



UNIWERSYTET MARII CURIE–SKŁODOWSKIEJ  
W LUBLINIE  
Instytut Nauk Biologicznych

Jakub Kordaczuk

**Interakcja *Galleria mellonella* z bakterią  
entomopatogenną *Pseudomonas entomophila*. Związki  
bioaktywne w hemolimfie zakażonych owadów**

**Interaction of *Galleria mellonella* with the entomopathogenic  
bacteria *Pseudomonas entomophila*. Bioactive compounds in  
the hemolymph of infected insects**

*Rozprawa doktorska*

Promotor: dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS

Lublin, 2023

Badania eksperymentalne wchodzące w skład niniejszej pracy finansowane były ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektu badawczego:



„Związki bioaktywne w reakcji odpornościowej *Galleria mellonella* zakażonej bakterią entomopatogenną *Pseudomonas entomophila*. Modulacja reakcji odpornościowej w piętnowaniu immunologicznym” (nr 2020/37/B/NZ6/00167, konkurs OPUS, kierownik projektu dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS)

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie finansowana była ze środków Instytutu Nauk Biologicznych UMCS, w ramach projektu badawczego :



„Analiza ekspresji genów kodujących nowoodkryte polipeptydy larw barciaka większego *Galleria mellonella* w przebiegu infekcji bakteriami *Pseudomonas entomophila*” (konkurs na projekty badawcze dla młodych naukowców Instytutu Nauk Biologicznych UMCS- edycja 2020, kierownik projektu mgr Jakub Kordaczuk)

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie opublikowano w artykule:

Kordaczuk J., Sułek M., Mak P., Zdybicka–Barabas A., Śmiałek J., Wojda I., 2022. Cationic protein 8 plays multiple roles in *Galleria mellonella* immunity, *Scientific Reports* 12(1), e11737

*Pseudomonas entomophila* otrzymano dzięki uprzejmości dr Frederica Boccarda (Francja), którego zespół wyizolował wspomniany szczep z *Drosophila melanogaster* pochodzącej z Guadelupe.

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	7
Streszczenie w języku polskim .....	11
Streszczenie w języku angielskim .....	14
1. Wstęp .....	17
1.1. Charakterystyka barciaka większego <i>Galleria mellonella</i> .....	17
1.2. Mechanizmy odpornościowe owadów .....	20
1.2.1. Rozpoznanie czynnika obcego i aktywacja szlaków sygnałowych.....	21
1.2.2. Peptydy odpornościowe.....	25
1.2.3. Układ oksydazy fenolowej .....	31
1.2.4. Lizozymy .....	32
1.2.5. Apolipoforyny .....	33
1.2.6. Inhibitory proteaz .....	35
1.2.7. Odpowiedź komórkowa.....	37
1.3. Interakcje gospodarz– patogen .....	42
1.3.1. Środowiskowe modulatory układu odpornościowego owadów .....	45
1.3.1.1. Czynniki biotyczne .....	45
1.3.1.2. Czynniki abiotyczne .....	47
1.3.2. Entomopatogeny .....	48
1.3.3. <i>Pseudomonas entomophila</i> .....	51
1.3.3.1. Ogólna charakterystyka bakterii <i>P. entomophila</i> .....	51
1.3.3.2. Systemy regulatorowe <i>P. entomophila</i> .....	52
1.3.3.3. Czynniki wirulencji <i>P. entomophila</i> .....	53
1.3.3.4. Proces infekcyjny <i>P. entomophila</i> .....	54
1.3.4. Rola entomopatogenów w tworzeniu biologicznych środków ochrony roślin .....	57
2. Cel pracy.....	59

3. Materiały i metody .....	60
3.1. Materiały i odczynniki używane w badaniach .....	60
3.2. Bufory i pożywki.....	61
3.3. Metody badań.....	63
3.3.1. Hodowla barciaka większego .....	63
3.3.2. Hodowla bakterii .....	63
3.3.3. Oznaczanie miana mikroorganizmów w zawiesinie .....	64
3.3.4. Przygotowanie bakterii i zakażanie larw <i>Galleria mellonella</i> .....	65
3.3.5. Wyznaczanie krzywych przeżywalności larw <i>G. mellonella</i> .....	66
3.3.6. Pobieranie hemolimfy larw <i>G. mellonella</i> .....	66
3.3.7. Oznaczanie stężenia białka.....	67
3.3.8. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy .....	67
3.3.9. Otrzymywanie polipeptydów niskocząsteczkowych hemolimfy za pomocą metanolu .....	68
3.3.10. Elektroforeza trycynowa .....	68
3.3.11. Elektroforeza glicynowa (SDS–PAGE) .....	72
3.3.12. Bioautografia .....	73
3.3.13. Zymografia .....	73
3.3.14. Przygotowanie materiału do analiz chromatograficznych. Rozdział RP–HPLC ( <i>reverse phase high–performance liquid chromatography</i> ) białek niskocząsteczkowych i peptydów hemolimfy .....	74
3.3.15. Oczyszczanie białek numer 20, 28, 32, 39, 41 i 48 .....	75
3.3.16. Obrazowanie frakcji białkowych po rozdziale HPLC.....	76
3.3.17. Przygotowanie próbek do sekwencjonowania metodą degradacji Edmana lub spektrometrii mas .....	77
3.3.18. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej oczyszczonych polipeptydów .....	78
3.3.19. Badanie aktywności przeciwgrzybiczej oczyszczonych polipeptydów .....	80
3.3.20. Pobieranie ciała tłuszczowego i jelit larw barciaka większego .....	80

3.3.21. Izolacja RNA z ciała tłuszczowego i jelita.....	81
3.3.22. Odwrotna transkrypcja i reakcja PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (tzw. Real-Time PCR) .....	82
3.3.23. Metoda „ <i>Replica plating</i> ” .....	84
3.3.24. Badanie perforacji błon bakteryjnych .....	84
3.3.25. Mikroskopia sił atomowych (AFM).....	85
3.3.26. Oznaczanie aktywności proteolitycznej w płynie pochodowlanym .....	86
3.3.27. Sporządzanie preparatów histologicznych .....	87
3.3.28. Metody statystyczne .....	87
4. Analiza wyników.....	88
4.1. Interakcja <i>G. mellonella</i> z jej naturalnym patogenem–bakterią <i>P. entomophila</i> .....	88
4.1.1. Przebieg infekcji po zakażeniu larw <i>G. mellonella</i> bakteriami <i>P. entomophila</i> poprzez tzw. infekcję naturalną. Zmiany morfologiczne zakażonych larw .....	88
4.1.2. Aktywność odpornościowa hemolimfy larw <i>G. mellonella</i> po zakażeniu <i>P. entomophila</i> .....	92
4.1.3. Rozdział elektroforetyczny białek hemolimfy zakażonych larw <i>G. mellonella</i> . Badanie aktywności przeciwbakteryjnej polipeptydów po rozdziale elektroforetycznym.....	93
4.1.4. Wpływ zakażenia bakterią <i>P. entomophila</i> na poziom ekspresji wybranych białek i peptydów odpornościowych <i>G. mellonella</i> .....	95
4.2. Analiza profili białkowych hemolimfy larw <i>G. mellonella</i> .....	99
4.3. Charakterystyka białka 20– <i>Galleria mellonella cationic protein 8</i> (GmCP8) .....	110
4.3.1. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego białko <i>Galleria mellonella cationic protein 8</i> (GmCP8) .....	110
4.3.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydu 20 czyli <i>Galleria mellonella cationic protein 8</i> (GmCP8) .....	111

---

4.3.4. Zmiany topografii powierzchni komórek mikroorganizmów po działaniu <i>Galleria mellonella cationic protein 8 (GmCP8)</i> .....	115
4.4. Charakterystyka białka 48– <i>Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform XI (Ebsp3)</i> .....	119
4.4.1. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego <i>Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform XI (Ebsp3)</i> .....	119
4.4.2. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej białka 48– <i>Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform XI (Ebsp3)</i> .....	120
4.4.3. Analiza sposobu działania białka <i>Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform XI (Ebsp3)</i> .....	126
4.5. Charakterystyka białka 41– <i>Odorant binding protein 7 (OBP7)</i> .....	127
4.5.1. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego <i>Odorant binding protein 7 (OBP7)</i> .....	127
4.5.2. Aktywność przeciwbakteryjna białka <i>Odorant binding protein 7 (OBP7)</i> . 128	
5. Dyskusja .....	131
5.1. Wpływ zakażenia bakteriami <i>P. entomophila</i> na organizm <i>G. mellonella</i> ....	132
5.2. Analiza i identyfikacja wybranych związków bioaktywnych w hemolimfie owadów zakażonych entomopatogenem .....	137
6. Wnioski.....	148
7. Literatura .....	152
8. Spis tabel .....	177
9. Spis rycin.....	178

## Wykaz skrótów

AMPs– peptydy odpornościowe (ang. *antimicrobial peptides*)

APS– nadsiarczan amonu (ang. *ammonium persulfate*)

apoLp–III– apolipoporyna III (ang. *apolipophorin III*)

ATP– adenozyno–5’–trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

Cactus– białko inhibitorowe z rodziny IκB

cDNA– produkt odwrotnej transkrypcji powstający na matrycy mRNA (ang. *complementary DNA*)

CFU– jednostki tworzące kolonie (ang. *colony forming units*)

Cry– białka krystaliczne *B. thuringiensis* (ang. *crystal proteins*)

Cyt– białka cytolityczne *B. thuringiensis* (ang. *cytolytic proteins*)

DAG– diacyloglicerol

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

Dif– białko efektorowe szlaku Toll/Dif zaangażowane w regulację ekspresję peptydów odpornościowych;

Dorsal– czynnik transkrypcyjny *D. melanogaster*, homolog NF–κB

Dredd– kaspaza uczestnicząca w aktywacji czynnika transkrypcyjnego Relish w szlaku IMD

DNA– kwasy deoksyrybonukleinowe

dsDNA– dwuniciowy DNA

Ebsp3– przypuszczalne białko wiążące feromony (ang. *Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform X*)

EWL– lizozym białka jaja kurzego (ang. *Egg White Lysozyme*)

FFAs– wolne kwasy tłuszczowe (ang. *free fatty acids*)

GmCP8– białko homologiczne do CP8 opisane u *G. mellonella* (ang. *Galleria mellonella cationic protein 8* )

GNBPs– receptory rozpoznające mikroorganizmy (ang. *Gram-negative binding proteins*)

HDLp– lipoforyna wysokiej gęstości (ang. *high-density lipophorin*)

SDS–PAGE– elektroforeza dwukierunkowa obejmująca z ogniskowaniem izoelektrycznym (IEF, ang. *isoelectric focusing*)

Imd– białko zaangażowane w transdukcję sygnału w szlaku Imd/Relish opisane u *Drosophila melanogaster* (ang. *immuno-deficient*)

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

IκB– inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF-κB (ang. *inhibitor of κB*)

JAK– kinazy tyrozynowe biorące udział w aktywacji białek STAT (ang. *Janus kinases*)

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

LPS– lipopolisacharyd

LTA– kwas lipotejchojowy (ang. *lipoteichoic acid*)

MMP– metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*)

NF-κB– rodzina czynników transkrypcyjnych odgrywających kluczową rolę w reakcjach immunologicznych

OBP- białko wiążące odoranty (ang. *Odorant binding protein 7*)

OBP7– przypuszczalne białko wiążący odoranty 7 (ang. *Odorant binding protein 7*)

OD– gęstość optyczna (ang. *optical density*)

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

PBS– roztwór soli fizjologicznej zbuforowany fosforanami (ang. *phosphate buffered saline*)

PFT– toksyny tworzące pory ( ang. *pore-forming toxins*)

PCR– łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)



PGRPs– receptory rozpoznające peptydoglikan (ang. *peptidoglycan recognition proteins*)

PO– oksydaza fenolowa (ang. *phenoloxidase*)

ProPO– profenolooksydaza (ang. *prophenoloxidase*)

proPO–AS– układ oksydazy fenolowej (ang. *proPO activating system*)

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

PTU– fenyloitiomocznik (ang. *phenylthiourea*)

PVDF– polifluorek winylidenu, materiał budulcowy membran stosowanych m.in. do elektrotransferu

Relish– białko w szlaku Imd/Relish regulujące ekspresję peptydów odpornościowych

Rel–68– forma aktywna białka Relish powstająca poprzez jego cięcie proteolityczne

RNA– kwasy rybonukleinowe

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

S7e– białko rybosomalne *G. mellonella*, którego ekspresja jest stała w badanych warunkach i przyjmowana za referencyjną

SDS– dodecylosiarczan sodu, detergent stosowany w elektroforezie do zniesienia ładunku powierzchniowego białek umożliwiając ich rozdział ze względu na masę cząsteczkową (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

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

SIP– sekrecyjne białko owadobójcze (ang. *secreted insecticidal protein*)

SPE– proteaza serynowa istotna w szlaku Toll/Dif (ang. *Spaetzle processing enzyme*)

Spaetzle– białko aktywowane poprzez proteolityczne cięcie przez SPE, jego wiązanie do receptora Toll powoduje przekazanie sygnału wewnątrz komórkowego

STAT– rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. *signal transducers and activators of transcription*)

TAG– triacyloglycerol

## Wykaz skrótów

---

TCA– kwas trichlorooctowy (ang. *trichloroacetic acid*)

TEMED– N,N,N',N'–tetrametylo–etylenodiamina (ang. *tetramethylethylene–diamine*)

Toll– transmembranowy receptor w szlaku sygnałów Toll/Dif odkryty u *D. melanogaster*

Tris– trihydroksymetyloaminometan (ang. *tris(hydroxymethyl)amino–methane*)

VIP– owadobójcze białko fazy wegetatywnej (ang. *vegetative insecticidal protein*)

## Streszczenie w języku polskim

Znajomość mechanizmów interakcji gospodarz–patogen pozwala na zrozumienie molekularnej roli poszczególnych elementów układu odpornościowego owada i czynników wirulencji patogenu, a także przyczynia się do rozwoju nauk przyrodniczych, medycznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych (Suesdek, 2019; Grether i Okamoto, 2022). Barciak większy *Galleria mellonella* jest modelem doświadczalnym wykorzystywanym w badaniach naukowych z dziedziny immunobiologii, w tym w analizie molekularnych interakcji z patogenami (Cook i McArthur, 2013). Z kolei *Pseudomonas entomophila* to szczep bakteryjny wyizolowany z przewodu pokarmowego muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. Zsekwencjonowanie genomu bakterii ujawniło, że koduje on szereg potencjalnych czynników wirulencji, w tym możliwe związki przeciwowadzie (Vodovar i in., 2006). Do zakażenia bakteriami *P. entomophila* dochodzi drogą pokarmową lub wskutek uszkodzenia kutykuli. Dotychczas przeprowadzone badania skupiały się jedynie na ogólnym poznaniu mechanizmu zakażenia *D. melanogaster* (Dieppois i in., 2015). Nie przeprowadzono badań pozwalających szczegółowo zbadać mechanizmy interakcji nowopoznanej bakterii z owadzim gospodarzem.

Badania podjęte w ramach niniejszej pracy miały na celu prześledzenie interakcji pomiędzy larwami *G. mellonella*, a bakteriami *P. entomophila*. Analizowano przeżywalność larw, oraz zmiany zachodzące w organizmie zakażonych owadów. Obserwowano spadek przeżywalności zwierząt, która zmniejszała się wraz ze wzrostem dawki zakaźnej bakterii. Na podstawie analizy krzywych przeżywalności, wytypowano dwie dawki zakaźne tj.  $10^3$  CFU *P. entomophila* (tzw. niższa dawka bakterii) oraz  $10^5$  CFU *P. entomophila* (tzw. wyższa dawka bakterii), które posłużyły do dalszych badań.

Analiza histologiczna przekrojów poprzecznych jelit larw *G. mellonella* wykazała, że nasilenie infekcji jest skorelowane z dawką bakterii jaką podawano owadom i zwiększa się proporcjonalnie do czasu upływającego od zakażenia. Obserwowano destrukcję jelita w zaawansowanym stadium. Prześledzenie wybranych aspektów humoralnej reakcji odpornościowej wskazało, że aktywność przeciwbakteryjna w pełnej hemolimfie pojawia się jedynie po zakażeniu owadów niższą dawką bakterii, jednak na podstawie rozdziału elektroforetycznego białek niskocząsteczkowych hemolimfy oraz analizy ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazano, że obecne są one w obu

grupach badawczych i posiadają właściwości przeciwbakteryjne. O aktywacji reakcji odpornościowej owadów, po podaniu każdej z dawek bakterii świadczyła indukcja ekspresji analizowanych genów, zarówno na poziomie lokalnym (w jelitach), jak i systemowym (w ciele tłuszczowym). Nie zaobserwowano jednorodnej tendencji ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe w odniesieniu do relacji między dawką a poziomem ekspresji genów.

Przeprowadzono analizę i identyfikację wybranych związków bioaktywnych w hemolimfie owadów zakażonych bakteriami i zbadano właściwości wybranych białek niskocząsteczkowych i peptydów. Wśród nich, zidentyfikowano szereg białek i peptydów, w tym całkowicie nieznaną, lub takie, których rola w reakcji odpornościowej owadów nie była określona. Szczególną uwagę zwrócono na białka i peptydy, których ilość zmniejszała się po zakażeniu wyższą dawką bakterii względem grupy zakażonej niższą dawką, co było zbieżne z obserwacjami dotyczącymi braku aktywności przeciwbakteryjnej w pełnej hemolimfie larw zakażonych wyższą dawką bakterii. Grupa ta stanowiła najliczniejszą spośród wszystkich analizowanych. W hemolimfie zidentyfikowano m.in.: peptyd prolinowy 1, nieznaną białko– produkt genu LOC1135102370 (białko 32), oraz lizozym, które brały udział w reakcji odpornościowej owadów, na co wskazywał wzrost ekspresji genów kodujących badane białka i peptydy. W przypadku białka 32 obserwowano spadek jego ilości po zakażeniu wyższą dawką w porównaniu do pozostałych grup (porównawczej i po niższej dawce), mimo że ekspresja genu wykazywała wyższy poziom po zakażeniu wyższą dawką bakterii. Białko 32 może być więc celem czynników wirulencji *P. entomophila*. Ponadto, wykazano że peptyd prolinowy 1, białko 32 oraz lizozym wykazują aktywność przeciw bakteriom *P. entomophila* w warunkach *in vitro*. Ponadto, w hemolimfie zakażonych owadów wykazano obecność białka *Gm cationic protein 8* (GmCP8), polipeptydu receptorowego owadów, działającego jako opsonina. Poziom ekspresji genu kodującego białko GmCP8 oraz jego ilość była na tym samym poziomie we wszystkich grupach, niezależnie od zakażenia bakteriami. Przeprowadzone badania wykazały, że białko to posiada *in vitro* aktywność przeciwdrobnoustrojową, a także prowadzi do zmian topografii i właściwości nanomechanicznych powierzchni komórek patogenów. Uzyskane wyniki wskazują na rolę białka GmCP8 w reakcjach odpornościowych *G. mellonella*. W analizowanym materiale wykryto także dwa polipeptydy należące do grupy białek wiążących odoranty (ang. *odorant binding protein*), których rola w reakcji odpornościowej *G. mellonella* nie była dotąd poznana. Pierwsze z nich, białko Ebsp3

(*Ejaculatory bulb-specific protein 3-like isoform XI*), posiada zdolność do wiązania feromonów. Obserwowano wzrost ekspresji genu kodującego Ebsp3 jedynie w materiale pobranym od owadów zakażonych niższą dawką *P. entomophila* co odpowiadało analizie ilości białka Ebsp3 w ekstraktach hemolimfy po zakażeniu entomopatogenem. Analiza właściwości przeciwdrobnoustrojowej *in vitro*, wskazała, że posiada ono aktywność przeciw wybranym mikroorganizmom w bardzo niskich stężeniach, a charakter jego działania jest cytostatyczny. Ponadto, wykazano że inkubacja białka Ebsp3 z płynem pochodzonym z *P. entomophila* prowadzi do degradacji polipeptydu, co może świadczyć o jego ważnej roli w odporności *G. mellonella*. Białko to, jest prawdopodobnie „celem” czynników wirulencji *P. entomophila*. W przypadku białka OBP7, drugiego z analizowanych polipeptydów należącego do grupy wiążących odoranty, notowano wzrost ekspresji genu w grupach stymulowanych zakażeniem oraz jego aktywność przeciwdrobnoustrojową *in vitro*. Jednak, w ekstraktach hemolimfy ilość białka OBP7 ulegała obniżeniu wraz ze zwiększeniem dawki zakaźnej *P. entomophila*. Przedstawione wyniki wskazują, że białko OBP7 także może stanowić jeden z potencjalnych celów wirulencji entomopatogenu.

Przeprowadzone badania pozwoliły na prześledzenie mechanizmu zakażenia larw *G. mellonella* przez bakterie *P. entomophila* i potwierdziły entomopatogenne właściwości badanego mikroorganizmu. W toku przeprowadzonych analiz udało się zidentyfikować szereg mało znanych białek i peptydów *G. mellonella*, poznać ich rolę w reakcji odpornościowej i potencjał przeciwdrobnoustrojowy.

**Słowa kluczowe:** *G. mellonella*, *P. entomophila*, entomopatogeny, peptydy odpornościowe

## Streszczenie w języku angielskim

Knowledge of the mechanisms of host-pathogen interactions helps to understand the molecular role of the individual elements of the insect immune system and pathogen virulence factors. It also contributes to the development of natural, medical, pharmaceutical, and veterinary sciences (Suesdek, 2019; Grether and Okamoto, 2022). The greater wax moth *Galleria mellonella* is an experimental model used in immunobiology research, including analyses of molecular interactions with pathogens (Cook and McArthur, 2013). In turn, *Pseudomonas entomophila* is a bacterial strain isolated from the alimentary tract of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The sequenced bacterial genome was shown to encode a number of potential virulence factors, e.g. potential insecticidal compounds (Vodovar et al., 2006). *P. entomophila* infections occur through the alimentary tract or damaged cuticle. The investigations conducted so far have focused only on general analyses of the mechanism of infection in *D. melanogaster* (Dieppois et al., 2015). No studies have been conducted to date to fully elucidate the mechanisms of interactions of the newly identified bacterium with the insect host.

The research undertaken as part of the dissertation was aimed at investigating the interactions between *G. mellonella* larvae and *P. entomophila* bacteria. Larval survival and changes in the organism of infected insects were analyzed. A decrease in animal survival was observed with the increase of the infectious dose of the bacteria. Based on the analysis of survival curves, two infectious doses were selected, i.e.  $10^3$  CFU *P. entomophila* (so-called lower dose of the bacteria) and  $10^5$  CFU *P. entomophila* (so-called higher dose of the bacteria), and used in further studies. The histological analysis of cross-sections of *G. mellonella* larval intestines revealed that the severity of infection was correlated with the dose of bacteria administered to the insects and increased proportionally to the infection time. Intestinal destruction in the advanced infection stage was observed. The monitoring of selected aspects of humoral immune response showed that antibacterial activity in whole hemolymph appeared after infection of the insects with the lower dose of the bacteria. However, the electrophoretic separation of low-molecular proteins of hemolymph and the analysis of their antimicrobial activity demonstrated that they were present in both research groups and exhibited antibacterial properties. The activation of insect immune response after each dose of the bacteria was

confirmed by the induction of the expression of analyzed genes both at the local (guts) and systemic (fat body) levels. There was no uniform trend in the expression of genes encoding immune peptides with regard to the relationship between the dose of the bacteria and the level of gene expression.

Selected bioactive compounds present in the hemolymph of insects infected with bacteria were analyzed and identified, and the properties of selected low-molecular proteins and peptides were investigated. Among them, a number of proteins and peptides were identified, including completely unknown ones or factors whose role in the immune response of insects has not yet been determined. Particular attention was paid to proteins and peptides whose amount declined after the infection with the higher dose of the bacteria, compared with the group infected with the lower dose. This was consistent with the observations of the absence of antibacterial activity in whole hemolymph of larvae infected with the higher dose of the bacteria. This was the most numerous group of all the analyzed groups. Proline peptide 1, an unknown protein– a product of the LOC1135102370 gene (protein 32), and lysozyme were identified in the hemolymph. They were involved in the immune response of the insects, as indicated by the increase in the expression of genes encoding the analyzed proteins and peptides. In the case of protein 32, a decrease in its amount was observed after infection with the higher dose, compared with the other groups (control and administered the lower dose), although the gene expression exhibited a higher level after the infection with the higher dose of the bacteria. Protein 32 may therefore be targeted by *P. entomophila* virulence factors. Moreover, proline peptide 1, protein 32, and lysozyme were shown to be active against *P. entomophila* in *in vitro* conditions. The hemolymph of the infected insects also contained *Gm cationic protein 8* (GmCP8), i.e. an insect receptor polypeptide acting as an opsonin. The level of expression of the gene encoding the GmCP8 protein and its amount was the same in all groups, regardless of the bacterial infection. The investigations showed that this protein had antimicrobial activity *in vitro* and induced changes in the topography and nanomechanical properties of pathogen cell surfaces. These results indicate the role of the GmCP8 protein in the immune response of *G. mellonella*. The analyzed material was also found to contain two polypeptides representing the group of odorant binding proteins whose role in the immune *G. mellonella* response has not been fully elucidated so far. One of them, i.e. the Ebsp3 protein (*Ejaculatory bulb-specific protein 3-like isoform X1*) has the ability to bind

pheromones. The expression of the gene encoding Ebsp3 increased only in the material collected from insects infected with the lower *P. entomophila* dose, which corresponded to the analysis of the Ebsp3 protein amount in hemolymph extracts obtained after the infection with this entomopathogen. The analysis of the *in vitro* antimicrobial properties of the protein revealed its activity against selected microorganisms at very low concentrations and its cytostatic action. Moreover, it was shown that incubation of the Ebsp3 protein with *P. entomophila* post-culture fluid resulted in degradation of the polypeptide, which may suggest its important role in *G. mellonella* immunity. This protein is probably a “target” of *P. entomophila* virulence factors. In the case of the OBP7 protein, i.e. the other analyzed polypeptide from the group of odorant binding proteins, enhanced gene expression was noted in the infected groups as well as its antimicrobial activity *in vitro*. However, the amount of the OBP7 protein in the hemolymph extracts decreased with the increasing *P. entomophila* infectious dose. These results indicate that the OBP7 protein may also be one of the potential targets of entomopathogen virulence.

The research allowed tracing the *P. entomophila* infection mechanism in *G. mellonella* larvae and confirmed the entomopathogenic properties of the analyzed microorganism. The study facilitated identification of a number of poorly known *G. mellonella* proteins and peptides and elucidation of their role in the immune response and antimicrobial potential.

**Keywords:** *G. mellonella*, *P. entomophila*, entomopathogens, immune peptides



## 1. Wstęp

### 1.1. Charakterystyka barciaka większego *Galleria mellonella*

Barciak większy *Galleria mellonella* to gatunek kosmopolityczny rozprzestrzeniony na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy. Systematykę owada przedstawia tabela 1. Z uwagi na pasożytnicze właściwości względem pszczoły miodnej *Apis mellifera* oraz pszczoły wschodniej *Apis cerana* gatunek ten nazywany jest także molem woskowym. Owad wyrządza duże szkody w pszczelarstwie, odpowiadając za zjawisko nazywane galleriozą, czyli utratą rodzin pszczelich, co jest przyczyną dużych strat ekonomicznych w sektorze pszczelarskim. Ponadto, *G. mellonella* jest wektorem przenoszącym choroby i wpływającym na populacje dzikich pszczół (Kwadha i in., 2017). W warunkach naturalnych larwy *G. mellonella* żywią się głównie miodem, woskiem pszczelim, pyłkiem i zrzuconym oskórkiem poczwarek pszczół. Larwy mogą rozwijać się również na sztucznej diecie, składającej się z produktów zbożowych, mleka w proszku, drożdży, miodu i glicerolu (Desai i in., 2019). Istotną rolę w diecie barciaka większego odgrywa białko, którego niedobór powoduje zaprzestanie wytwarzania oprzędu i spowalnia proces rozwojowy owada. *G. mellonella* jest typowym owadem holometabolicznym, ponieważ przechodzi cztery stadia rozwojowe w cyklu życiowym – jajo, larwa, poczwarka i *imago* (Kwadha i in., 2017).

**Tabela 1.** Systematyka *G. mellonella* (cyt za. Wojda i in., 2020b).

Królestwo	Animalia (Zwierzęta)
Typ	Arthropoda (Stawonogi)
Podtyp	Hexapoda (sześćcionogi)
Gromada	Insecta (owady)
Podgromada	Pterygota (uskrzydłone)
Nadrząd	Holometabola (skrytoskrzydłe)
Rząd	Lepidoptera (łuskoskrzydłe)
Nadrodzina	Pyraloidea
Rodzina	Pyralidae (omacniowate)
Podrodzina	Galleriinae (barciakowate)
Plemię	Galleriini
Rodzaj	<i>Galleria</i>
Gatunek	<i>Galleria mellonella</i>

Samce wabią samice za pomocą dwuskładnikowego feromonu (n–nonanal + n–undekanal) i emitują przy tym krótkie impulsy dźwiękowe o częstotliwości 75 kHz (Spangler, 1985; 1986). Samice mogą składać 50–150 jaj bezpośrednio do szczelin plastrów lub na ich powierzchni, co zabezpiecza je przed usunięciem przez pszczoły. Jeśli samica nie ma dostępu do wnętrza ula, składa jaja w zagłębieniach na jego powierzchni. Jaja mają kształt sferoidalny, szorstką powierzchnię i długość około 0,5 mm, a ich barwa może być biała, cielisto lub różowa. Czas trwania stadium jaja jest odwrotnie proporcjonalny do temperatury otoczenia. W optymalnej temperaturze, tj. około 28°C trwa przeciętnie 5 dni, natomiast w temperaturze 18°C może wydłużyć się do 30 dni. Z jaj wylęgają się kremowe larwy, których długość nie przekracza zwykle 3mm. Larwy kierują się w stronę plastrów woszczyny, na których żerują. W przypadku braku pożywienia może dochodzić między nimi do kanibalizmu. Istnieje 7 stadiów wylinkowych larw, przy czym średni czas trwania wszystkich stadiów larwalnych wynosi około 45 dni. Najintensywniejsze procesy rozwojowe przypadają na dwa ostatnie stadia larwalne (Ellis i in., 2013; Hosamani i in., 2017; Rahman i in., 2017; Desai i in., 2019).

Pod koniec ostatniego stadium larwa przestaje się odżywiać i przemieszcza się do miejsca, gdzie będzie budować kokon– jest to tzw. larwa wędrująca. Okres, w którym larwa barciaka większego buduje kokon jest nazywany okresem przygotowawczym (Desai i in., 2019). Larwa otoczona kokonem przestaje się poruszać i odżywiać, a czas potrzebny do jej przeobrażenia w poczwarkę to około 5 dni. Długość trwania stadium poczwarki u *G. mellonella* mieści się w zakresie od 5 do 50 dni i uzależniona jest od warunków środowiska takich jak wilgotność, temperatura oraz pora roku. Po uwolnieniu się z kokonów dorosłe osobniki pozostają nieaktywne, dopóki ich skrzydła w pełni się nie wykształcą. Kolor ómy na początku jest jasny, a z biegiem czasu ciemnieje, przyjmując ostatecznie szarą barwę. Długość samic waha się w zakresie 15–20 mm. Samce są zwykle mniejsze i jaśniejsze (Hosamani i in., 2017). Dorosłe osobniki nie są w stanie spożywać pokarmu, ponieważ ich aparaty gębowe są zdegenerowane. Długość życia dorosłej ómy mieści się w zakresie 7–30 dni i zależy od warunków środowiska (Opoosun i Odebiyi, 2009; Hosamani i in., 2017).

Szkody powodowane przez *G. mellonella* w pszczelarstwie oraz szereg cech biologicznych, które wykazuje ten organizm wzbudziły zainteresowanie naukowców, którzy uznali, że może on być dobrym modelem doświadczalnym w badaniach naukowych z dziedziny immunobiologii bezkręgowców i analizie interakcji w układzie gospodarz–patogen (Cook i McArthur, 2013; Champion i in., 2016). Głównymi zaletami

omawianego gatunku jako modelu badawczego jest jego kosmopolityzm, krótki cykl życiowy, łatwość hodowli i jej niski koszt, a także możliwość uzyskania dużej liczby osobników w stosunkowo krótkim czasie (Cotter i in., 2000). Szczególną uwagę należy zwrócić na obecny stan wiedzy dotyczący odpowiedzi immunologicznej owadów, która wykazuje wiele cech wspólnych z wrodzoną odpornością ssaków. W kontekście tych ostatnich istotnym jest, że larwy *G. mellonella* mogą być przetrzymywane w temperaturze 37°C, co odróżnia je od pozostałych bezkręgowych organizmów modelowych takich jak *Caenorhabditis elegans* czy *Drosophila melanogaster* i pozwala na badanie mechanizmów zakażenia patogenów ludzkich (Jander i in., 2000; Salzet, 2001; Brennan i in., 2002; Desalermos i in., 2012). Stosunkowo duży rozmiar larw ułatwia immunizację czynnikiem zakaźnym i pozwala na pobieranie tkanek owada do dalszych analiz (Andrejko, 2016). Na tle stale toczącej się dyskusji związanej z aspektami etycznymi wykorzystania kręgowców w badaniach naukowych, bezkręgowce – w tym owady stanowią dobrą alternatywę pozwalającą skutecznie ominąć trudności logistyczne i formalne, związane z wykorzystaniem zwierząt w badaniach naukowych. Ważnym osiągnięciem w kontekście badań z wykorzystaniem omawianego owada jest fakt uzyskania kompletnej sekwencji genomu *G. mellonella* (Lange i in., 2018).

Owad *G. mellonella* posiada niespotykaną zdolność trawienia polietylenu – jednego z najbardziej uciążliwych dla środowiska polimerów, który nie ulega biodegradacji. Nie ustalono jednak czy wspomniana właściwość larw jest jej naturalną cechą, czy też wynika z właściwości enzymatycznych mikroflory jelitowej owada (Bombelli i in., 2017). Ostatnio przeprowadzone badania wskazują, że polietylen może być degradowany przez *Enterobacter spp.* wyizolowany z jelita *G. mellonella* (Ren i in., 2019; Pivato i in., 2022).

Duże możliwości zastosowania wymuszają stałe zgłębianie i poszerzanie wiedzy na temat układu odpornościowego owadów, na który składają się mechanizmy humoralne – skupiające się m.in. na syntezie peptydów i białek odpornościowych oraz mechanizmy komórkowe – w których główną rolę pełnią hemocyty odpowiedzialne za procesy fagocytozy, nodulacji i inkapsulacji (Kavanagh i Reeves, 2004). Owady posiadają także bariery anatomiczno-fizjologiczne, zapewniające integralność organizmu i stanowiące pierwszą linię obrony owada.

## 1.2. Mechanizmy odpornościowe owadów

Mimo, że w toku ewolucji owady zachowały znaczne podobieństwo reakcji odpornościowych do wrodzonych mechanizmów obronnych ssaków, to w odróżnieniu od kręgowców nie wykształciły mechanizmów odporności nabytej (Vilmos i Kurucz, 1998). W toku badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat zwrócono uwagę na duże zdolności adaptacyjne układu odpornościowego owadów, a także plastyczność reakcji obronnej w odpowiedzi na zakażenie (Chambers i Schneider, 2012). Odporność owadów może być modulowana przez czynniki biotyczne (np. wcześniejszy kontakt z patogenem, obecność symbiontów) oraz abiotyczne (m.in. temperatura, wilgotność, nasłonecznienie) (Sinclair i in., 2013).

Kluczowym elementem odporności wrodzonej, zabezpieczającym organizm owada przed urazami mechanicznymi i wnikaniem mikroorganizmów jest integument – okrywa ciała, która spełnia jednocześnie rolę szkieletu zewnętrznego. Tworzą ją jednowarstwowy nabłonek pochodzenia ektodermalnego, a tuż nad nim kutykula, na którą składają się woski, kwasy tłuszczowe, sterole i która jest wysycona chityną. Białka kutykuli mogą ulegać procesom melanizacji, mineralizacji i sklerotyzacji – tworzeniu wiązań kowalencyjnych między ich grupami funkcyjnymi. Poza występowaniem w kutykuli, chityna wyściela tchawki, a także przednią i tylną część jelita, co stanowi barierę przed wniknięciem mikroorganizmów (Klowden, 2013; Moussian, 2010). W jelicie środkowym występuje błona perytroficzna, która izoluje ścianę jelita od treści pokarmowej. Ponadto ochronę tego odcinka jelita zapewniają obecne w nim enzymy proteolityczne oraz wysokie pH (Hegedus i in., 2009). Przerwanie integralności barier ochronnych prowadzi do zaburzenia homeostazy organizmu owada, a po rozpoznaniu czynnika zakaźnego, do uruchomienia reakcji odpornościowej, w którą zaangażowane są mechanizmy odpowiedzi humoralnej i komórkowej.

### 1.2.1. Rozpoznanie czynnika obcego i aktywacja szlaków sygnałowych

Wzorce molekularne związane z patogenami PAMPs (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) to struktury charakterystyczne dla mikroorganizmów, ale niewystępujące fizjologicznie w strukturach ciała żywiciela. Należą do nich przede wszystkim lipopolisacharyd, kwasy lipotejchojowe, zymosan,  $\beta$ -1,3-glukan, flagellina i peptydoglikan (Hultmark, 2003; Steiner, 2004; Gliński i in., 2011; Kurata i in., 2004). Struktury te są rozpoznawane przez receptory rozpoznające zwane PRR (ang. *pattern recognition receptors*), odpowiedzialne za wykrycie infekcji i aktywację kolejnych elementów układu odpornościowego, prowadząc w konsekwencji do wywołania odpowiedzi immunologicznej (Kurata i in., 2010; Gliński i in., 2011; Neyen i in., 2016). Do receptorów PRR zalicza się receptory rozpoznające peptydoglikan PGRP (ang. *peptidoglycan recognition proteins*). Głównymi miejscami indukcji i ekspresji genów kodujących PGRP są komórki tkanek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną owadów (El Chamy i in., 2008). Ze względu na rozmiar transkryptów wśród PGRP wyróżniono 2 klasy:

–S–PGRP (S od ang. *short*; krótkie PGRP), mające charakter receptorów zewnątrzkomórkowych. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do wiązania peptydoglikanu typu lizynowego, charakterystycznego dla większości bakterii Gram– dodatnich.

–L– PGRP (L od ang. *long*; długie PGRP), do których należą transbłonowe PGRP. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do wiązania peptydoglikanu typu diaminopimelinowego charakterystycznego dla większości bakterii Gram– ujemnych.

Tabela 2 prezentuje PGRP zidentyfikowane w organizmach owadów:

**Tabela 2.** Owadzie PGRP. Na podstawie Kordaczuk i in., 2020.

Podział PGRP ze względu na długość transkryptu	Wyróżniane podgrupy PGRP	Sposób uwalniania	Typ ekspresji	Miejsce ekspresji	Główna funkcja
PGRP–L	PGRP– LAc PGRP– LB PGRP– LE	transmembranowy	konstytutywna	hemocyty (PGRP–LAc) jelito (PGRP– LB) jelito/ hemolimfa (PGRP– LE)	Składnik szlaku IMD (PGRP– LAc) Funkcja amidazy (PGRP– LB), autofagia, aktywacja fenylooksydazy (PGRP–LE)

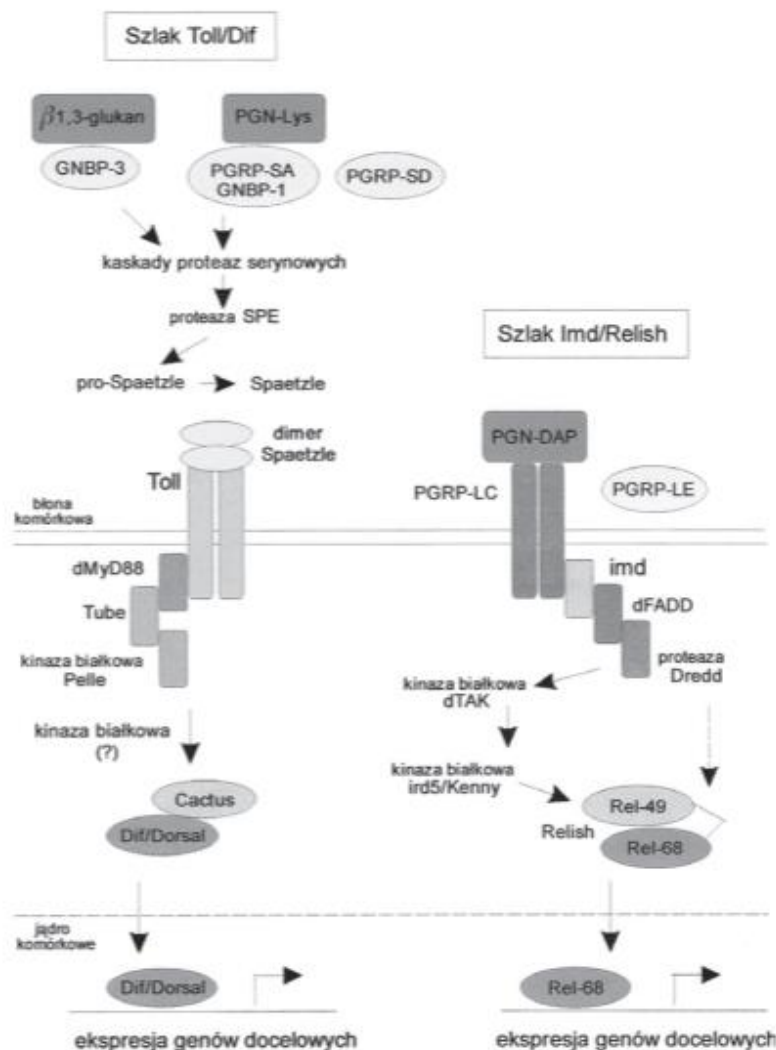
## Wstęp

	PGRP– LAa, PGRP– LAb, PGRP– LC, PGRP– LD, PGRP– LF	sekrecyjny	konstytutywna	hemocyty	Aktywator szlaku IMD (PGRP– LAa; PGRP– LAb) Szlak IMD, fagocytoza (PGRP– LC) Funkcja amidazy (PGRP– LD) Szlak IMD– negatywna regulacja (PGRP– LF)
PGRP– S	PGRP– SA, PGRP– SB1 PGRP– SB2	sekrecyjny	indukowana	ciało tłuszczowe	Składnik szlaku Toll (PGRP– SA; PGRP– SD) Funkcja amidazy (PGRP– SB1; PGRP– SB2 ; PGRP– SC1B; PGRP– SC2) Funkcja amidazy, fagocytoza (PGRP– SC1A)
	PGRP– SC1A PGRP– SC1B PGRP– SC2 PGRP– SD		konstytutywna		

Ponadto wyróżnia się grupę receptorów GGBP (ang. *Gram–negative binding protein*), do której należy GGBP–1 uczestniczący w rozpoznawaniu bakterii Gram–dodatnich oraz GGBP–3 odpowiedzialny za wiązanie  $\beta$ –1,3–glukanu charakterystycznego dla ściany komórkowej grzybów (Kim i in., 2000).

Szlaki przekazywania sygnałów regulujące ekspresję genów kodujących peptydy odpornościowe zostały najdokładniej opisane u *D. melanogaster*. Rozpoznanie przez określone typy receptorów PRR wzorców molekularnych patogenów bakterii Gram–dodatnich lub grzybów prowadzi do aktywacji szeregu proteaz serynowych obecnych w hemolimfie owadów, odpowiedzialnych za uruchomienie szlaku Toll/Dif. Schemat szlaku przedstawia rycina 1. Kaskadowa aktywacja proteaz serynowych prowadzi do aktywacji proteolitycznego enzymu SPE (ang. *Spaetzle processing enzyme*), którego funkcją jest proteolityczne przecięcie nieaktywnej formy cytokiny pro–Spaetzle, i powstanie formy aktywnej– Spaetzle. Cytokina ta zdolna jest do oddziaływania z transbłonowym receptorem Toll, występującym na powierzchni hemocytów i komórek ciała tłuszczowego. Opisana interakcja prowadzi do dimeryzacji receptora Toll i uruchomienia kaskady sygnałowej wewnątrz komórek, w skład której wchodzi Tube, MyD88 oraz kinaza Pelle. Powstanie kompleksu tych białek (tzw. kompleks adaptorowy) prowadzi do uwolnienia od inhibitora Cactus czynników transkrypcyjnych należących do rodziny *NF– $\kappa$ B*– Dif i Dorsal. Białko Dif bierze udział w odpowiedzi immunologicznej owadów natomiast białko Dorsal jest zaangażowane w rozwój embrionalny. W trakcie odpowiedzi immunologicznej w cytoplazmie dochodzi do fosforylacji inhibitora Cactus i uwolnienia białka Dif, a następnie jego translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywuje on ekspresję genów kodujących peptydy odpornościowe (Imler i Hoffmann, 2001; Khush i in., 2003).

W przypadku interakcji PGRP ze wzorcami molekularnymi (PAMPs) bakterii Gram-ujemnych, dochodzi do aktywacji drugiego szlaku sygnałowego– Imd/Relish przedstawionego na rycinie 1. Interakcja transbłonowych receptorów PGRP z białkiem Imd prowadzi do aktywacji kinazy dFADD (ang. *FAS-associated death domain*), proteazy Dredd (ang. *Death-related ced-3/Nedd2-like protein*) i kinazy białkowej dTAK1 (ang. *Drosophila homologue of transforming growth factor activated kinase 1*). Kinaza dTAK1 rekrutuje kinazę IKK, następnie ma miejsce fosforylacja białka Relish. Aktywne dFADD, Dredd i dTAK1 tworzą wspólnie kompleks czynników tnących ufosforylowane białko Relish co prowadzi do jego rozdzielenia na dwie podjednostki: Rel-68, należącej do rodziny NF- $\kappa$ B, która ulega translokacji do jądra komórkowego i reguluje ekspresję genów kodujących peptydy odpornościowe, oraz pozostającą w cytoplazmie Rel-49 o aktywności inhibitorowej I $\kappa$ B (Ferrandon i in., 2008; Charroux i Royet, 2010).



**Ryc. 1.** Szlaki przekazywania sygnałów u *D. melanogaster* (Cytryńska, 2009). Objasnienia w tekście.

*D. melanogaster* dysponuje także szlakiem sygnałowym JAK/STAT, którego aktywacja następuje w przypadku zakażenia bakteriami lub wirusami, generalnie warunkach stresu. Do aktywacji szlaku dochodzi w wyniku interakcji cytokiny z rodziny UDP (ang. *unpaired*) z receptorem Domeless, w wyniku czego aktywowana jest kinaza JAK (ang. *janus kinase*) odpowiedzialna za aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*). Rolą czynnika STAT jest aktywacja ekspresji genów kodujących cytokiny, białka stresu, a także polipeptydy biorące udział w regulacji powstawania hemocytów (Bier i Guichard, 2012; Myllymäki i Rämetsä, 2014).



Należy zaznaczyć, że ogólna zasada działania i szereg elementów biorących udział w opisanych powyżej szlakach sygnałowych odpowiedzialnych za ekspresję genów kodujących peptydy odpornościowe *D. melanogaster* jest podobna u innych owadów, w tym *G. mellonella*. Barciak większy dysponuje receptorami PGRP–A oraz PGRP–B, które są zdolne do rozpoznawania peptydoglikanu bakteryjnego, a także receptorem  $\beta$ –GRPs (ang.  *$\beta$ –1,3–glucan recognition proteins*) odpowiedzialnym za rozpoznawanie determinant molekularnych grzybów. U *G. mellonella* zidentyfikowano także receptory Toll oraz oddziaływujące z nim białko Spaetzle (Vogel i in., 2011). W procesie rozpoznawania zakażenia poza wspomnianymi receptorami PGRP, biorą udział także peptydy i białka odpornościowe– w tym hemolina i apolipoforyna III oraz białko GmCP8 (Pratt i Weers, 2004; Weers i Ryan, 2006; Kim i in., 2010).

Opisane wyżej szlaki przekazywania sygnałów komórkowych regulują ekspresję głównych efektorów odpowiedzi humoralnej tj. peptydów odpornościowych.

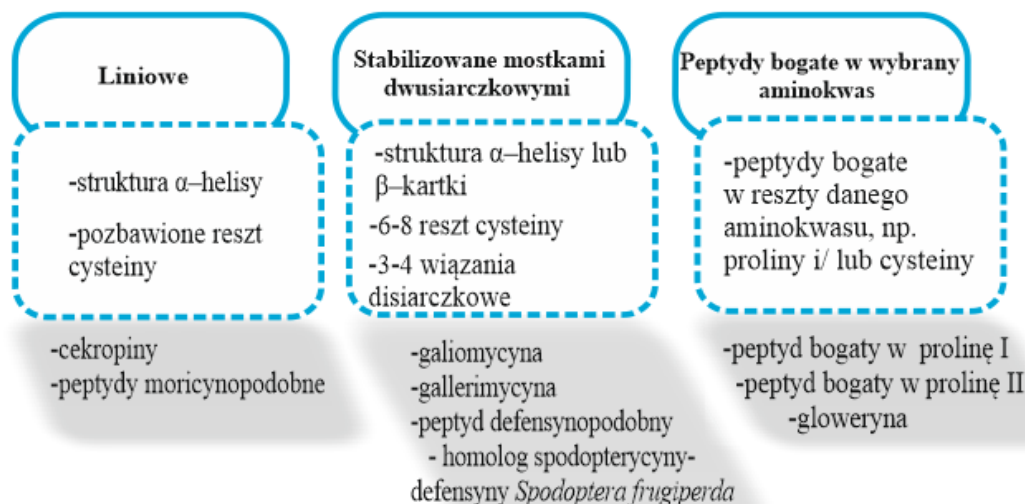
### 1.2.2. Peptydy odpornościowe

Synteza peptydów odpornościowych może zachodzić w różnych tkankach, ale głównym miejscem ich powstawania w odpowiedzi systemowej jest ciało tłuszczowe, z którego są wydzielane do hemolimfy (Wojda, 2017). Część z nich jest syntetyzowana konstytutywnie, jednak większość jest syntetyzowana w odpowiedzi na zakażenie. Na poziom syntezy danego peptydu może wpływać rodzaj patogenu i jego dawka, a także stężenie innych białek i peptydów przeciwdrobnoustrojowych w organizmie owada (Bolouri Moghaddam i in., 2016). Wykazano, że niektóre z peptydów przeciwdrobnoustrojowych mogą działać synergistycznie ze sobą. Dzięki temu, owad zużywa mniej energii potrzebnej do wytworzenia większej ilości cząsteczek efektorowych, osiągając bardzo dobry efekt obronny (Le i in., 2017).

Peptydy odpornościowe są cząsteczkami zbudowanymi najczęściej z 8–100 aminokwasów, a w ich budowie wyróżnia się regiony hydrofobowe i hydrofilowe, co nadaje im charakter amfipatyczny. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe wyróżnia szerokie spektrum działania i szybkość. Ponadto charakteryzuje je selektywność działania dzięki czemu nie uszkadzają komórek gospodarza. W przeciwieństwie do antybiotyków nie powodują oporności. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą być naładowane ujemnie

lub dodatkowo, bądź mieć charakter obojętny, jednak większość z nich posiada ładunek dodatni (Wojda i in., 2020a). Ze względu na rodzaj zakażającego patogenu lub komórek, na który działać mogą peptydy odpornościowe wyróżnia się cząsteczki o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciw pasożytniczych, przeciwnowotworowych, a także przeciwwirusowych. Ze względu na różnice w budowie peptydów o charakterze kationowym występujących w organizmie *G. mellonella*

### Peptydy odpornościowe *Galleria mellonella*

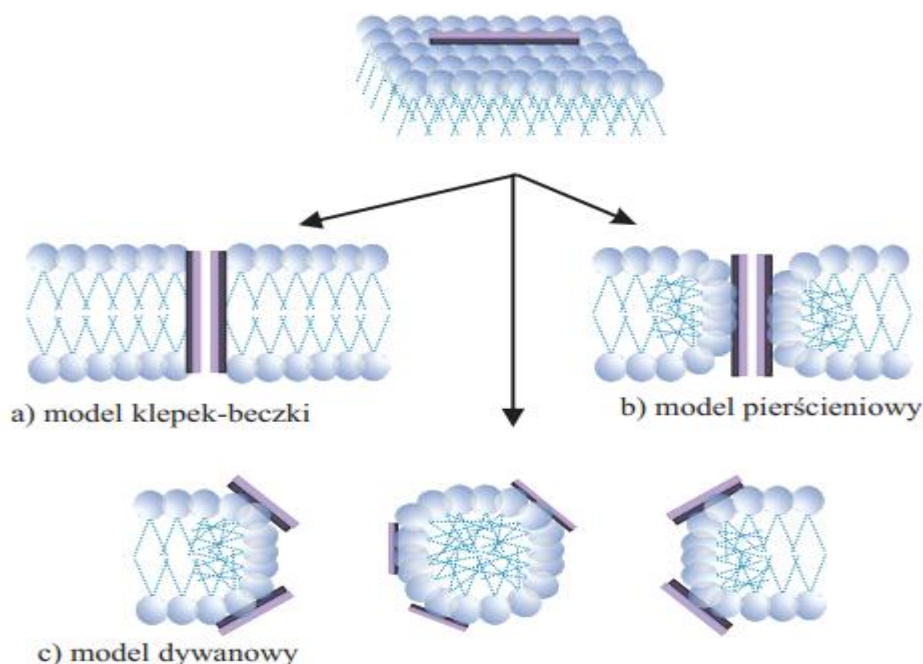


podzielono jej na trzy podgrupy przedstawione na rycinie 2.

**Ryc. 2.** Podział peptydów odpornościowych *G. mellonella* w zależności od budowy. Na podstawie Wojda i in., 2020a.

Ze względu na właściwości amfipatyczne peptydów przeciwdrobnoustrojowych, a także kationowy charakter przeważającej liczby tych cząsteczek, mogą one oddziaływać z ujemnie naładowanymi grupami LPS bakterii Gram-ujemnych lub anionowymi grupami LTA bakterii Gram-dodatnich, tworzących dwuwarstwę fosfolipidową błony komórkowej patogenów. Peptydy wypierają jony wapnia, odpowiadające za stabilizację błony komórkowej (Cruz i in., 2014). Dochodzi do wytworzenia agregatów i zaburzenia ciągłości błony komórkowej, prowadząc w konsekwencji do zwiększenia jej przepuszczalności i zakłócenia procesów metabolicznych komórki patogenu (Wiesner i Vilcinskas, 2010; Silva i in., 2014). Aby działanie peptydów było skuteczne muszą one osiągnąć stężenie progowe. Istnieje kilka różnych modeli obrazujących mechanizm działania owadzych peptydów odpornościowych z błoną komórkową bakterii, które nie wykluczają się wzajemnie.

Poglądowy schemat obrazujący mechanizmy zaburzenia integralności błon komórkowych przedstawiono na rycinie 3 (Wojda i in., 2020a). Model klepek–beczki (ryc. 3A) polega na wnikaniu peptydów do błony komórkowej bakterii, ich ścisłe przyleganie i formowanie kanałów (Silva i in., 2014; Wojda i in., 2020a). W modelu pierścieniowym (ryc. 3B) peptyd zmienia położenie fosfolipidów błonowych, które uginają się i zwracają swoją częścią hydrofilową do światła uformowanego kanału, który tworzą wraz z peptydami (Silva i in., 2014). Model dywanowy (ryc. 3C) polega na układaniu się peptydów na powierzchni błony komórkowej bakterii. Po przekroczeniu stężenia progowego peptydów dochodzi do oddziaływań z częścią hydrofilową błony, jej destabilizacji i utworzenia miceli (Wiesner i Vilcinskas, 2010). Wyróżnia się także model formowania agregatów, zgodnie z którym peptydy nieregularnie osadzają się na powierzchni błony pod różnymi kątami, prowadząc w konsekwencji do jej destabilizacji i zaburzenia ciągłości (Cruz i in., 2014; Wojda i in., 2020). Należy zwrócić uwagę na fakt, że poza opisanymi mechanizmami oddziaływania zidentyfikowano peptydy, które mogą wykazywać odmienny sposób działania, przenikając do komórki mikroorganizmu i zakłócając na przykład syntezę kwasów nukleinowych i białek, prowadząc tym samym do zaburzenia podstawowych procesów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu takich jak replikacja materiału genetycznego, jego transkrypcja, translacja lub jego obróbka potranslacyjna (Nguyen i in., 2011).



**Ryc. 3.** Poglądowy model oddziaływań peptydów odpornościowych z błonami komórkowymi bakterii. Objaśnienia w tekście. Ciemnym kolorem fioletowym zaznaczono hydrofilową część peptydu, natomiast jasnym kolorem fioletowym część hydrofobową. Na podstawie Wojda i in., 2020a.

Barciak większy zdolny jest do syntezy wielu peptydów i białek, których rolą jest udział w mechanizmach odpornościowych i czynna obrona przed atakiem patogenów. Poniżej przedstawiono opis głównych grup peptydów odpornościowych, które dotychczas zidentyfikowano w organizmie tego owada.

Cekropiny należą do liniowych i  $\alpha$ -helikalnych peptydów odpornościowych. W wyniku analizy transkryptomu *G. mellonella* zidentyfikowano cztery transkrypty cekropin, spośród których wyróżnić należy trzy cekropiny A oraz cekropinę D (Vogel i in., 2011). Dotychczas przeprowadzone badania nad cekropiną D wykazały, że posiada ona szerokie spektrum aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich a także Gram-ujemnych. Działanie cekropiny D zaobserwowano wobec grzyba nitkowatego *Aspergillus niger* (Cytryńska i in., 2007). Dotychczas z hemolimfy larw *G. mellonella* zakażonych *Escherichia coli* wyizolowano dwie cekropiny. Obie zidentyfikowane cekropiny posiadają masę około 4,3 kDa, przy czym pierwsza z nich wykazuje wysokie podobieństwo do cekropiny *Manduca sexta* (Mak i in., 2010), natomiast druga wykazuje homologię do cekropiny A *Hyalophora cecropia* (Kim i in., 2004). Obie wykryte

cekropiny wykazują szerokie spektrum aktywności wobec bakterii Gram–ujemnych i Gram–dodatnich (Kim i in., 2004; Cytryńska i in., 2007; Bolouri Moghaddam i in., 2016). Do peptydów liniowych zaliczane są także peptydy moricynopodobne. W hemolimfie *G. mellonella* wykryto obecność czterech peptydów należących do tej grupy– A, B, C3 i D. Sekwencjonowanie genomu *G. mellonella* ujawniło, że owad posiada osiem genów kodujących peptydy moricynopodobne– A, B, C1–C5 oraz D. Geny te kodują siedem peptydów ze względu na identyczność transkryptów C4 i C5 (Brown i in., 2008). Inne dane literaturowe uzyskane podczas analizy transkryptomu *G. mellonella* wykazały obecność sześciu transkryptów dla peptydów moricynopodobnych (Vogel i in., 2011). Peptydy moricynopodobne wykazują szerokie spektrum aktywności przeciw bakteriom Gram–dodatnim i Gram–ujemnym. Polipeptydy należące do omawianej grupy charakteryzują się aktywnością wobec wybranych grzybów entomopatogennych– *Metharizium anisopliae* i *Beauveria bassiana*, a w przypadku moricyny A– także wobec *Candida albicans* (Brown i in., 2008).

