowych znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) (Stączek i inni, 2018).

Po schłodzeniu gąsienicy przez 5 minut na szalce umieszczonej na lodzie, powierzchnię brzuszną odkażano 70% etanolem. Jałowym skalpelem nacinano powłoki ciała gąsienicy w okolicy ostatniej lub przedostatniej pary posuwek. Wypływającą hemolimfę (20 μ l) pobierano pipetą automatyczną i przenoszono do umieszczonej w lodzie probówki typu Eppendorf, zawierającej 80 μ l buforu IPS (bufor 1) z 0,2% dodatkiem nasyconego roztworu PTU. Po 10 μ l tak uzyskanej zawiesiny hemocytów przenoszono, natychmiast po pobraniu, do ośmiu dołków 8-dołkowego szkiełka (Nunc, USA). Do dołków dodawano 25 μ l tego samego buforu. Hemocyty inkubowano w wilgotnej komorze przez 30 minut w 28°C. Po inkubacji, niezbędnej do przyklejenia się hemocytów do szklanej powierzchni, dołki przemywano buforem IPS. Hemocyty przyklejone do szkiełka utrwalano w 30 μ l 3,7% roztworu paraformaldehydu w buforze TBS (bufor 9) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dołki płukano trzykrotnie buforem TBS. W celu oceny lokalizacji apoLp-III wewnątrz hemocytów przeprowadzono łagodną perforację błon komórkowych, przy użyciu detergentu, 0,2% roztworu Triton X-100, przez 7 minut, umożliwiając tym samym penetrację przeciwciał do wnętrza hemocytów (4 dołki z ośmiu). Równocześnie prowadzono doświadczenie bez użycia detergentu, zastępując go buforem TBS (4 dołki z ośmiu). Po określonym czasie dołki trzykrotnie przepłukano buforem TBS, po czym miejsca niespecyficznego wiązania się przeciwciał blokowano 5% roztworem BSA w buforze TBS przez 1 godzinę. Hemocyty inkubowano następnie 18 godzin z króliczymi przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko apolipoporynie III (końcowe stężenie 0,01 mg/ml), na kołysce, w 4°C. Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał buforem TBS, hemocyty inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi, kozimi, anty-króliczymi, znakowanymi FITC rozcieńczonymi 200-krotnie w TBS, na kołysce, w temperaturze pokojowej, przez 2 godziny. Po odpłukaniu przeciwciał buforem TBS, jądra komórkowe hemocytów barwiono barwnikiem Hoechst 32258 (20 μ g/ml) przez 2 minuty. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzano przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 495$ nm i długości fali emisji $\lambda = 517$ nm, z wykorzystaniem laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Niemcy) znajdującego się w

Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie. Fotografowano po 15 pól przedstawiających obrazy hemocytów każdego osobnika.

III.6.21. Analiza ekspresji genów wybranych peptydów w ciele tłuszczowym *G. mellonella*

Analizę ekspresji genów wykonano we współpracy z dr hab. Iwoną Wojdą, prof. UMCS (Zakład Immunobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS w Lublinie).

III.6.21.1. Izolacja RNA z ciała tłuszczowego *G. mellonella*

W celu izolacji całkowitego RNA z ciała tłuszczowego *G. mellonella* wykorzystano zestaw odczynników *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, USA) i postępowano według protokołu producenta.

Ciało tłuszczowe, pobrane zgodnie z opisem w punkcie III.6.5. dezintegrowano przy użyciu homogenizatora elektrycznego w obecności buforu lizującego, a następnie wirowano w probówkach z kolumienkami ($20\,000 \times g$, 2 minuty), w celu oczyszczenia preparatu z resztek komórkowych i DNA. Przesącz mieszało z równą objętością 70% etanolu, nakładano na kolumnkę wiążącą RNA i wirowano ($20\,000 \times g$, 20 sekund). Związane na kolumnie RNA przemywano trzykrotnie buforami płuczającymi. W celu elucji RNA, kolumnę przemywano buforem wypłukującym i wirowano ($20\,000 \times g$, 1 minuta). Przesącz zawierający RNA oczyszczano z możliwych pozostałości DNA przy użyciu zestawu *Turbo DNA-free* (Thermo Fisher Scientific, USA). Postępowano według protokołu producenta. Próbkę inkubowano z rekombinowaną DNazą I przez 30 minut w 37°C. Reakcję zatrzymywano inkubując mieszaninę z inhibitorem enzymu związanym z mikrogranulkami (5 minut, temperatura pokojowa). Próbkę odwirowywano dwukrotnie ($20\,000 \times g$, 1,5 minuty) celem oddzielenia mikrogranulek. W supernatancie, zawierającym oczyszczone RNA, oznaczano spektrofotometrycznie stężenie RNA. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Czystość preparatów RNA określano na podstawie stosunku pomiaru absorbancji przy dwóch długościach fali $\lambda = 260$ i $\lambda = 280$ nm (Wojda i Taszłow, 2013).

III.6.21.2. Odwrotna transkrypcja

Proces odwrotnej transkrypcji przeprowadzano z użyciem zestawu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Thermo Fisher

Scientific, USA) według protokołu producenta. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą 1 µg RNA, bufor, deoksyrybonukleotydy (dNTP), startery (ang. *Random Primers*), odwrotną transkryptazę oraz inhibitor RNaz. Poszczególne etapy reakcji prowadzone były w następujących warunkach: aktywacja odwrotnej transkryptazy – przez 10 minut w 25°C, synteza cDNA przez 120 minut w 37°C, inaktywacja odwrotnej transkryptazy – przez 5 minut w 85°C, po czym proces wstrzymywano (4°C). Do czasu reakcji PCR, cDNA przechowywano w -20°C.

III.6.21.3. Analiza Real-Time qPCR

Real-Time qPCR to ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA, umożliwiająca monitorowanie ilości produktu w czasie rzeczywistym. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem systemu StepOnePlusTM Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). Reakcję qPCR prowadzono z użyciem mieszaniny *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA) oraz par starterów dla odpowiednich genów (Tab. 3) (stężenie 50 nM) oraz 2,5 µl rozcieńczonej 100-krotnie mieszaniny zawierającej cDNA. Poszczególne etapy reakcji prowadzono w warunkach zalecanych przez producenta zestawu: aktywację polimerazy - w 95°C przez 10 minut, następnie 40 cykli: denaturacja (95°C przez 15 sekund), wiązanie starterów i elongacja (60°C przez 1 minutę) oraz odczyt. Każdy z uzyskanych pojedynczych produktów reakcji miał długość 131 par zasad. Ilość transkryptów normalizowano w odniesieniu do genu referencyjnego (gen kodujący białko rybosomalne S7e), którego ilość jest stała w badanych warunkach, z uwzględnieniem wydajności reakcji, która wynosiła powyżej 90% w przypadku wszystkich par starterów (Pfaffl, 2001). Otrzymaną wartość stosunku gen/S7e wykorzystano do wyliczenia względnego poziomu ekspresji badanego genu. W tym celu określono stosunek wartości gen/S7e gąsienic nieimmunizowanych do wartości gen/S7e gąsienic, którym podawano dany immunogen (Wojda i Taszłow, 2013).

Tab. 3. Sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystywanych w doświadczeniach
(Wojda i Jakubowicz, 2007).

gen	Starter przedni (<i>forward</i>) 5'→3'	Starter wsteczny (<i>reverse</i>) 5'→3'
S7e	ATG TGC CAA TGC CCA AGT TG	GTG GCT AGG CTT GGG AAG AAT
cekropina	ATT TGC CTG CAT CGT AGC G	CTT GTA CTG CTG GAC CAG CTT TT
IMPI	TCC TCC AGA AAC CTG TAT CTC CC	CGC AAA TTG GTA TGC ATG GTG
galiomycyna	TCG TAT CGT CAC CGC AAA ATG	GCC GCA ATG ACC ACC TTT ATA
gallerimycyna	TAT CAT TGG CCT TCT TGG CTG	GCA CTC GTA AAA TAC ACA TCC GG

III.6.22. Analiza zmian w hemocytogramie

Zaangażowanie hemocytów w odpowiedź komórkową oceniano analizując zmiany w hemocytogramie. Gąsienice *G. mellonella* immunizowano α -1,3-glukanem *A. niger* (dawka 5 μ g w 3 μ l 30% DMSO) i zarodnikami *A. niger* (dawka 1×10^5 w 3 μ l wody apyrogennej). Osobnikom kontrolnym podawano, odpowiednio, 30% DMSO lub wodę apyrogeną (3 μ l). Hemolimfę pobierano w czasie 0,25 – 24 godziny po immunizacji. W doświadczeniu wykorzystano też gąsienice nieimmunizowane. Analizy przeprowadzono dla 5 osobników w każdej grupie. Eksperyment powtórzono trzykrotnie.

Hemolimfę pobraną z gąsienicy rozcieńczano 5-krotnie w antykoagulancie (bufor 20). Liczbę hemocytów poszczególnych typów zliczano w 60 kwadratach siatki komory Bürkera, przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego Olympus B061 (USA). Liczbę hemocytów N_H znajdujących się w 1 μ l hemolimfy obliczono według wzoru:

$$N_H = \frac{\bar{n} \cdot a}{V},$$

gdzie:

N_H – liczba hemocytów w 1 μ l hemolimfy,

$\bar{n}$ – średnia liczba hemocytów w jednym kwadracie komory Bürkera,

a – rozcieńczenie hemolimfy,

V – nominalna objętość hemolimfy w jednym kwadracie komory Bürkera.

Nodule utworzone *in vivo* obserwowano w mikroskopie kontrastowo-fazowym, w 10 μ l świeżo pobranej hemolimfy (5 osobników na grupę). Obecność

zmelanizowanych nodul analizowano również we wnętrzu jamy ciała gąsienicy, po jej dysekcji (rozdział III.6.5).

III.6.23. Metody statystyczne

Wszystkie opisane w pracy eksperymenty wykonano co najmniej w trzech powtórzeniach. Ocenę istotności statystycznej różnic wartości średnich pomiędzy grupami przeprowadzono metodą jedno- i wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) (Brzeziński i Stachowski 1981; Sthle i Wolda, 1989). Do analizy przeżywalności gąsienic zastosowano metodę Kaplana-Meiera (Kaplan i Meier, 1958; Rasmussen i in., 2018). Przedziały istotności statystycznej wyników oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, bądź literami alfabetu, gdzie istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi w badanych grupach charakteryzował brak wspólnej litery. Obliczenia wykonano z użyciem programu Statistica (StatSoft, USA).

IV. ANALIZA WYNIKÓW

IV.1. Przeżywalność gąsienic *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu i zarodników *A. niger*

Zasadniczym celem badań była ocena reakcji odpornościowych gąsienic po podaniu α -1,3-glukanu, polisacharydu oczyszczonego ze ściany komórkowej *A. niger*. W celu porównania reakcji odpornościowych uruchamianych w odpowiedzi na ten pojedynczy składnik ściany komórkowej grzybów, z odpowiedzią na podanie naturalnego immunogenu środowiskowego, na kontakt z którym mogą być narażone owady, w badaniach wykorzystano również zarodniki *A. niger*. Dodatkowo, aby sprawdzić poziom wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej gąsienic uruchamianych w odpowiedzi na inny polisacharyd zbudowany z reszt glukozy, do immunizacji wykorzystano β -1,3/1,6-glukan z *Laminaria digitata* (laminaryna) (Rozdział III.6.2).

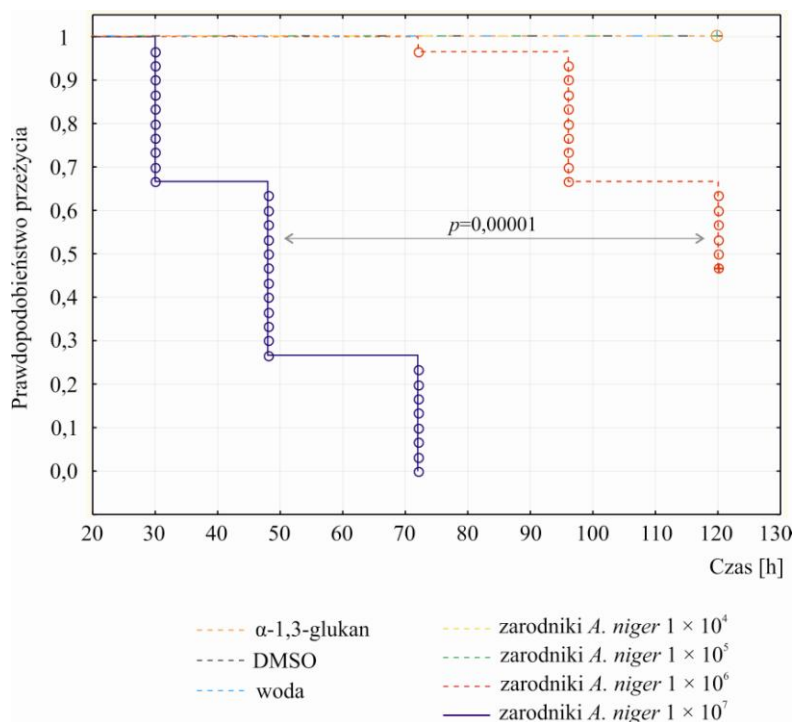
W pierwszym etapie przeprowadzono analizę przeżywalności gąsienic po podaniu różnych dawek α -1,3-glukanu *A. niger*, laminaryny oraz różnej liczby zarodników *A. niger*. Gąsienicom podawano 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g lub 20 μ g α -1,3-glukanu zawieszonego w 3 μ l 30% DMSO. Analizowano również wpływ 30% DMSO, który po iniekcji do hemocelu (3 μ l) osiągał w hemolimfie stężenie około 1,23% (przy założeniu, że objętość hemolimfy gąsienicy ostatniego stadium wynosi około 70 μ l). Laminarynę podawano gąsienicom w dawce 5 μ g, 10 μ g oraz 50 μ g, natomiast zarodniki w liczbie 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 lub 1×10^7 (w 3 μ l wody). Procedurę immunizacji gąsienic opisano w Rozdziale III.6.2.

Stwierdzono, że α -1,3-glukan, nawet w najwyższej zastosowanej dawce, nie wykazywał działania skutkującego zaburzeniem rozwoju lub śmiercią gąsienic. Podanie 3 μ l 30% DMSO również nie zaburzało rozwoju owadów (Ryc. 25). Po immunizacji, na ciele gąsienic widoczny był jedynie punktowy ślad w miejscu wkłucia (Ryc. 26). Obserwacje przeżywalności zakończono w momencie pojawienia się postaci dorosłych, których liczba odpowiadała liczbie gąsienic wykorzystanych w doświadczeniu (Ryc. 25, Ryc. 26).

Laminaryna podawana gąsienicom w dawkach 5 μ g, 10 μ g oraz 50 μ g (dane nieprzedstawione) nie obniżała ich przeżywalności, podobnie jak podanie 3 μ l wody dejonizowanej. Wykazano również, że dawka 1×10^4 oraz 1×10^5 zarodników *A. niger* nie wpływała negatywnie na przebieg dalszych etapów rozwoju osobniczego (Ryc. 25).

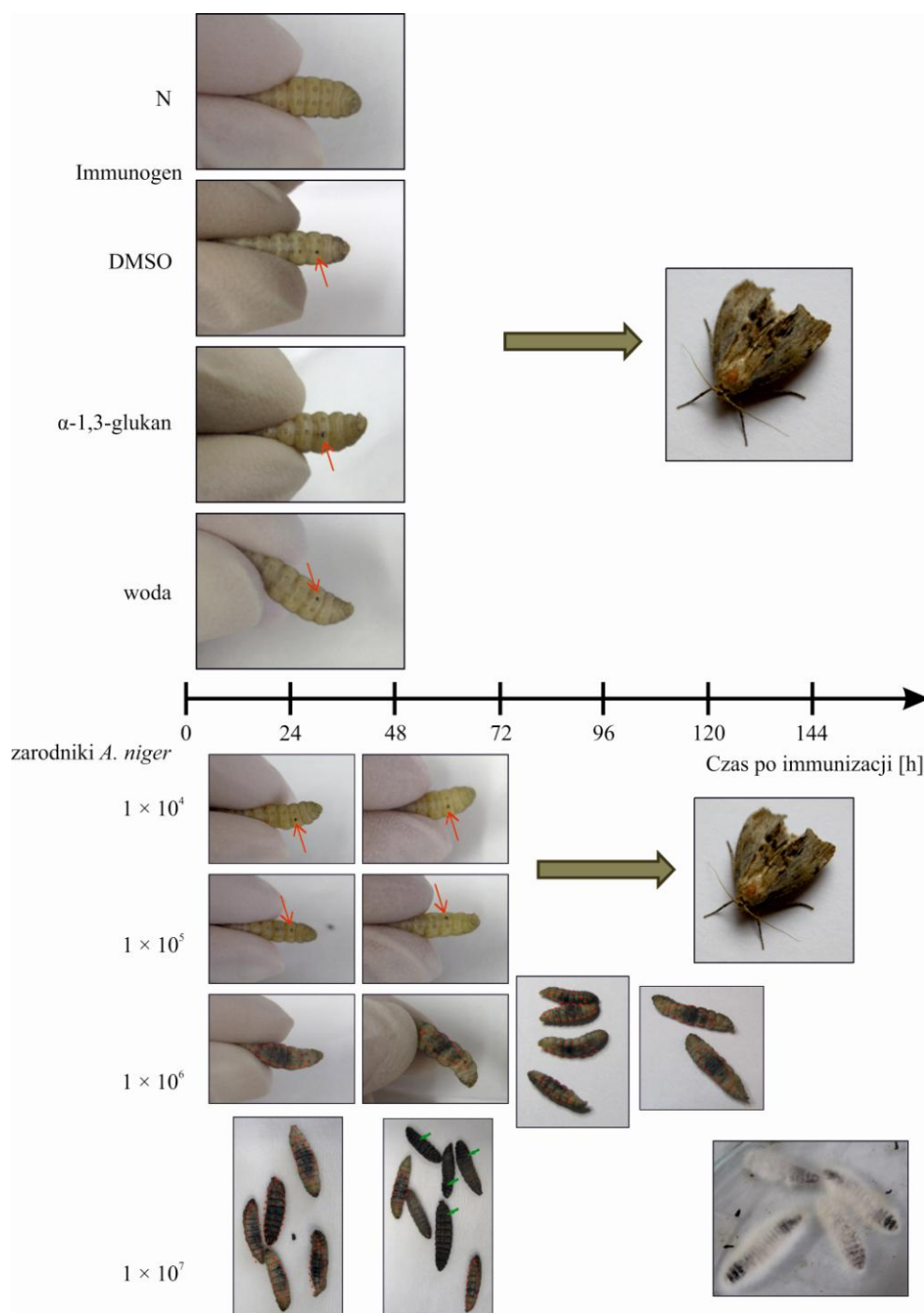
W miejscu wkłucia obserwowano jedynie punktowy ślad (Ryc. 26). Natomiast u gąsienic immunizowanych dawką zarodników wynoszącą 1×10^6 oraz 1×10^7 widoczne było początkowo znaczne zaciemnienie po stronie brzusznej, które rozprzestrzeniało się na całe ciało gąsienic (Ryc. 26). Analiza przeżywalności wykazała, że po podaniu gąsienicom dawki 1×10^6 zarodników prawdopodobieństwo przeżycia 120 godzin wynosiło poniżej 50%. Po podaniu 1×10^7 zarodników wszystkie gąsienice były martwe po upływie 72 godzin. Po 144 godzinach od immunizacji obserwowano przerost gąsienic grzybnią *A. niger* (Ryc. 26). Wykazano istotną statystycznie różnicę ($p=0,00001$) pomiędzy krzywymi przeżycia wyznaczonymi dla gąsienic immunizowanych zarodnikami *A. niger* w dawce 1×10^6 oraz 1×10^7 , przy użyciu metody Kaplana-Meiera i testu *log-rank* (Ryc. 25).

Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań wybrano dawkę 1×10^5 zarodników *A. niger*, jako najwyższą, której podanie nie zaburzało rozwoju barciaka większego i nie powodowało spadku przeżywalności gąsienic.



Ryc. 25. Wpływ wybranych immunogenów pochodzenia grzybowego na przeżywalność gąsienic *G. mellonella*.

Prawdopodobieństwo przeżycia gąsienic immunizowanych α -1,3-glukanem (1 μ g, 5 μ g, 10 μ g i 20 μ g) oraz zarodnikami *A. niger* (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7) oszacowano metodą Kaplana-Meiera. Analizy przeżywalności dokonywano w określonych punktach czasowych: 24, 30, 48, 72, 96, 120 godziny po immunizacji. Doświadczenie wykonano trzykrotnie. Na wykresie przedstawiono wynik reprezentatywnego doświadczenia przeprowadzonego na liczbie 30 osobników w każdej badanej grupie.



Ryc. 26. Zmiany w wyglądzie gąsienic *G. mellonella* obserwowane makroskopowo w różnym czasie po podaniu α -1,3-glukanu oraz zarodników *A. niger*.

Fotografie wykonano w różnych czasach po immunizacji i umieszczono na rycinie w odpowiednim miejscu wzdłuż osi czasu. Przedstawiono reprezentatywny obraz gąsienic (nie zachowano skali) po podaniu różnych dawek α -1,3-glukanu (1 μ g, 5 μ g, 10 μ g oraz 20 μ g) i zarodników *A. niger* (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7). Czerwonymi strzałkami i przerywanymi liniami zaznaczono melanizację widoczną na powierzchni brzusznej gąsienic. Gąsienice, których ciało było całkowicie zmelanizowane oznaczono zielonymi strzałkami. W tym przypadku jako umowny koniec obserwacji przyjęto przerost ciała owada przez grzybnię *A. niger*, natomiast w przypadku immunogenów nie zaburzających rozwoju owada, pojawienie się postaci dorosłych. N – owady nieimmunizowane; DMSO – owady po podaniu 30% DMSO; woda – owady po podaniu wody.

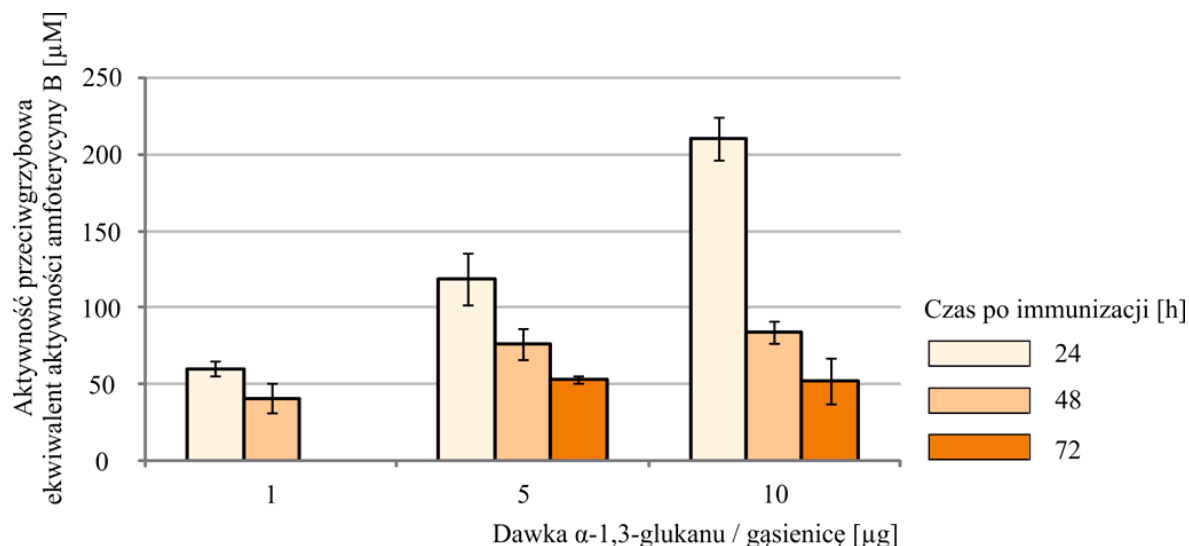
IV.2. Odpowiedź humoralna gąsienic *G. mellonella* na immunizację α -1,3-glukanem *A. niger*

Uruchomienie mechanizmów odpornościowych owadów w odpowiedzi na czynnik zakaźny wymaga prawidłowego rozpoznania określonych struktur PAMPs drobnoustrojów. W przypadku grzybów rolę tę przypisuje się głównie cząsteczce β -1,3-glukanu (Ochiai i Ashida, 1988; Brown i Gordon, 2003). Pomimo faktu, że udział α -1,3-glukanu w budowie ściany komórkowej wielu gatunków grzybów chorobotwórczych jest znaczny, jego rola w oddziaływaniach pomiędzy gospodarzem a patogenem jest w dalszym ciągu słabo poznana. Sprawdzone zatem, czy układ odpornościowy *G. mellonella* reaguje na jego obecność w hemocelu i uruchamia mechanizmy humoralnej odpowiedzi immunologicznej, takie jak indukcja przeciwdrobnoustrojowej aktywności w hemolimfie oraz aktywacja układu oksydazy fenolowej prowadząca do melanizacji.

IV.2.1. Aktywność przeciwgrzybowa w hemolimfie

Pierwszym krokiem w kierunku oceny stopnia aktywacji odpowiedzi immunologicznej gąsienic *G. mellonella* przez α -1,3-glukan, była analiza aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie. Sprawdzenie tej aktywności było szczególnie istotne ze względu na grzybowe pochodzenie tego polisacharydu, a uzyskane wyniki pozwoliły na wybór dawki α -1,3-glukanu, którą stosowano w kolejnych eksperymentach.

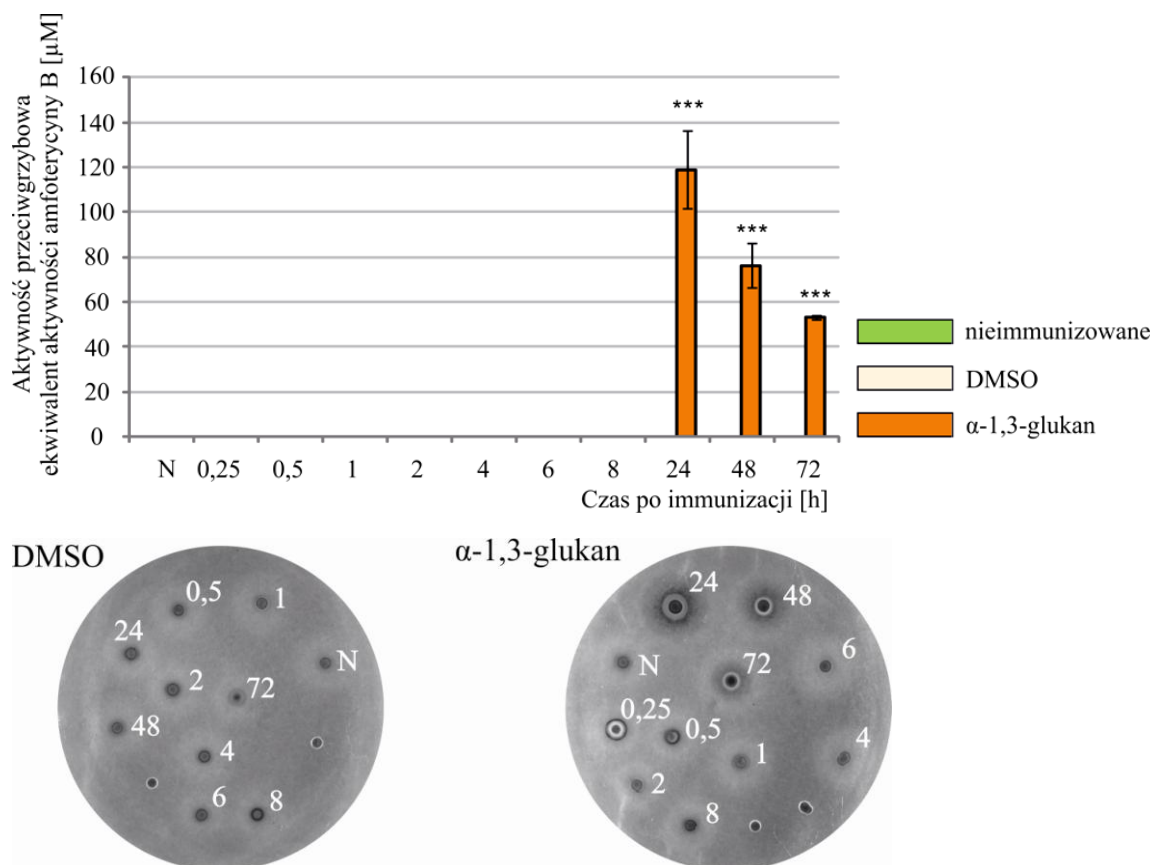
Ze względu na fakt, że analiza przeżywalności gąsienic po podaniu różnych dawek α -1,3-glukanu nie wykazała ich negatywnego wpływu, do wstępnego badania aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie wybrano trzy dawki: 1 μ g, 5 μ g oraz 10 μ g α -1,3-glukanu. Wykazano, że wszystkie badane dawki indukowały pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie po 24 godzinach od podania (Ryc. 27). W zależności od dawki, aktywność utrzymywała się do 48 godzin (1 μ g), bądź była obserwowana również po 72 godzinach od immunizacji (5 μ g oraz 10 μ g). Poziom aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie pobranej 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem wzrastał wraz ze zwiększaniem dawki, osiągając maksymalną wartość, odpowiadającą aktywności 210 μ M roztworu amfoterycyny B, po podaniu dawki 10 μ g. W dłuższych czasach nie obserwowano tej tendencji (Ryc. 27).



Ryc. 27. Analiza aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu różnych dawek α -1,3-glukanu *A. niger*.

Aktywność przeciwgrzybową badano w hemolimfie pobranej w czasie 0,25 - 72 godziny po podaniu 1 μg , 5 μg oraz 10 μg α -1,3-glukanu ($n=12$) metodą dyfuzji radialnej wobec *A. niger* (Rozdział III.6.6.2). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent aktywności amfoterycyny B ($\pm$ odchylenie standardowe). Na wykresie zaprezentowano rezultaty jedynie w czasach po immunizacji, przy których zaobserwowano pojawienie się stref zahamowania wzrostu grzyba.

Z uwagi na fakt, że dawka 5 μg α -1,3-glukanu była najniższą, po podaniu której aktywność przeciwgrzybową obserwowano w hemolimfie zarówno po 24, 48, jak również po 72 godzinach od immunizacji, została ona wykorzystana w dalszych badaniach (Ryc. 27). Aktywności przeciwgrzybowej nie wykryto w hemolimfie owadów nieimmunizowanych, jak również w żadnym z badanych czasów po immunizacji 3 μl 30% DMSO (Ryc. 28). Wykazano tym samym, że pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie jest związane z rozpoznaniem α -1,3-glukanu, składnika pochodzenia grzybowego, przez układ odpornościowy *G. mellonella*.



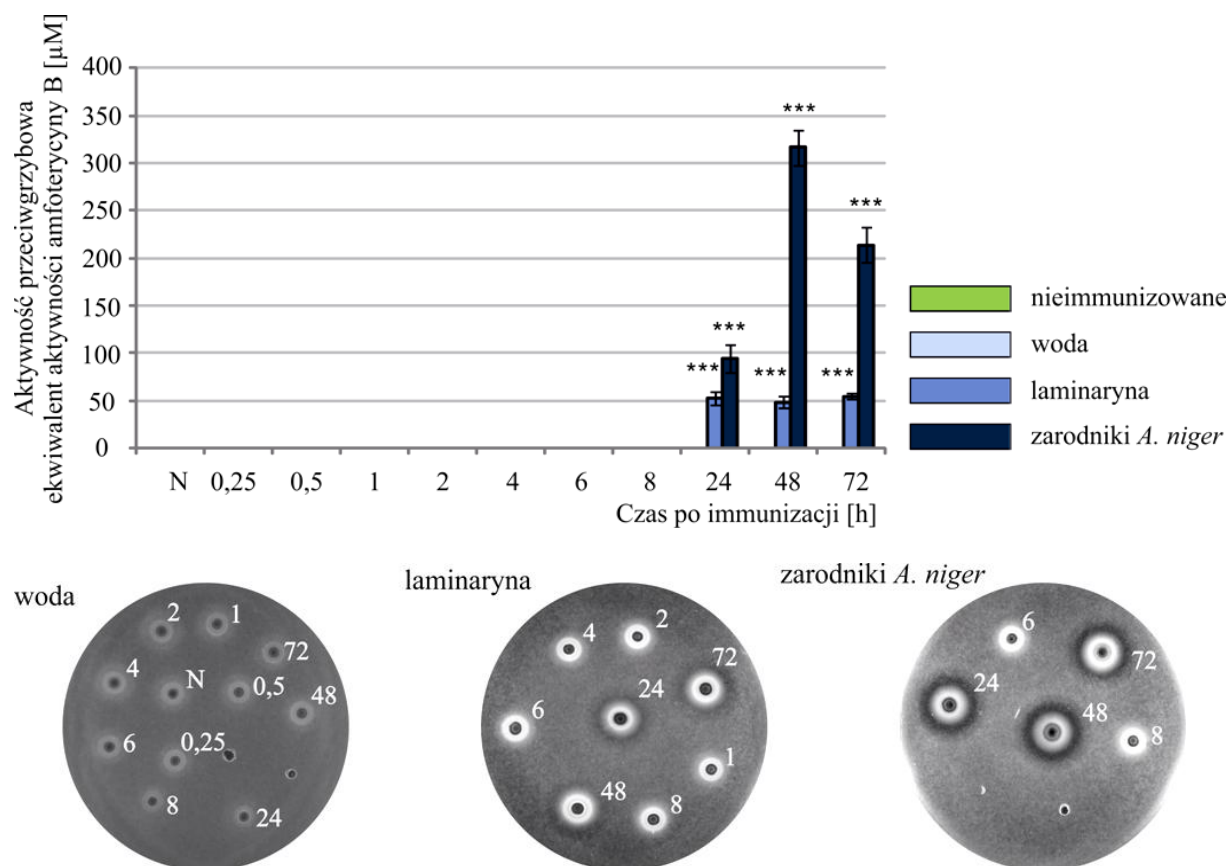
Ryc. 28. Aktywność przeciwgrzybowa w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu 5 μ g α -1,3-glukanu *A. niger*.

Aktywność przeciwgrzybową badano w hemolimfie pobranej w czasie 0,25 - 72 godziny po podaniu α -1,3-glukanu (5 μ g) oraz 3 μ l DMSO (n=12) metodą dyfuzji radialnej wobec *A. niger* (Rozdział III.6.6.2). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent aktywności amfoterycyny B ($\pm$ odchylenie standardowe). Istotnie statystycznie różnice pomiędzy wartościami średnimi (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi dla α -1,3-glukanu i DMSO zaznaczono gwiazdkami: *** $p \leq 0,001$. Poniżej wykresu przedstawiono fotografie płytek Petriego uwidaczniające wyniki eksperymentu. Strefy przejaśnienia, świadczące o zahamowaniu wzrostu *A. niger*, widoczne są wokół dołków, do których naniesiono hemolimfę wykazującą aktywność przeciwgrzybową. Ze względu na sposób obrazowania płytek, strefy przejaśnienia widoczne są w postaci obszarów ciemniejszych niż reszta płytki. Oznaczenia na płytce wskazują czas po immunizacji (h), w którym pobierano hemolimfę; N - hemolimfa owadów nieimmunizowanych.

W celu porównania poziomu aktywności przeciwgrzybowej hemolimfy gąsienic po immunizacji α -1,3-glukanem, z odpowiedzią na komórki, które zawierają go w ścianie komórkowej, gąsienicom podano zarodniki *A. niger*. Dodatkowo, sprawdzono poziom aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie larw po podaniu do hemocelu innego polisacharydu, β -1,3/1,6-glukanu z *Laminaria digitata* (laminaryny).

W odróżnieniu od α -1,3-glukanu, maksimum aktywności przeciwgrzybowej po podaniu zarodników *A. niger* stwierdzono po 48 godzinach. Aktywność ta odpowiadała

aktywności 316 μM roztworu amfoterycyny B. Poziom aktywności był wtedy ponad 4-krotnie wyższy niż po immunizacji α -1,3-glukanem i ponad 6-krotnie wyższy niż po immunizacji laminaryną. Wykazano, że aktywność przeciwgrzybowa indukowana w hemolimfie w odpowiedzi na laminarynę, której dawka była 10-krotnie wyższa niż α -1,3-glukanu (odpowiednio, 50 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$ i 5 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$) była po 24 godzinach od immunizacji około 2,5-krotnie niższa i odpowiadała aktywności 52 μM roztworu amfoterycyny B (Ryc. 29). Po podaniu 5 μg laminaryny, odpowiadającej zastosowanej dawce α -1,3-glukanu, nie stwierdzono aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie *G. mellonella*.

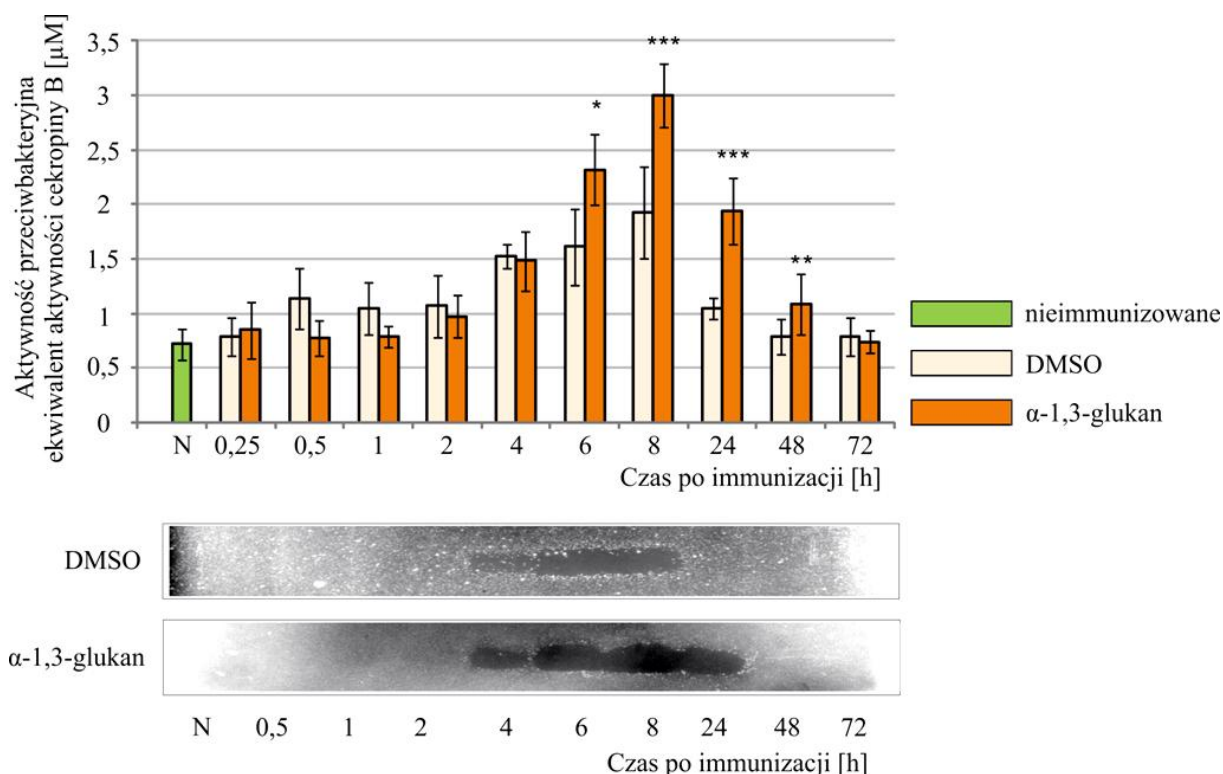


Ryc. 29. Aktywność przeciwgrzybowa w hemolimfie *G. mellonella* po immunizacji zarodnikami *A. niger* oraz laminaryną.

