



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ  
W LUBLINIE  
Instytut Nauk Biologicznych

Bartłomiej Iwański

**Wybrane mechanizmy odpowiedzi immunologicznej  
barciaka większego (*Galleria mellonella*) po podaniu  
egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa***

***Selected mechanisms of the immune response of the greater wax  
moth (*Galleria mellonella*) after injection of *Pseudomonas  
aeruginosa* exotoxin A***

*Rozprawa doktorska*

Promotor: dr hab. Mariola Andrejko, prof. UMCS

Lublin, 2023

*Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Marioli Andrejko, prof. UMCS za opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę i poświęcony czas*

*Dziękuję Pani mgr Monice Koziej za pomoc w przygotowaniu doświadczeń oraz grafik*

*Dziękuję również Pani prof. Małgorzacie Cytryńskiej oraz wszystkim Pracownikom, Koleżankom i Kolegom z Katedry Immunobiologii za pomoc, życzliwość i miłą atmosferę*

*Z całego serca dziękuję mojej Rodzinie za motywację i wsparcie*

## **Lista powiązanych tematycznie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**

**Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w następujących oryginalnych artykułach naukowych:**

### **Publikacja 1 (P1)**

Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. *Kosmos*, 72, 203-213.

doi: 10.36921/kos.2022\_2878

Punkty MNiSW<sub>2023</sub>: **20**

### **Publikacja 2 (P2)**

Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, 187, 107706. doi:10.1016/j.jip.2021.107706.

Impact Factor<sub>2023</sub>: **2,795**

Punkty MNiSW<sub>2023</sub>: **140**

### **Publikacja 3 (P3)**

Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 197, 107884. doi:10.1016/j.jip.2023.107884

Impact Factor<sub>2023</sub>: **2,795**

Punkty MNiSW<sub>2023</sub>: **140**

## Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
1. Wstęp.....	7
2. Hipoteza i cel badań.....	12
3. Omówienie wyników.....	13
3.1 Materiał biologiczny stosowany w badaniach.....	13
3.2 Egzotoksyna A.....	13
3.3 Analiza przeżywalności.....	13
3.4 Immunizacja owadów.....	14
3.5 Odpowiedź komórkowa gąsienic <i>G. mellonella</i> na obecność w organizmie <i>exoA</i> ...14	
3.5.1 Zmiany ilościowe hemocytów.....	14
3.5.2 Zmiany morfologiczne hemocytów.....	15
3.5.3 Barwienie fluorescencyjne hemocytów.....	15
3.5.4 Identyfikacja rodzaju śmierci komórkowej hemocytów.....	16
3.6 Wpływ egzotoksyny A na wybrane humoralne reakcje odpornościowe gąsienic <i>G. mellonella</i> .....	17
3.6.1 Aktywność układu oksydazy fenolowej (PO).....	17
3.6.2 Aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy gąsienic.....	17
3.6.3 Analiza profili białkowo-peptydowych hemolimfy.....	18
3.6.4 Zmiany poziomu apolipoproteiny III w hemolimfie owadów.....	19
3.6.5 Analiza poziomu apoLp-III w hemocytach i ciele tłuszczowym gąsienic immunizowanych <i>exoA</i> (wyniki nieopublikowane).....	19
3.6.6 Zmiany ilościowe i jakościowe izoform apoLp-III w tkankach owada (wyniki nieopublikowane).....	20
3.6.7 Immunodetekcja <i>exoA</i> oraz zmiany stężenia białka w tkankach owadów..... (wyniki nieopublikowane).....	22
3.7 Analiza statystyczna.....	22
4. Dyskusja.....	23
5. Podsumowanie.....	29
6. Literatura.....	31
Streszczenie.....	37
Abstract.....	39
Życiorys naukowy.....	41
Publikacja 1.....	46
Publikacja 2.....	58
Publikacja 3.....	64
Oświadczenia współautorów.....	73

## Wykaz skrótów

AMPs (ang. antimicrobial peptides) - peptydy przeciwdrobnoustrojowe

AO (ang. acridine orange) - oranż akrydyny

apoLp-III (ang. apolipoprotein-III) - apolipoproteina III

CD80 (ang. cluster of differentiation 80) - koreceptor 80

CD86 (ang. cluster of differentiation 86) - koreceptor 86

CD91 (ang. cluster of differentiation 91) - koreceptor 91

DAMPs (ang. damage-associated molecular patterns) - wzorce molekularne związane z uszkodzeniami

DHC (ang. differential hemocyte count) - liczba hemocytów poszczególnych grup

DNA (ang. deoxyribonucleic acid) - kwas deoksyrybonukleinowy

EF-2 (ang. elongation factor 2) - czynnik elongacji 2

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

exoA (ang. exotoxin A) - egzotoksyna A

H - Hoechst33342

HLA-DR (ang. Human Leukocyte Antigen - DR isotype) - ludzki antygen leukocytarny - izotyp DR

ICAM-1 (ang. Intercellular Adhesion Molecule 1) - białko adhezyjne 1

IEF (ang. isoelectrofocusing) - izoelektroogniskowanie

IFN- $\gamma$  - interferon - gamma

IL-1 (ang. interleukin-1) - interleukina 1

IP (ang. propidium iodide) - jodek propidyny

IPS (ang. insect physiological saline) - bufor fizjologiczny dla owadów

L-DOPA - 3,4-dihydroksy-L-fenylalanina

LMB-2 (ang. immunotoxin LMB-2) - immunotoksyna LMB-2

MAbs (ang. monoclonal antibodies) - przeciwciała monoklonalne

miRNA (ang. microRNA) - mikroRNA

NK (ang. natural killer cells) - komórki naturalnej cytotoxyczności

PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns) - wzorce molekularne związane z patogenami

pI (ang. isoelectric point) - punkt izoelektryczny

PO (ang. phenol oxidase) - oksydaza fenolowa

PRRs (ang. pattern recognition receptors) - receptory rozpoznające wzorce

PVDF (ang. polyvinylidene fluoride) - polifluorek winylidenu

RNA (ang. ribonucleic acid) - kwas rybonukleinowy

SDS-PAGE (ang. sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

THC (ang. total hemocyte count) - całkowita liczba hemocytów

TNF- $\alpha$  (ang. tumor necrosis factor) - czynnik martwicy nowotworów

# 1. Wstęp

Powszechnie występująca w środowisku Gram-ujemna pałeczka *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonadaceae*) jest oportunistycznym patogenem człowieka. U osób z osłabioną odpornością wywołuje zakażenia układu oddechowego, moczowego, zakażenia ran, kości, stawów, skóry oraz zapalenie rogówki. Ze względu na małe wymagania odżywcze, różnorodne mechanizmy oporności na antybiotyki oraz niewrażliwość na stosowane powszechnie środki dezynfekcyjne bakteria należy do najgroźniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych.

Jedną z charakterystycznych cech bakterii jest zdolność do syntezy szerokiego spektrum czynników wirulencji takich jak lipopolisacharyd, enzymy proteolityczne (elastaza A, elastaza B, proteaza IV i proteaza alkaliczna), hemolizyny, fosfolipazy oraz cytotoksyny (egzotoksyny A, S, T, U i Y). Działanie egzotoksyny S oraz T polega na spowalnianiu procesu fagocytozy, egzotoksyna Y uczestniczy w reorganizacji cytoskieletu komórki eukariotycznej, natomiast egzotoksyna U jest odpowiedzialna za uszkodzenia błony komórkowej (Khalifa i in., 2011).

Największe znaczenie w chorobotwórczości *P. aeruginosa* przypisuje się egzotoksynie A (*exoA*). W komórkach eukariotycznych *exoA* katalizuje ADP-rybozylację czynnika elongacji EF-2 w cytozolu, co skutkuje zahamowaniem procesu translacji, zaburzeniem homeostazy białkowej i skierowaniem komórki na drogę apoptozy (Łepeta i in., 2010). Toksyna zbudowana jest z trzech domen (613 aminokwasów): receptorowej (domena I), translokacyjnej (domena II) oraz ADP-rybozylującej (domena III). Podczas infekcji domena receptorowa wiąże się z receptorem CD91, który znajduje się na powierzchni komórki, umożliwiając domenie II translokację fragmentu domeny I (Ib) oraz domeny III do wnętrza komórki. Następnie domena ADP-rybozylująca jest odcinana przez wewnątrzkomórkowe proteazy i przyłącza się do EF-2 powodując zahamowanie syntezy białek. Stosunkowo dobrze poznane są właściwości cytotoksyczne *exoA* w stosunku do limfocytów i granulocytów, natomiast niewiele wiadomo o jej wpływie na inne komórki układu odpornościowego. Wykazano, że *exoA* hamuje syntezę interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) oraz ekspresję receptorów CD80, CD86, ICAM-1 i HLA-DR na monocytach, a także zmniejsza aktywność cytotoksyczną komórek NK (Michałkiewicz i in., 1999). Ponadto zaobserwowano, że *exoA* powoduje apoptozę ludzkich mastocytów oraz zmniejszenie produkcji niektórych cytokin, m.in. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  lub IL-1 (Jenkins i in., 2006; Staugas i in. 1992).

W nowoczesnej terapii antynowotworowej testowane jest wykorzystanie do walki z rakiem immunotoksyn, czyli połączenia toksyn bakteryjnych z przeciwciałami monoklonalnymi (MAbs), czynnikami wzrostu lub cytokinami specyficznymi wiążącymi się do danego antygen/receptora na powierzchni komórki nowotworowej. Badania przeprowadzone na ssaczych organizmach modelowych wykazały skuteczność immunotoksyny uzyskanej na bazie *exoA P. aeruginosa*, w zwalczaniu czerniaka, raka płuc, nerki i szpiku (Weldon i Pastan, 2011; Wolf i Elsässer-Beile, 2009). Innym przykładem skutecznej terapii z wykorzystaniem *exoA* jest toksyna LMB2, fragment zmienny przeciwciała anti-CD25 połączony ze skróconą egzotoksyną. W badaniach klinicznych wykazano jej aktywność w przewlekłej białaczce limfocytowej B-komórkowej i neoplazji komórek T (Łepeta i in., 2010).

W badaniach patogenności *P. aeruginosa* jako organizm modelowy wykorzystywany jest barciak większy *Galleria mellonella* (Lepidoptera, *Pyralidae*). Stwierdzono wysoki stopień korelacji pomiędzy zjadliwością bakterii w badaniach z użyciem barciaka oraz modeli ssaczych (Jander i in., 2000). Do zalet tego organizmu można zaliczyć kosmopolityczność, relatywnie niski koszt hodowli, krótki cykl życiowy oraz możliwość częstego pozyskiwania dużych ilości osobników. Duży rozmiar gąsienic (10-20mm) ułatwia manipulacje laboratoryjne oraz znacząco upraszcza pobieranie tkanek do analiz. Ponadto gąsienice mogą być bezpiecznie inkubowane w 37°C, temperaturze koniecznej do właściwej syntezy i działania wielu czynników wirulencji produkowanych przez patogeny chorobotwórcze dla człowieka (P1, Junqueira, 2012; Tsai i in., 2016). Ze względu na udowodnione podobieństwa pomiędzy wieloma składnikami wrodzonej odporności owadów i ssaków, barciak wykorzystywany jest przede wszystkim w badaniach interakcji patogen-gospodarz, do testowania patogenności i identyfikacji czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka oraz do oceny skuteczności leków przeciwdrobnoustrojowych (P1, Champion i in., 2016; Ramaro i in., 2012; Wojda i in., 2020).

Układ odpornościowy owadów jest oparty na powiązanych ze sobą mechanizmach odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Po sforsowaniu barier anatomiczno-fizjologicznych obecność obcych dla organizmu struktur jest rozpoznawana przez układ odpornościowy gospodarza. Swoiste dla danego mikroorganizmu determinanty strukturalne tzw. wzorce molekularne związane z patogenem PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns) lub cząsteczki będące efektem uszkodzenia komórek DAMPs (ang. danger-associated molecular patterns) są rozpoznawane przez specyficzne białka receptorowe owada PRRs



(ang. pattern recognition receptors). Proces ten jest wspomagany przez obecne w hemolimfie białka – hemolinę i apolipoproteinę III (apoLp-III).

Hemolina jest indukowalnym białkiem o masie 48 kDa zbudowanym z czterech domen immunoglobulinowych. Występuje w formie wolnej lub związanej z błoną komórkową hemocytów. Ma zdolność wiązania się do powierzchni komórek drożdży, bakterii Gram-ujemnych przez lipopolisacharyd oraz bakterii Gram-dodatnich poprzez oddziaływanie z kwasami lipotejchowymi (Tsai i in., 2016).