Defensynopodobne stanowią kolejną grupę peptydów, których geny zidentyfikowano u *G. mellonella*. Cechą charakterystyczną cząsteczek wchodzących w skład tej grupy jest obecność motywów  $\alpha/\beta$  stabilizowanych mostkami dwusiarczkowymi ze względu na bogactwo w cząsteczce reszt cysteiny (Mylonakis i in., 2016; Koehbach, 2017). Wśród peptydów *G. mellonella* należących do defensyn wyróżnić należy gallerimycynę, której masa molekularna to 6,4 kDa (Bolouri Moghaddam i in., 2016). Gallerimycyna wykazuje aktywność przeciwko grzybowi entomopatogennemu *M. anisopliae*. Nie wykazano aktywności wspomnianego peptydu wobec bakterii *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* oraz *E. coli* oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Schuhmann i in., 2003). Analiza ekspresji genu kodującego gallerimycynę wykazała wzrost ilości transkryptów w ciele tłuszczowym pobranym od larw *G. mellonella* uprzednio immunizowanych komórkami *C. albicans* (Bergin i in., 2006), blastosporami *B. bassiana* (Wojda i in., 2009), a także po podaniu lipopolisacharydu (Schuhmann i in., 2003). Kolejnym peptydem zaliczanym do defensyn jest galiomycyna o masie molekularnej 4,7 kDa (Lee i in., 2004). Peptyd ten wykazuje działanie przeciw grzybom nitkowatym i drożdżakom (Lee i in., 2004; Cytryńska i in., 2007). W ciele tłuszczowym larw *G. mellonella* poddanych zakażeniu *E. coli* (Lee i in., 2004), *B. bassiana* (Wojda i in., 2009), a także *C. albicans* (Bergin i in., 2006) wykazano wzrost ekspresji genu kodującego omawiany peptyd. U *G. mellonella* zidentyfikowano także spodopterycynę, należącą do defensyn, wykazującą homologię do spodopterycyny

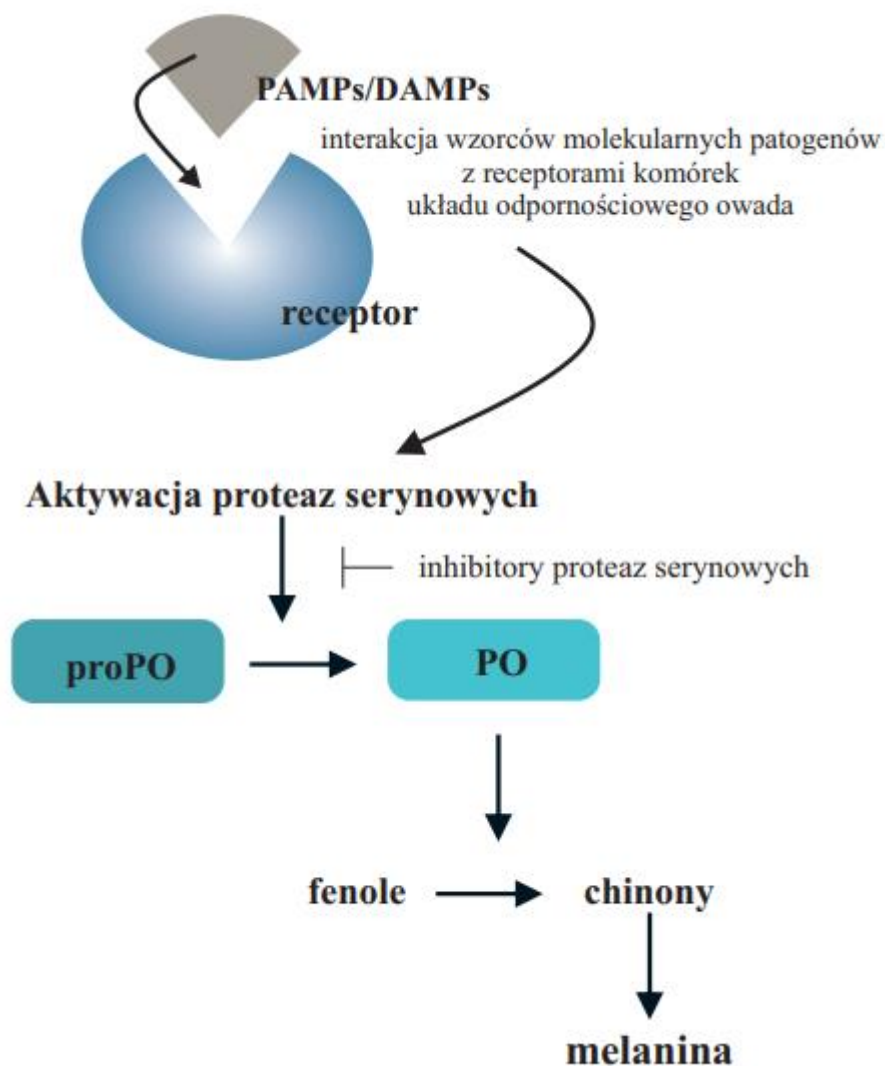
*Spodoptera frugiperda*, której masa molekularna wynosi około 4 kDa (Volkoff i in., 2003; Vogel i in., 2011). Ponadto, w organizmie barciaka większego zidentyfikowano peptyd defensynopodobny o masie molekularnej 4,9 kDa, posiadający aktywność przeciw grzybom, należącym do drożdżaków i grzybom nitkowatym oraz wobec Gram–dodatniej bakterii *Sarcina lutea* (Cytryńska i in., 2007).

W organizmie *G. mellonella* zidentyfikowano dwa peptydy prolinowe– peptyd prolinowy I oraz peptyd prolinowy II, posiadające masę molekularną odpowiednio 4,3 kDa oraz 4,9 kDa. Cechą charakterystyczną tych cząsteczek jest obecność w strukturze pierwszorzędowej licznych reszt proliny. Oba omawiane peptydy prolinowe wykazują aktywność przeciwko wybranym bakteriom Gram– dodatnim. Ponadto peptyd prolinowy I posiada aktywność przeciwko drożdżakom (Mak i in., 2001; Cytryńska i in., 2007). Głoweryny to peptydy odpornościowe, których cechą charakterystyczną jest obecność w strukturze pierwszorzędowej wielu reszt glicyny oraz brak cystein (Seitz i in., 2003). Głoweryny wykazują aktywność przeciw bakteriom Gram–ujemnym oraz wybranym bakteriom Gram–dodatnim, drożdżom, a także wirusom (Yi i in., 2014). Analiza transkryptomu *G. mellonella* wykazała obecność pięciu transkryptów głoweryn (Seitz i in., 2003; Vogel i in., 2011).

Wszystkie opisane powyżej peptydy odpornościowe wykazują charakter kationowy, należy jednak zauważyć, że w organizmie *G. mellonella* zidentyfikowano peptydy o charakterze anionowym ze względu na obecność w ich sekwencji reszt kwasu asparaginowego lub kwasu glutaminowego. Do tej grupy należy peptyd anionowy 1 oraz peptyd anionowy 2 posiadające odpowiednio masy molekularne 4,8 i 6,98 kDa. Cząsteczki te nie wykazują homologii do innych znanych peptydów i białek przeciwdrobnoustrojowych (Cytryńska i in., 2007, Zdybicka–Barabas i in., 2012). Peptyd prolinowy I posiada aktywność przeciwko bakterii Gram–dodatniej *S. lutea*, a także wybranym drożdżakom i grzybom nitkowatym, natomiast peptyd anionowy II wykazuje aktywność wobec wybranych bakterii Gram–dodatnich i grzybów nitkowatych (Cytryńska i in., 2007). Wykazano że peptydy te działają synergistycznie z lizozymem i apolipoforyną III wobec Gram–ujemnych bakterii *E. coli* i drożdżaka *C. albicans* (Zdybicka–Barabas i in., 2012; Sowa–Jasiłek i in., 2014).

### 1.2.3. Układ oksydazy fenolowej

Oksydaza fenolowa PO (ang. *phenoloxidase*) to białko, które w organizmach owadów występuje w formie nieaktywnej, tj. profenoloksydazy proPO (ang. *prophenoloxidase*). U *G. mellonella* miejscem przechowywania proPO są oenocytoidy (Altincicek i in., 2006). Poglądowy schemat mechanizmu regulacji aktywności oksydazy fenolowej został przedstawiony na rycinie 4. Do uruchomienia kaskadowej reakcji aktywacji proteaz serynowych odpowiedzialnych za przekształcenie profenoloksydazy w formę aktywną dochodzi w wyniku wykrycia wzorców molekularnych patogenów w organizmie owada oraz w przypadku zidentyfikowania uszkodzonych fragmentów komórek gospodarza DAMPs (ang. *damage-associated molecular patterns*) (Altincicek i in., 2006; Cerenius i in., 2008). Wszystkie receptory, proteazy i ich inhibitory odpowiedzialne za regulację aktywacji oksydazy fenolowej określa się mianem układu oksydazy fenolowej proPO-AS (ang. *proPO activating system*) (Cerenius i in., 2008). Główną rolą aktywnej oksydazy fenolowej jest kataliza reakcji utleniania fenoli do chinonów, stanowiących substrat w procesie syntezy melaniny. Jak wcześniej wspomniano, mechanizm syntezy melaniny aktywowany jest w odpowiedzi na sygnał pochodzący najprawdopodobniej z miejsca zranienia oskórka lub innej tkanki. Należy jednak zaznaczyć, że melanizacja jest także procesem fizjologicznym, którego celem jest zapewnienie odpowiednio twardego oskórka, stanowiącego barierę dla patogenów ze szczególnym uwzględnieniem grzybów entomopatogennych (Altincicek i in., 2006; Cerenius i in., 2008; Wojda, 2017). Kumulowanie melaniny w miejscu zranienia jest elementem mechanizmu odpowiedzialnego za proces gojenia ran (Iwama i Ashida, 1986; Kay i in., 2019). Melanina może być odkładana na powierzchni patogenu, dzięki czemu zostaje on odseparowany do organizmu owada i pozbawiony dostępu do substancji odżywczych. Z uwagi na fakt, że w procesie powstawania melaniny syntetyzowane są reaktywne formy tlenu toksyczne dla organizmu gospodarza, niezwykle ważną rolę serpin-inhibitorów proteaz serynowych, odpowiedzialnych za regulowanie działania układu oksydazy fenolowej (Krachler i in., 2021). Z drugiej strony reaktywne formy tlenu jak i inne produkty pośrednie wytwarzane w procesie syntezy melaniny są wykorzystywane jako narzędzia do walki z patogenami. Melanizacja może uzupełniać procesy odpowiedzi komórkowej, tj. inkapsulację i nodulację wpływając pozytywnie na ich przebieg (Kay i in., 2019; Trevijano-Contador i Zaragoza, 2018).



**Ryc. 4.** Uproszczony schemat regulacji aktywności układu oksydazy fenolowej (autorstwo własne). Objasnienia w tekście. PAMPs– wzorce molekularne patogenów; DAMPs– wzorce molekularne uszkodzonych komórek; proPO– profenoloksydaza; PO– oksydaza fenolowa

#### 1.2.4. Lizozymy

Lizozymy to grupa białek, które posiadają zdolność do hydrolizy wiązań glikozydowych obecnych między cząsteczką kwasu N-acetylmuraminowego a N-acetyloglukozaminą peptydoglikanu, stanowiącego składnik ściany komórkowej bakterii. Polipeptydy należące do tej grupy zidentyfikowano zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców. Lizozymy owadów są zdolne do rozkładu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W organizmie *G. mellonella* zidentyfikowano



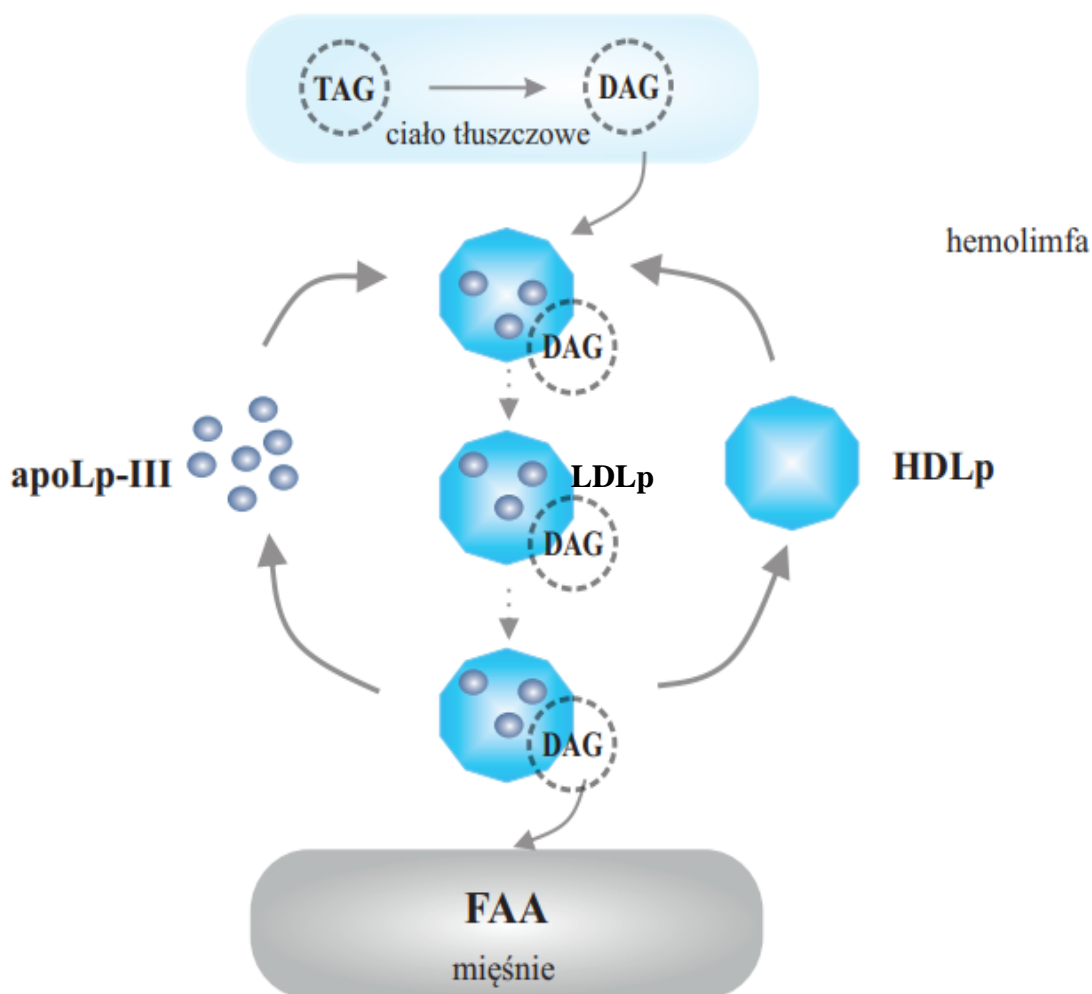
5 lizozymów– cztery typu c (ang. *chicken type lysozyme*) oraz jeden typu i (ang. *invertebrate type lysozyme*) (Jollès i in., 1979; Vogel i in., 2011). Spośród nich do tej pory udało się oczyścić jeden z lizozymów typu c. Polipeptyd ten zbudowany jest ze 121 aminokwasów, a jego masa wynosi 14,027 kDa (Mak i in., 2010). Wykazano, że ten typ lizozymu występuje konstytutywnie w hemolimfie owada, a w przypadku urazu, zakażenia patogenem grzybiczym lub bakteryjnym dochodzi do wzrostu jego stężenia (Sowa–Jasiłek i in., 2014; Mohamed i in., 2016). Lizozym powoduje enzymatyczny rozkład ściany komórkowej bakterii Gram–dodatnich (Sowa–Jasiłek i in., 2016). Lizozym *G. mellonella* wykazuje także niską aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii Gram–ujemnych (Yu i in., 2002). Istnieją doniesienia o nieenzymatycznej aktywności lizozymu wobec grzybów, charakteryzującej się podobnym sposobem działania do kationowych peptydów odpornościowych (Sowa–Jasiłek i in., 2014; 2016). Wykazano, że w organizmie *G. mellonella* lizozym może działać synergistycznie z peptydem anionowym II, a także z cekropiną. Ponadto, lizozym posiada zdolność do hamowania aktywności fenolooksydazy, a w konsekwencji regulacji syntezy melaniny i zapobiegania nadmiernej melanizacji w organizmie owada (Zdybicka– Barabas i in., 2014a; 2014b).

### 1.2.5. Apolipoforyny

Apolipoforyny to kompleksy białkowo–lipidowe krążące w hemolimfie owadów, których podstawową funkcją jest transport lipidów i związanych z nimi cząsteczek z ciała tłuszczowego do mięśni, gdzie lipidy służą jako źródło energii niezbędnej podczas lotu (Ryan i Van der Horst, 2000). U *G. mellonella* wyróżnia się trzy apolipoforyny: apolipoforynę I (apoLp–I), apolipoforynę II (apoLp–II) oraz apolipoforynę III (apoLp– III), których masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio około 250 kDa, 80 kDa i 18 kDa. Apolipoforyny te tworzą wspólnie kompleks owadziej lipoforyny (Weers i Ryan, 2006; Narajanaswami i in., 2010). Kiedy zapotrzebowanie energetyczne owada zwiększa się, dochodzi do regulowanego przez hormony adipokinetyczne przekształcenia triacylogliceroli (TAGs) do diacylogliceroli (DAGs). Jednocześnie do kompleksu składającego się z apoLp–I i apoLp–II– tzw. apolipoforyny wysokiej gęstości HDLp (ang. *high–density lipophorin*), dołączona zostaje apoLp–III, prowadząc do utworzenia kompleksu apolipoforyny niskiej gęstości LDLp (ang. *low–density lipophorin*) (Dettloff

i in., 2001). Dzięki obniżeniu hydrofobowości kompleksu, mogą do niego zostać przyłączone cząsteczki DAG. Cząsteczki LDLp są transportowane do mięśni, gdzie przenoszone przez nie DAGs poddawane są hydrolizie w wyniku czego uwolnione zostają cząsteczki kwasów tłuszczowych FFAs (ang. *free fatty acids*). Uwolnienie przenoszonej cząsteczki prowadzi do rozpadu kompleksu na HDLp i cząsteczkę apoLp-III, które wracają do hemolimfy i zdolne są do włączenia się w kolejny cykl przenoszenia tłuszczu (Niere i in., 2001; Weers i Ryan, 2006). Poszczególne etapy opisanego procesu przedstawiono na rycinie 5.

Apolipoporyna III odgrywa także istotną rolę w procesach odpornościowych owadów. Białko to bierze udział w modulacji aktywności układu fenoloooksydazy i zaangażowane jest proces koagulacji hemolimfy. Uczestniczy w sieciowaniu skrzepu, dzięki czemu możliwe jest zabezpieczenie miejsca zranienia owada i jego izolacja od środowiska zewnętrznego (Contreras i in., 2013; Adamo, 2017). Ponadto, apoLp-III może tworzyć kompleksy z kwasami nukleinowymi mogącymi pełnić rolę wzorców molekularnych uszkodzonych komórek DAMPs, w konsekwencji stymulując procesy krzepnięcia i gojenia ran (Altincicek i in., 2008). Ponadto, apoLp-III może działać jako receptor dla wzorców molekularnych patogenów- tj.: lipopolisacharydu, kwasu lipotejchojowego i  $\beta$ -1,3-glukanu (Wen i in., 2016; Zindel i Kubes, 2020). Wykazano, że apoLp-III zwiększa zdolności adhezyjne hemocytów i zaangażowana jest w regulację procesu inkapsulacji w odpowiedzi na zakażenia grzybicze (Whitten i in., 2004). Ze względu na swoje właściwości opsonizujące apoLp-III zaangażowana jest w procesy fagocytozy i nodulacji (Dunphy i in., 2003). Dowiedziono, że apoLp-III wykazuje właściwości przeciwbakteryjne zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011). Cząsteczki apoLp-III mogą działać synergistycznie z innymi peptydami odpornościowymi, np. cekropiną i lizozymem obecnymi w hemolimfie owada, prowadząc tym samym do skuteczniejszej reakcji odpornościowej gospodarza (Park i in., 2005; Zdybicka-Barabas i in., 2013). Poza tym, apoLp-III może bezpośrednio zabijać bakterie, a wraz z apoLp-I i apoLp-II może neutralizować toksyny bakteryjne (Ma i in., 2006; Zdybicka-Barabas i in., 2013; Kim i Jin, 2015). Ze względu na mnogość procesów w jakie zaangażowane jest apoLp-III jest także nazywana białkiem wielofunkcyjnym (Taszlów i Wojda, 2015).



**Ryc. 5.** Mechanizm transportu lipidów przy udziale owadzych apolipoproteinów. Objasnienia w tekście. Na podstawie Weers i in., 2006. TAG – triacyloglicerol, DAG– diacyloglicerol, HDLp – lipoforyna wysokiej gęstości, LDLp – lipoforyna niskiej gęstości, apoLp– III– apolipoporyna–III, FAA – wolne kwasy tłuszczowe

### 1.2.6. Inhibitory proteaz

Poza opisanymi wcześniej peptydami i białkami odpornościowymi *G. mellonella*, układ odpornościowy owada wyposażony jest także w inne narzędzie wspomagające jego walkę z patogenami poprzez hamowanie aktywności proteaz wydzielanych przez patogeny (Shaik i in., 2009). W roku 1998 w hemolimfie *G. mellonella* wykryto peptydowy, specyficzny inhibitor metaloproteaz, nazwany IMPI (ang. *inhibitor of metalloproteinases from insects*) (Wedde i in., 1998). Jego masa molekularna wynosi

około 8 kDa. Polipeptyd ten cechuje termostabilność, a w jego budowie wyróżnić należy mostki dwusiarczkowe, stabilizujące jego strukturę. Warto podkreślić, że jest to pierwszy zidentyfikowany, peptydowy, inhibitor metaloproteaz (Wedde i in., 1998; Griesch i in., 2000). W jego budowie wyróżnia się domenę o homologii do domeny inhibitorów trypsyny TIL (ang. *trypsin inhibitor-like domain*). W toku przeprowadzonych badań nie zidentyfikowano aby polipeptyd ten wykazywał aktywność inhibitora trypsyny (Clermont i in., 2004; Wedde i in., 2007). Wykazano obecność ośmiu genów kodujących homologi IMPI u *G. mellonella* (Vogel i in., 2011; Joop i Vilcinskas, 2016). Gen IMPI koduje dwa inhibitory metaloproteaz: IMPI-1 i IMPI-2. IMPI-1 posiada aktywność inhibitora termolizyny i zdolny jest do hamowania aktywności oksydazy fenolowej w warunkach *in vitro*. Sugeruje to, że może on zapobiegać nadmiernej aktywacji układu oksydazy fenolowej w odpowiedzi na zakażenia patogenami (Asai i in., 2021). Do ekspresji genu kodującego IMPI może dochodzić w wyniku rozpoznania przez receptory obecności w hemolimfie owada, krótkich fragmentów peptydowych białek gospodarza (<3 kDa)– tzw. „protfrags”, których obecność jest wynikiem hydrolizy polipeptydów hemolimfy owada przez metaloproteazy drobnoustrojów (Altincicek and Vilcinskas, 2006). IMPI-1 zostaje wydzielany do hemolimfy *G. mellonella* w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne i grzybicze co przemawia za jego zaangażowaniem w reakcje odpornościowe owada (Wedde i in., 1998). Ponadto, wykazano, że w odpowiedzi na zakażenie larw *G. mellonella* grzybami *B. bassiana* dochodzi do wzrostu ekspresji genu kodującego IMPI, co może wskazywać na jej rolę w reakcji układu odpornościowego owada w odpowiedzi na zakażenia grzybicze (Vertyporokh i Wojda, 2017). IMPI-2 koduje inhibitor metaloproteaz macierzy pozakomórkowej MMP (ang. *matrix metalloproteinase*), a jego produkt białkowy zaangażowany jest w mechanizmy związane z przeobrażeniem zupełnym *G. mellonella* (Parasa i in., 2017). W trakcie metamorfozy owada dochodzi do stymulacji jego układu odpornościowego (Weede i in., 2007, Asai i in., 2021).

W organizmie *G. mellonella* wykryto jeszcze trzy inne polipeptydy należące do rodziny inhibitorów proteaz serynowych ISPI-1, ISPI-2 oraz ISPI-3 (ang. *inducible serine protease inhibitors*). Wymienione polipeptydy charakteryzuje masa cząsteczkowa wynosząca około 10 kDa. Inhibitory ISPI-1 oraz ISPI-3 nie wykazują homologii względem żadnych z dotychczas poznanych polipeptydów (Fröbius i in., 2000; Vogel i in., 2011). W przypadku inhibitora ISPI-2 wykazano homologię z inhibitorami z rodziny Kunitz, których mechanizm działania polega na wiązaniu się substratem, a następnie

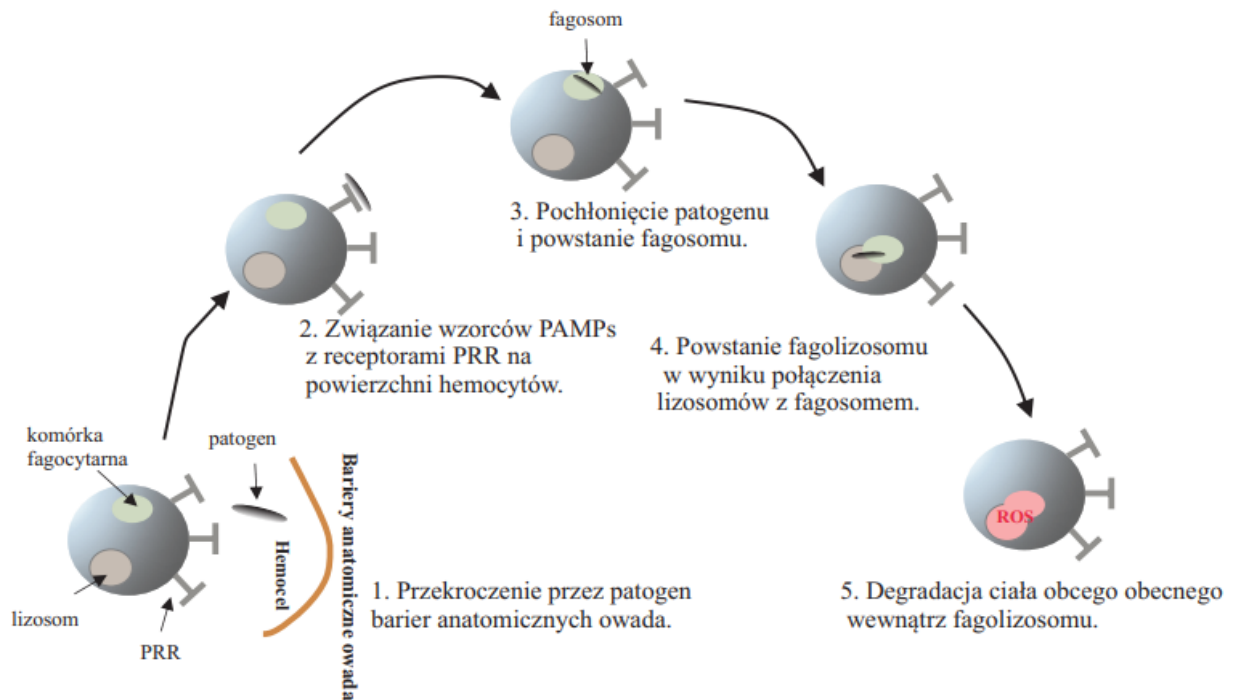
uleganiu powolnej hydrolizie. Substrat cały czas zostaje związany, przez co nie może być aktywny, a po całkowitej hydrolizie inhibitora zostaje on związany przez kolejną jego cząsteczkę (Vogel i in., 2011; Siemińska–Kuczer i in., 2017). Wykazano, że ISPI mogą pełnić funkcję opsonin a także posiadają zdolność do hamowania aktywności trypsyny i proteaz Pr1 i Pr2 wyizolowanych z grzyba *Metarhizium anisopliae* (Fröbuis i in., 2000; Ling i in., 2005).

### 1.2.7. Odpowiedź komórkowa

Odpowiedź komórkowa to obok odpowiedzi humoralnej druga gałąź wrodzonych mechanizmów odpornościowych owadów. W komórkowy typ reakcji odpornościowej owadów zaangażowane są hemocyty. U *G. mellonella* wyróżnia się prohemocyty, plazmatocyty, oenocytoidy, sferulocyty i granulocyty (Price i Ratcliffe, 1974). Prohemocyty to komórki pnia o dużych zdolnościach proliferacyjnych, z których rozwijają się inne typy hemocytów. Komórki te mają okrągły kształt, a ich średnica mieści się w przedziale 6–13  $\mu\text{m}$ . Posiadają słabo rozwiniętą siateczkę śródplazmatyczną szorstką, niewiele rybosomów i duże jądro. W hemolimfie występują w stosunkowo niewielkiej ilości i nie wykazują zdolności do adhezji (Brehelin, 1986; Lavine i Strand, 2002). Granulocyty zaangażowane są w procesy fagocytozy i nodulacji. Ich średnica mieści się w zakresie od 10 do 17  $\mu\text{m}$ . Komórki granulocytów wyróżnia obecność licznych ziarnistości, a także duże, centralnie umieszczone jądro, zajmujące połowę objętości komórki (Price i Ratcliffe, 1974; Brehelin, 1986). Plazmatocyty zaangażowane są w procesy fagocytozy i inkapsulacji oraz proces krzepnięcia hemolimfy i gojenia ran. Ich średnica mieści się w zakresie 13–15  $\mu\text{m}$  a kształt przypomina wrzeciono. Hemocyty te posiadają dobrze rozwiniętą siateczkę śródplazmatyczną szorstką i dużo rybosomów. W hemolimfie występują w dużej ilości i wykazują zdolności adhezyjne (Brehelin, 1986; Kavanagh i Reeves, 2004). Oenocytoidy są miejscem składowania elementów układu oksydazy fenolowej. Komórki te są zaangażowane w proces krzepnięcia i melanizacji hemolimfy. Ich średnica wynosi powyżej 19  $\mu\text{m}$ , a kształt przypomina wrzeciono. Ten typ komórek posiada słabo rozwiniętą siateczkę śródplazmatyczną szorstką, mitochondria i aparat Golgiego. W ich cytoplazmie zaobserwować można występowanie dużej ilości rybosomów, mikrotubule i peryferyjne położenie jądra komórkowego. Oenocytoidy nie posiadają zdolności adhezyjnych (Iwama i Ashida, 1986; Strand, 2008).

Sferulocyty to komórki odpowiedzialne za dostarczanie składników potrzebnych do tworzenia kutykuli. Ich średnica wynosi około 8  $\mu\text{m}$ . Cechą charakterystyczną tych komórek jest obecność licznych ziarnistości w cytoplazmie. Sferulocyty nie posiadają zdolności adhezyjnych (Price i Ratcliffe, 1974; Sass i in., 1994). Procentowy udział poszczególnych rodzajów hemocytów różni się zależnie od stanu fizjologicznego gospodarza, dlatego komórki te mogą być wskaźnikiem infekcji toczących się w organizmie owada (Bergin i in., 2003; Strand, 2008).

Do podstawowych mechanizmów odpornościowych, w które zaangażowane są hemocyty zalicza się fagocytozę, nodulację i inkapsulację. Fagocytoza to proces eliminacji niewielkich ciał obcych takich jak komórki bakteryjne czy kapsydy wirusów, które zakaziły organizm gospodarza (Hultmark, 2003). Pierwszym etapem fagocytozy jest rozpoznanie i ewentualnie opsonizacja ciał obcych. Za proces opsonizacji u *G. mellonella* odpowiada m. in. hemolina, która wiąże się do PAMPs takich jak lipopolisacharyd czy kwas lipotejchojowy (Rasmuson i Boman, 1979; Bergin i in., 2005). Białko to posiada właściwości przeciwdziałające sklejanemu hemocytów oraz stymulujące proces fagocytozy (Yu i in., 2002). W opsonizację zaangażowana może być opisana w podrozdziale 1.3.5. apolipoforyna III, a także peptyd GmCP8 (ang. *Galleria mellonella cationic protein 8*), wiążący się z lipopolisacharydem, kwasami lipotejchojowymi oraz  $\beta$ -1,3-glukanem (Kim i in., 2010). Obecne na powierzchni hemocytów lektyny i integryny, pełnią rolę receptorów dla wymienionych wcześniej opsonin lub bezpośrednio dla wzorców molekularnych patogenów. W wyniku rozpoznania dochodzi do endocytozy ciała obcego przez komórkę fagocytarną i utworzenia fagosomu, który w następstwie połączenia się z lizosomem tworzy fagolizosom. Obecność w lizosomie licznych enzymów trawiennych prowadzi do rozkładu pochłoniętego ciała obcego. W utworzonym fagolizosomie dochodzi do uwolnienia reaktywnych form tlenu ROS (ang. *reactive oxygen species*) i proteaz, co prowadzi do zabicia patogenu (Choi i in., 2002; Bergin i in., 2005). Efektywność procesu fagocytozy zależy od szeregu czynników takich jak wiek owada, gatunek patogenu, a także liczba drobnoustrojów atakujących organizm gospodarza (Gliński i Kostro 2004). Uproszczony schemat procesu fagocytozy przedstawia rycina 6.

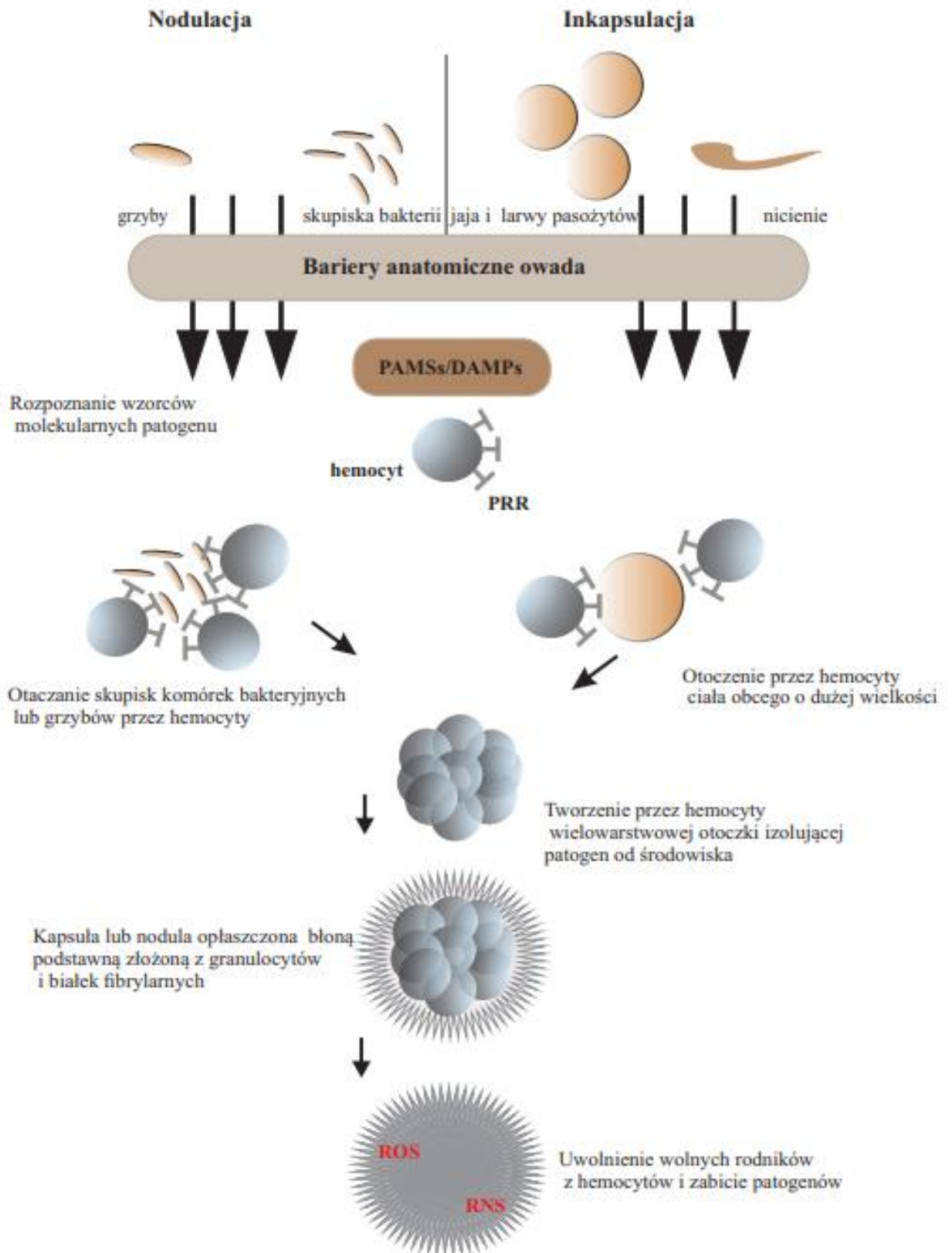


**Ryc. 6.** Uproszczony schemat fagocytozy (autorstwo własne). Objaśnienia w tekście.

W przypadku zbyt rozległej infekcji lub dużej wielkości patogenów zakażających organizm, proces fagocytozy może okazać się niewystarczający do jej opanowania. W takiej sytuacji dochodzi do uruchomienia któregoś z pozostałych mechanizmów odpowiedzi komórkowej. Inkapsulacja polega na tworzeniu kapsuł wokół jaj lub larw pasożytów, nicieni i pierwotniaków, których wielkość uniemożliwia fagocytozę, natomiast proces nodulacji prowadzi do utworzenia otoczek wokół skupisk bakterii czy grzybów. Jak przedstawiono na rycinie 7 oba procesy zachodzą w podobny sposób, a ich początkowym etapem jest rozpoznanie przez receptory zlokalizowane na granulocytach, obecnych w organizmie gospodarza ciał obcych poprzez interakcję z determinantami molekularnymi patogenów. Interakcja ta prowadzi do degranulacji granulocytów i uwolnienia peptydu PSP (ang. *plasmatocyte spreading peptide*), który odpowiada za rekrutację kolejnych plazmatocytów. Hemocyty otaczają patogeny tworząc wielowarstwową otoczkę izolującą drobnoustroje od środowiska zewnętrznego. Do powstałych kompleksów mogą także dołączać się oenocytoidy, odpowiedzialne za proces melanizacji w utworzonych agregatach. Wraz ze wzrostem grubości otoczki, spada liczba rekrutowanych plazmatocytów. Ostatecznie utworzona kapsuła lub nodula

opłaszczona zostaje otoczką złożoną z granulocytów, białek fibrylarnych, białek macierzy i proteoglikanów. Do zabicia zamkniętych w nodulach i kapsułach patogenów może dochodzić dzięki uwolnieniu wolnych rodników tlenu– ROS (ang. *reactive oxygen species*) i azotu– RNS (ang. *reactive nitrogen species*), a także chinonów (Pech i Strand, 1996; Clark i in., 1997; Marmaras i Lampropoulou, 2009; Srikanth i in., 2011 Browne i in., 2013; Dubovskiy i in., 2016).





**Ryc. 7.** Uproszczony schemat przebiegu procesu nodulacji i inkapsulacji (autorstwo własne).  
Objaśnienia w tekście.

### 1.3. Interakcje gospodarz– patogen

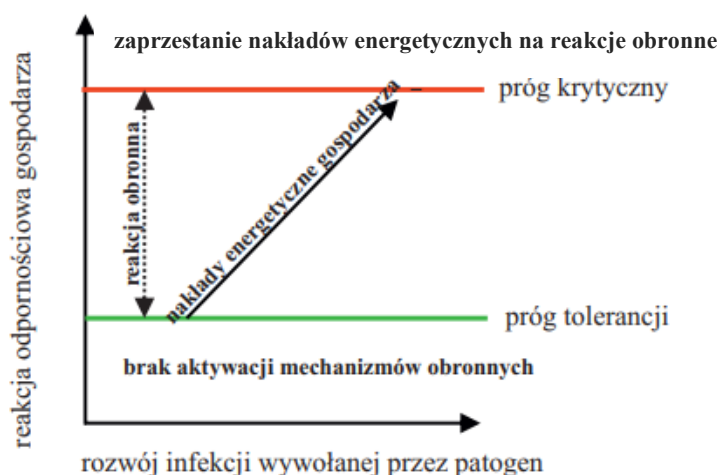
Analiza mechanizmów interakcji zachodzących pomiędzy gospodarzem i atakującym go patogenem ma szczególnie ważne znaczenie z punktu widzenia nauk biologicznych, medycyny i weterynarii. Dokładna znajomość takich oddziaływań pozwala na skuteczniejszą walkę z patogenami, projektowanie nowych cząsteczek bioaktywnych i zapobieganie rozwojowi infekcji (Grether i Okhamoto, 2022).

W roku 1973 Van Valen opracował hipotezę Czerwonej Królowej (ang. *Red Queen Hypothesis*) według której, śmierć określonych gatunków jest determinowana przez warunki ekologiczne. Zgodnie z hipotezą Czerwonej Królowej, wszystkie gatunki posiadają określony zestaw cech adaptacyjnych z powodu narażenia na zagrożenia ze strony innych organizmów. Oddziaływania pomiędzy patogenem a gospodarzem opierają się o ewolucyjny model „wyścigu zbrojeń” zaproponowany przez Dawkinsa i Krebsa (1979) opisujący część ogólnej teorii Czerwonej Królowej. Według zaproponowanego modelu drapieżnik i ofiara działają na siebie wzajemnie jako czynniki presji selekcyjnej. Każde z nich stara się rozwinąć nowe strategie, które pomogą im przewyciężyć konkurenta (Hall i in., 2011). Siłą napędową ciągłej ewolucji populacji gospodarza i patogenu jest przekazywanie potomstwu zestawu cech pozwalających na adaptację do stale zmieniającego się środowiska. Dobór płciowy jest jedną z najważniejszych strategii rozrodczych wpływających na odniesienie sukcesu w wyścigu zbrojeń. Niedawno przeprowadzone badania wskazują, że poza rywalizacją przedkopulacyjną duże znaczenie ma także rywalizacja postkopulacyjna (Moriomoto i in., 2019; Zhao i in., 2021). U *D. melanogaster* zaobserwowano zjawisko poliandrii – kopulacji samicy z kilkoma samcami, celem czego jest rywalizacja ejakulatów o zapłodnienie komórki jajowej. Prowadzi to do zapłodnienia komórki jajowej najsilniejszym materiałem genetycznym, czyli pochodzącym od samca, którego cechy zostają przekazane i w konsekwencji wyeliminowania genów, które przekazywane są przez pozostałe, słabsze osobniki (Moriomoto i in., 2019; Zhao i in., 2021; Grether i Okhamoto, 2022). Zmiany te mogą mieć charakter szybko wprowadzanych zarówno na poziomie genetycznym jak i epigenetycznym. Nowe allele „genów adaptacji” przekazywane są zarówno w populacji drapieżnika i ofiary, prowadzą kierunkową selekcję pozytywną, a cykliczność procesu prowadzi do nieustannej presji na każdego z przeciwników (Flores–Ponce i in., 2017; Hall i in., 2011) Ze względu na dużą skalę nakładów energetycznych do prowadzenia ciągłego „dozbrajania” każdego

z przeciwników „wyścig zbrojeń” nie może być procesem trwającym w nieskończoność. Do jego zakończenia może dojść w przypadku wyginięcia jednego z konkurentów lub osiągnięcia przez jeden ze konkurujących gatunków stanu optimum przy jednoczesnej niemożności uzyskania takiego stanu przez przeciwnika (Kosiol i in., 2008). Zarówno drapieżnik jak i ofiara mogą osiągnąć stan wzajemnego optimum jeśli przestają prowadzić wobec siebie presję selekcyjną.

Długotrwałe prowadzony wyścig zbrojeń może zmienić swój charakter na wprowadzanie rzadkich zmian kontradaptacyjnych przez każdego z przeciwników. Proces ten nazywany jest cyklem koewolucyjnym. Działania podejmowane przez drapieżnika i ofiarę przypominają „wojnę pozycyjną” (ang. *trench warfare*) polegającą na pozostaniu „w okopach” i wprowadzaniu rzadkich adaptacji przez konkurujące organizmy (Tellier i in., 2010). Pojawienie się „genu wirulencji” w populacji drapieżnika/patogenu pozwala na skuteczne atakowanie ofiary. Częstotliwość „genu wirulencji” w populacji drapieżnika zwiększa się. W odpowiedzi, w populacji ofiary pojawia się „gen oporności”, którego częstotliwość w populacji wzrasta, w skutek czego posiadanie przez drapieżnika „genu wirulencji” nie przynosi mu korzyści i częstotliwość jego występowania w populacji spada. Wraz ze wzrostem liczby osobników danej populacji posiadających allel niosący cechę kontradaptacyjną, przewaga zmniejsza się (Tellier i in., 2010; Floeres–Ponce i in., 2017).

Analizując strategię owada w odpowiedzi na zakażenie patogenem, szczególną uwagę należy zwrócić na wydatki energetyczne jakie musi ponieść gospodarz, aby przeprowadzić skuteczną obronę organizmu. Zgodnie z teorią zaproponowaną przez Van Baalena (1998), której główne założenia zobrazowano na rycinie 8, w przypadku gdy poziom infekcji nie przekracza progu tolerancji na patogen, gospodarzowi „nie opłaca się” wydatkować energii na aktywację mechanizmów obronnych. W sytuacji gdy próg tolerancji zostanie przekroczony, owad aktywuje mechanizmy obronne, ponosząc tym samym nakład energetyczny. W przypadku gdy infekcja rozwija się i osiąga próg krytyczny, powyżej którego prowadzenie skutecznej walki z patogenem jest niemożliwe, owad „woli” przeznaczyć energię na reprodukcję aby przedłużyć ciągłość gatunku, ponieważ „wie”, że ostatecznie przegra i zginie.



**Ryc. 8.** Główne założenia modelu nakładów energetycznych zaproponowane przez Van Baalena (1998). Objaśnienie w tekście.

Teoria zaproponowana przez Van Baalena odpowiada modelowi tolerancji zgodnie, z którym możliwe są cztery warianty odpowiedzi na zakażenie (Moreno–García i in., 2014). W sytuacji gdy szkody wywołane infekcją przez patogen nie przekraczają wartości progowej, gospodarz nie podejmuje walki. Stan ten określany jest mianem tolerancji (ang. *tolerance*). Jeśli szkody wywołane infekcją patogenu przekroczą wartość progową, gospodarz aktywuje mechanizmy obronne. Dochodzi do aktywnego atakowania patogenu i likwidacji szkód wywołanych zakażeniem. W konsekwencji dochodzi do osiągnięcia stanu odporności (ang. *resistance*) przez organizm gospodarza. W przypadku rozwijającej się infekcji i braku postępów ze strony gospodarza dochodzi do osiągnięcia wartości krytycznej zakażenia, co w konsekwencji prowadzi do śmierci owada. W tym wariantcie obserwuje się unikanie przez patogen mechanizmów obronnych aktywowanych przez gospodarza. Czwarty wariant polega na aktywnym hamowaniu reakcji odpornościowej, aktywowanej po przekroczeniu progu tolerancji na infekcję patogenem, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju zakażenia w organizmie owada i jego zabicia (Moreno–García i in., 2014). Mechanizmy obronne jakie podejmuje owad w odpowiedzi na zakażenie patogenem warunkowane są ograniczeniami związanymi z nakładami energetycznymi jakimi dysponuje. W tym kontekście optymalne z perspektywy gospodarza wydaje się prowadzenie strategii obronnych o niskim nakładzie energetycznym przeciwko patogenom o niskim potencjalnie wirulencji, a także dysponowanie skutecznymi jednak wysokoenergetycznymi strategiami obronnymi przeciwko rzadkim patogenom o wysokim potencjalnie wirulencji. Owad „musi” również

posiadać zaplecze energetyczne związane z wykonywaniem podstawowych czynności fizjologicznych. Nierzadko działania obronne jakie podejmuje gospodarz mogą mieć negatywny wpływ na jego organizm. W kontekście interakcji owad–patogen niezwykle istotne wydają się zdolności adaptacyjne układu odpornościowego, polegające na jego plastyczności. Mogą to być mechanizmy polegające na „zapamiętywaniu” zakażenia i uruchomieniu skuteczniejszej reakcji po powtórny kontakt z patogenem (Sinclair i in., 2013; Sułek i in., 2021).

### **1.3.1. Środowiskowe modulatory układu odpornościowego owadów**

Na przebieg zakażenia mają wpływ warunki środowiskowe takie jak temperatura, wilgotność powietrzna czy nasłonecznienie (Ortiz–Urquiza i Keyhani, 2013). Horsfalla i Cowlinga (1980) opracowali model trójkąta chorobowego opisującego zależność, w którym przebieg choroby stanowi wypadkową wrażliwości owada na atakujący go patogen, zdolności patogenu do infekowania gospodarza, oraz czynników środowiskowych. Wśród środowiskowych modulatorów układu odpornościowego owadów, wyróżnia się czynniki biotyczne i abiotyczne.

#### **1.3.1.1. Czynniki biotyczne**

Do czynników biotycznych zalicza się zachowania pomiędzy owadami żyjącymi w grupie, obecność symbiontów w organizmie owada, a także historię przebytych wcześniej infekcji (El–Seedi, i in., 2022). W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na rolę mikrobiomu w przebiegu interakcji między gospodarzem a patogenem. W organizmie owada, jelito jest miejscem bytowania większości mikroorganizmów symbiotycznych. Sprzyjające bakterie wspomagają procesy detoksyfikacji i trawienia, a także uczestniczą w syntezie wielu witamin niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza (Paramasiva i in., 2014; Gupta i Nair, 2020). Ponadto, zasiedlanie jelit przez sprzyjające mikroorganizmy, zapobiega rozwojowi organizmów patogennych. Wiele symbiontów zdolnych jest do wytwarzania antybiotyków skierowanych wobec patogennych szczepów bakterii. Z drugiej strony organizm gospodarza musi regulować ilość i skład swojego naturalnego mikrobiomu,

zwłaszcza, że wiele bakterii jelitowych, po dostaniu się do hemocelu, może powodować zaburzenie homeostazy organizmu gospodarza, prowadząc do poważnych zakażeń i jego śmierci (Lewis i Lize, 2015; Wu i in., 2016). Badania przeprowadzone z wykorzystaniem owadów pozbawionych naturalnego mikrobiomu, wskazały na niższy poziom aktywacji układu odpornościowego owada, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu syntezy peptydów odpornościowych (Abrudan i in., 2015; Wu i in., 2016; Gupta i Nair, 2020). Według Pradeu i Cooper (2012) organizm gospodarza zdolny jest do tolerowania obecności organizmów symbiotycznych ponieważ te ostatnie nie powodują zniszczenia komórek i tkanek gospodarza przez co nie aktywują mechanizmów reakcji odpornościowej.

Z drugiej strony zaobserwowano, że w odpowiedzi na powtórny kontakt z patogenem układ odpornościowy owadów może działać bardziej efektywnie. Mechanizm ten wiąże się z pojęciem plastyczności układu odpornościowego owadów, które wykształciły strategię adaptacyjną polegającą na „wyuczeniu zapamiętywania” przebytego zakażenia (Sheehan i in., 2020). Zjawisko to określane jest mianem piętnowania immunologicznego (ang. *immune priming*). Pierwsze doniesienia dotyczące piętnowania immunologicznego zostały opublikowane w 1992 przez Faulhabera i Karpa którzy wykazali, że owady immunizowane najpierw martwymi komórkami *Pseudomonas aeruginosa* wykazują ochronę przed powtórny zakażeniem tą samą bakterią (Faulhaber i Karp, 1992). Odkrycie to zapoczątkowało szereg badań dotyczących piętnowania immunologicznego owadów. W przypadku *G. mellonella* potwierdzono, że owad ten jest bardziej odporny na *Candida albicans*, jeśli wcześniej narażony był na działanie subletalnej dawki *C. albicans* (piętnowanie homologiczne) lub *Saccharomyces cerevisiae* (piętnowanie heterologiczne), a także po uprzednim podaniu składników ściany komórkowej (Bergin i in., 2006). Zwiększenie odporności wykazano także po ponownym podaniu owadom konidiów *Aspergillus fumigatus* (Fallon i in., 2012) oraz po zakażeniu termicznie zabitymi komórkami *Photobacterium luminescens*, jak również termicznie zabitymi komórkami *B. thuringiensis* (Wu i in., 2014; Wu i in., 2016). Dowiedziono, że podanie subletalnej dawki bakterii *B. thuringiensis* larwom owadów *G. mellonella* prowadzi do wzrostu oporności na badany szczep bakterii po podaniu dawki letalnej (Taszkow i in., 2017). Aktualnie w literaturze naukowej trwają dyskusje, w których przypadkach zwiększonej odporności można mówić o zapamiętywaniu infekcji, a w których możemy mówić o tzw. protekcji (Sułek i in., 2021).

W kontekście omawianego zagadnienia warto zwrócić uwagę na zjawisko

piętnowania immunologicznego między pokoleniami– TGIP (ang. *transgenerational immune priming*) polegające na zwiększeniu odporności potomstwa, gdy rodzice lub jeden z nich został zarażony tym samym (piętnowanie homologiczne między pokoleniami) lub innym (piętnowanie heterologiczne między pokoleniami) patogenem (Bozler, i in., 2020; Vilcinskas, 2021). Badania dotyczące mechanizmów leżących u podstaw TGIP dostarczyły dowodów na kluczowy udział matki w omawianym mechanizmie. Wykazano, że bakterie lub ich fragmenty mogą być przenoszone bezpośrednio do jaj poprzez białka żółtka (Herren i in., 2013; Freitag i in., 2014). Inni autorzy wskazują na rolę zmian epigenetycznych, które mogą odpowiadać za obserwowane zwiększenie odporności u potomstwa na drodze piętnowania międzypokoleniowego, co wyjaśniałoby przekazywanie zwiększonej odporności przez samców (Eggert i in., 2014). Piętnowanie międzypokoleniowe jest procesem kosztownym energetycznie– wykazano, że przekazanie odporności potomstwu, było związane także, ze spadkiem jego zdolności reprodukcyjnych w kolejnych pokoleniach (Schulz i in., 2019; Vilcinskas, 2021). Istnieje coraz więcej doniesień naukowych dotyczących transstadialnego piętnowania immunologicznego (ang. *transstadial immune priming*). Mechanizm ten polega na przekazywaniu odporności pomiędzy stadiami rozwojowymi owadów i dotychczas wykazany został u komarów. Dowiedziono, że *Anopheles gambiae*, które przebyły zakażenie bakteriami *E. coli* w stadium larwy, wykazywały zwiększoną odporność na ten sam szczep bakteryjny w stadium *imago* (Brown i in., 2019; Sułek i in., 2021). Poznanie podstaw tego mechanizmu wymaga jednak dalszych badań.

### **1.3.1.2. Czynniki abiotyczne**

Jak wcześniej wspomniano, do czynników środowiskowych wpływających na modulację układu odpornościowego owadów należą także czynniki abiotyczne, do których zalicza się m. in. dostępność pokarmu, temperaturę i wilgotność. Rodzaj pożywienia i dostępność składników odżywczych ma bardzo duży wpływ na poziom reakcji odpornościowej (Wu i in., 2016). Na przykład u *D. melanogaster* wykazano, że wraz ze spadkiem dostępności pożywienia, spada szybkość syntezy peptydów odpornościowych (Pletcher i in., 2005). Owady jako zwierzęta zmiennocieplne, nie mogą regulować temperatury ciała poprzez procesy metaboliczne. Najprostszym działaniem

jakie mogą podjąć aby doprowadzić do jej podwyższenia jest ekspozycja ciała na światło słoneczne lub tworzenie skupisk z innymi owadami, zwiększając temperaturę osobników. Zjawisko regulacji temperatury przez zmianę środowiska nazywa się „gorączką behawioralną” (ang. *behavioural fever*) (Anderson i in., 2013). Proces ten może zwiększyć zdolności odpornościowe owadów. Wykazano, że narażenie na stres temperaturowy jako czynnik abiotyczny może pozytywnie wpływać na reakcje odpornościowe owadów (Wojda i in., 2017). W wyniku narażenia na wysoką temperaturę w organizmie owadów dochodzi do aktywacji szeregu genów kodujących białka szoku cieplnego Hsp (ang. *heat shock proteins*). Poza tym, że jednym z zadań Hsp jest odpowiedź na stres temperaturowy, białka te zaangażowane są w ochronę składników komórki przeciwko innym czynnikom stresowym (Jee, 2016). Białka Hsp mogą pełnić funkcję sygnałów niebezpieczeństwa, informując o uszkodzeniu komórek i tkanek owada. Białko Hsp90 jest jednym z kluczowych elementów zaangażowanych w aktywację odpowiedzi na zakażenie oraz na stres temperaturowy. Jego działanie jest przykładem mechanizmu *cross-tolerance*, polegającego na równoczesnej aktywacji danego czynnika efektorowego przez różne szlaki sygnałowe (Sinclair i in., 2013). Poza tym, wyróżnia się także mechanizm *cross-talk* występujący, gdy dany czynnik efektorowy syntetyzowany w odpowiedzi na jeden typ stresu wykazuje działanie protekcyjne wobec innego rodzaju stresu. W wyniku narażenia owada na stres temperaturowy, dochodzi do ekspresji genów kodujących Hsp, dzięki czemu zapewniona jest dodatkowa ochrona organizmu gospodarza przed szkodami wywoływanymi przez patogen (Mattson i Calabrese, 2010; Sinclair i in., 2013).

### **1.3.2. Entomopatogeny**

Bakterie i grzyby stanowią grupę organizmów, które zdołały zasiedlić wszystkie nisze ekologiczne. Wiele z nich wywiera pozytywny wpływ na środowisko, w którym bytuje (Bel i in., 2020). W tym kontekście, na szczególną uwagę zasługują bakterie jelitowe, pełniące kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmu, stanowiąc naturalną ochronę przed namnażaniem się w nim entomopatogennych bakterii chorobotwórczych. Bakterie entomopatogenne to grupa mikroorganizmów, która na przestrzeni długiego procesu antagonistycznej koewolucji gospodarz–patogen rozwinęła szereg strategii niezbędnych do prowadzenia skutecznej inwazji na organizm gospodarza (Gibson i in.,



2014; Baranek i in., 2015). Wśród patogenów wyróżnia się generalistów, tj. mikroorganizmy, które są w stanie zakażać szerokie spektrum gospodarzy oraz specjalistów, czyli mikroorganizmy, posiadające zdolność do zakażenia jedynie wybranych gatunków owadów (Malagocka i in., 2019; Bono i in., 2020). W kontekście bakterii entomopatogennych szczególną uwagą należy zwrócić na ich zdolności do tworzenia form przetrwalnikowych, a także produkcji licznych toksyn, których działanie ma na ogół ograniczony i specyficzny charakter (Fedhila i in., 2002). Wśród bakterii o właściwościach entomopatogennych względem owadów wyróżnia się Gram–ujemne: *Chromobacterium subtsugae*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia aphidicola*, *Photorhabdus luminescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. entomophila*, *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophila*, *Serratia marcescens*, *Xenorhabdus nematophila*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia pestis* oraz Gram–dodatnie: *B. thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Melissococcus pluton* (Castagnola i Stock, 2014; Lacey i in., 2015).