Aktywność przeciwgrzybową badano w hemolimfie pobranej w czasie 0,25 - 72 godziny po podaniu laminaryny (50 μg w 3 μl wody), 1×10^5 zarodników *A. niger* (w 3 μl wody) oraz 3 μl wody ($n=12$) metodą dyfuzji radialnej wobec *A. niger* (Rozdział III.6.6.2). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent aktywności amfoterycyny B ($\pm$ odchylenie standardowe). Istotnie statystycznie różnice pomiędzy wartościami średnimi (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi dla laminaryny/zarodników i wody zaznaczono gwiazdkami: *** $p \leq 0,001$. Poniżej wykresu przedstawiono fotografie płytek Petriego uwidaczniające wyniki eksperymentu. Strefy przejaśnienia, świadczące o zahamowaniu wzrostu *A. niger*, widoczne są wokół dołków, do których naniesiono hemolimfę wykazującą aktywność przeciwgrzybową. Ze względu na sposób obrazowania płytek, strefy przejaśnienia widoczne są w postaci obszarów ciemniejszych niż reszta płytki. Oznaczenia na płytce wskazują czas po immunizacji (h), w którym pobierano hemolimfę; N - hemolimfa owadów nieimmunizowanych.

IV.2.2. Aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie

W odpowiedzi na różnego rodzaju obce cząstki hemolimfa owadów nabywa potencjału przeciwbakteryjnego, którego poziom można ocenić z wykorzystaniem metody dyfuzji radialnej wobec bakterii wskaźnikowych *E. coli* D31. Wykazano wzrost aktywności wobec bakterii *E. coli* w hemolimfie po immunizacji gąsienic zarówno α -1,3-glukanem *A. niger*, jak i DMSO (Ryc. 30). Istotną statystycznie różnicę w wykrywanej aktywności pomiędzy dwoma badanymi immunogenami zaobserwowano w czasie od 6 do 48 godzin po immunizacji. Maksimum aktywności anty-*E.coli*, odpowiadające aktywności 3 μ M roztworu cekropiny B, stwierdzono po 8 godzinach od immunizacji zarówno α -1,3-glukanem, jak również DMSO, przy czym poziom po podaniu polisacharydu był około 30% wyższy (Ryc. 30). Jednakże największą różnicę w poziomie aktywności przeciwbakteryjnej pomiędzy hemolimfą owadów immunizowanych α -1,3-glukanem a DMSO stwierdzono po 24 godzinach po podaniu. Poziom aktywności anty-*E. coli* po podaniu α -1,3-glukanu i DMSO był wtedy równy, odpowiednio, aktywności 1,9 μ M oraz 1 μ M roztworu cekropiny B. Wyniki uzyskane metodą dyfuzji radialnej korespondowały z obrazem bioautografii. Strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* w podłożu, którym nawarstwiono żel po rozdziale elektroforetycznym białek hemolimfy, obserwowano w próbkach hemolimfy pobranych w czasie od 4 do 24 godzin po immunizacji. Strefy widoczne były w miejscu, w którym na żelu, po rozdziale elektroforetycznym, lokują się peptydy o masie poniżej 10 kDa, odpowiadające peptydom przeciwdrobnoustrojowym (Ryc. 30).

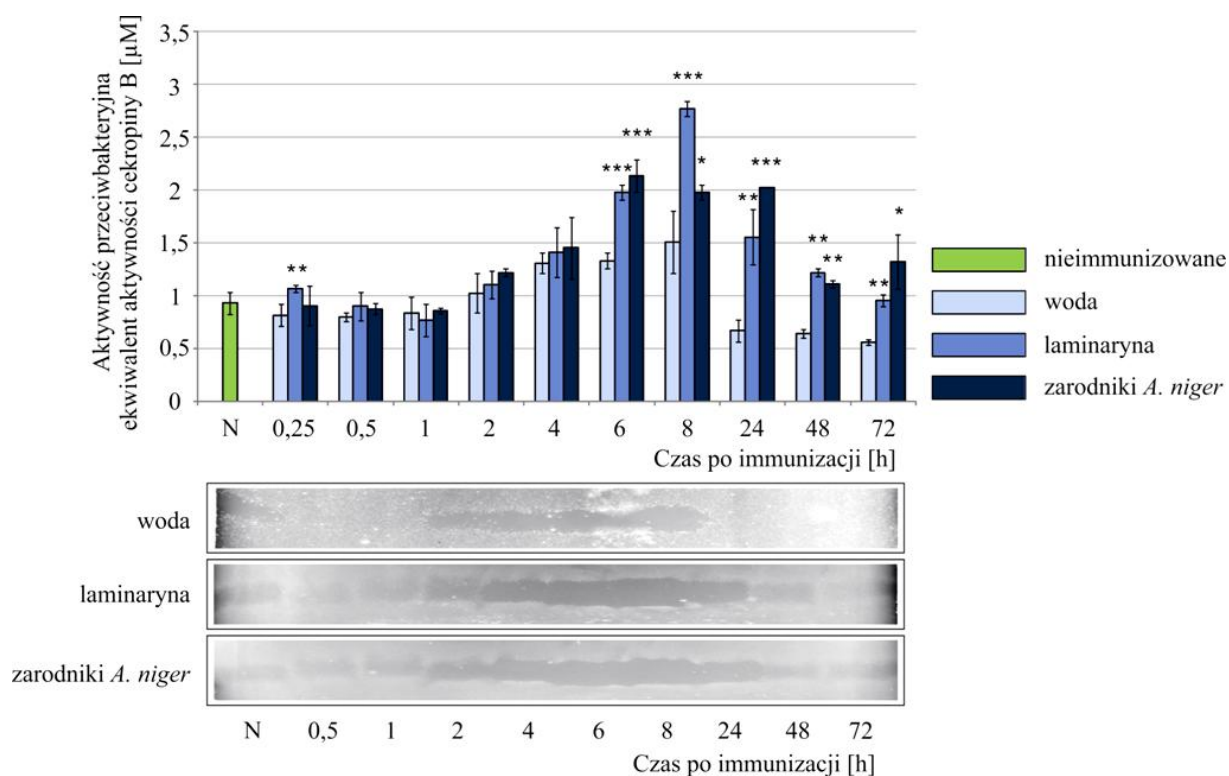


Ryc. 30. Aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger*.

Gąsienice immunizowano α -1,3-glukanem (5 μ g) lub 30% DMSO. Hemolimfę pobierano w czasie 0,25 - 72 godziny po immunizacji (n=12). Aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie oznaczano metodą dyfuzji radialnej wobec *E. coli* i przedstawiono jako ekwiwalent aktywności cekropiny B ($\pm$ odchylenie standardowe) (Rozdział III.6.6.1). Literą N oznaczono poziom aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów nieimmunizowanych. Istotność statystyczną wyznaczoną dla różnic pomiędzy średnimi wartościami (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi w odpowiednich czasach po immunizacji α -1,3-glukanem oraz DMSO oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Poniżej wykresu przedstawiono reprezentatywny obraz bioautografii, uwidaczniający strefy zahamowania wzrostu *E. coli* (zaciemnione obszary) (Rozdział III.6.7).

Określono również poziom aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie po podaniu gąsienicom zarodników *A. niger*, laminaryny oraz wody. Zaobserwowano podobieństwo w kinetyce wzrostu aktywności anty-*E. coli* w hemolimfie owadów immunizowanych α -1,3-glukanem i laminaryną. Maksimum aktywności przeciwbakteryjnej, odpowiadające aktywności 2,77 μ M roztworu cekropiny B, przypadało na 8 godzin po immunizacji laminaryną. W przypadku immunizacji zarodnikami, najwyższą aktywność zaobserwowano w czasie od 6 do 24 godzin po immunizacji, była ona jednak niższa niż w przypadku immunizacji α -1,3-glukanem i laminaryną, na poziomie odpowiadającym aktywności 2 μ M roztworu cekropiny B (Ryc. 31). Największą różnicę pomiędzy poziomem aktywności przeciwbakteryjnej po

podaniu laminaryny lub zarodników i wody zanotowano po 24 godzinach. Poziom aktywności był około dwu- i trzykrotnie wyższy po immunizacji, odpowiednio, laminaryną i zarodnikami *A. niger*, w porównaniu z poziomem po podaniu wody, odpowiadającym aktywności 0,74 μM roztworu cekropiny B. Wyniki bioautografii wykazały, że największe strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* uzyskano dla hemolimfy pobranej 8 godzin po podaniu zarówno zarodników, jak i laminaryny oraz wody. Podobnie jak po podaniu innych immunogenów użytych w badaniach, strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* obserwowano w miejscu odpowiadającym wysokości, na której w żelu lokują się rozdzielone elektroforetycznie peptydy przeciwdrobnoustrojowe (Ryc. 31).



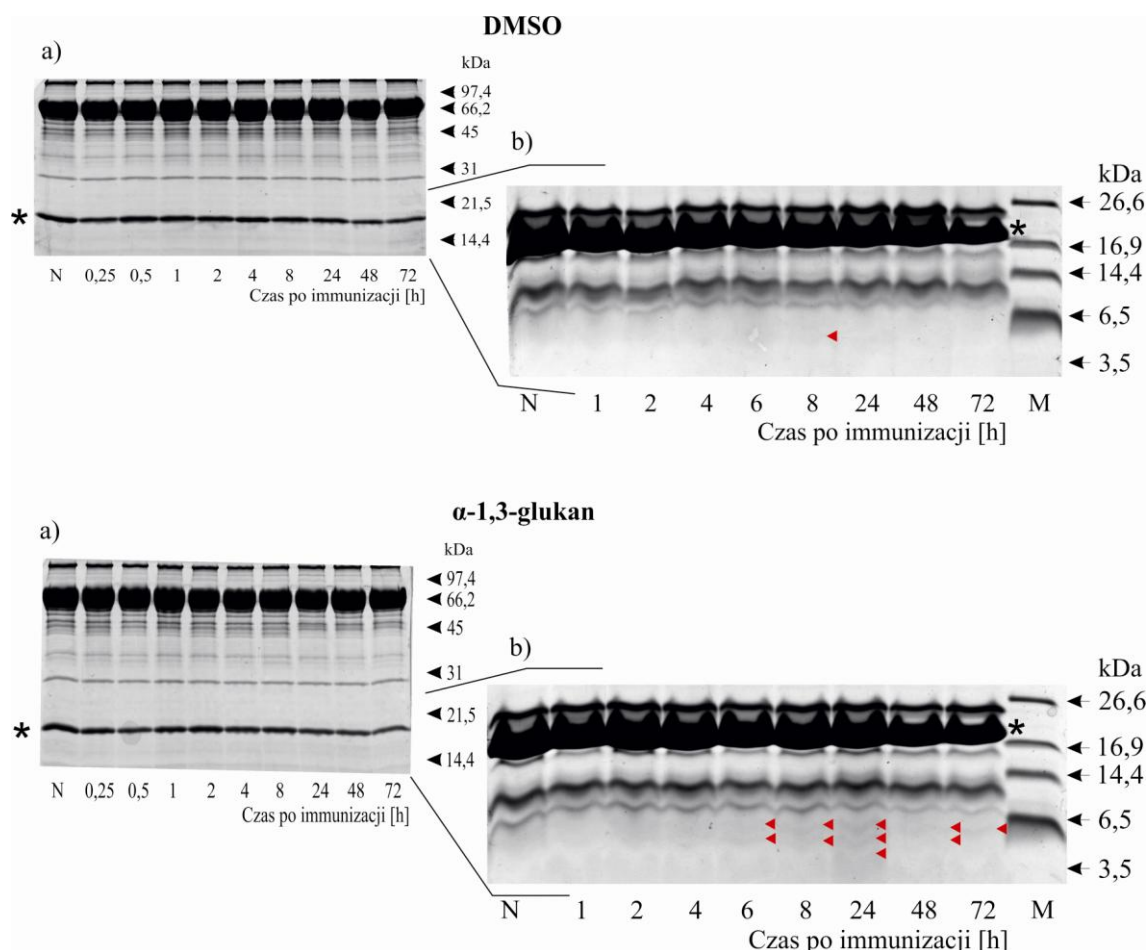
Ryc. 31. Aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po immunizacji laminaryną oraz zarodnikami *A. niger*.

Aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie oznaczano metodą dyfuzji radialnej wobec *E. coli* i przedstawiono jako ekwiwalent aktywności cekropiny B ($\pm$ odchylenie standardowe) (Rozdział III.6.6.1). Hemolimfę pobierano w czasie 0,25 - 72 godziny po immunizacji laminaryną (50 μg w 3 μl wody), dawką 1×10^5 zarodników *A. niger* (w 3 μl wody) oraz 3 μl wody ($n=12$). Literą N oznaczono poziom aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów nieimmunizowanych. Istotność statystyczną wyznaczono dla różnic pomiędzy średnimi wartościami (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi w odpowiednich czasach po immunizacji laminaryną/zarodnikami i wodą, i zaznaczono za pomocą gwiazdek: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Poniżej wykresu przedstawiono reprezentatywny obraz bioautografii, uwidaczniający strefy zahamowania wzrostu *E. coli* (zaciemnione obszary) (Rozdział III.6.7).

IV.2.3. Analiza zmian w profilu białkowym hemolimfy

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa w hemolimfie różniła się poziomem i charakterem zmian w zależności od immunogenu i czasu jaki upłynął od immunizacji. Szczególną uwagę zwrócono na aktywność przeciwgrzybową, którą stwierdzono w hemolimfie jedynie po podaniu α -1,3-glukanu (5 μ g), laminaryny (50 μ g) i zarodników *A. niger* w dawce 1×10^5 . W hemolimfie owadów, którym podano DMSO i wodę, nie wykazano tej aktywności. W celu wyjaśnienia obserwowanych różnic w aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne białek hemolimfy gąsienic immunizowanych badanymi immunogenami.

Analiza profili białkowych uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym próbek hemolimfy w warunkach denaturujących (Rozdział III.6.13) nie wykazała uchwytynych zmian jakościowych w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych, immunizowanych α -1,3-glukanem oraz 30% DMSO (Ryc. 32a). W związku z tym przeprowadzono rozdział elektroforetyczny ekstraktów metanolowych hemolimfy, w których znajdują się białka o masie cząsteczkowej poniżej 30 kDa oraz peptydy (Rozdział III.6.14). Analiza uzyskanych profili wykazała obecność peptydów o masie poniżej 6,5 kDa, które pojawiały się już 6 godzin po immunizacji α -1,3-glukanem i były obecne w hemolimfie aż do 72 godzin po immunizacji (Ryc. 32b). Największą intensywność wybarwienia prążków peptydowych oraz największą ich liczbę zanotowano po 24 godzinach od immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem. Te obserwacje korelują z wynikami badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej hemolimfy wobec *A. niger*, które przedstawiono w Rozdziale IV.2.1. Największa ilość wybarwionych prążków peptydowych w żelu odpowiadała maksymalnej aktywności określonej metodą dyfuzji radialnej w hemolimfie. W przypadku immunizacji DMSO, analiza profili białkowych ekstraktów metanolowych hemolimfy wykazała jedynie pojedynczy prążek o słabej intensywności, obecny w hemolimfie po 8 godzinach od immunizacji (Ryc. 32b), co może stanowić wyjaśnienie aktywności przeciwbakteryjnej wykrytej w hemolimfie gąsienic immunizowanych DMSO (Ryc. 30).



Ryc. 32. Profile białek i peptydów hemolimfy gąsienic *G. mellonella* immunizowanych α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

- (a) Białka hemolimfy (20 μ g) owadów nieimmunizowanych (N), immunizowanych 30% DMSO oraz α -1,3-glukanem (5 μ g), pobranej 0,25 - 72 godziny od podania immunogenu, rozdzielono w warunkach denaturujących w 13,8% żelu poliakrylamidowym. Po zakończonym rozdziale żele barwiono błękitem Coomassie Brilliant Blue R-250 (Rozdział III.6.13).
- (b) Peptydy i białka o masie poniżej 30 kDa, obecne w ekstraktach metanolowych hemolimfy, rozdzielano dodatkowo z wykorzystaniem elektroforezy trycynowej (Rozdział III.6.14). Po zakończonym rozdziale żele barwiono błękitem Coomassie Brilliant Blue G-250.

Czerwonymi strzałkami zaznaczono prążki odpowiadające peptydom przeciwdrobnoustrojowym. Gwiazdkami zaznaczono położenie apolipoforyny III.

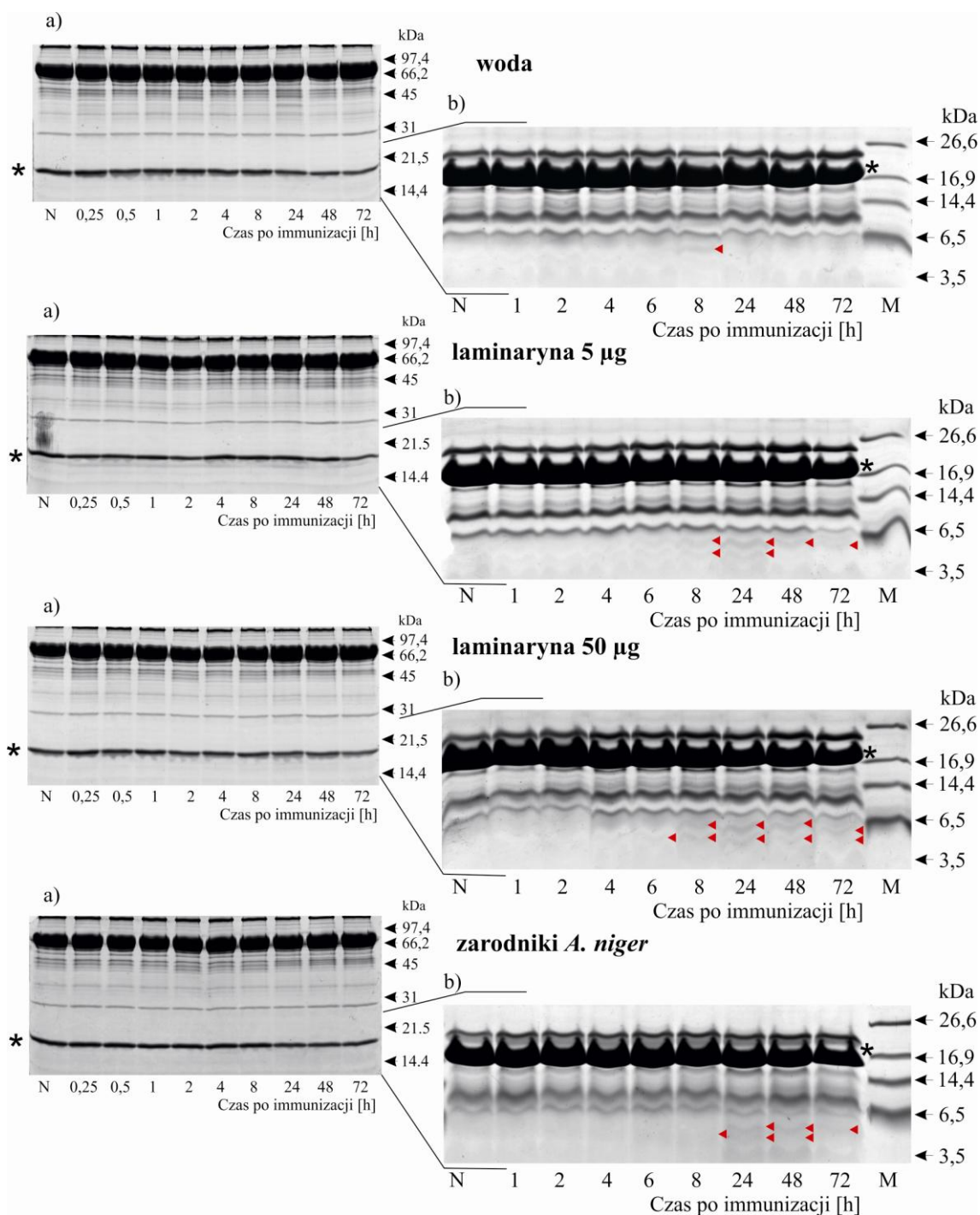
Czas pojawiania się i profil prążków peptydowych w hemolimfie po immunizacji gąsienic laminarną (50 μ g) przypominał obraz uzyskany po podaniu α -1,3-glukanu (5 μ g). Największą intensywność zabarwienia prążków stwierdzono w ekstraktach metanolowych otrzymanych z hemolimfy pobranej 24 godziny po immunizacji tą dawką laminaryny (Ryc. 33b). Po podaniu mniejszej dawki laminaryny

(5 µg), równej zastosowanej dawce α -1,3-glukanu, obserwowano również pojawienie się na żelu prążków odpowiadających peptydom przeciwdrobnoustrojowym, głównie w czasie 8 i 24 godzin po podaniu immunogenu. Biorąc pod uwagę fakt, że po immunizacji gąsienic dawką 5 µg laminaryny nie wykazano aktywności przeciwwgrzybowej w hemolimfie, wykryte prążki peptydowe reprezentują najprawdopodobniej peptydy przeciwbakteryjne.

Zmiany obserwowane w profilu białkowym po iniekcji zarodników *A. niger* dotyczyły również peptydów, które pojawiały się w czasie od 8 do 72 godzin po immunizacji, jednak po 24 i 48 godzinach były one najintensywniejsze. Zmiany w profilu białkowym w ekstraktach metanolowych hemolimfy po podaniu wody dostrzegalne były jedynie po 8 godzinach od immunizacji w postaci pojedynczego prążka peptydowego o masie poniżej 6,5 kDa (Ryc. 33b).

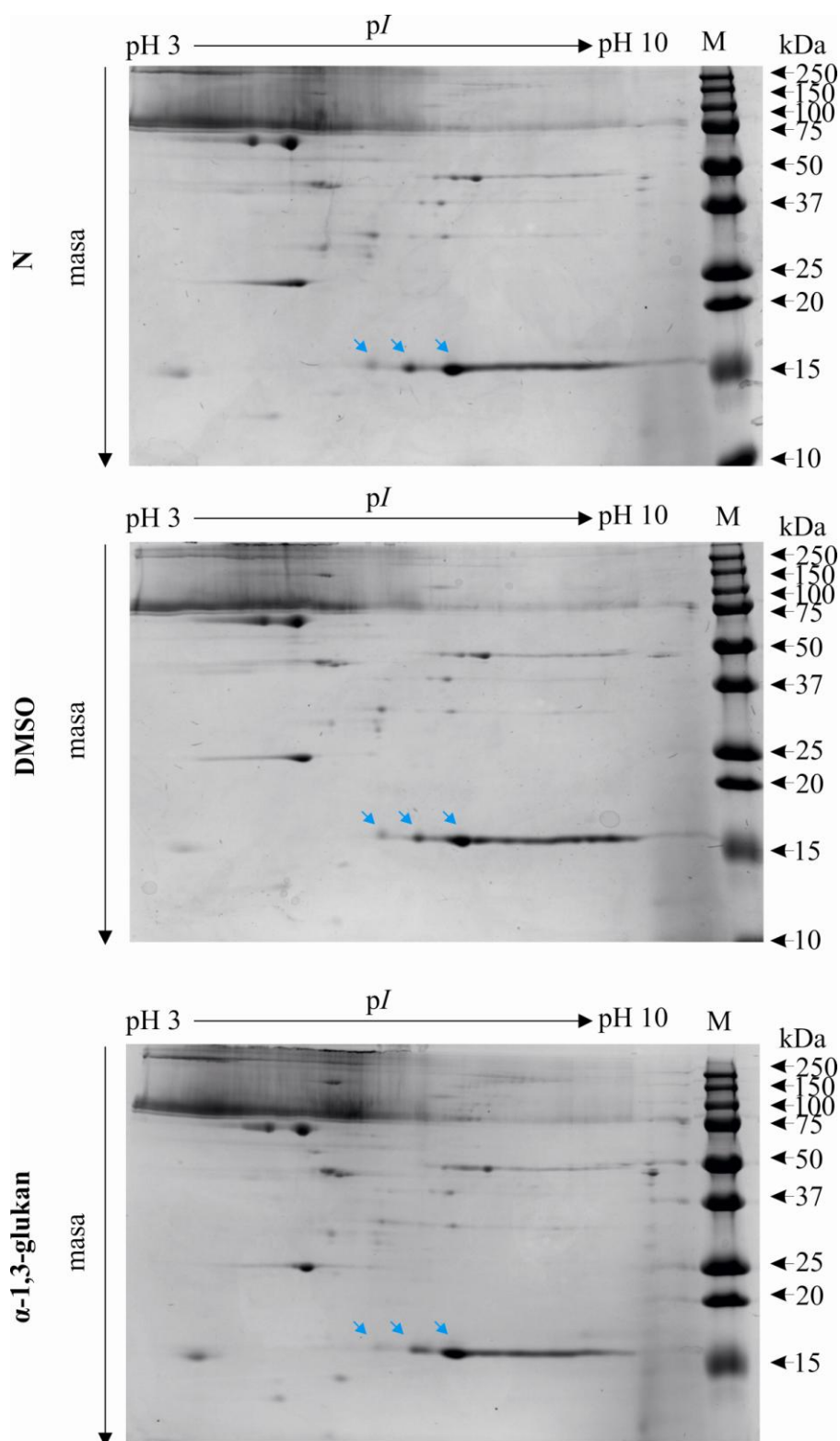
Uzyskane wyniki wskazują, że za aktywność przeciwwgrzybową i przeciwbakteryjną wykrytą w hemolimfie gąsienic immunizowanych badanymi immunogenami odpowiadają peptydy przeciwdrobnoustrojowe.

Z uwagi na fakt, że najwyższą aktywność przeciwwgrzybową stwierdzono w hemolimfie pobranej 24 godziny po podaniu α -1,3-glukanu, a analiza profilu peptydowego wykazała pojawienie się największej liczby prążków o masie poniżej 6,5 kDa, próbki tej hemolimfy poddano dodatkowej analizie elektroforetycznej. Obrazy uzyskane z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej (2D), w której białka rozdzielane są najpierw względem punktu izoelektrycznego (pI), a później względem masy cząsteczkowej, nie wykazały wyraźnych różnic jakościowych pomiędzy hemolimfą owadów nieimmunizowanych, jak również po 24 godzinach od podania 30% DMSO i α -1,3-glukanu *A. niger* (5 µg) (Ryc. 34).



Ryc. 33. Profile białek i peptydów hemolimfy gąsienic *G. mellonella* immunizowanych laminaryną oraz zarodnikami *A. niger*.

- (a) Białka hemolimfy (20 µg) owadów nieimmunizowanych (N), immunizowanych wodą, laminaryną (5 µg, 50 µg), zarodnikami *A. niger* (1×10^5), pobranej 0,25 - 72 godziny od podania immunogenu rozdzielono w warunkach denaturujących w 13,8% żelu poliakrylamidowym. Po zakończonym rozdzieleniu żele barwiono błękitem Coomassie Brilliant Blue R-250 (Rozdział III.6.13).
- (b) Peptydy i białka poniżej 30 kDa obecne w ekstraktach metanolowych hemolimfy rozdzielano dodatkowo z wykorzystaniem elektroforezy trycynowej (Rozdział III.6.14). Po zakończonym rozdzieleniu żele barwiono błękitem Coomassie Brilliant Blue G-250. Czerwonymi strzałkami zaznaczono prążki odpowiadające peptydom przeciwdrobnoustrojowym. Gwiazdkami zaznaczono położenie apolipoforyny III.



Ryc. 34. Elektroforeza dwukierunkowa białek hemolimfy gąsienic *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

Białka hemolimfy (200 μ g) owadów nieimmunizowanych (N), immunizowanych 30% DMSO oraz α -1,3-glukanem (5 μ g) pobranej 24 godziny od podania immunogenu rozdzielono pod względem punktu izoelektrycznego (pI), a następnie pod względem masy cząsteczkowej (Rozdział III.6.15). Po zakończonym rozdziale żele barwiono błękitem Coomassie Brilliant Blue R-250. Niebieskimi strzałkami zaznaczono położenie apolipoforyny III.

IV.2.4. Udział peptydów odpornościowych w odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* na α -1,3-glukan *A. niger*

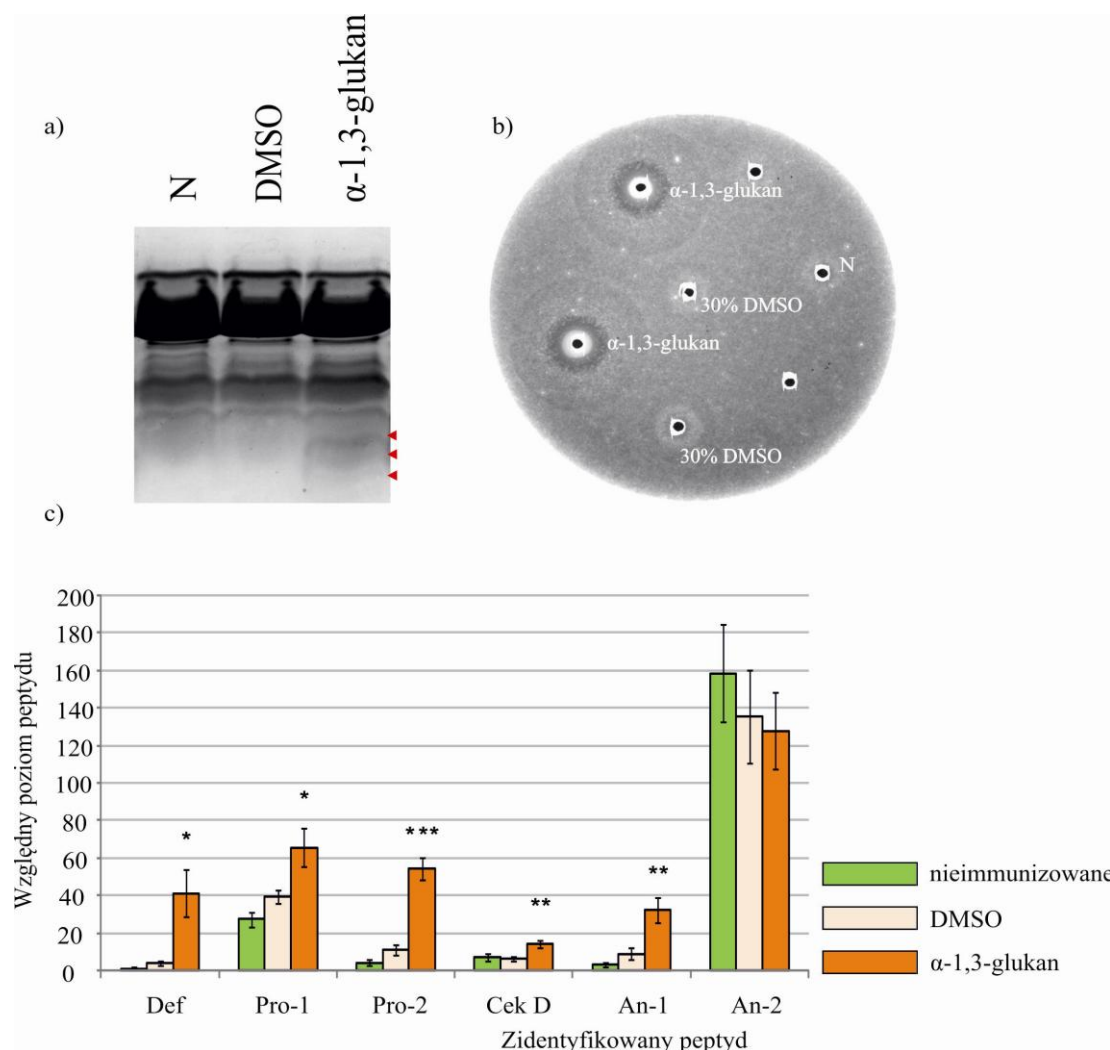
Peptydy odpornościowe to zazwyczaj cząsteczki o masie poniżej 10 kDa, które stanowią kluczowy element odpowiedzi humoralnej owadów. Za główne miejsce działania wielu z nich uznaje się błonę komórkową mikroorganizmów. Mogą też współdziałać z białkami obecnymi w hemolimfie, między innymi apolipoforyną III i lizozymem, prowadząc ostatecznie do eliminacji zakażenia. Jak wynika z analizy zmian w profilu białkowym, przedstawionej w poprzednim rozdziale, peptydy odpornościowe pojawiają się w hemolimfie *G. mellonella* również w odpowiedzi na podanie α -1,3-glukanu *A. niger* (Ryc. 32b).

IV.2.4.1. Identyfikacja i analiza poziomu wybranych peptydów odpornościowych w hemolimfie

Analiza profilu peptydów hemolimfy wykazała wyraźne różnice pomiędzy hemolimfą gąsienic immunizowanych α -1,3-glukanem i DMSO, szczególnie widoczne po 24 godzinach od immunizacji. Wynikały one z obecności dodatkowych prążków o masie poniżej 6,5 kDa w hemolimfie owadów, którym podano α -1,3-glukan (Ryc. 32b, Ryc. 35a). Ponadto stwierdzono, że ekstrakty metanolowe hemolimfy zebranej 24 godziny po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem wykazują aktywność przeciwgrzybową wobec *A. niger* (Ryc. 35b). Obie obserwacje wskazują, że to peptydy odpornościowe odpowiedzialne są za pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*.

W celu identyfikacji białek i peptydów odpornościowych obecnych w ekstraktach metanolowych hemolimfy, poddano je rozdzielaniu metodą HPLC oraz przeprowadzono sekwencjonowanie reszt aminokwasowych od N-końca (Rozdział III.6.18). W ekstraktach hemolimfy owadów nieimmunizowanych oraz immunizowanych α -1,3-glukanem i DMSO zidentyfikowano osiem peptydów i białek odpornościowych: defensynę *G. mellonella* (galiomycyna), peptyd bogaty w prolinę 1, peptyd bogaty w prolinę 2, cekropinę D, peptyd anionowy 1, peptyd anionowy 2 oraz lizozym i apolipoforynę III (Ryc. 35c). Poziom pięciu spośród sześciu zidentyfikowanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger* wzrósł istotnie w stosunku do hemolimfy owadów immunizowanych DMSO. Odnotowano między innymi 10-krotny wzrost poziomu defensyny *G. mellonella*, niemal 5-krotny wzrost poziomu peptydu prolinowego 2,

ponad 3,5-krotny wzrost poziomu peptydu anionowego 1, 2-krotny wzrost poziomu cekropiny D i 1,6-krotny wzrost poziomu peptydu prolinowego 1. Poziom peptydu anionowego 2 nie zmienił się w sposób istotny statystycznie (Ryc. 35c).



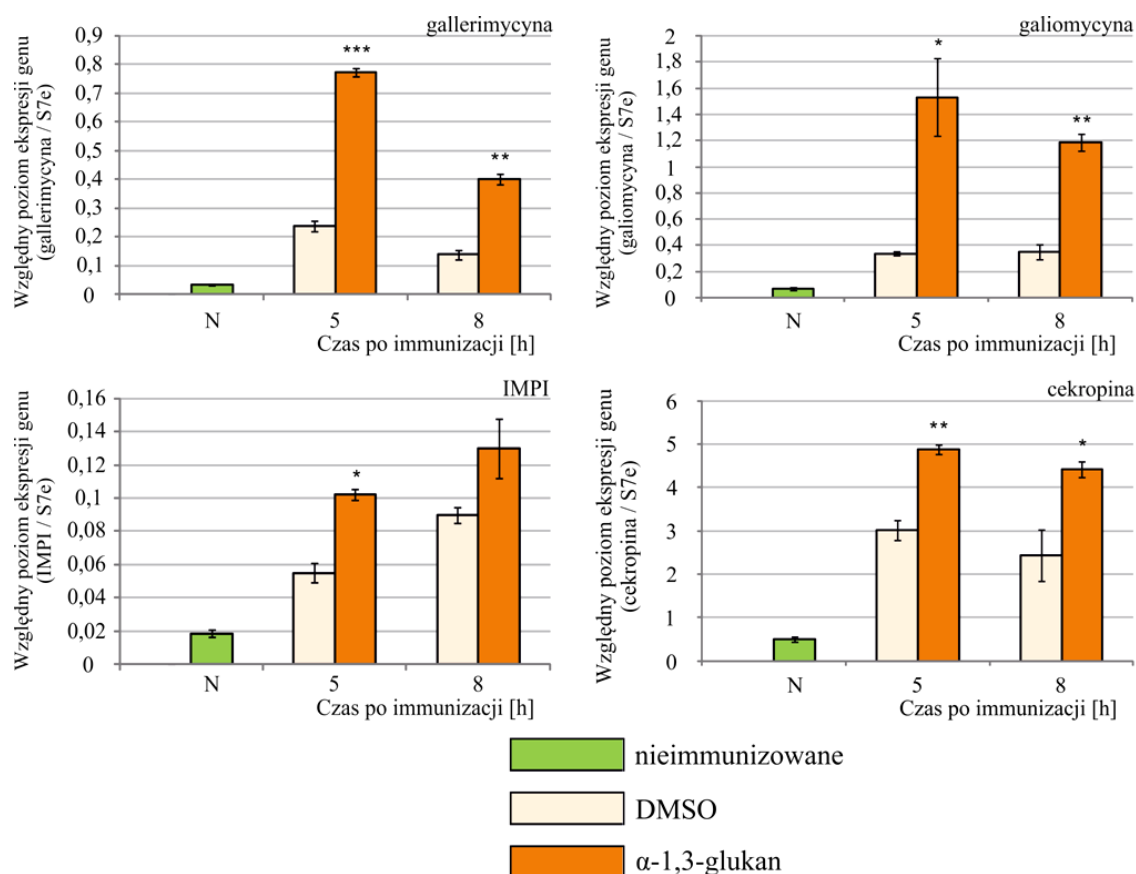
Ryc. 35. Poziom wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* immunizowanych α-1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

- (a) Ekstrakty metanolowe przygotowano z hemolimfy pobranej z gąsienic nieimmunizowanych (N) oraz 24 godziny po immunizacji α-1,3-glukanem (5 μg) i 30% DMSO i poddano rozdzielaniu z wykorzystaniem elektroforezy trycynowej (Rozdział III.6.14). Żel po rozdzielaniu barwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue G-250. Czerwonymi strzałkami zaznaczono położenie peptydów przeciwdrobnoustrojowych.
- (b) Zbadano aktywność przeciwgrzybową opisanych ekstraktów metanolowych wobec *A. niger* metodą dyfuzji radialnej (Rozdział III.6.6.2).
- (c) Poziom peptydów określano po ich rozdzielaniu metodą HPLC i identyfikacji z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą degradacji Edmana (Rozdział III.6.18). Względny poziom wyznaczono na podstawie oceny wysokości pików na chromatogramie. Istotność statystyczną wyznaczono dla różnic pomiędzy średnimi wartościami (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi po immunizacji α-1,3-glukanem (5 μg) oraz 30% DMSO i zaznaczono za pomocą gwiazdek: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Def - defensyna *G. mellonella*, Pro-1 – peptyd prolinowy 1, Pro-2 – peptyd prolinowy 2, Cek D – cekropina D, An-1 – peptyd anionowy 1, An-2 – peptyd anionowy 2.