ApoLp-III jest konstytutywnie wydzielana do hemolimfy, wchodzi w skład mobilnego kompleksu lipoforyn, który odpowiada za transport lipidów i zaopatrzenie energetyczne mięśni owada. Dobrze udokumentowana jest rola apoLp-III jako receptora rozpoznającego molekularne determinanty patogenów. Ponadto białko wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, jak również oddziałuje synergistycznie z lizozymem (Zdybicka-Barabas i in., 2013; 2015) oraz ciekropiną (Bolouri Moghaddam i in., 2016; Stączek i in., 2018) wzmagając ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. ApoLp-III jest zaangażowana w odpowiedź komórkową, uczestniczy w regulacji aktywności układu oksydazy fenolowej oraz detoksyfikuje toksyny drobnoustrojów. Białko to jest homologiem apolipoproteiny E, pełniąc funkcje odpornościowe u ssaków.

W odpowiedzi komórkowej owada uczestniczą hemocyty zaangażowane w proces fagocytozy oraz tworzenie otoczek wokół ciał obcych (enkapsulacja i nodulacja). U barciaka wyróżnia się 5 rodzajów hemocytów: prohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, sferulocyty oraz enocytoidy. Granulocyty i plazmatocyty, obecne w hemolimfie w największej ilości, są komórkami zdolnymi do adhezji do obcych powierzchni i odpowiadają za wspomniane wyżej procesy. Główną funkcją sferulocytów jest transport metabolitów, natomiast enocytoidy syntetyzują składniki układu oksydazy fenolowej. Ilość hemocytów w hemolimfie zmienia się w trakcie życia owada jak również w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne lub zakażenie (Binder i in., 2016; Browne i in., 2013; Lavine i Strand, 2002; Wu i in., 2016). Odpowiedź humoralna owadów obejmuje m.in. proces krzepnięcia hemolimfy, aktywację kaskad enzymów proteolitycznych prowadzących do melanizacji oraz indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych AMPs (ang. antimicrobial peptides) (**P1**).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są kluczowymi efektorami odporności wrodzonej. Wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, przeciwprzeczynnicy, a często przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Jak dotąd u *G.*

*mellonella* zidentyfikowano kilkanaście peptydów różniących się strukturą i mechanizmem działania. Są wśród nich peptydy  $\alpha$ -helikalne (cekropiny A i D, moricyny), o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyna), bogate w prolinę, w glicynę (gloweryny) a także peptydy anionowe (Cytryńska i in., 2007; Li i in., 2012). AMPs owadzie wykazują duży stopień homologii do peptydów syntetyzowanych przez organizmy ssacze, w tym do peptydów ludzkich. Dotychczasowe badania wykazały, że ich produkcja jest regulowana niekodującym, niskocząsteczkowym RNA (miRNA), tak jak ma to miejsce w organizmach ssaków, natomiast profil syntetyzowanych AMPs jest skorelowany z rodzajem zidentyfikowanego patogenu (Mukherjee i in., 2020).

W Katedrze Immunobiologii gąsienice barciaka większego *G. mellonella* wykorzystywane są jako organizm modelowy w badaniach interakcji bakterii *P. aeruginosa* z mechanizmami odporności wrodzonej gospodarza. Do tej pory wykazano, że po zakażeniu tym patogenem dochodzi do degradacji proteolitycznej zarówno peptydów odpornościowych jak i apolipoproteiny III, podczas gdy lizozym okazał się niewrażliwy na pozakomórkowe proteiny wytwarzane przez *P. aeruginosa* (Andrejko i in., 2005; 2008b). Uzyskane wyniki wskazują, że w degradację proteolityczną białek/peptydów odpornościowych zaangażowane są serynowa proteaza IV oraz elastaza B. Należy zaznaczyć, że elastaza B jak również alkaliczna proteaza podane w subletalnym stężeniu były odpowiedzialne za zwiększenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie larw *G. mellonella* poprzez indukcję syntezy peptydów obronnych (Andrejko i Mizerska-Dudka, 2011; 2012; Andrejko i in., 2009; Andrejko i Siemińska, 2016). Ponadto wykazano, że proteaza alkaliczna *P. aeruginosa* znacząco hamowała aktywację kaskady profenolooksydazy w hemolimfie *G. mellonella* (Andrejko i in., 2021b).

U gąsienic *G. mellonella* zakażonych szczepami *P. aeruginosa* różniącymi się profilem wydzielanych proteaz udało się zidentyfikować przeciwdrobnoustrojowe peptydy i białka (Andrejko i in., 2021a). Ponadto zaobserwowano, że infekcja owadów bakterią *P. aeruginosa* spowodowała istotne zmiany w morfologii, żywotności i zdolności rozprzestrzeniania się immunokompetentnych hemocytów, a mianowicie granulocytów i plazmatocytów (Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014). Uzyskane wyniki badań ujawniły zróżnicowany wpływ izolatów klinicznych *P. aeruginosa* na parametry odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella*, co wskazuje, że ten model owadzi może być przydatny do analizy czynników wirulencji różnych szczepów badanej bakterii (Andrejko i in., 2014).

## **2. Hipoteza i cel badań**

W ostatnich latach gąsienice *Galleria mellonella* z powodzeniem są stosowane jako organizm modelowy w badaniach patogenności oraz czynników wirulencji drobnoustrojów

chorobotwórczych dla człowieka, w tym bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.

Badania *in vivo* realizowane w Katedrze Immunobiologii dowiodły, że zakażenie gąsienic bakteriami *P. aeruginosa* powoduje zmiany w poziomie apolipoforyny III, aktywności układu oksydazy fenolowej oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej hemolimfy. Ponadto zaobserwowano apoptozę hemocytów po zakażeniu owadów tym patogenem. Podjęte badania przedstawione w niniejszej pracy, miały na celu identyfikację roli, jaką podczas zakażenia pełni egzotoksyna A - jeden z najgroźniejszych czynników wirulencji *P. aeruginosa* oraz zbadanie interakcji *exoA* z wybranymi elementami odpowiedzi odpornościowej gąsienic *G. mellonella*.

Celem niniejszej pracy było:

- przeanalizowanie wybranych mechanizmów komórkowej odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella*, po wprowadzeniu do hemocelu gąsienic subletalnej dawki *exoA*; badano zmiany ilościowe, jakościowe oraz morfologiczne hemocytów, jak również podjęto próbę identyfikacji rodzaju śmierci komórkowej hemocytów;
- określenie wpływu *exoA* na wybrane humoralne reakcje odpornościowe gąsienic *G. mellonella*. Wśród analizowanych parametrów należy wymienić: poziom apolipoforyny III w tkankach owadów; aktywność układu oksydazy fenolowej w warunkach *in vivo*, aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie badanych owadów.

### **3. Omówienie wyników**

#### **3.1. Materiał biologiczny stosowany w badaniach**

Modelem doświadczalnym stosowanym w badaniach były gąsienice barciaka większego *G. mellonella* (250-300 mg) z hodowli prowadzonej w Katedrze Immunobiologii w ściśle kontrolowanych warunkach (28°C, w ciemności, przy wilgotności 60-80%) na plastrach woszczyny pszczelej. W prowadzonych badaniach wykorzystywano następujące bakterie: *Escherichia coli* K12 szczep D31 (CGSC565, Genetic Stock Centre, New Haven, USA, Boman i in., 1974) oraz *Pseudomonas aeruginosa* szczep ATCC 27853 pochodzące z kolekcji drobnoustrojów Katedry Immunobiologii UMCS.

### 3.2. Egzotoksyna A

W doświadczeniach użyta została komercyjnie dostępna, oczyszczona i liofilizowana egzotoksyna A *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich). Przed zastosowaniem toksynę rozpuszczano w płynie fizjologicznym dla owadów IPS (150mM NaCl, 5mMKCl, 0,1M Tris-HCl, pH 6,9).

### 3.3. Analiza przeżywalności

W oparciu o krzywe przeżywalności larw *G. mellonella* (w czasie od 0 do 72 godz.) wyznaczone algorytmem Kaplana-Meiera (1958), do dalszych badań wybrana została dawka subletalna *exoA* (20ng/larwę), czyli dawka, która nie powodowała śmiertelności owadów do 48 godz. od immunizacji (**P2** Fig. 1A). Średnia dawka letalna (LD<sub>50</sub>) *exoA* dla gąsienic *G. mellonella* wyznaczona metodą Reeda-Muencha (1938) wynosiła 34,5 ng/larwę.

### 3.4. Immunizacja owadów

Gąsienice immunizowano subletalną dawką *exoA* (20 ng/5µl IPS/larwę) natomiast owadom kontrolnym podawano bufor IPS (5 µl/larwę). Próby hemolimfy, hemocytów i

ciała tłuszczowego pobierano po 1, 4, 8, 15, 18 i 24 godz. od immunizacji wg procedur opracowanych wcześniej w Katedrze (**P2**, **P3**, Andrejko i in., 2021a).

### 3.5 Odpowiedź komórkowa gąsienic *G. mellonella* na obecność w organizmie exoA

Wiadomo, że exoA charakteryzuje się cytotoksycznością w stosunku do limfocytów, granulocytów oraz hamuje proliferację makrofagów w organizmach ssaczych. Wykazano również, że toksyna powoduje śmierć granulocytów *Drosophila spp.* Dlatego też w niniejszej pracy przeanalizowano wybrane parametry komórkowej odpowiedzi odpornościowej gąsienic *G. mellonella* na podanie subletalnej dawki exoA.

#### 3.5.1 Zmiany ilościowe hemocytów

Pierwszym etapem tych badań była analiza zmian ilościowych hemocytów w hemolimfie gąsienic immunizowanych subletalną dawką egzotoksyny. Hemolimfę zbierano z pojedynczych osobników (20 µl / larwę; 5 larw / punkt czasowy), rozcieńczano 2-krotnie w antykoagulancie i natychmiast umieszczano w komorze Bürkera do obserwacji. Na podstawie zebranych danych wykonano hemocytogram dla całkowitej liczby hemocytów (THC) (**P3**). Następnie hemocyty zostały podzielone na grupy według różnic w ich budowie morfologicznej (Lavine i Strand, 2002) i wykonano hemocytogram dla poszczególnych ich rodzajów (DHC) (**P3**).

Wyniki analizy THC wykazały istotny statystycznie spadek (ponad 60%) całkowitej ilości hemocytów w hemolimfie owadów już po 8 godz. od podania exoA, utrzymujący się do 24 godz. (spadek o ponad 80%) w porównaniu z owadami kontrolnymi, które traktowano IPS (**P3**). Dzięki analizie DHC wykazano, że immunizacja owadów egzotoksyną spowodowała istotne zmiany ilościowe przede wszystkim granulocytów oraz plazmatocytów. W porównaniu z próbami kontrolnymi, po 8 godz. od immunizacji, ilość granulocytów zmniejszyła się o ponad 50%, natomiast plazmatocytów o ponad 70%. Z kolei po 24 godz. od podania exoA zarówno ilość granulocytów jak i plazmatocytów była niższa o około 85% niż w próbach kontrolnych. Nie zauważono istotnych statystycznie zmian w liczbie sferulocytów oraz enocytoidów (**P3**).

### 3.5.2. Zmiany morfologiczne hemocytów

Biorąc pod uwagę mechanizm działania *exoA* w komórkach eukariotycznych, założono, że obserwowany spadek liczby granulocytów i plazmatocytów mógł być skutkiem cytotoksycznego oddziaływania toksyny na hemocyty *G. mellonella*. Dlatego też w kolejnych doświadczeniach przeprowadzono obserwacje zmian morfologicznych oraz analizę przeżywalności hemocytów z wykorzystaniem błękitu trypanu. Hemocyty były barwione 20 minut 0,2% barwnikiem rozpuszczonym w IPS, następnie komórki obserwowano pod mikroskopem świetlnym (Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014, **P3**).

Mikroskopowa analiza hemocytów pobranych z larw immunizowanych *exoA* ujawniła wyraźne zmiany morfologiczne – komórki stały się większe, napęczniałe i zaokrąglone już po 8 godz. od iniekcji (**P3**, Fig. 3A, B i C). Ponadto hemocyty charakteryzowały się obecnością wakuoli w pobliżu jąder oraz licznych pęcherzyków błonowych. Niektóre z obserwowanych komórek były zabarwione na ciemnoniebiesko, co jest cechą charakterystyczną dla komórek martwych z uszkodzoną błoną (**P3**, Fig. 3D i E).