Jednym z najlepiej poznanych owadzich entomopatogenów jest Gram–dodatni *B. thuringiensis*. Są to urzęsione laseczki, osiągające długość 2–5  $\mu\text{m}$  i szerokość 1  $\mu\text{m}$  (Jouzani i in., 2017). Bakterie te zdolne są do wytwarzania form przetrwalnikowych, a także licznych czynników wirulencji. Do zakażenia owadów dochodzi poprzez zjedzenie spor lub komórek *B. thuringiensis*. Rzadziej do infekcji może dojść przez przetchlinki lub w wyniku zranienia powierzchni ciała owada i zakażenia przez powstałą ranę sporami lub komórkami wegetatywnymi. *B. thuringiensis* dysponuje szeroką gamą czynników wirulencji, syntetyzowanych w różnych fazach wzrostu (Bel i in., 2020). Do najważniejszych białek o właściwościach toksycznych należą  $\delta$ –endotoksyny– składniki kryształów syntetyzowanych w sporach wytwarzanych w stacjonarnej fazie wzrostu bakterii. Do  $\delta$ –endotoksyn zalicza się białko krystaliczne Cry, zdolne do tworzenia porów w jelicie środkowym owada co samo w sobie może być przyczyną śmierci owadów. Perforowane jelito może także stanowić „wrota zakażenia”, przez które bakterie wnikają do hemocelu (Bel i in., 2020). W początkowym etapie fazy logarytmicznej *B. thuringiensis* rozpoczyna syntezę metaloproteinaz InhA i InhA2 zaangażowanych w przełamywanie odpowiedzi immunologicznej owada (Osman i in., 2013; Baranek i in., 2015). W przypadku zakażenia larw *G. mellonella* bakteriami *B. thuringiensis*, metaloproteinaza InhA działa jako kostymulator  $\delta$ –endotoksyn (Fedhila i in., 2002). W środkowym etapie fazy logarytmicznego wzrostu *B. thuringiensis* syntetyzuje i wydziela do środowiska owadobójcze białka fazy wegetatywnej– VIPs, (ang. *vegetative*

*insecticidal proteins*) oraz sekrecyjne białka owadobójcze– SIPs, (ang. *secreted insecticidal proteins*) (Osman i in., 2013; Jouzani i in., 2017). Bakterie *B. thuringiensis* zdolne są także do wytwarzania  $\beta$ -egzotoksyn, tj. termostabilnych metabolitów wtórnych, które jako analogi ATP hamują działanie polimerazy RNA zależnej od DNA (Perani i in., 1998; Liu i in., 2014).

Zdolność do zakażenia owadów nabyły także wybrane gatunki grzybów. Należą do nich: *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Conidiobolus thromboides*, *Hirsutella thompsonii*, *Isaria fumosorosea*, *Lagenidium giganteum*, *Lecanicillium longisporum*, *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium acridum*, *M. anisopliae*, *Nomuraea rileyi* (Lacey i in., 2015). Jednym z najlepiej poznanych entomopatogenów grzybiczych jest *B. bassiana*. Grzyb ten zdolny jest do wytwarzania 3 rodzajów zarodników:

- hydrofobowych konidiów powietrznych, których powierzchnia pokryta jest tzw. pręcikami (ang. *rodlet layer*)
- hydrofilowych blastospor, które w przypadku wyczerpania substancji odżywczych zastępowane są ciałami strzępkowymi
- konidiów zanurzonych w przypadku ograniczenia substancji odżywczych w pożywce.

Forma saprofityczna grzyba jest zdolna do wzrostu w glebie i wytwarzania zarodników zdolnych do adhezji do kutykuli owadów. Po związaniu z oskórką owada, grzyb rozpoczyna syntezę enzymów degradujących kutykulę, wytwarza strzępki penetrujące, a następnie rozwija się we wnętrzu hemocelu w formie komórek wegetatywnych– blastospor. Wraz z ograniczeniem dostępności substancji odżywczych *B. bassiana* wytwarza ciała strzępkowe, a po całkowitym wyczerpaniu pożywienia i zabiciu owada przerasta na zewnątrz kutykulę. Spory wytworzone na powierzchni ciała martwego owada mogą prowadzić do kolonizacji tkanek roślinnych celem wymiany azotu pozyskanego z organizmu owada na cukry. Do głównych czynników wirulencji *B. bassiana* należą enzymy proteolityczne, wśród których wyróżnia się proteazę serynową podobną do subtylizyn Pr1, proteazę serynową, podobną do trypsyny Pr2 (Dias i in., 2008) i bassiasinę I (ang. *bassiasin I*) (Kim i in., 1999). Ponadto, genom *B. bassiana* koduje 20 chitynaz, spośród których najbardziej znaną jest endochitynaza Bbchit1 (Ortiz– Urquiza i Keyhani, 2016). Grzyb *B. bassiana* zdolny jest także do produkcji szeregu toksycznych dla organizmu owada metabolitów wtórnych, m. in. beauverycynę (ang. *beauvericin*) (Gibson i in., 2014) i beauverolidu L (ang. *Beauverolide L*) (Gibson i in., 2014).

### 1.3.3. *Pseudomonas entomophila*

#### 1.3.3.1. Ogólna charakterystyka bakterii *P. entomophila*

Bakterie *P. entomophila* L48 to Gram–ujemne pałeczki z polarnie położoną wicią, wyizolowane z przewodu pokarmowego *D. melanogaster* w 2001 roku (Vodovar i in., 2006). Systematykę bakterii przedstawia tabela 3. Bakterie te są zdolne do wzrostu w zakresie temperaturowym od 4°C do 42°C i przy pH wynoszącym od 3 do 10. Optymalna temperatura wzrostu wynosi około 30°C, a pH od 5 do 9 (Mulet i in., 2012; Dieppois i in., 2015). Analiza genomu bakterii wykazała, że tworzy go kulisty chromosom o rozmiarze 5888780 par zasad, a spośród wszystkich zidentyfikowanych genów, znana jest funkcja 67% (Vodovar i in., 2006). Szczep ten jest najbliższym spokrewnionym z saprofityczną bakterią glebową *Pseudomonas putida* (70,2% genów zidentyfikowanych w genomie *P. entomophila* ma swoje ortologi w genomie *P. putida*) (Vodovar i in., 2006; Bolbach i in., 2010). *P. entomophila* jest wszechstronny metabolicznie, jego genom koduje liczne lipazy, chitynazy, proteazy oraz hydrolazy, a także geny, których produkty odpowiadają za pozyskiwanie węgla z różnych źródeł, dzięki czemu jest on zdolny do rozwoju we wszystkich niszach ekologicznych. *P. entomophila* jest zdolny do syntezy cyjanowodoru. Proces ten jest regulowany obecnością tlenu w środowisku. W genomie bakterii zidentyfikowano geny kodujące białka odpowiedzialne za degradację glebowych polimerów (Ryall i in., 2009; Shahbaz–Mohammadi i Omidinia, 2011; Dieppois i in., 2015). Szczep ten posiada zestaw cech odpowiedzialnych za pozyskiwanie żelaza ze środowiska zewnętrznego. Należą do nich błonowe receptory Ton–B odpowiadające za wychwyt kompleksów hemu i żelaza. Ponadto, *P. entomophila* posiada geny *hasR* i *hxC*, których produkty biorą udział w wychwycie hemu oraz geny odpowiedzialne za syntezę fluorescencyjnego sideroforu piowerdyny (Vodovar i in., 2006; Bodilis i in., 2009). Omawiana bakteria dysponuje szerokim zestawem genów, których produkty cechują się wysoką patogennością wobec owadów. Dotychczas wykazano, że *P. entomophila* może z powodzeniem zakażać owady należące do rzędów Diptera, Lepidoptera i Coleoptera, a także śluzowca *Dictyostelium discoideum* oraz nicienia *C. elegans* (Vallet–Gély i in., 2010; Dieppois i in., 2015).

**Tabela 3.** Systematyka *P. entomophila* (Mulet i in., 2012).

Królestwo	Bacteria
Typ	Proteobacteria
Klasa	Gammaproteobacteria
Rząd	Pseudomonadales
Rodzina	Pseudomonadaceae
Rodzaj	<i>Pseudomonas</i>
Gatunek	<i>Pseudomonas entomophila</i>

### 1.3.3.2. Systemy regulatorowe *P. entomophila*

Kluczowym elementem kontrolującym zjadliwość *P. entomophila* jest dwuskładnikowy system GacS/GacA, składający się z kinazy receptorowej GacS i regulatora odpowiedzi GacA (Sarris i Scoulica, 2011). System GacS/GacA występuje także u wielu innych chorobotwórczych bakterii Gram–ujemnych (m. in. *Vibrio cholerae* i *Legionella pneumophila*) i odpowiada za regulację ekspresji genów kodujących niektóre czynniki wirulencji (Heeb i Haas, 2001). W przypadku *P. entomophila* odpowiada on za regulację ekspresji genów kodujących monalizynę, metaloproteazę AprA i entolizynę (Liehl i in., 2006; Opota i in., 2011; Sarris i Scoulica, 2011). *P. entomophila* dysponuje także dwuskładnikowym systemem regulatorowym AlgZ/AlgR. Nie wiadomo jednak w regulację ekspresji których genów jest on zaangażowany (Deppois i in., 2015). Badania przeprowadzone z użyciem mutantów pozbawionych systemu AlgZ/AlgR wykazały spadek wirulencji bakterii *P. entomophila* wobec *D. melanogaster*. U innych mikroorganizmów system AlgZ/AlgR zaangażowany jest w regulację syntezy alginianu, polisacharydów, cyjanowodoru i procesy powstawania biofilmu (Morici i in., 2007; Overhage i in., 2007; Dieppois i in., 2015). *P. entomophila* posiada także dwuskładnikowy system regulatorowy PrtR/PrtI odpowiadający za regulację ekspresji genu kodującego proteazę AprA (Liehl i in., 2006).

*P. entomophila* posiada geny *pvf*, których produkty biorą udział w wytwarzaniu metabolitów wtórnych o wysokim stopniu zjadliwości wobec owadów. Geny *pvf* regulują syntezę cząsteczki sygnalizacyjnej, zaangażowanej w wytwarzanie niektórych czynników wirulencji niezależnie od dwuskładnikowego systemu GacS/GacA (Vodovar

i in., 2006; Vallet–Gely i in., 2010). Wykazano, że geny *pvf* i system GacS/GacA współregulują syntezę monalizyny, z tego też względu istnieją dowody na ich współzależność (Dieppois i in., 2015).

### 1.3.3.3. Czynniki wirulencji *P. entomophila*

Do głównych toksyn odpowiadających za wysoki poziom zjadliwości bakterii *P. entomophila* należą metaloproteaza AprA, monalizyna i entolizyna.

Alkaliczna metaloproteaza AprA to białko o masie 51 kDa, wydzielane przez system sekrecyjny typu T1SS (Lally i in., 1999). W kontekście zjadliwości *P. entomophila*, dotychczas przeprowadzone badania wskazują na udział AprA w hamowaniu aktywności efektorów odpowiedzi immunologicznej owada, a także na promowaniu destrukcji nabłonka jelita gospodarza przez patogen. Metaloproteaza AprA odpowiada także za rozszczepianie pro–monalizyny na dwie podjednostki i w konsekwencji powstania jej aktywnej formy (Opota i in., 2011; Nonaka i in., 2020).

Monalizyna to białko o masie 30 kDa posiadające zdolność do perforacji komórek jelitowych owada. Białko to zaliczane jest do toksyn tworzących pory PFT (ang. *pore-forming toxins*) (Nonaka i in., 2020) Białka PFT wykazują dwa mechanizmy działania, polegające na wstawianiu w błony komórkowe komórki docelowej, swoich regionów o strukturze przypominającej  $\alpha$ –helisy lub regionów o strukturze szpilki do włosów (ang. *harpin loop*). Regiony te cechuje amfipatyczność i obecność licznych reszt seryny i treoniny (Opota i in., 2011). *P. entomophila* syntetyzuje monalizynę w formie protoksyny, której aktywacja zachodzi na drodze ograniczonej proteolizy prowadzonej przez wcześniej opisaną metaloproteazę AprA, lub też w wyniku działania termolizyny lub trypsyny (Nonaka i in., 2020). Dotychczas wykazano, że aktywna forma toksyny może degradować komórki nabłonkowe jelit owada, a także komórki fagocytujące układu odpornościowego gospodarza. Doświadczenie polegające na wstrzyknięciu endogennej monalizyny prowadziło do wywołania reakcji układu odpornościowego *D. melanogaster* i zabicia larw (Leone i in., 2015; Nonaka i in., 2020).

*P. entomophila* posiada zdolność do wytwarzania cyklicznego lipopeptydu endolizyny składającego się z 14 aminokwasów i trzech reszt kwasu tłuszczowego–C<sub>10</sub>OH. Endolizyna jest białkiem o właściwościach hemolitycznych i surfaktantowych (Vallet–Gely i in., 2010; Omoboye i in., 2019). Synteza endolizyny odbywa się pod

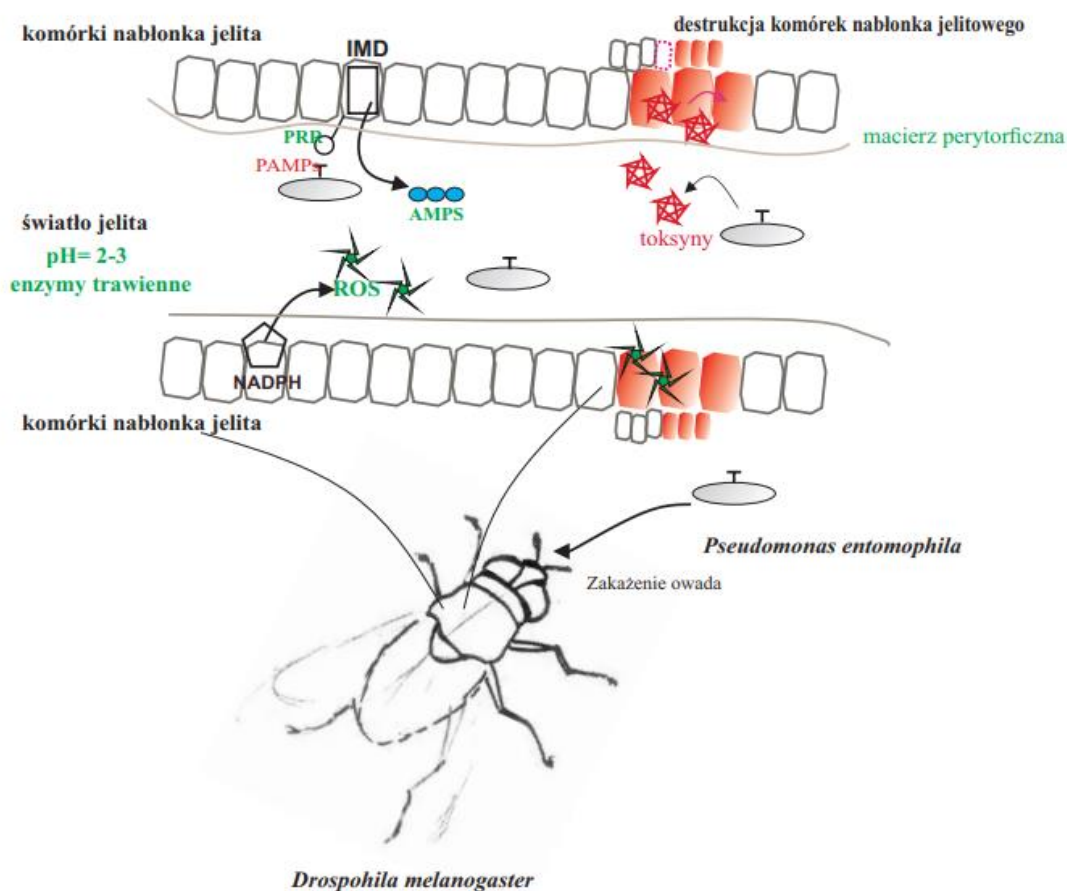
kontrolą dwuskładnikowego systemu regulatorowego GacS/GacA (Vallet–Gely i in., 2010). Dotychczas nie wykazano istotnej roli tego lipopeptydu w zjadliwości bakterii *P. entomophila* (Omoboje i in., 2019). W genomie *P. entomophila* zidentyfikowano obecność genów kodujących toksyny owadobójcze TccC i TcdD charakterystyczne dla bakterii entomopatogennych (Vodovar i in., 2006; Dieppois i in., 2015). Dokładny mechanizm działania i rola tych toksyn w procesie infekowania owadów nie został jednak opisany.

Poza opisaną wcześniej metaloproteazą AprA bakteria *P. entomophila* zdolna jest do syntezy 3 proteaz serynowych (Vodovar i in., 2006). Jedną z cech wyróżniającą *P. entomophila* na tle innych patogennych mikroorganizmów z rodzaju *Pseudomonas* jest brak obecności systemu sekrecyjnego typu T3SS odpowiadającego za dostarczanie białek patogenu do komórek docelowych gospodarza. *P. entomophila* dysponuje systemem sekrecyjnym typu T6SS odpowiedzialnym za dostarczanie czynników wirulencji patogenu do komórek gospodarza, a także do innych bakterii, co pozwala na skuteczną eliminację konkurentów (Opota i in., 2011, Bernal i in., 2018). U *P. entomophila* zidentyfikowano geny kodujące białka VgrG i Hcp wykazujące homologiczną względem systemu T6SS. Wykazano, że oba te białka znajdują się w płynie pohodowlanym *P. entomophila* (Opota i in., 2011; Sarris i Scoulica, 2011; Villamizar i in., 2020).

### **1.3.3.4. Proces infekcyjny *P. entomophila***

Pomimo poszerzenia znajomości zagadnień dotyczących bakterii *P. entomophila* na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat, przeważającą większość wyników badań uzyskano w oparciu o analizy mechanizmów interakcji *P. entomophila* z organizmem modelowym *D. melanogaster*. Nie przeprowadzono dokładnych analiz mechanizmu oddziaływań omawianego szczepu z innymi owadami. *P. entomophila* jako bakteria entomopatogenna jest zdolna do zakażenia gospodarza drogą pokarmową. Uproszczony schemat obrazujący proces infekcyjny przedstawiono na rycinie 10. Entomopatogen dostaje się do organizmu owada wraz z pożywieniem, po czym powoduje zahamowanie pobierania pokarmu przez zaatakowany organizm (Vodovar i in., 2005; Liehl i in., 2006). Bakterie z otworu gębowego przemieszczają się do jelit. *P. entomophila* jest odporny na warunki panujące w części środkowej jelita– tj. niskie pH mieszczące się w zakresie 2–3, oraz wysokie stężenie lizozymu (Shanbhag i Tripathi 2009; Mulet i in., 2012). Entomopatogen jest

także odporny na obecność reaktywnych form tlenu ROS (ang. *reactive oxygen species*), syntetyzowanych przez kompleksy oksydazy NADPH w odpowiedzi na zakażenia bakteryjne (Chakrabarti i in., 2012). W odpowiedzi na rozpoznanie determinant molekularnych *P. entomophila* przez receptory PRR owada, dochodzi do aktywacji szlaku Imd, w wyniku którego w komórkach jelit syntetyzowane są peptydy odpornościowe (Chakrabarti i in., 2012). Głównym celem czynników wirulencji entomopatogenu jest uszkodzenie komórek nabłonka jelitowego owada, prowadząc do całkowitej destrukcji narządu. Zakażenie wywołane przez *P. entomophila* prowadzi do zahamowania procesu translacji cząsteczek efektorowych, a następnie do zahamowania procesów naprawczych uszkodzonych tkanek (Amczesławski i in., 2009; Ha i in., 2009). Syntetyzowane przez owada ROS uszkadzają także jego własne komórki jelitowe. Tkanka jelit jest celem dla szeregu wcześniej opisanych czynników wirulencji. Zaatakowane przez *P. entomophila* jelita *D. melanogaster* kurczą się i pękają w konsekwencji ulegając całkowitemu zniszczeniu (Chakrabarti i in., 2012). Niedawno przeprowadzone badania wykazały wzrost odporności na entomopatogeny czternastego pokolenia populacji *D. melanogaster* poddawanej we wszystkich poprzednich pokoleniach infekcji bakteriami *P. entomophila* (Sharda i in., 2022).



**Ryc. 9.** Uproszczony schemat mechanizmu zakażenia *D. melanogaster* bakterią *P. entomophila* (autorstwo własne). Zieloną czcionką zaznaczono czynniki i mechanizmy obronne jakimi dysponuje owad w odpowiedzi na zakażenie entomopatogenem, zaś kolorem czerwonym czynniki wirulencji *P. entomophila*. Jelito owada pokryte jest od wewnętrznej strony macierzą perytroficzną a panujące w nim środowisko ma charakter kwasowy i charakteryzuje się obecnością enzymów trawiennych. Zadaniem wszystkich tych elementów jest ochrona owada przed zakażeniem. Czerwoną czcionką podpisano czynniki wirulencji *P. entomophila*. W wyniku zakażenia *P. entomophila*, determinanty molekularne bakterii (PAMPs), zostają rozpoznane przez receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów (PRR), które aktywują szlak Imd i syntezę peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPS). Zakażenie bakteriami rekrutuje kompleks oksydazy NADPH, odpowiadającej za wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS), działających ujemnie na *P. entomophila*. Wysoki poziom ROS, a także szeregu toksyn wytwarzanych przez entomopatogen prowadzi do poważnych uszkodzeń komórek nabłonka jelit owada.

Przeprowadzanie badań nad mechanizmem interakcji gospodarz–patogen wydaje się niezwykle przydatne, ze względu na potencjalne możliwości wykorzystania szeregu czynników wirulencji *P. entomophila* jako potencjalnych środków, które być mogłyby



zostać wykorzystane biokontroli przeciwko owadom szkodnikom. W kontekście możliwości potencjalnego wykorzystania *P. entomophila* jako biologicznego środka ochrony roślin szczególnie istotny wydaje się fakt, że szczep ten nie jest fitopatogeny (Vodovar i in., 2006; Villamizar i in., 2020). Ponadto, *P. entomophila* może wpływać na zwiększenie odporności roślin wobec zakażenia wywołanego grzybami chorobotwórczymi (Vallet–Gely i in., 2010; Dieppois i in., 2015).

### **1.3.4. Rola entomopatogenów w tworzeniu biologicznych środków ochrony roślin**

Ogromny postęp wiedzy w drugiej połowie XX wieku, pozwolił na odkrycie potencjału owadobójczego entomopatogenów jako alternatywy dla wykorzystania chemicznych środków ochrony roślin, które wywierają negatywny wpływ na środowisko i organizm człowieka (Gibson i in., 2014). Szereg czynników wirulencji jakimi dysponują *B. thuringiensis* i *B. bassiana* dał możliwość wykorzystania tych mikroorganizmów jako bioinsektycydów– preparatów zawierających w swoim składzie żywe mikroorganizmy lub pozyskane z nich metabolity, które wykorzystywane są w walce ze szkodnikami (Lacey i in., 2015; Mascarin i Jaronski, 2016). W 1996 roku po raz pierwszy wprowadzono na rynek rośliny zmodyfikowane genetycznie, zawierające geny odpowiadające za syntezę toksyny Cry pochodzącej z *B. thuringiensis*. Wykorzystanie roślin transgenicznych wpłynęło na redukcję nakładów finansowych przeznaczanych na ochronę upraw i znacząco zmniejszyło zanieczyszczenia środowiska pozwalając przy tym efektywnie zwalczać szkodniki (Jurat–Fuentes i Crickmore, 2017; Heckel, 2020). Z drugiej strony zwiększająca się liczba roślin transgenicznych może prowadzić do rozwoju odporności owadów na wprowadzane do roślin bakteryjnych czynników wirulencji. Prawdopodobieństwo wykształcenia przez owady odporności na bakteryjne czynniki wirulencji wprowadzane do modyfikowanych roślin jest większe niż na insektycydy ponieważ rośliny transgeniczne wywierają ciągłą presję selekcyjną na populacje owadów, wymuszając na nich szybszą adaptację do nowych warunków środowiska (Jouzani i in., 2017; Syed i in., 2020). Preparaty określane jako bioinsektycydy powinny posiadać szereg właściwości, które pozwalają na ich bezpieczne wykorzystanie w środowisku. Pożądanymi cechami jest wybiórczość, brak negatywnego

wpływu działania na środowisko, szybkość działania, umiarkowany okres trwałości, niskie koszty i łatwość produkcji oraz brak specjalistycznych urządzeń potrzebnych do dystrybucji preparatów (Butt i in., 2016; Mascarin i Jaronski, 2016). W przypadku *B. thuringiensis* – szczepy wykorzystywane do produkcji biopreparatów charakteryzują się dużą selektywnością, dzięki czemu negatywny wpływ jaki wywierają na środowisko jest ograniczony do minimum (Lacey i in., 2015). *B. bassiana* charakteryzuje się niższą skutecznością działania w porównaniu do insektycydów chemicznych, dlatego głównym celem strategii związanej z jej wykorzystaniem, jest ograniczenie populacji patogenów lub tworzenie preparatów skojarzonych z innymi bioinsektycydami – przede wszystkim z *B. thuringiensis* (Mascarin i Jaronski, 2016; Deng i in., 2017).

Pomimo tego, że owadzie entomopatogeny stanowią liczną grupę bakterii i grzybów, tylko nieliczne z nich mogą być wykorzystywane jako biologiczne środki ochrony roślin. Większość mikroorganizmów nie spełnia norm, jakimi powinny charakteryzować się takie preparaty lub stan wiedzy o ich właściwościach nie jest wystarczająco duży (Lacey i in., 2015; Jouzani i in., 2017). Z drugiej strony należy mieć świadomość, że pomimo skuteczności już opracowanych bioinsektycydów, nie są one narzędziem pozwalającym na całkowite rozwiązanie problemów zwalczania pasożytów roślin uprawnych oraz owadów przenoszących choroby (Deng i in., 2017). Poważny problem stanowi skuteczność wielu insektycydów ograniczona jedynie do stadium owadów aktywnie żerujących oraz zróżnicowana wrażliwość poszczególnych gatunków na ten sam czynnik wirulencji (Jouzani i in., 2017). Problemem jest nabywanie odporności na długotrwale stosowane środki ochrony biologicznej, które warunkowane może być zwiększoną syntezą komórek nabłonka jelitowego, zmianami pH w jelitach, a także mutacjami genów kodujących receptory powierzchniowe komórek owadów, z którymi oddziałują czynniki wirulencji (Castagnola i Stock, 2014; Bel i in., 2020). Zarówno po stronie gospodarza jaki i patogenu zachodzą procesy, których celem jest przystosowanie się do ciągle zmieniającego się środowiska przypominające nieustannie trwający „wyścig zbrojeń” (ang. *arms race*). W tym kontekście kluczowe wydaje się poszukiwanie i badanie nowych mikroorganizmów o entomopatogennych właściwościach, które mogłyby być potencjalnym źródłem cząsteczek o aktywności biologicznej, wykorzystywanych jako potencjalne bioinsektycydy.

## 2. Cel pracy

Celem badań było:

- wyznaczenie przeżywalności larw barciaka większego *Galleria mellonella* po zakażeniu bakteriami *Pseudomonas entomophila* naturalną drogą infekcji i prześledzenie przebiegu zakażenia,
- analiza wybranych parametrów odpowiedzi układu odpornościowego larw barciaka większego *G. mellonella* po zakażeniu bakterią entomopatogenną,
- identyfikacja związków bioaktywnych w hemolimfie zakażonych larw *G. mellonella*
- analiza właściwości wybranych polipeptydów hemolimfy larw *G. mellonella*.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Materiały i odczynniki używane w badaniach

Materiały i odczynniki	Producent
baktopepton	A&A Biotechnology s.c., Polska
TEMED (N,N,N',N'-tetrametylo-etylenodiamina)	Acros Organics, Stany Zjednoczone, Belgia
(skład: 1% trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 0,5% NaCl)	BIOCORP Spółka z o.o., Polska
białka markerowe <i>Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards</i> , białka markerowe <i>Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards</i> , białka markerowe <i>Precision Plus Protein Standards All Blue</i> , odczynnik Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate),	Bio-Rad, Stany Zjednoczone
agar bakteriologiczny	BTL Spółka z o.o., Polska
elastomer silikonowy Sylgard® 184	Dow Corning®, Stany Zjednoczone
chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), glicyna (kwas aminooctowy, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ), kwas octowy (CH <sub>3</sub> COOH),	Chempur, Polska
błękit Coomassie R-250 ( <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i> ), N-fenylotiomocznik (PTU, C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S)	Fluka, Szwajcaria
bibuła Whatman 3MM	GE Healthcare Life Sciences, UK
membrany PVDF Immobilon®-P, Triton® X-100	Merck-Millipore, Niemcy
APS (nadsiarazan amonu, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ), bis-akrylamid (N,N'-metyleno-bis-akrylamid), CAPS, SDS (dodecylosiarczan sodu)	MP Biomedicals, Francja
alkohol etylowy (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), błękit bromofenolowy (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> Br <sub>4</sub> S), diwodorofosforan (V) potasu (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), diwodorofosforan (V) sodu (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), glicerol (CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH), glukoza, kwas solny	POCh S.A., Polska

(HCl), metanol (CH <sub>3</sub> OH), wodorotlenek potasu (KOH)	
akrylamid, ampicylina, azokazeina, barwnik Coomassie Brilliant Blue G, cekropina B, czerń amidowa, detergen eozyna, E-Toxa-Clean®, dichlorometan (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ), EDTA ( <i>edetac acid</i> ), hematoksyлина, ksylen, lizozym białka jaja kurzego (EWL, <i>egg white lysozyme</i> ), n-heksan (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ), octan etylu (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ), paraplant®, PMSF ( <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> ), p-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd, RNaseZAP™, siarczan streptomycyny ( <i>streptomycin sulfate salt</i> ), strzykawka Hamilton®, termolizyna z <i>Bacillus thermoproteolyticus rokko</i> , TFA ( <i>trifluoroacetic acid</i> , C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ), Tris (ang. Trizma® <i>hydrochloride</i> ), trycyna (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> ), trypsyna, wodorofosforan (V) di-sodu (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), wodorowęglan sodu (NaHCO <sub>3</sub> ), zestaw do izolacji całkowitego RNA ( <i>GenElute Mammalian Total RNA Extraction kit</i> ), β-merkaptoetanol, zbuforowana formalina ( <i>formalin solution, neutral buffered, 10%</i> )	Sigma-Aldrich, Niemcy, Stany Zjednoczone
zestaw do odwrotnej transkrypcji ( <i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with RNase Inhibitor</i> ), zestaw do przeprowadzenia reakcji PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym ( <i>Power Sybr®Green PCR Master Mix</i> ), zestaw do trawienia DNA ( <i>TURBO DNA-free™ kit</i> )	Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone

### 3.2. Bufory i pożywki

Bufor/Pożywka	Skład	
Bufor 1	PBS (ang. <i>Phosphate buffered saline</i> ; pH 7,4)	140 mM NaCl 2,68 mM KCl 10,14 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O apyrogenna

## Materiały i metody

Bufor 2	bufor próbkowy do elektroforezy trycynowej 4x stężony	4% SDS 12% glicerol 50 mM Tris-HCl pH- 6,8 $\beta$ -merkaptoetanol 0,01% Coomasie Brilliant Blue G
Bufor 3	bufor do żelu (ang. <i>gel buffer</i> )	3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3% SDS
Bufor 4	bufor katodowy	0,1 M Tris-HCl pH 8,3 0,1 M trycyna 0,1% SDS
Bufor 5	bufor anodowy	200 mM Tris-HCl pH 8,9
Bufor 6	bufor próbkowy do elektroforezy glicynowej 4x stężony	0,125 M Tris-HCl pH 6,8 20% glicerol 4% SDS 0,002% błękit bromofenolowy
Bufor 7	bufor elektrodowy	0,44% glicyna 0,3% Tris 0,1% SDS
Bufor 8	bufor próbkowy do elektroforezy trycynowej SDS- PAGE 2x stężony (do liofilizatów po HPLC)	125 mM Tris-HCl pH 6,8 4% SDS 20% glicerol 0,01% Coomasie Brilliant Blue G-250
Bufor 9	bufor do elektrotransferu	10 mM CAPS pH 11 10% metanol
Bufor 10	bufor Ringera (pH 6,1)	172 mM KCl 68 mM NaCl 5 mM NaHCO <sub>3</sub>
Bufor 11	20 mM bufor fosforanowy (pH 6,8)	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Bufor 12	bufor HEPES (pH 7,5)	20 mM HEPES 150 mM NaCl
Bufor 13	bufor octanowy (pH 7,5)	10 mM CH <sub>3</sub> COONa 5 mM (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Ca

## Materiały i metody

Pożywka 1	LB	1% trypton 0,5% ekstrakt drożdżowy 0,5% NaCl
Pożywka 2	YPD	1% ekstrakt drożdżowy 2% baktopepton 2% glukoza

### 3.3. Metody badań

#### 3.3.1. Hodowla barciaka większego

Larwy *Galleria mellonella* hodowane były w plastikowych pojemnikach z plastrami woszczyny, umieszczonych w termostacie, w którym utrzymywane były następujące warunki: temperatura 28°C, wilgotność ok. 60–80% oraz całkowita ciemność. Pokarm stanowił naturalny wosk pszczeli z plastrów woszczyny. Do badań używano larw ważących około 200 mg.

#### 3.3.2. Hodowla bakterii

W doświadczeniach wykorzystano szereg szczepów bakteryjnych i grzybiczych. Spis wszystkich wykorzystanych organizmów, a także warunki wzrostu jakie im zapewniono przedstawia poniższa tabela 4.

**Tabela 4.** Spis organizmów używanych w doświadczeniach oraz warunki ich wzrostu.

Mikroorganizm	Źródło	Warunki wzrostu (pożywka, temperatura hodowli, warunki wytrząsania)
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	Frederic Boccard, CNRS, Francja	LB (pożywka 1), 30°C, 120 RPM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	LB (pożywka 1), 37°C, 120 RPM
<i>Escherichia coli</i> D31	CGSC5165, Genetic Stock Centre, New Haven, USA	LB (pożywka 1), 37°C, 120 RPM
<i>Escherichia coli</i> JM83 z wbudowanym plazmidem pCH110	(Pharmacia–Amersham)	LB (pożywka 1) + ampicylina, 37°C, 120 RPM
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC4698	LB (pożywka 1), 37°C, 120 RPM

<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kurstaki HD1	Bacillus Genetic Stock Centre, The Ohio State University, Department of Biochemistry)	LB (pożywka 1), 37°C, 120 RPM
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kolekcja Katedry Genetyki i Mikrobiologii, UMCS, Lublin, Polska	LB (pożywka 1), 37°C, 120 RPM
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	YPD (pożywka 2), 37°C, 120 RPM

### 3.3.3. Oznaczanie miana mikroorganizmów w zawiesinie

W celu sporządzenia zawiesiny mikroorganizmów o znanej liczbie żywych komórek w jednostce objętości, prowadzono spektrofotometryczny pomiar gęstości optycznej zawiesiny bakterii przy fali o długości  $\lambda=600$  nm wobec pożywki, w której namnażano mikroorganizmy.

Miano żywych komórek bakterii w zawiesinie o znanej gęstości optycznej, wyznaczano metodą posiewu powierzchniowego na podłoże stałe w oparciu o liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU). Przygotowano serię 10–krotnych rozcieńczeń zawiesiny bakterii. Po 100  $\mu$ l rozcieńczonej zawiesiny bakterii wysiewano na powierzchnię płytki Petriego z pożywką LB (pożywka 1) zestaloną 2% agarem. Płytki inkubowano w temperaturze wzrostu bakterii przez 24 godziny. Do odczytu wybierano płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których obserwowano policzalną liczbę kolonii. Miano bakterii (L) obliczano według poniższego wzoru.

$$L = \frac{N1+0,1N2}{C} \times d \times a$$

N1 – suma kolonii na płytach z pierwszego liczonego rozcieńczenia

N2 – suma kolonii z drugiego liczonego rozcieńczenia

C – liczba płytek, na których liczono kolonie

d – współczynnik najniższego liczonego rozcieńczenia

a – współczynnik posianej objętości, dla 100  $\mu$ l wynosi 10 (ponieważ wysiewano 1/10 objętości próbki)

Zawiesiny bakterii do poszczególnych doświadczeń wyznaczano w oparciu o pomiar gęstości optycznej, dla których ilość CFU została wcześniej określona.



### 3.3.4. Przygotowanie bakterii i zakażanie larw *Galleria mellonella*

Hodowlę bakterii prowadzono przez około 14 godzin do uzyskania gęstości optycznej ( $OD_{600} \approx 0,7$ ). Bakterie wirowano przez 7 minut przy 8 500 x g w celu osadzenia komórek bakteryjnych. Pożywkę LB (pożywka 1) usuwano, a bakterie zawieszano w 1 ml buforu PBS (bufor 1), tak aby uzyskać zawiesinę o gęstości optycznej  $OD_{600}=0,006$  lub  $OD_{600}=0,75$  (tj. odpowiednio  $10^3$  lub  $10^5$  CFU w 10  $\mu$ l). Bezpośrednio przed pobraniem do strzykawki zawiesiny bakteryjnej, była ona każdorazowo mieszana w celu utrzymania jednakowej liczby pobieranych komórek. Do zakażenia larw używano strzykawki Hamiltona o pojemności 25  $\mu$ l. Zależnie od szczepu bakterii używanych w doświadczeniach sposób zakażenia różnił się.

Zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *Pseudomonas. entomophila* prowadzono metodą tzw. przymusowego karmienia (ang. *force feeding*). Iglę strzykawki Hamiltona o pojemności 25  $\mu$ l, wprowadzano do otworu gębowego owada i podawano 10  $\mu$ l zawiesiny zawierającą  $10^3$  lub  $10^5$  komórek bakterii *P. entomophila* zawieszonych w buforze PBS (bufor 1). Larwom owadów z grupy porównawczej podawano sam bufor PBS. Czynność wykonywano bardzo ostrożnie, aby nie skaleczyć larw. Ponadto larwy, które zwracały podane do otworu gębowego bakterie lub sam PBS zostały wykluczone z doświadczenia.

W celu przygotowania mikroorganizmów niepatogennych do immunizacji larw, sporządzano tzw. „pastę bakteryjną” z bakterii *Escherichia coli* i *Micrococcus luteus*. Hodowle bakteryjne prowadzono przez około 12 godzin do uzyskania gęstości optycznej ( $OD_{600} \approx 0,7$ ). Następnie po 1000  $\mu$ l bakterii wirowano przez 8 minut przy 9 500 x g aby osadzić komórki, które następnie zawieszano w 500  $\mu$ l buforu PBS (bufor 1) i ponownie wirowano. Płyn odrzucano. Czynność powtarzano trzykrotnie. Po odpłukaniu z pożywki bakterie *E. coli* i *M. luteus* razem zawieszano 500  $\mu$ l buforu PBS (bufor 1) i ponownie wirowano. Po odrzuceniu płynu, otrzymaną „pastę bakteryjną” używano do immunizacji larw. W tym celu, końcówkę igły umieszczano w otrzymanej „paście” i nakłuwano larwę w przedostatnią posówkę.

Larwy owadów hodowano w plastikowych pojemnikach z dziurkowanymi pokrywkami zapewniającymi dostęp powietrza. Do pojemników wkładano jałowe papierowe krążki a następnie woszczyne. Pojemniki umieszczano w cieplarkach, w których utrzymywane były następujące warunki: temperatura 28°C, wilgotność

ok. 60–80% oraz całkowita ciemność. Zależnie od doświadczenia obserwowano przeżywalność larw, pozyskiwano hemolimfę lub izolowano ciało tłuszczowe i jelita.

### 3.3.5. Wyznaczanie krzywych przeżywalności larw *G. mellonella*

Wyznaczenie krzywych przeżywalności polegało na zliczaniu żywych larw owadów w obrębie grupy kontrolnej, którą stanowiły larwy zdrowe; grupy porównawczej, której podawano 10 µl PBS oraz grup doświadczalnych– larw owadów zakażanych tzw. niższą dawką bakterii *P. entomophila*  $10^3$  kom/10 µl zawiesiny, a także larw zakażanych *P. entomophila*  $10^5$  kom/10 µl zawiesiny, stanowiącą tzw. wyższą dawkę. Przeżywalność larw kontrolowano co 12 godzin. Za larwy martwe przyjmowano owady, które nie wykazywały oznak ruchu po zadaniu bodźca dotykowego. Uzyskane wyniki opracowane zostały za pomocą tzw. estymatora Kaplana–Meiera (Goel i in., 2010).

### 3.3.6. Pobieranie hemolimfy larw *G. mellonella*

Larwy *G. mellonella* bezpośrednio przed pobraniem hemolimfy znieczulano poprzez umieszczenie w płytce Petriego wypełnionej wodą o temperaturze 4°C i położoną na lodzie. Znieczulone larwy osuszano przy pomocy bibuły filtracyjnej. Miejsce ukłucia odkażano 70% alkoholem etylowym. Okolice przedostatniej posówki owadów nakłuwano delikatnie sterylnym skalpelem. Wypływającą z miejsca zranienia hemolimfę zbierano za pomocą mikropipety i przenoszono do probówki umieszczonej w lodzie, zawierającej niewielką ilość kryształków fenylotiomocznika (PTU) posiadającego właściwości przeciwmelanizacyjne. Zebraną hemolimfę wirowano przy sile odśrodkowej 200 x g w temperaturze 4°C przez 5 minut, celem osadzenia hemocytów bez ich destrukcji. Supernatant przenoszono do nowej probówki i wirowano przy 20000 x g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Uzyskany supernatant, który stanowiła hemolimfa wolna od elementów morfotycznych, przenoszono do nowych probówek i przechowywano w temperaturze –20°C. Z jednej larwy pobierano średnio 20 µl hemolimfy. W jednej puli znajdował się materiał pochodzący z 10 larw.

### 3.3.7. Oznaczanie stężenia białka

Do oznaczania stężenia białka w hemolimfie wykorzystano metodę Bradford (Bradford, 1976), która opiera się na zdolności do tworzenia kompleksów pomiędzy barwnikiem *Coomasie Brilliant Blue G*, a białkiem. Procesowi temu towarzyszy zmiana zabarwienia odczynnika z brunatnego na niebieskie i przesunięcie maksimum absorpcji z  $\lambda=465$  nm. do  $\lambda=595$  nm. Do oznaczenie stężenia białka hemolimfę rozcieńczano 400– krotnie ze względu na wysoką zawartość białka. Do kuwet nanoszono 800  $\mu$ l wody, 20  $\mu$ l badanego roztworu hemolimfy oraz 200  $\mu$ l odczynnika Bradford. W próbie ślepej, w miejsce badanego materiału dodawano wodę. Po dokładnym wymieszaniu, próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 8 minut, a następnie mierzono absorbancję przy  $\lambda=595$  nm. Stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej wykonanej z wykorzystaniem kolejnych rozcieńczeń albuminy surowicy wołowej (BSA), o znanym stężeniu. Wynik mnożono przez współczynnik rozcieńczenia badanej hemolimfy.

### 3.3.8. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy

Do oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy wykorzystano płytki Petriego z podłożem LB (pożywka 1) zestalonym agarom (0,7%) zawierającymi lizozym białka jaja kurzego EWL (ang. *Egg White Lysozyme*) w stężeniu 2,5 mg/ml, nasycony roztwór fenylotiomocznika (PTU, 1  $\mu$ l/ml), oraz nocną hodowlę *E. coli* D31 (1  $\mu$ l/ml) lub *P. entomophila* (1  $\mu$ l/ml), zależnie od oznaczenia. W oznaczeniu aktywności przeciw *E. coli* D31 do podłoża dodawano streptomycynę (0,15 mg/ml). Z wykorzystaniem filtra bakteriologicznego do gorącego podłoża dodawano rozpuszczony w wodzie lizozym (w celu zwiększenia czułości metody) oraz nasycony roztwór PTU, (zapobieganie procesowi melanizacji hemolimfy), a także streptomycynę (hamowanie wzrostu niepożądanych bakterii). Po ostudzeniu pożywki do temperatury 42°C dodano do niej 16– godzinną hodowlę *E. coli* D31, delikatnie mieszano i wylewano na płytki Petriego objętość 10 ml. W zastygniętym podłożu za pomocą wysterylizowanego korkoboru o średnicy 2,9 mm połączonego z pompką wodną, wycinano otwory, do których dodawano po 5  $\mu$ l hemolimfy pozbawionej hemocytów, zawierającej 40 mg/ml białka. Płytki z naniesionymi próbkami hemolimfy inkubowano w temperaturze 30°C w przypadku doświadczeń prowadzonych z wykorzystaniem *P. entomophila* lub 37°C

gdy do doświadczeń używano szczep *E. coli* D31. Następnego dnia mierzono przy pomocy suwmiarki średnicę strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół otworów. Uzyskane wartości przeliczano zgodnie z algorytmem wprowadzonym przez Hultmarka, na aktywność przeciwbakteryjną odpowiadającą danemu stężeniu cekropiny B (Hultmark, 1998). Wyniki opracowane zostały w oparciu o krzywe kalibracyjne wyznaczone indywidualnie dla każdego z badanych szczepów bakteryjnych, wykonaną na podstawie wielkości stref zahamowania wzrostu wokół otworów ze wzorcowymi stężeniami syntetycznej cekropiny B.

### **3.3.9. Otrzymywanie polipeptydów niskocząsteczkowych hemolimfy za pomocą metanolu**

Ekstrakcję polipeptydów za pomocą metanolu prowadzono z wykorzystaniem mieszaniny, zawierającej metanol, wodę i kwas octowy w stosunku 90:9:1. Do hemolimfy dodawano mieszaninę w stosunku 1:9 czyli do 10  $\mu$ l, 90  $\mu$ l mieszaniny Wytracone białka wysokocząsteczkowe osadzano poprzez wirowanie przy 20000 x g w temperaturze 4°C przez 30 minut. Supernatant, zawierający niskocząsteczkowe białka i peptydy, przenoszono do nowych próbek i liofilizowano w urządzeniu Liofilizator *Beta 1 – 8 LD plus* (Christ, Niemcy).

### **3.3.10. Elektroforeza trycynowa**

Elektroforeza trycynowa umożliwia rozdział polipeptydów o masie cząsteczkowej w granicach 3–20 kDa (Schagger i von Jagow, 1987). Materiałem nanoszonym na żel były ekstrahowane za pomocą metanolu, liofilizowane białka i peptydy lub frakcje białkowe po rozdziale HPLC. Liofilizaty otrzymane metodą opisaną w rozdziale 3.3.9. rozpuszczano w 4-krotnie rozcieńczonym buforze próbkowym do elektroforezy trycynowej (bufor 2). Bezpośrednio przed nanoszeniem próbek na żel, denaturowano je poprzez inkubację w 98°C przez 5 minut. Żele przygotowywano z wykorzystaniem zestawu firmy Bio-Rad (Stany Zjednoczone).

Do przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego ekstraktów metanolowych przygotowywano żele poliakrylamidowe o składzie:

żel separujący:

- 16% akrylamid
- 0,5% bisakrylamid
- 33,3% bufor do żelu (bufor 3)
- 10,7% glicerol
- 0,03% AMPS
- 0,03% TEMED

żel tzw. „spacer”:

- 6% akrylamid
- 0,2% bisakrylamid
- 33,4% bufor do żelu (bufor 3)
- 0,03% AMPS
- 0,04% TEMED

żel zagęszczający:

- 3,84% akrylamid
- 0,12% bisakrylamid
- 24,8% bufor do żelu (bufor 3)
- 0,08% AMPS
- 0,08% TEMED

Celem przeprowadzenia elektroforezy trycynowej frakcji białkowych zebranych podczas chromatografii HPLC, liofilizowane próbki otrzymanych frakcji rozpuszczano w 2 x rozcieńczonym buforze próbkowym do elektroforezy trycynowej SDS– PAGE (bufor 8), a na żel наносzono 1/3 objętości. Do

przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego frakcji peptydów  
przygotowywano żele poliakrylamidowe o składzie:

żel separujący:

- 9,65% akrylamid
- 0,6% bisakrylamid
- 1 M Tris-HCl, pH 8,45
- 11% glicerol
- 0,91% SDS
- 0,33% AMPS
- 0,05% TEMED

żel „spacer”:

- 9,69% akrylamid
- 0,3% bisakrylamid
- 1 M Tris-HCl, pH 8,45
- 0,1% SDS
- 0,03% AMPS
- 0,03% TEMED

żel zagęszczający:

- 2,48% akrylamid
- 0,08% bisakrylamid
- 0,48 M Tris-HCl, pH 8,45
- 0,05% SDS
- 0,078% AMPS

- 0,078% TEMED

Po umyciu i odłuszczeniu acetonem szklanych płytek, umieszczano je w statywie tak aby przekładki jednej, ściśle przylegały do drugiej. Między szkiełka wylewano na wysokość 5 cm warstwę żelu separującego, a następnie delikatnie wodę i pozostawiano do spolimeryzowania żelu. Warstwę wody znad żelu zlewano i wylewano na niego 1 cm warstwę żelu „spacer” i ponownie nanoszono wodę. Po spolimeryzowaniu „spacera” usuwano wodę i nanoszono roztwór żelu zagęszczającego, w którym umieszczano tzw. grzebień, celem stworzenia studzienek w spolimeryzowanej warstwie materiału. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie firmy Bio–Rad (Stany Zjednoczone) wypełnionym buforem katodowym (bufor 4) i anodowym (bufor 5) przez pierwszą godzinę przy napięciu 30 V, a później przy napięciu 90 V (elektroforeza ekstraktów metanolowych). W przypadku rozdziału elektroforetycznego poszczególnych frakcji uzyskanych po rozdziale HPLC prowadzono go początkowo przy napięciu 30 V (aż do całkowitego przejścia próbek przez warstwę zagęszczającą) następnie przy napięciu 50 V (gdy próbki znajdowały się w warstwie „spacer”), a ostatecznie przy napięciu 90 V. Masę cząsteczkową rozdzielonych białek szacowano względem białek markerowych *Polypeptide SDS–PAGE Molecular Weight Standards*. Po rozdziale, żel utrwalano w mieszaninie metanolu, wody i kwasu octowego w stosunku 5:4:1 przez 30 minut. Jako roztwór barwiący wykorzystano 0,025% *Coomasie Brilliant Blue G* w 10% kwasie octowym. Żele barwiono przez 1 godzinę, a następnie tło odbarwiano w 10% kwasie octowym do uzyskania ostrego obrazu przez około 30 minut. Uzyskany obraz archiwizowano za pomocą oprogramowania Image Lab Software. W przypadku elektroforezy trycynowej frakcji białkowych zebranych po chromatografii HPLC, masę cząsteczkową rozdzielonych białek oznaczano względem białek markerowych *Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards* a po skończonym rozdziale elektroforetycznym postępowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.16.

### 3.3.11. Elektroforeza glicynowa (SDS–PAGE)

Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w 13,8% żelu poliakrylamidowym (Laemmli, 1970). Do przeprowadzenia rozdziału białek stosowano żele poliakrylamidowe o składzie:

żel separujący:

- 13,8% akrylamid
- 0,46% bisakrylamid
- 0,38 M Tris–HCl pH 8,8
- 0,1% SDS
- 0,1% APS
- 0,1% TEMED

żel zagęszczający:

- 6,0% akrylamid
- 0,2% bisakrylamid
- 0,13 M Tris–HCl pH 6,8
- 0,1% SDS
- 0,1% APS
- 0,1% TEMED

Na żel nanoszono roztwór białka zawieszony w połowie objętości buforu próbkowego (bufor 6), a rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze elektrodowym (bufor 7) przy napięciu 100 V przez pierwsze 15 minut, a następnie przy napięciu 120 V. Masę cząsteczkową rozdzielonych białek szacowano względem białek markerowych *Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards*. W przypadku wybarwiania rozdzielonych białek, żel umieszczano na 30 minut w barwniku (40% metanol, 10% kwas octowy, 0,25% błękit *Coomassie R–250*), a następnie odbarwiano przez 24 godziny w 10% kwasie octowym. W celu utrwalenia



obrazu rozdzielonych białek wykonywano zdjęcie (ChemiDoc, BioRad). W przypadku badania aktywności przeciwbakteryjnej rozdzielonych polipeptydów, żelu nie barwiono, ale przeprowadzano tzw. bioautografię (rozdział 3.3.12).

### 3.3.12. Bioautografia

Metoda bioautografii polega na badaniu aktywności przeciwbakteryjnej białek hemolimfy po uprzednim rozdzieleniu w żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.11. Bezpośrednio po ukończeniu elektroforezy żel dwukrotnie płukano w 2,5% roztworze Tritonu X-100 przez 15 minut (aby usunąć SDS), następnie dwukrotnie, przez 15 minut w 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 oraz dwukrotnie przez 15 minut w płynnej pożywkę LB (pożywka 1). Świeżo przygotowaną pożywkę LB (pożywka 1) z 0,7% agarą poddano sterylizacji (121°C przez 15 minut przy 1 atm). Z wykorzystaniem filtru bakteriologicznego do gorącego podłoża dodano rozpuszczony w wodzie lizozym o stężeniu 2,5 mg/ml (zwiększenie czułości metody) oraz streptomycynę o stężeniu 0,15 mg/ml (hamowanie wzrostu niepożądanych bakterii). Po osiągnięciu przez pożywkę temperatury 42°C dodano do niej 16-godzinną hodowlę *E. coli* D31 (1 µl/ml), mieszano i zalewano żel 4,5 ml przygotowanej zawiesiny. Po zastygnięciu pożywki, żele inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, po czym analizowano strefy zahamowania wzrostu. W przypadku wykorzystania bakterii *P. entomophila* (1 µl/ml) wszystkie etapy wykonywano zgodnie z powyżej opisaną metodyką jednak do pożywki nie dodawano streptomycyny, a żel inkubowano w 30°C.

### 3.3.13. Zymografia

Metoda zymografii polega na detekcji białek o właściwościach proteolitycznych w badanym materiale po uprzednim rozdzieleniu próbek w żelu poliakrylamidowym zawierającym kazeinę. Rozdział elektroforetyczny prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.11. z różnicą w składzie żelu separującego tj. 10% akrylamid, 0,033% bisakrylamid i 2,5 mg/ml kazeiny. Na żel nanoszono badany materiał, zawieszony w połowie objętości buforu próbkowego (bufor 6), a rozdział

elektroforetyczny prowadzono w buforze elektrodowym (bufor 7) przy napięciu 90 V przez pierwsze 15 minut, a następnie przy napięciu 100 V. Następnie żel płukano w 2,5% roztworze Triton X-100 przez dwie godziny w celu usunięcia SDS, a później w 9 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 oraz 1 ml H<sub>2</sub>O. Kolejnego dnia żel umieszczano w roztworze 2% czerni amidowej w 10% kwasie octowym na godzinę i odbarwiano w 10% roztworze kwasu octowego do momentu pojawienia się przejaśnień świadczących o rozłożeniu kazeiny przez proteazy. Uzyskane obrazy archiwizowano wykonując zdjęcia za pomocą oprogramowania Image Lab Software.

### **3.3.14. Przygotowanie materiału do analiz chromatograficznych.**

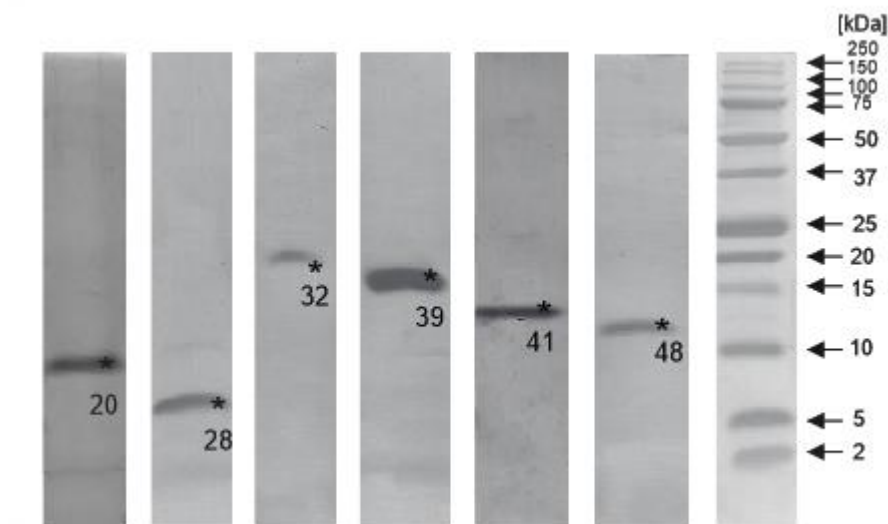
#### **Rozdział RP- HPLC (*reverse phase high-performance liquid chromatography*) białek niskocząsteczkowych i peptydów hemolimfy**

Białka niskocząsteczkowe i peptydy hemolimfy *G. mellonella* ekstrahowano przy użyciu metanolu (rozdział 3.3.9), liofilizowano, a następnie poddawano procedurze odtłuszczenia. Do liofilizatów dodawano 0,1% roztwór TFA w ilości 66,7 µl roztworu na każde 100 µl hemolimfy użytej do przygotowania liofilizatów (2/3 jej wyjściowej objętości). Ścianki próbówki, w której prowadzono liofilizację dokładnie płukano, a następnie łączono ich zawartość w obrębie grup doświadczalnych. Dodawano n-heksan w ilości 66,7 µl na każde 100 µl hemolimfy użytej do przygotowania próbki, mieszano i wirowano przy 20000 x g w temperaturze 4°C przez 15 minut. Górną frakcję, bogatą w tłuszcze ściągano i odrzucano, a do próbki dodawano octan etylu w ilości 66,7 µl na każde 100 µl hemolimfy użytej do przygotowania próbki. Po wymieszaniu i wirowaniu przy 20000 x g w temperaturze 4°C przez 15 minut górną warstwę usuwano. Równe objętości dolnej frakcji przenoszono do nowych próbek. Tak przygotowany materiał wstawiano na 24 godziny do -80°C a następnie liofilizowano w liofilizatorze *Beta 1-8 LD plus* (Christ, Niemcy). Liofilizaty przesyłano do Zakładu Biochemii Analitycznej (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie), do Profesora Pawła Maka, który wykonywał dalsze czynności związane z rozdziałem metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami- RP-HPLC (ang. *reverse phase high-performance liquid chromatography*). Rozdział przeprowadzano z wykorzystaniem kolumny *Discovery Bio*

*Wide Pore* C18. Do rozdziału wykorzystano dwa bufor, tj. A– 0,1% TFA(v/v) oraz B– 0,07% TFA, zawierający 80% acetonitryl (v/v) oraz gradient liniowy od 20% do 65% buforu B, jak opisano w pracy Kordaczuk i in., 2022. W wyniku rozdziału RP–HPLC każdej puli odtłuszczonych białek hemolimfy, w każdej z nich uzyskano 62 frakcje. Po nałożeniu chromatogramów, pola powierzchni poszczególnych pików obliczono przy użyciu programu Chromeleon (v7.2.10, Thermo Scientific). W wyniku analizy porównawczej uzyskanych chromatogramów z poszczególnych pul hemolimfy, wybrano frakcje do dalszych analiz. Frakcje te zostały zliofilizowane, a następnie dokonano analiz elektroforetycznych zawartych w nich białek (rozdział 3.3.10).

### **3.3.15. Oczyszczanie białek numer 20, 28, 32, 39, 41 i 48**

Źródłem białek była hemolimfa owadów immunizowanych *E. coli* i *M. luteus* (rozdział 3.3.4) zebrana 24 godziny po podaniu mikroorganizmów. Z hemolimfy wyekstrahowano następnie białka niskocząsteczkowe i peptydy przy użyciu metanolu (rozdział 3.3.9) i odtłuszczano metodą opisaną w rozdziale 3.3.14. Zliofilizowany i odtłuszczony materiał wysyłano do Zakładu Biochemii Analitycznej (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie), do Profesora Pawła Maka, celem oczyszczenia białek. Wstępny etap oczyszczania czyli frakcjonowanie niskocząsteczkowych białek i peptydów hemolimfy opisano powyżej (rozdział 3.3.14). W skrócie, białka oczyszczano pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami RP–HPLC. Wykorzystano analityczną kolumnę Discovery Bio Wide Pore o fazie typu C18 (Sigma), mieszaninę lotnych solwentów zawierających wodę, kwas trifluoroctowy, acetonitryl oraz detekcję spektrofotometryczną białek w ultrafiolecie przy długości fali 220 i 280 nm. Białka/peptydy numer 20, 28, 39, 41 i 48 oczyszczono na drodze dwóch zaś białko 32 za pomocą trzech kolejnych etapów, wykorzystujących liniowe gradienty stosowanych solwentów. Następnie frakcje zawierające poszczególne białka, zbierano ręcznie i odparowywano do sucha z użyciem wirówki próżniowej i rozpuszczano w ultra czystej wodzie. Obrazy elektroforetyczne oczyszczonych białek przedstawia rycina 10.