IV.2.4.2. Poziom ekspresji peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym

W celu określenia, czy za zwiększony poziom peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu *A. niger* odpowiada ich wzmożona synteza w ciele tłuszczowym, zbadano poziom ekspresji genów dla peptydów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną, m. in. wykazujących aktywność przeciwgrzybową gallerimycyny i defensyny *G. mellonella* (galiomycyny) oraz cekropiny i owadziego inhibitora metaloproteinaz (IMPI).

Analiza poziomu ekspresji genów w ciele tłuszczowym wykazała, że ilość transkryptów genów kodujących gallerimycynę i galiomycynę wzrosła, odpowiednio, ponad 3- i 4,5-krotnie, w czasie 5 godzin po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem, w porównaniu do owadów immunizowanych DMSO (Ryc. 36). Po 8 godzinach od immunizacji zaobserwowano już spadek ilości transkryptów tych genów o, odpowiednio, 12% i 26%. Poziom ekspresji genu cekropiny był 1,6- i 1,8-krotnie wyższy po podaniu α -1,3-glukanu w stosunku do podania DMSO, w czasie odpowiednio, 5 i 8 godzin po immunizacji. Natomiast ilość transkryptów genu IMPI wzrosła po immunizacji α -1,3-glukanem w porównaniu do podania DMSO 1,9- i 1,4-krotnie w czasie odpowiednio, 5 i 8 godzin po immunizacji. Najwyższy poziom ekspresji genów badanych peptydów stwierdzono zatem w czasie 5 godzin po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu *A. niger*. Po 8 godzinach od immunizacji poziom ekspresji ulegał obniżeniu (Ryc. 36).



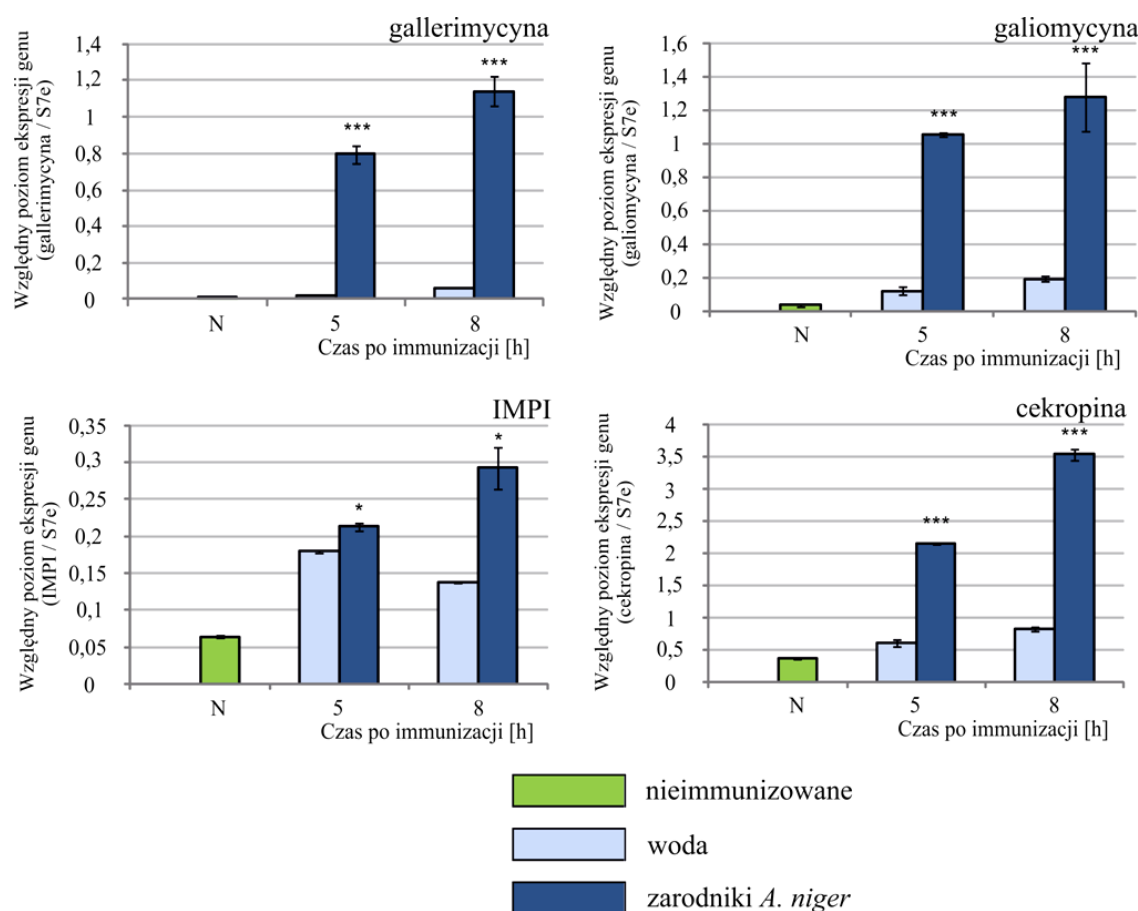
Ryc. 36. Poziom ekspresji genów wybranych peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po immunizacji α-1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

Poziom ekspresji genów gallerimycyny, galiomycyny, IMPI oraz cekropiny badano w ciele tłuszczowym pobranym z nieimmunizowanych gąsienic (N) oraz po 5 i 8 godzinach od immunizacji α-1,3-glukanem (5 µg) i 30% DMSO (3 µl), z wykorzystaniem Real Time qPCR (Rozdział III.6.21). Istotnie statystycznie różnice pomiędzy wartościami średnimi (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi w odpowiednich czasach po immunizacji α-1,3-glukanem i DMSO oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Podanie gąsienicom zarodników *A. niger* w dawce 1×10^5 skutkowało 33-krotnym wzrostem ekspresji genu gallerimycyny w stosunku do poziomu uzyskanego po podaniu wody, w czasie 5 godzin po immunizacji (Ryc. 37). W dłuższym czasie stwierdzono spadek ekspresji, jednak pozostawała ona na wysokim poziomie, stanowiącym 18-krotność poziomu zanotowanego u gąsienic po podaniu wody. Najwyższy poziom ekspresji genu galiomycyny również obserwowano po 5 godzinach od podania zarodników. Stwierdzono 8,7- i 6,7-krotny wzrost ekspresji tego genu w stosunku do poziomu u gąsienic immunizowanych wodą, w czasie odpowiednio, 5 i 8 godzin po immunizacji. Ekspresja genu kodującego cekropinę wzrosła 3,5- i 4,3-krotnie w czasie 5 i 8 godzin, w porównaniu do poziomu po podaniu wody. Ilość transkryptów

genu IMPI w kolejnych badanych czasach po immunizacji zarodnikami wzrosła o ok. 30% (Ryc. 37).

Wysoki poziom ekspresji genów peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej zarówno po 5, jak i 8 godzinach od immunizacji (Ryc. 37), może stanowić wyjaśnienie utrzymującej się dłużej aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu zarodników *A. niger*, co przedstawiono w Rozdziale IV.2.1.



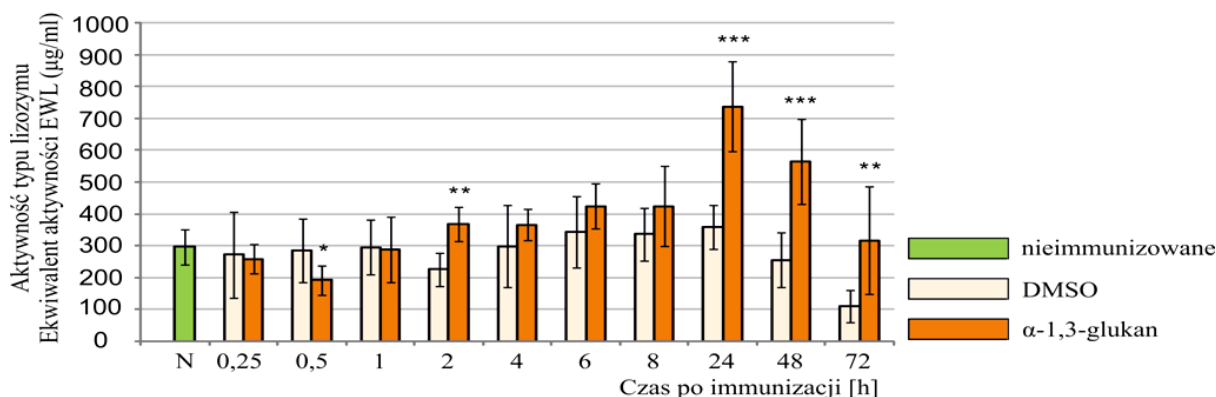
Ryc. 37. Poziom ekspresji genów wybranych peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po immunizacji zarodnikami *A. niger* i wodą.

Poziom ekspresji genów gallerimycyny, galiomycyny, IMPI oraz cekropiny badano w ciele tłuszczowym pobranym z nieimmunizowanych gąsienic (N) oraz po 5 i 8 godzinach od immunizacji zarodnikami *A. niger* (1×10^5) i wodą (3 μ l), z wykorzystaniem Real Time qPCR (Rozdział III.6.21). Istotne statystycznie różnice pomiędzy wartościami średnimi uzyskanymi w odpowiednich czasach po immunizacji zarodnikami i wodą oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

IV.2.5. Aktywność lizozymu w hemolimfie

Lizozym należy do białek zaangażowanych w walkę z drobnoustrojami, obecnych konstytutywnie w hemolimfie *G. mellonella*. Ze względu na swoją aktywność enzymatyczną względem peptydoglikanu, stanowi on broń wymierzoną szczególnie przeciw komórkom bakterii. Jednak jego poziom może wzrastać również w odpowiedzi na inne obce cząstki, których dostanie się do organizmu skutkuje zaburzeniem jego homeostazy (Yu i in., 2002).

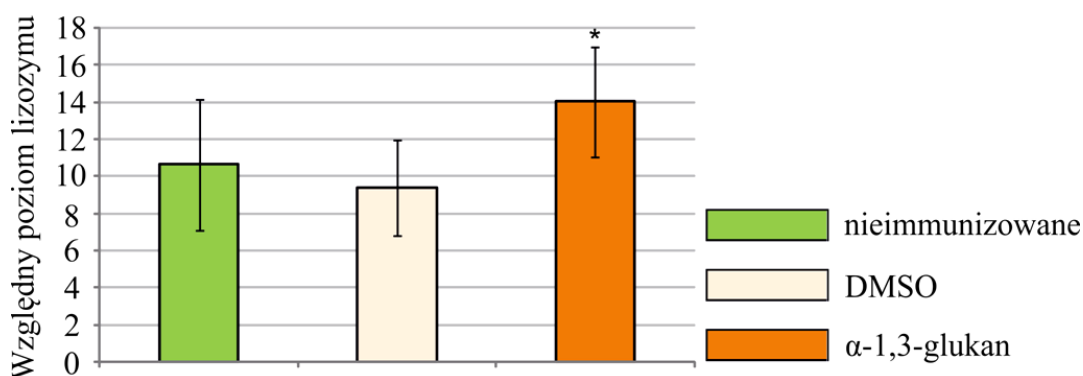
Aktywność lizozymu w hemolimfie nieimmunizowanych gąsienic *G. mellonella* odpowiada aktywności roztworu lizozymu białka jaja kurzego (EWL) o stężeniu 296 $\mu\text{g/ml}$. W czasie 0,5 godziny od podania gąsienicom α -1,3-glukanu stwierdzono spadek (o 35%) aktywności lizozymu w hemolimfie, do poziomu odpowiadającego aktywności roztworu EWL o stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ (Ryc. 38). Wykazano ponadto, że poziom aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic immunizowanych α -1,3-glukanem wzrastał 2-, 2,2- oraz 2,9-krotnie w porównaniu do owadów kontrolnych (DMSO) w czasie, odpowiednio, 24, 48 i 72 godziny po podaniu immunogenu (Ryc. 38). Najwyższy poziom aktywności lizozymu, odpowiadający aktywności roztworu EWL o stężeniu 737 $\mu\text{g/ml}$, stwierdzono w hemolimfie po 24 godzinach od podania α -1,3-glukanu. Odpowiada to czasowi, w którym w hemolimfie wykryto inne przejawy odpowiedzi immunologicznej gąsienic, między innymi aktywność przeciwgrzybową.



Ryc. 38. Aktywność lizozymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

Aktywność lizozymu oznaczano w hemolimfie metodą dyfuzji radialnej na płytkach z liofilizatem *M. lysodeictikus* (Rozdział III.6.8) i przedstawiono jako ekwiwalent aktywności lizozymu białka jaja kurzego (EWL) ($\pm$ odchylenie standardowe). Hemolimfę pobierano w czasie 0,25 - 72 godziny po immunizacji ($n=12$). Literą N oznaczono poziom aktywności lizozymu w hemolimfie owadów nieimmunizowanych. Istotność statystyczną wyznaczono dla różnic pomiędzy średnimi wartościami (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi w odpowiednich czasach po immunizacji α -1,3-glukanem (5 μg) oraz 30% DMSO i zaznaczono za pomocą gwiazdek: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

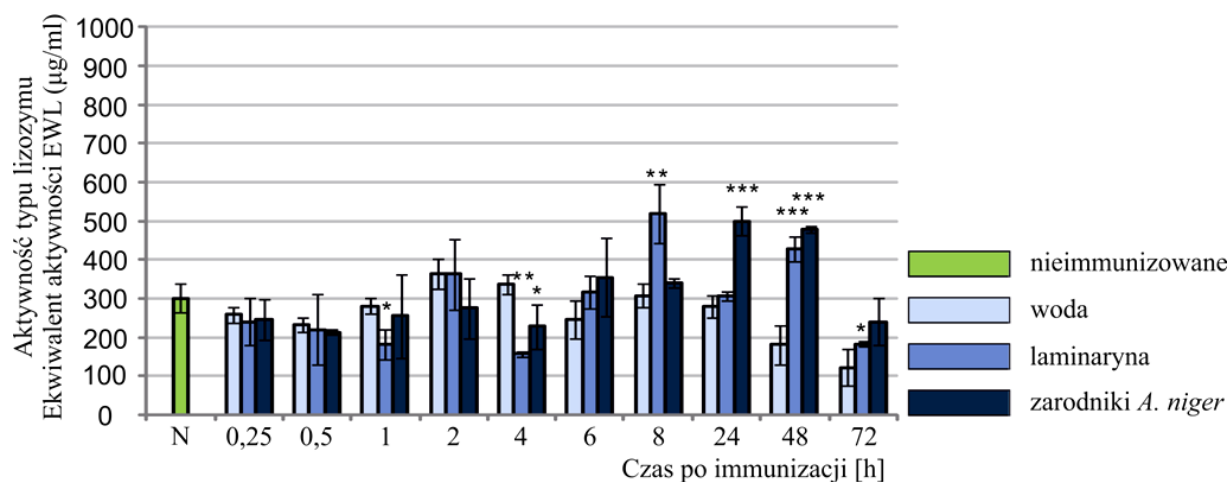
Analiza białek i peptydów obecnych w hemolimfie gąsienic (Rozdział III.6.18) potwierdziła, że lizozym obecny jest zarówno u owadów nieimmunizowanych, jak również po 24 godzinach od podania α -1,3-glukanu i DMSO. Wykazano, że względny poziom lizozymu w hemolimfie był w tym czasie istotnie wyższy po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem w porównaniu do immunizacji DMSO (Ryc. 39). Potwierdzono tym samym wyniki uzyskane metodą dyfuzji radialnej (Ryc. 38).



Ryc. 39. Poziom lizozymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

Poziom lizozymu w ekstraktach hemolimfy owadów nieimmunizowanych (N) oraz zebranej 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem (5 μ g) oraz 30% DMSO (n=30) określono po rozdziale metodą HPLC i identyfikacji metodą degradacji Edmana (Rozdział III.6.18). Względny poziom lizozymu wyznaczono na podstawie oceny wysokości pików na chromatogramie. Istotność statystyczną wyznaczono dla różnic pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi z trzech niezależnych doświadczeń po immunizacji α -1,3-glukanem oraz DMSO (* $p < 0,05$).

Wykorzystując metodę dyfuzji radialnej na płytkach z liofilizatem *M. lysodeikticus* wykazano wysoką aktywność lizozymu w hemolimfie gąsienic immunizowanych zarodnikami *A. niger* po 24 i 48 godzinach od immunizacji, podobnie jak po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu (Ryc. 40). Aktywność ta po 24 i 48 godzinach od immunizacji zarodnikami odpowiadała aktywności roztworu EWL o stężeniu 499 μ g/ml i 479 μ g/ml. Na podanie laminaryny gąsienice reagowały wcześniejszym wzrostem aktywności lizozymu w hemolimfie. Po 8 godzinach od immunizacji laminaryną, aktywność lizozymu odpowiadała aktywności roztworu EWL o stężeniu 518 μ g/ml. Podobnie jak po podaniu α -1,3-glukanu, okresowy spadek aktywności lizozymu stwierdzono również w hemolimfie gąsienic immunizowanych laminaryną i zarodnikami *A. niger*. Po 1 i 4 godzinach od podania gąsienicom laminaryny stwierdzono spadek o, odpowiednio, 35% i 54%, w porównaniu do gąsienic, którym podano wodę. Spadek aktywności lizozymu o 32% odnotowano również w hemolimfie gąsienic po 4 godzinach od podania zarodników *A. niger* (Ryc. 40).



Ryc. 40. Aktywność lizozymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po immunizacji laminaryną oraz zarodnikami *A. niger*.

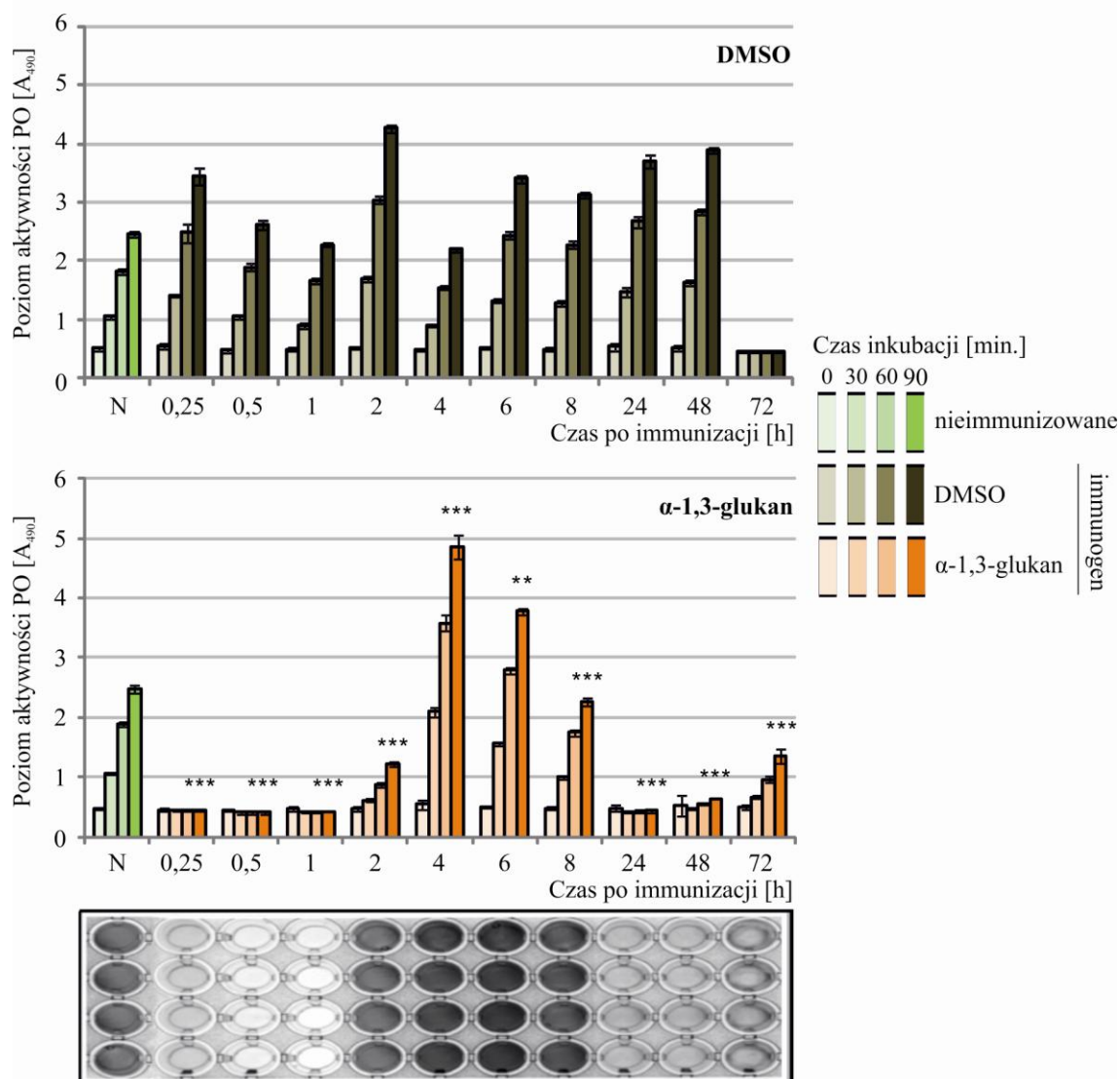
Aktywność lizozymu oznaczano w hemolimfie metodą dyfuzji radialnej na płytkach z liofilizatem *M. lysodeictikus* (Rozdział III.6.8) i przedstawiono jako ekwiwalent aktywności lizozymu białka jaja kurzego (EWL) ($\pm$ odchylenie standardowe). Hemolimfę pobierano w czasie 0,25 - 72 godziny po immunizacji laminaryną (50 μ g), zarodnikami *A. niger* (1×10^5) i wodą ($n=12$). Literą N oznaczono poziom aktywności lizozymu w hemolimfie owadów nieimmunizowanych. Istotność statystyczną wyznaczono dla różnic pomiędzy średnimi wartościami (z trzech niezależnych doświadczeń) uzyskanymi w odpowiednich czasach po immunizacji, odpowiednio, laminaryną/zarodnikami oraz wodą i zaznaczono za pomocą gwiazdek: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

IV.2.6. Aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie

Oksydaza fenolowa (PO) jest kluczowym enzymem procesu melanizacji, przez co wspomaga unieszkodliwianie ciał obcych, które dostały się do organizmu owada.

Wykazano, że w przeciwieństwie do owadów nieimmunizowanych oraz immunizowanych samym DMSO, podanie α -1,3-glukanu *A. niger* hamowało aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic (Ryc. 41). Zahamowanie aktywności PO obserwowano w czasie od 0,25 do 1 godziny od podania α -1,3-glukanu. Po tym czasie aktywność wzrastała, a jej maksimum zanotowano w hemolimfie pobranej 4 godziny od podania tego immunogenu. Poziom aktywności PO był w tym czasie dwukrotnie wyższy w porównaniu do poziomu aktywności w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych oraz po immunizacji DMSO. W hemolimfie pobranej 6 i 8 godzin po immunizacji α -1,3-glukanem obserwowano stopniowy spadek aktywności enzymu, aż do zahamowania aktywności w czasie 24 godzin po immunizacji. W odróżnieniu od immunizacji α -1,3-glukanem, w hemolimfie gąsienic immunizowanych

DMSO zahamowanie aktywności PO stwierdzono jedynie 72 godziny po podaniu immunogenu (Ryc. 41).

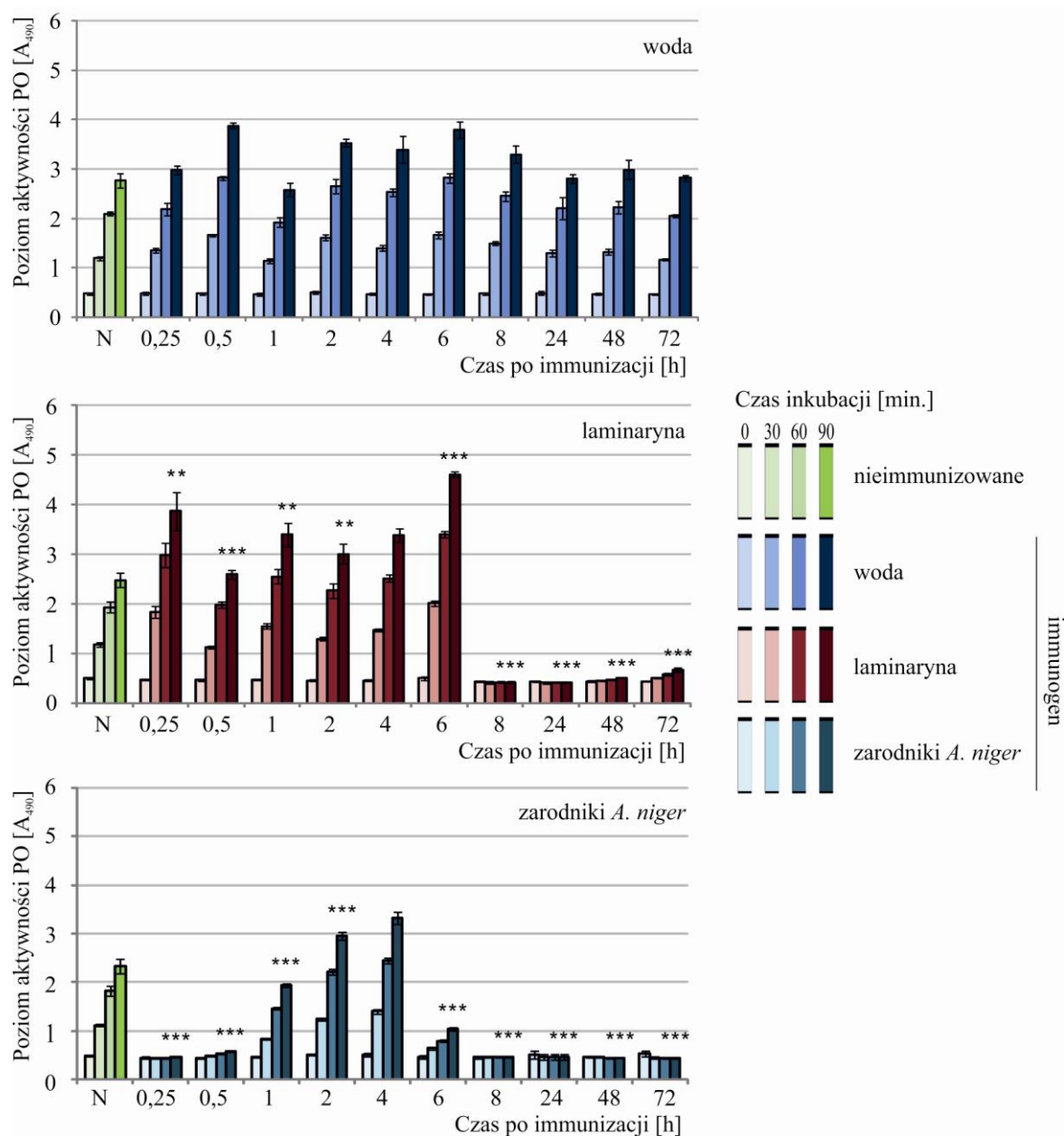


Ryc. 41. Aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

Aktywność oksydazy fenolowej (PO) (Rozdział III.6.9) oznaczono w hemolimfie gąsienic po 0,25 - 72 godzinach od immunizacji α -1,3-glukanem (5 μ g) i 30% DMSO. Na wykresie przedstawiono poziom aktywności PO jako wartość absorbancji przy długości fali $\lambda = 490$ nm w wybranych punktach czasowych: 0, 30, 60 i 90 minut (odpowiadających czasowi inkubacji hemolimfy z substratem) ($\pm$ odchylenie standardowe). Poziom aktywności w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych oznaczono literą N. Istotność statystyczną różnicy pomiędzy wartościami średnimi w poszczególnych czasach po immunizacji α -1,3-glukanem i DMSO, odczytaną po 90 minutach inkubacji, oznaczono gwiazdkami: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Fotografia znajdująca się poniżej wykresów przedstawia przykładowy obraz, który uzyskano po 90 minutach inkubacji hemolimfy owadów immunizowanych α -1,3-glukanem z L-DOPA. Poszczególne kolumny widocznej płytki 96-dołkowej odpowiadają kolejnym czasom po immunizacji, według kolejności zaznaczonej na wykresie.

Zaobserwowano podobieństwo w kinetyce zmian aktywności PO w hemolimfie po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu i zarodników *A. niger* (Ryc. 42). W obu przypadkach, w początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej po podaniu tych immunogenów (od 0,25 do 0,5 godziny), następowało całkowite zahamowanie aktywności PO, po czym zanotowano przejściowe pojawienie się aktywności enzymu obserwowane od 1 do 6 godzin po podaniu zarodników i od 2 do 8 godzin po podaniu α -1,3-glukanu. Natomiast, w odróżnieniu od immunizacji α -1,3-glukanem, zahamowanie aktywności PO po podaniu zarodników stwierdzono w czasie od 8 do 72 godzin. Należy zaznaczyć, że we wszystkich badanych czasach po podaniu zarodników *A. niger* poziom aktywności PO w hemolimfie pozostawał na niższym poziomie w porównaniu do poziomu w hemolimfie gąsienic immunizowanych wodą. Nie stwierdzono również zahamowania aktywności PO w żadnym z badanych czasów po podaniu gąsienicom wody (Ryc. 42).

W przypadku immunizacji gąsienic *G. mellonella* laminarną (50 μ g), kinetyka zmian aktywności PO w hemolimfie, w krótkim czasie po podaniu (0,25 godziny), była odmienna od kinetyki po podaniu α -1,3-glukanu i zarodników *A. niger*. Nie obserwowano wówczas zahamowania aktywności PO (Ryc. 42).



Ryc. 42. Aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po immunizacji laminarną i zarodnikami *A. niger*.

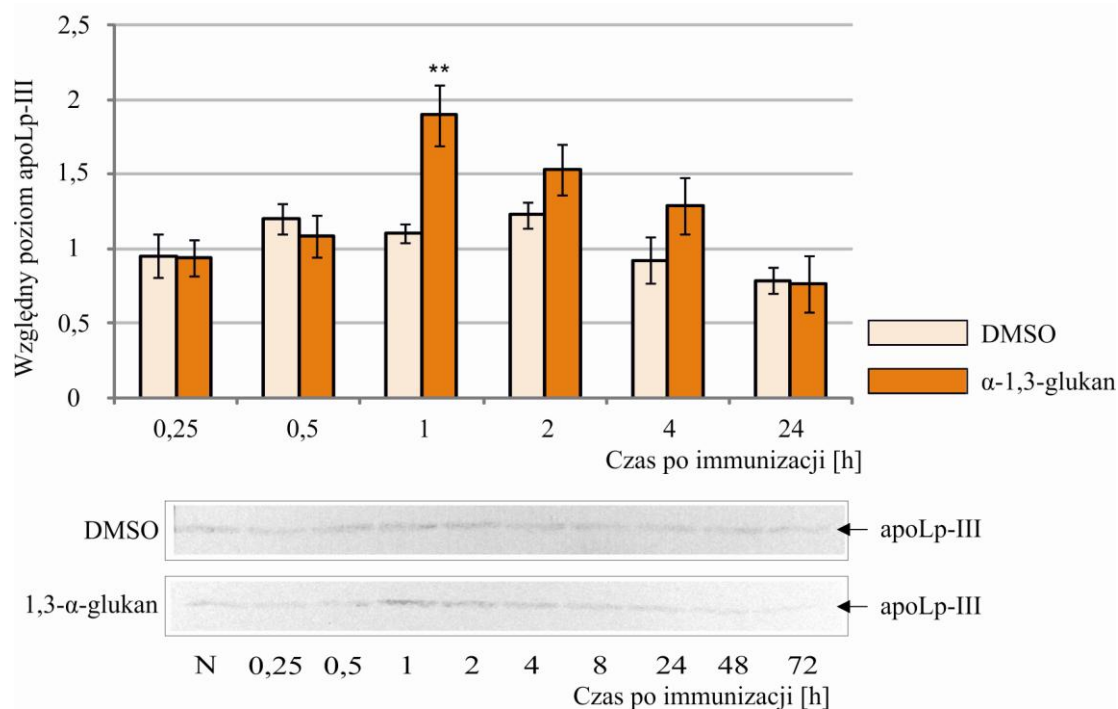
Aktywność oksydazy fenolowej (PO) (Rozdział III.6.9) oznaczono w hemolimfie gąsienic po 0,25 - 72 godzinach od immunizacji laminarną (50 μ g), zarodnikami *A. niger* (1×10^5) i wodą. Na wykresie przedstawiono poziom aktywności PO jako wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=490$ nm w wybranych punktach czasowych: 0, 30, 60 i 90 minut (odpowiadających czasowi inkubacji hemolimfy z substratem) ($\pm$ odchylenie standardowe). Poziom aktywności w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych oznaczono literą N. Istotność statystyczną różnicy pomiędzy wartościami średnimi w poszczególnych czasach po immunizacji laminarną/zarodnikami *A. niger* i wodą, odczytaną po 90 minutach inkubacji, oznaczono gwiazdkami: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

IV.2.7. Udział apolipoforyny III w odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* na α -1,3-glukan *A. niger*

Analiza obrazu rozdzielonych elektroforetycznie białek hemolimfy *G. mellonella* wykazała stosunkowo dużą ilość białka o masie cząsteczkowej około 18 kDa (Ryc. 32), a elektroforeza 2D uwidoczniała trzy jego izoformy (Ryc. 34). Identyfikacji tego białka jako apolipoforyna III (apoLp-III) dokonano na podstawie dostępnych danych literaturowych (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011), jak również wyników uzyskanych metodą immunoblottingu z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał przeciwko apoLp-III, zgodnie z opisem w Rozdziale III.6.17. Poza podstawową funkcją związaną z transportem lipidów, apoLp-III bierze również udział w reakcjach odpornościowych, podczas których jej rola polega między innymi na przekazywaniu sygnału o infekcji pomiędzy hemocytami i ciałem tłuszczowym. W celu oceny zaangażowania apoLp-III w odpowiedź immunologiczną *G. mellonella* na α -1,3-glukan *A. niger* prześledzono zmiany jej poziomu w hemolimfie oraz lokalizacji w hemocytach gąsienic po immunizacji tym składnikiem ściany komórkowej grzybów.

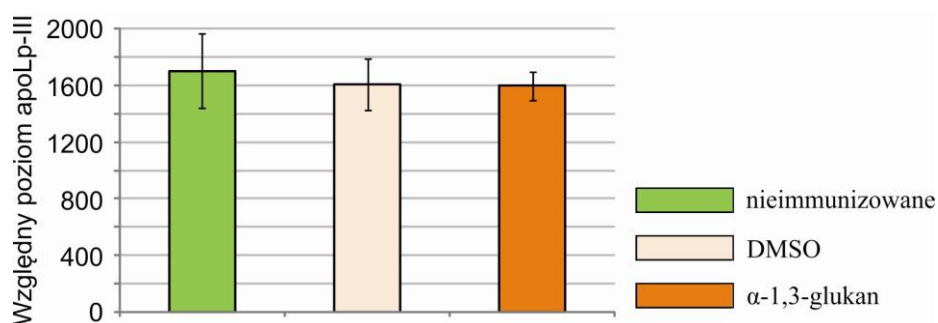
IV.2.7.1. Poziom apolipoforyny III w hemolimfie

Obecność apoLp-III potwierdzono w hemolimfie owadów nieimmunizowanych, jak również po podaniu α -1,3-glukanu i DMSO, metodą immunoblottingu, stosując przeciwciała skierowane specyficznie przeciw apoLp-III. Wykazano, że poziom apoLp-III wzrastał w hemolimfie pobranej 1 godzinę po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu; w pozostałych badanych punktach czasowych różnice nie były statystycznie istotne (Ryc. 43). Analiza poziomu apoLp-III przeprowadzona po rozdziale ekstraktów metanolowych hemolimfy pobranej 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem i DMSO metodą HPLC (rozdział III.6.18) potwierdziła, że poziom białka nie ulegał w tym czasie zmianie (Ryc. 44).



Ryc. 43. Poziom apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* immunizowanych α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

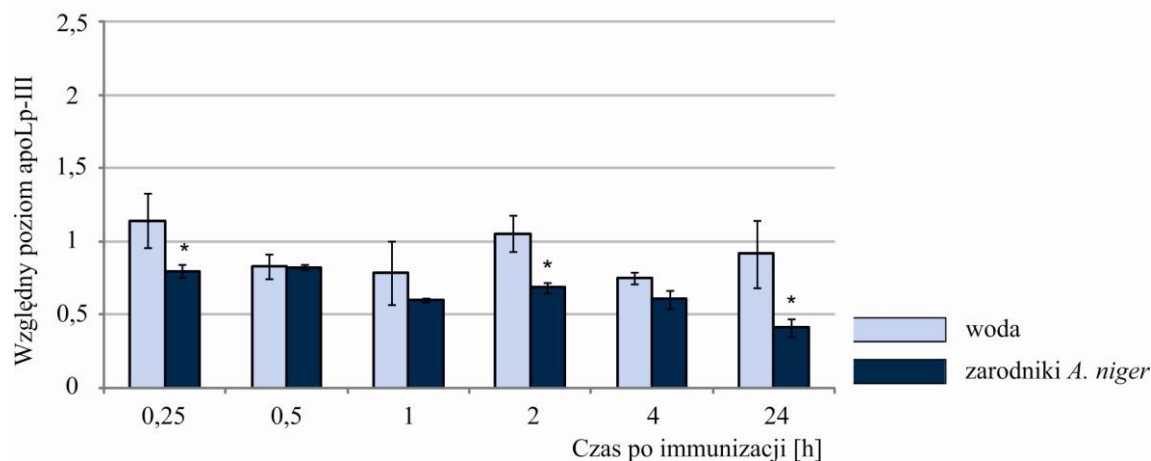
Białka hemolimfy (3 μ g) gąsienic nieimmunizowanych (N) oraz pobranej 0,25 - 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem (5 μ g) i 30% DMSO (n=12) rozdzielono elektroforetycznie i przeniesiono na membranę (Rozdział III.6.13 i Rozdział III.6.16). Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi przeciwko apoLp-III i II-rzędowymi sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną uwidoczniono na membranie prążki białkowe o masie ok. 18 kDa, odpowiadające położeniu apoLp-III (Rozdział III.6.17), których reprezentatywny obraz umieszczono na fotografii poniżej wykresu. Przeprowadzono analizę densytometryczną uzyskanych prążków, przyjmując relatywną wartość N=1. Poziom istotności wyznaczony dla różnic pomiędzy średnimi wartościami z trzech niezależnych doświadczeń uzyskanymi dla α -1,3-glukanu i DMSO oznaczono gwiazdkami: ** $p \leq 0,01$.



Ryc. 44. Względny poziom apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

Poziom apoLp-III w ekstraktach hemolimfy owadów nieimmunizowanych (N) oraz zebranej 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem (5 μ g) oraz 30% DMSO określono po rozdziale metodą HPLC (n=30) (Rozdział III.6.18). Względny poziom apoLp-III wyznaczano na podstawie oceny wysokości pików na chromatogramie. Istotność statystyczną wyznaczano dla różnic pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi z trzech niezależnych doświadczeń po immunizacji α -1,3-glukanem oraz DMSO.

Po podaniu gąsienicom zarodników *A. niger* (1×10^5) nie zanotowano wzrostu poziomu apoLp-III w hemolimfie, jaki stwierdzono po podaniu α -1,3-glukanu. Poziom apoLp-III był niższy niż określony w hemolimfie gąsienic po podaniu wody (Ryc. 45). Istotnie statystycznie różnice poziomu apoLp-III zanotowano w hemolimfie pobranej 0,25, 2 i 24 godziny od podania zarodników *A. niger*.