### 3.5.3. Barwienie fluorescencyjne hemocytów

Otrzymane rezultaty wskazywały na indukcję przez *exoA* zarówno nekrotycznej jak i apoptotycznej śmierci hemocytów *G. mellonella*. Aby zidentyfikować rodzaj śmierci komórkowej wywoływanej przez badaną toksynę przeprowadzono barwienie z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych – oranżu akrydyny oraz mieszaniny jodku propidyny/Hoechst 33342 wg metody opracowanej we wcześniejszych badaniach (Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014, **P3**). Hoechst 33342 (H) jest barwnikiem przechodzącym przez błonę komórkową, barwi DNA w jądrze zarówno żywych, jak i martwych komórek na niebiesko. Jodek propidyny (IP) nie przechodzi przez błonę komórkową, jest powszechnie stosowanym barwnikiem fluorescencyjnym odróżniającym żywe i martwe komórki z uszkodzoną błoną komórkową, które barwią się na czerwono. Oranż akrydyny (AO) przechodzi przez błonę komórkową, wchodzi w interakcje z DNA i RNA, barwi struktury komórkowe o kwaśnym pH, takie jak lizosomy, fagolizosomy lub wakuole autofagalne. W warunkach niskiego pH emituje światło pomarańczowe. Komórki martwe z uszkodzoną błoną komórkową są zabarwione na czerwono.

W trakcie analiz z wykorzystaniem AO zaobserwowano hemocyty zabarwione na

zielono w próbach kontrolnych, co jest charakterystyczne dla żywych, nieuszkodzonych komórek. W próbach badanych hemocyty uległy agregacji i miały liczne wakuole zabarwione na czerwono (**P3**, Fig.4). Po zastosowaniu mieszaniny H/IP w próbach kontrolnych zaobserwowano komórki z jądrem komórkowym zabarwionym na niebiesko, co świadczy o braku uszkodzeń. Z kolei w próbach zawierających hemocyty larw immunizowanych *exoA* w początkowych czasach (1-8 godz.) widoczne były liczne komórki z zabarwioną na czerwono cytoplazmą oraz jądrami emitującymi niebieską fluorescencję. W późniejszych godzinach (15-24 godz.) dominowały komórki emitujące niebieską fluorescencję, można było również zaobserwować struktury charakterystyczne dla apoptozy: ciała apoptotyczne i komórki ze skondensowaną chromatyną (**P3**, Fig. 5).

#### 3.5.4. Identyfikacja rodzaju śmierci komórkowej hemocytów

Aby bardziej szczegółowo wyjaśnić możliwy mechanizm oddziaływania *exoA* na hemocyty *G. mellonella*, przeprowadzono dodatkowe analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz IP/Aneksyny V (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II, BD Pharmingen™, **P3**). W doświadczeniach użyte zostały próby hemocytów otrzymane po 8 i 24 godz. od immunizacji owadów badaną toksyną. Wykazano, że po 8 godz. średnia liczba komórek nekrotycznych wynosiła 12,6% w próbie kontrolnej (owady traktowane IPS) oraz 14,5% w próbie zawierającej hemocyty owadów traktowanych *exoA*, podczas gdy średnia liczba komórek apoptotycznych wynosiła odpowiednio 17,7% oraz 23%. Z kolei po 24 godz. zanotowano znaczny wzrost liczby komórek apoptotycznych: o około 20% w próbie kontrolnej i o 46% w pobranej z larw poddanych działaniu *exoA*. Dodatkowo towarzyszyło temu znaczne zmniejszenie liczby komórek nekrotycznych, tj. do 7,5% w kontroli i 9,4% w próbach badanych, w porównaniu z próbami hemocytów uzyskanymi po 8 godz. (**P3**, Fig. 6).

W związku z tym, że uzyskane wyniki wskazywały na indukcję apoptozy w badanych hemocytach, dodatkowo przeprowadzono analizy mające na celu wykrycie aktywnej kaspazy 3 (marker apoptozy) w komórkach izolowanych z larw immunizowanych subletalną dawką *exoA*. W badaniach wykorzystano metodę cytometrii przepływowej oraz komercyjny zestaw PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen™, **P3**) wg procedury dostarczonej przez producenta. W porównaniu z próbą kontrolną, uzyskaną od owadów traktowanych IPS, 24 godz. od immunizacji owadów



egzotoksyną A zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości komórek z aktywną formą kaspazy 3 (**P3**, Fig.7).

### 3.6. Wpływ egzotoksyny A na wybrane humoralne reakcje odpornościowe gąsienic *G. mellonella*

Odpowiedź humoralna u owadów obejmuje głównie działanie składników rozpuszczonych w hemolimfie, do których zalicza się m.in. układ oksydazy fenolowej, lizozym, peptydy odpornościowe oraz inne białka, które oprócz podstawowych dla nich funkcji biorą udział w reakcjach obronnych organizmu jak np. apolipoforyna III (apoLp-III)

#### 3.6.1. Aktywność układu oksydazy fenolowej (PO)

Aktywacja układu PO jest jedną z najszybszych reakcji odpornościowych owada uruchamianych w momencie zranienia czy też rozpoznania obecności w organizmie obcych struktur. W hemolimfie otrzymanej po 1-24 godz. od immunizacji owadów *exoA*, poziom aktywności oksydazy fenolowej był określany metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem L-DOPA jako substratu (**P2**). Nieznaczny, ale istotny statystycznie spadek aktywności oksydazy fenolowej zaobserwowano już po 4 godz. od immunizacji. Natomiast po 8 i 15 godz. poziom aktywności obniżył się prawie 3-krotnie, następnie obserwowano powolny wzrost do poziomu w próbach kontrolnych (**P2**, Fig. 1C).

#### 3.6.2. Aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy gąsienic

Wiadomo, że u Lepidoptera lizozym jest obecny w hemolimfie na niskim poziomie, natomiast po immunizacji bakteriami lub grzybami jego poziom oraz aktywność wyraźnie wzrasta. Aktywność typu lizozymu wyznaczano na podstawie wielkości stref rozkładu peptydoglikanu ze ścian komórkowych bakterii *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich) metodą dyfuzyjną opisaną szczegółowo w **P2**; średnice tych stref przeliczano na ekwiwalent lizozymu białka jaja kurzego EWL (ang. Egg White Lysozyme). W hemolimfie larw immunizowanych *exoA* aktywność lizozymu zmniejszyła się o około 45% już po 1 godz., natomiast prawie 85% spadek zanotowano po 8, 15 i 18 godz. od

podania *exoA*. Obniżony poziom aktywności lizozymu utrzymywał się do końca doświadczenia (24 godz.).

Aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie gąsienic, skierowaną przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, analizowano metodą bioautografii, która pozwala na oznaczenie aktywności anty-*E. coli in situ*, po uprzednim rozdziale białek i peptydów hemolimfy metodą elektroforezy glicynowej w warunkach denaturujących. Próby przygotowano z hemolimfy owadów pobranej po 1, 8 i 15 godz. od podania *exoA*, próbę kontrolną stanowiła syntetyczna cekropina B. Na obrazach elektroforetycznych po rozdziale polipeptydów hemolimfy nie wykryto stref zahamowania wzrostu *E. coli*, zlokalizowanych w obszarze migracji próby kontrolnej (**P2**, Fig. 2C).

### 3.6.3. Analiza profili białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic

Przeciwdrobnoustrojowe peptydy i białka stanowią kluczowy element humoralnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom. Biorąc pod uwagę brak aktywności przeciwko *E. coli* wykazanej na żelach po bioautografii, celem kolejnych badań było sprawdzenie czy po aplikacji *exoA* do hemocelu owada dochodzi do indukcji syntezy peptydów odpornościowych.

W celu porównania profili białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic traktowanych *exoA* z hemolimfą owadów kontrolnych, które immunizowano zabitymi wysoką temperaturą bakteriami *P. aeruginosa*, wykonano ekstrakty metanolowe zawierające niskocząsteczkowe białka i peptydy (poniżej 30 kDa), następnie dokonano separacji polipeptydów ekstraktów za pomocą elektroforezy trycynowej wg metodyki opisanej w **P2**.

Na otrzymanych żelach zwrócono uwagę na brak prążków peptydowych o masie cząsteczkowej poniżej 6,5 kDa w próbach zawierających ekstrakty z hemolimfy owadów traktowanych *exoA*. Należy zaznaczyć, że w ekstrakcie kontrolnym otrzymanym z hemolimfy owadów immunizowanych bakteriami, prążki odpowiadające peptydom odpornościowym były wyraźnie widoczne. Wykryto również wyraźne zmiany w poziomie białka o masie 18 kDa, co odpowiada apolipoforynie III (**P2**, Fig. 2B).

### 3.6.4. Zmiany poziomu apolipoforyny III w hemolimfie owadów

Jednym z najważniejszych elementów humoralnej odpowiedzi odpornościowej jest apolipoporyna III. Białko to jest odpowiedzialne m. in. za rozpoznanie patogenów oraz ich czynników wirulencji. W celu zbadania wpływu *exoA* na poziom apoLp-III próbki hemolimfy pobrane od owadów immunizowanych *exoA* rozdzielano za pomocą SDS-PAGE, następnie poddawano elektrotransferowi na membrany PVDF i przeprowadzano immunoblotting z użyciem specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych rozpoznających apoLp-III (Agrisera). Wybarwione membrany zostały poddane analizie densytometrycznej z wykorzystaniem programu ImageJ, następnie przeprowadzono analizę statystyczną otrzymanych wyników, jak opisano w **P2**.

W hemolimfie owadów traktowanych *exoA* zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu apoLp-III o około 15% po 4 godz. od iniekcji w odniesieniu do gąsienic kontrolnych. Najniższy poziom badanego białka (około 2-krotny spadek) w porównaniu z kontrolą, zaobserwowano po 8 i 15 godz. od immunizacji, następnie ilość białka stopniowo rosła osiągając po 18-24 godz. poziom obserwowany w grupie kontrolnej (**P2**, Fig 2)

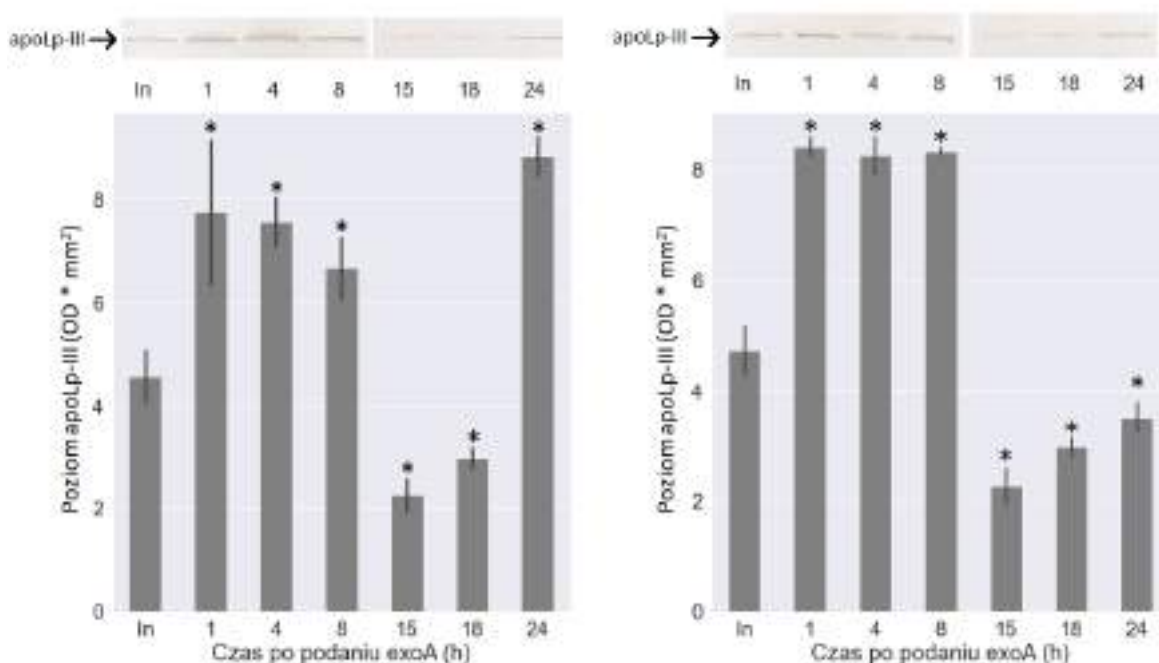
### 3.6.5. Analiza poziomu apoLp-III w hemocytach i ciele tłuszczowym gąsienic immunizowanych *exoA* (wyniki nieopublikowane)

Poniżej zaprezentowane zostały wyniki dodatkowych analiz, które nie zostały jeszcze opublikowane, których celem było bardziej szczegółowe określenie mechanizmu działania toksyny.