**Ryc. 10.** Rozdział elektroforetyczny białek/peptydów oczyszczonych z odtłuszczonych ekstraktów hemolimfy za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (ang. RP-HPLC). Numery poszczególnych peptydów odpowiadają numerom frakcji w których zostały zidentyfikowane.

### 3.3.16. Obrazowanie frakcji białkowych po rozdziale HPLC

Wybrane frakcje, uzyskane w wyniku rozdziału HPLC, poddawano tzw. elektroforezie trycynowej (rozdział 3.3.10.). Niewybarwiony żel uzyskany bezpośrednio po zakończeniu elektroforezy stabilizowano w buforze do elektrotransferu (bufor 9) przez 1 minutę. Membranę PVDF zanurzano na minutę w metanolu, a następnie płukano minutę wodzie. Otwartą pokrywę kasety umieszczono w naczyniu wypełnionym buforem do elektrotransferu (bufor 9) i przykryto gąbką, na której umieszczano kolejno dwie warstwy bibuły Whatman 3MM nawilżone buforem transferowym, na nich – żel, następnie membranę PVDF i ponownie 2 bibuły Whatman 3MM i gąbkę. Ramkę zamykano i umieszczono w aparacie z buforem do elektrotransferu (bufor 9) i jednostką chłodzącą. Tak przygotowany układ umieszczono na mieszadle magnetycznym. Transfer prowadzono przez 1,5 godziny przy napięciu stopniowo zwiększonym do około 90 V i 200 mA. Po skończonym elektrotransferze membranę umieszczano na minutę w wodzie na kołysce laboratoryjnej, a następnie wybarwiano przez 20 sekund w barwniku o składzie 0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 40% metanol i 1% kwas octowy. Membranę odbarwiano przez 15 minut w 50% metanolu wymienianym co 5 minut, a następnie przemywano ultra czystą wodą i suszono na powietrzu. Wykonano

zdjęcia uzyskanych obrazów i przeprowadzono pomiary intensywność prążków za pomocą Image Lab Software.

### 3.3.17. Przygotowanie próbek do sekwencjonowania metodą degradacji Edmana lub spektrometrii mas

Prążki, reprezentujące peptydy wytypowane do identyfikacji wycinano z membrany (rozdział 3.3.16) przy pomocy sterylnej skalpela i przenoszono do probówki Eppendrofa. Probówki zabezpieczano i wysyłano do Zakładu Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie przeprowadzano sekwencjonowanie prób metodą degradacji Edmana. Technika ta polega na kolejnym odszczepianiu reszt aminokwasowych od N–końca białka przy wykorzystaniu fenyloizotiocyanianu (PITC), zgodnie z procedurą opisaną w publikacji Edman, 1950. W przypadku prążków reprezentujących peptydy, których nie udało się zsekwencjonować techniką degradacji Edmana, zostały podane analizie metodą spektrometrii mas w laboratorium komercyjnym (Pracownia Proteomiki i Spektrometrii Mas, Małopolskie Centrum Biotechnologii UJ).

Ponieważ badania związane z rozdziałami HPLC białek hemolimfy oraz oczyszczaniem białek wykonywano we współpracy z Zakładem Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, dla pełnej klarowności, poniżej podano podsumowanie tych czynności.

**Tabela 5.** Podsumowanie i kolejność czynności związanych z rozdziałami polipeptydów hemolimfy oraz oczyszczaniem białek z uwzględnieniem miejsca wykonywania czynności. Numeracja jest ciągła i oznacza chronologię wykonywanych zadań.

<b>Katedra Immunobiologii UMCS (doktorant)</b>	<b>Zakład Biochemii Analitycznej UJ</b>
<b>Rozdzielanie białek niskocząsteczkowych hemolimfy</b>	
1. Zakażanie owadów i pozyskiwanie hemolimfy. Otrzymywanie ekstraktów metanolowych. 2. Odtłuszczenie ekstraktów metanolowych hemolimfy i liofilizacja.	

<p>4. Analiza chromatogramów i typowanie frakcji do kolejnych analiz.</p> <p>5. Analiza elektroforetyczna i densytometryczna składu białkowego poszczególnych frakcji. Wytypowanie i przygotowanie białek do sekwencjonowania</p>	<p>3. Rozdział RP–HPLC z analizą pola powierzchni poszczególnych pików białek.</p> <p>6. Sekwencjonowanie białek metodą degradacji Edmana</p>
<p><b>Oczyszczanie białek niskocząsteczkowych i peptydów</b></p>	
<p>1. Immunizacja owadów i pozyskiwanie hemolimfy.</p> <p>2. Otrzymywanie ekstraktów metanolowych hemolimfy.</p> <p>3. Odtłuszczenie ekstraktów i przygotowanie materiału do oczyszczania białek.</p> <p>5. Charakterystyka oczyszczonych białek i peptydów.</p>	<p>4. Oczyszczanie białek i analiza czystości preparatów.</p>

### 3.3.18. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej oczyszczonych polipeptydów

Całocną hodowlę badanych bakterii odświeżano przez 10–krotne rozcieńczenie w płynnym LB (pożywka 1) i inkubowano przez 2 godziny z wytrząsaniem 120 RPM i w temperaturze 30°C lub 37°C (w zależności od mikroorganizmu (tabela.4)). Przeprowadzono pomiar gęstości optycznej zawiesiny bakteryjnej, a następnie rozcieńczano ją w świeżej pożywce LB (pożywka 1) do  $OD_{600} = 0,02$ . Następnie,

20  $\mu\text{l}$  bakterii mieszano z badanym peptydem (próbka badana), w końcowym stężeniu podanym w opisie danego doświadczenia, lub z wodą jako próbą porównawczą, a następnie każdą z próbek rozdzielano na dwie, każda po 10  $\mu\text{l}$ . Jedną parę (próba porównawcza i badana) wysiewano od razu (czas 0), zaś drugą parę, inkubowano przez określony czas (od 30 minut do 120 minut) z wytrząsaniem 120 RPM i w temperaturze 30°C lub 37°C (w zależności od mikroorganizmu (tabela 4)), a następnie wysiewano.

Mieszaniny porównawcze i badane (czas 0 oraz o określonym czasie po inkubacji) rozcieńczano 100–krotnie (uzyskano stężenie  $10^{-2}$ ), a następnie wykonywano jeszcze dwa kolejne 10–krotne rozcieńczenia ( $10^{-3}$  i  $10^{-4}$ ). Następnie, 900  $\mu\text{l}$  każdego rozcieńczenia dodawano do 9 ml pożywki LB (pożywka 1) z 0,7% agarem schłodzonym do 40°C i wlewano na płytki Petriego. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C lub 37°C (w zależności od bakterii (tabela. 4)). Kolejnego dnia zliczano wyrosłe na płytkach kolonie bakteryjne. Wyniki przedstawiono jako procent, wyrosłych kolonii pochodzących z próbek inkubowanych z peptydem w stosunku do liczby wyrosłych kolonii pochodzących z próbek porównawczych inkubowanych bez peptydu w danym punkcie czasowym.

W celu zbadania innych właściwości peptydów metodę badania aktywności przeciwbakteryjnej modyfikowano w następujący sposób.

**Modyfikacja 1** miała na celu sprawdzenie czy możliwe jest bardzo szybkie działanie polipeptydu. W związku z tym zminimalizowano kontakt peptydu z bakteriami. Bezpośrednio po dodaniu peptydu (lub wody) do zawiesiny bakteryjnej sporządzono rozcieńczenie  $10^{-2}$  (jak opisano powyżej, dla czasu 0) po czym próbki wirowano 5 minut przy 8000 x g celem osadzenia bakterii i oddzielenia od roztworu peptydu. Uzyskany osad zawierający bakterie zawieszano w równej objętości świeżej pożywki LB (pożywka 1), a następnie wykonywano jeszcze dwa kolejne rozcieńczenia ( $10^{-3}$  i  $10^{-4}$ ) i wysiewano na płytki postępując zgodnie z metodą opisaną w pierwszej części rozdziału 3.3.18.

**Modyfikację 2** zastosowano celem sprawdzenia czy analizowany peptyd może działać po wysianiu na płytce. W tym celu zawiesinę bakterii o  $\text{OD}_{600} = 0,02$  inkubowano bez dodatku polipeptydu (ani wody) 60 minut zgodnie z procedurą opisaną w pierwszej części rozdziału 3.3.18, rozcieńczano  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  i wysiewano na płytki LB (pożywka 1) z 0,7% agarem oraz peptydem we wskazanym w doświadczeniach stężeniu. Porównywano liczbę wyrosłych kolonii na płytkach bez peptydu oraz zawierających peptyd.

**Modyfikację 3** wprowadzono aby sprawdzić czy peptyd ulega jakimkolwiek zmianom pod wpływem inkubacji z bakteriami. Próbkki porównawcze i badane inkubowano przez 60 minut zgodnie z procedurą opisaną w pierwszej części rozdziału 3.3.18, a następnie dwukrotnie wirowano 5 minut przy 8000 x g. Uzyskane supernatanty z próbek porównawczych i badanych sprawdzano na aktywność przeciwbakteryjną jak opisano w pierwszej części rozdziału 3.3.18.

### **3.3.19. Badanie aktywności przeciwwgrzybiczej oczyszczonych polipeptydów**

Nocną hodowlę *C. albicans* w płynnym YPD (pożywka 2) prowadzono przez 12 godzin przy obrotach 120 RPM i w temperaturze 37°C. Następnego dnia hodowlę odświeżano przez 10–krotne rozcieńczenie w płynnym YPD (pożywka 2) i hodowano przez kolejne 5 godzin z wytrząsaniem 120 RPM w temperaturze 37°C, tj. do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu. Zmierzone gęstość optyczną zawiesiny, a następnie rozcieńczano ją w świeżej pożywce YPD (pożywka 2) do OD<sub>600</sub>= 0,0025. Następnie 40 µl zawiesiny grzybów mieszano z 8 µl badanego peptydu (do uzyskania pożądanego stężenia peptydu) lub z 8 µl wody w przypadku próbki porównawczej. Każdą z próbek rozdzielano na 2 porcje. Jedną inkubowano w 37°C przez 60 minut, podczas gdy drugą część wysiewano bezpośrednio (czas 0). W celu posiewu, mieszaniny rozcieńczano 15 i 150 razy. Następnie 90 µl każdego rozcieńczenia dodawano do 9 ml pożywki YPD (pożywka 2) z 0,7% agarem schłodzonym do 40°C i wlewano na płytki Petriego. Wyniki przedstawiono jako procent CFU określany jako liczbę wyrosłych kolonii pochodzących z próbek inkubowanych z peptydem w stosunku do liczby wyrosłych kolonii pochodzących z próbek inkubowanych z wodą w danym punkcie czasowym.

### **3.3.20. Pobieranie ciała tłuszczowego i jelit larw barciaka większego.**

Larwy *G. mellonella*, z których izolowano ciało tłuszczowe i jelita, umieszczano w płytce Petriego wypełnionej wodą o temperaturze około 4°C i utrzymywanej na lodzie celem szybkiego schłodzenia i uśpienia owadów. Powierzchnię ciała owadów dezynfekowano przy użyciu 70% alkoholu etylowego a następnie, za pomocą nożyczek



odcinano głowę i ostatni segment odwłoka. Larwy rozcinano wzdłuż powierzchni brzusznej. Warstwę oskórkowo-mięśniową rozpinano przy pomocy szpilek na płytce z silikonem Sylgarda, wypełnionej schłodzonym buforem Ringera (bufor 10). Narządy wewnątrz przepłukiwano kilkakrotnie tym samym buforem (bufor 10). Do probówki Eppendorfa zawierającej schłodzony bufor Ringera (bufor 10) zbierano przy pomocy sterylnej pęsety ciało tłuszczowe lub jelito. Bufor Ringera (bufor 10) odciągano przy pomocy pipety automatycznej. Probówkę z pobranymi organami przeznaczoną do izolacji RNA zgodnie z metodą opisaną w rozdziale 3.3.21 umieszczano w ciekłym azocie ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) na 10 minut a następnie wyjmowano i przechowywano w zamrażarce utrzymującej temperaturę  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ciało tłuszczowe i jelita pobierano z 5 larw w każdej badanej grupie. Próbkę z jelitami przeznaczą do wykonania preparatów histologicznych umieszczano w 10% roztworze zbuforowanej formaliny celem ich utrwalenia, a następnie postępowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.27.

### **3.3.21. Izolacja RNA z ciała tłuszczowego i jelita**

Do izolacji RNA używano zestawu firmy Sigma (ang. *GenElute Mammalian Total RNA Extraction Kit*). Procedurę izolacji wykonywano zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. W pierwszym etapie ciała tłuszczowe/jelita dezintegrowano w buforze lizującym przy użyciu dezintegratora elektrycznego (ang. *Pellet Pestle® mixer*) i przesączano przez kolumnienki wirując  $20000 \times g$  przez 2 minuty. Do przesączu dodawano równą objętość 70% etanolu, mieszano a następnie przenoszono do kolumnienek ze złożem wiążącym RNA, które wirowano  $20000 \times g$  przez 1 minutę. Przesącz odrzucano, a kolumnę przemywano trzykrotnie roztworami płuczącymi. Kolumnienki przenoszono do nowych probówek Eppendorfa nanoszono na nie roztwór eluujący i wirowano 1 minutę przy  $20000 \times g$ . Ze względu na możliwość występowania fragmentów DNA w próbkach z przesączem zawierającym całkowite RNA, uzyskany materiał oczyszczano za pomocą zestawu TURBO DNA-free™ (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Próbki inkubowano z DNazą i buforem komercyjnym w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 30 minut. Następnie dodawano składnik inaktywujący i inkubowano próbki w temperaturze pokojowej przez 5 minut mieszając je co minutę. Składnik inaktywujący DNazę osadzano poprzez wirowanie próbek  $20000 \times g$  przez 1,5 minuty. Znad osadu zbierano supernatant,

w którym oznaczano stężenie RNA poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i współczynnika konwersji: 1,0=40,0 µg/ml. Do oceny czystości RNA dokonywano pomiaru stosunku absorbancji przy długości fal 260 i 280 nm.

### **3.3.22. Odwrotna transkrypcja i reakcja PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (tzw. Real-Time PCR)**

Proces odwrotnej transkrypcji prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził 1 µg RNA wyizolowanego metodą opisaną w rozdziale 3.3.21., a także trójfosforany nukleotydów (dNTP), uniwersalne startery (ang. *Random Primers*), odwrotna transkryptaza, inhibitor RNaz, oraz bufor według protokołu producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w następujących warunkach:

- Aktywacja odwrotnej transkryptazy w 25°C przez 10 minut.
- Reakcja syntezy cDNA w 37°C przez 120 minut.
- Inaktywacja odwrotnej transkryptazy w 85°C przez 5 minut.

Uzyskany materiał przechowywano w temperaturze -20°C i później używano do przeprowadzenia reakcji PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym, wykorzystując system *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific). W reakcji stosowano barwnik *SYBR® Green*, który wykazywał zdolność do fluorescencji po związaniu do dwuniciowego DNA. Poziom emitowanego sygnału był wprost proporcjonalny do ilości otrzymanego produktu (dsDNA).

Reakcję qRT-PCR prowadzono w objętości 10 µl z wykorzystaniem zestawu *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), zawierającego niezbędne składniki reakcji, do których dodawano określoną parą starterów w stężeniu 50 nM każdy oraz 2,5 µl matrycy, którą stanowiło 100-krotnie rozcieńczone cDNA.

Warunki prowadzonej reakcji:

- aktywacja polimerazy przez 95°C przez 10 minut

- 40 cykli składających się z naprzemiennie powtarzających etapów: denaturacja– 95°C przez 15 sekund oraz wiązanie starterów i elongacja– 60°C przez 1 minutę i odczyt.

Do reakcji PCR zaprojektowano i wykorzystano startery dla poszczególnych genów, które zamieszczono w tabeli 5. Krzywe wydajności wykonano przy użyciu serii rozcieńczeń cDNA, uzyskanego z RNA pochodzącego z ciała tłuszczowego zakażonych, porównawczych i kontrolnych larw. Wydajność reakcji dla wszystkich par starterów wynosiła powyżej 90%. Wszystkie startery dawały pojedyncze produkty o długości 131 par zasad.

Relatywny poziom ekspresji badanych genów normalizowano względem genu odniesienia (gen kodujący białko rybosomalne S7e, którego ilość pozostaje na tym samym poziomie niezależnie od warunków). Ekspresję badanego genu względem referencyjnego obliczano z uwzględnieniem wydajności reakcji (Pfaffl, 2001, równanie 3). Wyniki stanowiła relatywna wartość ekspresji genu w badanej próbce względem ekspresji tego genu w próbce kontrolnej.

**Tabela 6.** Sekwencje starterów użytych do qRT–PCR.

Starter	Sekwencja 5'→3' (forward)	Sekwencja 5'→3' (reverse)
S7e	ATGTGCCAATGCCCAAGTTG	GTGGCTAGGCTTGGAAGAAT
Cekropina	ATTTGCCTGCATCGTAGCG	CTTGTACTGCTGGACCAGCTTTT
Gallerimycyna	TATCATTGGCCTTCTTGGCTG	GCACTCGTAAAATACACATCCGG
Galiomycyna	TCGTATCGTCACCGCAAATG	GCCGCAATGACCACCTTTATA
IMPI	TCCTCCAGAAACCTGTATCTCCC	CGCAAATTGGTATGCATGGTG
Hemolina	CCCGAAGACGCTGGTGAATA	CGCACGTTCAATTGCTGTTC
Lizozym I	CGGAAAGGTGGCAAATGC	CATCTGGCTTCCCAGTTGGA
20– GmCP8	TAGTTGCCGTTACCGTCTGT	GGGTGTTTCTCCCAGTTCCTT
28– Peptyd prolinowy I	GAGAAGCGGACGAGCCTCTT	GCGCGCGTATCTTCTATTCTG
29– Niescharakteryzowane białko LOC113510237	GAGGAGCCGAAGCCAGTTAA	TTCTGCGGGCATTCTTCAAG
32– Niescharakteryzowane białko LOC113509844	GCGGTGTTGATGTCGCATTA	AGAGCGCATGCAAGCTTGTA
39– Lizozym 2	GTGCACGGTTCCTCTTTAAAT	GTGACACCATCACGAGTGCAA
41– Odorant binding protein 7	CCCTTGCCGTGACGTACAG	AGCACTCGACCAATCCTTGTG
45– Defensyna	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	GCAGGCGAAGAAGACGAAGA

48– Ejaculatory bulb– specific protein 3–like isoform X1	TGCGTACATTGCGAGATGAAG	GCTCGGGTACGTTGACAATCA
--	-----------------------	-----------------------

### 3.3.23. Metoda „*Replica plating*”

Aby sprawdzić czy działanie peptydu na bakterie ma charakter cytotoksyczny czy cytostatyczny wykonano „*Replica plating*” – przenoszenie kolonii bakteryjnych z pierwszej płytki (zawierającej peptyd) na drugą (niezawierającą peptydu). Bakterie z płytki zawierającej peptyd (przygotowane według metody opisanej w podrozdziale modyfikacja 3 rozdziału 3.3.18) „przeniesiono” na płytkę bez peptydu. Do płytki wyjściowej przykładano jałową bibułę filtracyjną i delikatnie dociskano przez 30 sekund. Następnie bibułę przenoszono na drugą płytkę Petriego z pożywką LB (pożywka 1) z 0,7% agarem i odpowiednią stroną dociskano ponownie. Porównano liczbę wyrosłych kolonii na płytkach bez peptydu oraz zawierających peptyd. Jeśli na płytce z peptydem znajdowały się komórki, które w wyniku cytostatycznego działania peptydu nie tworzyły kolonii, powinny one pojawić się na drugiej płytce.

### 3.3.24. Badanie perforacji błon bakteryjnych

Badanie zdolności do perforacji błon przez peptyd GmCP8 zostało wykonane przy użyciu szczepu *E. coli* JM83 z wbudowanym plazmidem pCH110 kodującym  $\beta$ –galaktozydazę (Pharmacia–Amersham). W przypadku przerwania ciągłości błony komórkowej dochodzi do uwalniania z komórek bakterii  $\beta$ –galaktozydazy i zajścia reakcji z substratem enzymu dodanym do mieszaniny inkubacyjnej, w wyniku której powstaje barwny produkt

Nocną hodowlę *E. coli* JM83 prowadzono w pożywce LB (pożywka 1) przez 12 godzin z wytrząsaniem 120 RPM i w temperaturze 37°C. Następnego dnia hodowlę odświeżano przez 10–krotne rozcieńczenie w pożywce LB (pożywka 1) i inkubowano przez 5 godzin z wytrząsaniem 120 RPM w temperaturze 37°C. Peptyd wstępnie inkubowano przez 15 minut w 37°C w 20 mM buforze fosforanowym pH 6,8 (bufor 11). Następnie 2  $\mu$ l zawiesiny komórek *E. coli* JM83 w fazie logarytmicznej ( $5 \times 10^5$  CFU) zawieszonych w tym samym buforze (bufor 11) dodano do 23  $\mu$ l roztworu GmCP8.

Stężenie końcowe GmCP8 wynosiło 7  $\mu\text{M}$  lub 14  $\mu\text{M}$ . Po 45 minutach inkubacji w 37°C do mieszaniny dodano 220  $\mu\text{l}$  20 mM buforu HEPES pH 7,5 zawierającego 150 mM NaCl (bufor 12) i 5  $\mu\text{l}$  50 mM roztworu p-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (substrat dla  $\beta$ -galaktozydazy). Próbki inkubowano przez 90 minut w 37°C i mierzono absorbancję przy 405 nm. Jako kontrolę negatywną (perforacja 0%) zastosowano żywe bakterie inkubowane z wodą, a jako kontrolę pozytywną (100% perforacji) posłużyły martwe bakterie zabite 5  $\mu\text{M}$  syntetyczną cekropiną B (Sigma-Aldrich).

### 3.3.25. Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Próbki bakteryjne lub grzybicze przygotowano do mikroskopii sił atomowych zgodnie z protokołem opisanym w publikacjach Zdybicka-Barabas i in., 2012 oraz Zdybicka-Barabas i in., 2013.

Całoczną hodowlę każdej bakterii odświeżano przez 10-krotne rozcieńczenie w płynnym LB (pożywka 1). W przypadku nocnej hodowli *C. albicans* hodowlę odnawiano przez 10-krotne rozcieńczenie w płynnym YPD (pożywka 2). Mikroorganizmy inkubowano przez 2 godziny z wytrząsaniem 120 RPM i w temperaturze 30°C lub 37°C (w zależności od mikroorganizmu (tabela 4)). Przeprowadzano pomiar gęstości optycznej, a następnie bakterie zawieszano w świeżej pożywce LB (pożywka 1) do  $\text{OD}_{600} = 0,02$  dla *P. entomophila* i *B. thuringiensis* lub pożywce YPD (pożywka 2) do  $\text{OD}_{600} = 0,0025$  dla *C. albicans*. Pobierano 250  $\mu\text{l}$  zawiesiny mikroorganizmów, mieszano z 50  $\mu\text{l}$  oczyszczonego peptydu o końcowym stężeniu 7  $\mu\text{M}$  lub wodą w przypadku grupy porównawczej i inkubowano przez 1 godzinę w 30°C lub 37°C (w zależności od mikroorganizmu (tabela 4)), z wytrząsaniem 120 RPM. Następnie do zawiesiny mikroorganizmów dodano 300  $\mu\text{l}$  20 mM buforu fosforanowego, pH 6,8 (bufor 11) i drobnoustroje osadzano przy 8000 x g przez 10 minut w 4°C. Osady dwukrotnie delikatnie przemywano 20 mM buforem fosforanowym o pH 6,8 (bufor 11), a następnie dwukrotnie wodą apyrogeną. Przygotowywano małe szalki, na których kładziono uprzednio zdezynfekowane i wysterylizowane krążki metalowe. Odklejało się płytkę węglanową i przyklejało do metalowego krążka a następnie usuwano zewnętrzną warstwę folii odsłaniając klej. Krążek *mica* pobierano pęsetą, rozwarstwiano i przyklejało do płytki węglanowej od jego zewnętrznej warstwy. Mikroorganizmy zawieszono w 10  $\mu\text{l}$  apyrogennej wody i nakładano na powierzchnię

świeżo przygotowanych krążków *mica*. Preparaty pozostawiano do wyschnięcia przez noc w 28°C przed obrazowaniem. Powierzchnię komórek *P. entomophila*, *B. thuringiensis* i *C. albicans* zobrazowano za pomocą aparatu NanoScope V AFM (Veeco, USA) w Laboratorium Analitycznym Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Pomiary prowadzono w trybie pracy „Peak Force QMN” z użyciem silikonowej końcówki o stałej sprężystości 0,4 Nm<sup>-1</sup> (NSG 30, NT-MDT, Moskwa, Rosja). Wyniki zostały przetworzone za pomocą Nanoscope Analysis v1.40 (Veeco). Zobrazowano trzy pola na każdym preparacie. Wartości chropowatości RMS (ang. *root mean square*) i wartości siły adhezji obliczono ze 114 pól o powierzchni odpowiednio 115 nm x 115 nm lub 103 nm x 103 nm, mierzonych na całej powierzchni komórki drobnoustroju w polu 500 nm x 500 nm dla *P. entomophila* i 1 μm x 1 μm dla *B. thuringiensis* i *C. albicans*. Profile przekrojów i trójwymiarowe obrazy komórek (3D) wygenerowano przy użyciu oprogramowania WSxW 5.0 (Nanotec, Hiszpania) (Horcas i in., 2007).

### **3.3.26. Oznaczanie aktywności proteolitycznej w płynie pochodzonym**

Całoczną hodowlę bakterii *P. entomophila* odświeżano przez 10-krotne rozcieńczenie w płynnym LB (pożywka 1) i inkubowano przez 2 godziny przy wytrząsaniu 120 RPM i w temperaturze 30°C. Zawiesinę bakterii (200 μl) wirowano 5 minut przy 8000 x g i zebrano supernatant. Oznaczano stężenie białka i sprawdzano aktywność proteolityczną w płynie pochodzonym. Do 4 μl płynu pochodzającego dodano 1 μl H<sub>2</sub>O. Pozytywną kontrolę stanowiło 4 μl roztworu termolizyny (1 pmol) w buforze octanowym do której dodano 1 μl wody (bufor 13). Następnie dodawano równą objętość roztworu azokazeiny (5 mg/ml w wodzie) i inkubowano przez 1 godzinę w 30°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 μl 5% kwasu trichlorooctowego (TCA), a następnie inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano przy 14000 x g przez 5 minut, aby pozbyć się niestrawionej azokazeiny. Do 18 μl supernatantu dodano 9 μl 5% NaOH. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm wobec ślepej próbki na 96-dołkowych przezroczystych mikroplótkach typu Half Area za pomocą czytnika mikroplótek Benchmark Plus (BioRad). Za jednostkę aktywności (U) uznano zmianę wartości absorbancji o 0,02 nm.

### 3.3.27. Sporządzanie preparatów histologicznych

Wykonanie preparatów histologicznych przekrojów poprzecznych jelit larw *G. mellonella* było możliwe dzięki współpracy z dr hab. Moniką Hułas-Stasiak z Katedry Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii (Instytut Nauk Biologicznych UMCS). Z materiału wypreparowanego i utrwalonego zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.20, wycinano część środkową jelita i płukano pod bieżącą wodą, a następnie odwadniano w szeregu roztworów alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (50–99,9%). Odwodniony materiał zanurzano w ksylenie (tzw. prześwietlanie), wysycano mieszaniną ksylenu i paraplastu® w stosunku 1:1, a następnie na dwie godziny umieszczano w samym paraplastie. Materiał zatopiony w bloczkach krojono przy pomocy mikrotomu rotacyjnego na skrawki o grubości 6 µm i naklejało na poli L–lizynowe szkiełka podstawowe (Superfrost, Niemcy). Preparat umieszczano na jedną minutę w wodzie destylowanej i kolejno na 3 minuty hematoksylinie i na 2 sekundy 0,1% kwasie solnym. Następnie preparat płukano pod bieżącą wodą i przez 3 minuty w 0,5% roztworze alkoholowym eozyny. Tak przygotowany preparat ponownie odwadniano i zaklejało szkiełkami nakrywkowymi, używając medium DPX. Obraz analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Carl Zeiss Axiovert 200M (Niemcy).

### 3.3.28. Metody statystyczne

Analizy statystyczne uzyskanych wyników wykonano za pomocą oprogramowania SigmaStat 4.0. Do analizy istotności statystycznej różnic w przeżywalności poszczególnych grup larw użyto testu log–rank (Goel i in., 2010). Normalność rozkładu danych sprawdzono z wykorzystaniem testu Shapiro–Wilka. Analizę różnic pomiędzy dwoma grupami wykonano przy użyciu Testu–t lub Mann–Whitney Rank Sum Test. Do analizy statystycznej wyników doświadczeń, w których liczba grup była większa niż dwie, użyto testów One Way ANOVA oraz Kruskal–Wallis One Way ANOVA oraz testu post–hoc Tukey. Poziom istotności ustalano dla  $p < 0,05$ . Poszczególne doświadczenia były wykonywane co najmniej w trzech powtórzeniach.

## 4. Analiza wyników

### 4.1. Interakcja *G. mellonella* z jej naturalnym patogenem–bakterią *P. entomophila*

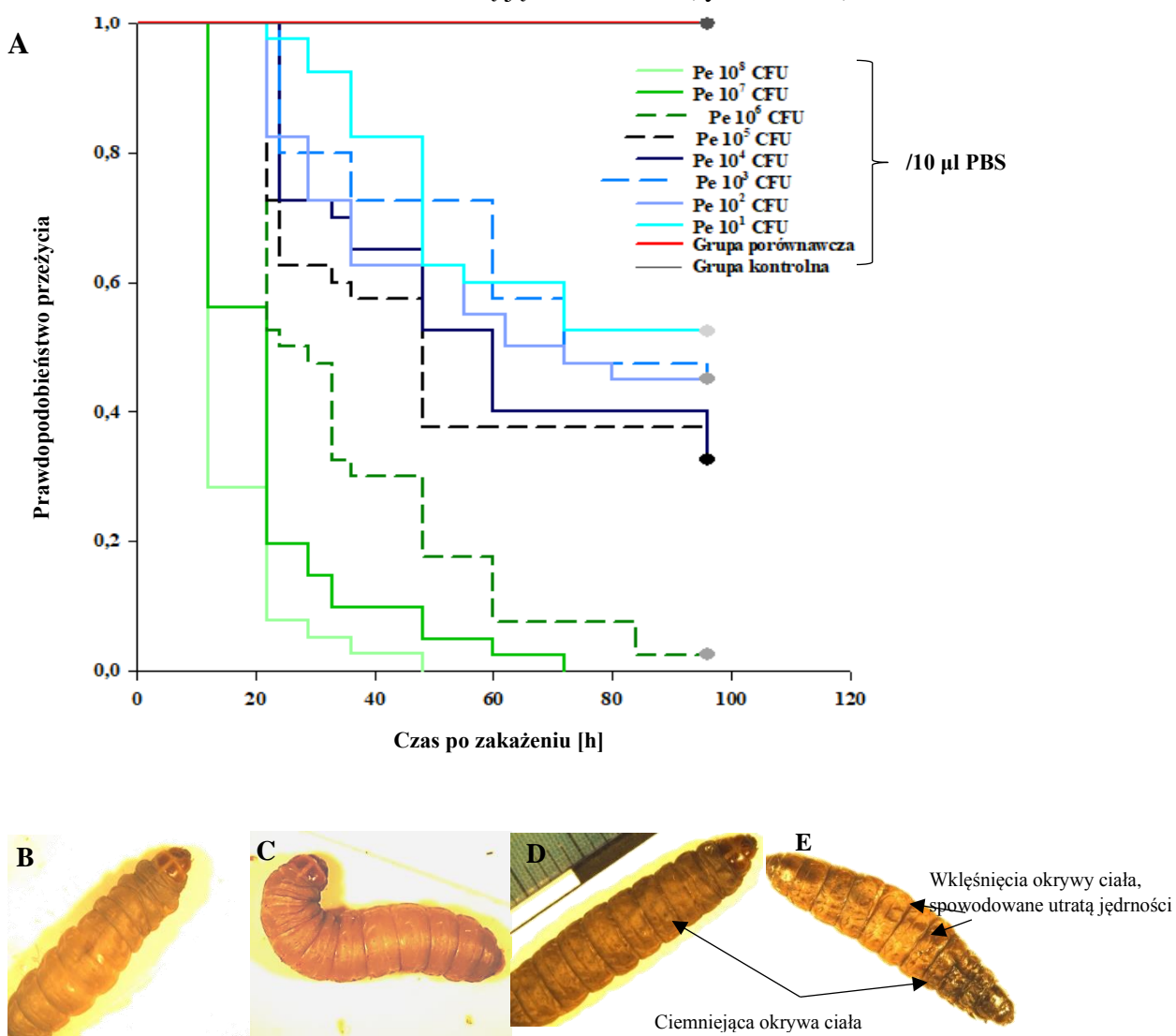
#### 4.1.1. Przebieg infekcji po zakażeniu larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* poprzez tzw. infekcję naturalną. Zmiany morfologiczne zakażonych larw

*Pseudomonas entomophila* zakaża owady, przenikając do ich organizmów drogą pokarmową. Stosowany w omawianych badaniach sposób infekcji, tj. podawanie bakterii drogą pokarmową– tzw. *force feeding* (rozdział 3.3.4), pozwolił na imitację procesu infekcyjnego zachodzącego w środowisku naturalnym. W pierwszym etapie badań sprawdzono przeżywalność larw *Galleria mellonella* po podaniu różnych ilości bakterii w objętości 10  $\mu$ l PBS (grupy badane). Grupę kontrolną stanowiły larwy zdrowe, zaś grupę porównawczą larwy którym podawano 10  $\mu$ l buforu PBS (ryc. 11 A). Przeżywalność owadów zmniejszała się wraz ze wzrostem dawki bakterii, którymi zakażano larwy. Podanie najwyższych spośród stosowanych dawek bakterii tj. *P. entomophila*  $10^8$  i  $10^7$  prowadziło do zabicia połowy spośród wszystkich owadów w grupie, odpowiednio po około 12 i 20 godzinach. W przypadku larw zakażonych dawką *P. entomophila*  $10^6$ , 50% śmiertelności obserwowano po około 28 godzinach po zakażeniu owadów. Dla kolejnych grup zakażonych bakteriami *P. entomophila* tj.  $10^5$  i  $10^4$ , 50% śmiertelności obserwowano odpowiednio po około 48 i 60 godzinach. W przypadku trzech najniższych dawek bakterii tj.  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  krzywe przeżywalności wyglądały podobnie, a 50% przeżywalności obserwowano około 72 godziny od podania larwom bakterii *P. entomophila*. Warto zaznaczyć, że dawki *P. entomophila*  $10^8$  i  $10^7$  finalnie powodowały śmierć wszystkich zakażonych owadów, zaś po podaniu dawek *P. entomophila*  $10^6$  przeżywało 3%, zakażenie dawką *P. entomophila*  $10^5$  i  $10^4$  prowadziło do przeżycia odpowiednio 40% i 35% owadów, zaś karmienie dawką *P. entomophila*  $10^2$  i  $10^1$  prowadziło do przeżycia odpowiednio 45% i 55% zakażonych larw (Ryc. 11. A). Biorąc pod uwagę, dawkę bakterii powodującą śmierć połowy larw w obrębie poszczególnych grup badawczych, z uwzględnieniem czasu jaki musi upłynąć do rozwoju odpowiedzi immunologicznej larw, a także możliwość pobrania tkanek larw w poszczególnych punktach czasowych, do dalszych badań wybrano dwie



dawki zakaźne–*P. entomophila*  $10^3$  kom/10  $\mu$ l, która na potrzeby niniejszej pracy została nazwana **niższą dawką** bakterii oraz *P. entomophila*  $10^5$  CFU/10  $\mu$ l zawiesiny stanowiącą tzw. **wyższą dawkę**.

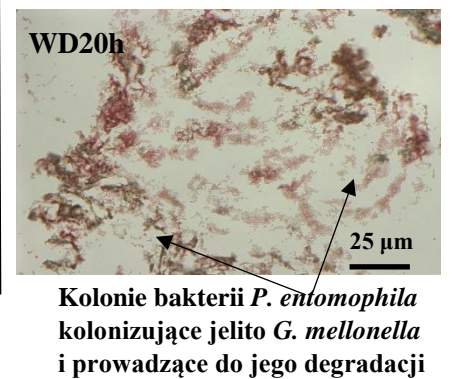
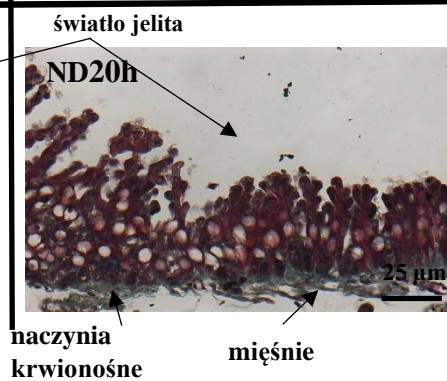
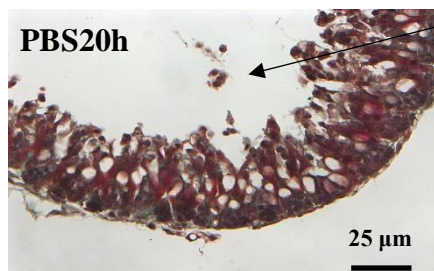
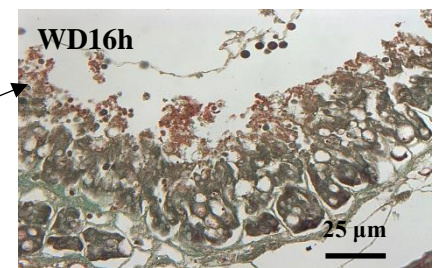
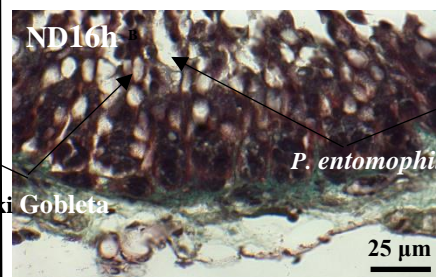
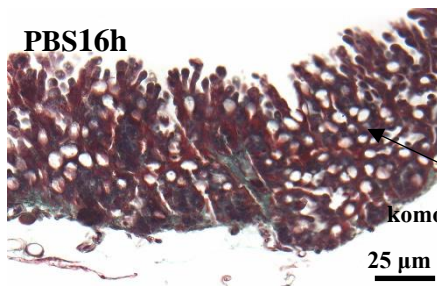
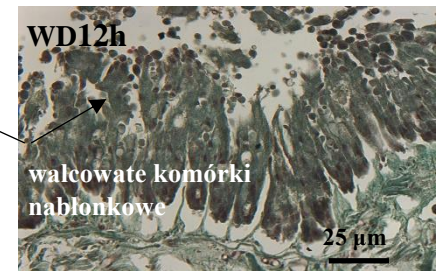
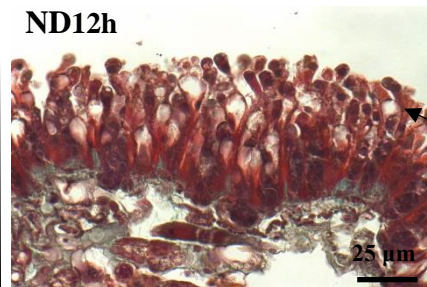
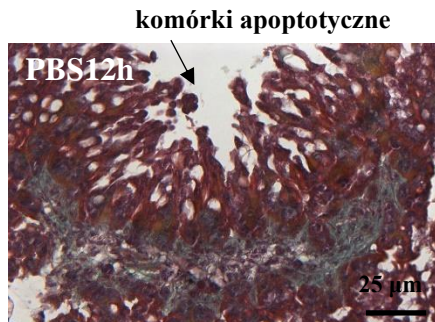
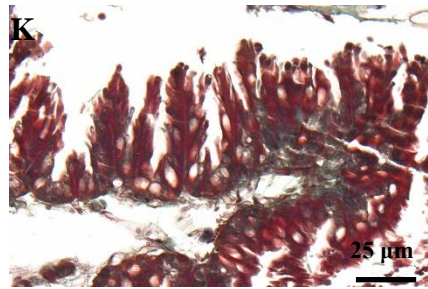
Analiza morfologiczna owadów (ryc. 11 B–E) wykazała, że larwy zakażone niższą dawką bakterii charakteryzowały się nieco niższymi zdolnościami motorycznymi względem larw z grupy kontrolnej i porównawczej, a także lepszą kondycją ruchową względem larw zakażonych wyższą dawką bakterii. Wraz z upływem czasu od zakażenia, zaobserwowano ciemnienie oskórka i utratę jędrności larw (ryc. 11 C–D).



**Ryc. 11.** A– Krzywe przeżywalności Kaplana–Meiera larw *G. mellonella* po zakażeniu bakteriami *P. entomophila* drogą pokarmową. B– Morfologia larw kontrolnych, C– Morfologia po podaniu PBS oraz D– Morfologia larw zakażonych niższą dawką bakterii– *P. entomophila*  $10^3$  kom/10  $\mu$ l zawiesiny a także E– Morfologia larw zakażonych wyższą dawką bakterii– *P. entomophila*  $10^5$  kom/10  $\mu$ l zawiesiny po 32 godzinach od podania PBS lub bakterii.

W celu prześledzenia zmian zachodzących w ciele zakażonego owada, wykonano preparaty histologiczne przekrojów poprzecznych jelit po 12, 16 i 20 godzinach od podania bakterii. Uzyskane obrazy analizowano odnosząc się do zdjęć uzyskanych z preparatów sporządzonych z larw należących do grupy porównawczej (którym podawano PBS), oraz owadów kontrolnych (bez podawania czegokolwiek). Po 12 godzinach od podania bakterii obraz jelit larw zakażonych niższą dawką (ryc. 12 ND12h) nie różnił się znacznie od obrazu jelit larw z grupy porównawczej (ryc. 12 PBS12h) i kontrolnej (ryc. 12 K). W przypadku obrazów jelit pochodzących z larw zakażonych wyższą dawką *P. entomophila*, zaobserwowano zgrupowania komórek bakterii usytuowane w jego świetle. Bakterie „oblepiały” walcowate komórki nabłonkowe (ryc. 12 WD12h). Po 16 godzinach w jelitach larw zakażonych wyższą dawką bakterii obserwowano postępującą destrukcję komórek walcowatych (ryc. 12 WD16h). Po 16 godzinach od zakażenia entomopatogenem w jelitach larw zakażonych niższą dawką bakterii zaobserwowano występowanie pojedynczych komórek bakteryjnych migrujących przez kolejne warstwy komórek walcowatych (ryc. 12 ND16h). Bakterie kolonizowały także komórki Gobleta, które wydawały się być nieco bardziej zaokrąglone (ryc. 12 ND16h) względem tych samych komórek larw z grupy kontrolnej i porównawczej (ryc. K, PBS16h). 20 godzin po infekcji w grupie larw zakażonych niższą dawką *P. entomophila* zidentyfikowano komórki bakteryjne poza światłem jelita, tj. w przylegających tkankach: mięśniach otaczających jelito i naczyniach krwionośnych owadów (ryc. 12 ND20h). Jelita nie uległy jednak całkowitemu zniszczeniu. W przypadku grupy owadów zakażonych wyższą dawką bakterii, zaobserwowano silną destrukcję komórek budujących jelito i rozsiane poza jego obręb liczne kolonie bakterii *P. entomophila* (ryc. 12 WD20h). Ponadto obrazy jelit pochodzące z larw zakażonych zarówno niższą (ryc. 12 ND12h, ND16h ND20h) jak i wyższą dawką (ryc. 12 WD12h, WD16h WD20h) charakteryzowały się zmniejszoną liczbą komórek apoptotycznych w świetle jelita larw, względem obrazów pochodzących z grupy porównawczej (ryc. 12 PBS12h, PBS16h, PBS20h) i kontrolnej (ryc. 12 K). Najpewniej komórki apoptotyczne stanowiły pierwszy napotkany pokarm bakterii, które dostawały się do organizmu przez jelito. Bakterie migrowały przez ściany jelit owada, a następnie kolonizowały jego tkanki i narządy.

Grupa kontrolna

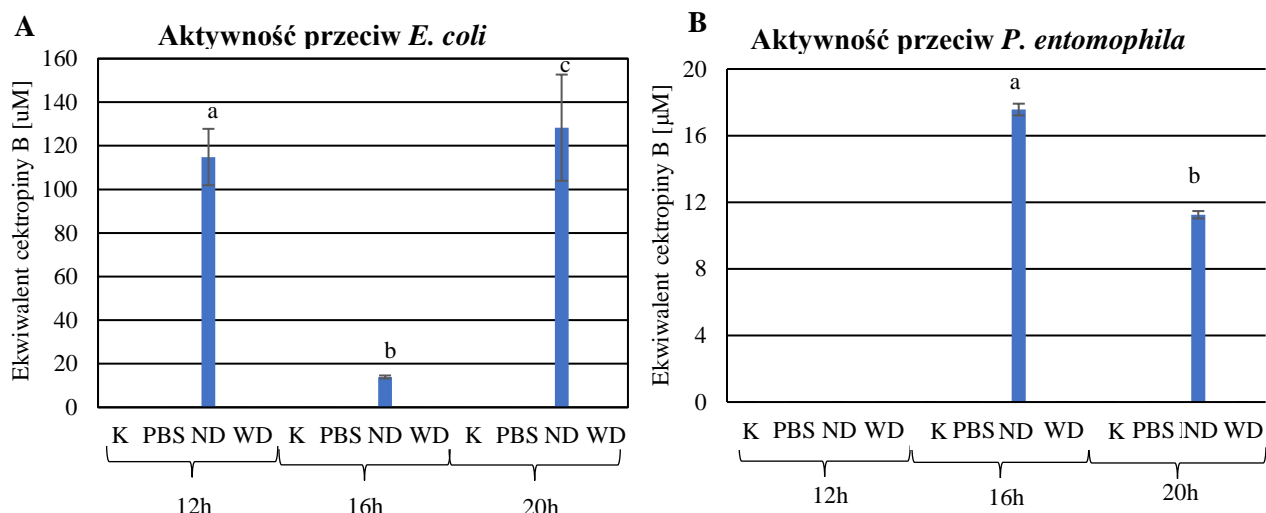


**Ryc. 12.** Preparaty histologiczne przekrojów poprzecznych jelita larw *G. mellonella*, widziane pod mikroskopem konfokalnym; **K**– grupa kontrolna , **PBS**– grupa porównawcza, której podawano 10 μl PBS; **ND**– grupa zakażona niższą dawką bakterii– *P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10 μl zawiesiny **WD**– grupa zakażona wyższą dawką bakterii– *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10 μl zawiesiny; **12h**– materiał zbierany po 12 godzinach od zakażenia, **16h**– materiał zbierany po 16 godzinach od zakażenia, **20h**– materiał zbierany po 20 godzinach od zakażenia.

#### **4.1.2. Aktywność odpornościowa hemolimfy larw *G. mellonella* po zakażeniu *P. entomophila***

Po wniknięciu bakterii, organizm gospodarza rozpoznaje jego wzorce molekularne, po czym aktywuje szereg elementów układu odpornościowego (Eleftherianos i Revenis, 2011). Aby poznać zmiany, zachodzące w stanie zaburzenia homeostazy owadów zakażonych *P. entomophila*, przeprowadzono badania aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy. W celu określenia właściwości odpornościowych oznaczono aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy, względem *Escherichia coli* i *P. entomophila*. Kontrolę stanowiła hemolimfa niczym nieimmunizowanych larw, pulę porównawczą zaś – hemolimfa larw, którym podano sam PBS. Hemolimfę pochodzącą ze wszystkich grup zbierano w określonych punktach czasowych, tj. 12, 16, 20 godzin od zakażenia *P. entomophila* lub podaniu PBS w przypadku grupy porównawczej. Wynik przedstawia rycina 13.

Aktywność przeciwbakteryjna względem *E. coli* i *P. entomophila* pojawiała się w hemolimfie owadów zakażonych niższą dawką bakterii i nie występowała w hemolimfie pochodzącej z larw zakażanych wyższą dawką bakterii, a także w hemolimfie pochodzącej z larw kontrolnych, oraz larw pochodzących z grupy porównawczej. Aktywność przeciw *E. coli* w hemolimfie owadów zakażonych niższą dawką bakterii pojawiała się po 12 godzinach od zakażenia, następnie spadała i wzrastała do poziomu zbliżonego sprzed spadku po 20 godzinach. W przypadku aktywności przeciw *P. entomophila* pojawiała się ona w hemolimfie pobranej 16 godzin od zakażenia i ulegała obniżeniu po 20 godzinach.

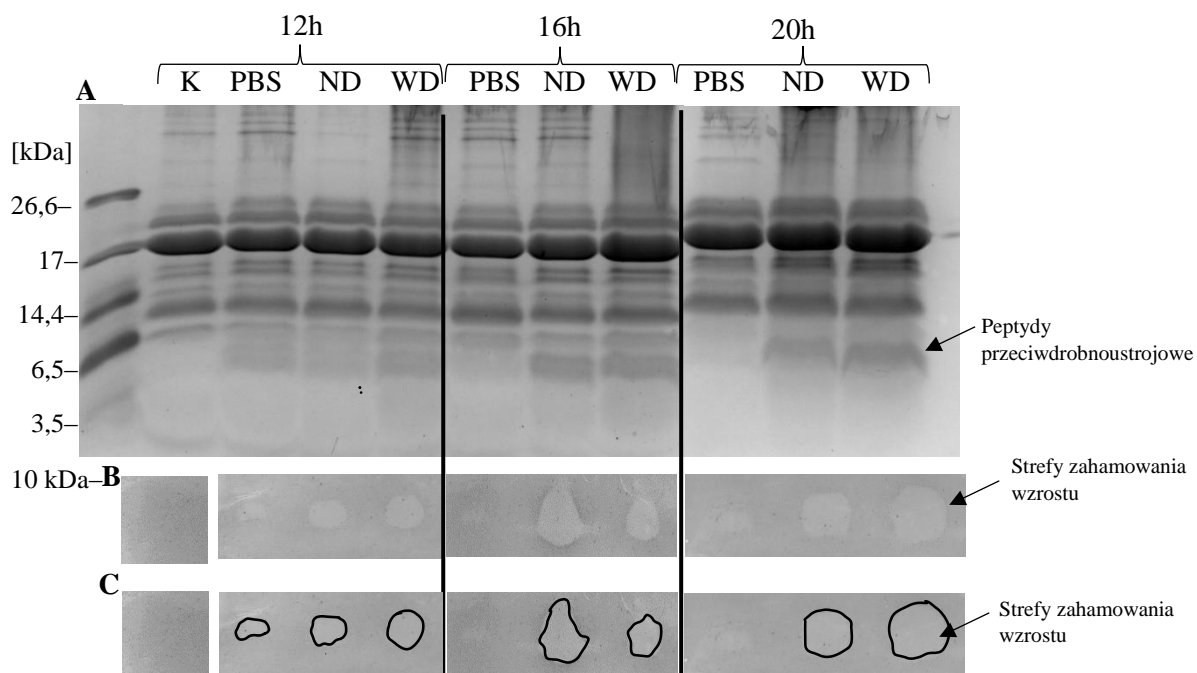


**Ryc. 13.** **A**– Aktywność przeciw *E. coli* hemolimfy larw *G. mellonella* po podaniu różnych dawek *P. entomophila*. Aktywność hemolimfy larw kontrolnych (**K**), grupy porównawczej, której podawano 10  $\mu\text{l}$  PBS (**PBS**); larw zakażonych niższą dawką bakterii– *P. entomophila*  $10^3$  kom/10  $\mu\text{l}$  zawiesiny (**ND**), larw zakażonych dawką wyższą– *P. entomophila*  $10^5$  kom/10  $\mu\text{l}$  zawiesiny (**WD**). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent cektropiny B ( $\pm\text{SD}$ , odchylenie standardowe,  $n=3$ ). **B**– Aktywność przeciw *P. entomophila* hemolimfy larw *G. mellonella* po podaniu różnych dawek *P. entomophila* oraz PBS. Oznaczenia jak podano wyżej. Kontrolę stanowiła hemolimfa kontrolnych larw (**K**). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent cektropiny B ( $\pm\text{SD}$ , odchylenie standardowe,  $n=3$ ). Różnice istotne statystycznie ( $P>0,05$ , test ANOVA) zaznaczone zostały różnymi literami.

#### 4.1.3. Rozdział elektroforetyczny białek hemolimfy zakażonych larw *G. mellonella*. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej polipeptydów po rozdziale elektroforetycznym

Polipeptydy niskocząsteczkowe hemolimfy zakażonych owadów rozdzielono stosując tzw. elektroforezę trycynową (rozdział 3.3.10). W uzyskanym obrazie przedstawionym na rycinie. 14A szczególną uwagę zwrócono na peptydy indukowalne, których masa nie przekraczała 6,5 kDa i które pojawiały się jedynie w materiale pochodzącym z larw zakażonych *P. entomophila* oraz w niektórych punktach czasowych po podaniu PBS. Maksymalne wybarwienie peptydów odnotowano po 16 godzinach od zakażenia. 20 godzin po zakażeniu prążki reprezentujące peptydy pojawiające się po zakażeniu wyższą dawką bakterii charakteryzowały się wyraźnie większą intensywnością względem intensywności peptydów wykrytych w hemolimfie larw, którym podawano niższą dawkę *P. entomophila*.

W celu sprawdzenia korelacji obrazu uzyskanego po rozdziale elektroforetycznym z aktywnością przeciwbakteryjną, przeprowadzono badania aktywności przeciwbakteryjnej w wybranych punktach czasowych po uprzednim rozdzieleniu białek hemolimfy w 13,8% żelu poliakrylamidowym (rozdział 3.3.12). Wyniki przedstawiono na rycinie 14B. W pożywce zawierającej bakterie, którą pokryto żel, obserwowano strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* D31. Zlokalizowane były one w miejscu, w którym znajdowały się białka o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa. Zaobserwowano pojawianie się stref w hemolimfie larw, którym podawano bakterie *P. entomophila*. Strefy w hemolimfie pochodzącej z larw zakażonych niższą dawką bakterii pojawiały się po 12 godzinach, zwiększały się w materiale pobranym 16 godzin od zakażenia. Po 20 godzinach strefy w hemolimfie pochodzącej z larw zakażonych wyższą dawką bakterii były wyraźnie większe w porównaniu ze strefami powstałymi po rozdziale białek hemolimfy pobranej po zakażeniu dawką niższą. W hemolimfie larw, którym podawano bufor PBS zaobserwowano śladowe strefy zahamowania wzrostu, powstałe prawdopodobnie jako reakcja na stres (12h). W hemolimfie gąsienic kontrolnych nie obserwowano aktywności przeciw *E. coli* D31 wokół rozdzielonych białek.



**Ryc. 14.** A– Elektroforetyczny rozdziel peptydów i białek niskocząsteczkowych ekstraktów hemolimfy po zakażeniu różnymi dawkami *P. entomophila* (tzw. elektroforeza trycynowa). B– Aktywność przeciwbakteryjna rozdzielonych w żelu polipeptydów hemolimfy larw

kontrolnych (**K**), larw którym podawano 10 µl PBS (**PBS**) larw zakażonych niższą dawką bakterii– *P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10 µl zawiesiny (**ND**), larw zakażonych wyższą dawką– *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10 µl zawiesiny (**WD**). **C**– strefy zahamowania wzrostu *E. coli* D31 zaznaczono czarną obwódką.

Podsumowując pomimo braku aktywności w pełnej hemolimfie larw zakażonych niższą dawką, zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół polipeptydów niskocząsteczkowych.

#### **4.1.4. Wpływ zakażenia bakterią *P. entomophila* na poziom ekspresji wybranych białek i peptydów odpornościowych *G. mellonella***

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w celu wstępnego poznania reakcji odpornościowej larw *G. mellonella* na zakażenie *P. entomophila* drogą pokarmową, zwróciły uwagę na szczególną rolę peptydów odpornościowych w odpowiedzi immunologicznej owadów. Indukowalne peptydy wykryto w ekstraktach metanolowych pochodzących z hemolimfy larw zakażonych obiema dawkami. Równolegle niskocząsteczkowe polipeptydy wykazywały aktywność przeciw *E. coli* D31. Z kolei w pełnej hemolimfie, aktywność przeciw *E. coli* D31 i *P. entomophila* wykazano jedynie w materiale pochodzącym z larw owadów zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila*. Aby poznać, które z dotychczas zidentyfikowanych peptydów w organizmie *G. mellonella* są indukowane zakażeniem larw bakteriami *P. entomophila*, przeprowadzono badania poziomu ekspresji genów kodujących wybrane polipeptydy odpornościowe uwzględniając zarówno dawkę jak i kinetykę zmian ich ekspresji. Poziom ekspresji wybranych genów badano wobec genu referencyjnego S7e kodującego białko rybosomalne *G. mellonella*, którego ekspresja jest stała w badanych warunkach i przyjmowana za referencyjną. Analizowano relatywny poziom ekspresji genu kodującego cekropinę D zdolną do tworzenia porów w błonie komórkowej, skutkującej lizą bakterii; genu kodującego peptyd defensynopodobny– wykazujący aktywność względem grzybów strzępkowych; genów kodujących gallerimycynę i galiomycynę– wykazujących aktywności wobec grzybów strzępkowych; genu kodującego hemolinę– białka opsonizującego, zawierającego domeny immunoglobulinowe; genu kodującego owadzi inhibitor metaloproteaz (IMPI)– wykazujący właściwości inhibitorowe wobec metaloproteaz drobnoustrojów oraz genu kodującego

lizozym – białka wykazującego zdolność do degradacji peptydoglikanu budującego ścianę komórkową bakterii poprzez hydrolizę wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego. Poziom ekspresji genów badano w ciele tłuszczowym – organie odpowiedzialnym za syntezę i sekrecję do hemolimfy białek i peptydów odpornościowych, oraz w jelicie – narządzie, który ze względu na entomopatogenne właściwości *P. entomophila* i naturalną metodę infekcji wykorzystywaną w doświadczeniach, stanowił potencjalne miejsce wzmożonej syntezy badanych polipeptydów. Sposób w jaki pobierano ciało tłuszczowe i jelita oraz metodyka izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji a także reakcji PCR z analizą ilości produktu opisano w rozdziałach: 3.3.20; 3.3.21; 3.3.22. Zaobserwowano, że poziom ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe wzrasta po zakażeniu zarówno w ciele tłuszczowym jak i w jelitach larw. W przypadku genu kodującego cekropinę, hemolinę i lizozym wyraźnie wyższy relatywny poziom ekspresji wykazano w jelitach zakażonych larw, natomiast relatywny poziom ekspresji genu kodującego gallerimycynę i peptyd defensynopodobny był wyższy w ciele tłuszczowym zakażonych owadów. Relatywna ekspresja pozostałych genów utrzymywała się na porównywalnym poziomie zarówno w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego jak jelit.