Ryc. 45. Poziom apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* immunizowanych zarodnikami *A. niger* i wodą.

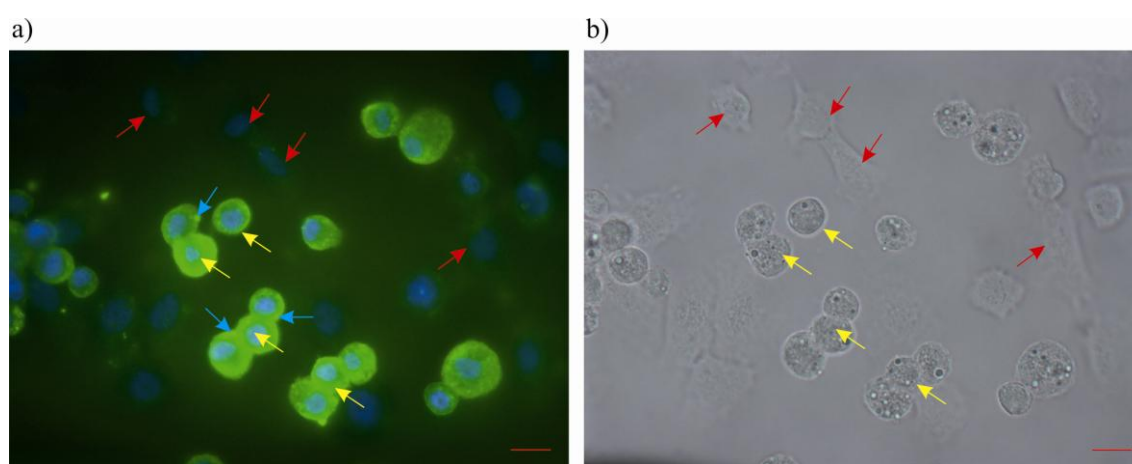
Białka hemolimfy (3 μ g) gąsienic nieimmunizowanych (N) oraz pobranej 0,25 - 24 godziny po immunizacji zarodnikami *A. niger* (1×10^5) i wodą (n=12) rozdzielono elektroforetycznie i przeniesiono na membranę (Rozdział III.6.13 i Rozdział III.6.16). Po inkubacji z przeciwciałami I-rzędowymi przeciwko apoLp-III i II-rzędowymi sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną uwidoczniło na membranie prążki białkowe o masie ok. 18 kDa, odpowiadające położeniu apoLp-III (Rozdział III.6.17). Przeprowadzono analizę densytometryczną uzyskanych prążków, przyjmując relatywną wartość N=1. Poziom istotności wyznaczony dla różnic pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi dla zarodników *A. niger* i wody oznaczono gwiazdką: * $p < 0,05$.

IV.2.7.2. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach

Uzupełnieniem badań nad udziałem apoLp-III w odpowiedzi immunologicznej na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*, była ocena zmian jej lokalizacji w hemocytach *G. mellonella*. W celu wykrycia apoLp-III, hemocyty przygotowane według opisu w Rozdziale III.6.20, inkubowano ze specyficznymi przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko apoLp-III oraz przeciwciałami drugorzędowymi znakowanymi izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). W celu dokonania wnikliwej analizy lokalizacji apoLp-III i określenia czy jest ona obecna wewnątrz komórki, przeprowadzono równocześnie doświadczenia, w których utrwalone na szkiełku hemocyty inkubowano bez oraz w obecności Tritonu X-100. Zastosowanie tego

detergentu powodowało łagodne zmiany błony komórkowej hemocytów, umożliwiające penetrację przeciwciał do wnętrza komórki.

Obrazy hemocytów gąsienic nieimmunizowanych uzyskane w mikroskopie fluorescencyjnym wykazały możliwość wewnątrzkomórkowej lokalizacji apoLp-III (Ryc. 46). Ze względu na właściwości adherentne w przygotowanych preparatach obecne były granulocyty i plazmatocyty. Zaobserwowano, że lokalizacja apoLp-III jest zależna od typu hemocytów. Zieloną fluorescencję, wskazującą na obecność apoLp-III, uwidoczniono jedynie w granulocytach (Ryc. 46). W plazmatocytach widoczne były tylko niebiesko wybarwione jądra komórkowe (Ryc. 46a).



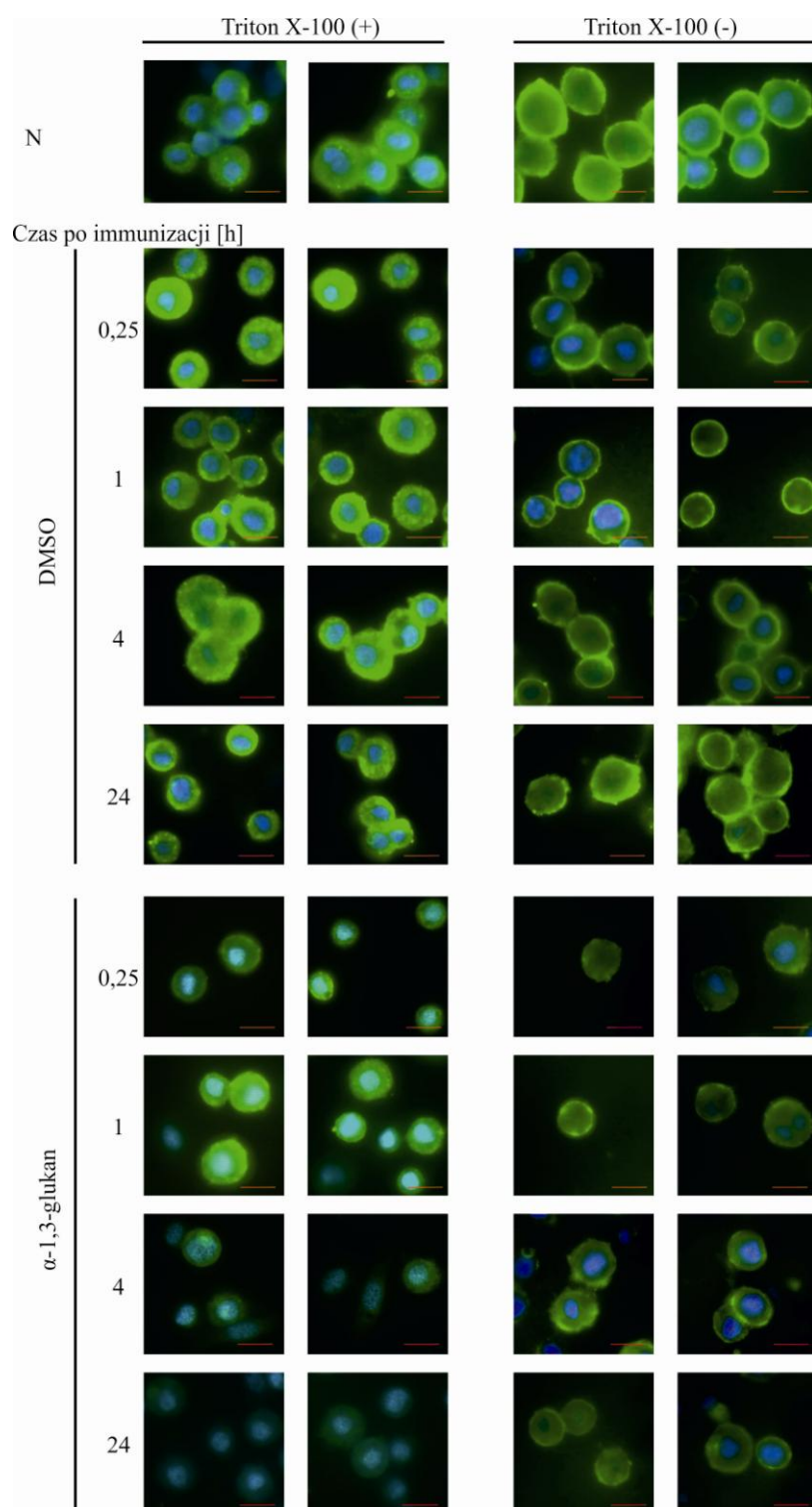
Ryc. 46. Wykrywanie apolipoforyny III w hemocytach *G. mellonella*.

Hemocyty pobrane z gąsienic nieimmunizowanych utrwalono na szkiełku i inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi przeciwko apoLp-III i II-rzędowymi znakowanymi FITC (Rozdział III.6.20). Zielona fluorescencja odpowiada lokalizacji apoLp-III w komórkach. Jądra hemocytów barwiono Hoechst 32258 (niebieska fluorescencja). Obrazy wykonano przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego przy długości fali $\lambda=495/517$ nm (a) oraz w świetle przechodzącym (b). Czerwonymi strzałkami oznaczono plazmatocyty, żółtymi - granulocyty, niebieskimi - lokalizację apoLp-III. Skala – 10 μ m.

Wykazano, że poziom fluorescencji wewnątrz hemocytów pobranych w czasie 0,25, 1, 4 i 24 godziny po podaniu gąsienicom DMSO wzrastał nieznacznie ponad poziom obserwowany w hemocytach owadów nieimmunizowanych (Ryc. 47). Natomiast po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem *A. niger* fluorescencja obserwowana w hemocytach była na zdecydowanie niższym poziomie, co mogło odzwierciedlać spadek zawartości apoLp-III. Szczególnie wyraźną redukcję fluorescencji zaobserwowano w hemocytach po 0,25, 4 i 24 godzinach od immunizacji α -1,3-glukanem. W czasie 1 godziny po podaniu α -1,3-glukanu poziom fluorescencji

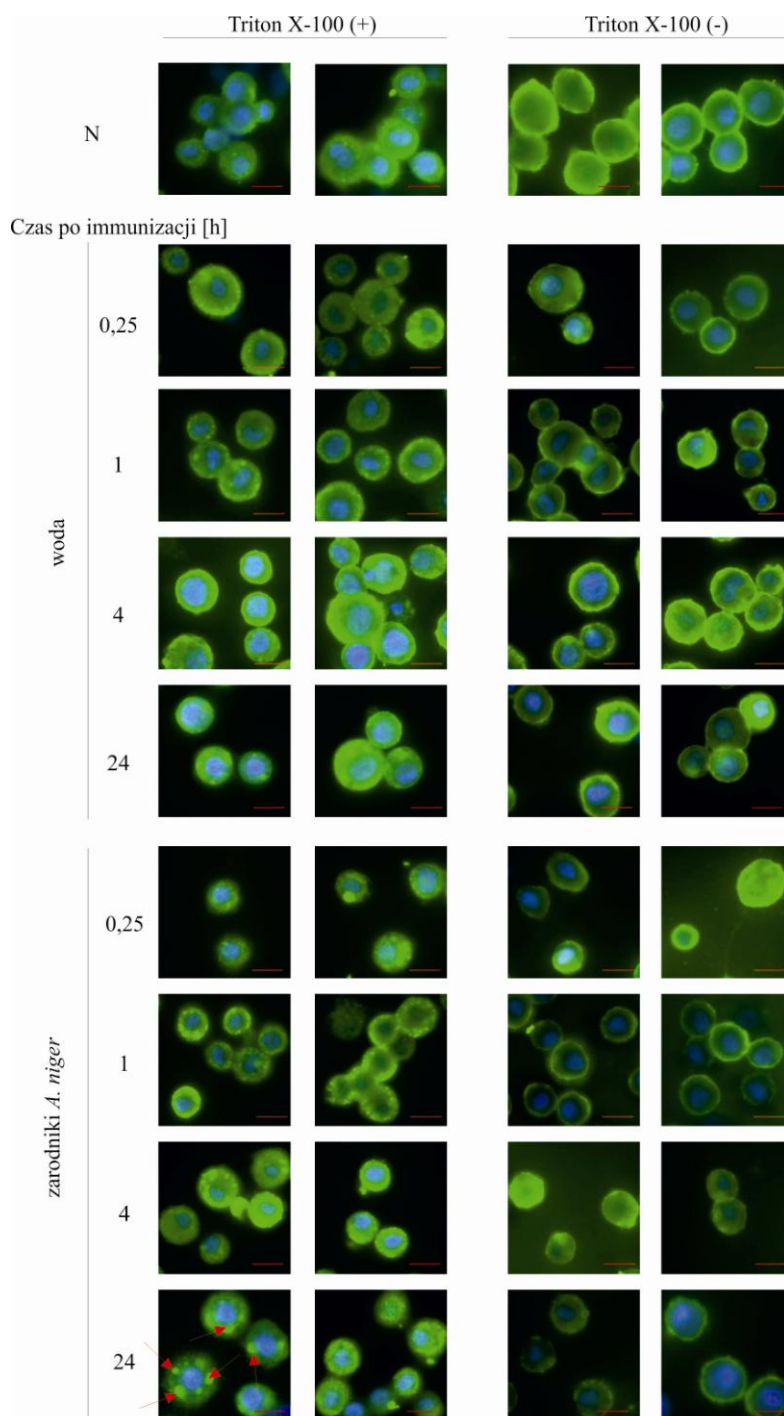
wzrastał, wskazując na przejściowy wzrost zawartości apoLp-III w hemocytach. Doświadczenie to umożliwiło dodatkowo obserwacje zmian liczby hemocytów. Po 15 minutach od immunizacji stwierdzono mniejszą liczbę komórek w preparatach. Redukcja liczby hemocytów dotyczyła zwłaszcza plazmatocytów, co potwierdzono analizą hemocytogramu – Rozdział IV.3. Jej powodem mógł być faktyczny spadek liczby plazmatocytów krążących w hemolimfie po immunizacji, ale także przejściowa utrata zdolności do adhezji na skutek działania α -1,3-glukanu *A. niger*. W preparatach hemocytów po 4 godzinach od podania α -1,3-glukanu obserwowana była natomiast duża liczba plazmatocytów silnie rozplaszczonych na powierzchni szkiełka, z długimi wypustkami, co mogło wskazywać na zwiększenie ich właściwości adherentnych. Po 24 godzinach od podania gąsienicom α -1,3-glukanu, w preparatach widoczne były hemocyty pozbawione zielonej fluorescencji (Ryc. 47).

W odróżnieniu od zmian obserwowanych po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem, wskazujących na spadek zawartości apoLp-III w hemocytach, po podaniu wody czy zarodników *A. niger* zielona fluorescencja widoczna była w hemocytach we wszystkich czasach po immunizacji (Ryc. 48). Punktowe zmiany mogące wskazywać na zgrupowania apoLp-III wewnątrz hemocytów obserwowano szczególnie po podaniu gąsienicom zarodników. Podobnie, jak po podaniu α -1,3-glukanu, zaobserwowano spadek liczby hemocytów w preparatach przygotowanych z hemolimfy pobranej w krótkim czasie (15 minut) od immunizacji zarodnikami *A. niger* (Ryc. 48).



Ryc. 47. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* i DMSO.

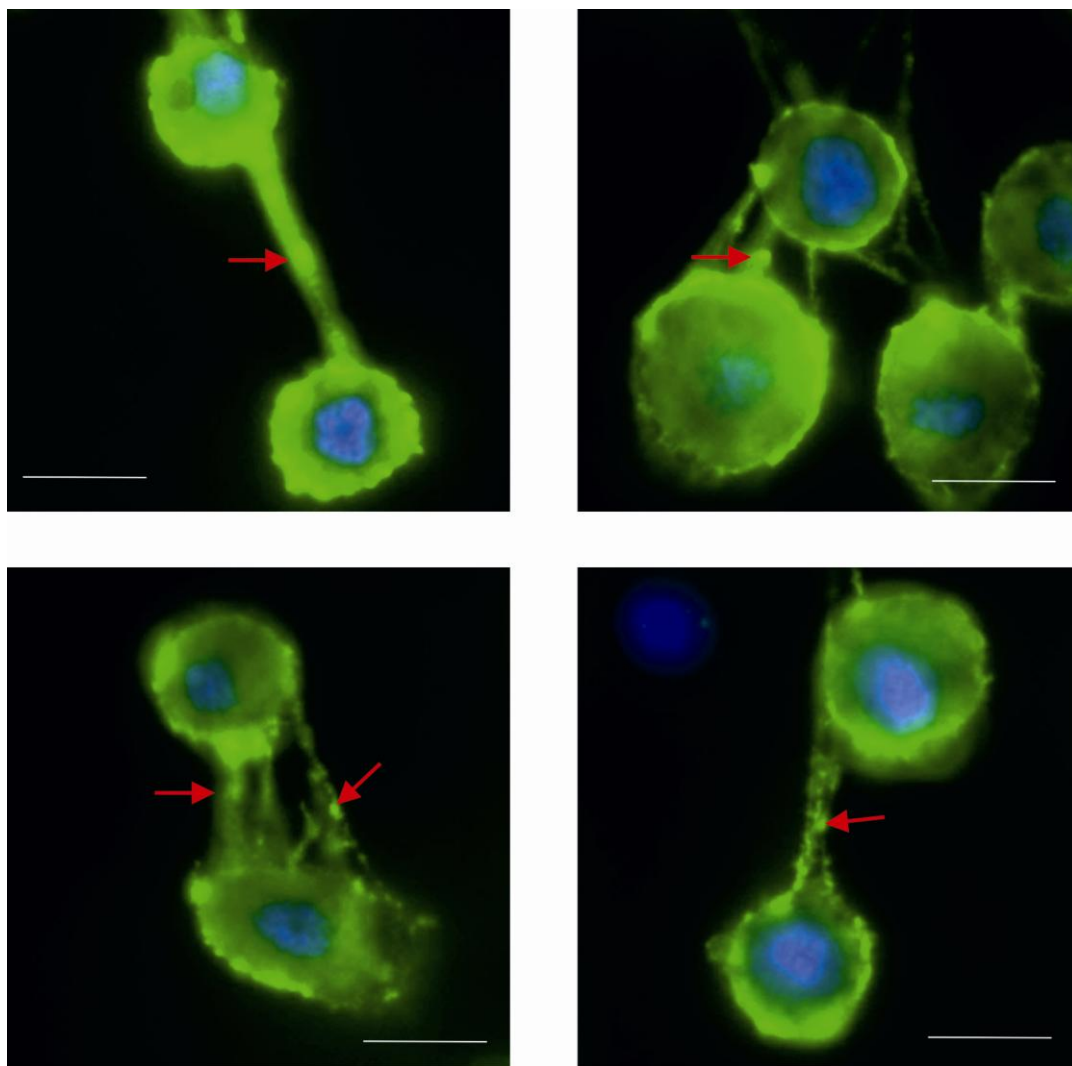
Hemocyty pozyskano z gąsienic nieimmunizowanych (N) oraz 0,25, 1, 4 oraz 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem (5 μ g) i 30% DMSO. Przeprowadzono równocześnie doświadczenia, w których hemocyty po utrwaleniu inkubowano z (+) / bez (-) dodatku Tritonu X-100. Hemocyty inkubowano następnie z przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi przeciwko apoLp-III i II-rzędowymi znakowanymi FITC. Zielona fluorescencja odpowiada lokalizacji apoLp-III. Jądra hemocytów barwiono Hoechst 32258 (niebieska fluorescencja). Przedstawiono reprezentatywne obrazy wykonane przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego (Rozdział III.6.20). Skala – 10 μ m.



Ryc. 48. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach *G. mellonella* po immunizacji zarodnikami *A. niger* i wodą.

Hemocyty pozyskano z gąsienic nieimmunizowanych (N) oraz 0,25, 1, 4 oraz 24 godziny po immunizacji zarodnikami *A. niger* (1×10^5) i wodą. Przeprowadzono równocześnie doświadczenia, w których hemocyty po utrwaleniu inkubowano z (+) / bez (-) dodatku Tritonu X-100. Hemocyty inkubowano następnie z przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi przeciwko apoLp-III i II-rzędowymi znakowanymi FITC. Zielona fluorescencja odpowiada lokalizacji apoLp-III w komórkach. Jądra hemocytów barwiono Hoechst 32258 (niebieska fluorescencja). Przedstawiono reprezentatywne obrazy wykonane przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego (Rozdział III.6.20). Strzałkami zaznaczono zgrupowania apoLp-III wewnątrz hemocytów. Skala – 10 μ m.

Doświadczenia mające na celu lokalizację apoLp-III w hemocytach *G. mellonella* dostarczyły również informacji o możliwości zaangażowania apoLp-III w proces krzepnięcia hemolimfy. We włóknach utworzonych podczas formowania monowarstwy hemocytów uwidoczniono punkty wykazujące zieloną fluorescencję, wskazujące na obecność apoLp-III (Ryc. 49).



Ryc. 49. Udział apolipoforyny III w procesie krzepnięcia hemolimfy *G. mellonella*.

Preparaty hemocytów *G. mellonella* inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi skierowanymi przeciwko apoLp-III i II-rzędowymi znakowanymi FITC (Rozdział III.6.20). Czerwonymi strzałkami zaznaczono punkty wykazujące zieloną fluorescencję wskazującą na lokalizację apolipoforyny III. Skala – 10 μm .

IV.3. Odpowiedź komórkowa gąsienic *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*

Zaangażowanie hemocytów w odpowiedź komórkową jest istotnym elementem reakcji obronnych owadów, w których ciała obce usuwane są, w zależności od wielkości, w procesie fagocytozy, nodulacji bądź inkapsulacji. O uruchomieniu mechanizmów odpowiedzi komórkowej, jako reakcji na rozpoznanie ciała obcego w organizmie, może świadczyć zmiana całkowitej liczby hemocytów THC (ang. *total hemocyte count*), jak również zmiana w proporcjach poszczególnych typów hemocytów DHC (ang. *differential hemocyte count*).

IV.3.1. Analiza hemocytogramu hemolimfy

Całkowitą liczbę hemocytów oraz poszczególnych ich typów w hemolimfie gąsienic immunizowanych α -1,3-glukanem, zarodnikami *A. niger*, DMSO i wodą, określano poprzez zliczanie w komorze Bürkera zgodnie z opisem w Rozdziale III.6.22. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie bezwzględnych wartości liczbowych (Tab. 4, Tab. 5) oraz procentowego udziału poszczególnych typów hemocytów w badanej populacji komórek (Ryc. 50). Zwrócono uwagę na fakt, że pomimo znacznych różnic osobniczych dotyczących całkowitej liczby hemocytów (THC), jak również liczby hemocytów określonych typów (Tab. 4, Tab. 5), procentowy ich udział w populacji hemocytów każdego osobnika w ramach danego doświadczenia był zbliżony (Ryc. 50).

Analizując THC wykazano, że po 2 i 4 godzinach od immunizacji α -1,3-glukanem oraz DMSO średnia liczba wszystkich hemocytów była niemal dwukrotnie większa w porównaniu do liczby hemocytów gąsienic nieimmunizowanych i wynosiła ok. $1,6-2 \times 10^4$ w 1 μ l hemolimfy (Tab. 4). Zwiększona liczba hemocytów obserwowana 2 godziny po podaniu tych immunogenów wynikała głównie ze wzrostu liczby plazmatocytów, natomiast 4 godziny po podaniu, ze wzrostu liczby granulocytów. Zwracał również uwagę trzykrotny wzrost liczby sferulocytów po 2 i 4 godzinach od immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger*. Istotny statystycznie wzrost liczby hemocytów po podaniu α -1,3-glukanu, w porównaniu do immunizacji DMSO, stwierdzono po 0,5 godzinie (Tab. 4).

W przypadku podania zarodników *A. niger*, istotny statystycznie wzrost liczby hemocytów, w porównaniu do liczby hemocytów u gąsienic nieimmunizowanych, obserwowano już po 1 godzinie od immunizacji (Tab. 5). Dodatkowo, stan ten utrzymywał się dłużej niż po innych immunogenach. Jeszcze 24 godziny po

immunizacji stwierdzono podwyższony poziom całkowitej liczby hemocytów. Wzrost THC w czasie od 1 do 24 godzin po immunizacji wynikał głównie ze wzrostu liczby granulocytów, ale również ze wzrostu liczby sferulocytów. Liczba granulocytów zwiększała się we wszystkich badanych czasach. Podanie gąsienicom wody powodowało wzrost liczby hemocytów po 4 godzinach, wynikający ze wzrostu liczby granulocytów i sferulocytów. Istotny statystycznie wzrost liczby hemocytów po podaniu zarodników, w porównaniu do immunizacji wodą, stwierdzono po 1, 4 i 24 godzinach od immunizacji (Tab. 5).

Wyraźną zmianą obserwowaną po 15 minutach od podania każdego z badanych immunogenów był około dwukrotny spadek liczby plazmatocytów w porównaniu do ich liczby u owadów nieimmunizowanych. Po podaniu α -1,3-glukanu spadek ten był największy, o ok. 60% (Tab. 4, Tab. 5).

Interesującą obserwacją był wzrost liczby sferulocytów, który zaznaczał się w różnym czasie po podaniu każdego z immunogenów, między innymi w czasie od 1 do 24 godzin po immunizacji zarodnikami *A. niger*. Z kolei w czasie 2 i 4 godzin po podaniu α -1,3-glukanu, średnia liczba sferulocytów wzrastała ponad 3-krotnie, osiągając najwyższe wartości w stosunku do ich liczby określonej po podaniu innych immunogenów (Tab. 4, Tab. 5).

Liczba enocytoidów w hemolimfie owadów immunizowanych α -1,3-glukanem wzrosła 4- i 3-krotnie, odpowiednio, 4 i 24 godziny od podania, w stosunku do liczby tych hemocytów w hemolimfie owadów nieimmunizowanych. Podobny wzrost obserwowano po podaniu gąsienicom DMSO w czasie 2 i 24 godzin od immunizacji (Tab. 4). Około 3-krotny wzrost liczby enocytoidów odnotowano po 4 i 24 godzinach od podania, odpowiednio, wody i zarodników *A. niger* (Tab. 5).

Tab. 4. Zmiany całkowitej liczby hemocytów (THC) oraz hemocytów poszczególnych typów po immunizacji gąsienic *G. mellonella* α -1,3-glukanem *A. niger* (a) oraz DMSO (b).

a) α -1,3-glukan

Czas [h]	Ogólna liczba hemocytów	Granulocyty	Plazmatocyty	Sferulocyty	Enocytoidy
N	10698±1616 ^a	5401±1119 ^a	4750±356 ^a	474±249 ^a	73±65 ^a
0,25	8596±1280 ^{ab}	5896±999 ^{ab}	1971±499 ^b	558±34 ^{ab***}	171±104 ^{ab}
0,5	16000±1686 ^{c*}	10868±1100 ^c	4431±1507 ^{ac}	493±194 ^{abc}	208±75 ^{abc}
1	14349±7366 ^{abcd}	9115±4464 ^{abcd}	4406±3081 ^{abcd}	646±236 ^{abcd}	182±69 ^{abcd}
2	17008±2693 ^{cde}	7029±1643 ^{abde}	7996±3513 ^{cde}	1779±802 ^e	204±135 ^{abcde}
4	18963±5186 ^{cdef}	12358±3952 ^{cdf}	4763±1443 ^{acdef}	1538±416 ^{e*}	304±113 ^{bcdef}
24	14604±4368 ^{acdef}	5036±1898 ^{abde}	8646±2552 ^{cde}	708±358 ^{abcd}	214±91 ^{bcdef}

b) DMSO

Czas [h]	Ogólna liczba hemocytów	Granulocyty	Plazmatocyty	Sferulocyty	Enocytoidy
N	10698±1616 ^a	5401±1119 ^a	4750±356 ^a	474±249 ^a	73±65 ^a
0,25	9868±1243 ^{ab}	6778±1034 ^{ab}	2174±122 ^b	736±43 ^{ab}	181±11 ^{ab}
0,5	12979±567 ^{ac}	8653±1346 ^{bc}	3417±1121 ^{abc}	799±277 ^{abc}	111±43 ^{abc}
1	18021±7463 ^{abcd}	11306±4960 ^{abcd}	5451±2629 ^{abcd}	1097±280 ^{bcd}	167±127 ^{abcd}
2	16549±2496 ^{cde}	5785±1564 ^{abcde}	9778±1107 ^{de}	660±349 ^{abcde}	326±175 ^{bcde}
4	20552±4640 ^{cdef}	11906±2166 ^{cdf}	7896±2622 ^{acdef}	615±221 ^{abcdef}	135±74 ^{abcdef}
24	19542±9035 ^{abcdef}	12819±5840 ^{abcdef}	5889±3067 ^{abcdef}	632±67 ^{abcdef}	201±154 ^{bcdef}

Gąsienice (5 osobników na grupę) immunizowano α -1,3-glukanem (5 μ g) lub 30% DMSO. Hemocyty zliczano w komorze Bürkera w preparatach przygotowanych ze świeżo pobranej hemolimfy po 0,25, 0,5, 1, 2, 4 i 24 godzinach od immunizacji i różnicowano na podstawie ich morfologii (Rozdział III.6.22). W tabeli podano liczbę hemocytów znajdującą się w 1 μ l hemolimfy ($\pm$ odchylenie standardowe). Poziom istotności wyznaczony dla różnic pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi dla α -1,3-glukanu i DMSO oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Wartości oznaczone różnymi literami w obrębie jednej grupy (poszczególne grupy mieszczą się w kolejnych kolumnach tabeli) różnią się statystycznie $p < 0,05$. N – hemocyty gąsienic nieimmunizowanych.

Tab. 5. Zmiany całkowitej liczby hemocytów (THC) oraz hemocytów poszczególnych typów po immunizacji gąsienic *G. mellonella* zarodnikami *A. niger* (a) i wodą dejonizowaną (b).

a) zarodniki *A. niger*

Czas [h]	Ogólna liczba hemocytów	Granulocyty	Plazmatocyty	Sferulocyty	Enocytoidy
N	10698±1616 ^a	5401±1119 ^a	4750±356 ^a	474±249 ^a	73±65 ^a
0,25	12775±1504 ^{ab}	8804±1724 ^b	2350±298	1429±386 ^{b*}	192±85 ^{ab}
0,5	12071±2074 ^{abc}	7596±1467 ^{bc}	3088±576 ^c	1233±129 ^{bc}	154±67 ^{abc}
1	16317±1690 ^{d*}	10642±1080 ^{bcd***}	4471±857 ^{acd}	1054±540 ^{abcd}	150±48 ^{abcd}
2	15550±2816 ^{bcde}	9967±1911 ^{bcde}	4283±1264 ^{acde}	1121±374 ^{bcde}	179±75 ^{abcde}
4	19208±1568 [*]	12908±1001 ^{ef**}	5021±953 ^{adef}	1204±262 ^{bcdef}	75±56 ^{acdef**}
24	17904±3535 ^{de*}	12146±2868 ^{bdef*}	4300±1442 ^{acdef}	1258±555 ^{bcdef}	200±38 ^{bcde}

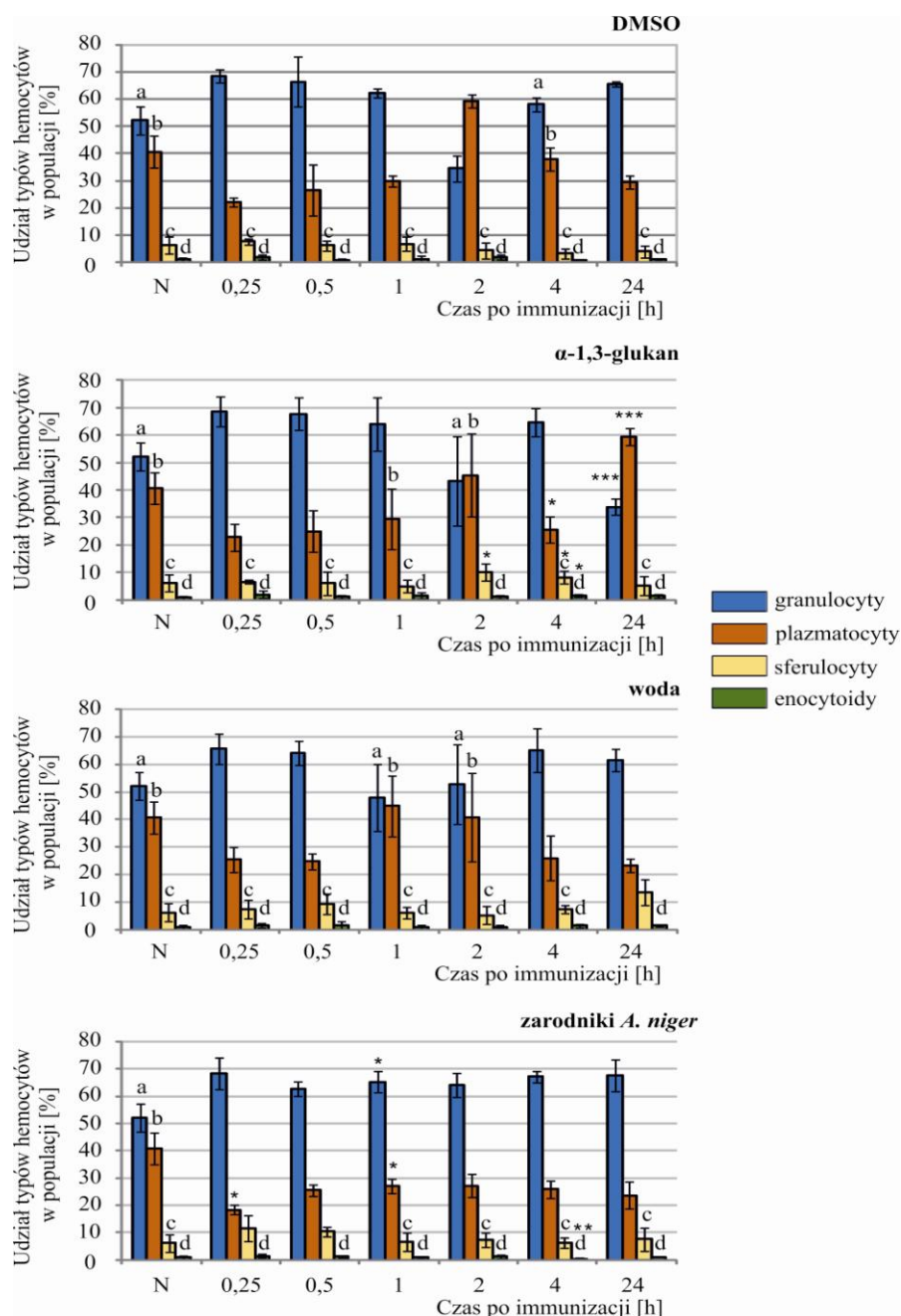
b) woda

Czas [h]	Ogólna liczba hemocytów	Granulocyty	Plazmatocyty	Sferulocyty	Enocytoidy
N	10698±1616 ^a	5401±1119 ^a	4750±356 ^a	474±249 ^a	73±65 ^a
0,25	10013±5416 ^{ab}	6588±3734 ^{ab}	2658±1697 ^b	650±234 ^{ab}	117±28 ^{ab}
0,5	11554±3892 ^{abc}	7333±2378 ^{abc}	2942±1185 ^{bc}	1125±575 ^{abc}	154±92 ^{abc}
1	12177±2580 ^{abcd}	6484±1224 ^{abcd}	4849±2801 ^{abcd}	750±316 ^{abcd}	94±91 ^{abcd}
2	12688±3854 ^{abcde}	7633±2845 ^{abcde}	4142±781 ^{abcde}	767±553 ^{abcde}	146±26 ^{abcde}
4	15263±2234 ^{bcdef}	9883±1477 ^{ce}	4046±1555 ^{abcdef}	1125±296 ^{cdef}	208±66 ^{cdef}
24	10719±3060 ^{abcdef}	6469±1948 ^{abcde}	2594±1029 ^{bcd}	1490±417 ^{cef}	167±70 ^{abcdef}

Gąsienice (5 osobników na grupę) immunizowano zarodnikami *A. niger* (1×10^5) lub wodą. Hemocyty zliczano w komorze Bürkera w preparatach przygotowanych ze świeżo pobranej hemolimfy po 0,25, 0,5, 1, 2, 4 i 24 godzinach od immunizacji i różnicowano na podstawie ich morfologii (Rozdział III.6.22). W tabeli podano liczbę hemocytów znajdującą się w 1 μ l hemolimfy ($\pm$ odchylenie standardowe). Poziom istotności wyznaczony dla różnic pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi dla zarodników i wody oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wartości oznaczone różnymi literami w obrębie jednej grupy (poszczególne grupy mieszczą się w kolejnych kolumnach tabeli) różnią się statystycznie $p < 0,05$. N – hemocyty gąsienic nieimmunizowanych.

Analiza procentowego udziału poszczególnych typów hemocytów (DHC) w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych wykazała, że granulocyty stanowią średnio 52%, plazmatocyty 41%, sferulocyty 6,1%, a enocytoidy 0,9% wszystkich hemocytów (Ryc. 50). Przeanalizowano zmiany we względnym udziale poszczególnych typów hemocytów w czasie 0,25, 0,5, 1, 2, 4 i 24 godziny po podaniu α -1,3-glukanu, DMSO, zarodników *A. niger* i wody. Wykazano, że po 15 minutach od podania każdego z immunogenów, procentowy udział granulocytów w populacji hemocytów zwiększał się do około 70% (68% po podaniu α -1,3-glukanu), czemu towarzyszył spadek udziału plazmatocytów. Na podstawie analizy bezwzględnej liczby hemocytów wykazano, że dominacja granulocytów wynikała w tym czasie raczej ze spadku liczby plazmatocytów niż wzrostu liczby granulocytów (Tab. 4). Wyjątek stanowiło podanie zarodników *A. niger*, gdzie po 15 minutach od immunizacji spadkowi liczby plazmatocytów towarzyszył wzrost liczby granulocytów (Tab. 5).

Obserwowane proporcje w udziale tych dwóch typów hemocytów utrzymywały się do 1 godziny po podaniu α -1,3-glukanu. Uwagę zwraca dominująca przewaga granulocytów zanotowana niemal we wszystkich czasach po podaniu zarówno α -1,3-glukanu, jak również DMSO i zarodników *A. niger*, z wyjątkiem hemolimfy pobranej 24 godziny po podaniu α -1,3-glukanu, kiedy to zaobserwowano istotną statystycznie przewagę plazmatocytów (w stosunku do ich udziału po podaniu DMSO) (Ryc. 50). W czasie 2 godzin po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem, DMSO oraz wodą obserwowano zachwianie utrzymującej się we wcześniejszych czasach tendencji do dominującego udziału granulocytów; stwierdzono zrównanie udziału granulocytów i plazmatocytów, bądź jak w przypadku DMSO, zwiększenie udziału plazmatocytów. Udział sferulocytów i enocytoidów wzrastał, odpowiednio, po 2 – 4 godzinach oraz 4 godziny od podania α -1,3-glukanu, w porównaniu do gąsienic immunizowanych DMSO. Zauważono, że 4 godziny od podania zarodników *A. niger* udział enocytoidów spadał w porównaniu do udziału tych hemocytów w hemolimfie gąsienic po podaniu wody (Ryc. 50).