W związku z tym, że zaobserwowano wyraźne zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie owadów, którym podano drogą iniekcji *exoA* (3.6.4), w kolejnej serii doświadczeń poziom tego białka analizowano w hemocytach oraz ciele tłuszczowym gąsienic *G. mellonella*. Ekstrakty białkowe z hemocytów oraz ciała tłuszczowego zostały przygotowane zgodnie z metodyką opisaną we wcześniejszych pracach (Andrejko i in., 2021a, Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014), następnie zostały rozdzielone metodą SDS-PAGE i poddane elektrotransferowi. Wybarwione membrany poddano analizie densytometrycznej z wykorzystaniem programu ImageJ, oraz analizie statystycznej, jak opisano w **P2**

Zarówno w hemocytach jak i w ciele tłuszczowym gąsienic zaobserwowano istotny statystycznie, około 2-krotny wzrost poziomu apoLp-III w porównaniu z grupami kontrolnymi, 1-8 godz. od podania owadom *exoA*. Natomiast 15-18 godz. od immunizacji

w badanych tkankach zaobserwowano ponad 50% spadek ilości apoLp-III. Z kolei pod koniec doświadczenia, po 24 godz. od immunizacji, poziom białka w hemocytach wzrósł około 2-krotnie, podczas gdy w ciele tłuszczowym wciąż był istotnie niższy niż w odpowiadającej próbie kontrolnej o około 50% (Fig 1).



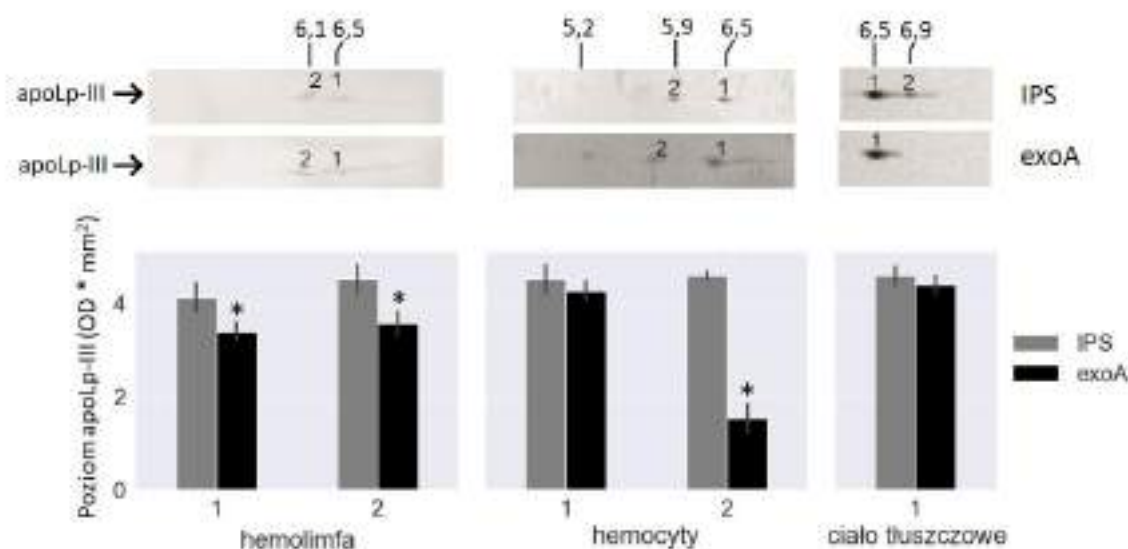
**Fig. 1** Zmiany poziomu apoLp-III w próbkach hemocytów (A) i ciała tłuszczowego (B) larw *G. mellonella* po podaniu exoA. Białka rozdzielono metodą SDS-PAGE, przeniesiono na membrany PVDF i sondowano specyficznymi przeciwciałami anty-apoLp-III. Przedstawiono reprezentatywne membrany. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej prążków uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów, średnia +/- SD. \* $p < 0,05$ , testy Kruskala-Wallis i Manna-Whitneya.

### 3.6.6. Zmiany ilościowe i jakościowe izoform apoLp-III w tkankach owada (wyniki nieopublikowane)

Ze względu na fakt, że największy spadek poziomu apoLp-III we wszystkich badanych tkankach był obserwowany po 15 godz. od iniekcji owadom exoA, dlatego też do dalszych doświadczeń mających na celu przeanalizowanie profilu poszczególnych izoform apoLp-III w hemolimfie, hemocytach oraz ciele tłuszczowym użyte zostały próby tkanek uzyskane w tym punkcie czasowym. Próbki tkanek poddano elektroforezie dwukierunkowej w zakresie 3-10 pH, następnie białka przeniesiono na membrany PVDF i przeprowadzono immunoblotting połączony z analizą densytometryczną. IEF/SDS-PAGE

wykonano z wykorzystaniem systemu Protean IEF FocusingSystem i 7-cm long ReadyStrip TMIPG Strips pH 3-10 (BioRad) (Zdybicka-Barabas i in., 2015).

W hemolimfie i hemocytach owadów kontrolnych zidentyfikowano dwie izoformy apoLp-III o identycznej masie cząsteczkowej i różnych punktach izoelektrycznych (odpowiednio o  $pI \sim 6,5$  i  $\sim 6,1$  w hemolimfie oraz  $pI \sim 6,5$  i  $\sim 5,9$  w hemocytach). Jedną izoformę o  $pI \sim 6,5$  oraz polipeptyd będący pochodną apoLp-III o  $pI \sim 6,9$  zaobserwowano w ciele tłuszczowym. W hemolimfie po 15 godz. od immunizacji owadów subletalną dawką *exoA* obserwowano istotny statystycznie spadek poziomu obu izoform o około 30%. W hemocytach po tym czasie zaobserwowano około 65% spadek poziomu izoformy o  $pI \sim 5,9$  podczas gdy poziom izoformy o  $pI \sim 6,5$  pozostał bez zmian. Dodatkowo zaobserwowano pojawienie się polipeptydu o  $pI \sim 5,2$  będącego pochodną apoLp-III. W ciele tłuszczowym nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w ilości głównej izoformy apoLp-III, natomiast nie zaobserwowano obecności polipeptydu o  $pI \sim 6,9$  (Fig 2).



**Fig. 2** Analiza form apoLp-III w hemolimfie, hemocytach i ciele tłuszczowym larw *G. mellonella*. Próbkę tkanek pobrano z owadów immunizowanych IPS i *exoA* 15 godz. po iniekcji. Białka rozdzielono metodą IEF/SDS-PAGE, przeniesiono na membrany PVDF i sondowano za pomocą specyficznych przeciwciał anty-apoLp-III. Przedstawiono reprezentatywne membrany. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej prążków uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów, średnia  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ , testy Kruskala-Wallis i Manna-Whitneya.

### 3.6.7. Immunodetekcja *exoA* oraz zmiany stężenia białka w tkankach owadów (wyniki nieopublikowane)

Jednym z podstawowych mechanizmów wirulencji *exoA* w komórkach eukariotycznych jest hamowanie syntezy białka. Aby sprawdzić czy ten efekt zachodzi w przypadku gąsienic *G. mellonella* z owadów pobierano próby hemolimfy, hemocytów oraz ciała tłuszczowego w odpowiednich czasach od immunizacji subletalną dawką *exoA*. Następnie, w otrzymanych próbach mierzono stężenie białka (Bradford, 1976) oraz poddawano je rozdziałowi za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i immunoblottingowi z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał rozpoznających *exoA* (Sigma-Aldrich).

We wszystkich próbach zaobserwowano wyraźną korelację w czasie pomiędzy spadkiem stężenia białka oraz detekcją *exoA* w badanych tkankach. Obecność *exoA* wykryto w hemolimfie w czasie od 1 do 18 godz., w hemocytach od 8 do 24 godz., natomiast w ciele tłuszczowym od 15 do 24 godz. Po 15 godz. stężenie białka we wszystkich tkankach było o około 50% niższe w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Największy spadek stężenia białka (80%) obserwowano po 24 godz. w hemocytach i ciele tłuszczowym.

### 3.7. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona z wykorzystaniem IDE Spyder (Raybaut, 2009.) oraz dodatkowych bibliotek 'pandas', 'scipy', 'seaborn' i 'lifelines'. Poziom istotności statystycznej dla wszystkich testów wynosił  $\alpha = 0.05$ . Wykorzystano testy Kruskala - Wallisa oraz *post-hoc* Manna - Whitneya. Przeżywalność owadów porównywano za pomocą krzywych Kaplana-Meiera oraz testu log-rank.

## 4. Dyskusja

Wiadomo, że egzotoksyna *A. P. aeruginosa* jest czynnikiem wirulencji oddziałującym cytotoksycznie na różne typy komórek ssaków, w tym komórki nabłonkowe i immunokompetentne. Ułatwia to patogenowi przełamanie mechanizmów odpowiedzi odpornościowej i rozprzestrzenienie się w organizmie żywiciela (Michalska i Wolf, 2015; Urbanowicz i Gniadkowski, 2017; Wolf i Elsässer-Beile, 2009). Wykazano,

że *exoA* indukuje apoptozę poprzez szlak zależny od kaspazy 8 lub zatrzymuje cykl komórkowy, po którym następuje skierowanie komórki na drogę apoptozy. Ten ostatni efekt jest związany z inaktywacją czynnika elongacji-2 (EF2) poprzez jego ADP-rybozylację, co w konsekwencji powoduje zahamowanie syntezy białek w komórkach docelowych (Chang i Kwon, 2007; Jenkins i in., 2006).

W badaniach z użyciem *D. melanogaster* zaobserwowano, że *exoA* może być również cytotoksyczna w stosunku do komórek bezkręgowców (Sharma i FitzGerald, 2010). W związku z tym, że celem mojej pracy było prześledzenie roli *exoA* w patogenezie bakterii *P. aeruginosa*, w pierwszej kolejności wykonano analizę przeżywalności *G. mellonella*, na podstawie której ustalono średnią dawkę letalną *exoA* ( $LD_{50}=34,5\text{ng}$ ) oraz dawkę subletalną (20ng *exoA*/larwę), która nie powodowała śmierci owadów do 48 godz. od iniekcji (**P2**). Należy zaznaczyć, że podanie gąsienicom subletalnej dawki *exoA* jednocześnie z żywymi komórkami bakterii *P. aeruginosa* (10 komórek/larwę) powodowało istotny statystycznie wzrost śmiertelności larw *G. mellonella* (**P2**), co potwierdziło rolę *exoA* jako czynnika wirulencji. Po ustaleniu dawki subletalnej *exoA* gąsienice immunizowano, pobierano tkanki owada w odpowiednich punktach czasowych i analizowano wpływ toksyny na wybrane reakcje komórkowe oraz humoralne.

Aby w pełni zrozumieć, jakie interakcje zachodzą pomiędzy *exoA* a odpowiedzią komórkową *G. mellonella*, przeanalizowano zmiany ilościowe oraz jakościowe hemocytów owadów. Te parametry są jednymi z podstawowych wskaźników opisujących komórkową odpowiedź odpornościową (Pereira i in., 2018). Dostępnych jest wiele publikacji wskazujących na zwiększoną liczbę immunokompetentnych komórek w odpowiedzi na infekcję lub stymulację odporności (Fuchs i in., 2010). Na przykład, Sheehan i Kavanagh (2018) oraz Stączek i in. (2020) wykazali wzrost liczby hemocytów po immunizacji *G. mellonella* odpowiednio  $\beta$ -1,3-glukanem *A. fumigatus* oraz  $\alpha$ -1,3-glukanem *A. niger*. Ten efekt wynikał ze wzrostu ilości granulocytów i plazmatocytów. Po podaniu gąsienicom *G. mellonella* *exoA* zaobserwowano wyraźny spadek całkowitej liczby granulocytów i plazmatocytów w hemolimfie, odpowiednio o około 50% oraz 70%, w porównaniu z owadami kontrolnymi. Co ciekawe, plazmatocyty okazały się bardziej podatne na działanie *exoA* niż granulocyty. W przypadku sferulocytów i oenocytoidów nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w liczbie tych komórek, natomiast zwiększenie ilości tego typu hemocytów notowano po immunizacji larw *G. mellonella*  $\alpha$ -1,3-glukanem *A. niger* i podaniu konidiów *A. niger* (Stączek i in., 2020). Rozbieżności między wynikami uzyskanymi przez innych autorów a wynikami przedstawionymi w

niniejszej pracy mogą wynikać z roli jaką pełnią w organizmie substancje, które podawano larwom *G. mellonella*. Różne formy glukanów są cząsteczkami stymulującymi odporność (PAMPs), co może objawiać się wzrostem liczby hemocytów, podczas gdy *exoA* jest czynnikiem wirulencji, czyli cząsteczką ukierunkowaną na supresję odporności gospodarza m.in. poprzez redukcję liczby komórek immunokompetentnych.