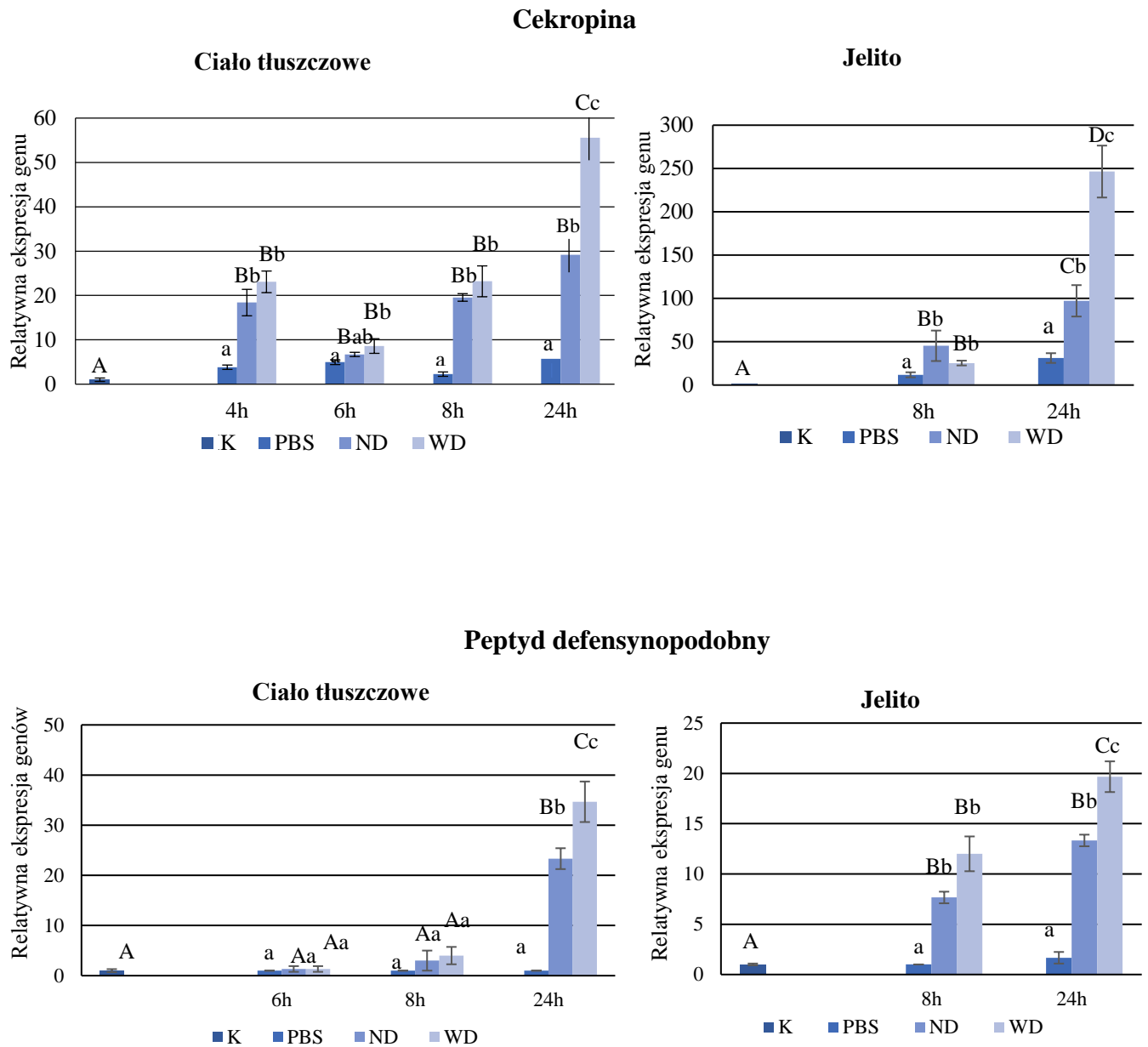
Największe zmiany w poziomie ekspresji genów zanotowano 24h po zakażeniu. W przypadku genów kodujących cekropinę, peptyd defensynopodobny i gallerimycynę najwyższy relatywny wzrost poziomu ekspresji obserwowano w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego i jelit larw zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila* w porównaniu do grup zakażonych niższą dawką bakterii po 24 godzinach od zakażenia. Poziom ekspresji genów kodujących galiomycynę, hemolinę i lizozym osiągał najwyższe wartości w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego i jelita larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila* po 24 godzinach. Inaczej było w przypadku genu IMPI, którego ekspresja w materiale pochodzącym z ciał tłuszczowych osiągała najwyższe wartości po 24 godzinach w grupie larw zakażonych niższą dawką bakterii, natomiast w przypadku ekspresji genu kodującego IMPI w jelicie najwyższy jej poziom zaobserwowano w grupie zakażonej wyższą dawką bakterii 24 godziny po podaniu bakterii.

Podsumowując, naturalna infekcja larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* indukuje zmiany ekspresji analizowanych genów. W przypadku cekropiny, peptydu defensynopodobnego i gallerimycyny w obu badanych narządach poziom ekspresji genów był wprost proporcjonalny do dawki, zaś w przypadku galiomycyny, hemoliny i lizozymu zwiększenie dawki spowodowało obniżenie w poziomie ekspresji genów

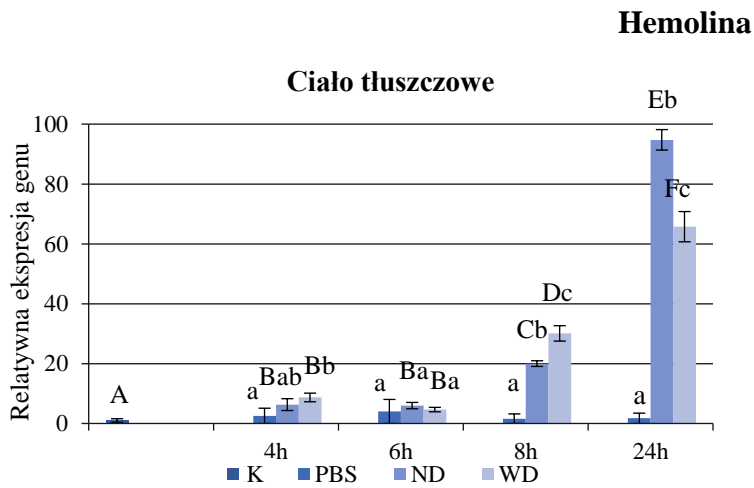
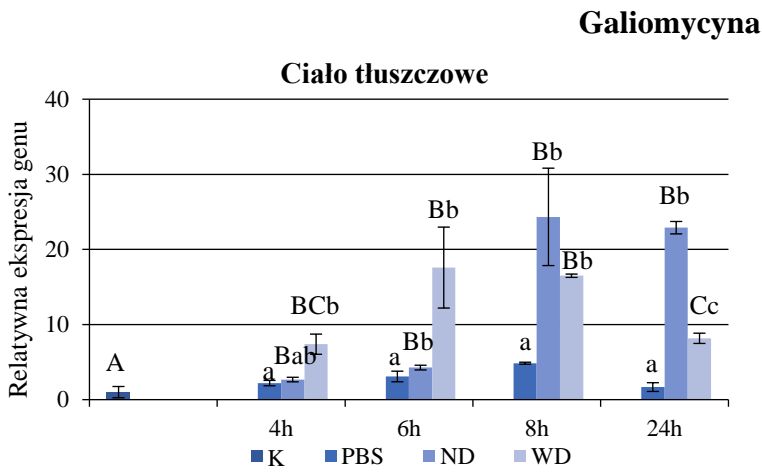
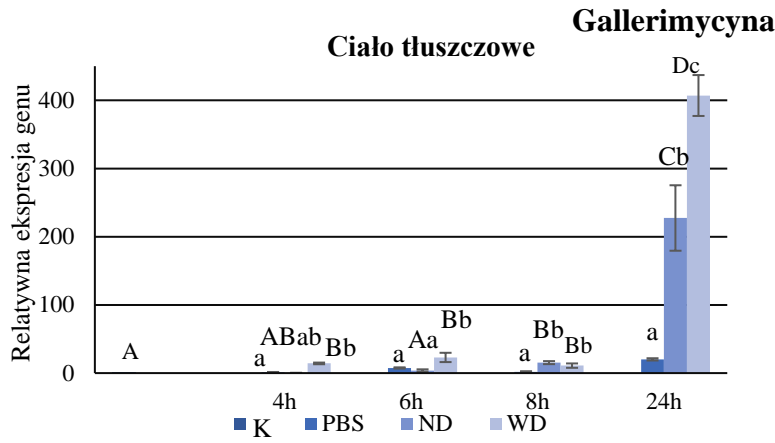


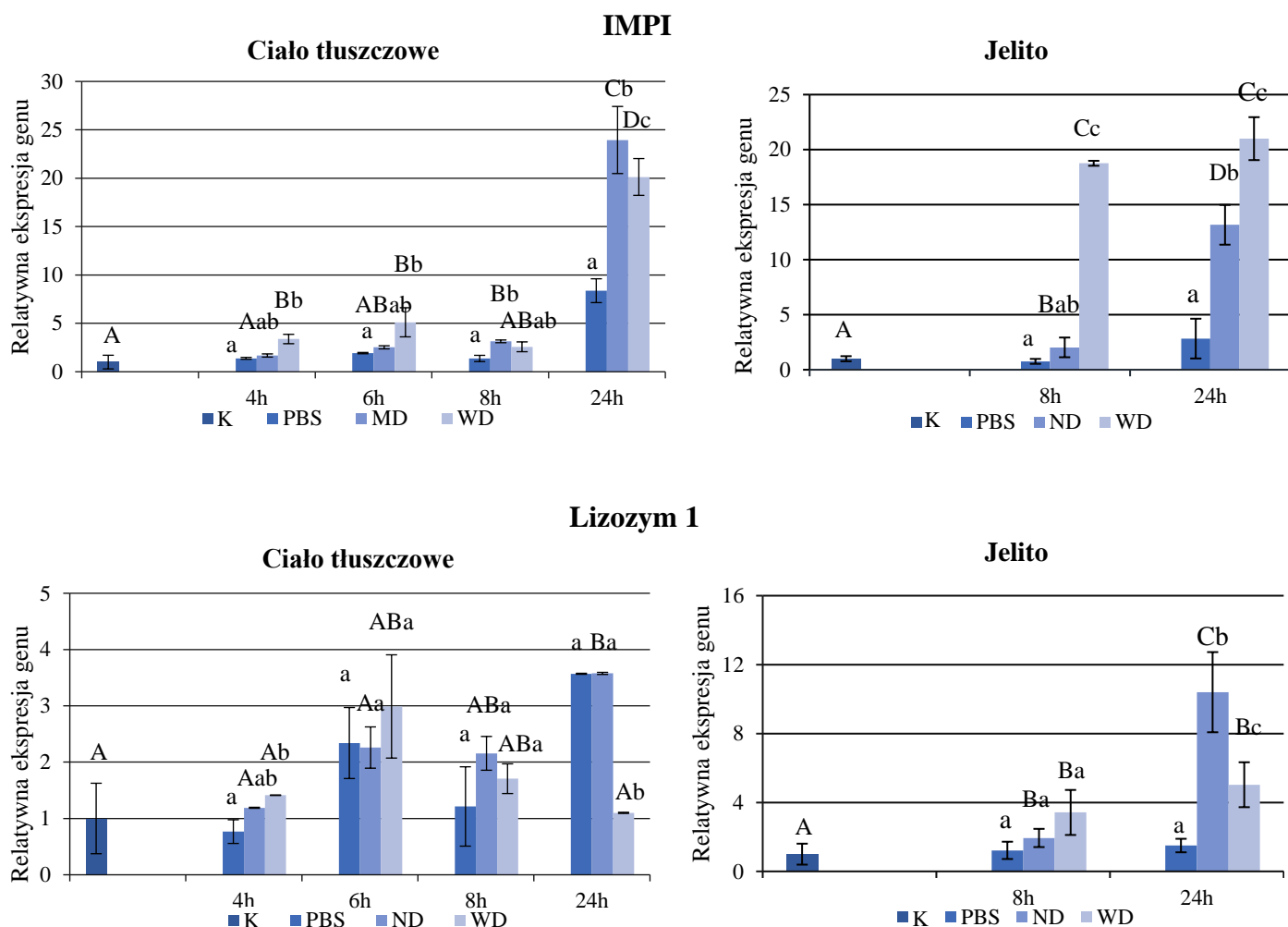
## Analiza wyników

w porównaniu z dawką niższą. Wpływ dawki na ekspresję IMPI zależał natomiast od organu: był wprost proporcjonalny do dawki w jelicie i odwrotnie proporcjonalny w ciele tłuszczowym. Uzyskane wyniki ekspresji genów zostały przedstawione na rycinie 15.



## Analiza wyników



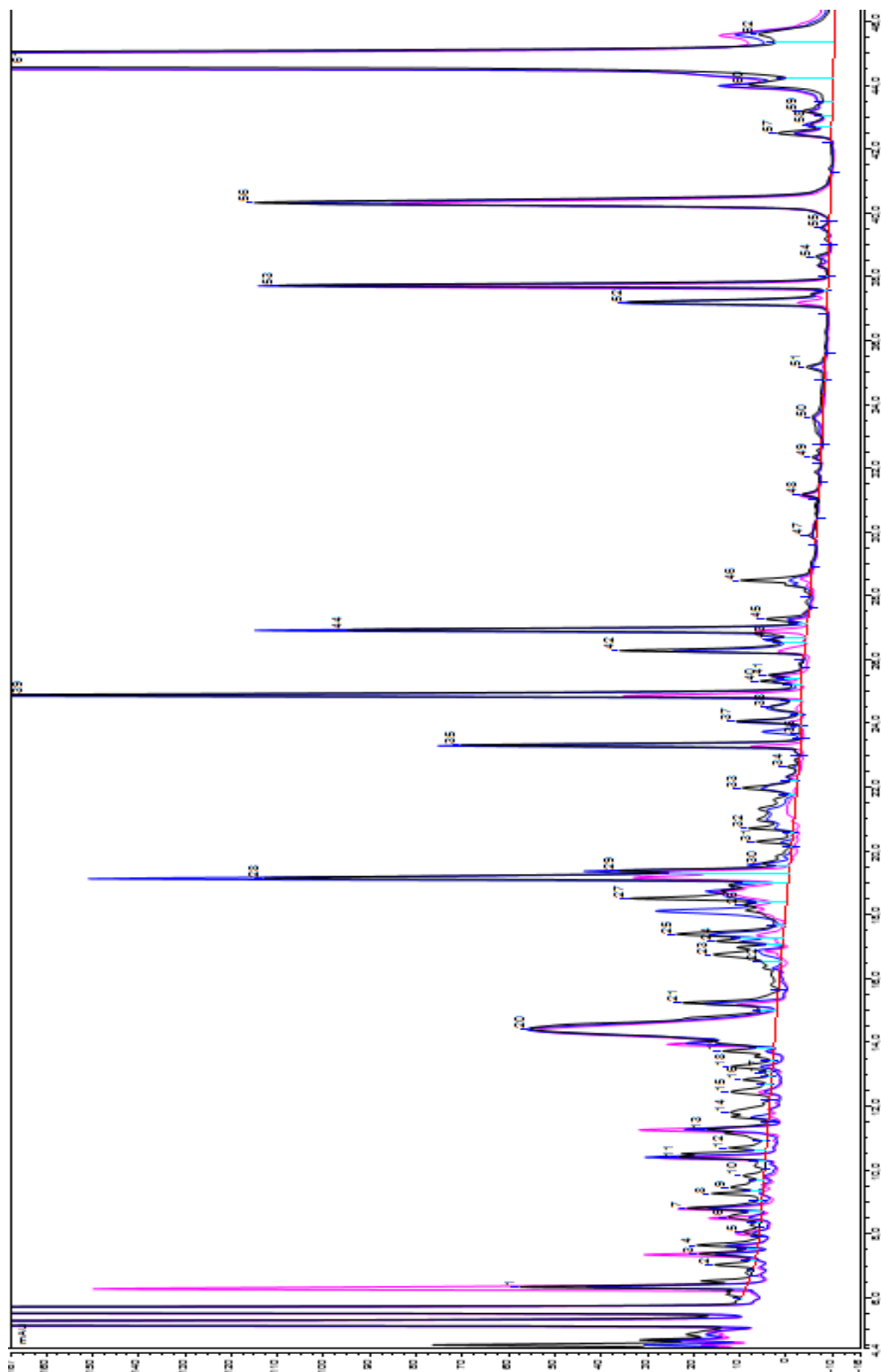


**Ryc. 15.** Ekspresja genów kodujących wybrane peptydy i białka odpornościowe w ciele tłuszczowym i jelitach larw grupy porównawczej, której podawano 10  $\mu$ l PBS (**PBS**); larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10  $\mu$ l zawiesiny (**ND**), larw zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10  $\mu$ l zawiesiny (**WD**). Kontrolę stanowił poziom ekspresji danego genu w ciele tłuszczowym larw, którym nic nie podawano (**K**). Wyniki przedstawiono jako względną wartość w stosunku ekspresji danego genu w kontroli ( $\pm$ SD, odchylenie standardowe, n= 3). Dużymi literami zaznaczono analizę istotności statystycznej w obrębie różnych punktów czasowych w danej grupie i kontroli, natomiast małymi literami zaznaczono różnice między grupami w obrębie określonego punktu czasowego (P<0,05, test ANOVA).

#### 4.2. Analiza profili białkowych hemolimfy larw *G. mellonella*

Aby szczegółowo porównać profile białkowe larw zakażonych niższą i wyższą dawką bakterii *P. entomophila* przygotowano odfuszczone ekstrakty metanolowe zawierające polipeptydy niskocząsteczkowe hemolimfy owadów zebranej 24 godziny po zakażeniu (rozdział 3.3.14). W każdej z grup uzyskane ekstrakty, otrzymano z tej samej

ilości hemolimfy. Próbki wysłano do Krakowa gdzie we współpracy z Profesorem Pawłem Makiem z Zakładu Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego prowadzono rozdziały chromatograficzne i dokonywano wstępnej analizy ilościowej rozdzielonych polipeptydów/grup polipeptydów poprzez pomiar pola powierzchni danego piku. Reprezentacyjne chromatogramy przedstawia rycina 16.



**Ryc. 16.** Chromatogram uzyskany przez nałożenie trzech analiz HPLC otrzymanych w wyniku rozdziału polipeptydów hemolimfy porównawczej (linia różowa) oraz puli otrzymanej z owadów zakażonych niższą– 10<sup>3</sup> CFU (linia niebieska) i wyższą dawką –10<sup>5</sup>CFU (linia czarna) *P. entomophila*. Numerami oznaczono porównywane frakcje.

W wyniku rozdziału HPLC w każdej puli hemolimfy uzyskano 62 frakcje (tabela 7). Po nałożeniu chromatogramów uzyskanych w wyniku rozdziału polipeptydów hemolimfy porównawczej oraz puli otrzymanej z owadów zakażonych niższą i wyższą dawką, porównano pole powierzchni poszczególnych pików. Był to wstępny etap w poszukiwaniu peptydów, których ilość zmienia się w wyniku zakażenia i których ilość różni się w zależności od podanej dawki patogenu.

**Tabela 7.** Podział frakcji polipeptydów uzyskanych analizą HPLC, ze względu na stosunek ilości pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi zakażonymi bakteriami i grupą porównawczą. Numery frakcji wybranych do dalszej analizy pogrubiono.

Frakcje, w których całkowita ilość białka nie wykazuje powtarzalnych różnic względem puli hemolimfy z owadów porównawczych	Frakcje, w których całkowita ilość białka zmniejsza się w hemolimfie owadów zakażonych (niezależnie od dawki) w stosunku do porównawczych	Frakcje, w których całkowita ilość białka jest większa w hemolimfie owadów zakażonych wyższą dawką w porównaniu do grupy zakażonej niższą dawką bakterii	Frakcje, w których całkowita ilość białka jest większa w hemolimfie owadów zakażonych niższą dawką w porównaniu do grupy zakażonej wyższą dawką bakterii
20, 37, 47, 49, 50, 51, 54, 55, 58, 59, 61	1, 3, 5, 6, 7, 13, 19, 35,	11, 26, 28, 29, 30, 36, 38, 42, 44, 45, 52, 53, 60, 62	2, 4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 31, 32, 33, 39, 40, 41, 43, 46, 48, 56, 57

Jak widać, nie zaobserwowano jednorodnej tendencji zmian ilości białka w poszczególnych frakcjach hemolimfy owadów zakażonych niską czy wysoką dawką względem grupy porównawczej, ani względem siebie. W przypadku części frakcji reprezentujących materiał z grup zakażonych bakteriami nie zaobserwowano zmian ilości względem grupy porównawczej, w przypadku niektórych zaobserwowano spadek poziomu ilości polipeptydów względem grupy porównawczej. W przypadku kilkudziesięciu pików wykazano wzrost ilości białka w grupach zakażonych *P. entomophila*. Ze względu na dużą liczbę uzyskanych frakcji, do identyfikacji białek i szczegółowych analiz wybrano część z nich. Kryterium wyboru frakcji stanowiły:

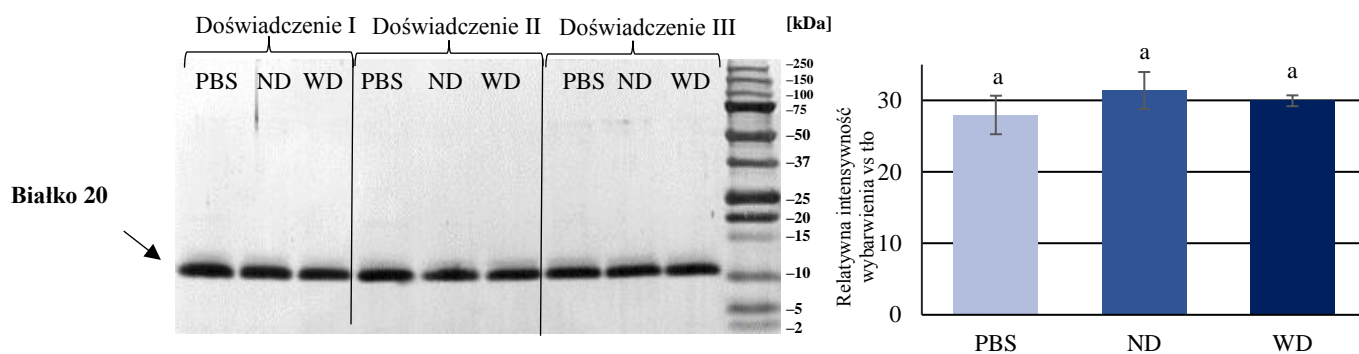
- 1) ilość białka (której wyznacznikiem było pole powierzchni pików). Ze względu na duże pole powierzchni pików reprezentującego frakcję 20 we wszystkich badanych grupach zdecydowano się poddać ją dalszym analizom.
- 2) wielkość i powtarzalność różnic w ilości białka w obrębie danej frakcji w poszczególnych grupach

## Analiza wyników

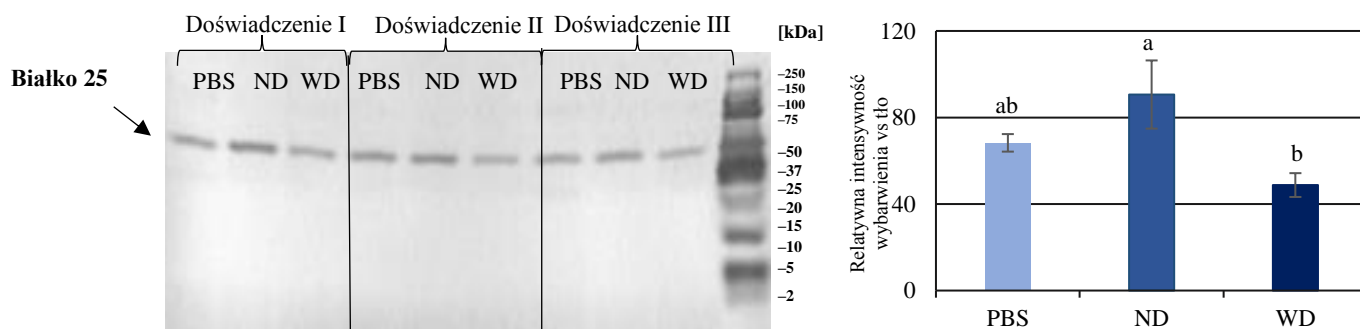
Miało to na celu poszukiwanie białek o znaczeniu immunologicznym, w tym tych, których zmiany ilościowe mogą być przyczyną braku aktywności odpornościowej pełnej hemolimfy owadów zakażonych wyższą dawką *P. entomophila*, być może na skutek działania czynników wirulencji stosowanej bakterii.

Wybrane frakcje z trzech doświadczeń zostały poddane analizie elektroforetycznej, a następnie białka zostały przeniesione na membranę PVDF. Po wybarwieniu, analizowano densytometrycznie relatywną ilość poszczególnych białek w puli materiału z hemolimfy owadów porównawczych oraz zakażonych obiema dawkami *P. entomophila*. Analizę elektroforetyczną poszczególnych frakcji przedstawia rycina 17. W dalszej części pracy zaznaczone polipeptydy będą nazwane numerami frakcji, w której lokalizowano je metodą HPLC.

### Frakcja 20

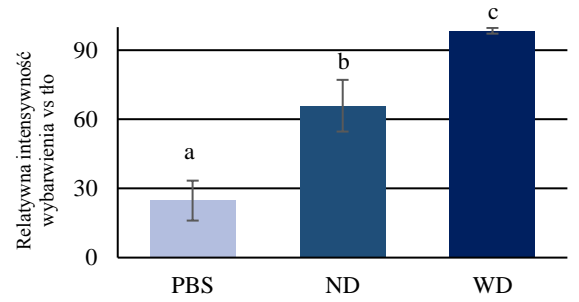
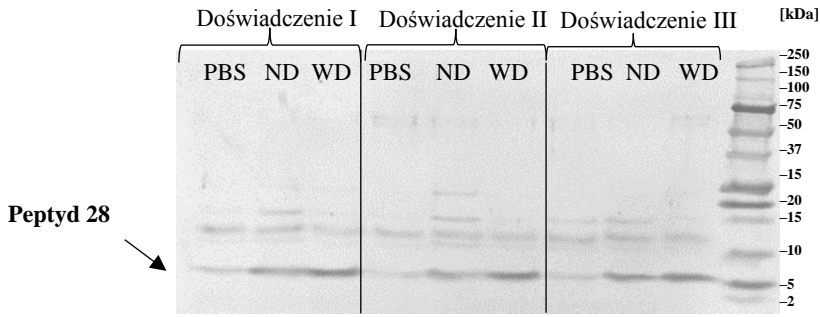


### Frakcja 25

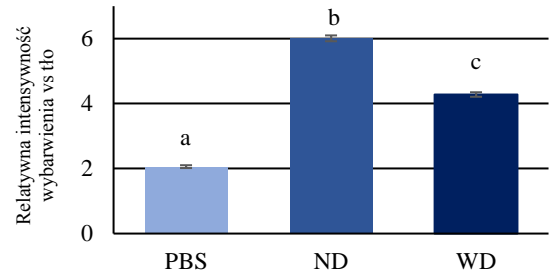
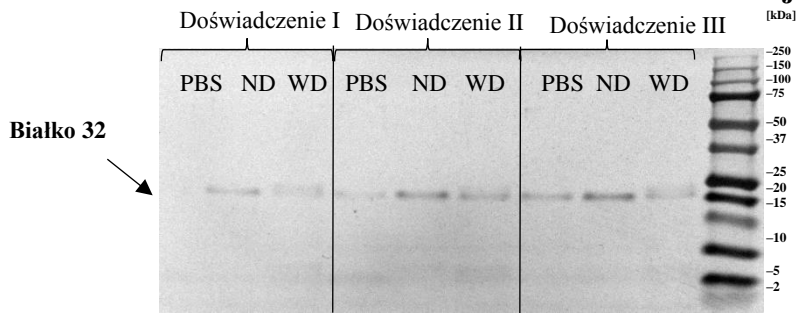


# Analiza wyników

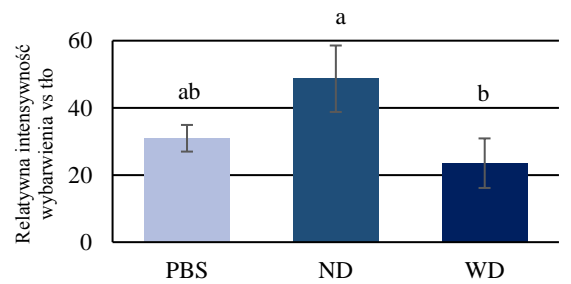
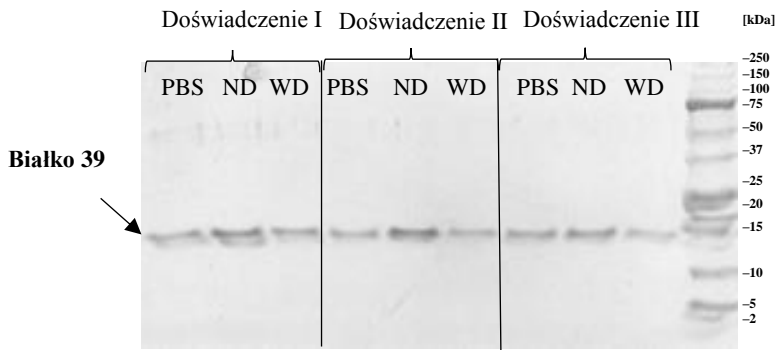
## Frakcja 28



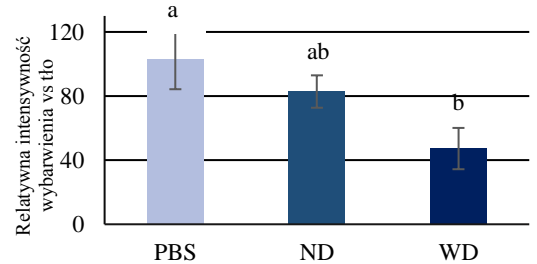
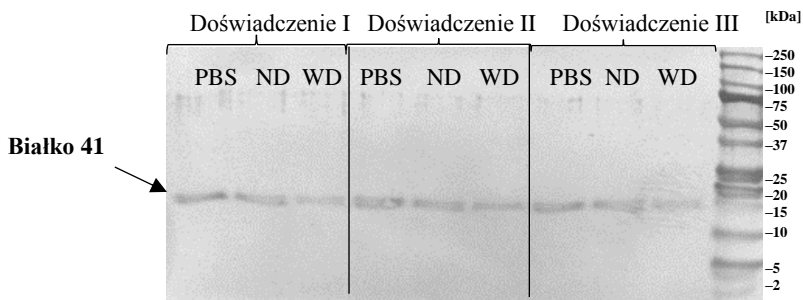
## Frakcja 32



## Frakcja 39

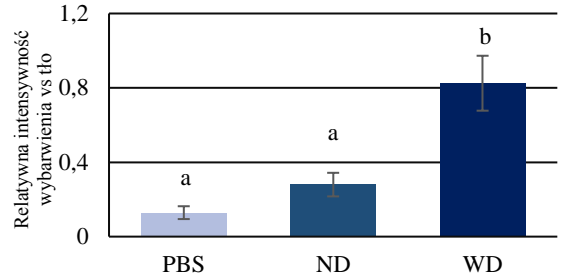
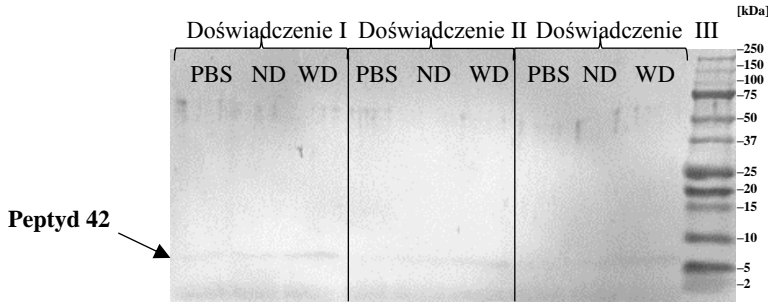


## Frakcja 41

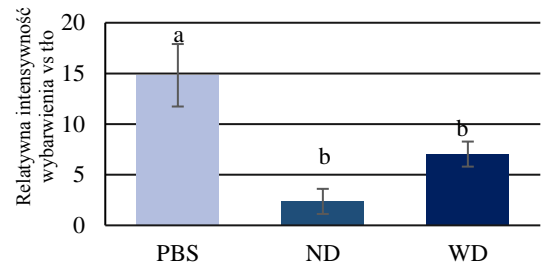
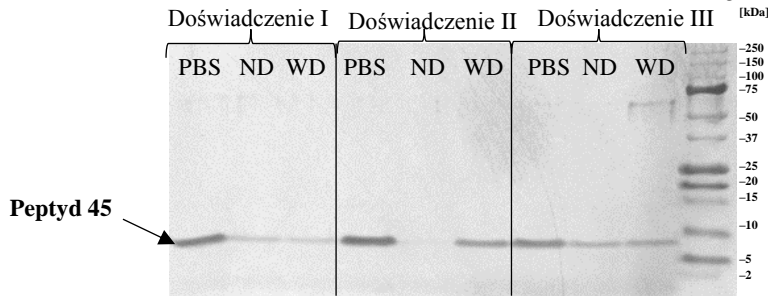




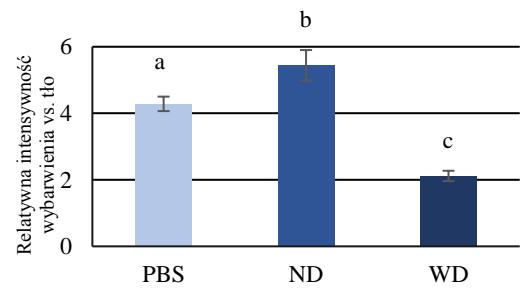
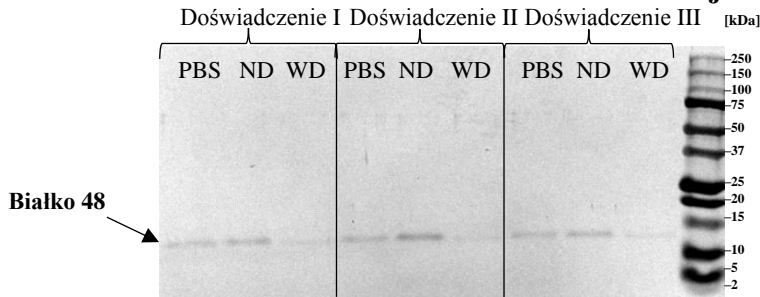
**Frakcja 42**



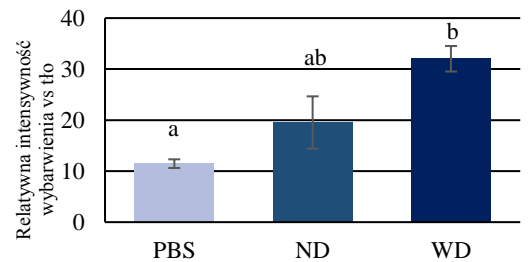
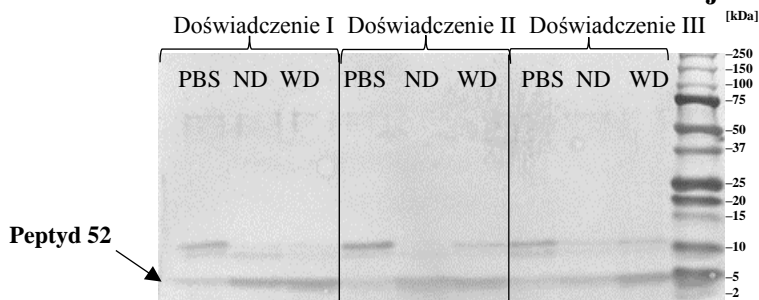
**Frakcja 45**

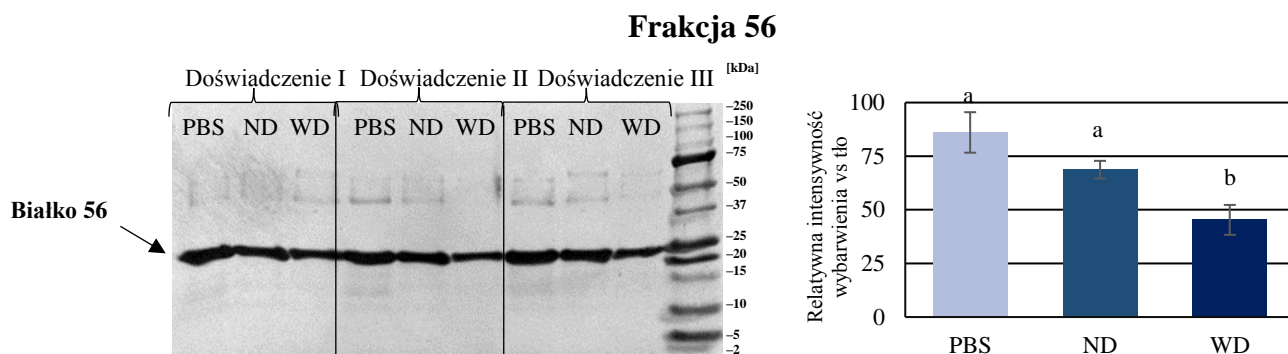


**Frakcja 48**



**Frakcja 52**





**Ryc. 17.** Obrazy rozdziałów elektroforetycznych wybranych frakcji uzyskanych po rozdziale HPLC niskocząsteczkowych polipeptydów hemolimfy larw *G. mellonella*, zebranej 24 godziny po zakażeniu niższą– $10^3$  (ND) lub wyższą– $10^5$  (WD) dawką bakterii *P. entomophila* oraz grupy larw, której podawano PBS. Każdy obraz elektroforetyczny reprezentuje 3 powtórzenia korespondujące z trzema niezależnymi doświadczeniami. Wykonano pomiar densytometryczny zaznaczonych polipeptydów i na ich podstawie sporządzono wykresy. Wyniki przedstawiono jako średnią pomiarów z 3 doświadczeń ( $\pm$ SD, odchylenie standardowe,  $n=3$ ). Wartości zaznaczone różnymi literami różnią się między sobą w sposób istotny statystycznie ( $P < 0,05$ , test ANOVA).

Polipeptydy zaznaczone strzałkami na rycinie 17 poddano identyfikacji. Sekwencjonowanie wykonano w Zakładzie Biochemii Analitycznej UJ. Frakcji 25 nie udało się zsekwencjonować metodą degradacji Edmana dlatego została ona poddana sekwencjonowaniu pociętych fragmentów za pomocą spektroskopii mas w laboratorium komercyjnym. Na podstawie uzyskanych sekwencji dokonano identyfikacji białek (tabela 8) przy użyciu algorytmu BLAST dostępnego w internecie pod adresem <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

**Tabela 8.** Uzyskane sekwencje i identyfikacja wybranych polipeptydów. Pogrubioną czcionką zaznaczono numery peptydów 20, 41 i 48, których charakterystyka znajduje się w dalszych rozdziałach.

Numer peptydu/ białka	Sekwencja N–końca	Zidentyfikowany peptyd/ białko
<b>20</b>	<b>DLVCGT</b> NFCKNNPXSTXVAA	<b>1 indukowalny inhibitor proteaz serynowych (ISPI–1; Białko GmCP8)</b> (Kim i in., 2010)
<b>25</b>	DYRPVcGSNGETYPNK	Przypuszczalny inhibitor proteaz serynowych (ang. <i>serine protease inhibitor dipetalogastin–like</i> )
28	DIQIPGIKKPTHRDI	Peptyd prolinowy 1 (Brown i in., 2009)
32	YGWDNSPGRQSWFPNTNQIN	Niescharakteryzowany peptyd, produkt genu LOC113509844 (Lizana i in., 2020)

## Analiza wyników

39	KTFTRCELVQALRRQ	Lizozym 2 (Vogel i in., 2011)
41	DVIEVQARKKGATLK	<b>Przypuszczalne białko wiążące odoranty 7 (ang. <i>Odorant binding protein (OBP7)</i>) (Lizana i in., 2020)</b>
42	DTLIGSCVWGATNYT	Peptyd defensynopodobny (Langen i in., 2006)
45	VQETQKLAKTVGANL	Apolipoforyna III (Browne i in., 2014)
48	EEKYTTNDDFDIEALIVNV	<b>Przypuszczalne białko wiążące feromony (ang. <i>bulb-specific protein 3-like isoform XI (Ebsp3)</i>) (Lizana i in., 2020)</b>
52	ENFFKEIERAGQRIR	Cekropina D (Vogel i in., 2011)
56	DDIATAVNEQTTQQIRDTLK	Hemolina (Daffre i Faye, 1997)

Spośród zidentyfikowanych polipeptydów hemolimfy larw *G. mellonella* znajdują się słabo poznane lub zupełnie nieznanne, które zostaną scharakteryzowane w dalszej części pracy. Podsumowując, zidentyfikowano polipeptydy, których ilość zmienia się powtarzalnie w badanych warunkach. Polipeptydy te można podzielić na 4 grupy.

Grupa 1. Polipeptydy, których ilość wzrasta po zakażeniu po minimum jednej dawce z wyłączeniem grupy 3. Należą do nich peptyd prolinowy 1 i peptyd defensynopodobny.

Grupa 2. Polipeptydy, których ilość zmniejsza się po minimum jednej dawce, z wyłączeniem grupy 3. Należy do nich apolipoforyna III.

Grupa 3. Polipeptydy, których jest mniej po zakażeniu wyższą dawką bakterii w porównaniu z niższą dawką, niezależnie od ich indukowalności. Są to:

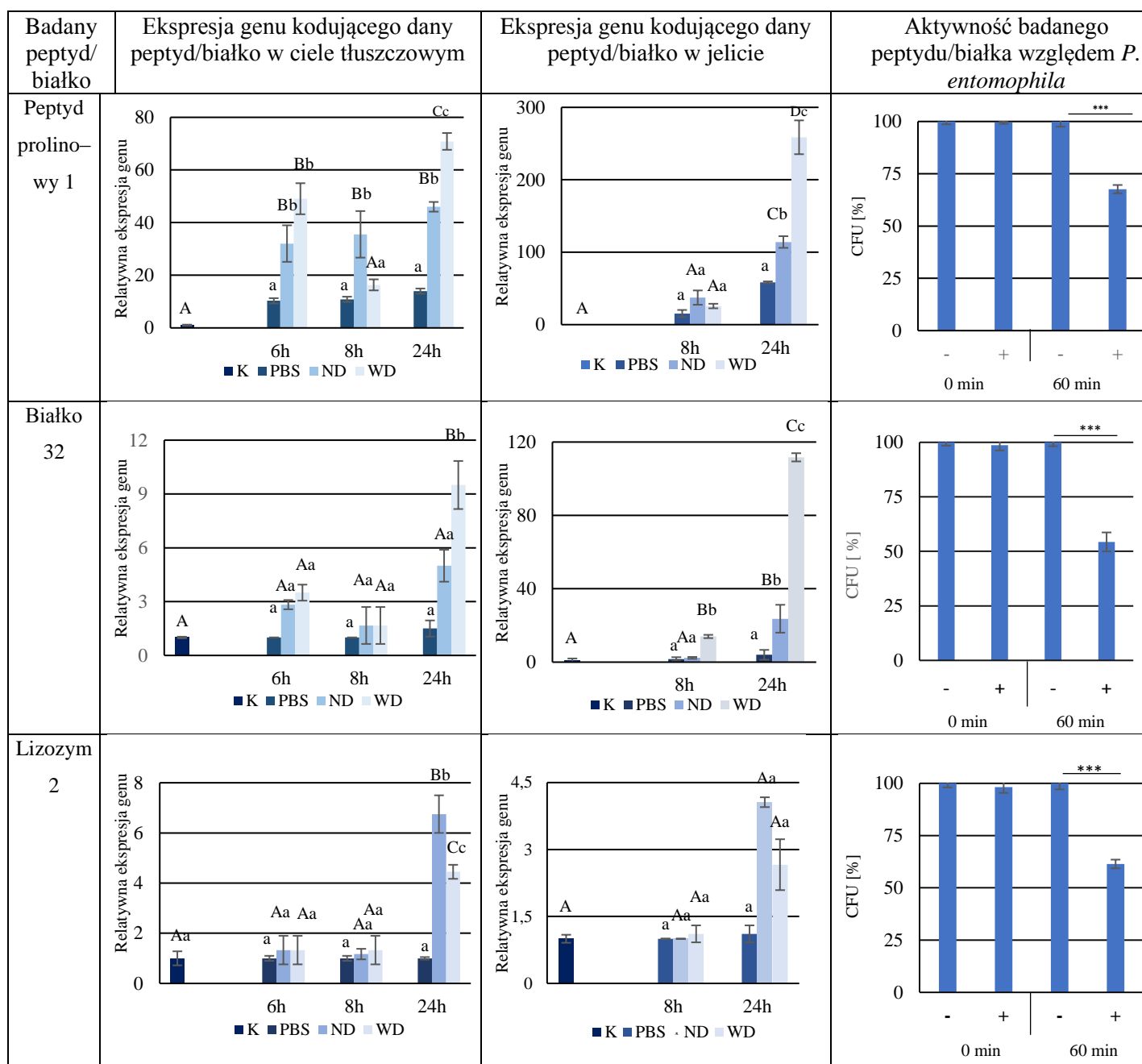
- białko 25– przypuszczalny inhibitor proteaz serynowych;
- białko 32– niecharakteryzowany białko, produkt genu LOC113510237;
- białko 39– lizozym 2;
- białko 41– przypuszczalne białko wiążące odoranty (OBP7);
- białko 48– przypuszczalne białko wiążące feromony (Ebsp3);
- białko 56– hemolina

Grupa 4. Polipeptydy, których ilość, nie zmienia się niezależnie dawki. Należy do niej białko GmCP8.

Najliczniejszą grupę stanowią polipeptydy z grupy 3, co jest zbieżne z obserwacją o braku aktywności przeciwbakteryjnej w pełnej hemolimfie owadów zakażonych wyższą dawką bakterii.

Sześć spośród omawianych polipeptydów zostało oczyszczonych do homogenności w Zakładzie Biochemii Analitycznej UJ. Trzy z nich – białko GmCP8, białko OBP7 i białko Ebsp3, zostały scharakteryzowane i opisane w kolejnych rozdziałach niniejszej pracy. Pozostałe trzy to: peptyd prolinowy 1, lizozym 2 i nieznane białko 32. Celem sprawdzenia czy zmiany w ilości wspomnianych białek w hemolimfie zakażonych owadów mogą mieć znaczenie fizjologiczne w interakcji *G. mellonella*–*P. entomophila*, sprawdzono ich aktywność przeciwbakteryjną. Ponadto, aby sprawdzić czy zmiany ilości tych polipeptydów są skorelowane z poziomem ekspresji genów, czy są wynikiem działania np. czynników wirulencji *P. entomophila* na białko, sprawdzono poziom ekspresji genów w ciele tłuszczowym oraz jelicie. Wyniki przedstawia rycina 18. Jak widać wzrost ilości peptydu prolinowego 1 w hemolimfie zakażonych owadów jest skorelowany ze wzrostem ekspresji genu zarówno w ciele tłuszczowym jak i jelicie. Wyższy poziom ekspresji po podaniu wyższej dawki bakterii ma miejsce 24 godziny od zakażenia zarówno w ciele tłuszczowym jak i jelicie. Peptyd ten wykazuje aktywność przeciw *P. entomophila*. W przypadku białka 32 wzrost ekspresji genu w ciele tłuszczowym ma miejsce po 24 godzinach od zakażenia, zaś w jelicie po 8 i 24 godzinach. We wszystkich tych przypadkach poziom ekspresji jest wyższy po zakażeniu wyższą dawką bakterii. Oznacza to, że pomimo intensywnej ekspresji genu w obu organach owada zakażonego wyższą dawką bakterii spada ilość białka. Może to wpływać na zdolności obronne gospodarza, bowiem białko to wykazuje aktywność przeciw *P. entomophila in vitro*. Inaczej jest w przypadku genu lizozymu 2, którego poziom ekspresji wzrasta w sposób istotny jedynie 24 godziny po zakażeniu w ciele tłuszczowym i jest niższy po zakażeniu wyższą dawką bakterii w porównaniu z niższą dawką. Może to wyjaśniać zmniejszoną ilość białka w hemolimfie oraz spadek aktywności hemolimfy, bowiem białko to ma aktywność przeciw *P. entomophila*.

## Analiza wyników



**Ryc. 18.** Ekspresja genów i aktywność przeciwbakteryjna wybranych polipeptydów hemolimfy larw *G. mellonella*. Ekspresja genów kodujących wybrane polipeptydy w ciele tłuszczowym i jelitach larw kontrolnych (K), grupy porównawczej, której podawano 10  $\mu$ l PBS (PBS); larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila*  $10^3$  kom/10  $\mu$ l zawiesiny (ND), larw zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila*  $10^5$  kom/10  $\mu$ l zawiesiny (WD). Wyniki przedstawiono jako relatywną wartość w stosunku ekspresji danego genu w kontroli ( $\pm$ SD, odchylenie standardowe). Dużymi literami zaznaczono analizę istotności statystycznej w obrębie różnych punktów czasowych w danej grupie i kontroli, natomiast małymi literami zaznaczono różnice między grupami w obrębie określonego punktu czasowego ( $P < 0,05$ , test ANOVA  $n = 3$ ). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa analizowanych polipeptydów wobec *P. entomophila*. Grupę porównawczą dla każdego punktu czasowego stanowiła próbka zawierająca równą ilość wody

dodawana do próbki zamiast polipeptydu. Próbkę wysiewano bezpośrednio (czas 0) i po 60 minutach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako procent CFU rosnących po inkubacji z polipeptydem w stosunku do średniej liczby CFU bez dodawania polipeptydu. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń. Wskazano istotne różnice (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test t- studenta).

Jak wcześniej wspomniano do dalszej charakterystyki wybrano 3 białka :

–białko 20– GmCP8 (ang. *cationic protein 8*), który u *G. mellonella* nie jest dobrze poznany na poziomie białkowym;

– białko 41– OBP7 (ang. *Odorant binding protein 7*) o wysokim stopniu homologii do białek wiążących odoranty. Polipeptyd ten u *G. mellonella* nie został scharakteryzowany;

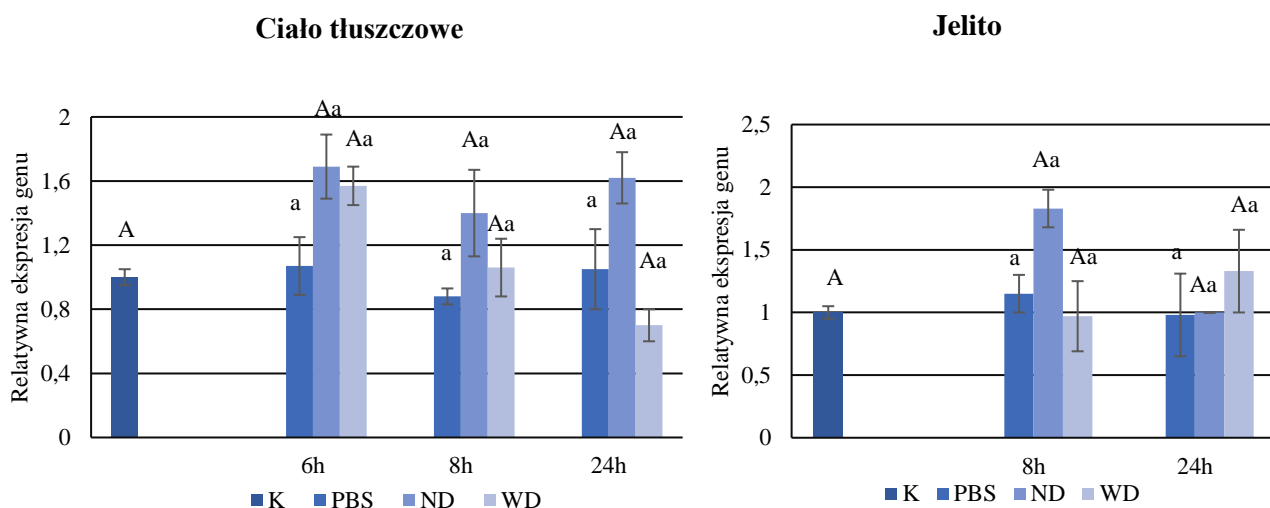
–białko 48– Ebsp3 (ang. *Ejaculatory bulb-specific protein 3-like isoform XI*) posiadający właściwości wiązania feromonów i u *G. mellonella* nie został scharakteryzowany.

### **4.3. Charakterystyka białka 20– *Galleria mellonella cationic protein 8* (GmCP8)**

#### **4.3.1. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego białko *Galleria mellonella cationic protein 8* (GmCP8)**

Wykonano doświadczenia, których celem była analiza ekspresji genu kodującego białko GmCP8 po zakażeniu larw *G. mellonella* drogą pokarmową zarówno niższą jak i wyższą dawką bakterii *P. entomophila*. Poziom ekspresji badanego genu oznaczano w ciele tłuszczowym, a także w jelicie larw. Zarówno w ciele tłuszczowym jak i jelicie pochodzącym z zakażonych owadów poziom ekspresji był podobny do poziomu obserwowanego w odpowiednich organach u kontrolnych i porównawczych larw we wszystkich analizowanych punktach czasowych jak przedstawiono na rycinie 19. W odpowiedzi na zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* nie dochodziło do istotnych zmian w poziomie ekspresji genu kodującego GmCP8 (Kordaczuk i in., 2022). Na uwagę zasługuje jednak fakt, że 24h po zakażeniu, poziom ekspresji genu kodującego GmCP8 w ciele tłuszczowym był około dwukrotnie niższy po podaniu

wyższej dawki *P. entomophila* w porównaniu z ekspresją genu po podaniu dawki niższej co należy traktować jedynie jako tendencję, ponieważ analiza statystyczna nie wykazała istotności ( $P > 0,05$ ).

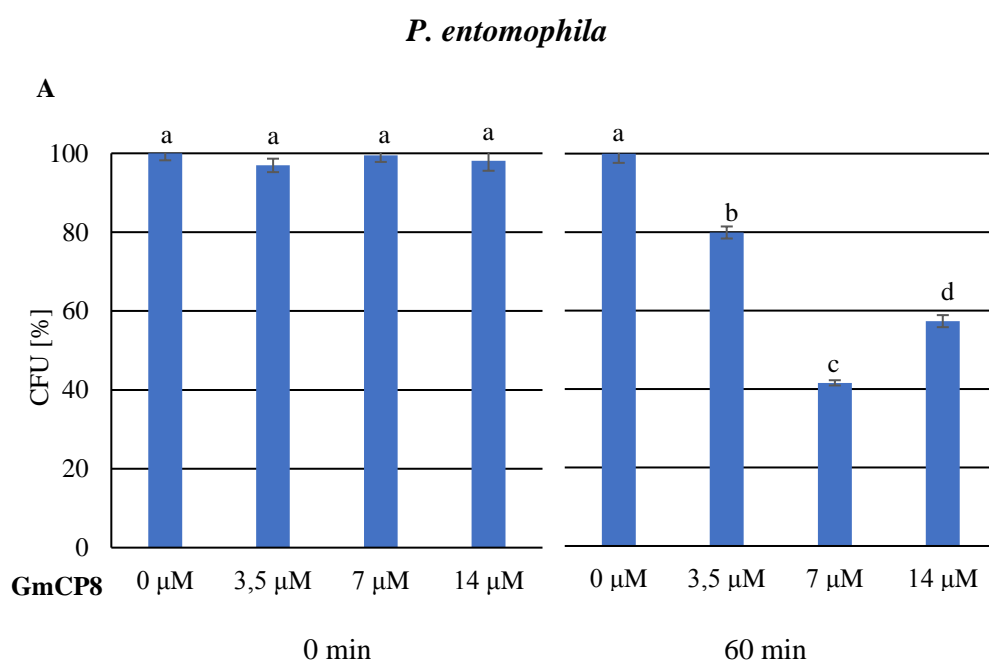


**Ryc. 19.** Ekspresja genu kodującego białko GmCP8 w ciele tłuszczowym i jelitach larw kontrolnych (**K**); grupy porównawczej, której podawano 10  $\mu$ l PBS (**PBS**); larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10  $\mu$ l zawiesiny (**ND**), larw zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10  $\mu$ l zawiesiny (**WD**). Wyniki przedstawiono jako relatywną wartość w stosunku do kontroli ( $\pm$ SD, odchylenie standardowe, n=3). Dużymi literami zaznaczono analizę istotności statystycznej w obrębie różnych punktów czasowych w danej grupie i kontroli, natomiast małymi literami zaznaczono różnice między grupami w obrębie określonego punktu czasowego ( $P < 0,05$ , test ANOVA) (Kordaczuk i in., 2022).