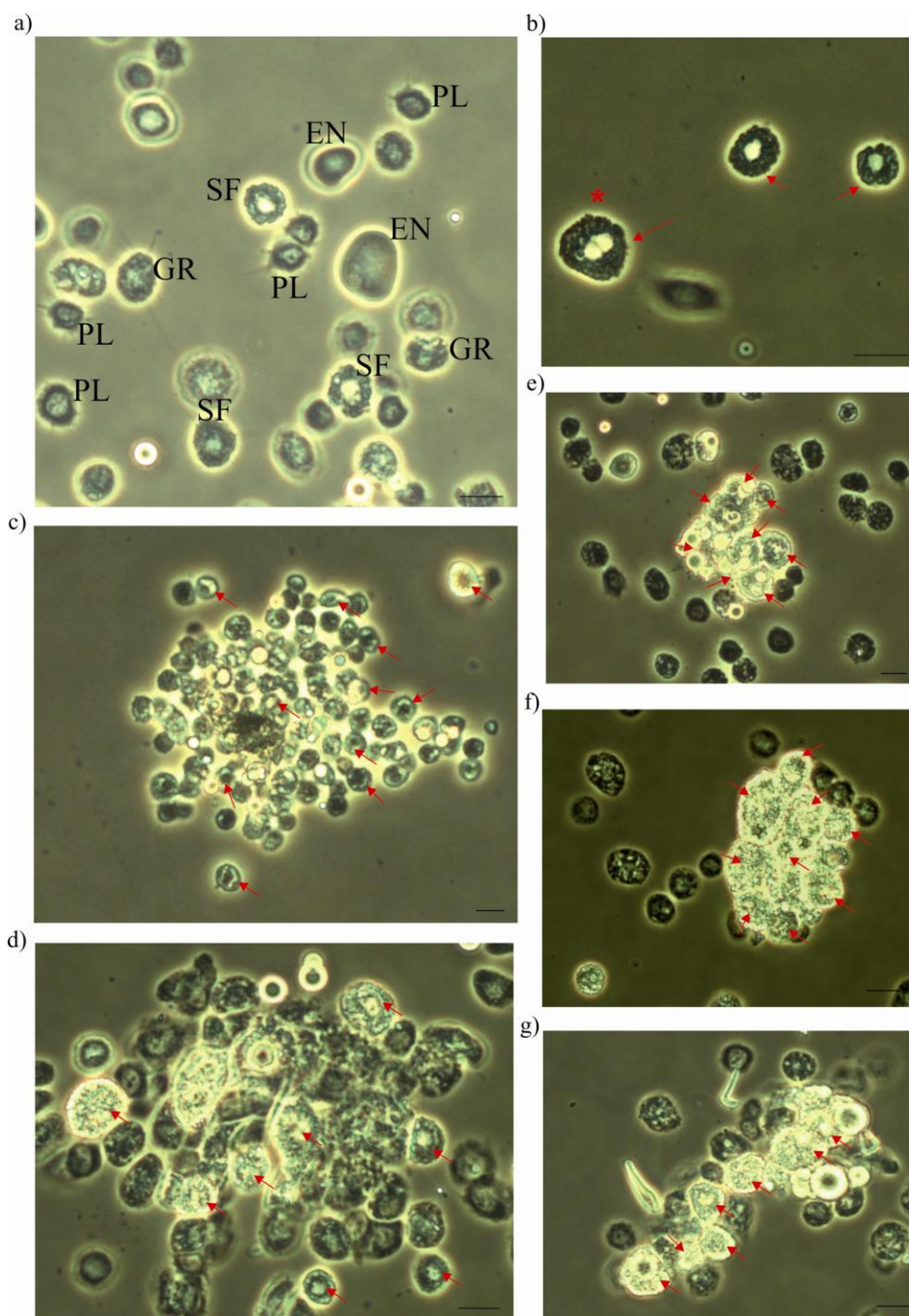
Ryc. 50. Względny udział poszczególnych typów hemocytów w populacji (DHC), po immunizacji gąsienic *G. mellonella* α -1,3-glukanem *A. niger*, DMSO, zarodnikami *A. niger* oraz wodą.

Gąsienice (5 osobników na grupę) immunizowano α -1,3-glukanem (5 μ g), 30% DMSO, zarodnikami *A. niger* (1×10^5) lub wodą. Hemocyty zliczano w komorze Bürkera w preparatach przygotowanych ze świeżo pobranej hemolimfy po 0,25 - 24 godzinach od immunizacji i różnicowano na podstawie ich morfologii (Rozdział III.6.22). Za 100% przyjęto liczbę wszystkich hemocytów znajdujących się w 1 μ l świeżo pobranej hemolimfy. Wyniki zaprezentowano jako wartość średnią ($\pm$ odchylenie standardowe). Poziom istotności wyznaczony dla różnic pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi dla α -1,3-glukanu i DMSO oraz zarodników i wody oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Istotność statystyczną różnic pomiędzy wartościami określającymi względny udział danego typu hemocytów w populacji hemocytów owadów nieimmunizowanych oraz w różnych czasach po immunizacji oznaczono poprzez brak wspólnej litery ($p < 0,05$). N – hemocyty gąsienic nieimmunizowanych.

IV.3.2. Formowanie nodul w hemocelu gąsienic

Udział hemocytów w odpowiedzi immunologicznej wiąże się między innymi z unieszkodliwianiem ciał obcych poprzez odseparowanie ich od reszty organizmu w postaci struktur zwanych nodulami lub kapsułami. Na wstępie analizowano obecność agregatów hemocytów (stanowiących początkowy etap formowania nodul) w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych oraz 0,25 - 72 godziny po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger* lub DMSO. W hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych nie stwierdzono występowania agregatów hemocytów. Natomiast po immunizacji α -1,3-glukanem i DMSO agregaty były obecne w hemolimfie we wszystkich badanych czasach po podaniu immunogenów. Największą ich liczbę wykryto 2 godziny po immunizacji, przy czym ich liczba po podaniu α -1,3-glukanu była trzykrotnie większa niż po podaniu DMSO i wynosiła, odpowiednio, 7,5 (odchylenie standardowe $\pm$ 2,5) oraz 2,5 (odchylenie standardowe $\pm$ 1,5) w 5 μ l hemolimfy. Uwagę zwróciła też znaczna liczba sferulocytów widoczna w obrębie powstałych agregatów (Ryc. 51).

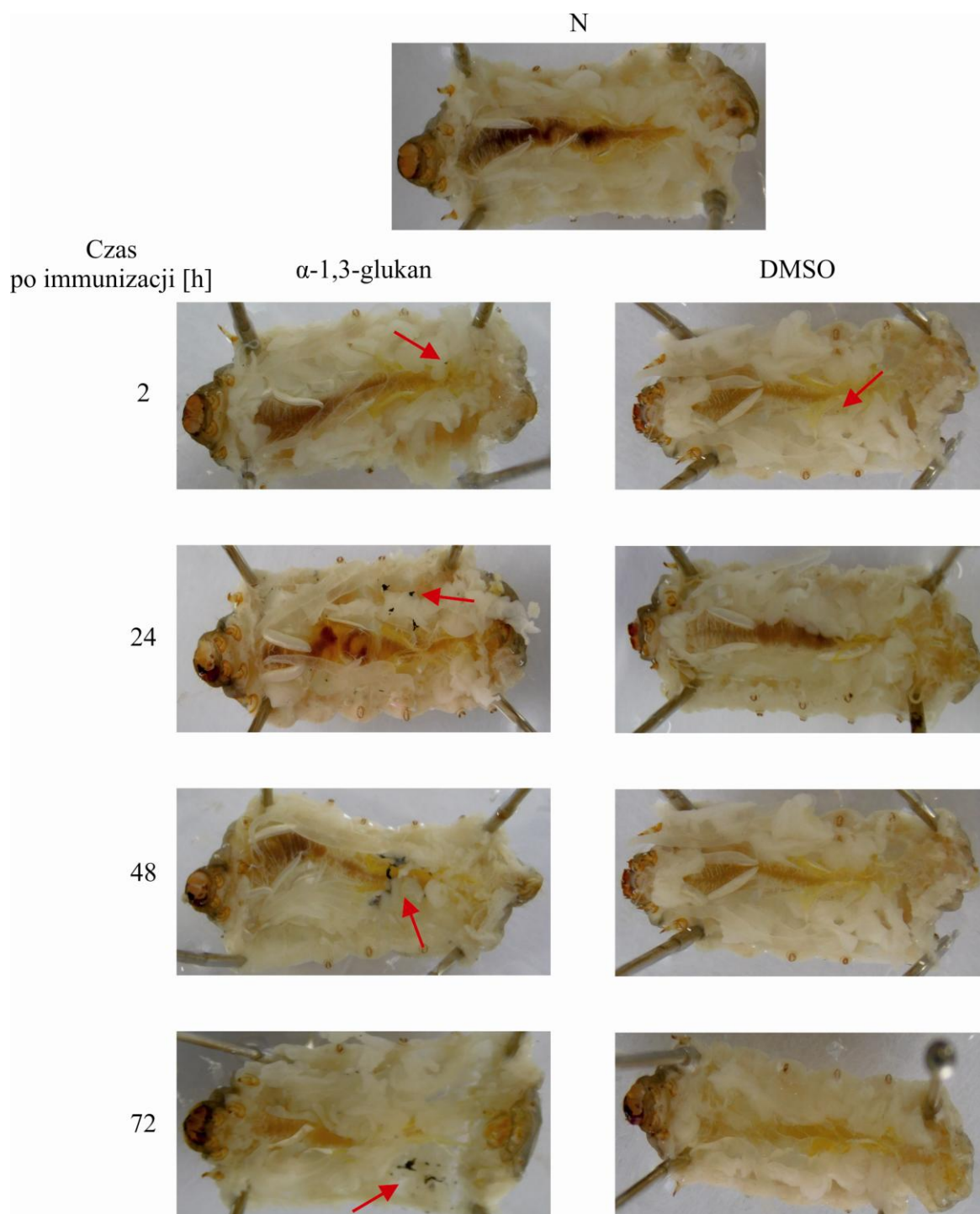
Zmianom mikroskopowym towarzyszyły łatwo dostrzegalne zmiany w obrazie makroskopowym po dysekcji ciała gąsienicy (Ryc. 52). Po 2 godzinach od immunizacji α -1,3-glukanem i DMSO widoczne były w obu przypadkach jedynie pojedyncze punkty o ciemnej barwie. Natomiast w czasie 24, 48 i 72 godzin po podaniu α -1,3-glukanu uwidoczniono wyraźne ciemne struktury, odpowiadające zmelanizowanym nodulom, przylegające do ciała tłuszczowego i powłok ciała gąsienicy, których nie stwierdzono po podaniu DMSO (Ryc. 52).



Ryc. 51. Udział hemocytów w odpowiedzi komórkowej *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*.

- (a) Obraz hemocytów obecnych w hemolimfie nieimmunizowanych gąsienic *G. mellonella*. PL – plazmatocyt, GR – granulocyt, SF – sferulocyt, EN – enocytoid.
- (b) Obraz sferulocytów obecnych w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*. Gwiazdką oznaczono sferulocyt najprawdopodobniej w trakcie podziału mitotycznego.
- (c) Reprezentatywny obraz agregatu powstałego *in vivo* w hemocelu gąsienic *G. mellonella* w godzinę po podaniu α -1,3-glukanu (5 μ g). Czerwonymi strzałkami zaznaczono obecność sferulocytów.
- (d) – (g) Przykładowe obrazy wskazujące na znaczny udział sferulocytów (czerwone strzałki) w formowaniu agregatów hemocytów *G. mellonella* *in vivo* po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*.

Obrazy uzyskano przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego. Skala - 10 μ m.



Ryc. 52. Obraz makroskopowy zmelanizowanych nodul powstałych w hemocelu *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger*.

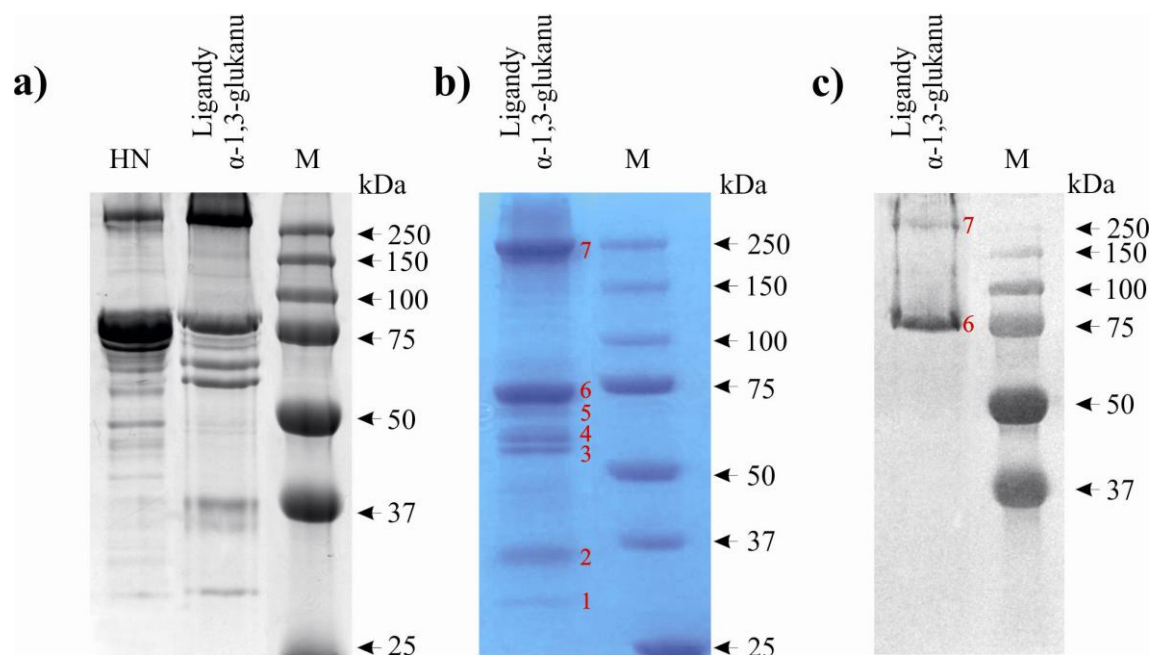
Przedstawiono reprezentatywny obraz gąsienic po dysekcji przeprowadzonej 2, 24, 48 i 72 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem (5 μ g) oraz 30% DMSO (n=3). Przedstawiono gąsienicę nieimmunizowaną (N). Czerwonymi strzałkami zaznaczono zmelanizowane nodule.

IV.4. Identyfikacja białek hemolimfy *G. mellonella* oddziałujących z α -1,3-glukanem *A. niger*

Pierwszym etapem reakcji odpornościowej jest rozpoznanie ciała obcego, które spowodowało zaburzenie homeostazy organizmu gospodarza. Przedstawione wcześniej wyniki wykazały, że α -1,3-glukan *A. niger* indukował odpowiedź immunologiczną gąsienic *G. mellonella*, co wskazuje, że ten składnik ściany komórkowej grzybów jest rozpoznawany przez układ odpornościowy barciaka większego.

W celu identyfikacji białek hemolimfy wiążących się do α -1,3-glukanu przeprowadzono inkubację zawiesiny tego polisacharydu z hemolimfą nieimmunizowanych gąsienic *G. mellonella* zgodnie z opisem w Rozdziale III.6.19. Białka, które wiązały się do α -1,3-glukanu rozdzielono elektroforetycznie, uwidoczniono na żelu poliakrylamidowym (Ryc. 53a) oraz przeniesiono na membranę, na której po wybarwieniu wyodrębniono 7 prążków białkowych (oznaczonych cyframi od 1 do 7), przeznaczonych do dalszej identyfikacji (Ryc. 53b). Sekwencjonowanie metodą degradacji Edmana umożliwiło identyfikację pięciu z nich, oznaczonych cyframi od 1 do 5 (Ryc. 53b, Tab. 6). Białko o masie cząsteczkowej ok. 30 kDa (1) zidentyfikowano jako czynnik aktywujący oksydazę fenolową *G. mellonella*; wykazuje ono również znaczne podobieństwo do peptydaz serynowych różnych gatunków motyli (Tab. 6). Białko o masie cząsteczkowej ok. 37 kDa (2) wykazuje podobieństwo do tryptazy *Papilio polytes* i innych peptydaz serynowych motyli oraz w pełni odpowiada białku kodowanemu w genomie *G. mellonella*, którego rola nie została jeszcze opisana. Białko o masie cząsteczkowej ok. 55 kDa (3), zidentyfikowano jako profenolooksydazę *G. mellonella*. Białka o masach 57 kDa (4) i 61 kDa (5) zidentyfikowano jako białka wiążące β -1,3-glukan *G. mellonella*, wykazujące znaczne podobieństwo do białek wiążących β -1,3-glukan innych motyli (Tab. 6). W celu identyfikacji białek znajdujących się w prążkach (6) i (7), o masach cząsteczkowych, odpowiednio, 75 kDa i 250 kDa, użyto metody immunoblottingu z przeciwciałami skierowanymi przeciwko apolipoforynie I i II (Ryc. 53c). Detekcja barwnych prążków odpowiadających masom ok. 75 kDa i 250 kDa wskazała, że poszukiwane białka to, odpowiednio, apolipoforyna I i II (Stączek in., 2018). Białka te analizowano również techniką spektrometrii mas, która potwierdziła rezultaty uzyskane z użyciem przeciwciał. Dodatkowo, w prążku odpowiadającym masie cząsteczkowej 75 kDa zidentyfikowano heksamerynę *G. mellonella* i arylforynę *G. mellonella*. Stwierdzono ponadto, że białko 250 kDa

wykazuje podobieństwo do lipoforyny *Plutella xylostella* i *Helicoverpa armigera* (Tab. 6).



Ryc. 53. Rozdział elektroforetyczny (a, b) oraz immunodetekcja (c) białek hemolimfy *G. mellonella* wiążących się do α -1,3-glukanu *A. niger*.

Hemolimfę gąsienic nieimmunizowanych (HN) inkubowano z zawiesiną α -1,3-glukanu przez 0,5 godziny (Rozdział III.6.19). Białka hemolimfy, które związały się z α -1,3-glukanem („ligandy α -1,3-glukanu”) rozdzielono elektroforetycznie i barwiono Coomassie Brilliant Blue R-250 (Rozdział III.6.13) (a), bądź przenoszono na membranę (Rozdział III.6.16) i barwiono Coomassie Brilliant Blue R-250 (b) albo poddano immunoblottingowi (c) (Rozdział III.6.17). Prążki białkowe oznaczone na membranie (b) czerwonymi cyframi od 1 do 5 wycinano z membrany, a następnie białka poddawano sekwencjonowaniu od N-końca (Rozdział III.6.19). Białka znajdujące się w prążku 6 i 7 (b) identyfikowano metodą spektrometrii mas (Rozdział III.6.19) oraz metodą immunoblottingu z wykorzystaniem przeciwciał I-rzędowych skierowanych przeciwko apolipoforynie I i II (c).

Tab. 6. Białka hemolimfy *G. mellonella* wiążące się do α -1,3-glukanu *A. niger*.

Nr	MW [kDa]	Zsekwencjonowany od N-końca fragment białka/peptyd zidentyfikowany w MS	Identyfikacja białka (% zgodnych reszt aminokwasowych)	Numer dostępu
1	~ 30	IIGDKDGEAKFGEFPWMVAI	100% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją czynnika aktywującego oksydazę fenolową <i>G. mellonella</i> (ang. <i>phenoloxidase - activating factor 2</i>)	XP_026749280.1
			95% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją tryptazy <i>Pieris rapae</i> oraz innych peptydaz serynowych motyli	XP_022125560.1
2	~ 37	LKDGPCPSYMDTCCLSPDRR	100% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją niescharakteryzowanego białka kodowanego w genomie <i>G. mellonella</i> (białko wiążące wapń, zawierające domenę EGF-podobną)	XP_026758204.1
			89% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją tryptazy <i>Papilio polytes</i> oraz innych peptydaz serynowych motyli	NP_001298484.1
3	~ 55	ETAAVFPRGIPRTPIIIPRD	100% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją profenolooksydazy <i>G. mellonella</i>	AAQ75026.1
4	~ 57	YEVPPAKLEAIWPKGLRVSL	100% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją białka wiążącego β-1,3-glukan <i>G. mellonella</i>	CAK22401.1

ANALIZA WYNIKÓW

			95% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją białka wiążącego β-1,3-glukan <i>Papilio xuthus</i>	KPI9719 1.1
5	~ 61	YVVPAAKLEAIYPKGLRVSI	100% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją białka wiążącego β-1,3-glukan <i>G. mellonella</i> (ang. <i>beta-1,3-glucan-binding protein 1-like Galleria mellonella</i>)	XP_0267 53104.1
			95% zgodnych reszt aminokwasowych z sekwencją białka wiążącego β-1,3-glukan <i>Plodia interpunctella</i>	Q8MU95 .1
6	75		apolipoforyna II	
		NELITAVYNPTAEIK	<u>apolipoforyna <i>Bicyclus anynana</i></u>	XP 0239463 06.1
		GTVETSTIDNTIR LIEANVDSPNVQYYK	<u>heksameryna <i>G. mellonella</i></u>	AAA198 01.1
		LANGLGEIPR VLSLLENWK EVVTEFLSLYK KLDPSLLNIQTK	<u>arylforyna <i>G. mellonella</i></u>	AAA742 29.1
7	250		apolipoforyna I	
		FDEQAQLR LLLDTPIVK FLVDVTGSDK TIANVIDEIR VIELEGTAVVK ANAPQAENLKK SLDPFDEIPAK FVLQVSPSSFK QLGEEINSDFK ETQNSVVTALQAK QFLAAANAITQR FPYPIVYDTDLK	<u>apolipoforyna <i>G. mellonella</i></u>	AAT768 06.1

ANALIZA WYNIKÓW

		ISTSESEFGNSYR YHLNIYSHPELGK QACIHAVAGNAENALR NNGQVAVNGASHGYPVEEK LGISPEFGLQITNEISEK ILQESIVEECVCNYANPFVGR		
		DNGQVAVNGASHGYPVEEK	<u>lipoforyna <i>Plutella xylostella</i></u>	AAT768 07.1
			<u>lipoforyna <i>Helicoverpa armigera</i></u>	AAT768 08.1

Białka zidentyfikowano poprzez sekwencjonowanie 20 kolejnych reszt aminokwasowych od N-końca (numery od 1 do 5 - odpowiadają numerom oznaczonym na Rycinie 53b) lub z wykorzystaniem spektrometrii mas (numery 6 i 7) – nazwy zidentyfikowanych tą metodą białek zostały podkreślone. Dane uzyskane za pomocą obu metod porównywano z danymi dostępnymi w odpowiednich bazach (Rozdział III.6.19). Dodatkowo przeprowadzono identyfikację białek 6 i 7 techniką immunoblottingu z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko apolipoforynie I i II.

V. DYSKUSJA

W odpowiedzi na obserwowany od wielu lat wzrost liczby zachorowań na infekcje grzybicze u ludzi, coraz więcej badań naukowych ma na celu wyjaśnienie różnych aspektów relacji gospodarz - patogen grzybowy. Badania te dotyczą między innymi poznania nowych struktur powierzchniowych komórek grzybów, które rozpoznawane są przez układ odpornościowy zwierząt, przebiegu odpowiedzi immunologicznej oraz wpływu czynników wirulencji grzybów na funkcjonowanie układu odpornościowego (Pereira i in., 2018).

Presja na ograniczenie wykorzystania w badaniach modelu ssaczego, jakim są myszy, skłoniła do poszukiwania odpowiednich alternatywnych organizmów modelowych wśród bezkręgowców (Amorim-Vaz i in., 2015). Zgodnie z tym trendem coraz częściej w badaniach dotyczących patogenezы infekcji grzybiczych wykorzystywane są gąsienice *G. mellonella* (Fuchs i in., 2010; Junqueira i Mylonakis, 2019; Trevijano-Contador i Zaragoza, 2019). Ten owad modelowy charakteryzuje się naturalną wrażliwością na patogeny grzybowe, w odróżnieniu od szeroko stosowanego organizmu modelowego, jakim jest muszka owocowa *D. melanogaster*. Badania wskazują, że *D. melanogaster* jest w stanie przeżyć zakażenie dużą dawką grzybów *A. fumigatus*, *C. neoformans* czy *C. albicans* (Mylonakis, 2008). Gąsienice *G. mellonella* są zatem użyteczne w badaniach wielu gatunków grzybów chorobotwórczych dla człowieka, w tym *C. albicans*, a także grzybów zawierających α -1,3-glukan w ścianie komórkowej, takich jak *C. neoformans*, *A. flavus*, *A. fumigatus* czy *H. capsulatum* (Binder i in., 2016; Cook i McArthur, 2013; London i in., 2006; Mylonakis i in., 2005; Pereira i in., 2018; Reeves i in., 2004; St Leger i in., 2000; Thomaz i in., 2013). Podatność barciaka większego na infekcje grzybicze predestynuje go również do wykorzystania w badaniach dotyczących skuteczności nowych związków o aktywności przeciwwgrzybowej (Cotter i in., 2000).

Zastąpienie modelu mysiego modelem owadziwym jest możliwe dzięki temu, że mechanizmy wrodzonej odporności owadów i ssaków wykazują wysoki stopień strukturalnej i funkcjonalnej homologii. W badaniach porównawczych z wykorzystaniem myszy oraz gąsienic *G. mellonella* stwierdzono, że 50% badanych mutantów *C. albicans* cechował podobny stopień wirulencji u obu organizmów modelowych (Amorim-Vaz i in., 2015; Brennan i in., 2002). Wykazano także, że określone mutanty *C. neoformans* nie były wirulentne zarówno wobec myszy, jak i *G.*

mellonella. Stopień tej korelacji był wyższy niż odnotowany w przypadku porównania innego zestawu organizmów modelowych, jakim były myszy i nicienie *Caenorhabditis elegans* (Desalermos i in., 2015). Wykorzystanie modelu owadziego do analizy mechanizmów odporności wrodzonej w przebiegu infekcji grzybami patogennymi, pozwala na redukcję kosztów i nakładu pracy, przy równoczesnym uzyskaniu wiarygodnych wyników (Borman, 2018; Champion i in., 2018).

Odpowiedź immunologiczną owadów na patogeny grzybowe lub składniki ich ściany komórkowej można ocenić analizując poszczególne reakcje układu odpornościowego. Do najczęściej określanych parametrów należy zmiana liczby hemocytów zaangażowanych w odpowiedź komórkową oraz mechanizmy odpowiedzi humoralnej, takie jak indukcja syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych i aktywacja układu oksydazy fenolowej (Sheehan i Kavanagh, 2018; Trevijano-Contador i Zaragoza, 2019).

Kluczowym etapem w indukcji odpowiedzi immunologicznej jest rozpoznanie struktur PAMPs komórek patogena (Brown i Gordon, 2005). Rolę determinanty molekularnej komórek grzybów rozpoznawanej przez układ odpornościowy owadów przypisuje się najczęściej cząsteczce β -1,3-glukanu (Brown i Gordon, 2003). Polisacharyd ten jest rozpoznawany za pomocą receptorów rozpoznających β -1,3-glukan (β GRPs/GNBPs) (Ferrandon i in., 2004; Kavanagh i Reeves, 2004). Receptory tego typu zidentyfikowano między innymi u: *D. melanogaster*, *B. mori*, *M. sexta*, *G. mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Plodia interpunctella* oraz *Thitarodes pui*. Według danych literaturowych, receptory β GRP cechuje wysoka specyficzność względem β -1,3-glukanu i mogą one pełnić rolę wskaźnika infekcji grzybowej, m. in. zakażenia grzybem *B. bassiana* (Fabrick i in., 2003; Ochiai i Ashida, 2000; Sun i in., 2019; Zhang i in., 2003). Wykazano ponadto, że ekspresja genu kodującego β GRP u *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera) była o ok. 30% wyższa po immunizacji laminaryną (β -1,3/1,6-glukanem), niż po podaniu LPS, składnika ściany komórkowej bakterii (Wu i in., 2018a). Podobnie, poziom ekspresji β GRP u *S. exigua* wzrastał po immunizacji grzybem strzępkowym *F. oxysporum*, ale nie po podaniu gąsienicom bakterii *E. coli* (Bang i in., 2013).

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wykazano, że do α -1,3-glukanu *A. niger* wiązały się białka obecne w hemolimfie nieimmunizowanych gąsienic *G. mellonella*, o masach cząsteczkowych około 57 kDa i 61 kDa, klasyfikowane jako receptory rozpoznające β -1,3-glukan (Tab. 6). Białka te wykazują 95% podobieństwa do białek wiążących β -1,3-glukan innych przedstawicieli rzędu

Lepidoptera, takich jak *Papilio xuthus* oraz *P. interpunctella*. Uzyskane wyniki sugerują, że przy udziale tych receptorów α -1,3-glukan *A. niger* może być rozpoznawany przez układ odpornościowy *G. mellonella*, a ponadto identyfikowany jako składnik pochodzenia grzybowego, pełniący, obok β -1,3-glukanu, rolę cząsteczki PAMP.

Przejawem aktywacji odpowiedzi humoralnej, w konsekwencji zmian ekspresji odpowiednich genów w ciele tłuszczowym, jest między innymi pojawienie się aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie. Efektem rozpoznania α -1,3-glukanu *A. niger* przez układ odpornościowy *G. mellonella* była aktywność przeciwgrzybowa, mierzona wobec *A. niger*, wykrywana w hemolimfie po 24 godzinach od podania tego polisacharydu, i utrzymująca się do 72 godzin po immunizacji (Ryc. 28). Warto zauważyć, że po podaniu gąsienicom laminaryny w dawce 5 μ g, odpowiadającej dawce α -1,3-glukanu *A. niger* stosowanej w doświadczeniach, nie stwierdzono aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie. Dopiero 10-krotnie wyższa dawka laminaryny indukowała pojawienie się tej aktywności. Jej poziom był jednak po 24 godzinach od immunizacji laminaryną 2,5-krotnie niższy w porównaniu do poziomu stwierdzonego po podaniu 5 μ g α -1,3-glukanu (Ryc. 29). Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że α -1,3-glukan *A. niger* jest silniejszym induktorem aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie w porównaniu do β -1,3/1,6-glukanu.

Podanie gąsienicom *G. mellonella* zarodników *A. niger* również indukowało pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie, której maksymalny poziom stwierdzono po 48 godzinach od immunizacji (Ryc. 29). Przesunięcie czasowe maksimum tej aktywności w stosunku do podania α -1,3-glukanu mogło wynikać z faktu, że zarodniki *A. niger* pokrywa hydrofobowa warstwa „rodlet” zbudowana z hydrofobin i melaniny, która chroni je przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy (Valsecchi i in., 2019b). Do uruchomienia odpowiedzi immunologicznej dochodzi w trakcie kiełkowania zarodników, kiedy eksponowane są składniki znajdujące się pod warstwą ochronną, m. in.: α -1,3-glukan, galaktozaminogalakтан (GAG) oraz galaktomannan (GM), a także β -1,3-glukan. Wyższy poziom aktywności przeciwgrzybowej po podaniu zarodników *A. niger* w porównaniu do poziomu po podaniu α -1,3-glukanu i laminaryny wynikał najprawdopodobniej z indukcji odpowiedzi immunologicznej przez mieszaninę wielu składników znajdujących się w

ścianie komórkowej grzyba. Warto zauważyć, że po podaniu wody oraz DMSO nie stwierdzono aktywności przeciwgrzybowej wobec *A. niger* w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*, w przeciwieństwie do wykrytej aktywności przeciwbakteryjnej, co może świadczyć o pewnym stopniu specyficzności tej reakcji.

Jak wskazują dane literaturowe, immunizacja gąsienic *G. mellonella* zarodnikami *F. oxysporum* indukowała pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie po 48 godzinach od podania, w przeciwieństwie do immunizacji komórkami *C. albicans*, których podanie gąsienicom indukowało tę aktywność hemolimfy po 24 godzinach od immunizacji, jednakże na dużo niższym poziomie (Mak in., 2010). W wyniku naturalnej infekcji gąsienic *G. mellonella* grzybem *B. bassiana* aktywność przeciwgrzybowa pojawiała się także po 24 godzinach i rosła wraz z czasem po immunizacji (Wojda i in., 2009).

Przejawem indukcji odpowiedzi immunologicznej jest również pojawienie się w hemolimfie aktywności przeciwbakteryjnej. Poziom tej aktywności już po 6 godzinach od podania α -1,3-glukanu *A. niger* był istotnie wyższy od poziomu zanotowanego po immunizacji gąsienic DMSO (Ryc. 30). Najwyższy poziom aktywności przeciwbakteryjnej stwierdzono w hemolimfie po 8 godzinach od podania α -1,3-glukanu oraz laminaryny. Immunizacja zarodnikami *A. niger* indukowała aktywność wobec *E. coli* w mniejszym stopniu, jednakże czas pojawiania się istotnie wyższej aktywności przeciwbakteryjnej w porównaniu do aktywności po immunizacji wodą był taki sam, jak po podaniu laminaryny i α -1,3-glukanu (Ryc. 31). Warto jednak zauważyć, że największą różnicę między aktywnością przeciwbakteryjną hemolimfy po podaniu α -1,3-glukanu i DMSO oraz zarodników/laminaryny i wody stwierdzono po 24 godzinach od immunizacji. Może to wynikać z faktu, że w tym czasie odpowiedź na podanie DMSO i wody uległa już wyciszeniu, co zostało potwierdzone metodą bioautografii. Dane literaturowe wskazują, że maksymalny poziom aktywności przeciwbakteryjnej po podaniu gąsienicom *G. mellonella* bakterii *E. coli* oraz *M. luteus* pojawiał się po 24 godzinach od immunizacji, a po podaniu bakterii *P. aeruginosa* nieco wcześniej, po 12-18 godzinach, w zależności od badanego szczepu (Andrejko i in., 2009; Andrejko i in., 2014; Mak i in., 2010).

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że w odróżnieniu od aktywności przeciwgrzybowej, aktywność przeciwbakteryjna indukowana u *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu, zarodników *A. niger* oraz laminaryny była mniej specyficzna, zważywszy na fakt, że wykrywano ją również po podaniu DMSO i wody.

Efektem wzrostu ekspresji określonych genów w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger* były zmiany w proteomie hemolimfy. Analiza profili białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic immunizowanych α -1,3-glukanem wykazała obecność dodatkowych prążków o masie poniżej 6 kDa, odpowiadających peptydom przeciwdrobnoustrojowym. Kinetyka ich pojawiania się w hemolimfie korelowała z aktywnością przeciwdrobnoustrojową hemolimfy. Największą liczbę dodatkowych prążków peptydowych obserwowano w hemolimfie pobranej 24 godziny od podania α -1,3-glukanu *A. niger* i laminaryny oraz od 24 do 48 godzin po podaniu zarodników *A. niger* (Ryc. 32, Ryc. 33). Mak i współpracownicy uzyskali podobne rezultaty. Po 24 godzinach od podania bakterii *E. coli* i *M. luteus* oraz grzybów *C. albicans* stwierdzono największą liczbę prążków peptydowych, natomiast po podaniu konidiów *F. oxysporum* najintensywniej wybarwione prążki widoczne były w hemolimfie pobranej 48 godzin po immunizacji (Mak i in., 2010).

Analiza profili białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic *G. mellonella* immunizowanych laminaryną ujawniła obecność prążków odpowiadających peptydom przeciwdrobnoustrojowym po podaniu dawki 5 μ g i 50 μ g, których intensywność była największa po 24 godzinach od immunizacji (Ryc. 33). Jednak podanie mniejszej dawki laminaryny nie indukowało aktywności przeciwrzybowej, co może wskazywać, że uwidocznione prążki odpowiadały peptydom o aktywności przeciwbakteryjnej. W odpowiedzi na podanie wody i DMSO, dodatkowe prążki, wskazujące na obecność peptydów odpornościowych, pojawiły się w hemolimfie *G. mellonella* jedynie po 8 godzinach od immunizacji, co w korelacji z poziomem aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie, wskazuje na peptydy przeciwbakteryjne.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy, jak również opublikowane wcześniej (Mak i in., 2010; Stączek i in., 2018; Zdybicka-Barabas i in., 2015), wykazujące, że układ immunologiczny *G. mellonella* reaguje w odmienny sposób na immunogeny pochodzenia bakteryjnego i grzybowego, wpisują się w nurt badań zapoczątkowany odkryciami Julesa Hoffmana, za które w 2011 roku otrzymał nagrodę Nobla. Jego badania wykazały, że układ immunologiczny *D. melanogaster* rozróżnia infekcje różnymi typami drobnoustrojów. W efekcie rozpoznania struktur PAMPs patogenów aktywowany jest określony szlak sygnałowy prowadzący do ekspresji genów odpowiednich peptydów i białek odpornościowych (Lemaitre i in., 1997). Infekcja *D. melanogaster* grzybami *B. bassiana* lub *M. anisopliae (robertsii)* prowadziła do

ekspresji genów peptydów przeciwgrzybowych, drosomycyny i miecznikowiny, nie wykazano natomiast ekspresji genów kodujących peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej: dipterycyny i cekropiny A. Podobnie, podanie zarodników *A. fumigatus* i Gram-dodatniej bakterii *M. luteus* indukowało ekspresję drosomycyny. Natomiast po podaniu muszkom bakterii Gram-ujemnej *E. coli* stwierdzono indukcję ekspresji genu dipterycyny, ale nie przeciwgrzybowej drosomycyny. Wykazano ponadto, że u muszki *D. melanogaster* różne gatunki grzybów mogą indukować ekspresję genu attacyny A wykorzystując różne szlaki sygnałowe (Hedengren-Olcott i in., 2004; Lemaitre i in., 1997; Rutschmann i in., 2000). Podobnie, po naturalnej infekcji gąsienic *G. mellonella* grzybami *B. bassiana* stwierdzono pojawienie się jedynie aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie, co związane było z indukcją ekspresji genów kodujących gallerimycynę oraz galiomycynę (Wojda i in., 2009). Analizę poziomu ekspresji genów kodujących te peptydy zastosowano również do oceny indukcji odpowiedzi przeciwgrzybowej *G. mellonella* po immunizacji *C. albicans* oraz *C. dubliniensis* (Dekkerová-Chupáčová i in., 2018). Mak i współpracownicy (2010) wykazali ponadto, że w zależności od typu immunogenu (bakterie Gram-dodatnie *M. luteus*, bakterie Gram-ujemne *E. coli*, drożdżaki *C. albicans*, grzyby strzępkowe *F. oxysporum*) gąsienice *G. mellonella* wykorzystują inny zestaw peptydów przeciwdrobnoustrojowych do eliminacji zakażenia.

Analiza ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe w ciele tłuszczowym *G. mellonella* przeprowadzona w niniejszej pracy, wykazała, że w odpowiedzi na podanie α -1,3-glukanu *A. niger* gąsienice uruchamiały mechanizmy odpowiedzi przeciwgrzybowej, co wyrażało się wzrostem ekspresji genów peptydów przeciwgrzybowych, galiomycyny i gallerimycyny. Galiomycyna ma *in vitro* aktywność wobec szeregu grzybów strzępkowych, m. in. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *F. oxysporum*, *A. niger*, *Pyricularia grisea* oraz drożdżaków *C. albicans* i *C. neoformans*. Gallerimycyna jest aktywna wobec grzybów strzępkowych *M. anisopliae* (*robertsii*), ale nie drożdży *S. cerevisiae* (Bolouri Moghaddam i in., 2016; Cytryńska i in., 2007; Lee i in., 2004; Schuhmann i in., 2003; Yi i in., 2014).