Zmiany obserwowane w hemocytogramach sugerują, że *exoA* wykazywała w stosunku do hemocytów aktywność cytotoksyczną lub powodowała hamowanie ich proliferacji. Natomiast zmiany morfologiczne, takie jak uwypuklenie błony komórkowej, a także pęcznienie komórek i jąder, wskazują, że spadek ilości hemocytów mógł być spowodowany śmiercią komórek na skutek działania egzotoksyny. Dostępne dane wskazują, że *exoA P. aeruginosa* powoduje zarówno nekrotyczną, jak i apoptotyczną śmierć komórek (Michalska i Wolf, 2015; Wolf i Elsässer-Beile, 2009). Wiadomo, że infekcje bakteryjne wywołują różne rodzaje śmierci komórkowej w celu wyeliminowania komórek immunokompetentnych, najczęściej jednak dochodzi w organizmie gospodarza do apoptozy (Ashida i in., 2011).

Wiadomo, że po zakażeniu larw barciaka bakterią *P. aeruginosa* jak również po immunizacji koronatyń-1, toksyną wytwarzaną przez owadobójczego grzyba *Conidiobolus coronatus*, dochodzi w organizmie owadów do indukcji apoptozy. W miarę rozwoju zakażenia *P. aeruginosa* obserwowano wyraźne zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne w hemocytach gąsienic tj. tworzenie uwypukleń na błonie komórkowej, wakuolizację cytoplazmy, pęcznienie komórek i jąder oraz kondensację chromatyny. Cechy te są typowe zarówno dla apoptotycznej jak i autofagalnej śmierci komórek (Mizerska-Dudka i Andrejko, 2014; Wieloch i in., 2011). Chociaż wiadomo, że apoptoza zachodzi w różnych grupach organizmów, proces ten nie jest dobrze poznany u owadów, spośród wszystkich dotychczas zbadanych owadów mechanizmy apoptozy zostały opisane u *Drosophila spp.* (Kidera i in., 2020; Li i in., 2020; Zhou, 2019). Natomiast bardzo niewiele wiadomo na temat apoptotycznych szlaków molekularnych u Lepidoptera.

Biorąc pod uwagę udowodnioną aktywność proapoptotyczną *exoA*, dalsze eksperymenty ukierunkowane były na identyfikację rodzaju śmierci komórkowej powodowanej przez tę toksynę. Po zastosowaniu mieszaniny H/IP oraz AO, w początkowych czasach (1-8 godz.) od podania owadom *exoA* obserwowano głównie komórki nekrotyczne, podczas gdy hemocyty ze skondensowaną chromatyną i licznymi kwaśnymi wakuolami, były obecne w późniejszych czasach (15-24 godz.) (**P3**). Cechy te jednak nie wskazywały jednoznacznie na typ śmierci komórkowej, tj. nie było jasne, czy



hemocyty zebrane z larw immunizowanych *exoA* przechodziły apoptozę czy autofagię. Dopiero dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej udało się wykazać znaczny wzrost liczby hemocytów fosfatydyloseryno-dodatnich i z aktywną kaspazą 3 w próbach pobranych od larw immunizowanych *exoA*, co dowiodło indukcji apoptozy.

Odpowiedź humoralna owadów obejmuje m.in. proces krzepnięcia hemolimfy i gojenia ran, aktywację układu oksydazy fenolowej (ang. phenoloxidase, PO) prowadzącą do melanizacji, jak również indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs). Jak wynika z badań przeprowadzonych w Katedrze Immunobiologii u gąsienic *G. mellonella* dochodzi do aktywacji układu oksydazy fenolowej w odpowiedzi na immunizację różnymi szczepami bakterii (Zdybicka-Barabas i in., 2014). Zaobserwowano również, że immunizacja owadów alkaliczną proteazą, czynnikiem wirulencji bakterii *P. aeruginosa*, powodowała wzrost aktywności PO w hemolimfie od 2 do 8 godz. oraz prawie całkowite zahamowanie po 15 godz. od podania proteazy (Andrejko i in., 2021b). W związku z tym, w pracy podjęto badania mające na celu sprawdzenie, czy aplikacja *exoA* *P. aeruginosa* wpłynie na aktywność PO w hemolimfie owadów. Okazało się że obecność *exoA* w organizmie *G. mellonella* spowodowała istotne statystycznie zmniejszenie aktywności PO w czasie od 4 do 15 godz. od immunizacji, następnie jednak aktywność wzrosła do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej (**P2**).

W hemolimfie owadów traktowanych badaną toksyną wykazano również wyraźne zahamowanie aktywności przeciwbakteryjnej typu lizozymu (**P2**). Podobnie jak w przypadku PO hamowanie aktywności lizozymu było najbardziej widoczne w czasie od 8 do 15 godz., co sugeruje, że *exoA* najskuteczniej hamowała syntezę białka w tym czasie. Jednak efekt ten w przypadku PO był przejściowy. Wygląda na to, że *exoA* ma inny wpływ na różne białka w hemolimfie, który zależy od poziomu białka lub regulacji jego aktywności. Spadek aktywności lizozymu obserwowany w przedstawionych badaniach po 1 i 4 godz. od immunizacji mógł być spowodowany wysokim poziomem już zsyntetyzowanej PO uwalnianej z encytooidów w początkowej fazie odpowiedzi odpornościowej. Z kolei po 24 godz., gdy wpływ *exoA* wyraźnie obniżył się, najprawdopodobniej z powodu jej zużycia, więcej PO było syntetyzowane i uwalniane z nowo proliferujących oenocytoidów, co dodatkowo hamowało aktywność lizozymu. Wyniki te są w pewnym stopniu zgodne z danymi opublikowanymi przez Stączek i in. (2020), w których wykazano korelację pomiędzy wyższą aktywnością lizozymu w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu  $\alpha$ -1,3-glukanu z hamowaniem aktywności PO.

Gąsienice *G. mellonella* syntetyzują szereg białek i peptydów odpornościowych o

zróżnicowanych właściwościach biochemicznych i przeciwdrobnoustrojowych, które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej (Cytryńska i in., 2007). Po analizie elektroforetycznej prób zawierających ekstrakty z hemolimfy owadów traktowanych *exoA*, nie stwierdzono obecności prążków peptydowych o masie cząsteczkowej poniżej 6,5 kDa. Ponadto nie obserwowano stref zahamowania wzrostu *E. coli*, gdy odpowiednie próbki hemolimfy zebrane w różnych czasach od immunizacji *exoA* zostały przetestowane metodą bioautografii. Uzyskane wstępne wyniki wskazują, że u gąsienic nie dochodzi do indukcji syntezy peptydów przeciwbakteryjnych w odpowiedzi na iniekcję *exoA*. Może to być spowodowane faktem, że *exoA* nie została rozpoznana jako czynnik zagrożenia przez układ odpornościowy gospodarza (stąd nie doszło do indukcji syntezy peptydów) lub zahamowaniem syntezy białek w komórkach gospodarza przez *exoA* – wówczas, mimo indukcji, synteza peptydów nie zachodzi z powodu braku funkcjonujących rybosomów. W tym drugim przypadku ekspresja peptydów byłaby indukowana, ale nie zakończona (**P2**). W przeciwieństwie do prezentowanych wyników, Chieda i in. (2011) wykazali, że egzotoksyna A nie wpływała na wytwarzanie AMPs w hemolimfie *Bombyx mori*.

Jedną ze strategii stosowanych przez bakterie entomopatogenne jest obniżenie poziomu apoLp-III zarówno poprzez hamowanie ekspresji tego białka, jak i degradację apoLp-III przez bakteryjne proteazy wytwarzane podczas infekcji (Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2013). We wcześniejszych badaniach prowadzonych w Katedrze wykazano, że po zakażeniu gąsienic *G. mellonella* bakterią *P. aeruginosa* obserwowano początkowo wzrost poziomu apoLp-III, a następnie znaczny spadek po dłuższym czasie trwania infekcji (Andrejko i in., 2008a). Zaobserwowano również, że białko to jest substratem dla czynników wirulencji *P. aeruginosa*, tj. proteazy IV i elastazy B (Andrejko i Mizerska-Dudka, 2012; Andrejko i in., 2005). Z drugiej strony wykazano również, że po podaniu elastazy B *P. aeruginosa* względne poziomy apoLp-III w larwach hemolimfy *G. mellonella* znacznie wzrosły w porównaniu z owadami kontrolnymi (Andrejko i Mizerska-Dudka, 2011).

W toku niniejszych badań wykazano znaczny spadek poziomu apoLp-III w hemolimfie larw *G. mellonella* immunizowanych *exoA P. aeruginosa*, nawet o 40% w porównaniu z grupą kontrolną (**P2**). Wyniki kolejnych eksperymentów wykazały związane z czasem zmiany w poziomie apoLp-III w hemocytach i ciele tłuszczowym owadów. Co ciekawe, w tych tkankach zaobserwowano początkowo (do 8 godz.) wzrost poziomu apoLp-III a następnie spadek po 15 godz. Z kolei 24 godz. od iniekcji *exoA* poziom

apoLp-III w hemocytach wzrósł około 2-krotnie w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w ciele tłuszczowym pozostał na poziomie obserwowanym we wcześniejszych czasach.

Zdybicka-Barabas i in. (2015) wykazali korelację w czasie między zmianami poziomu apoLp-III w hemolimfie, hemocytach i ciele tłuszczowym po immunizacji larw *G. mellonella* różnymi bakteriami i grzybami. Zakażenie bakteriami powodowało zwiększenie poziomu białka w hemolimfie, a obniżenie w ciele tłuszczowym, podczas gdy w hemocytach po iniekcji *E. coli* notowano wzrost, a po *M. luteus* spadek poziomu apoLp-III. Spadek ilości apoLp-III w hemolimfie może być związany z faktem, że ta cząsteczka wiążąca lipidy może być wykorzystywana przez owady jako źródło energii (Adamo i in., 2008). Wiadomo również, że rozpoznawanie obcych cząsteczek powoduje tworzenie się kompleksów apoLp-III-lipid i aktywację reakcji odpornościowych (Niere i in., 1999). Co więcej, takie kompleksy mogą być endocytozowane przez niektóre hemocyty (Dettloff i in., 2001), co może wyjaśniać znaczny wzrost poziomu tego białka w hemocytach wykryty w trakcie przeprowadzonych analiz. Należy zauważyć, że spadek ilości apoLp-III oraz innych białek był szczególnie zauważalny w punktach czasowych, w których w badanych tkankach wykrywano *exoA*. Wynikało to prawdopodobnie z wpływu *exoA* na syntezę białek w ciele owada.

Na podstawie literatury wiadomo, że w hemolimfie niepobudzonych larw *G. mellonella* obecne są dwie główne izoformy apoLp-III o *pI* ~6,1 i *pI* ~6,5, a u immunizowanych co najmniej trzy izoformy o różnym *pI* (5,9; 6,1; 6,5). W hemocytach niepobudzonych gąsienic wykazano obecność dwóch form apoLp-III o *pI* 6,3-6,5, a w ciele tłuszczowym czterech (Zdybicka-Barabas i in., 2015; Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2011). W opisywanych badaniach metodą elektroforezy dwukierunkowej (IEF/SDS-PAGE) oraz immunoblottingu z przeciwciałami anti-apoLp-III ujawniono dwie formy apoLp-III różniące się wartościami punktu izoelektrycznego oszacowanymi na ~6,5 i ~6,1 w hemolimfie larw kontrolnych. Podanie *exoA* spowodowało statystycznie istotny spadek poziomu tych izoform apoLp-III. Podobne wyniki uzyskali Vertyporokh i in. (2015), badając zmiany poziomu izoform apoLp-III po zakażeniu larw *G. mellonella* grzybem *Beauveria bassiana*. Autorzy odnotowali statystycznie istotny spadek ilości głównej izoformy apoLp-III w porównaniu z larwami kontrolnymi.