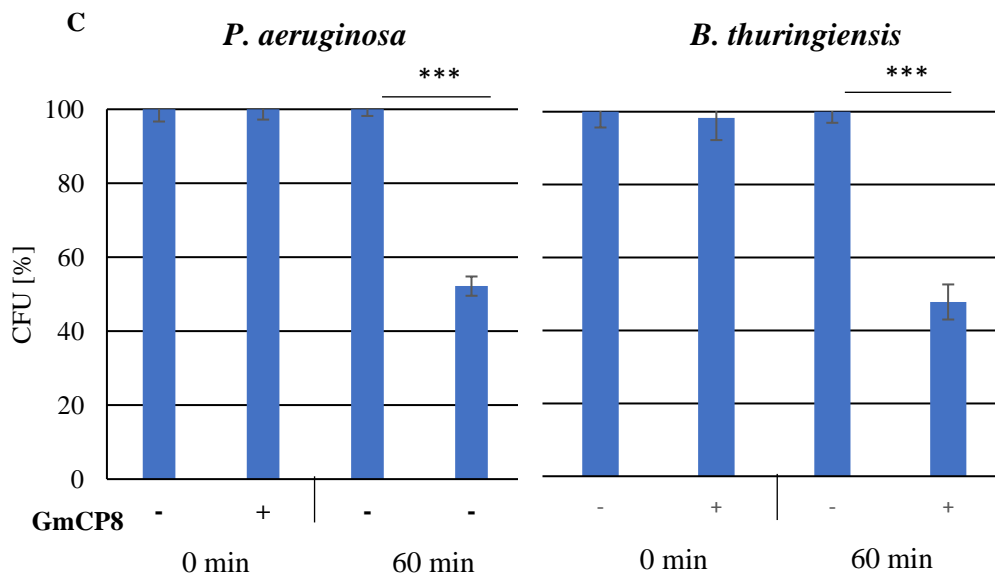
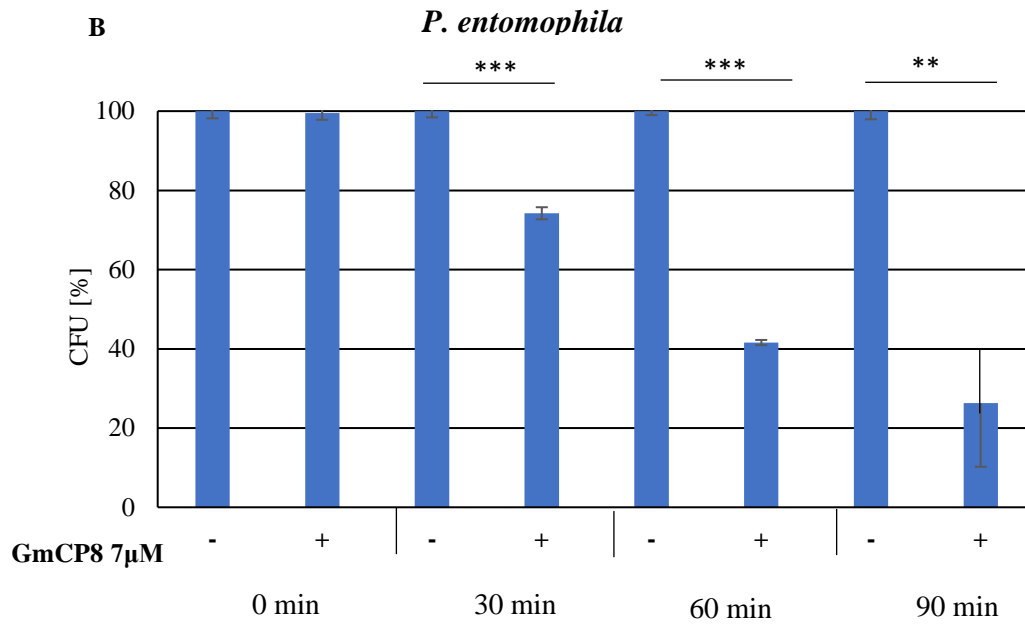
#### 4.3.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydu 20 czyli *Galleria mellonella cationic protein 8* (GmCP8)

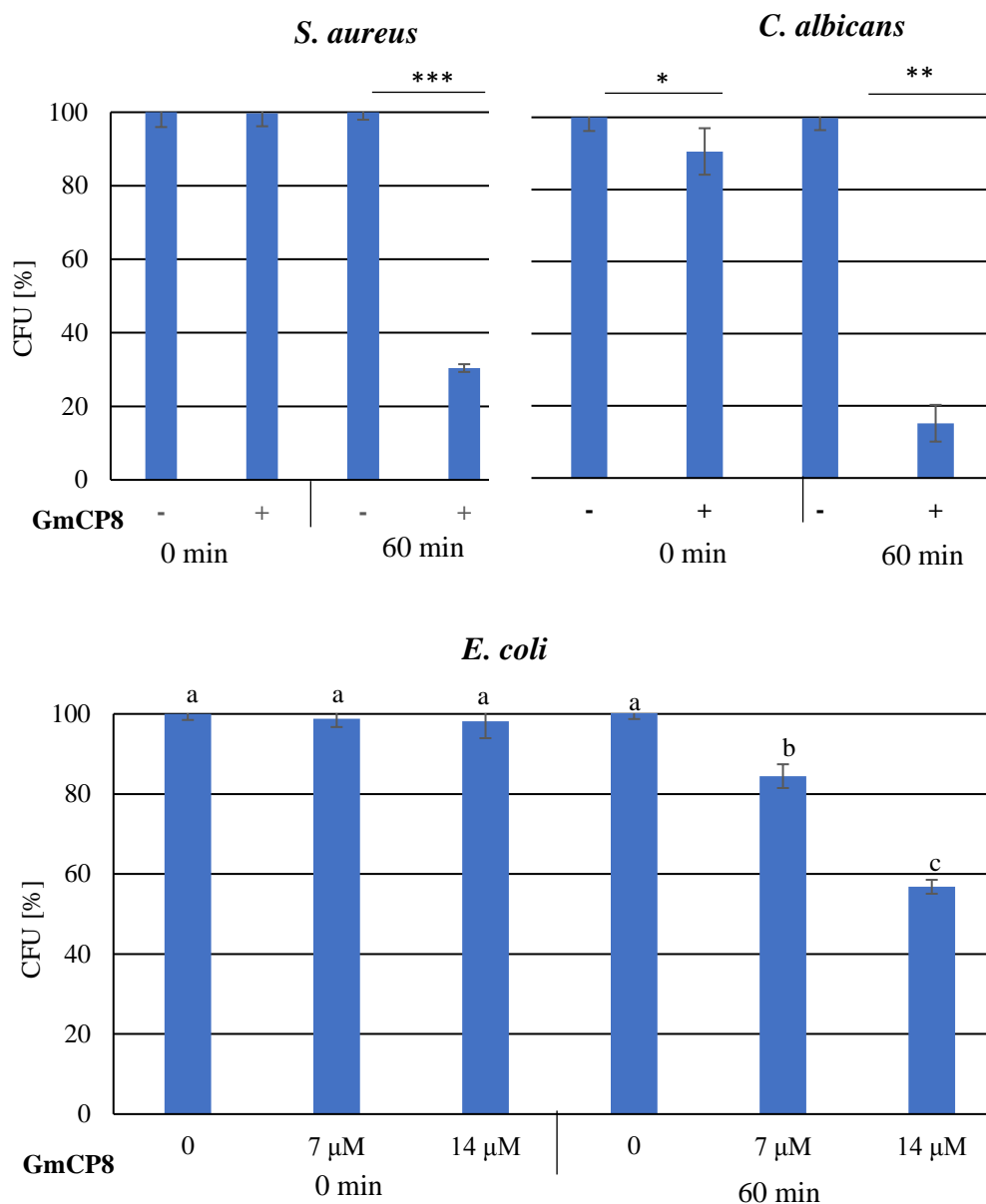
Wykonano badania których celem było sprawdzenie czy białko GmCP8 wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową. Aktywność tę przedstawiono jako procent kolonii bakteryjnych wyrosłych na płytkach po inkubacji bakterii z polipeptydem względem liczby kolonii bakterii wyrosłych w danym punkcie czasowym po inkubacji z wodą, uznaną za 100%. W pierwszym etapie doświadczeń zbadano aktywność białka GmCP8 przeciwko *P. entomophila* w trzech stężeniach (3,5  $\mu$ M, 7  $\mu$ M i 14  $\mu$ M). Na podstawie uzyskanych wyników zaprezentowanych na rycinie 20A stwierdzono, że białko to działa przeciwko *P. entomophila*, z najwyższą aktywnością obserwowaną w stężeniu 7  $\mu$ M,

dlatego też stężenie to zostało wybrane do dalszych analiz z wykorzystaniem białka GmCP8. W celu sprawdzenia kinetyki aktywności przeciwdrobnoustrojowej polipeptydu zależnie od czasu inkubacji z bakteriami zbadano poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej białka GmCP8 po 0, 30, 60 i 90 minutach inkubacji. Doświadczenie to wykazało, że średnia aktywność przeciwdrobnoustrojowa badanego białka wzrasta wraz z czasem inkubacji jak przedstawiono na rycinie 20B. Dalej polipeptyd inkubowano z bakteriami przez 60 minut aby zminimalizować możliwość podziału bakterii, które przeżyły inkubację z GmCP8. Ponadto, w czasie 90 minut odchylenie standardowe było bardzo duże. Sprawdzone aktywność białka GmCP8 w stężeniu 7  $\mu\text{M}$  wobec innych bakterii jak przedstawiono na rycinie 20C. Zbadano aktywność GmCP8 wobec entomopatogenicznej bakterii *Bacillus thuringiensis* – zaobserwowano pojawienie się około 50% kolonii w stosunku do grupy porównawczej, oraz ludzkich patogenów oportunistycznych *Pseudomonas aeruginosa* – odnotowano pojawienie się około 50% kolonii i *Staphylococcus aureus* – wyrosło około 30% kolonii, a także grzybów *Candida albicans* – wyrosło około 18% kolonii. W przypadku aktywności GmCP8 w stężeniu 7  $\mu\text{M}$  przeciwko *E. coli*, po inkubacji z białkiem wyrosło ponad 80% kolonii, dlatego przeprowadzono także doświadczenia z użyciem GmCP8 w wyższym stężeniu tj. 14  $\mu\text{M}$ , które redukowało liczbę wyrosłych kolonii ponad 50% (ryc. 20C) (Kordaczuk i in., 2022).









**Ryc. 20.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka GmCP8 wobec różnych mikroorganizmów. **A**– Aktywność białka GmCP8 w stężeniu 3,5  $\mu$ M, 7  $\mu$ M, 14  $\mu$ M wobec *P. entomophila*. Wynik stanowią średnie wartości  $\pm$  SD; różne litery pokazują różnicę statystyczną ( $p < 0,05$ , test ANOVA) **B**– Kinetyka aktywności białka GmCP8 względem *P. entomophila*. **C**– Aktywność białka GmCP8 wobec *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis*, *S. aureus*, *C. albicans* w stężeniu 7  $\mu$ M oraz *E. coli* w stężeniu 7  $\mu$ M i 14  $\mu$ M. Grupę porównawczą dla każdego punktu czasowego i badanego mikroorganizmu stanowiła równa ilość wody dodawana do próbki zamiast GmCP8. Próbkę wysiewano bezpośrednio (czas 0) i po 60 minutach inkubacji (w przypadku doświadczenia badającego kinetykę działania polipeptydu– także po 30 minut i 90 minut inkubacji (wykres A). Wyniki przedstawiono jako procent CFU rosnących po inkubacji z białkiem GmCP8 w stosunku do średniej liczby CFU bez dodawania białka (woda zamiast polipeptydu). Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń mieszaniny inkubacyjnej. Wskazano istotne różnice \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test t–studenta. W przypadku doświadczenia z *E. coli* różnice istotne

statystycznie między grupami zaznaczono literami ( $P < 0,05$ , test ANOVA) (Kordaczuk i in., 2022)

Aby poznać sposób działania polipeptydu GmCP8 na komórki drobnoustroju, przeprowadzono analizy zdolności badanego białka do permeabilizacji błony komórkowej. Szczep *E. coli* JM83 stosowany w doświadczeniach posiada plazmid pCH110 kodujący  $\beta$ -galaktozydazę. W przypadku przerwania ciągłości błony komórkowej dochodzi do uwalniania z komórek bakterii  $\beta$ -galaktozydazy. Jak widać (ryc. 21) poziom permeabilizacji korelował z aktywnością GmCP8 wobec *E. coli* JM83. Permeabilizacja błon wzrosła z 7% przy 7  $\mu$ M do prawie 25% przy 14  $\mu$ M zastosowanego białka. Tak więc omawiany polipeptyd powoduje perforację błony komórkowej *E. coli* JM83.

GmCP8	0	7 $\mu$ M	14 $\mu$ M
Perforacja [%]	0	7,13 (+/- 1,58)*	24, 8 (+/- 0,58)*

**Ryc. 21.** Permeabilizacja błony komórkowej *E. coli* JM38 po inkubacji GmCP8 w stężeniu 7  $\mu$ M i 14  $\mu$ M. Poziom perforacji określano wobec zawiesiny żywych bakterii inkubowanych z wodą traktowanych jako kontrola negatywna (0% perforacji), oraz bakterii zabitych 5  $\mu$ M syntetycznej cekropiny B, które przyjęto za kontrolę pozytywną (100% perforacji). Wyniki stanowią średnie wartości +/- SD n=3; Wskazano istotne różnice \*  $p < 0,05$  test t–studenta (Kordaczuk i in., 2022).

#### 4.3.4. Zmiany topografii powierzchni komórek mikroorganizmów po działaniu *Galleria mellonella cationic protein 8* (GmCP8)

W celu zobrazowania struktury powierzchni drobnoustrojów oraz parametrów biofizycznych po inkubacji z białkiem GmCP8 wykorzystano mikroskopię sił atomowych (AFM). Analizowano topografię powierzchni *P. entomophila* jako przedstawiciela bakterii Gram–ujemnych (ryc. 22– panel A), *B. thuringiensis* reprezentującego bakterie Gram–dodatnie (ryc. 22– panel B) oraz *C. albicans*–reprezentującej grzyby (ryc. 22– panel C) (Kordaczuk i in., 2022). Wykonano zdjęcia, tzw. *peak force error*, obrazujące topografię powierzchni komórki *P. entomophila* i widoczne różnice na powierzchni bakterii względem *P. entomophila* inkubowanego z wodą. Komórki bakterii inkubowane z GmCP8 zmieniły swoją typową morfologię i regularną strukturę przypominającą strukturę powierzchni orzecha. Trójwymiarowy obraz (3D) profilu powierzchni bakterii ujawnił, że powierzchnia bakterii *P. entomophila*

inkubowanych z białkiem posiada głębsze bruzdy i rowki (jak wskazano na osi Z: 98,9 nm) względem grupy kontrolnej inkubowanej z wodą (38,3 nm) (ryc. 22– panel A). Nakreślono profile powierzchni komórek bakterii i na ich podstawie stworzono wykresy, które jeszcze lepiej zobrazowały różnice w zmianach struktury powierzchni bakterii. Zaobserwowano, że bruzdy na powierzchni komórek bakterii inkubowanych z białkiem miały zróżnicowaną wielkość (głębokość około 20–30 nm i średnice 100–150 nm).

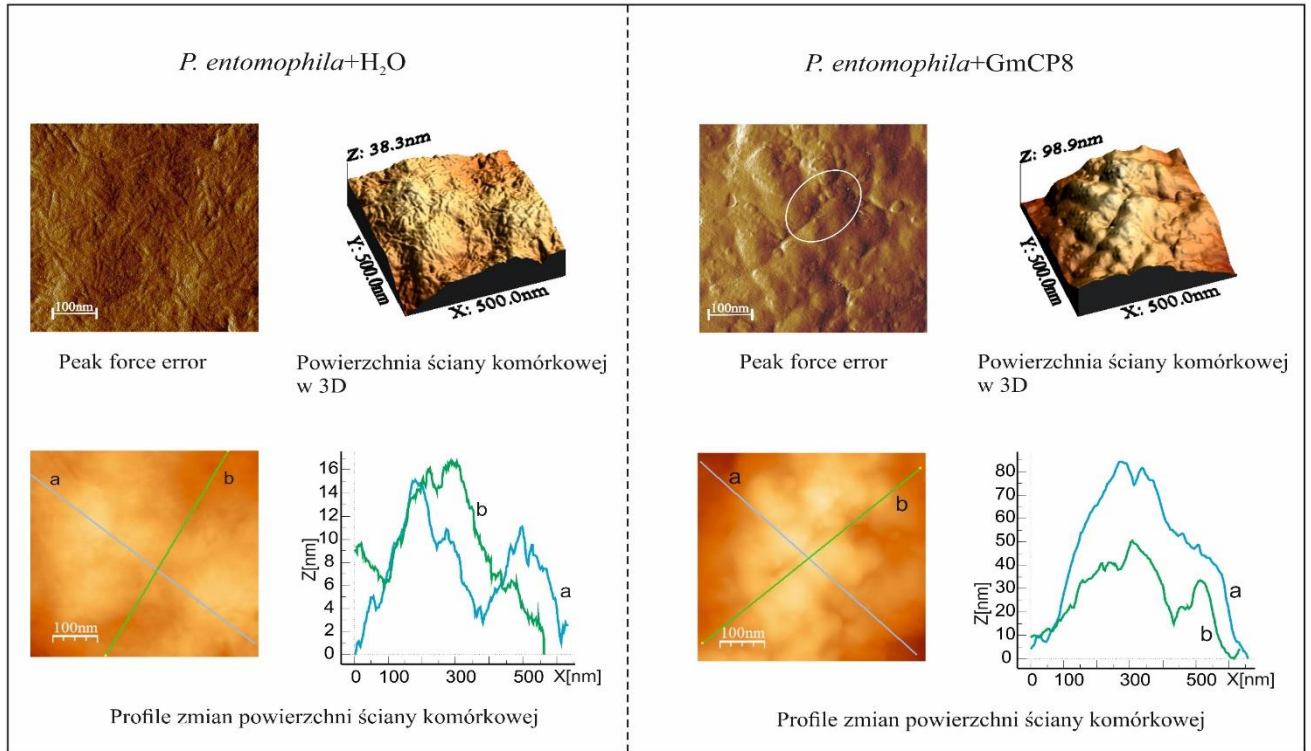
Inkubacja komórek *B. thuringiensis* z badanym białkiem także wpływała na zmianę struktury powierzchni bakterii. Pod wpływem GmCP8 bakterie *B. thuringiensis* straciły regularną strukturę powierzchni– została ona pokryta bruzdkami i pojawiły się nieregularne wgłębienia. Nakreślone profile powierzchni komórek bakterii ujawniły występowanie na powierzchni komórek wgłębień o głębokości 14–17 nm i szerokości do 150 nm (ryc. 22– panel B).

Powierzchnia *C. albicans* po inkubacji z białkiem GmCP8 także straciła swój regularny wzór. Na powierzchni komórek dostrzec można było nieregularnie rozmieszczone wgłębienia, grudki i ziarnistości. Wykonanie trójwymiarowego obraz (3D) oraz analiza zmian profili powierzchni komórek *C. albicans* wykazała jednak zmniejszenie głębokości bruzd i rowków na powierzchni względem komórek kontrolnych (ryc. 22– panel C).

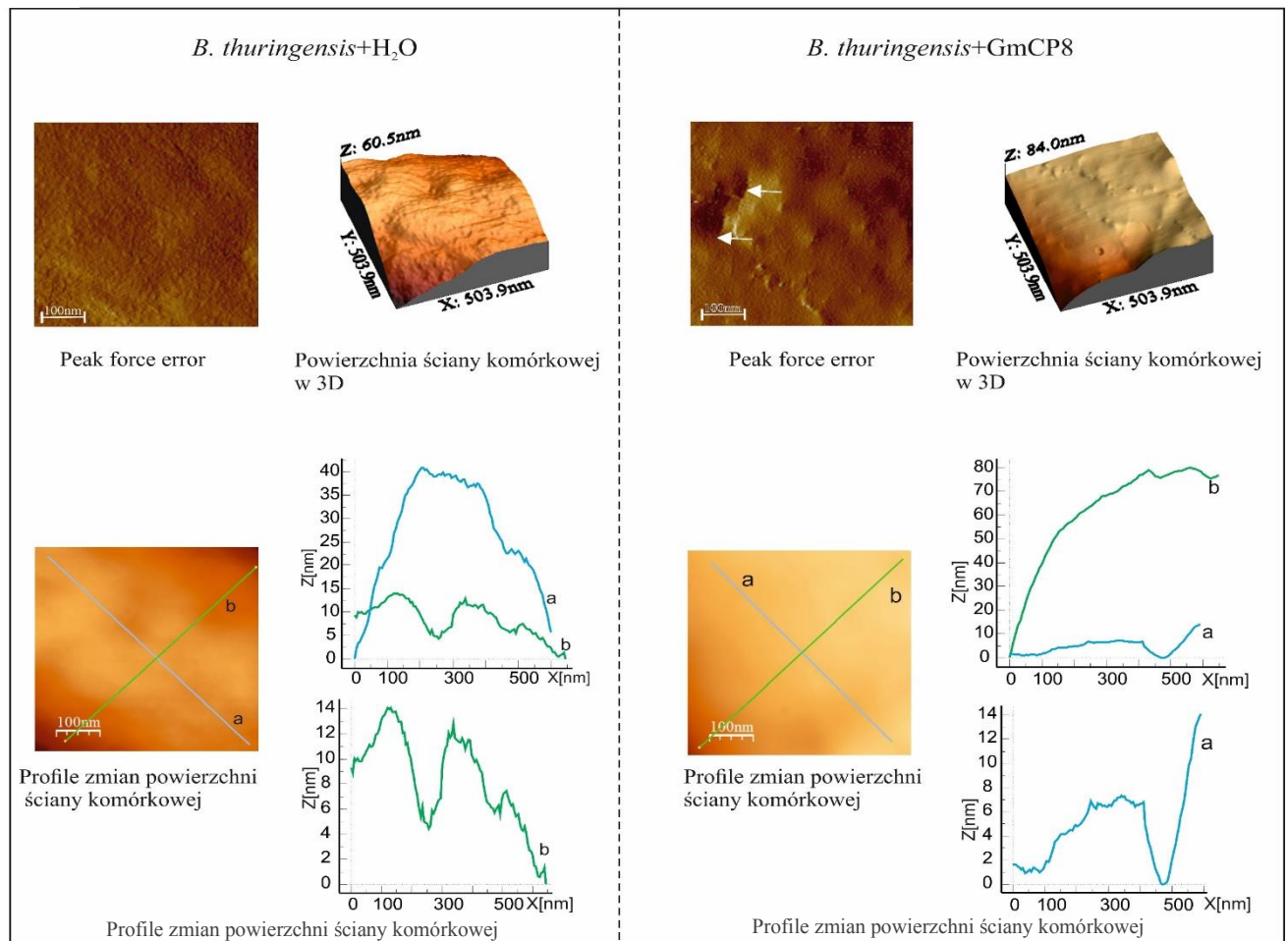
Względem każdego z analizowanych mikroorganizmów zbadano wpływ inkubacji z białkiem GmCP8 na zmiany właściwości fizycznych powierzchni komórek (ryc. 22– panel D). Dokonano pomiaru średniej chropowatości powierzchni komórek a także siły adhezji.

W przypadku *P. entomophila* wartość chropowatości powierzchni wzrosła około dwukrotnie do 2,059 ( $\pm 1,43$ ) nm względem komórek inkubowanych z wodą. Wykazano prawie dwukrotny wzrost siły adhezji po inkubacji z białkiem w porównaniu z komórkami kontrolnymi, wykazując zmiany właściwości biofizycznych powierzchni komórki. W przypadku inkubacji bakterii *B. thuringiensis* z badanym białkiem wykazano statystycznie istotny wzrost chropowatości do 3,081 ( $\pm 0,66$ ) nm oraz spadek sił adhezji (o ok. 1,5–krotny do 0,007 nN ) w porównaniu z bakteriami inkubowanymi z wodą. Komórki *C. albicans* po inkubacji z GmCP8 charakteryzowały się spadkiem średniej chropowatości do 0,6 ( $\pm 0,08$ ) nm, oraz dwukrotnym wzrostem wartości siły adhezji komórek z grupy kontrolnej (Kordaczuk i in., 2022).

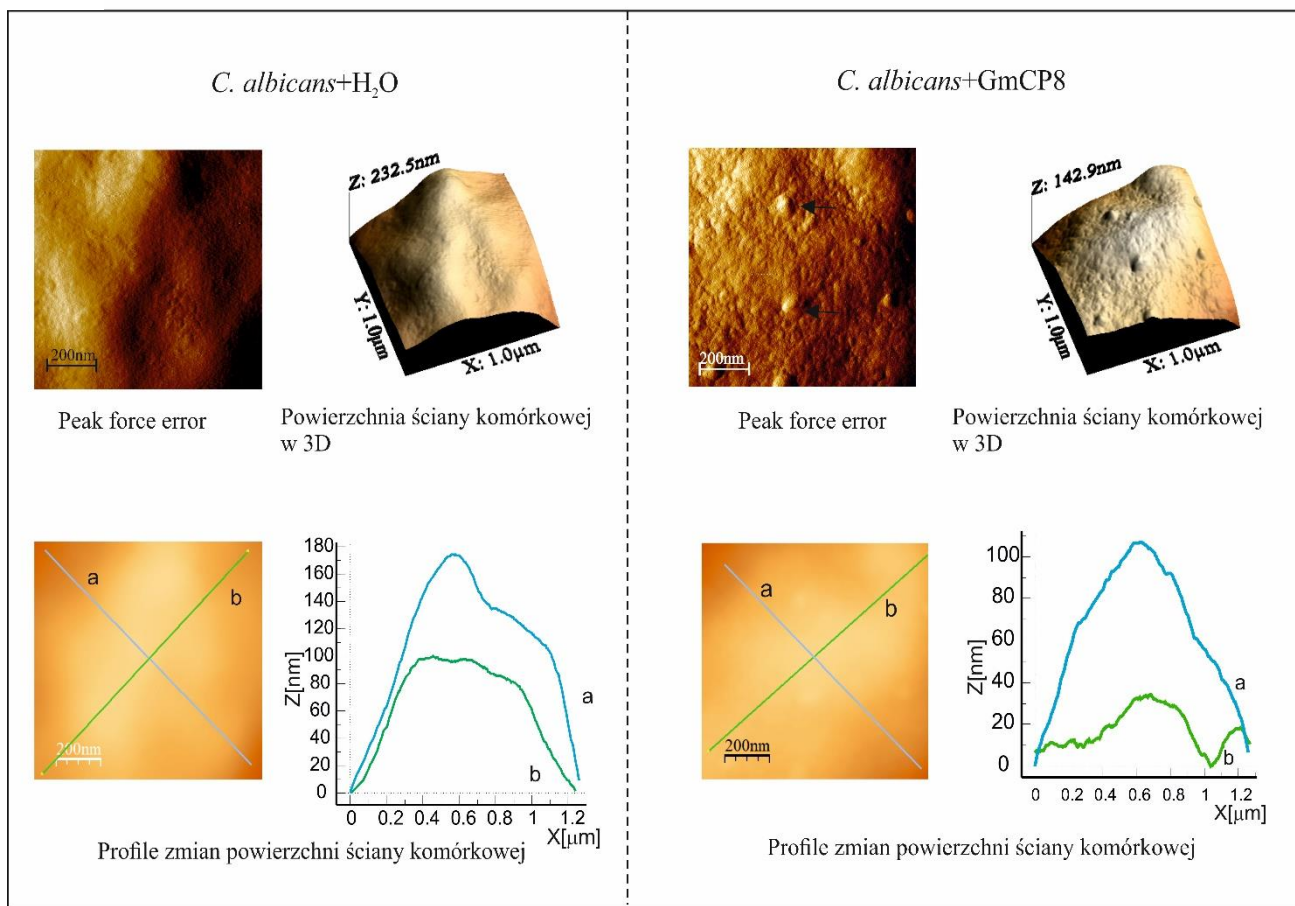
A



B



C



D

	Biofizyczne właściwości powierzchni komórkowej	
	Średnia chropowatość powierzchni (Ra) [nm]	Siła adhezji [nN]
<i>P.entomophila</i> +H <sub>2</sub> O	1.044(±0.36)	0.277(±0.009)
<i>P.entomophila</i> +GmCP8	2.059(±1.43)***	0.475(±0.054)***
<i>B.thuringiensis</i> +H <sub>2</sub> O	0.699(±0.09)	0.0115(±0.0009)
<i>B.thuringiensis</i> +GmCP8	3.081(±0.66)***	0.007(±0.0006)***
<i>C.albicans</i> +H <sub>2</sub> O	0.9(±0.17)	0.002(±0.005)
<i>C.albicans</i> +GmCP8	0.6(±0.08)***	0.004(±0.0008)***

**Ryc. 22.** Topografia powierzchni komórek **A**– *P. entomophila*, **B**– *B. thuringiensis* i **C**– *C. albicans* po godzinnej inkubacji z białkiem GmCP8. Grupę porównawczą stanowiły mikroorganizmy, które inkubowano przez godzinę z równą objętością wody. Wszystkie zdjęcia wykonane przy pomocy Mikroskopii Sił Atomowych (AFM). Przedstawiono obraz wysokościowy– *peak force error* oraz powierzchnię komórek w 3D (obszar 500 nm × 500 nm dla *P. entomophila*, 1 µm × 1 µm dla *B. thuringiensis* i *C. albicans*) a także profile zmian powierzchni komórek wytyczone wzdłuż linii a i b zaznaczonych na obrazie *peak force error*. **D**– W tabeli przedstawiono parametry biofizyczne powierzchni analizowanych komórek, takie jak

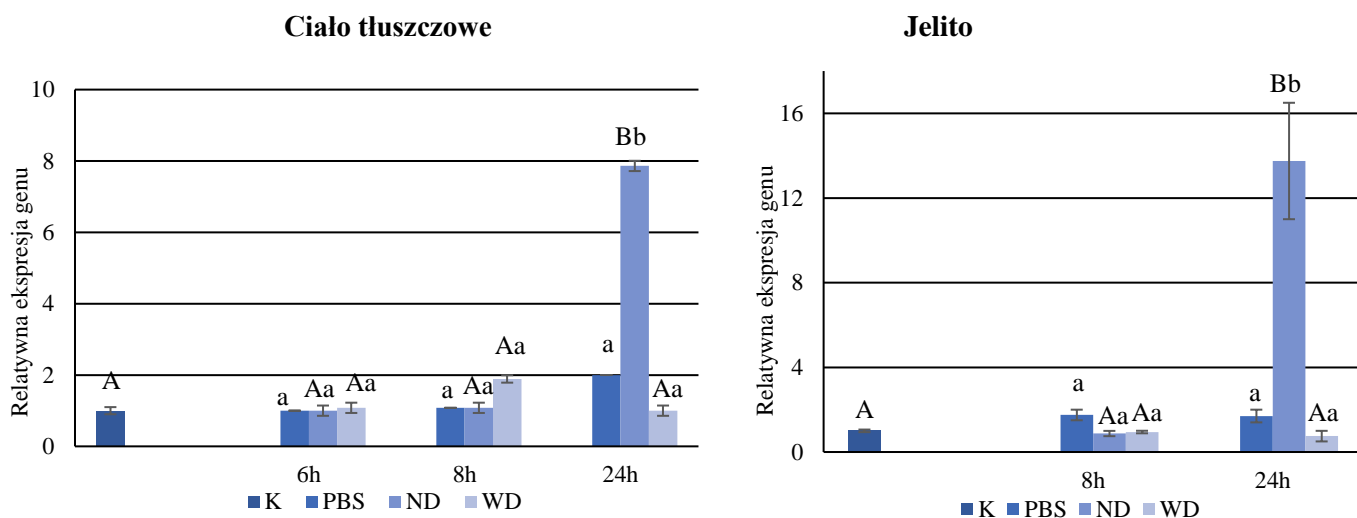
chropowatość i wartości siły adhezji. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD; n=114. Wskazano różnice istotne statystycznie \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; test t–studenta (Kordaczuk i in., 2022)

Podsumowując tę część pracy, białko GmCP8 wykazuje aktywność przeciw wszystkim zastosowanym w doświadczeniach szczepom bakterii i grzybów oraz prowadzi do zmian topografii powierzchni i biofizycznych właściwości ściany komórkowej bakterii *P. entomophila*, *B. thuringiensis* i drożdżaka *C. albicans*. Polipeptydy ten wykazuje zdolność do przerwania ciągłości błony komórkowej *E. coli* JM83.

#### **4.4. Charakterystyka białka 48– *Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform X1* (Ebsp3)**

##### **4.4.1. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego *Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform X1* (Ebsp3)**

Celem sprawdzenia ewentualnej roli białka Ebsp3 w mechanizmach odpornościowych *G. mellonella*, analizowano poziom ekspresji genu w ciele tłuszczowym a także w jelitach larw zakażonych *P. entomophila*. Wynik analiz przedstawiono na rycinie 23. W odpowiedzi na zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* dochodziło do indukcji ekspresji genu kodującego białko Ebsp3 w ciele tłuszczowym i jelitach pobranych 24 godziny od zakażenia niższą dawką *P. entomophila*. Nie odnotowano indukcji ekspresji genu w tym samym punkcie czasowym po zakażeniu larw wyższą dawką. W pozostałych punktach czasowych poziom ekspresji genu kodującego białko Ebsp3 nie ulegał zmianie w wyniku zakażenia bakteriami.



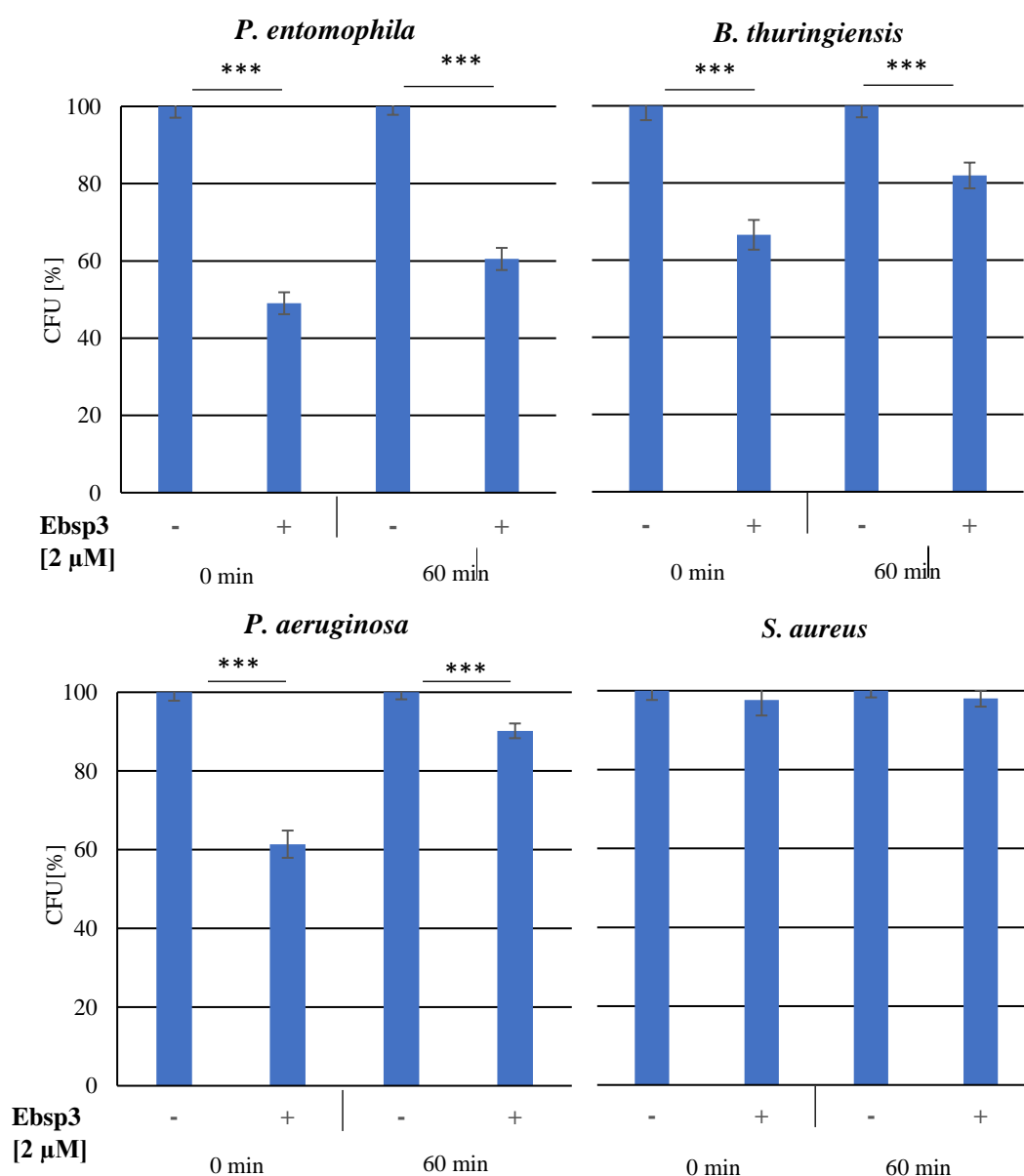
**Ryc. 23.** Ekspresja genu kodującego białko Ebsp3 w ciele tłuszczowym i jelitach larw kontrolnych (**K**); z grupy porównawczej, której podawano 10 μl PBS (**PBS**); larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10 μl zawiesiny (**ND**), larw zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10 μl zawiesiny (**WD**). Wyniki przedstawiono jako relatywną wartość w stosunku do kontroli (±SD, n=3). Dużymi literami zaznaczono analizę istotności statystycznej w obrębie różnych punktów czasowych w danej grupie i kontroli, natomiast małymi literami zaznaczono różnice między grupami w obrębie określonego punktu czasowego (P<0,05, test ANOVA).

#### 4.4.2. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej białka 48–*Ejaculatory bulb-specific protein 3-like isoform X1* (Ebsp3)

Wykonano badania, których celem było sprawdzenie czy analizowany polipeptyd posiada aktywność przeciwdrobnoustrojową (ryc. 24). Okazało się, że spadek liczby wyrosłych kolonii w wyniku działania białka był najwyższy bezpośrednio po jego dodaniu do bakterii, czyli w tzw. czasie 0. W przypadku działania białka na *P. entomophila*, dodanie białka i natychmiastowe wysianie doprowadziło do wyrośnięcia około 50% kolonii bakteryjnych w stosunku do liczby CFU po dodaniu wody zamiast Ebsp3. Białko Ebsp3 po 60 minutach inkubacji z *P. entomophila* prowadziło do spadku liczby komórek bakterii do około 60% względem liczby wyrosłych kolonii po inkubacji białka z wodą. Sprawdzono aktywność Ebsp3 wobec innego bakteryjnego entomopatogenu *B. thuringiensis*, wykazując spadek liczby CFU do prawie 70% wartości wyjściowej bezpośrednio po zmieszaniu bakterii z białkiem i do około 85% po 60 minutach inkubacji. Badania aktywności przeciwbakteryjnej białka Ebsp3 wykonano



także względem dwóch ludzkich patogenów oportunistycznych– *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Wykazano, że badany polipeptyd powoduje spadek liczby komórek *P. aeruginosa* do około 60% bezpośrednio po dodaniu do bakterii. Aktywność Ebsp3 przeciw *P. aeruginosa* po 60 minutach inkubacji prowadziła do niewielkiej redukcji liczby kolonii, bowiem wyrosło aż około 92% kolonii w stosunku do liczby kolonii po inkubacji w wodą. W analizowanych stężeniach nie wykazano aktywności badanego białka względem bakterii *S. aureus* zarówno bezpośrednio po jego dodaniu do bakterii jak i po 60 minutach inkubacji.



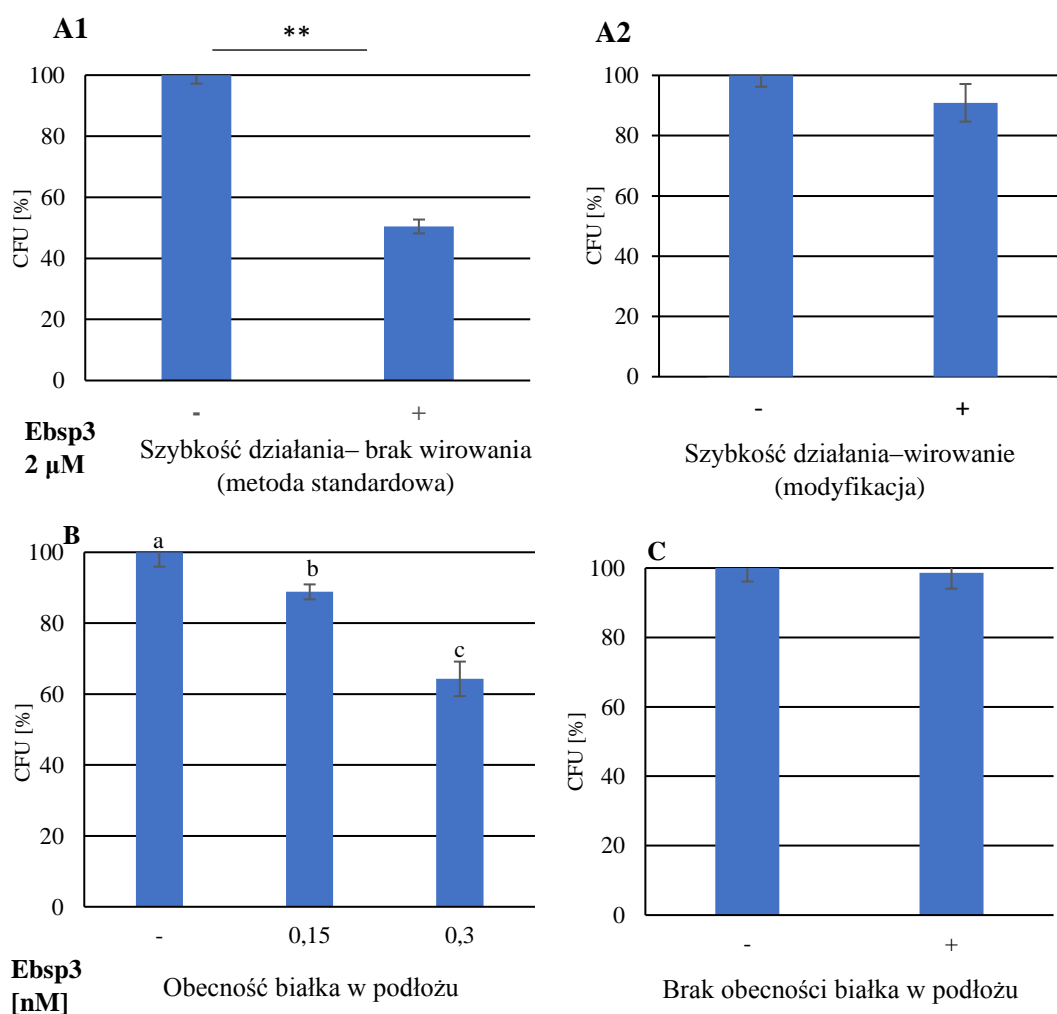
Ryc. 24. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka Ebsp3 w stężeniu 2 μM w mieszaninie inkubacyjnej względem *P. entomophila*, *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*. Grupę

porównawczą dla każdego punktu czasowego i badanego mikroorganizmu stanowiła próbka z równą ilością wody dodanej do próbki zamiast Ebsp3. Próbkę wysiewano bezpośrednio (czas 0) i po 60 minutach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako procent CFU wyrosłych po inkubacji z polipeptydem Ebsp3 w stosunku do średniej liczby CFU bez dodawania polipeptydu. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń. Wskazano istotne różnice \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test t–studenta.

Celem sprawdzenia przyczyny opisanego powyżej zjawiska, zaplanowano szereg doświadczeń, których wyniki pozwoliły lepiej poznać sposób działania białka Ebsp3. Jedną z możliwości wytłumaczenia działania badanego białka bezpośrednio po jego dodaniu do bakterii *P. entomophila* (czas 0) mógłby być fakt, że działałoby on bardzo szybko, zaś komórki które przeżyłyby, mogłyby ulec podziałom w czasie godzinnej inkubacji. Celem weryfikacji tej hipotezy metodę zmodyfikowano i bezpośrednio po dodaniu Ebsp3, mieszaninę odwirowano, aby oddzielić pozostające w roztworze białko Ebsp3 od bakterii. Gdyby hipoteza była prawdziwa, spadek liczby kolonii byłby nadal widoczny. Jednak jak przedstawiono na rycinie 25 A2 w tak wykonanym doświadczeniu nie zaobserwowano działania Ebsp3 na *P. entomophila*, podczas gdy w doświadczeniu wykonanym bez wirowania, którego wyniki przedstawiono na rycinie 25 A1, spadek liczby CFU po dodaniu białka był obserwowany. Ponieważ odrzucono hipotezę o błyskawicznym działaniu białka Ebsp3, wyciągnięto wniosek, że jego wpływ na bakterie ma miejsce nie tyle bezpośrednio po dodaniu białka do zawiesiny mikroorganizmów, ale na płytkach, już po wysianiu, gdzie wciąż znajdowało się białko, jednak minimum 10000 razy rozcieńczone w stosunku do stężenia w mieszaninie inkubacyjnej przed wysianiem oraz dodaniem do LB (pożywka 1) zawierającym 0,7% agar (rozdział 3.3.18). Aby zweryfikować postawioną hipotezę do próbki zawierającej bakterie *P. entomophila* nie dodawano białka Ebsp3, a zawiesinę wysiano na płytce w wariacie bez badanego polipeptydu (kontrola) lub zawierające białko Ebsp3 w stężeniach zbliżonych do stężenia uzyskanego w wyniku wysiania rozcieńczonej mieszaniny bakterii z białkiem. Tym razem, hipoteza została potwierdzona (ryc. 25 B). Powodem zmniejszenia liczby kolonii w próbce po dodaniu białka, była jego obecność w pożywce stałej. Białko działało w bardzo niskich stężeniach. Na płytkach zawierających 0,15 nM białko Ebsp3 wyrosło około 90% bakterii w stosunku do ich liczby na płytkach bez białka oraz około 60% w obecności białka Ebsp3 w stężeniu 0,3 nM względem liczby kolonii wyrosłych na płytkach niezawierających polipeptydu.

Wynika z tego, że brak lub zmniejszenie działania Ebsp3 po godzinnej inkubacji z bakteriami może być spowodowane, zmianami zachodzącymi w trakcie godzinnej inkubacji w samym białku pod wpływem bakterii, lub w bakteriach pod wpływem białka. Wykazano, że bakterie po inkubacji z Ebsp3 i po zwirowaniu są nadal wrażliwe na jego działanie (dane nie przedstawione). Okazało się jednak, że polipeptyd Ebsp3 po inkubacji z zawiesiną bakterii tracił aktywność co potwierdza wynik przedstawiony na rycinie 25 C. Dowiedziono tego, wirując mieszaninę inkubacyjną białka Ebsp3 z bakteriami (po godzinnej inkubacji), a następnie sprawdzając aktywność supernatantu, w którym znajdował się polipeptyd wobec świeżo przygotowanej zawiesiny bakterii *P. entomophila*. Nie zaobserwowano zmniejszenia liczby wyrosłych bakterii.

Podsumowując, białko Ebsp3 po 60 minutach inkubacji z bakteriami, traciło aktywność przeciwdrobnoustrojową.



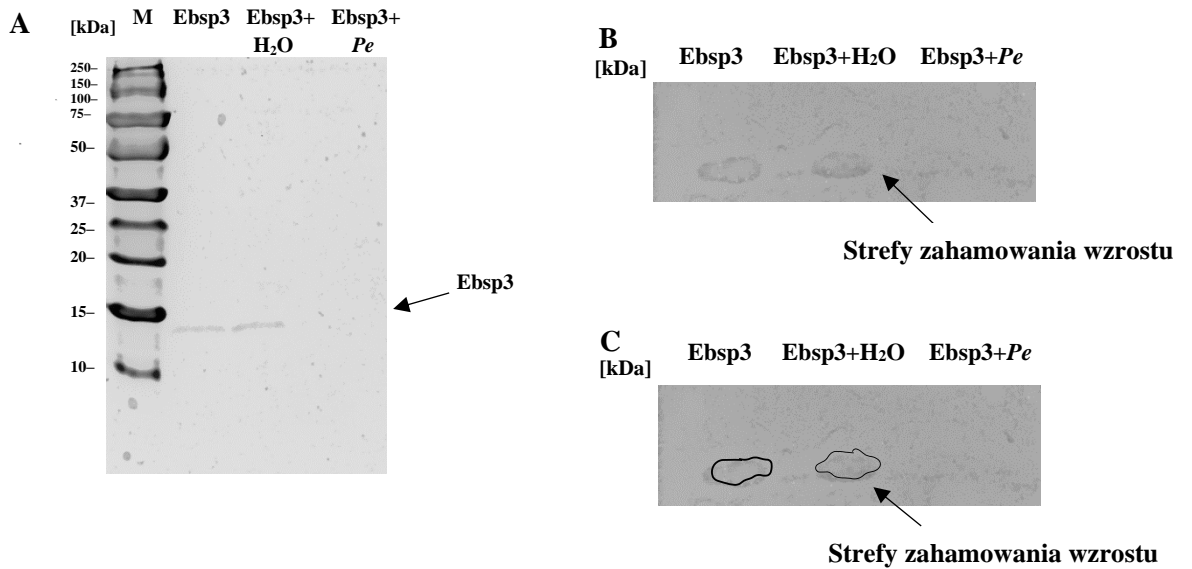
Ryc. 25. Analiza właściwości białka Ebsp3. A– Analiza szybkości działania białka Ebsp3

w stężeniu 2  $\mu\text{M}$  w mieszaninie inkubacyjnej względem *P. entomophila*. Próbkę porównawczą (tj. bakterie z wodą) (-) i badane – bakterie z polipeptydem (+) wysiewano bez inkubacji, tj. w czasie 0 i bez uprzedniego wirowania (**A1**) oraz poddane wirowaniu celem oddzielenia bakterii od badanego białka (**A2**). Wyniki przedstawiono jako procent CFU wyrosłych bezpośrednio po zmieszaniu z białkiem Ebsp3 w stosunku do średniej liczby CFU bez dodawania białka. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń. Wskazano istotne różnice \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test t – studenta. **B** – Wpływ obecności Ebsp3 w podłożu stałym na wzrost *P. entomophila*. Wynik stanowią średnie wartości  $\pm$  SD; Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń. Różne litery pokazują różnicę statystyczną ( $p < 0,05$ ). **C** – Aktywność supernatantu pochodzącego z mieszaniny inkubacyjnej *P. entomophila* i białka Ebsp3 inkubowanych godzinę, określana wobec bakterii *P. entomophila* (+) względem grupy porównawczej tj. bakterii inkubowanych z wodą (-). Przedstawiono średnie wartości CFU  $\pm$  SD. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń. Nie wykazano istotnych różnic ( $p > 0,05$ ).

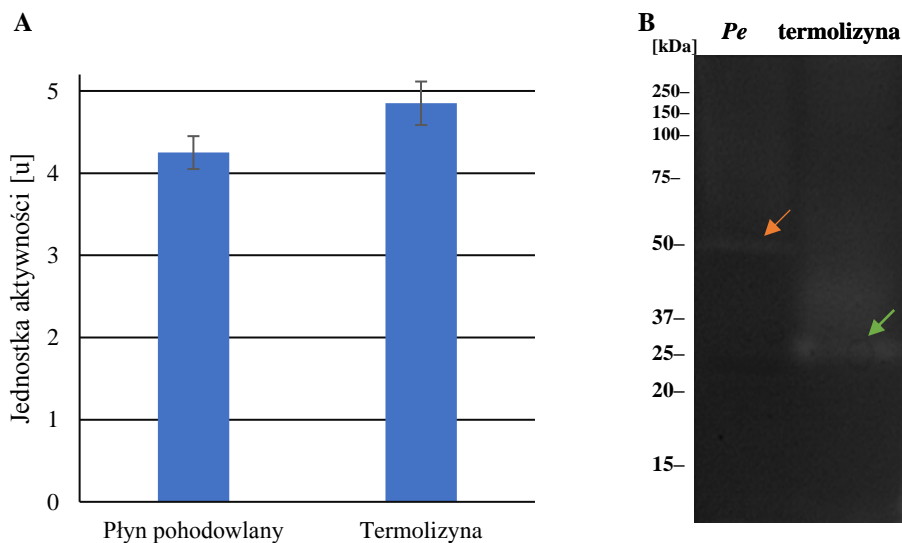
Dalej wykryto, że pod wpływem inkubacji białka z zawiesiną bakterii jest ono degradowane, co pokazuje zarówno żel, na którym wybarwione białko Ebsp3 zanika (ryc. 26 A) oraz bioautografia, ukazująca równoległą utratę aktywności wobec *P. entomophila* (ryc. 26 B).

W kolejnym doświadczeniu wykazano, że odwirowany płyn pochodzący z *P. entomophila* wykazuje aktywność proteolityczną (ryc. 27 A). Wykonano to metodą spektrofotometryczną (rozdział 3.3.26) oraz metodą zymografii (rozdział 3.3.13). W zymografii obserwowano jest trawienie kazeiny na wysokości około 50 kDa, co wskazuje na masę cząsteczkową enzymu (Ryc. 27B).

Podsumowując, wykazano, że Ebsp3 jest wrażliwy na proteazy wydzielane przez *P. entomophila*.



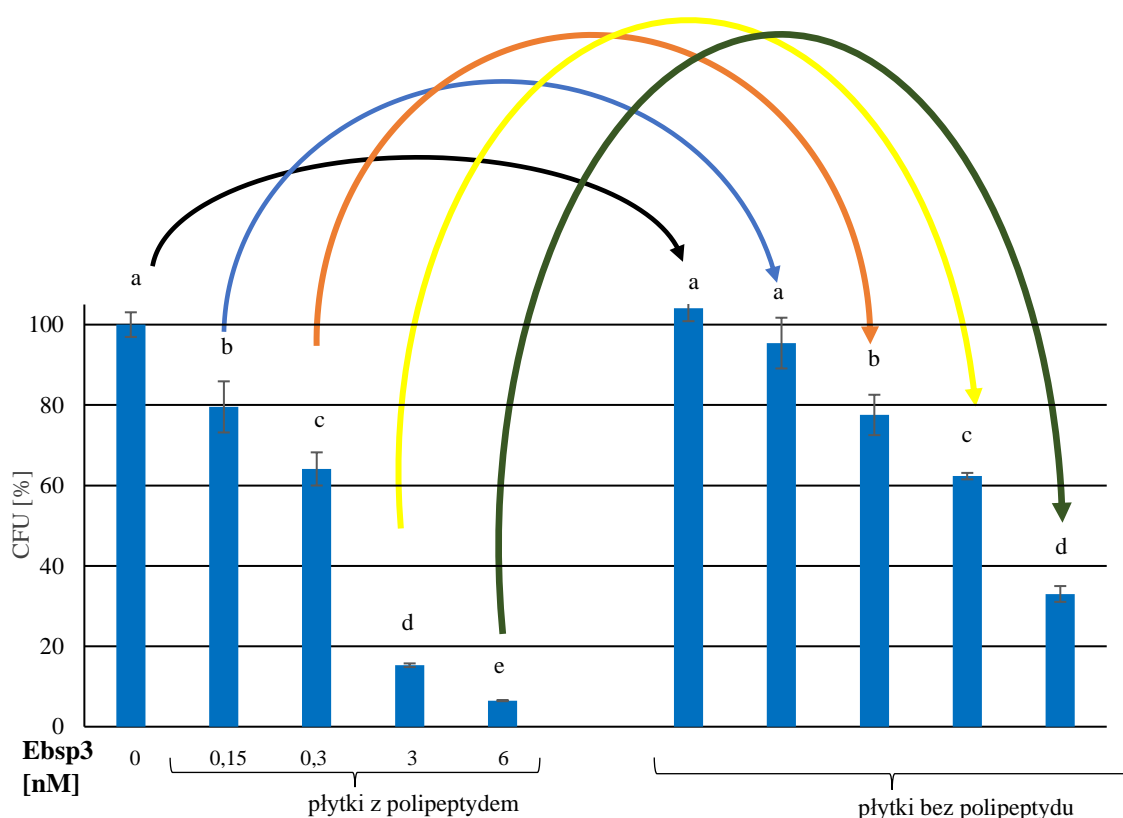
**Ryc. 26.** A– Analiza elektroforetyczna białka Ebsp3 (0,8 µg białka), oraz białka Ebsp3 po 60 minutach inkubacji z wodą (Ebsp3+H<sub>2</sub>O) oraz białka Ebsp3 po inkubacji przez 60 minut z zawiesiną *P. entomophila* (Ebsp3+Pe). B– Te same próbki nanoszono na żel i wykonywano bioautografię (rozdział 3.3.12). C– Strefy zahamowania wzrostu *P. entomophila* zaznaczone czarną obwódką. Zniknięciu białka (A) towarzyszył zanik aktywności przeciwbakteryjnej (B i C).



**Ryc. 27.** Aktywność proteolityczna płynu pochodowlanego *P. entomophila* badana metodą: A– spektrofotometryczną. Płyn pochodowlany otrzymano i inkubowano z azokazeiną według metody opisanej w rozdziale 3.3.26. Termolizyna została zastosowana jako kontrola pozytywna. Obie próbki wykazywały aktywność proteolityczną. Wynik stanowią średnie wartości  $\pm$  SD; n=3). B– zymografii, tj. po uprzednim rozdziale elektroforetycznym materiału. Na żel nanoszono płyn pochodowlany zawierający 2 µg białka. Aktywność proteolityczną płynu pochodowlanego po rozdziale elektroforetycznym porównywano z aktywnością termolizyny. Pomarańczową strzałką zaznaczono kazeinę wytrawioną przez białko o aktywności proteolitycznej, zieloną strzałką zaznaczono strawioną kazeinę przez termolizynę.

#### 4.4.3. Analiza sposobu działania białka *Ejaculatory bulb-specific protein 3-like isoform XI* (Ebsp3)

Ponieważ aktywność polipeptydu Ebsp3 miała miejsce na płytkach, gdzie jego stężenie było dużo niższe niż stężenia w jakich działają znane peptydy odpornościowe, sprawdzono czy działanie tego białka polega na hamowaniu podziałów komórkowych (działanie cytostatyczne), czy też na zabijaniu bakterii (działanie cytobójcze). Zmodyfikowaną metodą „*replica plating*” (przeniesienia kolonii bakteryjnych z jednej płytki na drugą) wykazano, że białko Ebsp3 nie prowadzi do całkowitego zabicia bakterii (ryc. 28). Ilość kolonii bakteryjnych na płytkach przeniesionych na pożywkę bez polipeptydu była większa po 24 godzinnej inkubacji w 30°C względem CFU kolonii na płytkach z polipeptydem, z których przenoszono bakterie.



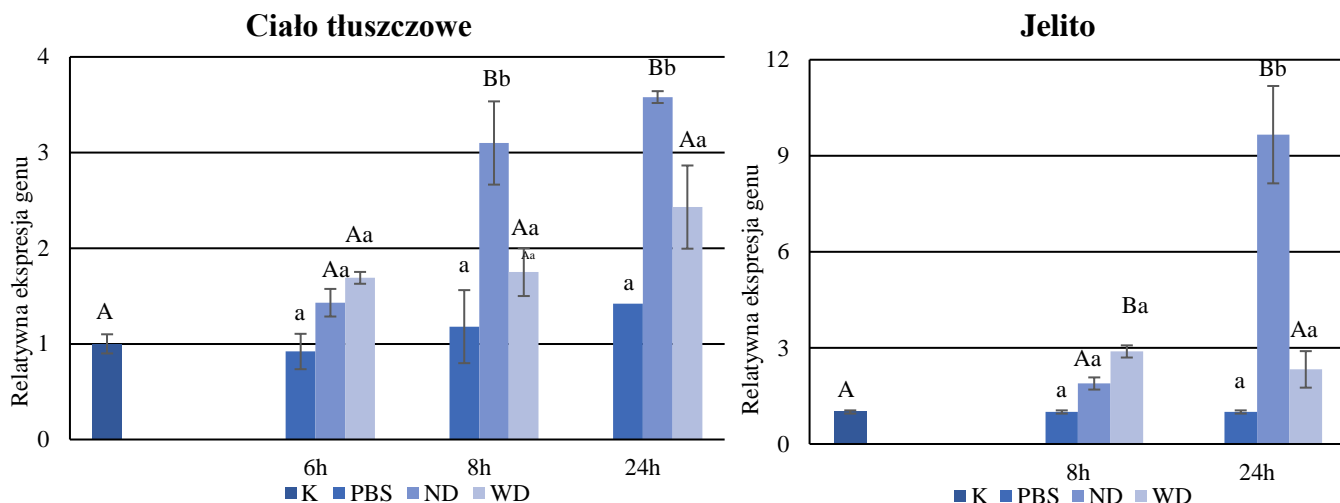
**Ryc. 28.** Badanie właściwości białka Ebsp3 względem bakterii *P. entomophila*. Aktywność przeciwbakteryjna białka Ebsp3 dodanego bezpośrednio do podłoża względem próby porównawczej (0). Mieszaninę bakterii z wodą (odpowiednik próbki kontrolnej stanowiącej mieszaninę mikroorganizmu i wody wysiewanej bez inkubacji z rozdziału 3.3.18) wysiewano na płytki, a po wyrośnięciu kolonii bakteryjnych *P. entomophila* poddano je „kopiowaniu” metodą

„Replica plating”. Wyniki przedstawiono jako procent CFU wyrosłych po inkubacji na płytkach z białkiem Ebsp3 dodanym do podłoża lub poddanych „kopiowaniu” w stosunku do średniej liczby CFU uzyskanej na płytkach bez białka (próbka 0). Wynik stanowią średnie wartości  $\pm$ SD, n=3; różne litery pokazują różnicę statystyczną ( $p < 0,05$ , test ANOVA).

## **4.5. Charakterystyka białka 41– *Odorant binding protein 7 (OBP7)***

### **4.5.1. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego *Odorant binding protein 7 (OBP7)***

Kolejnym charakteryzowanym polipeptydem było białko OBP7. Analizowano poziom ekspresji genu w ciele tłuszczowym i jelicie larw *G. mellonella* zakażonych bakteriami *P. entomophila* drogą pokarmową. W odpowiedzi na zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* ekspresja genu kodującego białko OBP7 wzrosła około 3–krotnie w ciele tłuszczowym pobranym 8 i 24 godziny od owadów zakażonych niższą dawką bakterii. Obserwowano także wzrost poziomu ekspresji badanego genu w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego larw zakażonych wyższą dawką *P. entomophila*, był on jednak istotnie statystycznie niższy względem poziomu ekspresji obserwowanego w materiale pochodzącym z larw zakażonych niższą dawką bakterii. Ponadto, ponad 9–krotny wzrost poziomu ekspresji genu kodującego białko OBP7 wykazano w jelicie pobranych po 24 godzinach od zakażenia larw. Wzrost ten obserwowano jedynie po zakażeniu niższą dawką bakterii. W pozostałych punktach czasowych poziom ekspresji genu kodującego białko OBP7 nie ulegał zmianie w wyniku zakażenia bakteriami. Omawiane wyniki przedstawiono na rycinie 29.