Wykazano 4,5-krotny wzrost ekspresji genu kodującego galiomycynę oraz 3-krotny wzrost poziomu ekspresji genu gallerimycyny po 5 godzinach od podania α -1,3-glukanu gąsienicom *G. mellonella* (Ryc. 36) Po immunizacji zarodnikami *A. niger* stwierdzono po 5 godzinach 8,7-krotny wzrost ekspresji genu galiomycyny oraz 33-krotny wzrost ekspresji genu gallerimycyny (Rys. 37). Jak wynika z danych

literaturowych, infekcja gąsienic *G. mellonella* grzybem *B. bassiana* prowadziła również do wzmożonej ekspresji genów kodujących galiomycynę i gallerimycynę. Poziom ekspresji genu galiomycyny był najwyższy po 72 godzinach od zakażenia i odpowiadał 3-krotnemu poziomowi ekspresji u gąsienic nieimmunizowanych. Poziom ekspresji genu gallerimycyny wzrósł dwukrotnie po 24 godzinach od kontaktu z *B. bassiana*, a najwyższy poziom ekspresji, wynoszący 5-krotność poziomu u gąsienic nieimmunizowanych, wykazano po 96 godzinach (Vertyporokh i Wojda, 2017). Wzrost poziomu ekspresji genu gallerimycyny odnotowano również po podaniu gąsienicom *G. mellonella* mieszaniny bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae* (Wojda i Jakubowicz, 2007). Wysoki poziom ekspresji genów galiomycyny i gallerimycyny stwierdzono również w czasie 1, 4 i 24 godziny po immunizacji gąsienic *G. mellonella* grzybami z rodzaju *Candida*. Ekspresja tych genów była pozytywnie skorelowana z poziomem wirulencji *Candida* sp. Wyższy poziom ekspresji zanotowano po podaniu *C. albicans*, którego cechuje wyższa wirulencja niż *C. dubliniensis* (Brown i in., 2009; Dekkerová-Chupáčová i in., 2018; Rossoni i in., 2017; Vogel i in., 2011).

Poziom ekspresji genu cekropiny, analizowany w niniejszej pracy, wzrósł 1,6-krotnie oraz 1,8-krotnie, odpowiednio, po 5 i 8 godzinach od immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem *A. niger*, natomiast po immunizacji zarodnikami *A. niger* wzrósł 3,5- oraz 4,3-krotnie po, odpowiednio, 5 i 8 godzinach od podania (Ryc. 36, Ryc. 37). Wyjaśnieniem stosunkowo wysokiego poziomu ekspresji cekropiny po podaniu składników pochodzenia grzybowego mogą być wyniki opublikowane przez Yun i Lee (2016), którzy wykazali, że cekropina jest induktorem apoptozy komórek *C. albicans*. Ponadto, wśród cekropin opisano też peptydy o aktywności przeciwgrzybowej, m. in. *D. melanogaster* i *B. mori* (Ekengren i Hultmark, 1999; Lu i in., 2016).

Poza peptydami przeciwdrobnoustrojowymi organizm owada wykorzystuje inne peptydy, które pomagają mu przeciwdziałać skutkom infekcji. Aktywność proteaz drobnoustrojów może być ograniczona wskutek działania owadziego inhibitora metaloproteinaz, IMPI, który *in vitro* hamuje kiełkowanie zarodników *M. robertsii* w stopniu zbliżonym do lizozymu, inhibitora trypsyny czy peptydu przeciwgrzybowego, miecznikowiny (Mukherjee i Vilcinskas, 2018). W niniejszej pracy wykazano, że poziom ekspresji genu IMPI w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*, a także zarodników *A. niger*, wzrósł około 2-krotnie, odpowiednio, po 5 i 8 godzinach od immunizacji (Ryc. 37, Ryc. 37). Vertyporokh i Wojda (2017) wykazały, że w wyniku naturalnej infekcji *G. mellonella* grzybem *B. bassiana* poziom

transkryptów IMPI nie zmieniał się po 24 godzinach. Wzrost odnotowano jednak w dłuższych czasach od zakażenia. Indukcję ekspresji genu IMPI po 24 godzinach stwierdzono również po podaniu gąsienicom *G. mellonella* bakteryjnego LPS (Altincicek i in., 2007).

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, w ślad za wzrostem ekspresji genów peptydów o aktywności przeciwgrzybowej w ciele tłuszczowym *G. mellonella*, po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*, odnotowano wzrost poziomu tych peptydów w hemolimfie. Wykazano, że po 24 godzinach od podania gąsienicom *G. mellonella* α -1,3-glukanu *A. niger*, kiedy to stwierdzono najwyższą aktywność przeciwgrzybową w hemolimfie, wzrósł w hemolimfie poziom pięciu z sześciu zidentyfikowanych peptydów odpornościowych. Odnotowano aż 10-krotny wzrost poziomu galiomycyny (defensyny *G. mellonella*) (Ryc. 35). Wzrost poziomu tej defensyny w hemolimfie wykazano również po immunizacji gąsienic *G. mellonella* zarodnikami *F. oxysporum* (Mak i in., 2010). Po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* stwierdzono ponadto 5-krotny wzrost poziomu peptydu prolinowego 2 (Ryc. 35). Dane literaturowe wskazują, że kilkukrotny wzrost poziomu tego peptydu w hemolimfie notowano także po podaniu gąsienicom *G. mellonella* bakterii *M. luteus* i *E. coli* oraz grzybów *C. albicans* i *F. oxysporum* (Cytryńska i in., 2007; Mak i in., 2010). Poziom peptydu anionowego 1, który *in vitro* wykazuje aktywność wobec *A. niger* (Cytryńska i in., 2007) wzrósł 3,5-krotnie po immunizacji α -1,3-glukanem tego gatunku grzyba (Ryc. 35). Pomimo, że cekropiny uważa się za peptydy o aktywności głównie przeciwbakteryjnej, podanie α -1,3-glukanu indukowało 2-krotny wzrost poziomu cekropiny D w hemolimfie *G. mellonella*. Peptyd ten *in vitro* wykazuje aktywność wobec *A. niger* (Cytryńska i in., 2007; Kim i in. 2004b; Mak i in., 2010).

Istotną rolę w obronie organizmu owada przed patogenami pełni również lizozym, który w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* obecny jest konstytutywnie (Pereira i in., 2018). Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały, że poziom aktywności tego białka w hemolimfie gąsienic nieimmunizowanych odpowiadał ekwiwalentowi aktywności roztworu EWL o stężeniu 296 μ g/ml, co stanowiło potwierdzenie wcześniej opublikowanych wyników (Boguś i in., 2007). Dane literaturowe wskazują, że poziom lizozymu w hemolimfie owadów wzrasta po infekcji zarówno bakteryjnej, jak i grzybowej (Ekengren i Hultmark, 1999; Gillespie i in., 2000). Wzrost aktywności lizozymu w hemolimfie stwierdzono na przykład po 24

godzinach od zakażenia naturalnego gąsienic *G. mellonella* grzybem *B. bassiana*, jak również po immunizacji różnymi dawkami blastospor tego grzyba (Wojda i in., 2009). Kontakt gąsienic *G. mellonella* z grzybem *C. coronatus* powodował też wzrost aktywności lizozymu (Boguś i in., 2007). Podanie komórek grzybów *C. albicans* oraz *C. neoformans*, a także immunizacja glukuronoksylomannanem (GXM), składnikiem otoczki *C. neoformans*, indukowały wzrost aktywności lizozymu w hemolimfie *G. mellonella* (Trevijano-Contador i in., 2015). Po podaniu gąsienicom *G. mellonella* α -1,3-glukanu *A. niger* stwierdzono 2-, 2,2- oraz 2,9-krotny wzrost poziomu aktywności tego enzymu w hemolimfie, odpowiednio, po 24, 48 i 72 godzinach od immunizacji. Podanie gąsienicom laminaryny i zarodników *A. niger* indukowało największy wzrost aktywności lizozymu po 48 godzinach od immunizacji.

Wzrost aktywności lizozymu w hemolimfie po podaniu składników pochodzenia grzybowego może wynikać z faktu, że ma on aktywność przeciwgrzybową (Vilcinskas i Matha, 1997). Komórki *C. albicans* poddane działaniu lizozymu *G. mellonella* wykazywały cechy komórek apoptotycznych (Sowa-Jasiłek i in., 2016). Stwierdzono również, że w przebiegu tej reakcji lizozym może współpracować z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi, np. peptydem anionowym 2, a także z apolipoforyną III *G. mellonella* (Sowa-Jasiłek i in., 2014; Zdybicka-Barabas i in., 2013; Zdybicka-Barabas i in., 2014).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały przejściowy spadek aktywności lizozymu w krótkim czasie po podaniu badanych immunogenów: po 0,5 godzinie od podania α -1,3-glukanu *A. niger*, po 1 i 4 godzinach od podania laminaryny, po 4 godzinach od immunizacji zarodnikami *A. niger* (Ryc. 38, Ryc. 40). Podobny efekt obserwowano w badaniach Andrejko i współpracowników (2014) po immunizacji *G. mellonella* bakteriami *P. aeruginosa* (Andrejko i in., 2014). Spadek aktywności lizozymu w krótkich czasach po immunizacji może być wynikiem obniżenia jego ilości w hemolimfie na skutek wiązania się do powierzchni ciał obcych. Dane literaturowe wskazują, że lizozym wiąże się do komórek bakterii Gram-dodatnich *B. circulans*, *M. luteus*, *S. lutea*, *L. monocytogenes*, bakterii Gram-ujemnych *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, drożdżaków *C. albicans*, *C. fructus*, *C. wickerhamii*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Schizosaccharomyces pombe* oraz zarodników grzybów strzępkowych *A. niger* i *A. oryzae* (Cytryńska i in. - dane nieopublikowane; Sowa-Jasiłek i in., 2014; Zdybicka-Barabas i in., 2012). W trakcie realizacji niniejszej pracy nie znaleziono wprawdzie lizozymu *G. mellonella* wśród białek wiążących się do

α -1,3-glukanu *A. niger*, jednakże brak identyfikacji tego polipeptydu mógł być wynikiem zastosowanej techniki. Po rozdiale elektroforetycznym białek hemolimfy związanych do α -1,3-glukanu *A. niger* nie stwierdzono bowiem wystarczająco intensywnie wybarwionych prążków białkowych o masie około 14 kDa, co było warunkiem pozwalającym na ich późniejszą identyfikację. Przedstawione wyniki wskazują jednak na udział lizozymu w zwalczaniu infekcji o etiologii grzybowej u *G. mellonella*.

Jedną z pierwszych reakcji układu odpornościowego owada na zakażenie jest uruchomienie układu oksydazy fenolowej, którego aktywność prowadzi do wytworzenia melaniny. Wykazano, że układ ten jest aktywowany u *G. mellonella* zarówno w odpowiedzi na infekcję bakteriami Gram-ujemnymi, np. *E. coli*, *Legionella pneumophila*, jak również Gram-dodatnimi *Listeria monocytogenes*, a także grzybami, np. *A. oryzae* (Joyce i Gahan, 2010; Harding i in., 2012; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010; Zdybicka-Barabas i in., 2014). U *B. mori* układ PO jest uruchamiany po immunizacji bakteriami *E. coli*, *M. luteus*, *Y. pseudotuberculosis*, jak i peptydoglikanem *M. luteus*, *S. aureus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* (Chen i Lu, 2018). Badania na szarańczy wędrownej *Locusta migratoria* oraz szarańczy pustynnej *Schistocerca gregaria* wykazały, że laminaryna indukuje aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie tych owadów (Franssens i in., 2008; Goldsworthy i in., 2002).

U *M. sexta* do aktywacji układu PO dochodzi w efekcie rozpoznania β -1,3-glukanu przez receptory β GRPs, a pozbawienie owadów tych receptorów skutkowało brakiem aktywacji układu PO w obecności β -1,3-glukanu (Ma i Kanost, 2000; Takahasi i in., 2009; Zhao i in., 2007). Rolę receptora β GRP w aktywacji układu PO potwierdzono również u *Ostrinia furnacalis* (Wu i in., 2018a). Jak wykazano w niniejszej pracy, białka zidentyfikowane jako receptory β GRPs *G. mellonella* oddziaływały z α -1,3-glukanem *A. niger*, co sugeruje udział tego typu receptorów w rozpoznawaniu również tego składnika ściany komórkowej grzybów. Jednakże, po podaniu gąsienicom *G. mellonella* α -1,3-glukanu *A. niger*, jak również zarodników *A. niger*, stwierdzono zahamowanie aktywności PO w krótkim czasie po immunizacji. Po podaniu α -1,3-glukanu efekt zahamowania zanotowano w czasie od 0,25 do 1 godziny, po podaniu zarodników efekt ten utrzymywał się do pół godziny po immunizacji (Ryc. 41, Ryc. 42). Po tym czasie, w hemolimfie pojawiała się przejściowo aktywność PO po podaniu obu immunogenów; warto jednak zauważyć, że po podaniu zarodników *A.*

niger aktywność ta pozostawała stale na poziomie niższym niż w hemolimfie owadów kontrolnych. W dłuższych czasach, od 24 do 72 godzin po immunizacji α -1,3-glukanem, oraz od 8 do 72 godzin po podaniu zarodników *A. niger* i laminaryny, stwierdzono ponowne zahamowanie aktywności PO w hemolimfie *G. mellonella*. Podobny efekt odnotowano również w wyniku zakażenia *G. mellonella* grzybami entomopatogennymi *M. anisopliae (robertsii)*, *C. coronatus* oraz *B. bassiana* (Boguś i in., 2007; Fuguet i in., 2004; Slepneva i in., 2003). Trevijano-Contador i współpracownicy (2015) wykazali, że układ PO nie ulega aktywacji w krótkim czasie po podaniu gąsienicom *G. mellonella* komórek dzikiego szczepu *C. neoformans*, zawierających otoczkę, jak również mutantą, który jest jej pozbawiony. Autorzy ci sugerują, że prekursorzy melaniny mogą być wiązane na powierzchni komórek grzyba.

Zahamowanie aktywności PO w początkowym etapie rozwoju infekcji grzybiczej, a także w krótkim czasie po immunizacji składnikami ściany komórkowej grzybów oraz zarodnikami, może być sposobem wykorzystywanym przez patogeny grzybowe na uniknięcie odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu gospodarza. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują, że α -1,3-glukan może być cząsteczką biorącą udział w hamowaniu układu PO w odpowiedzi na patogeny grzybowe. Jak wykazano, wśród białek hemolimfy *G. mellonella*, które wiązały się do α -1,3-glukanu *A. niger*, zidentyfikowano profenolooksydazę oraz czynnik aktywujący oksydazę fenolową, a także proteazę serynową o masie cząsteczkowej 37 kDa. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że hamowanie aktywności układu oksydazy fenolowej w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger* wynikać może zarówno z wiązania prekursora enzymu odpowiedzialnego za inicjację procesu melanizacji, jak również z ograniczenia dostępności proteaz serynowych, którą są niezbędne do jego aktywacji.

Z kolei zanotowane w niniejszej pracy zahamowanie aktywności PO po 24 godzinach od podania gąsienicom *G. mellonella* α -1,3-glukanu i zarodników *A. niger* mogło być związane ze zwiększonym poziomem peptydów i białek odpornościowych w hemolimfie, m.in. 10-krotnym wzrostem poziomu defensyny *G. mellonella* (galiomycyny) oraz 1,6-krotnym wzrostem poziomu peptydu prolinowego 1. Potwierdzeniem tej tezy są wyniki uzyskane przez Zdybicką-Barabas i Cytryńską (2010), które wykazały zahamowanie aktywności PO w hemolimfie *G. mellonella* inkubowanej z ekstraktami metanolowymi hemolimfy, zawierającymi peptydy odpornościowe i lizozym. Stwierdzono ponadto, że spośród peptydów i białek

zawartych w tych ekstraktach defensyna *G. mellonella*, lizozym oraz peptyd prolinowy 1 hamowały aktywność PO, przy czym defensyna w największym stopniu (Zdybicka-Barabas i in., 2014). Hamowanie układu PO po immunizacji zarodnikami *A. niger* mogło być również efektem działania metalotionein, wytwarzanych przez grzyba białek wiążących jony Ca^{2+} , które uważane są potencjalne inhibitory układu PO (Goetghebeur i Kermasha, 1996).

Zahamowanie aktywności PO w hemolimfie *G. mellonella* w czasie od 24 do 72 godzin po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger* mogło być też związane z jej negatywną regulacją przez lizozym. Warto zauważyć, że najwyższy wzrost aktywności lizozymu stwierdzono po 24 i 48 godzinach po podaniu α -1,3-glukanu, co skorelowane było z zahamowaniem aktywności PO w hemolimfie *G. mellonella*. Podobnie, w hemolimfie *M. sexta* lizozym hamował aktywację proPO do aktywnej formy PO poprzez bezpośrednie oddziaływanie z proPO (Rao i in., 2010). Wykazano także, że gąsienice *Spodoptera littoralis* charakteryzujące się wyższym poziomem aktywności lizozymu w hemolimfie, cechował równocześnie niższy poziom aktywności PO (Cotter i in., 2008). U *A. gambiae* związanie lizozymu do kulek Sephadex hamowało proces ich melanizacji (Li i Paskewitz, 2006).

Wysoki koszt energetyczny procesu melanizacji może być również przyczyną zahamowania aktywności PO w dłuższym czasie po immunizacji, co obserwowano w niniejszej pracy. W celu utrzymania w pełni aktywnego układu PO organizm owada musi wydatkować dużo energii. Wynika to z faktu, że substrat dla PO, tyrozyna, jest otrzymywana z fenyloalaniny, aminokwasu, który owady mogą pozyskać jedynie z pożywieniem (Chapman, 1998). Melanina, końcowy produkt uruchomienia układu PO jest bogata w azot, w związku tym podczas procesu melanizacji wymagana jest wysoka podaż tego pierwiastka. W przeciwnym razie azot pozyskiwany jest białek (Blois, 1978; Lee i in., 2008). Potwierdzeniem tej tezy mogą być wyniki badań, wskazujące na zależność aktywności PO od diety. *Tenebrio molitor* oraz *Hetaerina americana*, które miały swobodny dostęp do pokarmu charakteryzował wyższy poziom PO niż owadów niekarmionych (González-Tokman i in., 2011; Rantala i in., 2003; Siva-Jothy i Thompson, 2002). Ponadto wykazano, że dieta bogata w białka niezbędna jest do prawidłowej aktywacji układu PO. Może to świadczyć o wykorzystywaniu białek jako źródła aminokwasów do syntezy składników układu PO oraz samej PO (Abisgold i Simpson, 1987; Srygley i in., 2009).

Oslabianie funkcji układu odpornościowego owada poprzez hamowanie układu PO, może być sposobem wykorzystywanym przez patogeny na uniknięcie odpowiedzi immunologicznej, co w efekcie prowadzi do rozwoju infekcji. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują, że α -1,3-glukan, składnik ściany komórkowej grzybów może odgrywać dwojaką rolę. Z jednej strony uruchamia niektóre reakcje odpornościowe, a z drugiej odgrywa rolę czynnika wirulencji, hamując inne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza, m. in. układ oksydazy fenolowej.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że apolipoforyna III *G. mellonella* nie wiąże się do α -1,3-glukanu *A. niger*. Było to o tyle zaskakujące, że apoLp-III uważana jest za cząsteczkę PRR zdolną do oddziaływania z różnymi strukturami molekularnymi drobnoustrojów. Jak wskazują dane literaturowe, apoLp-III wiąże się do kwasów lipotejchojowych, lipopolisacharydu i β -1,3-glukanu, które są składnikami ściany komórkowej, odpowiednio, bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów. Wykazano również oddziaływanie tego białka z powierzchnią zarodników grzybów strzępkowych *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. oryzae* oraz *F. oxysporum*, szeregu gatunków drożdży i drożdżaków, m. in. *C. albicans*, *C. fructus*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, a także komórek bakterii Gram-dodatnich *S. aureus*, *Bacillus circulans*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* oraz Gram-ujemnych *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* (Fallon i in., 2011; Halwani i in., 2000; Kato i in., 1994; Whitten i in., 2004; Yu i in., 2018; Zdybicka-Barabas i in., 2015; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011).

Dane literaturowe wskazują, że poziom apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* ulega zmianom w zależności od podanego patogenu, jak również od czasu po immunizacji, a zmianom poziomowi apoLp-III w hemolimfie towarzyszą zmiany poziomu tego białka w hemocytach i cieple tłuszczowym (Stączek i in., 2018; Zdybicka-Barabas i in., 2015). Zdybicka-Barabas i Cytryńska (2011) wykazały, że po immunizacji gąsienic *G. mellonella* bakteriami *E. coli* i *K. pneumoniae* poziom apoLp-III w hemolimfie początkowo wzrastał, po czym ulegał obniżeniu w dłuższym czasie po immunizacji. Immunizacja gąsienic bakteriami *M. luteus* skutkowała niewielkim wzrostem poziomu apoLp-III odnotowanym w czasie od 6 do 24 godzin po podaniu bakterii (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011).

W niniejszej pracy zanotowano wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* po 1 godzinie od immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* (Ryc. 43). Natomiast w przypadku podania zarodników *A. niger*, we wszystkich badanych czasach po immunizacji odnotowano spadek poziomu apoLp-III w hemolimfie (Ryc. 45), czego przyczyną mogło być wiązanie się apoLp-III do powierzchni zarodników. Podobnie, spadek poziomu apoLp-III stwierdzono po immunizacji *G. mellonella* innymi grzybami strzępkowymi zawierającymi α -1,3-glukan w ścianie komórkowej, *F. oxysporum* oraz *A. fumigatus* (Schoffemeer i in., 1999; Sheehan i in., 2018).

Zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* obserwowane po immunizacji różnymi immunogenami mogą wynikać z przypisywanej apoLp-III roli cząsteczki sygnałnej przekazującej sygnał o infekcji do hemocytów i ciała tłuszczowego, co związane jest z jej oddziaływaniem z lipidami oraz cząstkami lipoforyn. Dettlof i współpracownicy (2001) wykazali, że biotynylowana apoLp-III, krótko po podaniu do hemocelu *G. mellonella*, była wykrywana w określonej subpopulacji hemocytów, a immunizacja gąsienic *G. mellonella* bakteriami indukowała formowanie kompleksów apoLp-III z lipidami, które po włączeniu do cząstek LDL ulegały endocytozie przez granulocyty.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, z wykorzystaniem metod immunocytochemicznych, analizowano lokalizację apoLp-III w hemocytach gąsienic *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu oraz zarodników *A. niger*. Obecność apoLp-III stwierdzono głównie w granulocytach *G. mellonella* (Ryc. 46), co jest zgodne z wynikami zaprezentowanymi w pracy Dettlof i inni (2001), gdzie wykazano, że kompleks LDL ulegał endocytozie do komórek, których morfologia wskazywała na granulocyty. Zanotowano spadek poziomu apoLp-III w hemocytach po immunizacji α -1,3-glukanem, z wyjątkiem 1 godziny po immunizacji (Ryc. 47). Kim i współpracownicy (2004a) wykazali, że 0,5 godziny po podaniu gąsienicom *H. cunea* bakterii *E. coli* granulocyty, zawierające apoLp-III we wnętrzu granul, ulegały degranulacji. Zjawisko to mogłoby stanowić wyjaśnienie spadku poziomu apoLp-III w hemocytach *G. mellonella* 15 minut po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*.

Jak wspomniano wcześniej apoLp-III nie wiązała się do α -1,3-glukanu *A. niger*, zatem prawdopodobnie nie jest zaangażowana w rozpoznawanie tego polisacharydu. Ponadto, jak wskazują dane literaturowe, funkcję molekuly sygnałnej apoLp-III pełni w kompleksie LDL, czyli po związaniu z apoLp-I, apoLp-II oraz lipidami (Dettloff i in.,

1999). Na przykład, 15 minut i 1 godzinę po podaniu gąsienicom *G. mellonella* zarodników *F. oxysporum* zawartość apoLp-III w kompleksach z apoLp-I/apoLp-II w hemolimfie wzrastała, odpowiednio, 2-krotnie i 4-krotnie, w porównaniu do poziomu u owadów nieimmunizowanych (Stączek i in., 2018). Jak wykazano w niniejszej pracy, apoLp-I i apoLp-II wiązały się do α -1,3-glukanu *A. niger*, a zatem ich udział w tworzeniu kompleksów LDL z apoLp-III w hemolimfie mógł być ograniczony. Efektem tego mogło być upośledzenie formowania cząstek LDL ulegających endocytozie przez granulocyty, a w konsekwencji obniżenie poziomu apoLp-III w hemocytach po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*. Może to być kolejny mechanizm wykorzystywany przez patogeny w celu opóźnienia czy ograniczenia przekazywania sygnału o zakażeniu, a tym samym blokowania odpowiedzi odpornościowej gospodarza.

Przejściowy wzrost poziomu apoLp-III w hemocytach gąsienic *G. mellonella* po 1 godzinie od podania α -1,3-glukanu *A. niger* mógł wynikać ze wzrostu ekspresji genu kodującego apoLp-III, jak to przedstawiono w badaniach przeprowadzonych na gąsienicach *Samia cynthia ricini* immunizowanych bakteriami *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* (Yu i in., 2018). Jednakże, ekspresja genu apoLp-III nie była analizowana w ramach niniejszej pracy.

Wyraźny wzrost zawartości apoLp-III stwierdzono natomiast w hemocytach we wszystkich czasach po podaniu gąsienicom *G. mellonella* zarodników *A. niger* (Ryc. 48) co mogło odzwierciedlać rolę apoLp-III jako cząsteczki sygnałnej, przekazującej informację o infekcji do hemocytów biorących udział w odpowiedzi komórkowej. Translokacja apoLp-III do hemocytów może również stanowić wyjaśnienie spadku poziomu apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu zarodników *A. niger*.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że podobnie jak u innych gatunków Lepidoptera, takich jak: *Diatraea saccharalis*, *Euclea delphinii*, *Lithacodes fasciola* i *Eupoecilia ambiguella*, dominującymi typami hemocytów w hemolimfie *G. mellonella* są granulocyty i plazmatocyty, stanowiące, odpowiednio, 52% i 41% wszystkich hemocytów (Ryc. 50) (Falleiros i in., 2003; Stoepler i in., 2013; Vogelweith, 2016). Jak obliczono, sferulocyty i enocytydy stanowiły u *G. mellonella*, odpowiednio, 6,1% oraz 0,9% wszystkich hemocytów. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi opublikowanymi przez Ratcliff'a i współpracowników (1986), którzy oszacowali procentowy udział granulocytów, plazmatocytów, sferulocytów i enocytoidów na, odpowiednio, 48%, 47%, 3% i 1%.

Część autorów wśród hemocytów krążących w hemolimfie przedstawicieli rzędu Lepidoptera wymienia także prohemocyty (Boguś i in., 2018; Strand, 2008; Yamashita i Iwabuchi, 2001). Dane literaturowe wskazują, że u gąsienic *G. mellonella* z końca siódmego stadium wylinkowego stanowią one około 0,07% populacji hemocytów. Niewielki odsetek tych hemocytów mógł uniemożliwić ich detekcję w przygotowanych preparatach hemolimfy poddanych analizie w niniejszej pracy. Brak prohemocytów w zestawieniu przedstawionym w niniejszej dysertacji może wynikać też z faktu, że są to komórki multipotencjalne, toteż mogą szybko różnicować się w inne typy hemocytów (Boguś i in., 2018; Huang i in., 2010; Neuwirth, 1973; Wu i in., 2016; Yamashita i Iwabuchi, 2001).

Warto zauważyć, że w literaturze naukowej można dostrzec rozbieżności dotyczące udziału procentowego poszczególnych typów hemocytów krążących w hemolimfie owadów. Wynikają one między innymi z różnych technik użytych do określania typów hemocytów, jak również różnych metod ich zliczania. Dane literaturowe wskazują także, że gąsienice tego samego gatunku karmione różnym pokarmem wykazują zróżnicowanie w składzie procentowym poszczególnych typów hemocytów (Huang i in., 2010). Różnice mogą dotyczyć również całkowitej liczby hemocytów. Przykładem są tu gąsienice *E. ambiguella*, u których stwierdzono zróżnicowaną liczbę hemocytów poszczególnych typów w zależności od gatunku winogron, którymi były karmione (Vogelweith i in., 2016). Shikano i współpracownicy (2010) wykazali, że larwy motyla *Trichoplusia ni* karmione brokułami charakteryzowały się większą liczbą hemocytów niż karmione ogórkami. Ze względu na fakt, że granulocyty, poza udziałem w reakcjach odpornościowych, są również zaangażowane w transport składników odżywczych, liczba tych hemocytów w hemolimfie owadów karmionych ubogim pokarmem spada (Klowden, 2002). Na liczbę hemocytów u gąsienic *M. sexta* z tego samego stadium wylinkowego ma też wpływ płeć owadów. Wykazano, że w połowie piątego stadium wylinkowego samice mają pięć razy większą, a samce trzy razy większą liczbę hemocytów w porównaniu do początku tego stadium (Beetz i in., 2008).

Zmiany w całkowitej liczbie hemocytów uważa się za istotny czynnik wskazujący na aktywację układu odpornościowego owadów. Komórki te biorą bowiem udział w odpowiedzi komórkowej, w tym fagocytozie, nodulacji i inkapsulacji (Carton in., 2008; Dubovskiy i in., 2016). O zaangażowaniu hemocytów w odpowiedź

odpornościową *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu oraz zarodników *A. niger*, DMSO i wody świadczył między innymi spadek liczby plazmatocytów po 15 minutach od podania tych immunogenów (Tab. 4, Tab. 5). Najniższą liczbę plazmatocytów odnotowano w tym czasie po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger*. Spadek liczby plazmatocytów może wskazywać na ich zaangażowanie w proces nodulacji, ponieważ stanowią one główną składową nodul (Browne i in., 2013; Gago i in., 2014; Grizanova i in., 2018; Mesa-Arango i in., 2013), a formowanie nodul po immunizacji gąsienic α -1,3-glukanem *A. niger* zostało stwierdzone w niniejszej pracy. Według Gagen i Ratcliffe (1976) już po kilku minutach od immunizacji gąsienic *G. mellonella* i *Pieris brassicae* bakteriami *B. cereus* powstawały agregaty, w skład których wchodziły głównie plazmatocyty oraz bakterie i granulocyty. Podobnie, Boguś i współpracownicy (2007) wykazali, że już po 5 minutach inkubacji *in vitro* hemocytów *G. mellonella* z entomopatogennym grzybem *C. coronatus* obserwowano formowanie agregatów, prowadzących następnie do powstawania kapsuł. W zależności od gatunku owada i rodzaju ciała obcego proces tworzenia kapsuł/nodul jest kontynuowany w czasie od 2 do 24 godzin po immunizacji (Carton i in., 2008). W większości przypadków po 24 godzinach kapsuła/nodula jest wyraźnie widoczna, jednak, jak podają Ratcliffe i Gagen (1977), potrzeba 72 godzin do pełnego uformowania tej struktury.

Tworzenie agregatów hemocytów w hemolimfie *G. mellonella* odnotowano we wszystkich czasach po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger* (Ryc. 51). Największą ich liczbę stwierdzono po 2 godzinach od podania tego polisacharydu; była ona trzykrotnie większa w porównaniu do immunizacji DMSO. Dysekcja gąsienicy wykazała obecność zmelanizowanych nodul widocznych makroskopowo już po 2 godzinach po immunizacji α -1,3-glukanem (Ryc. 52). Podobnie, po 2 godzinach inkubacji hemocytów *G. mellonella* z grzybem *C. coronatus* *in vitro* stwierdzono obecność zmelanizowanych kapsuł, a podanie *G. mellonella* bakterii *E. coli* skutkowało ich eliminacją w procesie nodulacji, już po 2 godzinach od immunizacji (Boguś i in., 2007). Po 6 godzinach od immunizacji gąsienic *G. mellonella* zarodnikami *A. fumigatus* uwidoczniono również niewielkich rozmiarów zmelanizowane struktury, które po 24 godzinach były wyraźnie widoczne (Sheehan i in., 2018). Mechanizmy odpowiedzi komórkowej były również zaangażowane w odpowiedź *G. mellonella* na zakażenie *C. albicans*, czego przejawem było stwierdzenie w obrazach histologicznych tkanek gąsienicy zmelanizowanych nodul po 48 godzinach od podania tego grzyba (Perdoni i in., 2014).

Po 4 godzinach od immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* odnotowano większą zdolność plazmatocytów *G. mellonella* do adhezji (ang. *hyper-spreading hemocytes*). W literaturze można odnaleźć opisy podobnych obserwacji, m. in. 24 godziny po infekcji *G. mellonella* grzybem *C. coronatus*, jak również po zakażeniu *M. sexta* grzybem *B. bassiana* (Boguś i in., 2018; Dean i in., 2004). Może to dodatkowo wskazywać na silniejszą aktywację odpowiedzi komórkowej po podaniu tego składnika ściany komórkowej *A. niger*.

Charakterystycznym zjawiskiem obserwowanym u zwierząt jest wzrost liczby komórek odpornościowych w odpowiedzi na infekcję (Fuchs i in., 2010). Po 2 i 4 godzinach od podania α -1,3-glukanu *A. niger* i DMSO w niniejszej pracy stwierdzono niemal dwukrotny wzrost całkowitej liczby hemocytów, który wynikał ze wzrostu liczby, odpowiednio, plazmatocytów i granulocytów. Po podaniu zarodników *A. niger* wzrost zanotowano już po 1 godzinie, a wynikał on głównie ze wzrostu liczby granulocytów. Może to odzwierciedlać ich kluczową rolę w odporności owadów, gdyż poza zaangażowaniem w odpowiedź komórkową, uczestniczą także w krzepnięciu hemolimfy. Jak wskazują dane literaturowe, osobniki *E. ambiguella* o największej liczbie granulocytów w hemolimfie były najlepiej chronione przed bakteriami i pasożytami (Vogelweith i in., 2016).

Warto zauważyć, że wzrost liczby hemocytów w hemolimfie *G. mellonella*, do poziomu ok. $1,6 \times 10^4/1 \mu\text{l}$ hemolimfy, nastąpił najszybciej po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*, w porównaniu do innych badanych immunogenów (Tab. 4). Dane literaturowe wskazują, że wzrost liczby hemocytów w hemolimfie świadczy o skutecznej walce owada z patogenem. Sheehan i Kavanagh (2018) wykazali 25% wzrost liczby hemocytów po 6 godzinach od podania gąsienicom *G. mellonella* β -1,3-glukanu z *S. cerevisiae*. W innych badaniach całkowita liczba hemocytów wzrosła niemal dwukrotnie po 24 godzinach od immunizacji gąsienic *G. mellonella* dawką 5 μg β -glukanu (Mowlds i in., 2010). Perdoni i współpracownicy (2014) stwierdzili, że liczba hemocytów widoczna w obrazach histologicznych tkanek *G. mellonella* po 24 godzinach od immunizacji grzybem *C. albicans* jest większa w porównaniu do gąsienic kontrolnych, szczególnie w miejscu podania grzybów do hemocelu gąsienic. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, istotny statystycznie wzrost liczby hemocytów po 24 godzinach od immunizacji stwierdzono jedynie po podaniu zarodników *A. niger*. Podobnie, podanie gąsienicom *G. mellonella* zarodników *A. fumigatus* prowadziło do wzrostu liczby hemocytów. Ponadto, po podaniu zarodników

zabitych wysoką temperaturą stwierdzono większy wzrost liczby hemocytów, co, jak sugerowali autorzy, mogło wynikać z usunięcia warstwy „rodlet” i ekspozycji innych składników ściany komórkowej (Sheehan i in., 2018).

Wykazany w niniejszej pracy wzrost całkowitej liczby hemocytów po podaniu badanych immunogenów, mógł być wynikiem uwolnienia hemocytów osiadłych z powierzchni narządów wewnętrznych owada, czym również Bergin i współpracownicy (2003) tłumaczyli wzrost liczby hemocytów po 6 godzinach od immunizacji *G. mellonella* drożdżakiem *Candida* sp.. Wzrost liczby hemocytów mógł wiązać się również ze wzmożonymi podziałami mitotycznymi hemocytów, co stwierdzono m.in. u komarów z rodzaju *Anopheles* (King i Hillyer, 2013).

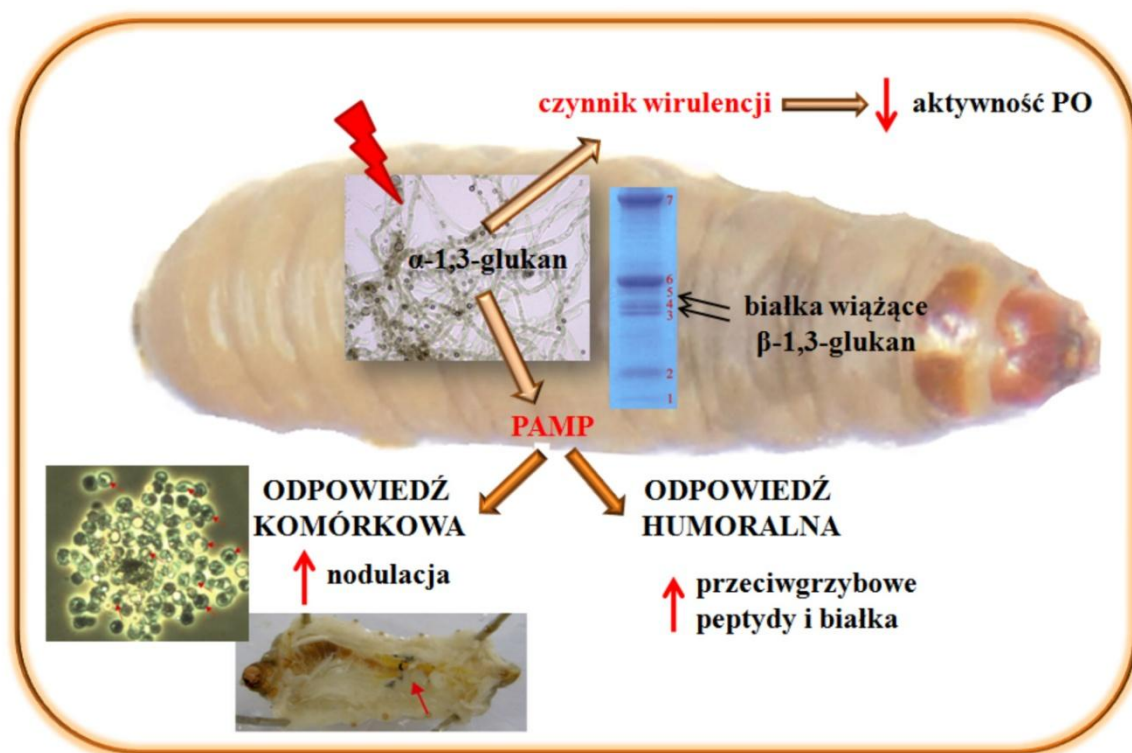
Dane literaturowe wskazują ponadto na korelację pomiędzy wirulencją patogenów grzybowych, takich jak *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* oraz *S. cerevisiae*, a liczbą hemocytów u zakażonych nimi gąsienic *G. mellonella* (Bergin i in., 2003). Gąsienice zakażone najbardziej patogennymi szczepami wykazywały znaczną redukcję gęstości hemocytów. Da Silva i współpracownicy (2000) wykazali, że wzrost liczby hemocytów towarzyszył redukcji liczby komórek szczepu *C. albicans* o niskiej patogenności w hemolimfie komara *Culex quinquefasciatus*, co świadczyło o efektywnej reakcji na zakażenie. W przypadku izolatów *C. albicans* o wysokiej patogenności zauważono spadek liczby hemocytów, przy jednoczesnym wzroście liczby komórek drożdżaka w hemolimfie. Podobnie, po immunizacji *G. mellonella* bakteriami *Actinobacillus pleuropneumonia* wykazano, że szczep o niskiej wirulencji powodował wzrost liczby hemocytów wraz z czasem po immunizacji, natomiast szczep o wysokiej wirulencji spadek ich liczby, prowadząc ostatecznie do śmierci 97% gąsienic po 24 godzinach (Blanco i in., 2017). Z kolei infekcja gąsienic *G. mellonella* drogą pokarmową nicieniami *Steinernema* sp. prowadziła początkowo do spadku liczby hemocytów w ciągu 30 minut, do ok. 20% poziomu stwierdzonego u gąsienic kontrolnych. Po 4 godzinach, kiedy nicienie przemieściły się z przewodu pokarmowego do jamy ciała następował stopniowy wzrost liczby hemocytów, która po 16 godzinach wynosiła około 160% poziomu wykrywanego u gąsienic kontrolnych. Po tym czasie zanotowano stopniowy spadek liczby hemocytów niemal do zera po 24 godzinach od infekcji, co wiązało się ze śmiercią owadów (Matha i Mracek, 1984). Po immunizacji *G. mellonella* grzybem entomopatogennym *C. coronatus* stwierdzono także 8-krotny spadek liczby hemocytów (Boguś i in., 2018), natomiast u gąsienic *B. mori* i *S. exigua* odnotowano spadek liczby hemocytów po zakażeniu innym

entomopatogennym gatunkiem grzyba *B. bassiana* (Hung i in., 1993; Rajitha i in., 2013).