W hemocytach larw kontrolnych wykryto obecność dwóch form apoLp-III o *pI* ~6,5 i ~5,9. Immunizacja owadów *exoA* spowodowała statystycznie istotny spadek ilości izoformy *pI* ~5,9, natomiast główna izoforma apoLp-III (*pI* ~6,5) pozostała niezmienną.

Ponadto zaobserwowano pojawienie się polipeptydu pochodzącego z apoLp-III o szacowanym  $pI \sim 5,2$ . Hemocyty mogą być zdolne do syntezy apoLp-III, co może wyjaśniać stosunkowo wysoki ogólny poziom apoLp-III w ciągu pierwszych godzin po iniekcji *exoA*. Zmiany poziomu apoLp-III w hemocytach mogły wynikać zarówno z hamowania syntezy białek, jak i cytotoksycznego działania *exoA* na hemocyty (**P3**).

Ciało tłuszczowe jest głównym miejscem syntezy i przetwarzania apoLp-III u owadów. W opisywanych badaniach nie wykryto statystycznie istotnych różnic w ilości głównej izoformy o  $pI \sim 6,5$  między owadami kontrolnymi a owadami immunizowanymi *exoA*. Natomiast obecny w kontroli polipeptyd o  $pI \sim 6,9$  zanikł całkowicie, co było skorelowane ze spadkiem całkowitej ilości apoLp-III w ciele tłuszczowym; można zatem przypuszczać, że był to efekt działania *exoA*. Uważa się, że dodatkowe formy apoLp-III obecne w hemolimfie powstają po uwolnieniu apoLp-III z komórek ciała tłuszczowego do hemolimfy. Obecność dodatkowych polipeptydów jest zmienna i odzwierciedla aktualny stan metaboliczny komórek ciała tłuszczowego (Vertyporokh i in., 2015; Zdybicka-Barabas i in., 2015).

## 5. Podsumowanie

Egzotoksyna A *Pseudomonas aeruginosa* moduluje odpowiedź odpornościową gąsienic *Galleria mellonella* poprzez supresję zarówno mechanizmów komórkowych jak i humoralnych. Immunizacja owadów subletalną dawką toksyny powoduje zaburzenia w syntezie białek (w tym białek/peptydów istotnych dla odpowiedzi humoralnej) oraz zmiany ilościowe oraz jakościowe komórek immunokompetentnych. Po raz pierwszy wykazano, że zmiany ilościowe i morfologiczne zaobserwowane w hemocytach *G. mellonella* są efektem nekrotycznej śmierci komórek w początkowych etapach oraz indukcji apoptozy w późniejszych czasach działania *exoA*.

Badania parametrów odpowiedzi humoralnej dowiodły, że po immunizacji gąsienic *exoA P. aeruginosa* dochodzi do czasowej supresji aktywności oksydazy fenolowej oraz

trwałego obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej typu lizozymu. Metodą bioautografii wykazano również brak aktywności skierowanej przeciwko Gram-ujemnej bakterii *E. coli*, a po analizie elektroforetycznej profili białkowych hemolimfy nie wykryto prążków peptydowych o masie cząsteczkowej poniżej 6,5 kDa. Uzyskane wyniki wskazują, że prawdopodobnie u gąsienic traktowanych *exoA* nie dochodzi do indukcji syntezy peptydów odpornościowych, które pełnią istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej owadów przeciwko bakteriom.

Wykorzystując metodę immunoblottingu oraz analizę densytometryczną wykazano zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie, hemocytach i ciele tłuszczowym gąsienic *G. mellonella* immunizowanych *exoA*. Obecność toksyny w hemolimfie skutkowałą spadkiem poziomu apoLp-III, następnie ilość białka stopniowo rosła osiągając po 18 i 24 godz. poziom obserwowany w próbach kontrolnych. Natomiast w hemocytach i ciele tłuszczowym początkowo wykryto wzrost ilości apoLp-III, z kolei w późniejszych czasach nastąpił znaczny spadek poziomu tego białka. Zaobserwowano również zmiany w profilu izoform apoLp-III w badanych tkankach. Uzyskane wyniki wskazują, że *G. mellonella* jest użytecznym i wygodnym modelem do analizy czynników wirulencji i ich udziału w przełamaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

#### Wnioski:

1. Rola *exoA* jako czynnika wirulencji bakterii *P. aeruginosa* polega na przełamaniu zarówno komórkowych jak i humoralnych reakcji obronnych gąsienic *G. mellonella*.
2. Zmiany ilościowe i jakościowe hemocytów są skutkiem indukowania przez *exoA* apoptozy komórek immunokompetentnych, przede wszystkim granulocytów i plazmatocytów.
3. Immunizacja owadów *exoA* powoduje obniżenie aktywności oksydazy fenolowej, aktywności przeciwbakteryjnej (wobec bakterii Gram-ujemnych) oraz aktywności typu lizozymu w hemolimfie gąsienic.
4. Wydaje się, że w wyniku aplikacji owadom *exoA* nie dochodzi do indukcji syntezy (lub zahamowania syntezy) peptydów odpornościowych, co jest jednym z powodów obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy.
5. Egzotoksyna A powoduje zmiany poziomu białka apoLp-III w hemolimfie, hemocytach i ciele tłuszczowym owadów; wpływa również na zmiany w profilu izoform apoLp-III w badanych tkankach.

6. Hamowanie reakcji obronnych owada jest skorelowane z czasem detekcji *exoA* w poszczególnych tkankach.
7. Gąsienice *G. mellonella* okazały się wygodnym modelem do analizy roli *exoA* w patogenezie bakterii *P. aeruginosa* jak również do badania interakcji toksyny z elementami układu immunologicznego owada.

## 6. Literatura:

1. Adamo, S.A., Roberts, J.L., Easy, R.H., Ross, N.W., 2008. Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipoprotein III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. *Journal of Experimental Biology*, 211, 531-538.
2. Andrejko, M., Mizerska-Dudka, M., 2011. Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, 16-26.
3. Andrejko, M., Mizerska-Dudka, M., 2012. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase B on level and activity of immune proteins/peptides of *Galleria mellonella* hemolymph. *Journal of Insect Science* 12, 88.

4. Andrejko, M., Cytryńska, M., Jakubowicz, T., 2005. Apolipoprotein III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters, 243, 331-337.
5. Andrejko, M., Mak P., Siemińska-Kuczer A., Iwański B., Wojda I., Suder P., Kuleta P., Regucka K., Cytryńska, M., 2021a. 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. Journal of Insect Physiology, 131,104239.
6. Andrejko, M., Mizerska-Dudka, M., Jakubowicz, T., 2008a. Changes in *Galleria mellonella* apolipoprotein III level during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Journal of Invertebrate Pathology, 97, 14-19.
7. Andrejko, M., Mizerska-Dudka, M., Jakubowicz, T., 2008b. Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Folia microbiologica, 53, 147.
8. Andrejko, M., Mizerska-Dudka, M., Jakubowicz, T., 2009. Antibacterial activity *in vivo* and *in vitro* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 152, 118-123
9. Andrejko, M., Siemińska, A., 2016. The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in *Galleria mellonella* larvae. Invertebrate Survival Journal, 13, 269-280.
10. Andrejko, M., Siemińska-Kuczer, A., Iwański B., Cytryńska, M., 2021b. Overcoming insect immune response: The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in phenoloxidase inhibition. Physiological Entomology, 46, 145-156.
11. Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, M., Cytryńska, M., 2014. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Invertebrate Pathology, 115, 14-25.
12. Ashida, H., Mimuro, H., Ogawa, M., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., Sasakawa, C., 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. Journal of Cell Biology, 195, 931–942.
13. Binder, U., Maurer E., Lass-Flörl C., 2016. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. Fungal Biology, 120, 288-295.

14. Bolouri Moghaddam, M. R., Tonk, M., Schreiber, C., Salzig, D., Czermak, P., Vilcinskas, A., Rahnamaeian, M., 2016. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. *Biological Chemistry*, 397, 939-945.
15. Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K., Rasmuson Jr, T., 1974. Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infection and Immunity*, 10, 136-145.
16. 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, 248-254.
17. Browne, N., Heelan, M., Kavanagh K., 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4, 597-603.
18. Champion, O. L., Wagley, S., Titball, R., 2016. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*, 7, 840-845.
19. Chang, J. H., Kwon, H. Y., 2007. Expression of 14-3-3 $\delta$ , cdc2 and cyclin B proteins related to exotoxin A-induced apoptosis in HeLa S3 cells. *International Immunopharmacology*, 7, 1185-1191.
20. Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., Jakubowicz, T., 2007. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28, 533-546.
21. 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. *Journal of Insect Physiology*, 47, 789-797.
22. Fuchs, B. B., O'Brien, E., El Khoury, J. B., Mylonakis, E., 2010. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1, 475-482.
23. Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. *Kosmos*, 72, 203-213.
24. Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, 187, 107706.



25. Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107884.
26. Jander, G., Rahme L., Ausubel, F., 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology* 182, 3843-3845.
27. Jenkins, C. E., Swiatoniowski, A., Power, M. R., Lin, T. J., 2006. *Pseudomonas aeruginosa*-induced human mast cell apoptosis is associated with up-regulation of endogenous Bcl-xS and down-regulation of Bcl-xL. *The Journal of Immunology*, 177, 8000-8007.
28. Junqueira, J. C., 2012. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*, 3, 474-476.
29. Kaplan, E. L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457–481.
30. Khalifa, A.B.H., Moissenet, D., Thien, H.V. Khedher, M., 2011. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Vlinique* 69, 393-403.
31. Kidera, H., Hatabu, T., Takahashi, K.H., 2020. Apoptosis inhibition mitigates aging effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 148, 69–76.
32. Lavine, M. D., Strand, M. R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32,1295-1309.
33. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z., 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37, 207-215.
34. Li, Z., Wu, C., Ding, X., Li, W., Xue, L., 2020. Toll signaling promotes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila*. *Cell Division* 15, 1–11.
35. Łepeta, K., Łasica, A. M., Jagusztyn-Krynicka, E. K., 2010. Zastosowanie produktów mikroorganizmów w terapiach antynowotworowych. *Postępy Mikrobiologii*, 49, 355-368.
36. Michalska, M., Wolf, P., 2015. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*, 6, 963.
37. Michałkiewicz, J., Stachowski, J., Barth, C., Patzer, J., Dzierżanowska, D., Madaliński, K., 1999. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN- $\gamma$

- synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. *Immunology Letters*, 69, 359-366.
38. Mizerska-Dudka, M., Andrejko, M., 2014. *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 232-246.
  39. Mukherjee, K., Amsel, D., Kalsy, M., Billion, A., Dobrindt, U., Vilcinskas, A., 2020. MicroRNAs regulate innate immunity against uropathogenic and commensal-like *Escherichia coli* infections in the surrogate insect model *Galleria mellonella*. *Scientific Reports*, 10, 2570.
  40. Niere, M., Meißlitzer, C., Dettloff, M., Weise, C., Ziegler, M. Wiesner, A., 1999. Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1433, 16-26.
  41. Pereira, T.C., De Barros, P.P., Fugisaki, L.R.D.O., Rossoni, R.D., Ribeiro, F.D.C., De Menezes, R.T., Junqueira, J.C., Scorzoni, L., 2018. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *Journal of Fungi*, 4, 128.
  42. Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., 2012. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 70.
  43. Raybaut, P., 2009. Spyder-documentation. Available Online at: [Pythonhosted.org](http://Pythonhosted.org).
  44. Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimation of 50% end points. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 493-497.
  45. Sharma, A. K., FitzGerald, D., 2010. *Pseudomonas* exotoxin kills *Drosophila* S2 cells via apoptosis. *Toxicon*, 56, 1025-1034.
  46. Sheehan, G., Kavanagh, K., 2018. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence*, 9, 163-172.
  47. Staugas, R.E., Harvey, D.P., Ferrante, A., Nandoskar, M. Allison, A.C., 1992. Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infection and Immunity*, 60, 3162-3168.