**Ryc. 29.** Ekspresja genu kodującego białko OBP7 w ciele tłuszczowym i jelitach larw kontrolnych (**K**), z grupy porównawczej, której podawano 10µl PBS (**PBS**); larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10 µl zawiesiny (**ND**), larw zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10µl zawiesiny (**WD**). Wyniki przedstawiono jako relatywną wartość w stosunku do kontroli (±SD, odchylenie standardowe, n=3). Dużymi literami zaznaczono analizę istotności statystycznej w obrębie różnych punktów czasowych w danej grupie i kontroli, natomiast małymi literami zaznaczono różnice między grupami w obrębie określonego punktu czasowego (P<0,05, test ANOVA).

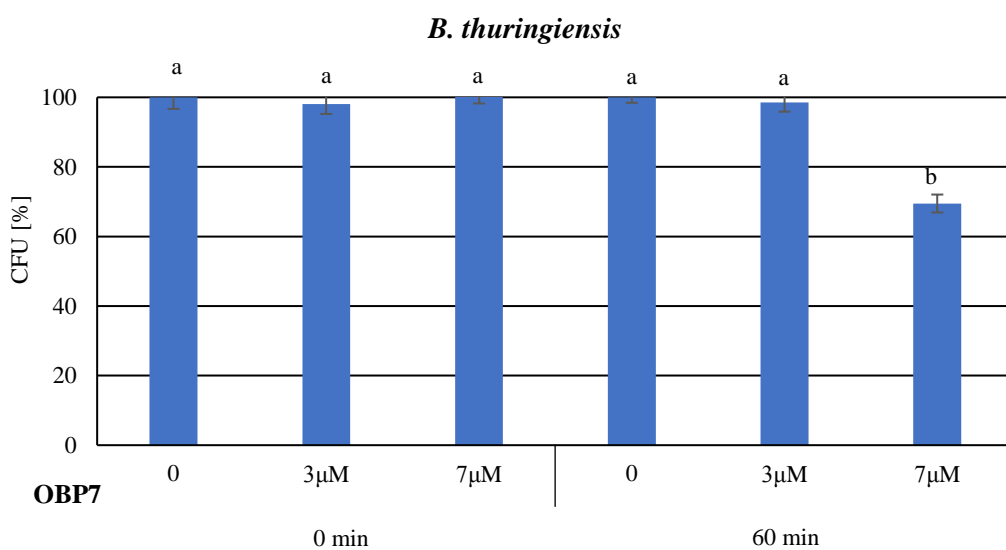
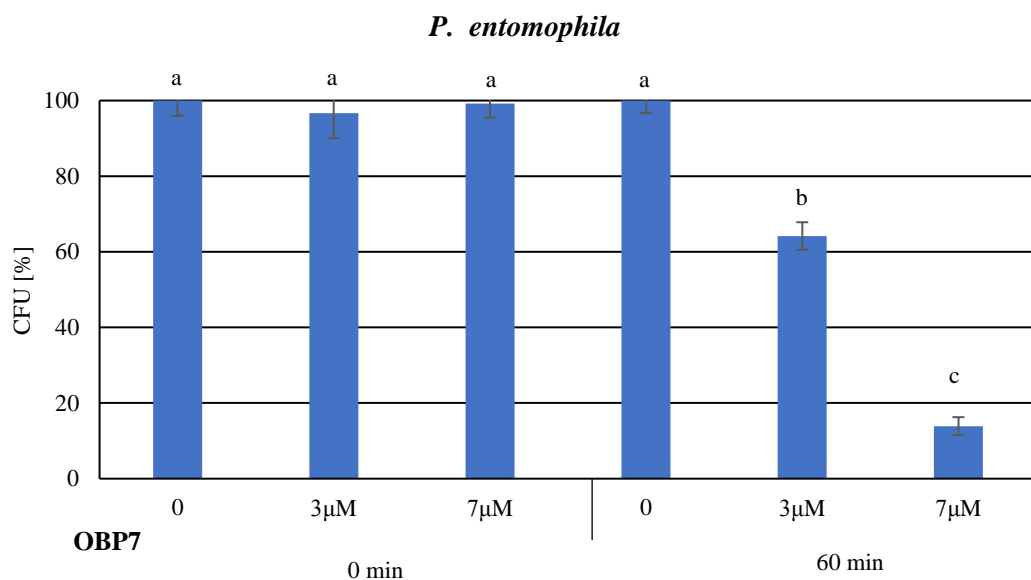
#### 4.5.2. Aktywność przeciwbakteryjna białka *Odorant binding protein 7* (OBP7)

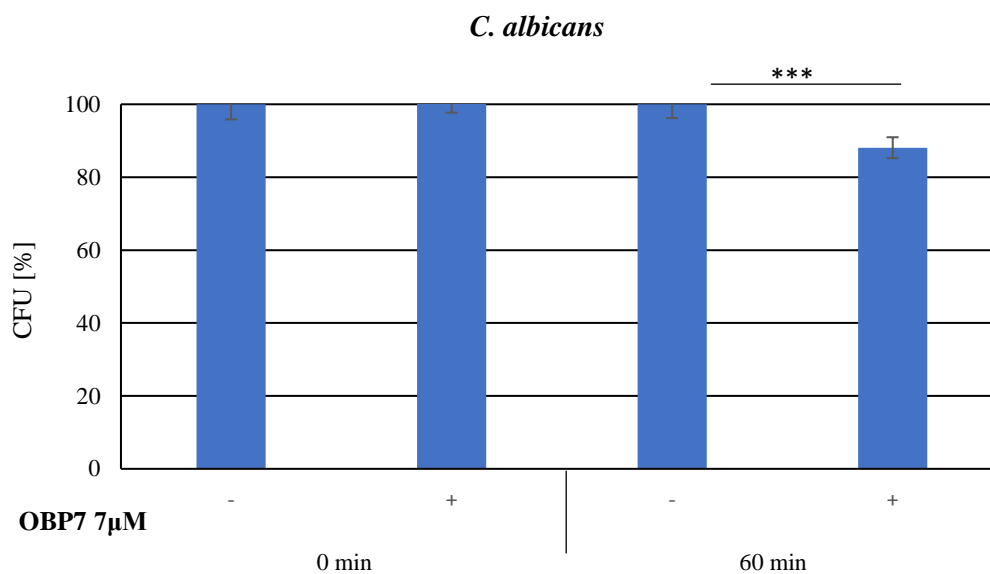
Podobnie jak w przypadku opisanych powyżej polipeptydów, badano aktywność białka OBP7. Ze względu na małą ilość uzyskanego preparatu zbadano aktywność białka wobec *P. entomophila* (przedstawiciel bakterii Gram–ujemnych), *B. thuringiensis* (przedstawiciel bakterii Gram–dodatni) oraz przeciwko grzybom *C. albicans*. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 30. Bakterie wysiewano bezpośrednio po dodaniu białka, a także po 60 minutach inkubacji z badanym polipeptydem lub z wodą. Na podstawie wyników doświadczeń okazało się, że białko działa przeciwko *P. entomophila* w obu badanych stężeniach– tj. 3 µM i 7 µM przy czym w obecności białka w stężeniu 3 µM obserwowano spadek do około 60% CFU w stosunku do liczby kolonii wyrosłych w grupie porównawczej inkubowanej z wodą. Stężenie białka 7 µM prowadziło do spadku kolonii bakteryjnych do około 18% w stosunku do liczby CFU po dodaniu wody zamiast OBP7. Następnie zbadano aktywność białka OBP7 względem



## Analiza wyników

*B. thuringiensis* w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  i 7  $\mu\text{M}$ . Na podstawie wyników dowiedziono, że białko OBP7 w stężeniu 3  $\mu\text{M}$  nie wykazuje istotnej aktywności przeciw *B. thuringiensis*. Aktywność OBP7 względem *B. thuringiensis* obserwowano po godzinnej inkubacji z białkiem w stężeniu 7  $\mu\text{M}$ . Prowadziła ona do spadku CFU do około 70% względem liczby CFU po dodaniu wody zamiast OBP7 w tym samym czasie. Wykazano, że 60–minutowa inkubacja białka OBP7 z drożdżakiem *C. albicans* prowadziła do spadku CFU do około 85% względem liczby CFU wyrosłych po dodaniu wody zamiast OBP7 w tym samym czasie.





**Ryc. 30.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka OBP7 względem *P. entomophila*, *B. thuringiensis* i *C. albicans*. Grupę porównawczą dla każdego punktu czasowego i badanego mikroorganizmów stanowiła próbka zawierająca równą ilość wody zamiast OBP7. Próbkę wysiewano bezpośrednio (czas 0) i po 60 minutach. Wyniki przedstawiono jako procent CFU rosnących po inkubacji z białkiem OBP7 w stosunku do średniej liczby CFU po inkubacji z wodą. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i każdorazowo w obliczeniach uwzględniano dane z 2 rozcieńczeń. W przypadku porównywania więcej niż 2 grup, grupy oznaczone tą samą literą nie wykazują między sobą statystycznie istotnej różnicy ( $P > 0,05$ , test ANOVA). W przypadku analizy statystycznej pomiędzy dwiema grupami wskazano istotne statystycznie różnice \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test t–studenta.

## 5. Dyskusja

Badanie interakcji gospodarz–patogen jest jednym z filarów zdobywania wiedzy w zakresie immunobiologii bezkręgowców. W kontekście nieustannych zmian zarówno ze strony gospodarza jaki i patogenu, dostępny arsenał obronny ciągle ewoluuje aby jak najefektywniej odpowiedzieć na zdolności adaptacyjne i czynniki wirulencji przeciwnika (Suesdek, 2019). Ograniczanie się do jednego organizmu modelowego jest błędem, ponieważ każda zmiana gospodarza może prowadzić do modulacji innych elementów jego układu odpornościowego. Z kolei poszczególne mikroorganizmy charakteryzują się innym spektrum czynników wirulencji, zjadliwością, a także odmiennym mechanizmem zakażenia owada (Hall i in., 2011; Sen i in., 2016). Zgłębienie wiedzy z zakresu immunobiologii bezkręgowców i ich zdolności adaptacyjnych w kontekście zakażeń patogenami daje możliwość odkrycia nowych cząsteczek bioaktywnych zaangażowanych w ich reakcję odpornościową. Zagadnienie to wydaje się być szczególnie intrygujące w kontekście poszukiwania nowych owadzych peptydów odpornościowych, które charakteryzować się będą szerokim spektrum aktywności wobec mikroorganizmów patogennych (Grether i Okamoto, 2022). Z drugiej strony poznanie mechanizmu działania niedawno odkrytych mikroorganizmów o właściwościach entomopatogennych, mogłoby przybliżyć naukowców do opracowania nowych bioinsektycydów charakteryzujących się wyższą skutecznością działania względem już stosowanych (Joly i in., 2020; Méndez–González i in., 2022).

W niniejszej pracy przedmiotem badań była analiza interakcji pomiędzy larwami barciaka większego *Galleria mellonella* a ich naturalnym entomopatogenem–*Pseudomonas entomophila*. Analizowano wpływ zakażenia na przeżywalność larw oraz zmiany zachodzące w organizmie owada pod wpływem zakażenia entomopatogenem. Dalej, przeprowadzono analizę i identyfikację wybranych związków bioaktywnych w hemolimfie owadów zakażonych bakteriami i zbadano właściwości wybranych białek i peptydów niskocząsteczkowych.

### 5.1. Wpływ zakażenia bakteriami *P. entomophila* na organizm *G. mellonella*

Na podstawie przeżywalności larw *G. mellonella* po zakażeniu różnymi dawkami *P. entomophila* metodą odzwierciedlającą naturalny mechanizm infekcji, wyznaczono krzywe przeżywalności. Proporcjonalnie do zwiększania dawki zakaźnej bakterii spadała przeżywalność larw. Dawki  $10^8$ – $10^6$  CFU podawane larwom *G. mellonella* powodowały od 100% do 98% śmiertelności owadów w ciągu około 50–100 godzin od zakażenia. Podanie dawek niższych zwiększało prawdopodobieństwo przeżycia owadów, które wynosiło od 0,3 do 0,55 (czyli od 30 do 55%) i przejścia do stadium poczwarki. Warto zaznaczyć, że przebieg krzywych przeżywalności wyznaczonych po podaniu wyższej dawki *P. entomophila* drogą pokarmową–  $10^5$  CFU był zbliżony do krzywych przeżywalności wyznaczonych po podaniu 500 CFU *P. entomophila* do hemocelu larw (Sulek M, rozprawa doktorska w przygotowaniu), co potwierdza fakt, że zakażenie drogą pokarmową wymaga większej dawki patogenu (Fedhila i in., 2010; Rossani i in., 2019). Na podstawie analiz krzywych przeżywalności i możliwości pobierania materiału od żywych larw, wytypowano dwie dawki zakaźne tj.  $10^3$  CFU *P. entomophila* (tzw. niższa dawka bakterii) oraz  $10^5$  CFU *P. entomophila* (tzw. wyższa dawka bakterii), które posłużyły do analizy reakcji odpornościowej larw *G. mellonella* w odpowiedzi na zakażenie entomopatogenem. Obserwowano zmiany w wyglądzie zakażonych owadów. Larwy zakażone bakteriami charakteryzowały się zmniejszoną ruchliwością i utratą turgoru ciała a w okolicach posówek obserwowano zaciemnienie oskórka. Podobnie, spadek ruchliwości larw *G. mellonella* wykazano także po zakażeniu grzybem *Candida albicans*, a było to skorelowane z obecnością patogenu w mięśniach (Fuchs i in., 2010; Vertyporokh, i in., 2017). Możliwe, że po uszkodzeniu jelit, *P. entomophila* przedostaje się również do mięśni (nie tylko tych bezpośrednio otaczających jelito), powodując zahamowanie motoryki. Z drugiej strony jest również prawdopodobne, że owady zmniejszając ruchliwość "oszczędzają" energię, która jest potrzebna do walki z patogenem (Moreno-García i in., 2014). Odpowiedź na to pytanie będzie wymagała kolejnych badań.

Obserwowano delikatną i równomierną melanizację larw jednak, była ona dużo mniejsza względem larw *G. mellonella*, które zakażano *P. entomophila* drogą iniekcji do hemocelu (Sulek M, rozprawa doktorska w przygotowaniu). Jest to zgodne z danymi literaturowymi, które mówią o aktywacji kaskady proteaz, w odpowiedzi na

zakażenie i zranienie, które przekształcają drogą ograniczonej proteolizy profenolooksydazę w oksydazę fenolową, czyli aktywny enzym odpowiedzialny za syntezę melaniny. Ponieważ melanizacja jest dużo mniejsza po zakażeniu drogą pokarmową niż drogą iniekcji, można przypuszczać, że naturalna infekcja sprzyja wytwarzaniu przez patogen czynników, które hamują aktywację oksydazy fenolowej (Kay i in., 2019; Krachler i in., 2022; Sułek M, rozprawa doktorska w przygotowaniu).

Analiza histologiczna przekrojów poprzecznych jelit larw *G. mellonella* wykazała, że nasilenie infekcji jest skorelowane z dawką bakterii, którą podawano owadom, a także z czasem upływającym od zakażenia. Obrazy histologiczne prezentujące przekroje poprzeczne jelit pochodzących z larw zakażonych zarówno niższą jak i wyższą dawką bakterii charakteryzowały się zmniejszoną liczbą komórek apoptotycznych w świetle jelita względem liczby komórek w obrazach pochodzących z grupy porównawczej, której podawano PBS i grupy kontrolnej. Prawdopodobnie komórki apoptotyczne stanowiły pierwszy pokarm dla bakterii *P. entomophila* w czasie rozwijającej się infekcji. W przypadku jelit wypreparowanych z larw 16 godzin po zakażeniu niższą dawką bakterii, obserwowano pojedyncze komórki *P. entomophila* migrujące przez komórki walcowate nabłonka jelitowego, natomiast w preparatach sporządzonych po 20 godzinach od zakażenia, komórki bakteryjne obserwowano poza światłem jelita. Proces infekcyjny w jelitach larw zakażonych wyższą dawką bakterii charakteryzował się gwałtowniejszym przebiegiem – po 12 godzinach obserwowano skupiska bakterii oblepiające komórki walcowate, po 16 godzinach wykazano postępującą destrukcję jelit, natomiast po 20 godzinach – ich całkowity rozkład i liczne skupiska komórek bakteryjnych. Podsumowując analizy krzywych przeżywalności, morfologii larw, oraz preparatów histologicznych jelit *G. mellonella* potwierdziły silne entomopatogenne właściwości badanej bakterii wobec owada wykorzystanego w doświadczeniach i wskazały na silną destrukcję jelit zakażonych larw. Jednocześnie wykazano, że w zaawansowanym stadium zakażenia, komórki patogenu przedostają się przez jelito (Fedhila i in., 2010). Owady mogą więc ginąć nie tylko wskutek destrukcji jelit, ale w wyniku septicemii, podobnie jak po zakażeniu *B. thuringiensis* (Kyei-Poku i in., 2007).

Skupiono się na prześledzeniu humoralnej reakcji odpornościowej larw *G. mellonella* w przebiegu zakażenia dwiema wcześniej wybranymi dawkami *P. entomophila*. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że przymusowe „karmienie” larw badanym entomopatogenem wywołuje pojawienie się aktywności

przeciwbakteryjnej w hemolimfie barciaka jedynie po zakażeniu *G. mellonella* niższą dawką bakterii *P. entomophila* zarówno wobec bakterii *Escherichia coli* jak i *P. entomophila*. Nie wykazano aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy pochodzącej z larw *G. mellonella* zakażonych wyższą dawką *P. entomophila* wobec żadnego z badanych mikroorganizmów. W hemolimfie pobranej po 16 godzinach od zakażenia *P. entomophila* zanotowano spadek jej aktywności wobec *E. coli*, względem aktywności hemolimfy larw zakażonych pobranej, po 12 i 20 godzinach. Być może aktywność hemolimfy odzwierciedlała początkową indukcję reakcji odpornościowej, która została obniżona, a następnie, w wyniku podziałów komórkowych bakterii patogennej ponownie indukowana. Różnice w profilu aktywności hemolimfy wobec *E. coli* i *P. entomophila* mogą wynikać z faktu, że inny zestaw peptydów i białek hemolimfy działa optymalnie na poszczególne bakterie (Mak i in., 2010). Ponadto, należy liczyć się z faktem, że wynik aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* wobec bakterii entomopatogennej jest wypadkową aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy oraz czynników wirulencji patogenu, którymi mogą być enzymy proteolityczne wydzielane *in vitro* na zewnątrz (Andrejko, 2016). Obserwowana aktywność przeciwbakteryjna mogła być wynikiem działania peptydów odpornościowych takich jak cekropina D oraz peptydu moricynopodobnego. Ponadto, należy zwrócić uwagę na możliwość synergistycznego działania peptydów. Dowiedziono, że obecność peptydy przeciwgrzybiczego gallerimycyny prowadzi do stymulacji aktywności cekropiny wobec bakterii, zaś obecność lizozymu stymuluje aktywność odpornościową peptydów (Cytryńska i in., 2001; Cytryńska i in., 2007; Brown i in., 2008; Bolouri–Moghaddam i in., 2016). Przyczyny braku aktywności w hemolimfie larw *G. mellonella* zakażonych wyższą dawką patogenu mogą być co najmniej dwie. Po pierwsze, organizm owada przy tak silnym zakażeniu może „poddąć się” i nie wydatkować energii na reakcje obronne. Według modelu „*threshold*”, owady mogą: a) nie indukować reakcji odpornościowych przy niskiej liczbie komórek patogenu, naprawiając jedynie uszkodzenia wyrządzone przez bakterię. Jest to tzw. tolerancja (ang. *tolerance*); b) indukować mechanizmy odpornościowe jeśli uszkodzenie wywołane przez patogen przekracza pewien poziom (tzw. „*threshold*”). Jest to tzw. odporność (ang. *resistance*); c) zaniechać obrony kiedy szansa na przeżycie jest znikoma. Dorosłe osobniki inwestują wówczas w reprodukcję. Jest to tzw. kompromis (ang. *trade-off*). Po drugie, brak aktywności przeciwbakteryjnej można także wytłumaczyć wydzielaniem przez patogen czynników wirulencji, np. proteaz, które degradują białka i peptydy hemolimfy owadów (Van Baalen i in., 1998;

Vodovar i in., 2006; Moreno–García i in., 2014).

Aby wyjaśnić co jest przyczyną braku aktywności hemolimfy po zakażeniu wyższą dawką patogenu, przeprowadzono analizy elektroforetyczne oraz badania poziomu aktywności przeciw *E. coli* rozdzielonych białek niskocząsteczkowych i peptydów hemolimfy. Wykazano obecność i aktywność niskocząsteczkowych składników hemolimfy w materiale pobranym 12, 16 i 20 godzin od zakażenia larw zarówno wyższą jak i niższą dawką bakterii *P. entomophila*. Dowiodło to, że niezależnie od dawki zakaźnej bakterii *P. entomophila* dochodzi do aktywacji reakcji odpornościowej i syntezy niskocząsteczkowych peptydów. Być może podstawą różnic w aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy larw zakażonych wyższą dawką była obecność związków hamujących aktywność peptydów w pełnej hemolimfie lub stężenie poszczególnych składników hemolimfy było zbyt niskie, aby wykazać tam aktywność przeciwbakteryjną w obecności wielu innych białek. Uzasadnieniem takiej możliwości jest fakt, że w hemolimfie owadów zdrowych, znajdują się związki o działaniu przeciwbakteryjnym (apolipoforyna III, lizozym, peptyd anionowy 2) a jednak w hemolimfie tej nie jest wykazywana aktywność przeciwko bakteriom Gram–ujemnym (Brown i in., 2008; Zdybicka-Barabas i in., 2012).

Jako że indukcja peptydów odpornościowych wymaga czasu, a poziom ekspresji genów kodujących poszczególne peptydy może wzrastać wraz z rozwijającym się zakażeniem, ekspresję genów badano w szeregu punktów czasowych (Makarova i in., 2016). Do analizy ekspresji wybrano geny kodujące cekropinę D, peptyd defensynopodobny, gallerimycynę, galiomycynę, hemolinę, IMPI i lizozym. Cekropina D to peptyd odpornościowy o działaniu przeciwbakteryjnym, którego aktywność wykazano zarówno wobec przedstawicieli bakterii Gram–dodatnich jak i Gram–ujemnych (Kim i in., 2004). Wykazano wzrost ekspresji genu kodującego cekropinę D w odpowiedzi na zakażenie badanym entomopatogenem, proporcjonalnie do dawki *P. entomophila* i do czasu upływającego od zakażenia. Należy zwrócić uwagę, że poziom relatywnej ekspresji genu kodującego cekropinę, po 24 godzinach od zakażenia był około 5–krotnie wyższy w jelicie w stosunku do relatywnej ekspresji w ciele tłuszczowym. W przypadku peptydu defensynopodobnego wykazano, że ulega on zwiększonej ekspresji pod wpływem zakażenia *P. entomophila*, a poziom jego indukcji zwiększa się proporcjonalnie do dawki zakaźnej *P. entomophila* i czasu upływającego od zakażenia. Poziom relatywnej ekspresji genu kodującego peptyd defensynopodobny po 24 godzinach od zakażenia był około 2–krotnie wyższy w ciele

tłuszczowym w stosunku do relatywnej ekspresji w jelicie. Wcześniej wykazano, że peptyd defensynopodobny wykazuje aktywność przeciw drożdżom, grzybom nitkowatym, a także bakteriom Gram-dodatnim *Sarcina lutea* (Cytryńska i in., 2007). Podobne wyniki jak w przypadku peptydu defensynopodobnego, obserwowano względem relatywnej ekspresji genu kodującego gallerimycynę. Poziom syntezy gallerimycyny był jednak około 4-krotnie wyższy w ciele tłuszczowym względem ekspresji w jelicie, po 24 godzinach od zakażenia. Dotychczas wykazano, że poziom ekspresji gallerimycyny zwiększa się u larw *G. mellonella* zakażonych grzybami *C. albicans* i *Bauveria bassiana*, oraz po immunizacji LPS. Wzrostu ekspresji genu kodującego gallerimycynę nie wykazano jednak w ciele tłuszczowym pochodzącym z larw *G. mellonella* immunizowanych uprzednio bakterią *E. coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* (Cytryńska i in., 2007, Andrejko i in., 2021). Jak wspomniano wcześniej, indukcja ekspresji genów kodujących peptydy o aktywności przeciwgrzybiczej lub przeciw bakteriom Gram-dodatnim, nie dziwi jeśli jest się świadomym ich synergistycznego działania z innymi peptydami (Zdybicka-Barabas i in., 2012; Zdybicka-Barabas i in., 2013). Poziom relatywnej ekspresji genów kodujących galiomycynę oraz hemolinę wzrastał zarówno w ciele tłuszczowym jak i jelitach larw *G. mellonella* po zakażeniu bakteriami *P. entomophila*, jednak wyższy poziom ekspresji genów obserwowano w materiale pochodzącym z larw zakażonych niższą dawką bakterii. W przypadku hemoliny wykazano około 4-krotnie wyższy poziom ekspresji w jelicie względem ciała tłuszczowego. Wzrost ekspresji genów kodujących galiomycynę i hemolinę obserwowano także po zakażeniu larw *G. mellonella* grzybem *C. albicans* (Vertyporokh i Wojda, 2020). Zwiększoną indukcję galiomycyny obserwowano także u larw *G. mellonella* zakażonych wcześniej *B. bassiana* oraz larw narażonych na szok termiczny, a następnie infekowanych bakteriami *Bacillus thuringiensis* (Bergin i in., 2006; Wojda i in., 2009 Wojda i Taszłow, 2013). Zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* prowadziło do zwiększenia ekspresji genów kodujących owadzi inhibitor metaloproteaz IMPI, którego poziom zwiększał się wraz z czasem upływającym od infekcji. W przypadku ciała tłuszczowego, najwyższy poziom ekspresji obserwowano w grupie zakażonej niższą dawką bakterii, natomiast w przypadku jelit w grupie zakażonej wyższą dawką *P. entomophila*. Podobnie wzrost poziomu ekspresji genu kodującego IMPI obserwowano po immunizacji larw *G. mellonella* LPS pochodzącym z *E. coli*, po iniekcji komórkami *B. thuringiensis* oraz po zakażeniu grzybami *C. albicans* i *B. bassiana* (Brown i in., 2009; Zdybicka-Barabas i in., 2010;



Wojda i Taszłow, 2013; Souza i in., 2016, Vertyporokh i Wojda, 2017). Jak wiadomo IMPI jest inhibitorem metaloproteaz i jego synteza zmniejsza destrukcyjne działanie proteolitycznych czynników wirulencji mikroorganizmów (Shaik i in., 2009). Jak wspomniano we wstępie, jego ekspresja jest indukowana obecnością w hemolimfie zdegradowanych białek (Altincicek and Vilcinskas, 2006). Ostatnim z analizowanych podstawowych genów peptydów odpornościowych był gen lizozymu 1, którego wyraźnie wyższy relatywny poziom ekspresji wykazano w jelitach larw zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila*. Relatywna ekspresja genu kodującego lizozym 1 analizowana po 24 godzinach od zakażenia była około 2–krotnie wyższa w jelitach względem ekspresji genu kodującego to białko w ciele tłuszczowym.

Analizując powyższe, dojść można do dwóch głównych wniosków. Po pierwsze, w odpowiedzi na zakażenie naturalną metodą larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* dochodzi do aktywacji reakcji odpornościowej na poziomie lokalnym – w jelitach, jaki i w ciele tłuszczowym, z czego wynika, że reakcja odpornościowa owada w odpowiedzi na zakażenie *P. entomophila* ma także charakter systemowy. Niezależnie od dawki bakterii *P. entomophila* jaką zakażano owady obserwowano indukcję ekspresji genów. Po drugie, ekspresja genów: galiomycyny, hemoliny, lizozymu 1 i IMPI (w ciele tłuszczowym), jest skorelowana z obniżeniem aktywności pełnej hemolimfy co może być częściowym wyjaśnieniem tego zjawiska. Być może patogen odpowiada za powstawanie zmian epigenetycznych w organizmie gospodarza, prowadzących w konsekwencji do hamowania ekspresji genów kodujących białka i peptydy odpornościowe (Gómez-Díaz i in., 2012).

## **5.2. Analiza i identyfikacja wybranych związków bioaktywnych w hemolimfie owadów zakażonych entomopatogenem**

Rozdział chromatograficzny polipeptydów/grup polipeptydów obecnych w ekstraktach metanolowych hemolimfy larw zakażonych niższą i wyższą dawką bakterii *P. entomophila*, przeprowadzony metodą HPLC pozwolił na uzyskanie 62 frakcji. Poprzez porównanie pól powierzchni poszczególnych „pików” pochodzących z trzech pul hemolimfy (po podaniu PBS, oraz po zakażeniu niższą i wyższą dawką bakterii *P. entomophila*) nie zaobserwowano jednorodnej tendencji zmian ilości białek w poszczególnych frakcjach. W przypadku większości frakcji, ilość białka była większa

w hemolimfie owadów zakażonych niższą dawką w porównaniu do grupy zakażonej wyższą dawką bakterii (28 frakcji). W 14 analizowanych frakcjach całkowita ilość białka była większa w hemolimfie owadów zakażonych wyższą dawką w porównaniu do grupy zakażonej niższą dawką bakterii, natomiast w 8 frakcjach całkowita ilość białka zmniejszała się w hemolimfie owadów zakażonych (niezależnie od dawki), w stosunku do porównawczych. W przypadku pozostałych 11 frakcji, całkowita ilość białka nie wykazała powtarzalnych różnic względem puli hemolimfy z owadów porównawczych. Ze względu na dużą liczbę uzyskanych frakcji, do dalszej identyfikacji białek i szczegółowych analiz wybrano 11 frakcji, o powtarzalnych zmianach ilościowych wykazanych we wstępnych analizach. Wybrano także frakcję 20, która zawierała bardzo duże ilości białka. Rozdziały elektroforetyczne wybranych frakcji oraz analiza densytometryczna białek i peptydów potwierdziła tendencje obserwowane w trakcie analizy chromatogramów. Sekwencjonowanie oraz identyfikacja przy pomocy algorytmu BLAST ujawniła, że wśród analizowanych peptydów i białek znajdowały się białko: GmCP8– tzw. *Galleria mellonella cationic protein 8* (białko 20) (Fröbius i in., 2000), peptyd prolinowy 1 (peptyd 28) (Brown i in., 2009), peptyd defensynopodobny (peptyd 42) (Langen i in., 2006), apolipoporyna III (białko 45) (Browne i in., 2014), a także szereg peptydów i białek, których ilość zmniejszała się po zakażeniu wyższą dawką bakterii w porównaniu z niższą dawką, co było zbieżne z obserwacjami dotyczącymi braku aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie larw zakażonych wyższą dawką *P. entomophila*. Do tej grupy peptydów i białek należały: przypuszczalny inhibitor proteaz serynowych (białko 25), niecharakteryzowane białko– produkt genu LOC113510237 (białko 32) (Lizana i in., 2020), lizozym (białko 39) (Vogel i in., 2011), przypuszczalne białko wiążące odoranty–OBP7 (białko 41) (Lizana i in., 2020), przypuszczalne białko wiążące feromony– Ebsp3 (białko 48) (Lizana i in., 2020) oraz hemolina (białko 56) (Daffre i Fayeb, 1997). Na uwagę zasługuje fakt, że grupa ta była najliczniejsza spośród analizowanych, co dodatkowo przemawia za rolą zidentyfikowanych peptydów i białek w niższej aktywności hemolimfy larw *G. mellonella* po zakażeniu wyższą dawką *P. entomophila*.

Relatywna ekspresja genu kodującego peptyd prolinowy 1 zwiększała się w miarę upływu czasu od zakażenia badaniem entomopatogenem, proporcjonalnie do dawki *P. entomophila* zarówno w ciele tłuszczowym jak i jelitach. Przedstawione wyniki dowodzą, że peptyd prolinowy 1 może odgrywać istotną rolę zarówno w odpowiedzi lokalnej jak i systemowej (Cytryńska i in., 2007; Brown i in., 2009). Istotnie wzrost

poziomu ekspresji genu był skorelowany ze wzrastającą ilością produktu białkowego w hemolimfie. Peptyd ten– jak wykazano– posiada aktywność przeciw *P. entomophila* *in vitro*. Oznacza to, że zmiany w poziomie ekspresji genu oraz ilości peptydu prolinowego 1 mają fizjologiczne znaczenie w walce *G. mellonella* z patogenem *P. entomophila*. Dotychczas potwierdzono, że peptyd prolinowy 1 zdolny jest do hamowania wzrostu drożdży. Ponadto, wykazano jego obecność w hemolimfie *G. mellonella* po zakażeniu Gram-dodatnimi bakteriami *Micrococcus luteus* (Mak i in., 2001; Cytryńska i in., 2007; Brown i in., 2009).

Poziom relatywnej ekspresji genu kodującego białko 32 zwiększał się wraz z czasem upływającym od zakażenia entomopatogenem a najwyższe wartości obserwowano w tkankach pochodzących z larw zakażonych wyższą dawką *P. entomophila* podobnie jak w przypadku wcześniej omówionego peptydu prolinowego 1. Białko 32 posiadało aktywność *in vitro* przeciw *P. entomophila*. Jak wspomniano, wyższy poziom ekspresji genu kodującego białko 32 obserwowano po zakażeniu wyższą dawką bakterii. Z drugiej strony analiza elektroforetyczna frakcji zawierającej białko 32 oraz analiza densytometryczna profili białkowych między poszczególnymi grupami wykazała mniejszą ilość białka w materiale pochodzącym z owadów zakażonych wyższą dawką bakterii niż w grupie zakażonej niższą dawką *P. entomophila*. Być może, w wyniku działania czynników wirulencji patogenu hamowana jest synteza tego białka, lub co wydaje się bardziej prawdopodobne, białko 32 jest degradowane przez proteazy *P. entomophila*. Oznaczałoby to, że jedną z przyczyn śmierci zakażonych owadów może być wydatkowanie energii związanej z transkrypcją genów białek/peptydów odpornościowych, które i tak będą zdegradowane przez czynniki patogenu. Analiza bazy danych Prosite, wykazała w sekwencji białka 32 obecność domen typu Kazal I, charakterystycznych dla inhibitorów proteaz serynowych (Laskowski i Qasim, 1980). Białko to może więc pełnić rolę obronną przeciw proteazom wydzielanym przez *P. entomophila*. Jednakże dotychczas przeprowadzone badania nie wykazały zdolności tego białka do hamowania aktywności termolizyny i trypsyny (Sulek M, rozprawa doktorska w przygotowaniu). Aby w pełni poznać rolę i mechanizm działania białka 32 konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Inaczej było w przypadku ekspresji genu lizozymu 2, która zwiększała się wraz z czasem upływającym od zakażenia entomopatogenem a najwyższy poziom osiągała w tkankach pochodzących z larw zakażonych niższą dawką *P. entomophila*. W przypadku omawianego wcześniej poziomu ekspresji lizozymu 1 wyższy poziom

indukcji białka obserwowano także po zakażeniu niższą dawką bakterii *P. entomophila*. Niższa ekspresja genu po zakażeniu wyższą dawką *P. entomophila* mogła wpływać na zmniejszoną ilość białka w hemolimfie oraz spadek jej aktywności. Wykonane badania aktywności lizozymu przeciw *P. entomophila* potwierdziły jego działanie wobec analizowanej bakterii w warunkach *in vitro*.

W kontekście indukcji syntezy peptydów odpornościowych warto zwrócić uwagę na zjawisko synergistycznego działania poszczególnych peptydów i białek odpornościowych. Dotychczas dowiedziono, że działanie lizozymu na perforację błony komórkowej *E. coli* jest efektywniejsze w obecności peptydu anionowego 2 (Zdybicka–Barabas i in., 2012; Sowa–Jasiłek i in., 2014). Istnieją doniesienia, że bakterie *E. coli* w obecności lizozymu stają się bardziej wrażliwe na attacyny, cekropiny i defensyny (Engström i in., 1984). Być może wyższa ekspresje genu kodującego lizozym 1 w jelicie i wyższa w ciele tłuszczowym w przypadku lizozymu 2 larw *G. mellonella* zakażonych niższą dawką bakterii *P. entomophila*, wpływa na efektywniejsze działanie peptydów takich jak cekropina, wzmacniając odpowiednio lokalną i systemową reakcję odpornościową w jelicie i ciele tłuszczowym. Z drugiej strony możliwe, że w reakcji odpornościowej *G. mellonella* przeciw *P. entomophila* lizozym 1 ma fizjologiczne znaczenie w jelicie a lizozym 2 w ciele tłuszczowym.

W dalszej część badań skupiono się na analizie trzech wybranych białek zidentyfikowanych u larw *G. mellonella*, których właściwości i rola w reakcji odpornościowej owadów nie zostały do tej pory poznane.

Analiza sekwencji aminokwasowej białka 20 w bazach danych wskazała, że jest to *Galleria mellonella cationic protein 8* (GmCP8), zaś w innych badaniach nazywane jest indukowalnym inhibitorem proteaz serynowych (Fröbius i in., 2000). Białko to wykazuje podobieństwo do sekwencji aminokwasowych białek zidentyfikowanych u *Tasar Antheraea mylitta* i *M. sexta* (Fröbius i in., 2000; Ling i in., 2009; Kim i in., 2010). Dotychczas przeprowadzone badania wykazywały, że posiada ono charakter białka receptorowego owadów działając jako opsonina i zaangażowane jest w proces fagocytozy mikroorganizmów. Jednak jego zdolność do hamowania aktywności proteaz nie została wcześniej zbadana (Shrivastava i Ghosh, 2000; Kim i in., 2010). Rola białka GmCP8 w reakcjach odpornościowych owadów nie została w pełni poznana. Przeprowadzono doświadczenia, których celem było zbadanie aktywności oczyszczonego GmCP8. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego badane białko w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego i jelit larw *G. mellonella* po zakażeniu

różnymi dawkami bakterii nie wykazała istotnie statystycznych różnic pomiędzy badanymi grupami. Wynik ten był zgodny z analizą ilości białka w ekstraktach hemolimfy po zakażeniu entomopatogenem. Podobnie, brak zwiększonej ekspresji GmCP8 po zakażeniu bakteriami *E. coli* zanotowano w badaniach opublikowanych przez Kim i in., 2014. Analiza aktywności GmCP8 *in vitro* wykazała, że posiada ono działanie przeciwdrobnoustrojowe, ponieważ było aktywne przeciwko bakteriom Gram– dodatnim (*B. thuringiensis*), bakteriom Gram– ujemnym (*P. entomophila*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) i grzybom *C. albicans*. Dalej wykazano, że peptyd ten powoduje perforację błony komórkowej *E. coli* czyli działa w sposób podobny do znanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Zdybicka– Barabas i in., 2012; Sowa–Jasiłek i in., 2016). Co więcej, analizy z wykorzystaniem Mikroskopii Sił Atomowych wykazały, że peptyd ten może zmieniać strukturę i parametry fizykochemiczne komórek wybranych szczepów mikroorganizmów, względem których wykazano jego aktywność przeciwdrobnoustrojową. Powierzchnia komórek *P. entomophila* utraciła charakterystyczną strukturę i zmieniała się na bardziej szorstką z większą ilością głębokich bruzd i rowków na powierzchni. Godzinna inkubacja GmCP8 z bakteriami wpłynęła na prawie dwukrotny wzrost sił adhezyjnych i chropowatości, co świadczy o zmianie właściwości nanomechanicznych powierzchni komórek względem kontroli. Podobnie, zmianę struktury powierzchni komórek na bardziej nieregularną, charakteryzującą się większą ilością bruzd i zagłębień obserwowano u bakterii *B. thuringiensis* pod wpływem GmCP8. Także parametry fizykochemiczne uległy zmianie prowadząc do wzrostu chropowatości powierzchni komórek i spadku ich sił adhezyjnych względem grupy kontrolnej. Powierzchnia komórek *C. albicans* po godzinnej inkubacji z GmCP8 stała się bardziej ziarnista i niejednorodna. Zmianie uległy także parametry fizykochemiczne. Wykazano dwukrotny spadek chropowatości komórek i dwukrotny wzrost ich sił adhezyjnych względem kontroli. Badania z wykorzystaniem Mikroskopii Sił Atomowych, przeprowadzone z użyciem innych peptydów odpornościowych przez innych autorów wskazują, że charakter obserwowanych zmian zależy od stężenia peptydu i czasu oddziaływania z komórkami bakteryjnymi (Zdybicka– Barabas i in., 2019). Notowano zmiany w strukturze powierzchni komórek *C. albicans* inkubowanych z wykazującą właściwości przeciwdrobnoustrojowe apoLp–III pochodzącą z larw *G. mellonella* (Zdybicka– Barabas i in., 2012). Zmianę parametrów nanomechanicznych powierzchni komórek *C. albicans* obserwowano także po inkubacji z anionowym peptydem 2 oraz z lizozymem *G. mellonella* (Sowa– Jasiłek i in., 2016;

Sowa–Jasiłek i in., 2020). Ponadto, doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem AFM, pozwoliły zobrazować zmiany parametrów biofizycznych i powierzchni bakterii *Bacillus circulans*, *M. luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* i *Legionella pneumophila* oraz grzybów *Zygosaccharomyces marxianus* i *Fusarium oxysporum* poddanych działaniu apoLp–III pochodzącej z larw *G. mellonella* (Zdybicka–Barabas i in., 2011; Zdybicka–Barabas i in., 2012; Zdybicka–Barabas i in., 2014). Badania przeprowadzone z wykorzystaniem AFM wskazują, że peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe zaburzają strukturę powierzchni mikroorganizmów. W efekcie oddziaływań pomiędzy dodatnio naładowanymi peptydami a ujemnie naładowaną powierzchnią mikroorganizmu dochodzi może do wbudowania peptydów i białek odpornościowych w strukturę powierzchni komórki i zmian jej parametrów fizykochemicznych, w tym przepuszczalności.

Zdolności białka GmCP8 do oddziaływania z powierzchnią mikroorganizmów prowadzące do zmiany struktury powierzchni i właściwości biofizycznych są zgodne z doniesieniami o możliwości wiązania się białka GmCP8 z LPS, kwasami lipotejchojowymi i  $\beta$ -glukanem. Według doniesień Kim i in., (2010) po związaniu białka GmCP8 z patogenami dochodzi do internalizacji całego kompleksu do hemocytów, co w świetle zaprezentowanych wyników może sugerować, że białko to uczestniczy w zabijaniu bakterii wewnątrz hemocytów. Analizy przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dowodzą o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych GmCP8 i potwierdzają jego obecność w hemolimfie niezależnie od zakażenia co przemawia za traktowaniem GmCP8, jako jednego z narzędzi wykorzystywanych przez larwy *G. mellonella* na pierwszej linii obrony przeciwdrobnoustrojowej. Prawdopodobne jest również, że białko GmCP8 działa synergistycznie z różnymi związkami hemolimfy tak jak w przypadku omawianego lizozymu (Zdybicka–Barabas i in., 2013; Bolouri–Moghaddam i in., 2016). Warto również wspomnieć, że w laboratorium Katedry Immunobiologii UMCS, wykazano hamującą aktywność GmCP8 wobec termolizyny, jak i trypsyny, co potwierdza aktywność tego białka jako inhibitora metaloproteaz stale obecnego w hemolimfie (Kordaczuk i in., 2022; Sułek M, rozprawa doktorska w przygotowaniu). Właściwość ta odróżnia białko GmCP8 od IMPI którego ekspresja jest stymulowana infekcją (Griesch i in., 2000; Weede i in., 2007). Poza udziałem w reakcjach odpornościowych, białko GmCP8 może być zaangażowane także w inne procesy fizjologiczne owada takie jak regulacja rozwoju larw, w którą zaangażowane są owadzie inhibitory proteaz (Wedde i in., 2007). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe GmCP8

plasują to białko wśród innych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które mogłyby zostać wykorzystane w celu zapobiegania niepożądanemu wzrostowi mikroorganizmów na powierzchni urządzeń biomedycznych, protez czy implantów (Espitia i in., 2012; Mylonakis i in., 2016).

Przeprowadzona z wykorzystaniem baz danych analiza sekwencji aminokwasowej białka 48 wskazała, że jest to *Ejaculatory bulb-specific protein 3-like isoform XI* (Ebsp3). Białko to należy do grupy polipeptydów wiążących odorany, w tym feromony (ang. *odorant binding protein*) (Lizana i in., 2020; Zhou i in., 2009; Hu i in., 2018; Yang i in., 2019). W organizmie owada polipeptydy te współtworzą system białek obwodowego układu węchowego i znajdują się głównie na czułkach, jednak ich obecność wykazano także na nogach i odwłoku owadów (Leal i in., 2013; Gu i in., 2019). U *G. mellonella* zidentyfikowano 20 OBP, co stanowi mniej niż u pozostałych owadów należących do Lepidoptera, Autorzy sugerują, że może być to związane z cyklem życiowym *G. mellonella* ograniczonym do środowiska ula (Lizana i in., 2020). Dotychczas przeprowadzone badania dowiodły, że owadzie białka wiążące odoranty zaangażowane są w proces transportu rozpuszczalnych w tłuszczach cząsteczek zapachowych ze środowiska zewnętrznego do receptorów węchowych poprzez węchową limfę czuciową, chronią transportowane substancje przed degradacją, działają jako kofaktory dla receptorów węchowych i zwiększają ich wrażliwość oraz biorą udział w dezaktywacji substancji zapachowych (Galindo, 2001; Menuz i in., 2014; Chang i in., 2015;). Białka te biorą udział w usuwaniu substancji zapachowej z organizmu owada co prowadzi do zatrzymania reakcji na odorant (Ziegelberger, 2008). Rola białek wiążących feromony, w tym białka Ebsp3 w odporności u *G. mellonella* nie została poznana. Analiza poziomu ekspresji genu kodującego badane białko w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego i jelit larw *G. mellonella* po zakażeniu dwiema dawkami bakterii wykazała, istotne różnice pomiędzy badanymi grupami. Obserwowano wzrost ekspresji genu kodującego Ebsp3 w ciele tłuszczowym i jelitach pobranych 24 godziny po zakażeniu jedynie od owadów zakażonych niższą dawką *P. entomophila*. Wyższy poziom relatywnej ekspresji obserwowano w materiale pochodzącym z jelit. Wynik korespondował z analizą ilości białka Ebsp3 w ekstraktach hemolimfy po zakażeniu entomopatogenem. Analiza aktywności białka Ebsp3 wykazała, że posiada ono zróżnicowaną aktywność *in vitro* przeciwko Gram-dodatnim bakteriom *B. thuringiensis* i Gram-ujemnym bakteriom *P. entomophila* i *P. aeruginosa*, natomiast nie wykazano jego aktywności przeciw *Staphylococcus aureus*. Działanie

przeciwdrobnoustrojowe białka Ebsp3 było widoczne bezpośrednio po dodaniu białka do bakterii i zmniejszało się po godzinnej inkubacji wobec wszystkich badanych szczepów bakteryjnych. W przypadku inkubacji stukrotnie rozcieńczonej mieszaniny białka z bakteriami, w ogóle nie wykrywano aktywności przeciwbakteryjnej po godzinnej inkubacji, a jedynie bezpośrednio po dodaniu białka do bakterii (dane nieprzedstawione). Dalsze analizy wykonane z wykorzystaniem bakterii *P. entomophila*, których celem było poznanie właściwości Ebsp3 dowiodły, że białko to wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w bardzo niskich stężeniach. Aktywność którą obserwowano była wynikiem działania białka Ebsp3 po wysianiu na płytki, gdzie wciąż znajdowało się Ebsp3, jednak minimum 10000 razy rozcieńczone w stosunku do stężenia w mieszaninie inkubacyjnej. Badania, których celem było poznanie mechanizmu działania białka Ebsp3 przeprowadzone z wykorzystaniem metody „*replica plating*” (przenoszenia kolonii bakteryjnych z jednej płytki na drugą) wskazały, że działanie Ebsp3 ma charakter bakteriostatyczny polegający na zahamowaniu podziałów komórkowych bakterii. Liczba CFU bakterii po przeniesieniu na płytki bez białka była większa co oznacza, że na płytkach z białkiem znajdowały się żywe komórki, które nie podzieliły się i nie wytworzyły kolonii. Część z pojedynczych bakterii mogła nie zostać przeniesiona lub zginąć z przyczyn niezależnych od działania białka, co może tłumaczyć, że liczba CFU bakterii po przeniesieniu na płytki bez białka nie osiągała 100%.

Wykazano, że białko Ebsp3 po 60 minutach inkubacji z bakteriami, traciło aktywność przeciwdrobnoustrojową. Metodą bioautografii wykazano utratę aktywności białka Ebsp3 przeciw *P. entomophila* po godzinnej inkubacji z płynem pochodowlanym *P. entomophila*. Dowiedziono, że odwirowany płyn pochodowlany pochodzący z *P. entomophila* posiada aktywność proteolityczną. Następnie metodą zymografii wykazano, że w płynie pochodowlanym występuje białko o masie około 50 kDa wykazujące aktywność proteolityczną, które potencjalnie może odpowiadać za utratę aktywności Ebsp3. Istotnie wykazano degradację białka Ebsp3 po inkubacji z płynem pochodowlanym *P. entomophila*. Powyższe obserwacje wyjaśniają brak aktywności białka po inkubacji Ebsp3 w mieszaninie inkubacyjnej, zaś aktywność bezpośrednio po wysianiu. Prawdopodobnie w podłożu stałym stężenie wydzielanych proteaz jest zbyt niskie. Próby zsekwencjonowania i identyfikacji proteazy obecnej w płynie pochodowlanym *P. entomophila* zakończyły się niepowodzeniem, jednak w przyszłości planowana jest ich kontynuacja. W genomie *P. entomophila* zidentyfikowano geny kodujące trzy proteazy serynowe i jedną proteazę alkaliczną. Na podstawie analizy mas



cząsteczkowych poszczególnych białek *P. entomophila* o aktywności proteaz wykonanej w bazie UniProt i porównania ich z masą cząsteczkową wykrytego białka o aktywności proteolitycznej, najbardziej prawdopodobne jest, że jest to metaloproteaza AprA o masie 50,9 kDa (Vodovar i in., 2006). Obecność białka o podobnej masie cząsteczkowej i aktywności proteolitycznej została wykazana także w płynie pochodzonym z *P. entomophila*. Co więcej iniekcja do hemocelu larw *G. mellonella* białek z płynu pochodzącego z *P. entomophila* prowadziła do spadku przeżywalności larw (Kural, praca magisterska w przygotowaniu). Aktywność proteaz wobec Ebsp3 może wyjaśniać zmniejszoną ilość tego białka w ekstraktach hemolimfy pochodzącej z larw *G. mellonella* zakażonych wyższą dawką bakterii *P. entomophila*. Tak więc podatność Ebsp3 na proteazy *P. entomophila* może również przyczynić się do braku aktywności pełnej hemolimfy po zakażeniu larw *G. mellonella* wyższą dawką entomopatogenu. Z drugiej strony obserwowana aktywność białka Ebsp3 jak i innych analizowanych białek i peptydów stanowi wypadkową działania polipeptydu na bakterie oraz proteaz bakteryjnych na polipeptyd, które jednak różnią się wrażliwością na bakteryjne proteazy. Warto przeprowadzić analizy, które pozwolą na poznanie roli także pozostałych białek i peptydów zidentyfikowanych w ekstraktach hemolimfy *G. mellonella* poddanych zakażeniu *P. entomophila*. Ze względu na złożoność procesu, badania nad mechanizmem jego działania powinny zostać kontynuowane w przyszłości. Uzyskane wyniki dowodzą, że białko Ebsp3 jest zaangażowane w reakcję odpornościową larw *G. mellonella*. Jego rola w odporności owada *G. mellonella* wydaje się być szczególnie ważna ze względu na fakt, że białko to jest prawdopodobnie celem czynników wirulencji *P. entomophila*. Rolę białek wiążących feromony w reakcjach odpornościowych owadów zdają się potwierdzać badania przedstawione przez autorów publikacji Knutelski i in., 2021, którzy wykazali, że białka wiążące feromony pochodzące z *Rhynchophorus ferrugineus* posiadają aktywność przeciwbakteryjną, a ich poziom w hemolimfie owada wzrasta w wyniku zakażenia bakteriami. Powyższe obserwacje mogą wskazywać na konieczność rozpatrywania mechanizmów odporności owadów w kontekście ich płci (Hu i in., 2018; Knutelski i in., 2021).

Wykonana przy użyciu baz danych analiza sekwencji aminokwasowej białka 41 wskazała, że jest to białko *Odorant binding protein 7* (OBP7), które podobnie jak Ebsp3 należy do grupy białek wiążących odoranty OBP (ang. *Odorant binding protein*). Wykazano, że u *G. mellonella* białko OBP7 zaangażowane jest w komunikację seksualną (Lizana i in., 2020).

Analiza poziomu ekspresji genu kodującego badane białko w materiale pochodzącym z ciała tłuszczowego i jelit larw *G. mellonella* po zakażeniu różnymi dawkami bakterii wykazała istotny statystyczny wzrost relatywnej ekspresji genu kodującego białko OBP7 w ciele tłuszczowym i jelitach pobranych 24 godziny po zakażeniu *P. entomophila*. Niewielki wzrost relatywnej ekspresji OBP7 obserwowano w materiale pobranym po 24 godzinach od owadów zakażonych wyższą dawką *P. entomophila*, był on jednak niższy względem ekspresji badanego genu w materiale pochodzącym z larw zakażonych niższą dawką bakterii. Analiza elektroforetyczna frakcji 41 odpowiadającej białku OBP7 oraz analiza densytometryczna profili białkowych między poszczególnymi grupami wykazała mniejszą ilość białka w materiale pochodzącym z owadów zakażonych bakteriami względem grupy porównawczej, przy czym najniższy poziom białka wykryto w ekstraktach hemolimfy larw zakażonych wyższą dawką *P. entomophila*. Dane literaturowe dowodzą, że ekspresja genu kodującego białko OBP7, wyrażana jest nie tylko w czułkach, ale także odnóżach i brzuchu, w przeciwieństwie do innych OBP *G. mellonella* co może mieć związek z innymi funkcjami tego białka niż dotychczas poznane (Lizana i in., 2021). Analiza aktywności OBP7 *in vitro* wykazała, że białko to wykazuje zróżnicowane działanie przeciwdrobnoustrojowe. Aktywność OBP7 wobec *P. entomophila* (przedstawiciel bakterii Gram–ujemnych) i *B. thuringiensis* (przedstawiciel bakterii Gram–dodatnich) badano w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  i 7  $\mu\text{M}$  po 60 minutach inkubacji. W przypadku bakterii *P. entomophila* aktywność OBP7 zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia. W przypadku *B. thuringiensis*, aktywność obserwowano tylko po inkubacji z białkiem w wyższym stężeniu. Aktywność OBP7 w stężeniu 7  $\mu\text{M}$  przeciw *C. albicans* (przedstawiciel grzybów) była najniższa spośród obserwowanych wobec innych drobnoustrojów. Ze względu na niewielką ilość oczyszczonego białka wykonano jedynie analizę ekspresji genu oraz badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Istnieją doniesienia potwierdzające aktywność białek wiążących zapach zidentyfikowanych u kręgowców wobec *C. albicans* oraz *P. aeruginosa* (Bianchi i in., 2019). Należy jednak zaznaczyć, że struktura białek wiążących zapach, a także ich funkcja znacząco różnią się między gatunkami (Foret i in., 2007). Przeciwdrobnoustrojową aktywność białek rodziny OBP oraz wzrost ich poziomu w immunizowanej hemolimfie dorosłych *R. ferrugineus* potwierdza, że polipeptydy należące do tej grupy zaangażowane są w procesy odpornościowe (Knutelski i in., 2021). W kontekście obniżonego poziomu białka w analizowanych ekstraktach hemolimfy larw

zakazonych bakteriami *P. entomophila*, mimo wzrostu ekspresji genu w grupach stymulowanych zakażeniem oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej tego białka wykazanej *in vitro*, wydaje się że OBP7 pełni ważną rolę w reakcji odpornościowej larw *G. mellonella* i może stanowić jeden z potencjalnych celów wirulencji entomopatogenu. Za taką możliwością przemawia fakt, że zmniejszanie ilości tego białka jest proporcjonalne do dawki zakaźnej – najmniejszą jego ilość obserwuje się po podaniu larwom *G. mellonella* wyższej dawki bakterii *P. entomophila*. Z drugiej strony brak aktywności przeciwbakteryjnej w pełnej hemolimfie larw *G. mellonella* po zakażeniu wyższą dawką bakterii *P. entomophila*, koresponduje z obniżoną ekspresją genu OBP7 w ciele tłuszczowym i jelitach owadów. W tym przypadku, możemy mówić o tym, że organizm owada może sam hamować ekspresję genu ze względu na wysoki poziom zakażenia, w celu oszczędzania energii, o czym wspomniano wcześniej (Van Baalen i in., 1998; Moreno–García i in., 2014), lub wydzielane przez patogen białka hamują ekspresję genu.

W hemolimfie larw *G. mellonella* zakażonych różnymi dawkami bakterii *P. entomophila* zidentyfikowano szereg białek i peptydów, wśród których znajdowały się takie, których ilość była mniejsza po zakażeniu wyższą dawką bakterii względem zakażenia niższą dawką *P. entomophila*. Może to być przyczyną braku aktywności w hemolimfie owadów zakażonych wyższą dawką. Część z nich poddano dalszym analizom dzięki czemu udało się poznać biologiczne właściwości i rolę w reakcji odpornościowej *G. mellonella*. Niniejsza praca, daje podstawy do dalszej analizy białek i peptydów odpornościowych, połączonych z analizą związków wydzielanych przez *P. entomophila* i ich wpływu na reakcje odpornościowe owada. Ze względu na złożoność interakcji składników hemolimfy owadziej, z pewnością będą tu potrzebne badania *in vivo*. Pomocne będzie tu wykorzystanie odpowiednich mutantów gospodarza i patogenu.