Po 2 i 4 godzinach od podania α -1,3-glukanu *A. niger* oraz od 1 do 24 godzin po podaniu zarodników *A. niger* gąsienicom *G. mellonella* odnotowano wzrost liczby sferulocytów. Choć Ribeiro i Brehelin (2006) stwierdzili, że komórki te nie biorą aktywnego udziału w odpowiedzi komórkowej, w niniejszej pracy zwrócił uwagę fakt, że po podaniu α -1,3-glukanu hemocyty te dość licznie uczestniczyły w tworzeniu agregatów, będących pierwszym etapem w formowaniu nodul. Ochiai i współpracownicy (1992) metodami immunocytochemicznymi wykazali ponadto, że receptory β GRP biorące udział w rozpoznawaniu obcych cząstek znajdują się zarówno w granulocytach, jak i w sferulach sferulocytów gąsienic *B. mori*. W badaniach z wykorzystaniem mszyc *Acyrtosiphon pisum* wykazano, że sferulocyty mogą uczestniczyć w koagulacji hemolimfy, jak również w gromadzeniu energii i transporcie lipidów (Schmitz i in., 2012). Obserwacje poczynione w ramach niniejszej pracy sugerują również, że zwiększona liczba sferulocytów może wynikać z podziałów, którym podlegają te hemocyty, podobnie jak granulocyty i plazmatocyty. W analizowanych preparatach mikroskopowych uwidoczniono bowiem duże sferulocyty zawierające dwa jądra komórkowe, co mogło świadczyć o procesie podziału. Obserwacje te stoją w opozycji do danych literaturowych, w których Tan i współpracownicy (2013) pokazali, że sferulocyty *B. mori* pozbawione są możliwości dzielenia się. Wykazano, że liczba enocytoidów w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu, zarodników *A. niger* i wody wzrosła ponad 3-krotnie po 4 i 24 godzinach od immunizacji, a po podaniu DMSO po 2 i 24 godzinach od immunizacji. Wzrost liczby tych hemocytów może być uzasadniony faktem, że enocytoidy odpowiedzialne są za syntezę i uwalnianie składników układu oksydazy fenolowej, której aktywność warunkuje prawidłowy przebieg procesu melanizacji (Eleftherianos i Revenis, 2011; Kanost i in., 2004; Lavine i Strand, 2002).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują na podwójną rolę α -1,3-glukanu grzybów w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej owadów (Ryc. 54). Wykazano jednoznacznie, że z jednej strony α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ immunologiczny *G. mellonella*, co prowadzi do aktywacji szeregu reakcji odpornościowych, w tym syntezy peptydów o aktywności przeciwgrzybowej. Może być więc zaliczany, obok β -1,3-glukanu, do cząsteczek PAMPs stanowiących determinanty

molekularne grzybów. Z drugiej strony, α -1,3-glukan może być uznawany za czynnik wirulencji grzybów, z uwagi na fakt, że jest odpowiedzialny za hamowanie jednej z najwcześniejszych reakcji odpornościowych owada, jaką jest aktywacja układu oksydazy fenolowej. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w najnowszych publikacjach naukowych. Jak podają Valasecchi i współpracownicy (2019a) rola α -1,3-glukanu w odpowiedzi immunologicznej ssaków może być dwojaka. Z jednej strony *in vivo* na modelu mysim polisacharyd ten stymulował odpowiedź immunologiczną oraz *ex vivo* aktywował komórki dendrytyczne (Bozza i in., 2009; Stephen-Victor i in., 2017). Z drugiej strony chronił zarodniki *A. fumigatus* przed fagocytozą przez mysie makrofagi *in vivo* (Beauvais i in., 2013).



Ryc. 54. Modulacja odpowiedzi immunologicznej gąsienic *G. mellonella* przez przez α -1,3-glukan *A. niger* (strzałkami oznaczono odpowiednio, $\uparrow$ wzrost, $\downarrow$ spadek; opracowanie własne).

VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

PODSUMOWANIE

W wyniku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej dysertacji stwierdzono:

- Alfa-1,3-glukan *A. niger* w dawkach 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g i 20 μ g nie wpływał na przeżywalność gąsienic *G. mellonella*.
- Do α -1,3-glukanu *A. niger* wiązały się określone białka hemolimfy nieimmunizowanych gąsienic *G. mellonella*. Wśród nich zidentyfikowano: białka rozpoznające β -1,3-glukan, apolipoforynę I, apolipoforynę II, prooksydazę fenolową, czynnik aktywujący oksydazę fenolową, proteazę serynową podobną do peptydaz serynowych Lepidoptera, arylforynę i heksamerynę.
- Poziom ekspresji genów kodujących peptydy o aktywności przeciwgrzybowej, galiomycyny i gallerimycyny, wzrastał znacząco w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu z *A. niger*.
- W odpowiedzi na podanie α -1,3-glukanu *A. niger* w hemolimfie *G. mellonella* pojawiała się aktywność przeciwgrzybowa, wynikająca z obecności peptydów przeciwdrobnoustrojowych; α -1,3-glukan indukował szczególnie wzrost poziomu peptydów i białek o aktywności przeciwgrzybowej, w tym galiomycyny, peptydu anionowego 1, cekropiny D, a także lizozymu.
- Aktywność układu oksydazy fenolowej w hemolimfie *G. mellonella* była hamowana w krótkim czasie po podaniu α -1,3-glukanu *A. niger*; przyczyną zahamowania aktywności układu oksydazy fenolowej mogło być wiązanie prooksydazy fenolowej oraz proteazy serynowej aktywującej prooksydazę fenolową przez ten polisacharydowy składnik ściany komórkowej grzybów.
- Apolipoforyna III nie wiązała się do α -1,3-glukanu *A. niger*; prawdopodobnie nie jest zaangażowana w przekazywanie sygnału o obecności α -1,3-glukanu do wnętrza hemocytów.
- Zmiany w całkowitej liczbie hemocytów oraz liczbie hemocytów poszczególnych typów, czemu towarzyszyło formowanie nodul, świadczyły o zaangażowaniu odpowiedzi komórkowej w reakcji układu odpornościowego *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu *A. niger*.

WNIOSKI

1. Układ immunologiczny gąsienic *G. mellonella* rozpoznaje α -1,3-glukan *A. niger*. W tym procesie udział biorą receptory rozpoznające β -1,3-glukan (β GRP) zaangażowane w detekcję infekcji grzybiczej u owadów.
2. Alfa-1,3-glukan *A. niger* stanowi kolejną, obok β -1,3-glukanu, determinantę molekularną grzybów rozpoznawaną przez układ odpornościowy *G. mellonella*.
3. Alfa-1,3-glukan można klasyfikować z jednej strony jako determinantę molekularną grzybów, której rozpoznanie uruchamia odpowiedź komórkową i humoralną u owadów, a z drugiej jako czynnik wirulencji grzybów odpowiedzialny za opóźnianie reakcji odpornościowej owadów, na przykład poprzez wiązanie prooksydazy fenolowej i innych składników układu oksydazy fenolowej.

VII. LITERATURA

- Abad A.**, Fernandez-Molina J.V., Bikandi J., Ramirez A., Margareto J., Sendino J., Hernando F.L., Ponton J., Garaizar J., Rementeria A. **2010** What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología* 27: 155-182.
- Abisgold J.D.**, Simpson S.J. **1987** The physiology of compensation by locusts for changes in dietary protein. *Journal of Experimental Biology* 129: 329–346.
- Agaisse H.**, Perrimon N. **2004** The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews* 198: 72-82.
- Aguilera F.**, McDougall C., Degnan B.M. **2013** Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evolutionary Biology* 13: 96.
- Akira S.**, Hemmi H. **2003** Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 85: 85-95.
- Alba A.**, López-Abarrategui C., Otero-González A.J. **2012** Host defense peptides: an alternative as antiinfective and immunomodulatory therapeutics. *Biopolymers* 98: 251-267.
- 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*. *Infection and Immunity* 75: 175-183.
- Altincicek B.**, Stötzl S., Wygrecka M., Preissner K.T., Vilcinskas A., **2008**, Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *Journal of Immunology* 181: 2705-2712.
- Amorim-Vaz S.**, Delarze E., Ischer F., Sanglard D., Coste A.T. **2015** Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Frontiers in Microbiology* 6: article 367.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152: 118-123.

- Andrejko M.**, Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M. **2014** Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Invertebrate Pathology* 115: 14-25.
- Aperis G.**, Fuchs B.B., Anderson C.A., Warner J.E., Calderwood S.B., Mylonakis E. **2007** *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes and Infection* 9: 729-34.
- Bang K.**, Park S., Cho S. **2013** Characterization of a β -1,3-glucan recognition protein from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science* 20: 575-84.
- Beaulaton J.** **1979** Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms. *Biochimie* 61: 157-164.
- Beauvais A.**, Bozza S., Kniemeyer O., Formosa C., Balloy V., Henry C., Roberson R., Dague E., Chignard M., Brakhage A.A., Romani L., Latgé J.P. **2013** Deletion of the α -1,3-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Pathogens* 9: e1003716.
- Beauvais A.**, Fontaine T., Aimaniananda V., Latgé J.P. **2014** *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia* 178: 371-377 .
- Beauvais A.**, Latgé J.P. **2018** Fungal cell wall. *Journal of Fungi* 4: 91-98.
- Beauvais A.**, Maubon D., Park S., Morelle W., Tanguy M., Huerre M., Perlin D.S., Latgé J.P. **2005** Two alpha (1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Applied Environmental Microbiology* 71: 1531-1538.
- Beetz S.**, Holthusen T.K., Koolman J., Trenczek T. **2008** Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 67: 63-75.
- Benaducci T.**, Sardi Jde C., Lourencetti N.M., Scorzoni L., Gullo F.P., Rossi S.A., Derissi J.B., de Azevedo Prata M.C., Fusco-Almeida A.M., Mendes-Giannini M.J. **2016** Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms *in vitro* and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Frontiers in Microbiology* 7 (article 290): 1-10.
- Bergin D.**, Brennan M., Kavanagh K. **2003** Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and Infection* 5: 1389-1395.

- Bettencourt** R., Lanz-Mendoza H., Lindquist K.R., Faye I. **1997** Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. *European Journal of Biochemistry* 250: 630-637.
- Bier** E., Guichard A. **2012** Deconstructing host-pathogen interactions in *Drosophila*. *Disease Models and Mechanism* 5: 48-61.
- Bina** S., Zaidler M. **2009** JAK/STAT pathway signalling in *Drosophila melanogaster*. W: Anastasis Stephanou: *JAK-STAT Pathway in Disease*. CRC Press 24-36.
- Binder** U., Maurer E., Lass-Flörl C. **2016** *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biology* 120: 288-295.
- Binggeli** O., Neyen C., Poidevin M., Lemaitre B. **2014** Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *PLoS Pathogens* 10: e1004067.
- Blanco** L.A.A., Crispim J.S., Fernandes K.M., de Oliveira L.L., Pereira M.F., Soares Bazzolli D.M. Martins G.F. **2017** Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research* 370: 153–168.
- Bogdan** C., Röllinghoff M., Diefenbach A. **2000** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology* 12: 64-76.
- Boguś** M.I., Kędra E., Bania J., Szczepanik M., Czygier M., Jabłoński P., Pasztaleniec A., Samborski J., Mazgajska J., Polanowski A. **2007** Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *Journal of Insect Physiology* 53: 909-922.
- Boguś** M.I., Ligęza-Żuber M., Polańska M., Mosiewicz M., Włoka E., Sobocińska M. **2018** Fungal infection causes changes in the number, morphology and spreading ability of *G. mellonella* haemocytes. *Physiological Entomology* 43: 214-226.
- Bolouri** Moghaddam, 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. *Biological Chemistry* 397: 939–945.
- Boman** H.G., Nilsson-Faye I., Paul K., Rasmuson Jr.T. **1974** Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cythia* pupae. *Infection and Immunity* 10: 136-145.

- Borman A.M. 2018** Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host-pathogen interactions after fungal infection. *Virulence* 9: 9-12.
- Bozza S., Clavaud C., Giovannini G., Fontaine T., Beauvais A., Sarfati J., D'Angelo C., Perruccio K., Bonifazi P., Zagarella S., Moretti S., Bistoni F., Latgé J.P., Romani L. 2009** Immune Sensing of *Aspergillus fumigatus* Proteins, Glycolipids, and Polysaccharides and the Impact on Th Immunity and Vaccination 183: 2407-2414.
- Bradford M. 1976** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brennan M., Thomas D.Y., Whiteway M., Kavanagh K. 2002** Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Medical Microbiology and Immunology* 34: 153–157
- Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A.R., Levitz S.M., Netea M.G., White T.C. 2012** Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine* 4: 165.
- Brown G.D., Gordon S. 2003** Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19: 311-315.
- Brown G.D., Gordon S. 2005** Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cellular Microbiology* 7: 471-479.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology* 38: 201–212.
- Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D. 2009** A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 792–800.
- Browne N., Heelan M., Kavanagh K. 2013** An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4: 597-603.
- Brzeziński J., Stachowski R. 1981** Zastosowanie analizy wariancji w eksperymentalnych badaniach psychologicznych. *PWE*.
- Camacho E., Sepulveda V., Goldman W., San-Blas G., Nino-Vega G. 2012** Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* *AMY1* in a *Histoplasma capsulatum* *amy 1*

- mutant, relates an α -(1,4)-amylase to cell wall α -1,3-glucan synthesis. PLOS ONE 7: e50201.
- Cao X.**, He Y., Hu Y., Wang Y., Chen Y.R., Bryant B., Clem R.J., Schwartz L.M., Blissard G., Jiang H. **2015** The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 62: 64-74.
- Capilla A.**, Karachentsev D., Patterson R.A., Hermann A., Juarez M.T., McGinnis W. **2017** Toll pathway is required for wound-induced expression of barrier repair genes in the *Drosophila* epidermis. PNAS 114: 2682-2688.
- Carrion Sde J.**, Leal S.M. Jr., Ghannoum M.A., Aimaniananda V., Latgé J.P., Pearlman E. **2013** The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks Decin-1 and Decin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. The Journal of Immunology 191: 2581-2588.
- Carton Y.**, Poirie M., Nappi A.J. **2008** Insect immune resistance to parasitoids. Insect Science 15: 67-87.
- Cerenius L.**, Lee B.L., Söderhäll K. **2008** The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology 29: 263-271.
- Cerenius L.**, Söderhäll K. **2004** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews 198: 116-26.
- Champion O.L.**, Titball R.W., Bates S. **2018** Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. Journal of Fungi 4: 1-12.
- Chang Y.C.**, Penoyer L.A., Kwon-Chung K.J. **1996** The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. Infection and Immunity 64: 1977-1983.
- Chapman R.F.** **1998** The Insects. Structure and Function, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Charriere J.D.**, Imdorf A. **1999** Protection of honey combs from wax moth damage. The American Bee Journal 139: 627-630.
- Chen K.**, Lu Z. **2018** Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori*. Developmental and Comparative Immunology 83: 3-11.
- Cheng T.**, Zhao P., Liu C., Xu P., Gao Z., Xia Q., Xiang Z. **2006** Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. Genomics 87: 356-365.

- Cherry S., Silverman N. 2006** Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend. *Nature Immunology* 7: 911-917.
- Choe K.M., Werner T., Stöven S., Hultmark D., Anderson K.V. 2002** Requirement for a Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) in Relish Activation and Antibacterial Immune Responses in *Drosophila*. *Science* 296: 359-362.
- Cociancich S., Ghazi A., Hetru C., Hoffmann J.A., Letellier L. 1993** Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 19239-19245.
- Cook S.M., McArthur J.D. 2013** Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4: 350-353.
- Cooper M.D., Alder M.N. 2006** The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124: 815-822.
- Cotter G., Doyle S., Kavanagh K. 2000** Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Medical Microbiology and Immunology* 27: 163–169.
- Cotter S.C., Myatt JP, Benskin C.M., Wilson K. 2008** Selection for cuticular melanism reveals immune function and life-history trade-offs in *Spodoptera littoralis*. *Journal of Evolutionary Biology* 21:1744-54.
- 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: 533-546.
- Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Jabłoński P., Jakubowicz T. 2001** Detection of antibacterial polypeptide activity *in situ* after sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 299: 274-276.
- Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Jakubowicz T. 2006** Studies on the role of protein kinase A in humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology* 52: 744-753.
- Da Silva J.B., De Albuquerque M.R., De Araujo E., Peixoto C.A., Hurd H. 2000** Immune defence mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 257-262.
- Daffre S., Faye I. 1997** Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig-superfamily. *FEBS Letters* 408: 127-130.

- Dague E.**, Alsteens D., Latgé J.P., Dufrene Y. **2008** High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophysical Journal* 94: 656-660.
- d'Alençon E.**, Bierne N., Girard P.A., Magdelenat G., Gimenez S., Seninet I., Escoubas J.M. **2013** Evolutionary history of x-tox genes in three lepidopteran species: origin, evolution of primary and secondary structure and alternative splicing, generating a repertoire of immune-related proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 54-64.
- De Gregorio E.**, Spellman P.T., Tzou P., Rubin G.M., Lemaitre B. **2002** The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal* 21: 2568-2579.
- de Groot P.W.**, Ruiz C., Vázquez de Aldana C.R., Duenas E., Cid V.J., Del Rey F., Rodriguez-Pena J.M., Pérez P., Andel A., Caubin J., Arroyo J., Garcia J.C., Gil C., Molina M., Garcia L.J., Nombela C., Klis F.M. **2001** A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics* 2: 124-142.
- de Groot P.W.**, Yin Q.Y., Weig M., Sosinska G.J., Klis F.M., de Koster C.G. **2007** Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 24: 267-278.
- Dean P.**, Richards E.H., Edwards J.P., Reynolds S.E., Charnley K. **2004** Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology* 28: 689-700.
- Dekkerová-Chupáčová J.**, Borghi E., Morace G., Bujdáková H. **2018** Up-Regulation of Antimicrobial Peptides Gallerimycin and Galiomicin in *Galleria mellonella* Infected with *Candida* Yeasts Displaying Different Virulence Traits. *Mycopathologia* 183: 935-940.
- Denning D.W.** **1998** Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 26: 781-803.
- Denning D.W.**, Pleuvry A., Cole D.C. **2013** Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis in adults. *Medical Mycology* 51: 361-370.
- Desalermos A.**, Tan X., Rajamuthiah R., Arvanitis M., Wang Y., Li D., Kourkoumpetis T.K., Fuchs B.B., Mylonakis E. **2015** A multi-host approach for the systematic

- analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. The Journal of Infectious diseases 15: 298-305.
- Destoumieux-Garzón D.**, Brehelin M., Bulet P., Boublik Y., Girard P.A., Baghdiguian S., Zumbihl R., Escoubas J.M. **2009** *Spodoptera frugiperda* X-tox protein, an immune related defensin rosary, has lost the function of ancestral defensins. PLoS One 4: e6795.
- 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 and Tissue Research 306: 449–458.
- Dettloff M.**, Wiesner A. **1999** Immune stimulation by lipid-bound apolipophorin III. W: Wiesner A., Dunphy G.B., Marmaras V.J., Morishima I., Sugumaran M., Yamakawa M. Techniques in Insect Immunology 243-251.
- Dong Y.**, Aguilar R., Xi Z., Warr E., Mongin E., Dimopoulos G. **2006a** *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent Plasmodium parasite species. PLoS Pathogens 2: e52.
- Dong Y.M.**, Taylor H.E., Dimopoulos G. **2006b** AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. PLoS Biology 4: 1137–1146.
- Dubovskiy I.M.**, Kryukova N.A., Glupov V.V., Ratcliffe N.A. **2016** Encapsulation and nodulation in insects. Invertebrate Survival Journal 13: 229-246.
- Dushay M.S.** **2009** Insect hemolymph clotting. Cellular and Molecular Life Sciences 66: 2643-2650.
- Dziarski R.** 2004 Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Molecular Immunology 40: 877-886.
- Edwards J.A.**, Allore E.A., Rappleye C.A. **2010** The yeast-phase virulence requirement for α -glucan synthase differs among *Histoplasma capsulatum* chemotypes. Eucaryotic Cell 10: 87-97.
- Edwards J.A.**, Chen C., Kemski M.M., Hu J., Mitchell T.K. Rappleye C.A. **2013** *Histoplasma* yeast and mycelia transcriptoms reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. BMC Genomics 14: 695.
- Edwards J.A.**, Rappleye C.A. **2011** *Histoplasma* mechanisms of pathogenesis-one portfolio doesn't fit all. FEMS Microbiology Letters 324: 1-9.
- Ekengren S.**, Hultmark D. **1999** Drosophila cecropin as an antifungal agent. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29: 965-72.

- El Chamy L., Leclerc V., Caldelari I., Reichhart J.M. 2008** Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. *Nature Immunology* 9: 1165–1170.
- Eleftherianos I., Revenis C. 2011** Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of Innate Immunity* 3: 28–33.
- Ellis J.D., Graham J.R., Mortensen A. 2013** Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research* 52: 1-17.
- Elrod-Erickson M., Mishra S., Schneider D. 2000** Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology* 10: 781-784.
- Ertürk-Hasdemir D., Broemer M., Leulier F., Lane W.S., Paquette N., Hwang D., Kim C.H., Stöven S., Meier P., Silverman N. 2009** Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 9779-9784.
- Erwig L.P., Gow N.A.R. 2016** Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology* 14: 163-176.
- Fabrick J. A., Baker J.E., Kanost M.R. 2003** cDNA cloning, purification, properties, and function of a β -1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 579-594.
- Falleiros Â.M.F., Bombonato M.T.S., Gregório E.A. 2003** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 287-294.
- Fallon J.P., Troy N., Kavanagh K. 2011** Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence* 2: 413–421.
- Fazekas De St. S., Groth R.G., Webster G., Datyner A. 1963** Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta* 71: 377-546.
- Fearon D.T. 1997** Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 388: 323-324.
- Fedhila S., Daou N., Lereclus D., Nielsen-LeRoux C. 2006** Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Molecular Microbiology* 62: 339-55.

- Ferrandon D.**, Imler J.L., Hoffmann J.A. **2004** Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond. *Seminars in Immunology* 16: 43–53.
- Ferrandon D.**, Jung A.C., Criqui M.C., Lemaitre B., Uttenweiler-Joseph S., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. **1998** A drosomycin–GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the *Toll* pathway. *The EMBO Journal* 17: 1217-1227.
- Fisher M.**, Henk D., Briggs C., Brownstein J., Madoff L., McCraw S., Gurr S. **2012** Emerging fungal threats to animals, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186-194.
- Flajnik M.F.**, Kasahara M. **2010** Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics* 11: 47–59.
- Fontaine T.**, Beauvais A., Loussert C., Thevenard B., Fulgsang C., Ohno N., Clavaud C., Prevost M.C., Latgé J.P. **2010** Cell wall α -1,3-glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 707-712.
- Fontaine T.**, Simenel C., Dubreucq G., Adam O., Delepierre M., Lemoine J., Vorgias C.E., Diaquin M., Latgé J.-P. **2000** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Biological Chemistry* 275: 27594-27607.
- Foukas L.C.**, Katsoulas H.L., Paraskevopoulou N., Metheniti A., Lambropoulou M., Marmaras V.J. **1998** Phagocytosis of *Escherichia coli* by Insect Hemocytes Requires Both Activation of the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway for Attachment and β_3 Integrin for Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 273: 14813–14818.
- Franssens V.**, Simonet G., Breugelmans B., Van Soest S., Van Hoef V., Vanden Broeck J. **2008** The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 29: 235-41.
- Fröbius A.C.**, Kanost M.R., Götz P., Vilcinskas A. **2000** Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *European Journal of Biochemistry* 267: 2046-2053.
- 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.

- Fuguet R., Vey A. 2004** Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 152-167.
- Fujikawa T., Kuga Y., Yano S., Yoshimi A., Tachiki T., Abe K., Nishimura M. 2009** Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Molecular Microbiology* 73: 553-570.
- Fujikawa T., Sakaguchi A., Nishizawa Y., Kouzai Y., Minami E., Yano S., Koga H., Meshi T., Nishimura M. 2012** Surface α -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLOS Pathogens* 8: e1002882.
- Gago S., García-Rodas R., Cuesta I., Mellado E., Alastruey-Izquierdo A. 2014** *Candida* parapsilosis, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 5: 1-8.
- Gajda E., Bugla-Płoskońska G. 2014** Lysozyme - occurrence in nature, biological properties and possible applications. *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 68: 1501-1515.
- Gardiner E.M., Strand M.R. 1999** Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 45: 113-126.
- Gardiner E.M., Strand M.R. 2000** Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 43:147-164.
- Geoghegan I., Steinberg G., Gurr S. 2017** The role of the fungal cell wall in the infection plants. *Trends in Microbiology* 25: 957-967.
- Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb B., Vilcinskas A. 2000** Fungi as elicitors of insect immune responses. *Insect Biochemistry and Physiology* 44: 49-68.
- Gillespie J.P., Kanost M.R., Trenczek T. 1997** Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611-643.
- Gobert V., Gottar M., Matskevich A.A., Rutschmann S., Royet J., Belvin M., Hoffmann J.A., Ferrandon D. 2003** Dual Activation of the *Drosophila* Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. *Science* 302: 2126-2130.
- Goetghebeur M., Kermasha S. 1996** Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 42: 935-940.

- Goldsworthy G.**, Opoku-Ware K., Mullen L. **2002** Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of the prophenoloxidase cascade in the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology* 48: 601-608.
- González-Santoyo I.**, Córdoba-Aguilar A. **2012** Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142: 1-16.
- González-Tokman D.M.**, Córdoba-Aguilar A., González-Santoyo I., Lanz-Mendoza H. **2011** Infection effects on feeding and territorial behaviour in a predatory insect in the wild. *Animal Behaviour* 81: 1185–1194.
- Gottar M.**, Gobert V., Matskevich A.A., Reichhart J.-M., Wang C., Butt T.M., Belvin M., Hoffmann J.A., Ferrandon D. **2006** Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* 127: 1425-1437.
- Gow N.A.R.**, Latgé J.P., Munro C.A. **2017** The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum* 5: 1-25.
- Grizanov E.V.**, Semenova A.D., Komarov D.A., Chertkova E.A., Slepneva I.A., Dubovskiy I.M. **2018** Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 98: e21460.
- Haine E.R.**, Rolff J., Siva-Jothy M.T. **2007** Functional consequences of blood clotting in insects. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 456-464.
- Hakamori S.** **1964** Rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides catalysed by methyl carbon. *The Journal of Biochemistry* 55: 205-208.
- Halwani A.**, Dunphy G. **1997** Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Journal of Insect Physiology* 43: 1023-1029.
- Halwani A.E.**, Dunphy G.B. **1999** Apolipoprotein-III in *Galleria mellonella* potentiates hemolymph lytic activity. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 563-570.
- Halwani A.E.**, Niven D.F., Dunphy G.B. **2000** Apolipoprotein-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 233-241.

- Hara S., Yamakawa M. 1995** Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 29923-29927.
- 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. *Infection and Immunity* 80: 2780-90.
- Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M. 2008** Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51: 2-15.
- Hawksworth D. 2001** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 milion species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Hedengren-Olcott M., Olcott M.C., Mooney D.T., Ekengren S., Geller B.L., Taylor B.J., 2004.** Differential activation of the NF-B-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* 279: 21121–21127.
- Hedstrom L. 2002** Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews* 102: 4501-4524.
- Hegedus D., Erlandson M., Gillott C., Toprak U. 2009** New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54: 285-302.
- Henry C., Latgé J.-P., Beauvais A. 2012** α -1,3-glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 11: 26-29.
- Hernandes-Chavez M.J., Perez-Garcia L.A., Nino-Vega G.A., Mora-Montes H.M. 2017** Fungal strategies to evade the host immune recognition. *Journal of Fungi* 3: 51.
- Hetru C., Hoffmann D., Bulet P. 1998** Antimicrobial peptides from insects, W: Molecular mechanisms of immune response in insects, red. Brey PT., Hultmark D., Chapman & Hall, London: 40-66.
- Hillyer J. 2016** Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology* 58: 102-118.
- Hillyer J.F., Schmidt S.L., Christensen B.M. 2003** Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Parasitology* 89: 62-69.
- Hillyer J.F., Strand M.R. 2014** Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Current Opinion in Insect Science* 3: 14-21.

- Hoffmann** J.A., Kafatos F.C., Janeway Jr. C.A., Ezekowitz R.A.B. **1999** Phylogenetic perspectives in Innate Immunity. *Science* 284: 1313-1318.
- Hogan** L.H., Klein B.S. **1994** Altered expression of surface α -1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infection and Immunity* 62: 3543-3546.
- Huang** F., Yang Y.Y., Shi M., Li J.Y., Chen Z.Q., Chen F.S., Chen X.X. **2010** Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutella xylostella* larva: cell types and their role in phagocytosis. *Tissue and Cell* 42: 360-364.
- Hughes** A.L. **2012** Evolution of the β GRP/GNBP/ β -1,3-glucanase family of insects. *Immunogenetics* 64: 549–558.
- Hultmark** D. **1996** Insect lysozymes. *Experientia Supplementum* 75: 87-102.
- Hultmark** S., Engström Å., Bennich H., Kapur R., Boman H. G. **1982** Insect Immunity: Isolation and Structure of Cecropin D and Four Minor Antibacterial Components from *Cecropia* Pupae. *European Journal of Biochemistry* 127: 207-217.
- Hung** S.Y., Boucias D.G., Vey A. **1993** Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the Cellular Defense Response of *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 179-187.
- Iimura** Y., Ishikawa H., Yamamoto K., Sehna F. **1998** Hemagglutinating properties of apolipoprotein III from the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 38: 119-125.
- Iketani** M., Nishimura H., Akayama K., Yamano Y., Morishima Y. **1999** Minimum structure of peptidoglycan required for induction of antibacterial protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 19-24.
- Imler** J.L., Zheng L. **2004** Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 18-26.
- Inglis** D., Voorhies M., Hocking-Murray D., Sil A. **2013** Comparative transcriptomics of infectious spores from the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* reveals a core set of transcripts that specify infectious and pathogenic states. *Eukaryotic Cell* 12: 828-852.
- Issa** N., Guillaumot N., Lauret E., Matt N., Schaeffer-Reiss C., Van Dorsselaer A., Reichhart J.M., Veillard F. **2018** The Circulating Protease Persephone Is an

- Immune Sensor for Microbial Proteolytic Activities Upstream of the *Drosophila* Toll Pathway. *Molecular Cell* 69: 539-550.
- Jarosz J. 1995** Haemolymph immune proteins protect the insect body cavity from invading bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 111: 213-220.
- Johansson M.W., Holmblad T., Thörnqvist P.O., Cammarata M., Parrinello N., Söderhäll K. 1999** A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *Journal of Cell Science* 112: 917-925.
- Jorjão A.O., Oliveira L.D., Scorzoni L., Figueiredo-Godoi L.M.A., Prata M.C.A., Jorge A.O.C., Junqueira J.C. 2018** From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence* 9: 383-389.
- Joyce S.A., Gahan C.G. 2010** Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology* 156: 3456-68.
- Junqueira J.C., Mylonakis E. 2019** Current Status and Trends in Alternative Models to Study Fungal Pathogens. *Journal of Fungi* 5: 1-4.
- Jura C. 2002** Bezkręgowce, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Kajla M.K., Shi L., Li B., Luckhart S., Li J., Paskewitz S.M. 2011** A new role for an old antimicrobial: lysozyme c-1 can function to protect malaria parasites in *Anopheles mosquitoes*. *PLoS One* 6: e19649.
- Kanost M.R., Jiang H., Yu X.Q. 2004** Innate immune responses of lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Review* 198: 97-105.
- Kaplan E.L., Meier P. 1958** Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481
- Karacali S., Deveci R., Pehlivan S., Özcan A. 2000** Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in the larval stage. *Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 37: 167-170.
- Kato Y., Motoi Y., Taniai K., Kadono-Okuda K., Yamamoto M., Higashino Y., Shimabukuro M., Chowdhury S., Xu J., Sugiyama M. 1994** Lipopolysaccharide-lipophorin complex formation in insect hemolymph: a common pathway of lipopolysaccharide detoxification both in insects and in mammals. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24: 547-555.
- Kaul N, Forman H.J. 1996** Activation of NF kappa B by the respiratory burst of macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 21: 401-405.

- Kavanagh** K., Reeves E.P. **2004** Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Reviews* 28: 101-112.
- Kavanagh** K., Sheehan G. **2018** The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. *Journal of Fungi* 4: 113-126.
- Khush** R.S., Leulier F., Lemaitre B. **2001** *Drosophila* immunity: two paths to NF- κ B. *Trends in Immunology* 22: 260-264.
- Kiho** T., Yoshida I., Katsuragawa M., Sakushima M., Usui S., Ukai S. **1994** Polysaccharides in Fungi XXXIV: A polysaccharide from fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activities of its carboxymethylated product. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17: 1460-1462.
- Killiny** N. **2018** Generous hosts: Why the larvae of greater wax moth, *Galleria mellonella* is a perfect infectious host model? *Virulence* 9: 860-865.
- Kim** C.H., Lee J.H., Kim I., Seo S.J., Son S.M., Lee K.Y., Lee I.H. **2004b** Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Molecules and Cells* 17: 262-266.
- Kim** H.J., Je H.J., Park S.Y., Lee I.H., Jin B.R., Yun H.K., Yun C.Y., Han Y.S., Kang Y.J., Seo S.J. **2004a** Immune activation of apolipophorin-III and its distribution in hemocyte from *Hyphantria cunea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:1011-1023.
- Kim** J.Y. **2016** Human fungal pathogens: Why should we learn? *Journal of Microbiology* 54: 145-148.
- Kim** M.J., Choe K.M. **2014** Basement membrane and cell integrity of self-tissues in maintaining *Drosophila* immunological tolerance. *PLoS Genetics* 10: e1004683.
- Kim** Y.S., Ryu J.H., Han S.J., Choi K.H., Nam K.B., Jang I.H., Lemaitre B., Brey P.T., Lee W.J. **2000** Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 32721-32727.
- King** J.G., Hillyer J.F. **2012** Infection-induced interaction between the mosquito circulatory and immune systems. *PLoS Pathogens* 8: e1003058.

- King J.G., Hillyer J.F. 2013** Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biology* 11: 55.
- Kleino A., Silverman N. 2014** The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental and Comparative Immunology* 42: 25-35.
- Klimpel K.R., Goldman W.E. 1987** Isolation and characterization of spontaneous avirulent variants of *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity* 55: 528-533.
- Klowden M.J. 2002** *Physiological Systems in Insects* Elsevier Academic Press, New York
- Koizumi N., Imamura M., Kadotani T., Yaoi K., Iwahana H., Sato R. 1999** The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Letters* 443: 139-143.
- Kopáček P., Weise C., Götz P. 1995** The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25: 1081-1091.
- Krautz R., Arefin B., Theopold U. 2014** Damage signals in the insect immune response. *Frontiers in Plant Science* 5: 342
- Kurata S. 2014** Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 42: 36-41.
- Kurucz E., Váczi B., Márkus R., Laurinyecz B., Vilmos P., Zsámboki J., Csorba K., Gateff E., Hultmark D., Andó I. 2007** Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biologica Hungarica* 58: 95-111.
- Kwadha C.A., Ong'amo G.O., Ndegwa P.N., Raina S.K., Fombong A.T. 2017** The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 8: 61-78.
- Lackie A.M. 1988** Haemocyte Behaviour. *Advances in Insect Physiology* 21: 85-178.
- Lamprou I., Mamali I., Dallas K., Fertakis V., Lampropoulou M., Marmaras V.J. 2007** Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology* 121: 314-327.

- Lapointe J.F., Dunphy G.B., Mandato C.A. 2012** Hemocyte-hemocyte adhesion and nodulation reactions of the greater wax moth, *Galleria mellonella* are influenced by cholera toxin and its B-subunit. *Results in Immunology* 2: 54-65.
- Latgé J.P. 2007** The cell wall: carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66: 279-290.
- Latgé J.P. 2010** Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* 12: 863-872.
- Lavine M.D., Strand M.R. 2001** Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 47: 965-974.
- Lavine M.D., Strand M.R. 2002** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295-1309.
- Lee K.P., Simpson S.J., Wilson K. 2008** Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology* 22: 1052–1061.
- Lee M.J., Sheppard D.C. 2016** Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Microbiology* 54: 232-242.
- Lee W.J., Lee J.D., Kravchenko V.V., Ulevitch R.J., Brey P.T. 1996** Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7888–7893.
- Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C.H., Lee, I.H. 2004** Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Molecular Biology* 13: 65–72.
- Lemaitre B., Hoffmann J. 2007** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25: 697–743.
- Lemaitre B., Reichhart J.M., Hoffmann J.A., 1997** *Drosophila* host defense: differential display of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 14614–14619.
- Lemarre C., Sokol S., Debeaupuis J.P., Henry C., Lacroix C., Glaser P., Coppee J.Y., Francois J.M., Latgé J.P. 2008** Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics* 9: 417-431.