48. Stączek, S., Zdybicka-Barabas, A., Mak, P., Sowa-Jasiłek, A., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Suder, P., Wydrych, J., Grygorczuk, K., Jakubowicz, T. Cytryńska, M., 2018. Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipoprotein III during immune response against different pathogens. *Journal of Insect Physiology*, 105, 18-27.
49. Stączek, S., Zdybicka-Barabas, A., Wiater, A., Pleszczyńska, M., Cytryńska, M., 2020. Activation of cellular immune response in insect model host *Galleria mellonella* by fungal  $\alpha$ -1, 3-glucan. *Pathogens and Disease*, 78, ftaa062.
50. Tsai, C.J.Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7, 214-229.
51. Urbanowicz, P., Gniadkowski, M., 2017. "Ciężkozbrojny" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne. *Kosmos*, 66, 11-29.
52. Vertyporokh, L., Taszłow, P., Samorek-Pieróg, M., Wojda, I., 2015. Short-term heat shock affects the course of immune response in *Galleria mellonella* naturally infected with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 42-51.
53. Weldon, J.E., Pastan, I., 2011. A guide to taming a toxin – recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *The FEBS Journal*, 278, 4683-4700.
54. Wieloch, W., Boguś, M.I., Ligęza, M., Koszela-Piotrowska, I., Szewczyk, A., 2011. Coronatin-1 isolated from entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* kills *Galleria mellonella* hemocytes in vitro and forms potassium channels in planar lipid membrane. *Toxicon*, 58, 369–379.
55. Wojda, I., Staniec, B., Sułek, M., Kordaczuk, J., 2020. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathogens and Disease*, 78, ftaa057.
56. Wolf, P., Elsässer-Beile, U., 2009. *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology*, 299,161-176.
57. Wu, G., Liu, Y., Ding, Y., Yi, Y., 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell*, 48, 297–304.

58. Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., 2011. Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158, 90-98.
59. Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., 2013. Apolipoproteins and insects immune response. *Invertebrate Survival Journal*, 10, 58-68.
60. Zdybicka-Barabas, A., Mak, P., Jakubowicz, T., Cytryńska, M., 2014. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87, 1-12.
61. Zdybicka-Barabas, A., Sowa-Jasiłek, A., Stączek, S., Jakubowicz, T., Cytryńska, M., 2015. Different forms of apolipoprotein III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides*, 68, 105-112.
62. 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 (BBA)- Biomembranes*, 1828, 1449-1456.
63. Zhou, L., 2019. P53 and apoptosis in the *Drosophila* model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1167, 105–112.

## Streszczenie

W podjętych badaniach prześlędzono komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną barciaka większego *Galleria mellonella* na egzotoksynę A *Pseudomonas aeruginosa*. W hemolimfie owadów immunizowanych *exoA* wykazano spadek całkowitej liczby hemocytów, przede wszystkim granulocytów i plazmatocytów. Po barwieniu fluorescencyjnym zaobserwowano, że komórki wykazywały cechy charakterystyczne dla apoptotycznej i autofagalnej śmierci komórek, m.in. wakuolizację cytoplazmy i kondensację chromatyny. Metodą cytometrii przepływowej wykazano znaczny wzrost liczby hemocytów fosfatydyloseryno-dodatnich i z aktywną kaspazą 3, co świadczy o indukcji apoptozy przez *exoA*. Badania parametrów odpowiedzi humoralnej w hemolimfie owadów immunizowanych dowiodły, że *exoA* powodowała inhibicję aktywności oksydazy fenolowej (8-15 godz. od iniekcji) oraz znaczący spadek aktywności typu lizozymu. Ponadto w hemolimfie nie wykazano aktywności przeciwko bakterii *E. coli* a na żelach SDS-PAGE nie zaobserwowano prążków peptydowych o masie cząsteczkowej

poniżej 6,5 kDa, co wskazuje na nieobecność peptydów przeciwdrobnoustrojowych. W hemolimfie obserwowano spadek poziomu apoLp-III, szczególnie od 4 do 15 godz. od podania owadom exoA, następnie ilość białka stopniowo rosła osiągając po 24 godz. poziom obserwowany w grupie kontrolnej. Wykazano korelację w czasie pomiędzy zmianami ilości apoLp-III w ciele tłuszczowym oraz hemocytach badanych gąsienic. W obu tkankach wykryto początkowy wzrost ilości apoLp-III (1-8 godz.) oraz spadek po 15-18 godz. od iniekcji exoA. Z kolei po 24 godz. poziom apoLp-III w hemocytach wzrósł około 2-krotnie, podczas gdy w ciele tłuszczowym utrzymywał się na obniżonym poziomie. Elektroforeza dwukierunkowa oraz immunoblotting z przeciwciałami przeciwko apoLp-III ujawniły zmiany w profilu izoform apoLp-III w badanych tkankach. Zaobserwowano dwie izoformy apoLp-III o  $pI \sim 6,5$  i  $\sim 6,1$  w hemolimfie, o  $pI \sim 6,5$  i  $\sim 5,9$  w hemocytach oraz jedną izoformę o  $pI \sim 6,5$  w ciele tłuszczowym z dodatkowym polipeptydem o  $pI \sim 6,9$ . Podanie owadom exoA spowodowało w hemolimfie spadek poziomu obu izoform apoLp-III o około 30%. W hemocytach wykryto jedynie 65% spadek ilości izoformy o  $pI \sim 5,9$ , natomiast pojawił się dodatkowy polipeptyd o  $pI \sim 5,2$ . Nie zaobserwowano istotnych różnic w ilości głównej izoformy w ciele tłuszczowym, natomiast polipeptyd o  $pI \sim 6,9$  zanikł całkowicie.

**Słowa kluczowe:** *Galleria mellonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, egzotoksyna A, interakcje patogen-gospodarz, odpowiedź odpornościowa

## **Abstract**

In present studies, the cellular and humoral immune response of the greater wax moth *Galleria mellonella* to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A was investigated. A decrease in the total number of hemocytes, mainly granulocytes and plasmatocytes, was detected in the hemolymph of insects injected with exoA. Fluorescent staining showed that the cells exhibited features of apoptotic and autophagic cell death, e.g. cytoplasm vacuolization and chromatin condensation. The flow cytometry revealed a significant increase in the number of phosphatidylserine- and active caspase 3-positive hemocytes, which indicates induction of apoptosis by exoA. The parameters of the humoral response in the hemolymph of insects injected with exoA indicated inhibition of phenoloxidase activity (8-15 hours after injection) and a significant decrease in lysozyme-type activity. In addition, the hemolymph showed no anti-*E. coli* activity, and no peptide bands with molecular mass below 6.5 kDa were observed on electrophoretic gels, which indicated the absence of antimicrobial peptides. A decrease in the apoLp-III level in the hemolymph was observed, especially 4 to 15 hours after the administration of exoA to the insects.

Afterwards, the amount of the protein gradually increased, reaching the level observed in the control group after 24 hours. A correlation in time between changes in the apoLp-III amount in the fat body and the hemocytes of *exoA*-challenged larvae was demonstrated. An initial increase in apoLp-III (1-8 hours) and a decrease in its level after 15-18 hours were detected in both tissues after *exoA* injection. In turn, after 24 hours, the level of apoLp-III increased approximately 2-fold in the hemocytes but remained at a reduced level in the fat body. Two-dimensional electrophoresis and immunoblotting with anti-apoLp-III antibodies revealed changes in the profile of apoLp-III isoforms in the examined tissues. Two isoforms of apoLp-III with isoelectric points of *pI* ~6.5 and ~6.1 in the hemolymph and with *pI* ~6.5 and ~5.9 in the hemocytes as well as one isoform with *pI* ~6.5 in the fat body with an additional polypeptide with a *pI* ~6.9 were detected. After *exoA* injection, an approx. 30 % decrease in the level of both forms apoLp-III in the hemolymph was observed. In hemocytes, only a 65% decrease in the amount of the *pI*~5.9 isoform was detected, while an additional polypeptide of *pI*~5.2 appeared. No significant differences were observed in the amount of the major isoform in the fat body, while the polypeptide with *pI* ~6.9 disappeared completely.

**Keywords:** *Galleria mellonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, exotoxin A, host-pathogen interactions, immune response





## ŻYCIORYS NAUKOWY

### DANE PERSONALNE:

*Imię i nazwisko:* Bartłomiej Iwański  
*Data i miejsce urodzenia:* 14 listopada 1994, Świdnik  
*Adres korespondencyjny:* ul. Smorawińskiego 3/6  
21-040, Świdnik  
*e-mail:* iwanski.bartlomiej11@wp.pl  
*Telefon:* +48 695 558 001

### WYKSZTAŁCENIE:

**2010-2013** – **II Liceum** Ogólnokształcące w Świdniku im. K. K. Baczyńskiego  
profil: biologiczno-chemiczny

**2013-2017** – Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

**Studia stacjonarne I stopnia**

kierunek: Biotechnologia

tytuł zawodowy: inżynier

Temat pracy inżynierskiej: „Wykorzystanie bakteriofagów w kontroli zakażeń racic u bydła mlecznego”

**2017-2019** – Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

**Studia stacjonarne II stopnia**

kierunek: Biotechnologia

tytuł zawodowy: magister inżynier

Temat pracy magisterskiej: „Wykorzystanie bakteriofagów w kontroli zakażeń racic u bydła mlecznego”

**od 2019** – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

**Studia stacjonarne III stopnia**

kierunek: Biologia

**DOROBEK NAUKOWY:**

- 4 publikacje z bazy Journal Citation Reports (Web of Science Group) o łącznym współczynniku IF 2019-2023 = 10,127 i Punkty MNiSW 2019-2023 = 470
- 2 komunikaty zjazdowe na konferencjach międzynarodowych oraz 8 na konferencjach krajowych

**PRACE OPUBLIKOWANE:**

1. 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. *Journal of Insect Physiology* 131, 104239. (IF<sub>2023</sub> = 2,608, Punkty MNiSW<sub>2023</sub> = 100)  
doi: 10.1016/j.jinsphys.2021.104239
2. Andrejko, M., Siemińska-Kuczer, A., **Iwański, B.**, Cytryńska, M., 2021. Overcoming insect immune response: The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in phenoloxidase inhibition. *Physiological Entomology* 46, 145-156 (IF<sub>2023</sub> = 1,929, Punkty MNiSW<sub>2023</sub> = 70) doi: 10.1111/phen.12354
3. **Iwański, B.**, Andrejko, M., 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. *Kosmos*, 72, 203-213. (Punkty MNiSW<sub>2023</sub> = 20) doi: 10.36921/kos.2022\_2878
4. **Iwański, B.**, Andrejko, M., 2022. Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, 187, 107706. (IF<sub>2023</sub> = 2,795, Punkty MNiSW<sub>2023</sub> = 140)  
doi:10.1016/j.jip.2021.107706

5. **Iwański, B.**, Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107884. (IF<sub>2023</sub> = 2,795, Punkty MNiSW<sub>2023</sub> = 140)  
doi:10.1016/j.jip.2023.107884

## WYGŁOSZONE REFERATY:

### O zasięgu krajowym:

1. 2018 - Iwański B., Staniszewski A., Skowronek P. Metalo- $\beta$ -laktamazy nowe zagrożenie w leczeniu klinicznym, V Forum Młodych Przyrodników Lublin, s.35
2. 2018 - Skowronek P., Staniszewski A., Iwański B. Przegląd i charakterystyka popularnych miodów pod kątem rodzaju nektaru/spadzi pozyskiwanego z użytków pszczelich V Forum Młodych Przyrodników Lublin s.68
3. 2018 - Skowronek P., Staniszewski A., Iwański B. Przegląd i zastosowanie popularnych miodów i produktów pszczelich V Forum Młodych Przyrodników, Lublin s.67
4. 2018 - Staniszewski A., Iwański B., Skowronek P. Porównanie wpływu sztucznej diety zdefiniowanej oraz niezdefiniowanej na przeżywalność i parametry reprodukcyjne zawisiaka tytoniowego (*Manduca sexta*) V Forum Młodych Przyrodników, Lublin s.70
5. 2018 - Staniszewski A., Iwański B., Skowronek P. Zastosowanie biologii molekularnej w identyfikacji chronionych gatunków *Formica str.* Występujących na terytorium Polski. V Forum Młodych Przyrodników, Lublin s.71
6. 2019 - Iwański B., Staniszewski A. Antibiotic resistance – the developing threat VI Forum Młodych Przyrodników Lublin s.35
7. 2019 - Iwański B., Staniszewski A. *Galleria mellonella* – model organism in immunobiology VI Forum Młodych Przyrodników Lublin s.36
8. 2019 - Staniszewski A., Iwański B. Bacteriophages as possible way to prevent and treatment of american foulbrood VI Forum Młodych Przyrodników Lublin s.75
9. 2019 - Staniszewski A., Iwański B. Are bacteriophages the solution to problem of antibiotic resistant bacteria? VI Forum Młodych Przyrodników Lublin s.76

### O zasięgu międzynarodowym:

1. 2018 - Iwański B., Staniszewski A., Skowronek P. Drug resistance – what is it and how does it work? 2<sup>nd</sup> National Scientific Conference „Zrozumieć Naukę” Łódź s.73
2. 2022 - Iwański B., Bartkowska A., Koziej M., Andrejko M., 1st INTERNATIONAL PhD STUDENT'S CONFERENCE AT THE UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN: ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT (ICDSUPL) Lublin A013.