## 6. Wnioski

1. Potwierdzono patogenność bakterii *Pseudomonas entomophila* względem owada *Galleria mellonella*. Zakażenie drogą pokarmową larw prowadzi do spadku przeżywalności owadów, która zmniejsza się wraz ze wzrostem dawki zakaźnej bakterii.
2. Zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* prowadzi do destrukcji jelit owadów, zwiększającej się wprost proporcjonalnie do czasu i dawki entomopatogenu. *P. entomophila* migrując przez komórki jelita przedostaje się do hemocelu.
3. Aktywność przeciwbakteryjną w pełnej hemolimfie wykazano w grupie owadów zakażonych niższą spośród dwóch dawek bakterii ( $10^3$  CFU/larwę) wybranych do dalszych doświadczeń. Po podaniu dawki wyższej ( $10^5$  CFU/larwę) nie odnotowano aktywności przeciwbakteryjnej. Jednak analiza elektroforetyczna wykazała pojawianie się peptydów w hemolimfie owadów zakażonych obiema dawkami. Było to skorelowane z pojawieniem się aktywności przeciwbakteryjnej niskocząsteczkowych składników hemolimfy. Oznacza to, że brak aktywności przeciwbakteryjnej nie jest wynikiem braku indukcji odpowiedzi odpornościowej, a może być skutkiem działania czynników wirulencji patogenu.
4. Naturalna infekcja larw *G. mellonella* bakteriami *P. entomophila* indukuje zmiany ekspresji wybranych genów kodujących peptydy odpornościowe na poziomie lokalnym – w jelicie, oraz na poziomie systemowym – w ciele tłuszczowym owadów. Brak aktywności przeciwbakteryjnej po zakażeniu wyższą dawką bakterii *P. entomophila* nie jest także skutkiem braku indukcji ekspresji badanych genów.
5. Wykryto i zidentyfikowano peptydy i białka, których ilości w hemolimfie zakażonych owadów zmieniały się po zakażeniu lub były różne po podaniu wyższej i niższej dawki patogenu. Obserwowane zmiany nie wykazywały jednorodnej tendencji. Najliczniejszą grupę stanowiły polipeptydy, których ilość zmniejszała się po zakażeniu wyższą dawką bakterii w porównaniu z niższą dawką, co było zbieżne z obserwacjami dotyczącymi braku aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie larw zakażonych wyższą dawką.
6. Wykazano, że peptyd prolinowy 1, nieznane białko 32 i lizozym są zaangażowane w mechanizmy odpornościowe *G. mellonella* po zakażeniu *P. entomophila* i posiadają aktywność przeciw entomopatogennej bakterii *in vitro*. W przypadku peptydu prolinowego 1, jego ilość koreluje z ekspresją genu, tj. zwiększa się w miarę wzrostu

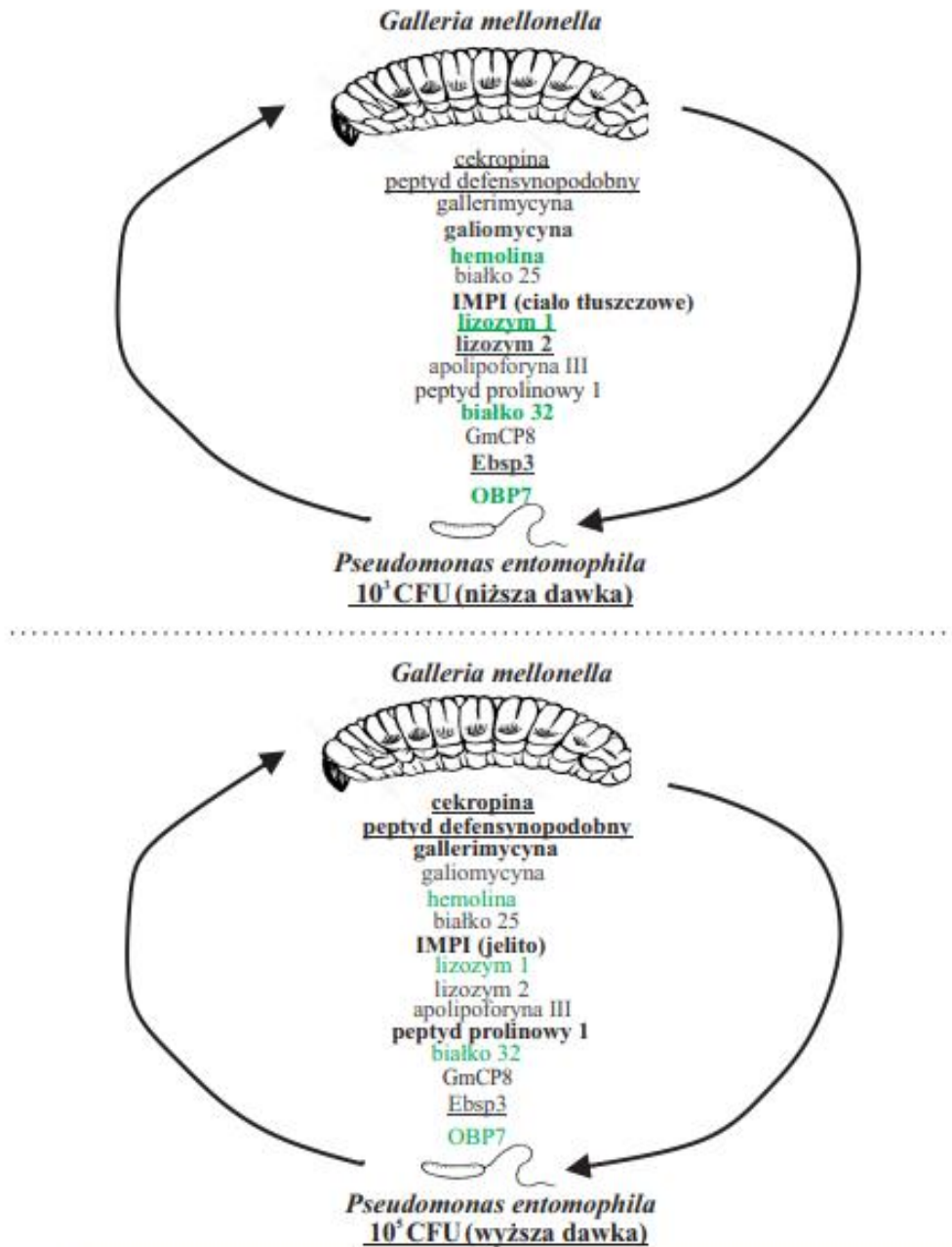
dawki zakaźnej. W przypadku lizozymu, jego ilość zmniejsza się w miarę wzrostu dawki i koreluje z ekspresją obu badanych genów. Z kolei białka 32 ubywa, mimo wzrostu ekspresji genu.

7. Poznano nowe funkcje białka GmCP8. Wykazano, że posiada ono aktywność przeciwdrobnoustrojową. Jego działanie powoduje perforację błon biologicznych oraz zmiany topografii i właściwości nanomechanicznych komórek mikroorganizmów. Wskazano na potencjalne możliwości zastosowania tego białka w sektorze medycznym, farmaceutycznym i biotechnologii.

8. Zidentyfikowano białko Ebsp3 i wykazano, że zaangażowane ono jest w mechanizmy odpornościowe larw *G. mellonella*. Białko to wykazuje charakter cytostatyczny. Wykazano jego aktywność wobec *P. entomophila*, *Bacillus thuringiensis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ilość Ebsp3 w hemolimfie zmniejsza wraz ze wzrostem dawki patogenu, podobnie jak ekspresja genu. Ponadto, białko to najprawdopodobniej stanowi cel dla czynników wirulencji patogenu.

9. Zidentyfikowano białko OBP7, którego rola w reakcji odpornościowej *G. mellonella* nie była znana. Poza *P. entomophila* ma ono aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *B. thuringiensis* i *Candida albicans*. Ilość tego białka zmniejsza się wraz ze wzrostem dawki, podobnie jak ekspresja genu. W obu przypadkach może to być wynikiem działania czynników wirulencji *P. entomophila*.

Podsumowanie roli poszczególnych białek w odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella* na zakażenie bakteriami *P. entomophila* przedstawia rycina 31.



Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wybranych peptydów i białek						
Peptyd	peptyd prolinowy 1	lizozym 1	białko 32	GmCP8	Ebsp3	OBP7
Mikroorganizm						
<i>P. entomophila</i>	+	+	+	+	++	+
<i>B. thuringiensis</i>				+	++	+
<i>P. aeruginosa</i>				+	++	
<i>E. coli</i>				+		
<i>S. aureus</i>				+	-	
<i>C. albicans</i>				+		+

**Ryc. 31.** Podsumowanie reakcji odpornościowej *G. mellonella* na zakażenie *P. entomophila*. Pogrubioną czcionką zaznaczono w której z grup (po zakażeniu niższą lub wyższą dawką

## Wnioski

---

entomopatogenu) obserwowano wyższy poziom ekspresji genów kodujących analizowane peptydy i białka odpornościowe. Podkreśleniem zaznaczono peptydy, których poziom korelował z ekspresją genów w ciele tłuszczowym i jelicie. Zieloną czcionką zaznaczono peptydy i białka, których ilość była obniżona mimo, wzrostu ekspresji genów wobec grupy kontrolnej. W tabeli przedstawiono wyniki analizy aktywności przeciwdrobnoustrojowej mało znanych lub nowoodkrytych peptydów i białek odpornościowych *G. mellonella*.

Legenda do tabeli: „—” – brak aktywności badanego peptydu/białka wobec testowanego drobnoustroju, „+” – aktywność badanego peptydu wobec testowanego drobnoustroju. Znak \* oznacza, że badany peptyd/ białko ma (*P. entomophila*) lub najprawdopodobniej ma (pozostałe mikroorganizmy) działanie cytostatyczne.

## 7. Literatura

- Abrudan M.I., Smakman F., Grimbergen A.J., Westhoff S., Miller E.L., van Wezel G.P., Rozen D.E., 2015. Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (35), s.: 11054–11059
- Adamo S.A., 2017, The stress response and immune system share, borrow, and reconfigure their physiological network elements: evidence from the insects, *Hormones and Behavior*, 88, s.: 25–30
- Altincicek B., Linder M., Linder D., Preissner K., Vilcinskis A., 2006. Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Activate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*, *Infection and Immunity*, 75(1), s.: 175–183
- Altincicek B., Vilcinskis A., 2006. Metamorphosis and collagen–IV–fragments stimulate innate immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *Dev Comp Immunol*, 30(12), s.:1108–1118
- Anderson R.D., Blanford S., Jenkins N.E., Thomas M.B., 2013. Discriminating fever behavior in house flies, *PLoS ONE*, 8 (4), nr artykułu e62269, s.: 1–4
- Andrejko M., 2016. Modulacja humoralnej odpowiedzi odpornościowej gąsienic *Galleria mellonella* przez enzymy proteolityczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *Postępy Mikrobiologii*, 55 (3), s.: 255–267
- Andrejko M., Mak P., Siemińska–Kuczer A., Iwański B., Wojda I., Suder P., Kuleta P., Regucka K., Cytryńska M., 2021. A comparison of the production of antimicrobial peptides and proteins by *Galleria mellonella* larvae in response to infection with two *Pseudomonas aeruginosa* strains differing in the profile of secreted proteases, *J Insect Physiol*, 131:104239
- Asai M., Sheehan G., Li Y., Robertson B.D., Kavanagh K., Langford P.R., Newton S.M., 2021. Innate Immune Responses of *Galleria mellonella* to *Mycobacterium bovis* BCG Challenge Identified Using Proteomic and Molecular Approaches, *Front Cell Infect Microbiol*, 9,11:619981
- Baranek J., Adam Kaznowski A., Konecka E., Naimov S., 2015. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus*



*thuringiensis* against lepidopteran pests, *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, s.: 72–81

- Bel Y., Ferré J., Hernández–Martínez P., 2020. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action, *Toxins*, 12(12), s.:85–91
- 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(15), s.: 1389–1395
- Bergin D., Murphy L., Keenan J., Clynes M., Kavanagh K., 2006. Pre–exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides, *Microbes and Infection*, 8, s.: 2105–2112
- Bergin D., Reeves E., Renwick J., Wientjes F., Kavanagh K., 2005. Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils, *Infection and Immunity*, 73(7), s.: 4161–4170
- Bernal P., Llamas M.A., Filloux A., 2018. Type VI secretion systems in plant–associated bacteria, *Environ Microbiol*, 20(1), s.:1–15
- Bianchi F., Flisi S., Careri M., Riboni N., Resimini S., Sala A., Conti V. Mattarozzi M., Taddei S., Spadini C., 2019. Vertebrate odorant binding proteins as antimicrobial humoral components of innate immunity for pathogenic microorganisms, *PLoS ONE*, 14, e213545
- Bier E., Guichard A., 2012. Deconstructing host–pathogen interactions in *Drosophila*, *Disease Models and Mechanisms*, 5 (1), s.: 48–61
- Bodilis J., Ghysels B., Osayande J., Matthijs S., Pirnay J.P., Denayer S., De Vos D., Cornelis P., 2009. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ Microbiol*, 11, s.: 2123–2135
- 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 copresentation of diverse antimicrobial peptides, *Biological Chemistry*, 397 (9), s.: 939–945
- Bombelli P., Howe C.J., Bertocchini F., 2017. Polyethylene bio–degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Curr Biol*, 27, s.:292–293

- Bono L.M., Draghi J.A., Turner P.E., 2020. Evolvability Costs of Niche Expansion, *Trends Genet*, 36(1), s.:14–23
- Bozler J., Kacsoh B.Z., Bosco G., 2020. Maternal Priming of Offspring Immune System in *Drosophila*, *G3 (Bethesda)*, 10, s.:165–175
- Bradford M.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, s.: 248–254
- Brehelin M., 1986. *Immunity in Invertebrates. Cells, Molecules, and Defense Reactions*. Berlin Heidelberg: Springer–Verlag
- Brennan M., Thomas D.Y., Whiteway M., Kavanagh K., 2002. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34 (2), s.: 153–157
- Brown L.D., Shapiro L.L.M., Thompson G.A., Estevez–Lao T.Y., Hillyer J.F., 2019. Transstadial immune activation in a mosquito: Adults that emerge from infected larvae have stronger antibacterial activity in their hemocoel yet increased susceptibility to malaria infection, *Ecol. Evol*, 9, s.:6082–6095
- 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, s.: 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, s.: 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 (7), s.: 597–603
- Butt T.M., Coates C.J., Dubovskiy I.M., Ratcliffe N.A., 2016. *Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions*. W: B. Lovett, R. J. St Leger, *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Academic Press
- Castagnola A., Stock P.S., 2014. Common virulence factors and tissue target of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests, *Insects*, 5 (1), s.: 139–156

- Cerenius L., Lee B., Söderhäll K., 2008. The proPO–system: pros and cons for its role in invertebrate immunity, *Trends in Immunology*, 29(6), s.: 263–271
- Chakrabarti S., Liehl P., Buchon N., Lemaitre B., 2012. Infection–induced host translational blockage inhibits immune responses and epithelial renewal in the *Drosophila* gut, *Cell Host Microbe*, 12. s.:60–70
- Chambers M.C., Schneider D.S., 2012. Pioneering immunology: insect style, *Current Opinion in Immunology*, 24, s.: 10–14
- Champion O.L., Wagley S., Titball R.W., 2016. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research, *Virulence*, 7 (7), s.: 840–84
- Chang H., Li Y., Yang T., Pelosi P., Dong S., Wang G., 2015. Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis*, *Sci. Rep*, 5, 13093–13105
- Charroux B., Royet J., 2010. *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract, *Fly*, (1), s.:40–47
- Choi J., Whitten M., Cho M., Lee K., Kim M., Ratcliffe N., Lee B., 2002. Calreticulin enriched as an early–stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae, *Developmental & Comparative Immunology*, 26(4), s.: 335–343
- Clark K.D., Pech L.L., Strand M.R., 1997. Isolation and identification of a plasmocyte–spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*, *Journal of Biological Chemistry*, 272, s.: 23440– 23447
- Clermont A., Wedde M., Seitz V., Podsiadlowski L., Lenze D., Hummel M., Vilcinskas A., 2004. Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity, *Biochemical Journal*, 382, s.: 315–322
- Contreras E., Rausell C., Real M.D., 2013. *Tribolium castaneum* apolipoprotein–III acts as an immune response protein against *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxic activity, *J Invertebr Pathol*, 113(3), s.:209–213
- Cook S.M., McArthur J.D., 2013. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens, *Virulence*, 4 (5), s.: 350–353

- Cotter G., Doyle S., Kavanagh K., 2000. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 27, s.: 163–169
- Cruz J., Ortiz C., Guzmán F., Fernández–Lafuente R., Torres R., 2014. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms, *Current Medicinal Chemistry*, 21, s.: 1–23
- Cytryńska M., 2009. Odporność bez przeciwciał. *Postępy biologii komórki*, 36 (2), s.:309–324
- Cytryńska M., Mak P., Zdybicka–Barabas A., 2007. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph, *Peptides*, 28, s.:533–46
- Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Jabłoński P., Jakubowicz T., 2001. Detection of antibacterial polypeptide activity in situ after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal Biochem*, 299(2), s.:274-276
- Dawkins R., Krebs J.R., 1979. Arms races between and within species, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 205, s.: 489–511
- Deng S.–Q., Cai Q.D., Deng M.–Z., Huang Q., Peng H.–J., 2017. Scorpion neurotoxin AaIT–expressing *Beauveria bassiana* enhances the virulence against *Aedes albopictus* mosquitoes, *AMB Express*, 7(121)
- Desai A.V., Siddhapara M.R., Patel P.K., 2019. Biology of greater wax moth, *Galleria mellonella*. On artificial diet, *J Exp Zool India*, 22 s.: 1267–1272
- Desalermos A., Fuchs B., Mylonakis E., 2012. Selecting an Invertebrate Model Host for the Study of Fungal Pathogenesis, *PLoS Pathogens*, 8(2): e1002451
- Dettloff M., Kaiser B., Wiesner A., 2001. Localization of injected apolipoprotein III in vivo—new insights into the immune activation process directed by this protein, *J Insect Physiol* 47, s.:789–797
- Dias B.A., Neves P.M.O.J., Furlaneto–Maia L., Furlanego M.C., 2008. Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, s.: 301–306
- Dieppois G., Opota O., Lalucat J., Lemaitre B., 2015. *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties, *New Aspects of Pseudomonas Biology*, 7, s.: 25–50

- Dubovskiy I.M., Kryukova N.A., Glupov V.V., Ratcliffe N.A., 2016. Encapsulation and nodulation in insects, *Invertebrate Survival Journal*, 13, s.: 229–246
- Dunphy G.B., Oberholzer U., Whiteway M., Zakarian R.J., Boomer I., 2003. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae), *Canadian Journal of Microbiology*, 49, s.: 514–524
- Edman P., 1950. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides, *Acta Chem. Scand*, 4, s.:283–293
- Eggert H., Kurtz J., Diddens–de Buhr M.F., 2014. Different effects of paternal trans–generational immune priming on survival and immunity in step and genetic offspring, *Proceedings of the Royal Society B*, 281: 20142089
- 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. *Nat. Immunol*, 9, s.: 1165–1170
- Ellis J.D., Graham J.R., Mortensen A., 2013. Standard methods for wax moth research. *J Apic Res*, 52, s.:1–17
- El–Seedi H.R., Ahmed H.R., El–Wahed A.A.A., Saeed A., Algethami A.F., Attia N.F., Guo Z., Musharraf S.G., Khatib A., Alsharif S.M., Naggat Y.A., Khalifa S.A.M., Wang K., 2022. Bee Stressors from an Immunological Perspective and Strategies to Improve Bee Health, *Vet Sci*, 9(5):199
- Engström P., Carlsson A., Engström A., Tao Z.J., Bennich H., 1984. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*, *EMBO J*, 3, s.: 3347–3351
- Espitia P.P.J., de Fátima Ferreira Soares N., Dos Reis Coimbra J.S., de Andrade N.J., Souza Cruz R., Alves Medeiros E.A., 2012. Bioactive peptides: Synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food, *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 11(2), s.:187–204
- Fallon J.P., Troy N., Kavanagh K., 2012. Pre–exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses, *Virulence*, 2, s.: 413–421
- Faulhaber L.M., Karp R.D., 1992. A diphasic immune response against bacteria in the american cockroach, *Immunology*, 75, s.:378–381

- Fedhila S., Buisson C., Dussurget O., Serron P., Glomski I.J., Liehl P., Lereclus D., Nielsen–LeRoux C., 2010. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*, *J Invertebr Pathol*, 103(1), s.:24–9.
- Ferrandon, D., Imler, J., Hetru, C. i Hoffmann, J. 2008. *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 7, strony 862–874. Fedhila S., Nel P., Lereclus D., 2002, The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route, *Journal of Bacteriology*, 184 (12), s.: 3296–3304
- Flores–Ponce M., Vallebuena–Estrada M., González–Orozco E., Ramos–Aboites H.E., García–Chávez J.N., Simões N., Montiel R., 2017. Signatures of co–evolutionary host–pathogen interactions in the genome of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*, *BMC Evol Biol*, 17(1). s.:108
- Forêt S., Wanner K.W., Maleszka R., 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochem, Mol. Biol*, 37, s.:19–28
- Freitak D., Schmidtberg H., Dickel F., Lochnit G., Vogel H., Vilcinskis A., 2014. The maternal transfer of bacteria can mediate trans–generational immune priming in insects, *Virulence*, 5 (4), s.: 547–554
- Fröblius A.C., Kanost M.R., Götz P., Vilcinskis 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, s.: 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(6), s.: 475–482
- Galindo K., Smith D.P., 2001. A large family of divergent *Drosophila* odorant–binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla, *Genetics*, 159, s.:1059–1072
- Gibson D.M., Donzelli B.G.G., Krasnoff S.B., Keyhani N.O., 2014. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi, *Natural Product reports*, 31: 1287

- Gliński Z., Buczek K., Maré M., 2011. Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej – nowe osiągnięcia, *Życie Weterynaryjne*, 86 (9), s.: 687–694
- Goel M.K., Khanna P., Kishore J., 2010. Understanding survival analysis: Kaplan–Meier estimate, *International Journal of Ayurveda Research*, 1, s.: 274–278
- Gómez-Díaz E., Jordá M., Peinado M.A., Rivero A., 2012. Epigenetics of HostPathogen Interactions: the Road Ahead and the Road Behind, *PLOS Pathogens*, 8(11): e1003007
- Grether G.F., Okamoto K.W., 2022. Eco–evolutionary dynamics of interference competition, *Ecol Lett*, 25(10), s.:2167–2176
- Griesch J., Wedde M., Vilcinskis A., 2000. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, s.: 461–472
- Gu S.–H., Zhou J.–J., Wang G.–R., Zhang Y., Guo Y.–Y., 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 43, s.:237–251
- Gupta A., Nair S., 2020. Dynamics of Insect–Microbiome Interaction Influence Host and Microbial Symbiont, *Front Microbiol*, 11:1357
- Ha E.M., Lee K.A., Park S.H., Kim S.H., Nam H.J., Lee H.Y., Kang D., Lee W.J., 2009a. Regulation of DUOX by the Galphaq–phospholipase Cbeta–Ca<sup>2+</sup> pathway in *Drosophila* gut immunity, *Dev Cell*, 16, s.:386–397
- Ha E.M., Lee K.A., Seo Y.Y., Kim S.H, Lim J.H., Oh B.H., Kim J., Lee W.J., 2009b. Coordination of multiple dual oxidase–regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *drosophila* gut, *Nat Immunol*, 10 s.:949–957
- Hall A.R., Scanlan P.D., Morgan A.D., Buckling A., 2011. Host–parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection, *Ecology Letters*, 14(7), s.: 635–642
- Heckel D.G., 2020. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective, *Arch Insect Biochem Physiol*, 104(2):e21673

- Heeb S., Haas D., 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact*, 14, s.:135
- Hegedus D., Erlandson M., Gillott C., Toprak U., 2009, New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function, *Annual Review of Entomology*, 54 (1), s.: 285–302
- Herren J.K., Paredes J.C., Schüpfer F., Lemaitre B., 2013. Vertical transmission of a *Drosophila* endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery, *MBio*, 4, s.:1–8
- Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M., 2007. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Rev Sci Instrum*, 78(1):013705
- Horsfall J.G., Cowling E.B., 1980. *How Plants Defend Themselves*. W: J. G. Horsfall, *Plant Disease. An Advanced Treatise*, volume V. New York: Academic Pres
- Hosamani V., Hanumantha Swamy B.C., Kattimani K.N., 2017. Studies on biology of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.). *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6, s.:3811–3815
- Hu P., Gao C., Zong S., Luo Y., Tao J., 2018. Pheromone Binding Protein EhipPBP1 Is Highly Enriched in the Male Antennae of the Seabuckthorn Carpenterworm and Is Binding to Sex Pheromone Components, *Front. Physiol*, 9, s.:447–457
- Hultmark D., 1998. Quantification of antimicrobial activity using the inhibition-zone assay. W: A. Wiesner, G.B. Dunphy, V.J. Marmaras, I. Morishima, M. Sugumaran, M. Yamakawa, *Techniques in Insect Immunology*. Fair Heaven: SOS Publications
- Hultmark D., 2003, *Drosophila* immunity: paths and patterns, *Current Opinion in Immunology*, 15, s.: 12–19
- Ibrahim H., Matsuzaki T., Aoki T., 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function, *FEBS Letters*, 506(1), s.: 27–32
- Imler J.L., Hoffmann J.A., 2001. Toll receptors in innate immunity, *Trends in Cell Biology*, 11 (7), s.: 304–311



- Iwama R., Ashida M., 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, *Insect Biochemistry*, 16(3), s.: 547–555
- Jander G., Rahme L., Ausbel F., 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects, *Journal of Bacteriology*, 182, s.: 3843–3845
- Jee H., 2016. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini–review, *Journal of Exercise Rehabilitation*, 12(4), s.: 255–259
- Jollès J., Schoentgen F., Croizier G., Croizier L., Jollès P., 1979. Insect lysozymes from three species of lepidoptera: Their structural relatedness to the c (chicken) type lysozyme, *Journal of Molecular Evolution*, 14(4), s.: 267–271
- Joly A., Soltys J., Gallet A., Rousset R., 2020. Impact des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur le développement de cancers de l'intestin [Impact of *Bacillus thuringiensis*–based bioinsecticides on the development of intestinal cancers], *Med Sci*, 1, s.:23–27
- Joop G., Vilcinskas A., 2016. Coevolution of parasitic fungi and insect hosts, *Zoology*, 119(4), s.: 350–358
- Jouzani G.S., Valijanlian E., Sharafi R., 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings, *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(7) s.:2691–2711
- Jurat–Fuentes J.L., Crickmore N., 2017. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action, *J Invertebr Pathol*, 142, s.:5–10
- Kavanagh K., Reeves E.P., 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens, *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (1), s.: 101–112
- Kay S., Edwards J., Brown J., Dixon R., 2019. *Galleria mellonella* Infection Model Identifies Both High and Low Lethality of *Clostridium perfringens* Toxicogenic Strains and Their Response to Antimicrobials, *Front Microbiol*, 10:1281
- Khush R.S., Leurier F., Lemaitre B., 2003. Pathogen surveillance – the flies have it, *Science*, 2966, s.: 273–277

- Kim M.S., Byun M., Oh B.H., 2003. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*, *Nat. Immunol*, 4 s.:787–793
- Kim B.Y., Jin B.R., 2015. Apolipophorin III from honeybees (*Apis cerana*) exhibits antibacterial activity, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 182, s.:6–13
- Kim C.H., Lee J.H., Kim I., Seo S.J., Son S.M., Lee K.Y., Lee I.H., 2004. Purification and cDNA Cloning of a Cecropin-like Peptide from the Great Wax Moth, *Galleria mellonella*, *Molecules and Cells*, 17(2), s.: 262–266
- Kim H.-K., Hoe H.-S., Suh D.S., Kang S.C., Hwang C., Kwon S.-T., 1999. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease, *Biotechnology Letters*, 21, s.: 777–783
- Kim Y., Ryu, J., Han S., Choi, K., Nam K., Jang I., 2000. Gram-negative Bacteria-binding Protein, a Pattern Recognition Receptor for Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-Glucan That Mediates the Signaling for the Induction of Innate Immune Genes in *Drosophila melanogaster* Cells, *Journal Of Biological Chemistry*, 275(42), s.: 32721–32727
- Klowden M., 2013. *Physiological systems in insects*. Amsterdam: Academic Press
- Knutelski S., Awad M., Łukasz N., Bukowski M., Śmiałek J., Suder P., Dubin G., Mak P., 2021. Isolation, Identification, and Bioinformatic Analysis of Antibacterial Proteins and Peptides from Immunized Hemolymph of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus*, *Biomolecules*, 11(1):83
- Koehbach J., 2017. Structure-Activity Relationships of Insect Defensins, *Frontiers in Chemistry*, 5: 45
- Kordaczuk J., Sułek M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Śmiałek J., Wojda I., 2022 Cationic protein 8 plays multiple roles in *Galleria mellonella* immunity, *Sci Rep*, 12(1), 11737.
- Kordaczuk J., Sułek M., Wojda I., 2020. General overview on the role of Peptidoglycan Recognition Proteins in insect immunity, *Acta Biochim Pol*, 67(3) s.:319–326

- Kosiol C., Vinar T., da Fonseca R.R., Hubisz M.J., Bustamante C.D., Nielsen R., Siepel A., 2008. Patterns of positive selection in six Mammalian genomes, *PLoS Genet*, 4(8):e1000144
- Krachler A.M., Sirisaengtaksin N., Monteith P., Paine C.E.T., Coates C.J., Lim J., 2021. Defective phagocyte association during infection of *Galleria mellonella* with *Yersinia pseudotuberculosis* is detrimental to both insect host and microbe. *Virulence*, (1) s.:638–653
- Kurata S., 2004. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in *Drosophila*, *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 49, s.: 1174–1178
- Kurata S., 2010. Extracellular and intracellular pathogen recognition by *Drosophila* PGRP-LE and PGRP-LC, *Int. Immunol*, 22, s.: 143–148
- Kurata S., Aiki S., Kawabata S., 2006. Recognition of pathogens and activation of immune response in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity, *Immunobiology*, 211, s.: 237–249
- Kwadha C., Ong'amo G., Ndegwa P., Raina S., Fombong A., 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*, *Insects*, 8(2): 61
- Kyei-Poku G., Gauthier D., Pang A., van Frankenhuyzen K., 2007. Detection of *Bacillus cereus* virulence factors in commercial products of *Bacillus thuringiensis* and expression of diarrheal enterotoxins in a target insect, *Canadian Journal of Microbiology*, 53 (12), s.: 1283-1290
- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S., 2015, Insect pathogens as biological control agents: Back to the future, *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, s.: 1–41
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, s.: 680–685
- Lally E.T., Hill R.B., Kieba I.R., Korostoff J., 1999. The interaction between RTX toxins and target cells, *Trends Microbiol*, 7 s.:356–361
- Langen G., Imani J., Altincicek B., Kieseritzky G., Kogel K.H., Vilcinskas A., 2006, Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco, *Biological Chemistry*, 387, s.: 549–557

- Lavine M., Strand M., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, 32(10), s.: 1295–1309
- Le C.-F., Fang C.-M., Sekaran S.D., 2017. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61: e02340–16
- Leal W.S., Nikonova L., Peng G., 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*, *FEBS Lett*, 464, s.:85–90
- 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 (1), s.: 65–72
- Leone P., Bebeacua C., Opota O., Kellenberger C., Klaholz B., Orlov I., Cambillau C., Lemaitre B., Roussel A., 2015. X-ray and Cryo-electron Microscopy Structures of Monalysin Pore-forming Toxin Reveal Multimerization of the Pro-form, *J Biol Chem*, 290(21), s.:13191–13201
- Lewis Z., Lizé A., 2015. Insect behaviour and the microbiome, *Curr Opin Insect Sci*, 9, s.:86–90
- Liehl P., Blight M., Vodovar N., Boccard F., Lemaitre B., 2006. Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model, *PLoS Pathog*, 2:e56
- Ling E., Rao X.J., Ao J-Q., Yu X-Q., 2009. Purification and characterization of a small cationic protein from the tobacco hornworm *Manduca sexta*, *Insect Biochem. Mol. Biol*, 38(4), s.:263–271
- Ling E., Yu X., 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(12), s.: 1356–1366
- Liu X., Ruan L., Peng D., Li L., Sun M., Yu Z., 2014. Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects, *Toxins*, 6, s.: 2229–2238
- Lizana P., Machuca J., Larama G., Quiroz A., Mutis A., Venthur H., 2020. Mating-based regulation and ligand binding of an odorant-binding protein

support the inverse sexual communication of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Insect Mol Biol*, 29(3), s.:337–351

- Lu A., Zhang Q., Zhang J., Yang B., Wu K., Xie W., Luan Y., Ling E., 2014. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity, *Frontiers in Physiology*, 5: 252
- Ma G., Hay D., Li D., Asgari S., Schmidt O., 2006. Recognition and inactivation of LPS by lipophorin particles, *Dev Comp Immunol*, 30 s.:619–626
- Mak P., Chmiel D., Gacek G.J., 2001. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*, *Acta Biochimica Polonica*, 48 (4), s.: 1191–1195
- Mak P., Zdybicka–Barabas A., Cytryńska M., 2010. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi, *Developmental & Comparative Immunology*, 34(10), s.: 1129–1136
- Makarova O., Rodriguez–Rojas A., Eravci M., Weise C., Dobson A., Johnston P., Rolff J., 2016. Antimicrobial defence and persistent infection in insects revisited, *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 371: 1695
- Malagočka J., Eilenberg J., Jensen A.B., 2019. Social immunity behaviour among ants infected by specialist and generalist fungi, *Curr Opin Insect Sci*, 33, s.:99–104
- Marmaras V., Lampropoulou M., 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity, *Cellular Signalling*, 21(2), s.: 186–195
- Mascarin G.M., Jaronski S.T., 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32bu
- Mattson M.P., Calabrese E.J., 2010. Hormesis: a revolution in biology, toxicology and medicine, Springer, Dordrecht
- Méndez–González F., Castillo–Minjarez J.M, Loera O., Favela–Torres E., 2022 Current developments in the resistance, quality, and production of entomopathogenic fungi, *World J Microbiol Biotechnol*, 38(7):115.
- Menuz K., Larter N.K., Park J., Carlson J.R., 2014. An RNA–Seq Screen of the *Drosophila* Antenna Identifies a Transporter Necessary for Ammonia Detection, *PLoS Genet*, 10, s.:1–19
- Mohamed A.A., Zhang I., Dorrah M.A., Elmogy M., Yousef H.A., Bassal T.T.M., Duvic B., 2016. Molecular characterization of a c–type lysozyme from the desert

- locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae), *Dev Comp Immunol*, 61 s.:60–69
- Moreno–García M., Condé R., Bello–Bedoy R., Lanz–Mendoza H., 2014. The damage threshold hypothesis and the immune strategies of insects, *Infection, Genetics and Evolution*, 24, s.: 25–33
  - Morici L.A., Carterson A.J., Wagner V.E, Frisk A., Schurr J.R., Honer zu Bentrup K., Hassett D.J., Iglewski B.H., Sauer K., Schurr M.J., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum–sensing system in a biofilm–specific manner, *J Bacteriol*, 189, s.:7752–7764
  - Morimoto J., McDonald G.C., Smith E., Smith D.T., Perry J.C., Chapman T., Pizzari T., Wigby S., 2019. Sex peptide receptor–regulated polyandry modulates the balance of pre– and post–copulatory sexual selection in *Drosophila*, *Nat Commun*, 10(1), s.:283
  - Morimoto J., McDonald G.C., Smith E., Smith D.T., Perry J.C., Chapman T., Pizzari T., Wigby S., 2019. Sex peptide receptor–regulated polyandry modulates the balance of pre– and post–copulatory sexual selection in *Drosophila*, *Nat Commun*, 10(1), s.:283
  - Moussian B., 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), s.: 363– 375
  - Mulet M., Gomila M., Lemaitre B., Lalucat J., Garcia–Valdes E., 2012. Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp., *Nov Syst Appl Microbiol*, 35. S.:145–149
  - Myllymäki H., Rämet M., 2014. JAK–STAT Pathway in *Drosophila* Immunity, *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(6), s.: 377–385
  - Mylonakis E., Podsiadlowski L., Muhammed M., Vilcinskis A., 2016. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides, *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 371: 20150290
  - Narajanaswami V., Kiss R.S., Weers P.M., 2010. The helix bundle: a reversible lipid binding motif, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 155(2), s.:123–133

- Neyen C., Runchel C., Schüpfer F., Meier P., Lemaitre B., 2016. The regulatory isoform rPGRP–LC induces immune resolution via endosomal degradation of receptors, *Nat Immunol*, 17(10), s.:1150–1158
- Nguyen L.T., Haney EF., Vogel H.J., 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends Biotechnol*, 29, s.:464–472
- 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, s.:11502–11508
- Nonaka S., Salim E., Kamiya K., Hori A., Nainu F., Asri R.M., Masyita A., Nishiuchi T., Takeuchi S., Kodera N., Kuraishi T., 2020. Molecular and Functional Analysis of Pore–Forming Toxin Monalysin From Entomopathogenic Bacterium *Pseudomonas entomophila*, *Front Immunol*, 27, s.:511–520
- Omoboye O.O., Oni F.E., Batool H., Yimer H.Z., De Mot R., Höfte M., 2019. *Pseudomonas* Cyclic Lipopeptides Suppress the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* by Induced Resistance and Direct Antagonism, *Front Plant Sci*, 10: 901
- Opoosun O.O., Odebiyi J.A., 2009. Life Cycle Stages of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), *Nigerian Journal of Entomology*, 26, s:21–27.
- Opota O., Vallet–Gely I., Vincentelli R., Kellenberger C., Iacovache I., Gonzalez M.R., Roussel A., van der Goot F.G., Lemaitre B., 2011. Monalysin, a novel ss–pore–forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality, *PLoS Pathog*, 7:e1002259
- Ortiz–Urquiza A., Keyhani N.O., 2013. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle, *Insects*, 4, s.: 357–374
- Ortiz–Urquiza A., Keyhani N.O., 2016. Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection in Insects. W: B. Lovett, R.J. St Leger, *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Academic Press
- Osman G., Assaeedi A., Osman Y., El–Ghareeb D., Alreedy R., 2013. Purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal toxin protein(s), *Letters in Applied Microbiology*, 57, s.: 310–316

- Overhage J., Lewenza S., Marr A.K., Hancock R.E., 2007. Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library, *J Bacteriol*, 189, s.:2164–2169
- Paramasiva I., Shouche Y., Kulkarni G.J., Krishnayya P.V., Akbar S.M., Sharma H.C., 2014. Diversity in gut microflora of *Helicoverpa armigera* populations from different regions in relation to biological activity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$  endotoxin Cry1Ac, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87(4), s.: 201–213
- Parasa V.R., Muvva J.R., Rose J.F., Braian C., Brighenti S., Lerm M., 2017. Inhibition of Tissue Matrix Metalloproteinases Interferes with *Mycobacterium tuberculosis*–Induced Granuloma Formation and Reduces Bacterial Load in a Human Lung Tissue Model, *Front Microbiol*, 5,8:2370
- Park S.Y., Kim C.H., Jeong W.H., Lee J.H., Seo S.J., Han Y.S., Lee I.H., 2005. Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*, *Developmental & Comparative Immunology*, 29(1), s.: 43–51
- Pech L.L., Strand M.R., 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, *Journal of Cell Science*, 109, s.: 2053–2060
- Pelosi P., Iovinella I., Zhu J., Wang G., Dani F.R., 2017. Beyond chemoreception: Diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects, *Biol. Rev*, 93, s.:184–200
- Perani M., Bishop A., Vaid A., 1998. Prevalence of  $\beta$ –exotoxin, diarrhoeal toxin and specific  $\delta$ –endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 160, s.: 55–60
- Pivato A.F., Miranda G.M., Prichula J., Lima J.E.A., Ligabue R.A., Seixas A., Trentin D.S., 2022. Hydrocarbon–based plastics: Progress and perspectives on consumption and biodegradation by insect larvae, *Chemosphere*, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.133600
- Pletcher S.D., Libert S., Skorupa D., 2005. Flies and their golden apples: the effect of dietary restriction on *Drosophila* aging and age–dependent gene expression, *Ageing Research Reviews*, 4, s.: 451–480
- Pradeu T., Cooper E.L., 2012. The danger theory: 20 years later, *Frontiers in immunology*, 3, s.: 1–9



- Pratt C., Weers P., 2004. Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipoprotein III, from *Galleria mellonella*, *Biological Chemistry*, 385(11), s.: 1113–1119
- Price C., Ratcliffe N., 1974. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders, *Zeitschrift für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 147(4), s.: 537–54
- Rahman A., Bharali P., Borah L., 2017. Postembryonic development of *Galleria mellonella* L. and its management strategy, *J Entomol Zool Stud*, 5, s.: 1523–1526.
- Rasmuson T., Boman H.G., 1979. Insect immunity – V. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae, *Insect Biochemistry*, 9(3), s.: 259–264
- Ren L., Men L., Zhang Z., 2019. Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter sp.* D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*, *Int J Environ Res Public Health*, 16: 1941
- Rossoni R.D., Ribeiro F.C., Dos Santos H.F.S., Dos Santos J.D., Oliveira N.S., Dutra M.T.D.S., de Lapena S.A.B., Junqueira J.C., 2019. *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens, *Arch Oral Biol*, 101:13-22.
- Ryall B., Mitchell H., Mossialos D., Williams H.D., 2009. Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*, *Lett Appl Microbiol*, 49, s.:131–135
- Ryan R.O., Van der Horst D.J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in energy production, *Ann Rev Entomol*, 45 s.:233–260
- Salzet M., 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses, *Trends in Immunology*, 22 (6), s.: 285–288
- Sarris P.F., Scoulica E.V., 2011. *Pseudomonas entomophila* and *Pseudomonas mendocina*: potential models for studying the bacterial type VI secretion system. *Infect, Genet Evol*, 11 s.:1352–1360
- Sass M., Kiss A., Locke M., 1994. Integument and Hemocyte Peptides, *Journal of Insect Physiology*, 40(5), s.: 407–421
- Schuhmann B., Seitz V., Vilcinskis 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, s.: 125–133
- Schulz N.K.E., Sell M.P., Ferro K., Kleinholting N., Kurtz J., 2019. Transgenerational Developmental Effects of Immune Priming in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*, Front. Physiol, 10, 98
  - Seitz V., Clermont A., Wedde M., Hummel M., Vilcinskis A., Schlatterer K., Podsiadlowski L., 2003. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach, Developmental and Comparative Immunology, 27, s.: 207–215
  - Sen R., Nayak L., De R.K., 2016. A review on host–pathogen interactions: classification and prediction, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 35, s.: 1581–1599
  - Shahbaz–Mohammadi H., Omidinia E., 2011. Screening and characterization of proline dehydrogenase flavoenzyme producing *Pseudomonas entomophila*, Iran J Microbiol, 3, s.:201–202
  - Shaik H.A., Sehnal F., 2009. Hemolin expression in the silk glands of *Galleria mellonella* in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration, J Insect Physiol, 55 (9), s.:781–787
  - Shanbhag S., Tripathi S., 2009. Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut, J Exp Biol, 212, s.:1731–1744
  - Sharda S., Kawecki T.J., Hollis B., 2022. Adaptation to a bacterial pathogen in *Drosophila melanogaster* is not aided by sexual selection, Ecol Evol, 12(2):e8543
  - Sheehan, G., Farrell, G., Kavanagh, K., 2020. Immune priming: the secret weapon of the insect world, Virulence, 11, s.:238–246
  - Shrivastava B., Ghosh A.K., 2003. Protein purification, cDNA cloning and characterization of a protease inhibitor from the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, Insect Biochem. Mol. Biol, 33:1025–1033
  - Siemińska–Kuczer A., Vertyporokh L., Andrejko M., Wojda I., Stączek S., Zdybicka–Barabas A., Grygorczuk K., Cytryńska M., 2017. Metaloproteiny i ich inhibitory: rola w patogenezie na wybranych przykładach [Metalloproteases

and their inhibitors: role in pathogenesis of selected examples], *Postepy Biochem*, 63(4), s.:269–276

- Silva P.M., Gonçalves S., Santos N.C., 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes, *Frontiers in Microbiology*, 5 (97), s.: 1–17
- Sinclair B.J., Ferguson L.V., Salehipour–shirazi G., MacMillan H.A., 2013. Crosstolerance and Cross–talk in the Cold: Relating Low Temperatures to Desiccation and Immune Stress in Insects, *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), s.: 545–556
- Souza J.L.S., Lund R.G., Martins R.M., 2016. Metalloproteinases Secreted By *Candida*: a Systematic Review, *Enzyme Engineering*, 5: 145
- Sowa–Jasiłek A., Zdybicka–Barabas A., Stączek S., Pawlikowska–Pawłęga B., Grygorczuk–Płaneta K., Skrzypiec K., Gruszecki W.I., Mak P., Cytryńska M., 2020. Antifungal Activity of Anionic Defense Peptides: Insight into the Action of *Galleria mellonella* Anionic Peptide 2, *Int J Mol Sci*, 21(6):1912
- Sowa–Jasiłek 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, s.: 194–201
- Sowa–Jasiłek A., Zdybicka–Barabas A., Stączek S., Wydrych J., Skrzypiec K., Mak P., Deryło K., Tchórzewski M., Cytryńska M., 2016. *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells, *Microbiol Res*, 193, s.:121–131
- Spangler H.G., 1985. Sound production and communication in the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae), *Ann Entomol Soc Am*, 78, s.:54–61
- Spangler H.G., 1986. Functional and temporal analysis of sound production in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *J Comp Physiol A*, 159, s.:751–756
- Srikanth K., Park J., Stanley D.W., Kim Y., 2011. Plasmacyte–spreading peptide influences hemocyte behavior via eicosanoids, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78 (3), s.: 145–160
- Steiner H., 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity, *Immunol. Rev*, 198, s.: 83–96

- Strand M., 2008. The insect cellular immune response, *Insect Science*, 15(1), s.: 1– 14
- Suesdek L., 2019. Microevolution of medically important mosquitoes – A review, *Acta Trop*, 191, s.:162–171
- Sulek M., Kordaczuk J., Wojda I., 2021. Current understanding of immune priming phenomena in insects, *J Invertebr Pathol*, 185:107656
- Syed T., Askari M., Meng Z., Li Y., Abid M.A., Wei Y., Guo S., Liang C., Zhang R., 2020. Current Insights on Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) as Next Generation Pest Killers, *Toxins*, 12(8):522
- Taszłow P., Vertyporokh L., Wojda I., 2017. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after repeated infection with *Bacillus thuringiensis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, s.: 87–96
- Taszłow P., Wojda I., 2015. Changes in the hemolymph protein profiles in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis* involve apolipoprotein III. The effect of heat shock, *Archives of insect biochemistry and physiology*, 88 (2), s.: 123–143
- Tellier A., de Vienne D.M., Giraud T., Hood M.E., Refrégier G., 2010. Theory and Examples of Reciprocal Influence Between Hosts and Pathogens. From Short Term to Long Term Interactions: Coevolution, Cospeciation and Pathogen Speciation Following Host Shifts. W: A.W. Barton, *Host–Pathogen Interactions: Genetics, Immunology, and Physiology*. New York: Nova Science Publishers Inc
- Trevijano–Contador N., Zaragoza O., 2018. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens, *J Fungi*, 5(1):3
- Vallet–Gely I., Novikov A., Augusto L., Liehl P., Bolbach G., Pechy–Tarr M., osson P., Keel C., Caroff M., Lemaitre B., 2010a. Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production, *Appl Environ Microbiol*, 76, s.:910–921
- Vallet–Gely I., Opota O., Boniface A., Novikov A., Lemaitre B., 2010b. A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence, *Cell Microbiol*, 12, s.:1666–1679
- Van Baalen M., 1998. Coevolution of recovery ability and virulence, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 265, s.: 317–325
- Van Valen L., 1973. A New Evolutionary Law, *Evolutionary Theory*, 1, s.: 1–30

- 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(2), s.: 273–278
- Vertyporokh L., Wojda I., 2020. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*, *J Invertebr Pathol*, 170:107327
- Vilcinskas A., 2021. Mechanisms of transgenerational immune priming in insects, *Dev Comp Immunol*, 124:104205
- Villamizar S., Ferro J.A., Caicedo J.C., Alves L.M.C., 2020. Bactericidal Effect of Entomopathogenic Bacterium *Pseudomonas entomophila* Against *Xanthomonas citri* Reduces Citrus Canker Disease Severity, *Front Microbiol*, 11:1431
- Vilmos P., Kurucz E., 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system, *Immunology Letters*, 62(2), s.: 59–66
- Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., 2006. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*, *Nat Biotechnol*, 24 s.:673–679
- Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F., Lemaitre B., 2005. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, s.:11414–11419
- 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: 308
- Volkoff A.N., Rocher J., d'Alençon E., Bouton M., Landais I., Quesada-Moraga E., Vey A., Fournier P., Mita K., Devauchelle G., 2003, Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidopteran insects?, *Gene*, 319, s.: 43–53
- Wedde M., Weise C., Kopacek P., Franke P., Vilcinskas A., 1998. Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the

- hemolymph of greater wax moth larvae *Galleria mellonella*, Eur J Biochem, 255(3), s.:535–543
- Wedde M., Weise C., Nuck R., Antilcicek B., Vilcinskas A., 2007. The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors, Biological Chemistry, 388, s.: 119–127
  - Weers, P., Ryan, R., 2006. Apolipophorin III: Role model apolipoprotein, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36(4), s.: 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*, Dev Comp Immunol, 65, s.:124–131
  - Whitten M.M., Tew I.F., Lee B.L., Ratcliffe N.A., 2004. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in beta–1,3–glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions, J Immunol, 172(4), s.: 2177–2185
  - Wiesner J., Vilcinskas A., 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system, Virulence, 1(5), s.: 440–64
  - Wojda I., 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*, Insect Science, 24(3), s.: 342–357
  - Wojda I., Cytryńska M., Zdybicka–Barabas A., Kordaczuk J., 2020a. Insect Defense Proteins and Peptides.,Subcell Biochem, 94, s.:81–121
  - 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, s.: 525–531
  - Wojda I., Staniec B., Sulek M., Kordaczuk J., 2020b. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies, Pathog Dis, 78(9)
  - Wojda I., Vertyporokh L., 2017. Układ odpornościowy owadów w obronie integralności organizmu, Kosmos. Problemy nauk biologicznych, 66(4), s.: 541–551
  - Wu G., Xu L., Yi Y., 2016. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionatal cellular and humoral immuneresponses, Immunology Letters, 174, s.: 45–52
  - Wu G., Zhao Z., Liu C., Qiu L., 2014. Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat–killed bacterial cells induced an enhanced immune

protection against *Photorhabdus luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process, *Journal of Economic Entomology*, 107, s.: 559–569

- Yang H., Liu Y.–L., Tao, Y.–Y., Yang W., Yang C.–P., Zhang J., Qian L.–Z., Liu H., Wang Z.–Y., 2019. Bioinformatic and biochemical analysis of the key binding sites of the pheromone binding protein of *Cyrtotrachelus buqueti* Guerin–Meneville (Coleoptera: Curculionidea), *PeerJ*, 7, s.:1–17
- Yi H.–Y., Chowdhury M., Huang Y.–D., Yu X.–Q., 2014. Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), s.: 5807–5822
- Yu K., Kim K., Lee J., Lee H., Kim S., Cho K., Nam M., Lee I., 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*, *Developmental & Comparative Immunology*, 26(8), s.: 707–713
- Zdybicka–Barabas A., Cytryńska M., 2011. Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 158 (1), s.: 90–98
- Zdybicka–Barabas A., Cytryńska M., Jakubowicz T., 2010. A kinetic study on antibacterial peptides of *Galleria mellonella* larvae and pupae synthesized in response to challenge with *Escherichia coli* lipopolysaccharide, *Annales UMCS Sectio C (Biologica)*, LXV 2 (C); s.: 18–25
- Zdybicka–Barabas A., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M., 2014a, Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87 (1), s.: 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, s.: 2623–2635
- Zdybicka–Barabas A., Palusińska–Szysz M., Gruszecki W.I., Mak P., Cytryńska M., 2014b. *Galleria mellonella* apolipoprotein III—an apolipoprotein with anti–*Legionella pneumophila* activity, *Biochim Biophys Acta*, 1838(10), s.:2689–2697
- Zdybicka–Barabas A., Stączek S., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Cytryńska M., 2013. Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and

lysozyme against Gram-negative bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, s.: 1449–1456

- Zhao Y., Lu G.A., Yang H., Lin P., Liufu Z., Tang T., Xu J., 2021. Run or Die in the Evolution of New MicroRNAs—Testing the Red Queen Hypothesis on De Novo New Genes, *Mol Biol Evol*, 38(4) s.:1544–1553
- Zhou J.-J., 2010. Odorant-Binding Proteins in Insects, *Vitam. Horm.*, 83, s.:241–272
- Ziegelberger G., 2008. Redox-Shift of the Pheromone-Binding Protein in the Silkworm *Antheraea Polyphemus*, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem*, 232, s.:706–711
- Zindel J., Kubes P., 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation, *Annu Rev Pathol*, 15, s.:493–518



## 8. Spis tabel

**Tabela 1.** Systematyka *G. mellonella* (cyt za. Wojda i in., 2020b).

**Tabela 2.** Owadzie PGRP. Na podstawie Kordaczuk i in., 2020.

**Tabela 3.** Systematyka *P. entomophila* (Mulet i in., 2012).

**Tabela 4.** Spis organizmów używanych w doświadczeniach oraz warunki ich wzrostu.

**Tabela 5.** Podsumowanie i kolejność czynności związanych z rozdzielaniem polipeptydów hemolimfy oraz oczyszczaniem białek z uwzględnieniem miejsca wykonywania czynności.

**Tabela 6.** Sekwencje starterów użytych do qRT-PCR.

**Tabela 7.** Podział frakcji polipeptydów uzyskanych analizą HPLC, ze względu na stosunek ilości pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi zakażonymi bakteriami i grupą porównawczą.

**Tabela 8.** Uzyskane sekwencje i identyfikacja wybranych polipeptydów.

## 9. Spis rycin

- Ryc. 1.** Szlaki przekazywania sygnałów u *D. melanogaster* (Cytryńska, 2009).  
Objaśnienia w tekście.
- Ryc. 2.** Podział peptydów odpornościowych *G. mellonella* w zależności od budowy  
(na podstawie Wojda i in., 2020a).
- Ryc. 3.** Poglądowy model oddziaływań peptydów odpornościowych z błonami  
komórkowymi bakterii. Objąśnienia w tekście. Na podstawie Wojda i in., 2020a.
- Ryc. 4.** Uproszczony schemat regulacji aktywności układu oksydazy fenolowej  
(autorstwo własne). Objąśnienia w tekście.
- Ryc. 5.** Mechanizm transportu lipidów przy udziale owadzych apolipoporyn. Objąśnienia  
w tekście. Na podstawie Weers i in., 2006.
- Ryc. 6.** Uproszczony schemat fagocytozy (autorstwo własne). Objąśnienia w tekście.
- Ryc. 7.** Uproszczony schemat przebiegu procesu nodulacji i inkapsulacji (autorstwo  
własne). Objąśnienia w tekście.
- Ryc. 8.** Główne założenia modelu nakładów energetycznych zaproponowane przez Van  
Baalena (1998). Objąśnienie w tekście.
- Ryc. 9.** Uproszczony schemat mechanizmu zakażenia *D. melanogaster* bakterią  
*P. entomophila* (autorstwo własne).
- Ryc. 10.** Rozdział elektroforetyczny białek oczyszczonych z odtłuszczonych ekstraktów  
hemolimfy za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z odwróconymi  
fazami (ang. RP–HPLC).
- Ryc. 11. A–** Krzywe przeżywalności Kaplana–Meiera larw *G. mellonella* po zakażeniu  
bakteriami *P. entomophila* drogą pokarmową. **B–** Morfologia larw kontrolnych, **C–**  
Morfologia po podaniu PBS oraz **D–** Morfologia larw zakażonych niższą dawką bakterii–  
*P. entomophila* 10<sup>3</sup> kom/10 ul zawiesiny a także **E–** Morfologia larw zakażonych wyższą  
dawką bakterii– *P. entomophila* 10<sup>5</sup> kom/10 ul zawiesiny po 32 godzinach od podania  
PBS lub bakterii.
- Ryc. 12.** Preparaty histologiczne przekrojów poprzecznych jelita larw *G. mellonella*,  
widziane pod mikroskopem konfokalnym.

**Ryc. 13.** **A**– Aktywność przeciw *E. coli* hemolimfy larw *G. mellonella* po podaniu różnych dawek *P. entomophila*. **B**– Aktywność przeciw *P. entomophila* hemolimfy larw *G. mellonella* po podaniu różnych dawek *P. entomophila*.

**Ryc. 14.** **A**–Elektroforetyczny rozdział peptydów i białek niskocząsteczkowych ekstraktów hemolimfy po zakażeniu różnymi dawkami *P. entomophila* (tzw. elektroforeza trycynowa). **B**– Aktywność przeciwbakteryjna rozdzielonych w żelu polipeptydów. **C**– strefy zahamowania wzrostu *E. coli* D31.

**Ryc. 15.** Ekspresja genów kodujących wybrane peptydy i białka odpornościowe w ciele tłuszczowym i jelitach.

**Ryc. 16.** Chromatogram uzyskany przez nałożenie trzech analiz HPLC otrzymanych w wyniku rozdziału polipeptydów hemolimfy porównawczej (linia różowa) oraz puli otrzymanej z owadów zakażonych niższą-  $10^3$  CFU (linia niebieska) i wyższą dawką -  $10^5$ CFU (linia czarna) *P. entomophila*.

**Ryc. 17.** Obrazy rozdziałów elektroforetycznych wybranych frakcji uzyskanych po rozdziale HPLC niskocząsteczkowych polipeptydów hemolimfy larw *G. mellonella*

**Ryc. 18.** Ekspresja genów i aktywność przeciwbakteryjna wybranych polipeptydów hemolimfy larw *G. mellonella*.

**Ryc. 19.** Ekspresja genu kodującego białko GmCP8 w ciele tłuszczowym i jelitach

**Ryc. 20.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka GmCP8 wobec różnych mikroorganizmów. **A**– Aktywność białka GmCP8 w stężeniu 3,5  $\mu$ M, 7  $\mu$ M, 14  $\mu$ M wobec *P. entomophila*. **B**– Kinetyka aktywności białka GmCP8 względem *P. entomophila*. **C**– Aktywność białka GmCP8 wobec *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis*, *S. aureus*, *C. albicans* stężeniu 7  $\mu$ M oraz *E. coli* w stężeniu 7  $\mu$ M i 14  $\mu$ M.

**Ryc. 21.** Permeabilizacja błony komórkowej *E. coli* JM38 po inkubacji GmCP8 w stężeniu 7  $\mu$ M i 14  $\mu$ M.

**Ryc. 22.** Topografia powierzchni komórek **A**– *P. entomophila*, **B**– *B. thuringiensis* i **C**– *C. albicans* po godzinnej inkubacji z białkiem GmCP8. **D**– W tabeli przedstawiono parametry biofizyczne powierzchni analizowanych komórek, takie jak chropowatość i wartości siły adhezji.

**Ryc. 23.** Ekspresja genu kodującego białko Ebsp3 w ciele tłuszczowym i jelitach.

**Ryc. 24.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka Ebsp3 w stężeniu 2  $\mu$ M w mieszaninie inkubacyjnej względem *P. entomophila*, *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*.

**Ryc. 25.** Analiza właściwości białka Ebsp3. **A**– Analiza szybkości działania białka Ebsp3 w stężeniu 2  $\mu$ M w mieszaninie inkubacyjnej względem *P. entomophila*. Próbki porównawcze (tj. bakterie z wodą) (–) i badane– bakterie z polipeptydem (+) wysiewano bez inkubacji– tj. w czasie 0 i bez uprzedniego wirowania (**A1**) oraz poddane wirowaniu celem oddzielenia bakterii od badanego białka (**A2**). **B**– Wpływ obecności Ebsp3 w podłożu stałym zależnie od zastosowanego stężenia wobec *P. entomophila*. **C**– Aktywność supernatantu pochodzącego z mieszaniny inkubacyjnej *P. entomophila* i białka Ebsp3 inkubowanych godzinę, określana wobec bakterii *P. entomophila* (+) względem grupy porównawczej tj. bakterii inkubowanych z wodą (–).

**Ryc. 26.** **A**– Analiza elektroforetyczna białka Ebsp3 (0,8  $\mu$ g białka), oraz białka Ebsp3 po 60 minutach inkubacji z wodą (Ebsp3+H<sub>2</sub>O) oraz białka Ebsp3 inkubowanego przez 60 minut z zawiesiną *P. entomophila* (Ebsp3+Pe). **B**– Te same próbki nanoszono na żel i wykonywano bioautografię (rozdział 3.3.12) **C**– Strefy zahamowania wzrostu *P. entomophila*

**Ryc. 27.** Aktywność proteolityczna płynu pochodzącego z *P. entomophila* badana metodą: **A**– spektrofotometryczną; **B**– zymografii po uprzednim rozdziale elektroforetycznym materiału.

**Ryc. 28.** Badanie właściwości białka Ebsp3 względem bakterii *P. entomophila*.

**Ryc. 29.** Ekspresja genu kodującego białko OBP7 w ciele tłuszczowym i jelitach.

**Ryc. 30.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka OBP7 względem *P. entomophila*, *B. thuringiensis* i *C. albicans*.

**Ryc. 31.** Podsumowanie reakcji odpornościowej *G. mellonella* na zakażenie *P. entomophila*