- Leulier F.**, Parquet C., Pili-Floury S., Ryu J.H., Caroff M., Lee W.J., Mengin-Lecreulx D., Lemaitre B. **2003** The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature Immunology* 4: 478–484.
- Levashina E.A.**, Moita L.F., Blandin S., Vriend G., Lagueux M., Kafatos F.C. **2001** Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104: 709-718.
- Li B.**, Paskewitz S.M. **2006** A role for lysozyme in melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Journal of Insect Physiology* 52: 936-942.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology* 32: 919-928.
- Ligoxygakis P.**, Pelte N., Hoffmann J.A., Reichhart J.M. **2002** Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* 297: 114-116.
- Lin P.J.**, Grimm L.H., Wulkow M., Hempel D.C., Krull R. **2008** Population balance modeling of the conidial aggregation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering* 99: 341-350.
- Lindgren M.**, Riazi R., Lesch C., Wilhelmsson C., Theopold U., Dushay M.S. **2008** Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *Journal of Insect Physiology* 54: 586-592
- Lindsay S.A.**, Wasserman S.A. **2014** Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Developmental & Comparative Immunology* 42: 16-24.
- London R.**, Orozco B.S., Mylonakis E. **2006** The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host–pathogen interactions. *FEMS Yeast Research* 6: 567–73.
- Loussert C.**, Schmitt C., Prevost M.C., Balloy V., Fadel E., Philippe B., Kauffmann-Lacroix C., Latgé J.P., Beauvais A. **2010** In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology* 12: 405-410.
- Lowenberger C.** **2001** Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 219-29.
- Lowenberger C.**, Bulet P., Charlet M., Hetru C., Hodgeman B., Christensen B.M., Hoffmann J.A. **1995** Insect immunity: isolation of three novel inducible

- antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25: 867-873.
- Lu A.**, Zhang Q., Zhang J., Yang B., Wu K., Xie W., Luan Y.X., Ling E. **2014** Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in Physiology* 5: 252.
- Lu D.**, Geng T., Hou C., Huang Y., Qin G., Guo X. **2016** *Bombyx mori* cecropin A has a high antifungal activity to entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Gene* 583: 29-35.
- Luckhart S.**, Rosenberg R. **1999** Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene* 232: 25-34.
- Luckhart S.**, Vodovotz Y., Cui L., Rosenberg R. **1998** The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5700-5705.
- Lundgren J.G.**, Jurat-Fuentes J.L. **2012** Physiology and ecology of host defense against microbial invaders. W: Vega F.E., Kaya H.K., *Insect Pathology*, Academic Press, Londyn, Wielka Brytania: 461-480.
- Luo C.**, Zheng L. **2000** Independent evolution of *Toll* and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 51: 92-98.
- Ma C.**, Kanost M.R. **2000** A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 7505-7514.
- Ma C.**, Kanost M.R. **2001** A beta-1,3-glucan-binding protein from *Manduca sexta*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 484: 309-312.
- Maguire R.**, Duggan O., Kavanagh K. **2016** Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell Biology and Toxicology* 32: 209-216.
- Mak P.**, Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M. **2010** A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 1129-1136.
- Mamali I.**, Lamprou I., Karagiannis F., Karakantza M., Lampropoulou M., Marmaras V.J. **2009** A beta integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 858-866.

- Marion** C.L., Rappleye C.A., Engle J.T., Goldman W.E. **2006** An α -1,4-amylase is essential for α -1,3-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Microbiology* 62: 970-983.
- Marmaras** V.J., Lampropoulou M. **2009** Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* 21: 186-195.
- Maróti** G.G., Kereszt A., Kondorosi É. **2011** Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology* 162: 363–374.
- Martin** J.P. **1950** Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-233.
- Matha** V., Mracek Z. **1984** Changes in haemocyte counts in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleriidae) larvae infected with *Steinernema* Sp. (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 30: 86-89.
- Maubon** D., Park S., Tanguy M., Huerre M., Schmitt C., Prévost M.C., Perlin D.S., Latgé J.P., Beauvais A. **2006** AGS3, an α (1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates cymelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal Genetics and Biology* 43: 366-375.
- Meekins** D.A., Kanost M.R., Michel K. **2017** Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 62: 105-119.
- Meister** M., Hetru C., Hoffmann J. A. **2000** The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 248: 17-36.
- Mesa-Arango** A.C., Forastiero A., Bernal-Martínez L., Cuenca-Estrella M., Mellado E., Zaragoza O. **2013** The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Medical Mycology* 51: 461-72.
- Metheniti** A., Paraskevopoulou N., Lambropoulou M., Marmaras V.J. **2001** Involvement of FAK/Src complex in the processes of *Escherichia coli* phagocytosis by insect hemocytes. *FEBS Letters* 496: 55-59
- Miyata** S., Casey M., Frank D.W., Ausubel F.M., Drenkard E. **2003** Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity* 71: 2404-2413.

- Moreira S.**, Stramer B., Evans I., Wood W., Martin P. **2010** Prioritization of competing damage and developmental signals by migrating macrophages in the *Drosophila* embryo. *Current Biology* 20: 464-470.
- Moreno-Habel D.A.**, Biglangawa I.M., Dulce A., Luu D.D., Garcia P., Weers P.M., Haas-Stapleton E.J. **2012** Inactivation of the budded virus of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by gloverin. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 92-101.
- Moussian B.** **2010** Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 363-375.
- Mouyna I.**, Fontaine T. **2009** Cell wall of *Aspergillus fumigatus*: a dynamic structure W: Latgé J.-P., Steinbach W.J. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis, Waszyngton, USA: 149-158.
- Mowlds P.**, Coates C., Renwick J., Kavanagh K. **2010** Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following β -Glucan inoculation. *Microbes and Infection* 12: 146-153.
- Mukherjee K.**, Domann E., Hain T. **2011** The greater wax moth *Galleria mellonella* as an alternative model host for human pathogens. W: Vilcinskas A. *Insect Biotechnology*, Springer, Germany.
- Mukherjee K.**, Vilcinskas A. **2018** The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection. *Virulence* 9: 402-413.
- Myllmäki H.**, Rämet M. **2014** JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *The Scandinavian Journal of Immunology* 79: 377–385.
- Myllmäki H.**, Valanne S., Rämet M. **2014** The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* 192: 3455-3462.
- Mylonakis E.** **2008** *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 165: 1-3.
- Mylonakis E.**, Moreno R., El Khoury J.B. **2005** *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infection and Immunity* 73: 3842–3850.
- Nagai T.**, Kawabata S. **2000** A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *Journal of Biological Chemistry* 275: 29264-29267.

- Nakahara Y.**, Kanamori Y., Kiuchi M., Kamimura M. **2010** Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *PLoS One* 5: e11816.
- Nappi A.J.**, Vass E., Frey F., Carton Y. **2000** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4: 423-430.
- Nardi J.B.**, Gao C., Kanost M.R. **2001** The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. *Journal of Insect Physiology* 47: 997-1006.
- Nardi J.B.**, Pilas B., Ujhelyi E., Garsha K., Kanost M.R. **2003** Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Development Genes and Evolution* 213: 477-491.
- Neuwirth M.** **1973** The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Journal of morphology* 139: 105-123.
- 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. *Biochemistry* 40: 11502-11508.
- Ochiai M.**, Ashida M. **1988** Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 12056-12062.
- Ochiai M.**, Ashida M. **2000** A pattern-recognition protein for β -1,3-glucan: the binding domain and the cDNA cloning of β -1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 4995-5002.
- Ochiai M.**, Niki T., Ashida M. **1992** Immunocytochemical localization of beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell and Tissue Research* 268: 431-437.
- Ohta M.**, Watanabe A., Mikami T., Nakajima Y., Kitami M., Tabunoki H., Ueda K., Sato R. **2006** Mechanism by which *Bombyx mori* hemocytes recognize microorganisms: direct and indirect recognition systems for PAMPs. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 867-877.
- Oztug M.**, Martinon D., Weers P.M. **2012** Characterization of the apoLp-III/LPS complex: insight into the mode of binding interaction. *Biochemistry* 51: 6220-6227.
- Paris S.**, Debeaupuis J.P., Cramer R., Carey M., Charles F., Prevost M. C., Schmitt C., Bruno P., Latge J.P. **2003** Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1581-1588.

- Pastor-Pareja J.C., Wu M., Xu T. 2008** An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Disease Models and Mechanisms* 1: 144-154.
- Patterson T.F., Kirkpatrick W.R., White M., Hiemenz J.W., Wingard J.R., Dupont B., Rinaldi M.G., Stevens D.S., Graybill J.R. 2000** Invasive aspergillosis disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Medicine* 79: 250-260.
- Pech L.L., Strand M.R. 1996** Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science* 109: 2053-2060.
- Pech L.L., Strand M.R. 2000** Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology* 46: 1565-1573.
- Pendland J.C., Heath M.A., Boucias D.G. 1988** Function of a galactose-binding lectin from *Spodoptera exigua* larval haemolymph: Opsonization of blastospores from entomogenous hyphomycetes. *Journal of Insect Physiology* 34: 533-540.
- Perdoni E., Falleni M., Tosi D., Cirasola D., Romagnoli S., Braidotti P., Clementi E., Bulfamante G., Borghi E. 2014** A Histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *European Journal of Histochemistry* 58: 258-262.
- Pereira T.C., de Barros P.P., Fugisaki L.R.O., Rossoni R.D., Ribeiro F.C., de Menezes R.T., Junqueira J.C., Scorzoni L. 2018** Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of Fungi* 4: 1-19.
- Pfaffl M.W. 2001** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Pfaller M.A., Diakema D.J. 2010** Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology* 36: 1-53.
- Polacheck I., Rosenberger R.F. 1977** *Aspergillus nidulans* mutant lacking α -1,3-glucan, melanin and cleistothecia. *Journal of Bacteriology* 132: 650-656.
- Pratt C.C., Weers P.M. 2004** Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipophorin III, from *Galleria mellonella*. *Biological Chemistry* 385: 1113-1119.
- Ragland S.A., Criss A.K. 2017** From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens* 13: e1006512.

- Rajitha K.**, Savithri G., Sujathamma P. **2013** Haemocyte population dynamics in fifth instar silkworm *Bombyx mori* L inoculated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. International Journal of Agricultural Science and Research 3: 265-276.
- Ramarao N.**, Nielsen-Leroux C., Lereclus D. **2012** The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. Journal of Visualized Experiments 70: e4392.
- Rämet M.**, Manfruelli P., Pearson A., Mathey-Prevot B., Ezekowitz R.A. **2002** Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for E. coli. Nature 416: 644-648.
- Rantala M.J.**, Kortet R., Kotiaho J.S., Vainikka A., Suhonen J. **2003** Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. Functional Ecology 17: 534–540.
- 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. Developmental and Comparative Immunology 34: 264-71.
- Rao X.J.**, Cao X., He Y., Hu Y., Zhang X., Chen Y.R., Blissard G., Kanost M.R., Yu X.Q., Jiang H. **2015** Structural features, evolutionary relationships, and transcriptional regulation of C-type lectin-domain proteins in *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 62: 75-85.
- Rao X.J.**, Zhan M.Y., Pan Y.M., Liu S., Yang P.J., Yang L.L., Yu X.Q. **2018** Immune functions of insect β GRPs and their potential application. Developmental and Comparative Immunology 83: 80-88.
- Rappleye C.A.**, Eissenberg L.G., Goldman W.E. **2007** *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 1366-1370.
- Rappleye C.A.**, Engle J.T., Goldman W.E. **2004** RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. Molecular Microbiology 53: 153–165.
- Rasmussen L.**, Pratt N., Hansen M. R., Hallas J., Pottegård A. **2018** Using the “proportion of patients covered” and the Kaplan Meier survival analysis to describe treatment persistence. Pharmacoepidemiology and Drug Safety 27: 867-871.

- Ratcliffe** N.A., Gagen S.J. **1976** Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: Nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 373-382.
- 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 and Cell* 9: 73-85.
- Ratcliffe** N.A., Mead G.P., Renwranz L.R. **1986** Insect haemocyte separation – an essential prerequisite to progress in understanding Insect Cellular Immunity. W: Brehélin M. *Immunity in Invertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Razzell** W., Evans I.R., Martin P., Wood W. **2013** Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Current Biology* 23: 424-429.
- Reedy** J.L. Bastidas R.J., Heitman J. **2007** The virulence of human pathogenic fungi: Notes from the South of France. *Cell Host and Microbe* 2: 77-83.
- Reese** A.J., Doering T.L. **2003** Cell wall α -1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Molecular Microbiology* 50: 1401-1409.
- Reese** A.J., Yoneda A., Breger J.A. Beauvais A., Liu H., Griffith C.L., Bose I., Kim M.J. Skau C., Yang S, Sefko J.A., Osumi M., Latgé J.P., Mylonakis E., Doering T.L. **2007** Loss of cell wall α (1-3)glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Molecular Microbiology* 63: 1385-1398.
- Reeves** E.P., Messina C.G., Doyle S., Kavanagh K. **2004** Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158: 73-79.
- Ribeiro** C., Brehélin M. **2006** Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology* 52: 417-429.
- Rizki** R.M., Rizki T.M. **1980** Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* 189: 207-213.
- Rizki** T.M., Rizki R.M. **1983** Blood cell surface changes in *Drosophila* mutants with melanotic tumors. *Science* 220: 73-75.
- Rosales** C. **2011** Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *Invertebrate Survival Journal* 8: 109-131.

- Rossoni R.D.**, Fuchs B.B., de Barros P.P., Velloso M.D.S., Jorge A.O.C., Junquiera J.C. **2017** *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. PLoS ONE 12: e0173332.
- Rowley A.F.**, Ratcliffe N.A. **1978** A histological study of wound healing and hemocyte function in the wax-moth *Galleria mellonella*. Journal of Morphology 157: 181-200.
- Royet J.**, Reichhart J.M. **2003** Detection of peptidoglycans by NOD proteins. Trends in Cell Biology 13: 610-614.
- Rutschmann S.**, Jung A.C., Hetru C., Reichhart J.M., Hoffmann J.A., Ferrandon D. **2000** The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. Immunity 12: 569–580.
- Salem H.M.**, Hussein M.A., Hafez S.E., Hussein M.A., Sayed R.M. **2014** Ultrastructure changes in the haemocytes of *Galleria mellonella* larvae treated with gamma irradiated *Steinernema carpocapsae* BA2. Journal of Radiation Research and Applied Sciences 7: 74-79.
- San-Blas F.**, Vernet D. **1977a** Induction of the synthesis of cell wall α -1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. Infection and Immunity 15: 897-902.
- San-Blas G.**, San-Blas F., Ormaechea E., Serrano L.E. **1977b** Cell wall analysis of an adenine-requiring mutant of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. Sabouraudia 15: 297-303.
- San-Blas G.**, San-Blas F., Serrano L.E. **1977c** Host-parasite relationship in the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. Infection and Immunity 15: 343-346.
- Satyavathi V.V.**, Minz A., Nagaraju J. **2014** Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. Cell Signalling 26: 1753-1763.
- Schägger H.**, von Jagow G. **1987** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry 166: 368-379.
- Schmitz A.**, Anselme C., Ravallec M., Rebuf C., Simon J.C., Gatti J.L. **2012** The Cellular Immune Response of the Pea Aphid to Foreign Intrusion and Symbiotic Challenge. PLoS ONE 7: e42114.

- Schoffemeer** E.A.M., Klis F.M., Sietsma J.H., Cornelissen B.J.C. **1999** The Cell Wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 27: 275-282.
- Schoofs** L., Holman G.M., Hayes T.K., Nachman R.J., De Loof A. **1990** *Locusta* tachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides from the vertebrate tachykinin family. *FEBS Letters* 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*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 53: 125-133.
- Seitz** V., Clermont A., Wedde M. **2003** Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 207–215.
- Shaik** H.A., Sehnael F. **2009** Hemolin expression in the silk glands of *Galleria mellonella* in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration. *Journal of Insect Physiology* 55: 781-787.
- Shao** Q., Yang B., Xu Q., Li X., Lu Z., Wang C., Huang Y., Söderhäll K., Ling E. **2012** Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *Journal of Biological Chemistry* 287: 14270-14279.
- Sheehan** G., Clarke G., Kavanagh K. **2018** Characterisation of the cellular and proteomic response of *Galleria mellonella* larvae to the development of invasive aspergillosis. *BMC Microbiology* 18: 63.
- Sheehan** G., Kavanagh K. **2018** Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence* 9: 163-172.
- Shikano** I., Ericsson J.D., Cory J.S., Myers J.H. **2010** Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. *Basic and Applied Ecology* 11: 15-22.
- Sigle** L.T., Hillyer J.F. **2016** Mosquito hemocytes preferentially aggregate and phagocytose pathogens in the periostial regions of the heart that experience the most hemolymph flow. *Developmental and Comparative Immunology* 55: 90-101.
- Silva** L.N., Da Hora G.C.A., Soares T.A., Bojer M.S., Ingmer H., Macedo A.J., Trentin D.S. **2017** Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus*

- infection and inhibits multiple virulence factors. *Scientific Reports* 7: 2823-2839.
- Silverman N.**, Maniatis T. **2001** NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Development* 15: 2321-2342.
- Siva-Jothy M.T.**, Thompson J.W. **2002** Short-term nutrient deprivation affects adult immune function in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. *Physiological Entomology* 27: 206–212.
- Slepneva I.A.**, Komarov D.A, Glupov V.V., Serebrov V.V., Khramtsov V.V. **2003** Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 188-191.
- Smith P.**, Mwangi J., Afrane Y., Yan G., Obbard D., Randford-Cartwright L., Little T. **2011** Alternative splicing of the *Anopheles gambiae* Dscam gene in diverse *Plasmodium falciparum* infections. *Malaria Journal* 10: 156.
- Sowa-Jasilek A.**, Zdybicka-Barabas A., Stączek 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-Jasilek 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. *Microbiological Research* 193: 121-131.
- Srygley R.B.**, Lorch P.D., Simpson S.J., Sword G.A. **2009** Immediate protein dietary effects on movement and the generalised immunocompetence of migrating Mormon crickets *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Ecological Entomology* 34: 663–668.
- St Leger R.J.**, Bidochka M.J., Roberts D.W. **1994** Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 313: 1-7.
- St Leger R.J.**, Screen S.E., Shams-Pirzadeh B. **2000** Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 320–324.
- Stączek S.**, Grygorczuk K., Zdybicka-Barabas A., Siemińska-Kuczer A., Vertyporokh L., Andrejko M., Wojda I., Cytryńska M. **2017** Różne oblicza oksydazy fenolowej u zwierząt. *Postępy Biochemii* 63: 315-325.

- Stączek S.**, Zdybicka-Barabas A., Mak P., Sowa-Jasiłek A., Kędracka-Krok S., Jankowska U., Suder P., Wydrych J., Grygorczuk K., Jakubowicz T., Cytryńska M. **2018** Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipophorin III during immune response against different pathogens. *Journal of Insect Physiology* 105: 18-27.
- Stephen-Victor E.**, Karnam A., Fontaine T., Beauvais A., Das M., Hegde P., Prakhar P., Holla S., Balaji K.N., Kaveri S.V., Latgé J.P., Aïmaniananda V., Bayry J. **2017** *Aspergillus fumigatus* Cell Wall α -(1,3)-Glucan Stimulates Regulatory T-Cell Polarization by Inducing PD-L1 Expression on Human Dendritic Cells. *The Journal of Infectious Diseases* 216: 1281-1294.
- Sthle L.**, Wold S. **1989** Analysis of variance (ANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 6: 259-272.
- Stoepler T.M.**, Castillo J.C., Lill J.T., Eleftherianos I. **2013** Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. *PLoS One* 8: e70978.
- Stokes B.A.**, Yadav S., Shokal U., Smith L.C., Eleftherianos I. **2015** Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-12.
- Strand M.R.** **2008** The insect cellular immune response. *Insect Science* 15: 1-14.
- Strand M.R.**, Clark K.D. **1999** Plasmacytocyte spreading peptide induces spreading of plasmacytocytes but represses spreading of granulocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42: 213-223.
- Strand M.R.**, Pech L.L. **1995** Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology* 40: 31-56.
- Sun S.C.**, Faye I. **1995** Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H₂O₂ and diminished by thiol reagents. *European Journal of Biochemistry* 231: 93-98.
- Sun Z.**, Wu W., Zhang G. **2019** Characterization of novel β -1,3-glucan recognition proteins from a Tibetan Plateau ghost moth *Thitarodes pui* (Lepidoptera, Hepialidae). *Physiological entomology* 44: 20-32.
- Takahasi K.**, Ochiai M., Horiuchi M., Kumeta H., Ogura K., Ashida M. and Inagaki F. **2009** Solution structure of the silkworm β GRP/GNBP3 N-terminal domain reveals the mechanism for β -1,3-glucan-specific recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 11679-11684.

- Takehana A.**, Katsuyama T., Yano T., Oshima Y., Takada H., Aigaki T., Kurata S. **2002** Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. PNAS 99: 13705-13710.
- Tan J.**, Xu M., Zhang K., Wang X., Chen S., Li T., Xiang Z., Cui H. **2013** Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology 59: 595-603.
- Terenius O.** **2008** Hemolin-A lepidopteran anti-viral defense factor? Developmental and Comparative Immunology 32: 311-316.
- Theopold U.**, Krautz R., Dushay M.S. **2014** The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. Developmental and Comparative Immunology 42: 42-46.
- Theopold U.**, Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O. **2002** The coagulation of insect hemolymph. Cellular and Molecular Life Sciences 59: 363-372.
- Thomaz L.**, García-Rodas R., Guimarães A.J., Taborda C.P., Zaragoza O., Nosanchuk J.D. **2013** *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. Virulence 4: 139-146.
- Ting A.T.**, Bertrand M.J.M. **2016** More to life than NF- κ B in TNFR1 signaling. Trends in Immunology 37: 535-545.
- Tojo S.**, Naganuma F., Arakawa K., Yokoo S. **2000** Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Insect Physiology 46: 1129-1135.
- Trevijano-Contador N.**, Herrero-Fernández I., García-Barbazán I., Scorzoni L., Rueda C., Rossi S.A., García-Rodas R., Zaragoza O. **2015** *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. Virulence 6: 66-74.
- Trevijano-Contador N.**, Zaragoza O. **2019** Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. Journal of Fungi 5: 3-26.
- Valanne S.**, Wang J.-H., Ramet M. **2011** The *Drosophila* toll signaling pathway. The Journal of Immunology 186: 649–656.
- Valsecchi I.**, Dupres V., Michel J.P., Duchateau M., Matondo M., Chamilos G., Saveanu C., Guijarro J.I., Aïmanianda V., Lafont F., Latgé J.P., Beauvais A. **2019a** The puzzling construction of the conidial outer layer of *Aspergillus fumigatus*. Cellular Microbiology 21: e12994.

- Valsecchi I.**, I.Lai J., Stephen-Victor E., Pillé A., Beaussart A., Lo V., Pham C.L.L., Aïmanianda V., Kwan A.H., Duchateau M., GaiGianetto Q., Matondo M., Lehoux M., Sheppard D.C., Dufrene Y.F., Bayry J., IñakiGuijarro J., Sunde M., Latgé J.P. **2019b** Assembly and disassembly of *Aspergillus fumigatus* conidial rodlets. The Cell Surface. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100023>.
- van der Weerden N.L.**, Bleackley M.R., Anderson M.A. **2013** Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. Cellular and Molecular Life Sciences 70: 3545-3570.
- Vazquez J.A.**, Tovar-Torres M.P., Hingwe A., Cheema F., Welch V., Ford K. **2016** The changing epidemiology of invasive aspergillosis in the non-traditional host: risk factors and outcomes. Pulmonary and Critical Care Medicine 1: 67-71.
- Vertyporokh L.**, Wojda I. **2017** Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*. Acta Biochimica Polonica 64: 273-278.
- Vijayan M.**, Chandra N. **1999** Lectins. Current Opinion in Structural Biology 9: 707-714.
- Vilcinskas A.**, Matha V. **1997** Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae). European Journal of Entomology 94: 461-472.
- Vilcinskas A.**, Wedde M. **2002** Insect inhibitors of metalloproteinases. IUBMB Life 54: 339-343.
- Vizioli J.**, Richman A.M., Uttenweiler-Joseph S., Blass C., Bulet P. **2001** The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 241-248.
- Vogel H.**, Altincicek B., Glöckner G., Vilcinskas A. **2011** A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genomics 12: 1-19.
- Vogelweith F.**, Moret Y., Monceau K., Thiéry D., Moreau J. **2016** The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. Journal of Insect Physiology 88: 33-39.
- Wago H.** **1983** The important significance of filopodial elongation of phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*, in recognition of foreignness. Developmental and Comparative Immunology 7: 445-453.

- Wang L., Ligoxygakis P. 2006** Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response, *Immunology* 211: 251-261.
- Wang Y., Jiang H., Kanost M.R. 1999** Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 1075-1086.
- Wang Y., Sumathipala N., Rayaprolu S., Jiang H. 2011** Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a β -1,3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 322-331.
- Warburg A., Shtern A., Cohen N., Dahan N. 2007** Laminin and a *Plasmodium* ookinete surface protein inhibit melanotic encapsulation of Sephadex beads in the hemocoel of mosquitoes. *Microbes and Infection* 9: 192-199.
- Wedde M., Weise C., Nuck R., Altincicek B., Vilcinskas A. 2007** The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. *Biological Chemistry* 388: 119-127.
- Weers P.M.M., Ryan R.O. 2006** Apolipophorin III: role model apolipoprotein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 231-240.
- Wen D., Wang X., Shang L., Huang Y., Li T., Wu C., Zhang R., Zhang J. 2016** Involvement of a versatile pattern recognition receptor, apolipophorin-III in prophenoloxidase activation and antibacterial defense of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Developmental and Comparative Immunology* 65: 124-131.
- Werner T., Borge-Renberg K., Mellroth P., Steiner H., Hultmark D. 2003** Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 278: 26319-26322.
- Werner T., Liu G., Kang D, Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. 2000** A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 97: 13772-13777.
- Whitten M.M., Ratcliffe N.A. 1999** In vitro superoxide activity in the haemolymph of the West Indian leaf cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Journal of Insect Physiology* 45: 667-675.

- Whitten** M.M.A., Tew I.F., Lee B.L., Ratcliffe N.A. **2004** A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in β -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *Journal of Immunology* 172: 2177-2185.
- Wiater** A., Paduch R., Choma A., Pleszczyńska M., Siwulski M., Dominik J., Janusz G., Tomczyk M., Szczodrak J. **2012** Biological study on carboxymethylated (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 51: 1014-1023.
- Wiegand** C., Levin D., Gillespie J., Willott E., Kanost M., Trenczek T. **2000** Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 45: 95-108.
- Wierzbicka** M. **2000** Grzybice układowe-współczesne zagrożenia. *Nowa Medycyna* 4: 1-4.
- Wiesner** A., Losen S., Kopáček P., Weise C., Götz P. **1997** Isolated apolipophorin III from *Galleria mellonella* stimulates the immune reactions of this insect. *Journal of Insect Physiology* 43: 383-391.
- Wiesner** J., Vilcinskas A. **2010** Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1: 440–464.
- Wojda** I. **2017** Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science* 24: 342-357.
- Wojda** I., Jakubowicz T. **2007** Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 53: 1134-1144.
- 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. *Journal of Insect Physiology* 55: 525-531.
- Wojda** I., Taszłow P. **2013** Heat shock affects host-pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Physiology* 59: 894-905.
- Wolski** E.A., Maldonado S., Daleo G.R., Andreu A.B. **2007** A novel α -1,3-glucan elicits plant defense responses in potato and induces protection against *Rhizoctonia solani* AG-3 and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 93-103.
- Woods** J.P. **2016** Revisiting old Friends: Developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. *Journal of Microbiology* 54: 265-276.

- Wu G., Li M., Liu Y., Ding Y., Yi Y. 2015** The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. *Journal of Insect Physiology* 81: 60-68.
- Wu G., Liu Y., Yi Y. 2016** Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in innate immunity. *Tissue and Cell* 48: 297-304.
- Wu G., Yi Y. 2015** Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 167: 131-139.
- Wu Q., Patočka J., Kuča K. 2018b** Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review *Toxins* 10: e461.
- Wu T., Zhao Y., Wang Z. Song Q., Wang Z., Xu Q., Wang Y., Wang L., Zhang Y., Feng C. 2018a** β -1,3-Glucan recognition protein 3 activates the prophenoloxidase system in response to bacterial infection in *Ostrinia furnacalis* Guenée. *Developmental and Comparative Immunology* 79: 31-43.
- Xu X.X., Zhong X., Yi H.Y., Yu X.Q. 2012** *Manduca sexta* gloverin binds microbial components and is active against bacteria and fungi. *Developmental and Comparative Immunology* 38: 275-284.
- Yamada K., Natori S. 1994** Characterization of the antimicrobial peptide derived from sapecin B, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochemical Journal* 3: 623-628.
- Yamashita M., Iwabuchi K. 2001** *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology* 47: 325-331.
- Yi H.Y., Chowdhury M., Huang Y.D., Yu X.Q. 2014** Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 5807–5822.
- Yi H.Y., Deng X.-., Yang W.Y. 2013** Gloverins of the silkworm *Bombyx mori*: structural and binding properties and activities. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 612–625.
- Yoshida H., Kinoshita K., Ashida M. 1996** Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 13854-13860.

- Yoshimi A.**, Miyazawa K., Abe K. **2016** Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 80: 1700-1711.
- Yoshimi A.**, Miyazawa K., Abe K. **2017** Function and biosynthesis of cell wall α -1,3-glucan in fungi. *Journal of Fungi* 3: 63-84.
- Yu H.Z.**, Wang J., Zhang S.Z., Toufeeq S., Li B., Li Z., Yang L.A., Hu P., Xu J.P. **2018** Molecular characterisation of Apolipophorin-III gene in *Samia cynthia ricini* and its roles in response to bacterial infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 159: 61-70.
- Yu K.H.**, Kim K.N., Lee J.H., Lee H.S., Kim S.H., Cho K.Y, Nam N.H., Lee I.H. **2002** Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Developmental and Comparative Development* 26: 707-713.
- Yu X.Q.**, Gan H., Kanost M.R. **1999** Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 585-597.
- Yu X.Q.**, Jiang H., Wang Y., Kanost M.R. **2003** Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 197-208.
- Yu X.Q.**, Kanost M.R. **2000** Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 275: 37373-37378.
- Yu X.Q.**, Kanost M.R. **2002** Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *European Journal of Biochemistry* 269: 1827-1834.
- Yun J.E.**, Lee D.G. **2016** Cecropin A-induced apoptosis is regulated by ion balance and glutathione antioxidant system in *Candida albicans*. *IUBMB Life* 68: 652-62.
- Yurchenco P.D.** **2011** Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: 1-27.
- Zakarian R.J.**, Dunphy G.B., Albert P.J., Rau M.E. **2002** Apolipophorin-III affects the activity of the haemocytes of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology* 48: 715-723.

- Zdybicka-Barabas A.**, Cytryńska M. **2010** Phenoloxidase activity in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Aspergillus oryzae*. *Annales Universitatis Mariae Curie Skłodowska Sectio C LXV*: 49-57.
- Zdybicka-Barabas A.**, Cytryńska M. **2011** Involvement of apolipophorin III in antimicrobial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 158: 90-98.
- Zdybicka-Barabas A.**, Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M. **2014** Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 87: 1-12.
- Zdybicka-Barabas A.**, Mak P., Klys A., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiołka M.J., Cytryńska M. **2012** Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 2623-2635.
- Zdybicka-Barabas A.**, Sowa-Jasiłek A., Stączek S., Jakubowicz T., Cytryńska M. **2015** Different forms of apolipophorin III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides* 68: 105-112.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 1449-1456.
- Zdybicka-Barabas A.**, Stączek S., Pawlikowska-Pawłęga B., Mak P., Luchowski R., Skrzypiec K., Mendyk E., Wydrych J., Gruszecki W.I., Cytryńska M. **2018** Studies on the interactions of neutral *Galleria mellonella* cecropin D with living bacterial cells. *Amino Acids* doi: 10.1007/s00726-018-2641-4.
- Zhang G.**, Ghosh S. **2001** Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *Journal of Clinical Investigation* 107: 13-19.
- Zhang R.**, Cho H.Y., Kim H.S., Ma Y.G., Osaki T., Kwabata S., Söderhäll K., Lee B.L. **2003** Characterization and properties of a 1,3- β -D-glucan pattern recognition protein of *Tenebrio molitor* larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation. *J. Biol. Chem.* 278: 42072-42079.

- Zhang S.**, Sato H., Ichinose S., Tanaka M., Miyazawa K., Yoshimi A., Abe K., Shintani T., Gomi K. **2017** Cell wall α -1,3-glucan prevents α -amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 124: 47-53.
- Zhang X.**, He Y., Cao X., Gunaratna R.T., Chen Y., Blissard G., Kanost M.R., Jiang H. **2015** Phylogenetic analysis and expression profiling of the pattern recognition receptors: Insights into molecular recognition of invading pathogens in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 62: 38-50.
- Zhao P.**, Li J., Wang Y., Jiang H. **2007** Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem.Mol. Biol.* 37: 952-959.
- Zhong X.**, Xu X.X., Yi H.Y., Lin C., Yu X.Q. **2012** A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42: 514-524.
- Zhu Y.**, Ragan E.J., Kanost M.R. **2010** Leureptin: A soluble, extracellular leucine-rich repeat protein from *Manduca sexta* that binds lipopolysaccharide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 713-722.
- Zonneveld B.J.M.** **1972** The significance of α -1,3-glucan of the cell wall and α -1,3-glucanase for cleistothecium development. *Biochimica et Biophysica Acta* 273: 174-187.

SPIS RYCIN

Ryc. 1. Pozycja taksonomiczna barciaka większego <i>G. mellonella</i>	17
Ryc. 2. Gąsienica (a) oraz postać dorosła (b) barciaka większego <i>G. mellonella</i>	19
Ryc. 3. Reakcje odpornościowe <i>G. mellonella</i> uruchamiane w odpowiedzi na zakażenie.	22
Ryc. 4. Porównanie szlaków sygnałowych Toll, Imd i JAK/STAT	29
Ryc. 5. Regulacja syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych w szlaku Toll i Imd u <i>Drosophila</i>	32
Ryc. 6. Typy hemocytów <i>G. mellonella</i>	35
Ryc. 7. Prawdopodobny przebieg procesu hematopoezy u Lepidoptera	37
Ryc. 8. Zaangażowanie hemocytów gąsienic <i>G. mellonella</i> w odpowiedź komórkową na zarodniki <i>A. niger in vivo</i> . Proces fagocytozy bądź adhezji zarodników do powierzchni hemocytów (a) oraz nodulacji zarodników przez hemocyty (b).....	39
Ryc. 9. Schematyczny przebieg reakcji kaskadowej prowadzącej do melanizacji u owadów	43
Ryc. 10. Proces krzepnięcia hemolimfy zaangażowany w gojenie ran u <i>G. mellonella</i>	45
Ryc. 11. Wybrane mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych	47
Ryc. 12. Epidemiologia inwazyjnych grzybic u ludzi	56
Ryc. 13. Epidemiologia inwazyjnych aspergilloz u ludzi	57
Ryc. 14. Porównanie budowy ściany komórkowej wybranych gatunków grzybów	58
Ryc. 15. Porównanie budowy ściany komórkowej zarodników (A) oraz strzępek (B) <i>A. fumigatus</i>	60
Ryc. 16. Immunodetekcja α -1,3-glukanu w ścianie komórkowej <i>A. niger</i>	76
Ryc. 17. Cząstki α -1,3-glukanu <i>A. niger</i> obrazowane przy użyciu AFM.....	78
Ryc. 18. Wzory strukturalne: (A) α -1,3-glukanu oraz (B) laminaryny (rozgałęziony β -1,3/1,6-glukan).....	80
Ryc. 19. Rola oksydazy fenolowej w melanogenezie	84
Ryc. 20. Obraz elektroforetyczny SDS-PAGE markerowych białek rekombinowanych	87
Ryc. 21. Schemat przygotowania żelu do elektroforezy Tris-trycyna SDS-PAGE.....	88
Ryc. 22. Obraz elektroforetyczny Tris-trycyna SDS-PAGE białek markerowych	89
Ryc. 23. Zestaw do elektrotransferu białek z żelu na membranę	90
Ryc. 24. Zasada wykrywania białek na membranie z użyciem przeciwciał.....	91
Ryc. 25. Wpływ wybranych immunogenów pochodzenia grzybowego na przeżywalność gąsienic <i>G. mellonella</i>	101
Ryc. 26. Zmiany w wyglądzie gąsienic <i>G. mellonella</i> obserwowane makroskopowo w różnym czasie po podaniu α -1,3-glukanu oraz zarodników <i>A. niger</i>	102

Ryc. 27. Analiza aktywności przeciwgrzybowej w hemolimfie <i>G. mellonella</i> po podaniu różnych dawek α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	104
Ryc. 28. Aktywność przeciwgrzybowa w hemolimfie <i>G. mellonella</i> po podaniu 5 μ g α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	105
Ryc. 29. Aktywność przeciwgrzybowa w hemolimfie <i>G. mellonella</i> po immunizacji zarodnikami <i>A. niger</i> oraz laminaryną.....	106
Ryc. 30. Aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i>	108
Ryc. 31. Aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji laminaryną oraz zarodnikami <i>A. niger</i>	109
Ryc. 32. Profile białek i peptydów hemolimfy gąsienic <i>G. mellonella</i> immunizowanych α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	111
Ryc. 33. Profile białek i peptydów hemolimfy gąsienic <i>G. mellonella</i> immunizowanych laminaryną oraz zarodnikami <i>A. niger</i>	113
Ryc. 34. Elektroforeza dwukierunkowa białek hemolimfy gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	114
Ryc. 35. Poziom wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> immunizowanych α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	116
Ryc. 36. Poziom ekspresji genów wybranych peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	118
Ryc. 37. Poziom ekspresji genów wybranych peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym <i>G. mellonella</i> po immunizacji zarodnikami <i>A. niger</i> i wodą.....	119
Ryc. 38. Aktywność lizozymu w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	120
Ryc. 39. Poziom lizozymu w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	121
Ryc. 40. Aktywność lizozymu w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji laminaryną oraz zarodnikami <i>A. niger</i>	122
Ryc. 41. Aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	123
Ryc. 42. Aktywność oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> po immunizacji laminaryną i zarodnikami <i>A. niger</i>	124
Ryc. 43. Poziom apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> immunizowanych α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	127
Ryc. 44. Względny poziom apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> 24 godziny po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	127
Ryc. 45. Poziom apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic <i>G. mellonella</i> immunizowanych zarodnikami <i>A. niger</i> i wodą.....	128
Ryc. 46. Wykrywanie apolipoforyny III w hemocytach <i>G. mellonella</i>	128
Ryc. 47. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> i DMSO.....	131

Ryc. 48. Immunolokalizacja apolipoforyny III w hemocytach <i>G. mellonella</i> po immunizacji zarodnikami <i>A. niger</i> i wodą.....	132
Ryc. 49. Udział apolipoforyny III w procesie krzepnięcia hemolimfy <i>G. mellonella</i> ..	133
Ryc. 50. Względny udział poszczególnych typów hemocytów w populacji (DHC), po immunizacji gąsienic <i>G. mellonella</i> α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> , DMSO, zarodnikami <i>A. niger</i> oraz wodą	139
Ryc. 51. Udział hemocytów w odpowiedzi komórkowej <i>G. mellonella</i> na podanie α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	141
Ryc. 52. Obraz makroskopowy zmelanizowanych nodul powstałych w hemocelu <i>G. mellonella</i> po immunizacji α -1,3-glukanem <i>A. niger</i>	142
Ryc. 53. Rozdział elektroforetyczny (a, b) oraz immunodetekcja (c) białek hemolimfy <i>G. mellonella</i> wiążących się do α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	144
Ryc. 54. Modulacja odpowiedzi immunologicznej gąsienic <i>G. mellonella</i> przez przez α -1,3-glukan <i>A. niger</i>	168

SPIS TABEL

Tab. 1. Skład żeli do elektroforezy Tris-glicyna SDS-PAGE (opracowanie własne). ...	86
Tab. 2. Skład procentowy żeli do elektroforezy Tris-trycyna SDS-PAGE	88
Tab. 3. Sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystywanych w doświadczeniach ...	98
Tab. 4. Zmiany całkowitej liczby hemocytów (THC) oraz hemocytów poszczególnych typów po immunizacji gąsienic <i>G. mellonella</i> α -1,3-glukanem <i>A. niger</i> (a) oraz DMSO (b).....	136
Tab. 5. Zmiany całkowitej liczby hemocytów (THC) oraz hemocytów poszczególnych typów po immunizacji gąsienic <i>G. mellonella</i> zarodnikami <i>A. niger</i> (a) i wodą dejonizowaną (b).....	137
Tab. 6. Białka hemolimfy <i>G. mellonella</i> wiążące się do α -1,3-glukanu <i>A. niger</i>	145