#### PREZENTOWANE POSTERY:

1. Iwański B., Staniszewski A., Skowronek P. Antybiotykooporność – skąd się wzięła i jak działa? V Forum Młodych przyrodników Lublin, 2018 s.36

#### DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE:

1. Praktyka laboratoryjna
2. współprowadzenie zajęć w roku akademickim 2018/2019
3. współprowadzenie zajęć w roku akademickim 2019/2020
4. współprowadzenie zajęć w roku akademickim 2020/2021
5. współprowadzenie zajęć w roku akademickim 2021/2022
6. współprowadzenie zajęć w roku akademickim 2022/2023

#### UDZIAŁ W GRANTACH:

w ramach dotacji celowej MNiSW, przyznanej przez Wydziałową Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów UMCS:

- 2020 - kierownik i wykonawca indywidualnego projektu badawczego „Interakcje gospodarz-patogen na przykładzie *Galleria mellonella* i egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa*”

#### UCZESTNICTWO W SZKOLENIACH:

2017 – udział w szkoleniu „Sekwencjonowanie nowej generacji”

2018 – udział w kursie i uzyskanie kompetencji Wewnętrznego Auditora Jakości

2022 – ukończenie szkolenia Automate Boring Stuff with Python Programming  
2022 – ukończenie szkolenia Data Science: Python for Data Analysis 2022 Full Bootcamp  
2022 – ukończenie szkolenia Intermediate Python Immersive Training  
2022 – ukończenie szkolenia Data Manipulation in Python: Master Python, Numpy & Pandas  
2023 – ukończenie szkolenia Data Science: R Programming Complete Diplomna 2023  
2023 – ukończenie szkolenia PostgreSQL Databases & Python  
2023 – ukończenie szkolenia The Ultimate Pandas and PostgreSQL Bootcamp – Data Analysis  
2023 – ukończenie szkolenia Data Analysis for Entry Level Job

### **DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZUJĄCA NAUKĘ:**

2019 - przygotowanie i współprowadzenie pokazów w ramach Nocy Biologów i Dni Otwartych UMCS  
2020 - przygotowanie i współprowadzenie pokazów w ramach Nocy Biologów i Dni Otwartych UMCS  
2021 - przygotowanie i współprowadzenie pokazów w ramach Nocy Biologów i Dni Otwartych UMCS  
2022 - przygotowanie i współprowadzenie pokazów w ramach Nocy Biologów i Dni Otwartych UMCS  
2023 - przygotowanie i współprowadzenie pokazów w ramach Nocy Biologów i Dni Otwartych UMCS

## **Publikacja 1**

Iwański Bartłomiej, Andrejko Mariola

Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w  
badaniach biomedycznych.

doi: 10.36921/kos.2022\_2878

**Punkty MNiSW<sub>(2023)</sub> = 20**

BARTŁOMIEJ IWAŃSKI, MARIOLA ANDREJKO

*Katedra Immunobiologii, Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej  
Akademicka 19, 20-033 Lublin  
E-mail: iwanski.bartlomiej11@wp.pl  
mariola.andrejko@mail.umcs.pl*

## BARCIAK WIĘKSZY (*Galleria mellonella*) JAKO ORGANIZM MODELOWY W BADANIACH BIOMEDYCZNYCH

### WSTĘP

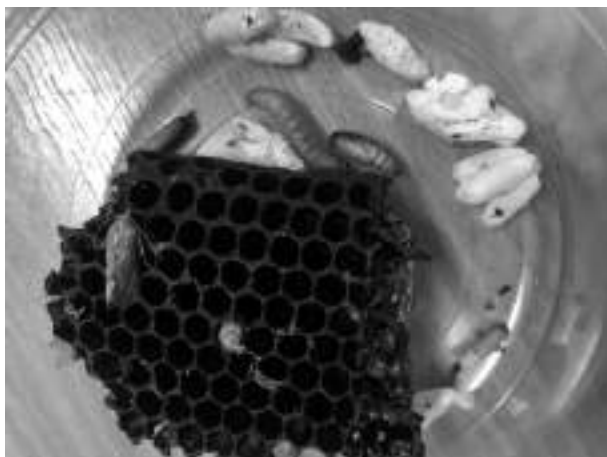
Wybór odpowiedniego organizmu modelowego jest niezwykle ważny podczas planowania doświadczeń mających na celu analizę mechanizmów patogenezы drobnoustrojów. Organizm taki musi zapewnić warunki jak najbardziej zbliżone do obserwowanych podczas infekcji człowieka, czyli konieczny jest etap kolonizacji oraz odpowiedź układu odpornościowego gospodarza. Ze względu na podobieństwo immunologiczne i anatomiczne, do tego rodzaju badań wykorzystuje się z reguły modele ssacze. Testy z użyciem ssaków są niestety czasochłonne, pracochłonne i kosztowne. Ponadto budzą spore kontrowersje etyczne.

Gąsienice barciała większego (*Galleria mellonella*) są powszechnie wykorzystywanym organizmem modelowym w badaniach interakcji gospodarz-patogen oraz do testowania skuteczności substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost różnorodności badanych drobnoustrojów w układzie *G. mellonella*-patogen, a uzyskane wyniki wniosły nieoceniony wkład w badania nad wirulencją ludzkich patogenów. Zastosowanie owadów zgodnie z zasadą „3R” (ang. replacement, reduction, refinement) pozwala na stopniowe zastępowanie ssaczých organizmów modelowych w badaniach – jako bezkręgowce gąsienice barciała nie są objęte przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt i wytycznymi Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Jako główny zarzut do

stosowania tego rodzaju modeli podaje się m.in. brak wystandaryzowanych procedur hodowli owada, co utrudnia porównywanie wyników uzyskanych w różnych laboratoriach (MIKULAK i współaut. 2018).

### BARCIAK WIĘKSZY – ORGANIZM MODELOWY

Barciał większy (*G. mellonella*) jest przedstawicielem rzędu Lepidoptera, należy do rodziny omacnicowatých (Pyralidae). W naturalnych warunkach jest szkodnikiem pasiek, dlatego jego występowanie jest skorelowane z występowaniem pszczoły miodnej (Ryc. 1). Do zalet gatunku jako organizmu modelowego można zaliczyć kosmopolityczność, relatywnie niski koszt hodowli, krótki cykl życiowy i możliwość łatwego pozyskiwania dużej liczby osobników. Stosunkowo duży rozmiar gąsienic (10–20 mm) ułatwia manipulacje laboratoryjne i znacząco upraszcza pobieranie tkanek do analiz (m.in. hemolimfy, ciała tłuszczowego, hemocytów). Gąsienice można zakażać miejscowo, poprzez podanie drobnoustroju drogą pokarmową, lub przez bezpośrednie wprowadzenie patogenu do hemocelu, a iniekcja umożliwia podanie dokładnej liczby badanych mikroorganizmów. Gąsienice mogą być bezpiecznie inkubowane w 37°C, temperaturze koniecznej do właściwej syntezy i działania wielu czynników wirulencji, produkowanych przez badane patogeny chorobotwórcze dla człowieka (JUNQUEIRA 2012, TSAI i współaut. 2016). Głównym powodem sukcesu *G. mello-*



Ryc. 1. Barciak większy (*Galleria mellonella*).

*nella* jako organizmu modelowego jest fakt, że reakcje immunologiczne owadów zachowały w toku ewolucji znaczne podobieństwa do odpowiedzi wrodzonej ssaków. Na podstawie porównania genomów stwierdzono istnienie wielu owadzych homologów ludzkich genów kodujących białka, które mogą być zaangażowane zarówno w rozpoznanie mikroorganizmów, jak i w proces transdukcji sygnału (VOGEL i współaut. 2011). Dlatego poznanie mechanizmów regulujących funkcjonowanie układu immunologicznego owadów może dostarczyć cennych informacji na temat wrodzonego układu odpornościowego ssaków (LIONAKIS 2011). Gąsienice barciaka wykorzystywane są przede wszystkim w badaniach interakcji patogenów z mechanizmami odporności wrodzonej gospodarza, do testowania patogenności i identyfikacji czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka oraz do oceny skuteczności leków przeciwdrobnoustrojowych (RAMARAO i współaut. 2012, CHAMPION i współaut. 2016, WOJDA i współaut. 2020).

#### UKŁAD ODPORNOŚCIOWY OWADÓW

W przypadku prowadzenia badań immunologicznych istotna jest znajomość funkcjonowania układu odpornościowego organizmu modelowego. Na odpowiedź odpornościową barciaka *G. mellonella* składają się wzajemnie powiązane ze sobą zewnętrzne bariery ochronne oraz wewnętrzne mechanizmy odporności wrodzonej – odpowiedź komórkowa i humoralna. Po sforsowaniu bariery anatomiczno-fizjologicznej przez mikroorganizm następuje jego rozpoznanie przez układ odpornościowy owada. W identyfikowaniu struktur charakterystycznych dla patogenów PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns), takich jak lipopolisacharyd (LPS), kwasy lipotejchajowe

(LTA), peptydoglikan (PG) i  $\alpha$ -1-3-glukan, lub cząsteczek będących efektem uszkodzenia komórek DAMPs (ang. danger-associated molecular patterns) biorą udział białka receptorowe określane jako PRR (ang. pattern recognition receptors) (STOKES i współaut. 2015, LANGE i współaut. 2018). Ponadto, detekcja mikroorganizmów wspomagana jest przez hemolinę i apolipoforynę III (apoLp-III). Hemolina jest indukowalnym białkiem zbudowanym z czterech domen immunoglobulinowych D1-D4 tworzących strukturę podkowy. Występuje w formie wolnej lub związanej z błoną komórkową hemocytów. Ma zdolność wiązania się do powierzchni komórek drożdży, LPS bakterii Gram-ujemnych i LTA bakterii Gram-dodatnich (TSAI i współaut. 2016). ApoLp-III jest konstytutywnie wydzielana do hemolimfy, wchodzi w skład mobilnego kompleksu lipoforyn, który odpowiada za transport lipidów i zaopatrzenie energetyczne mięśni owada (ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2015). Ponadto wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, jak również oddziałuje synergistycznie z lizozymem (ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2013) oraz cekropiną (BOLOURI MOGHADDAM i współaut. 2016, STĄCZEK i współaut. 2018) wzmagając ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Natychmiast po wnikięciu patogenu do organizmu owada uruchamiana jest odpowiedź komórkowa, która związana jest z upostaciowanymi składnikami hemolimfy – hemocytami, komórkami wykazującymi analogię do ssaczych fagocytów. U barciaka wyróżnia się 5 rodzajów hemocytów: prohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, sferulocyty i encytoidy. Granulocyty i plazmatocyty, obecne w hemolimfie w największej liczbie, są komórkami zdolnymi do adhezji do obcych powierzchni, dlatego są odpowiedzialne m.in. za fagocytozę i tworzenie otoczek wokół ciał obcych (nodulacja i inkapsulacja). Główną funkcją sferulocytów jest transport metabolitów, natomiast encytoidy syntetyzują składniki układu oksydazy fenolowej. Liczba hemocytów w hemolimfie zmienia się w trakcie życia owada, jak również w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne i zakażenie (LAVINE i STRAND 2002, BROWNE i współaut. 2013, BINDER i współaut. 2016, WU i współaut. 2016).

Odpowiedź humoralna owada obejmuje m.in. proces krzepnięcia hemolimfy i gojenia ran, aktywację układu oksydazy fenolowej (ang. phenoloxidase, PO), prowadzącą do melanizacji, jak również indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) (CYTRYŃSKA 2009, BOLOURI MOGHADDAM i współaut. 2016). Produkcja melaniny jest katalizowana przez PO, enzym magazynowany głównie w encytoidach, w postaci nieaktywnego zymogenu, który



nazwano profenolooksydazą (ang. prophenol-oxidase, proPO). W wyniku działania kaskady proteaz serynowych proPO przekształcana jest w formę aktywną PO na drodze ograniczonej proteolizy. Enzym ten katalizuje oksydację fenoli do chinonów, które spontanicznie polimeryzując, tworzą melaninę i otaczają rozpoznane patogeny (KAVANAGH i REEVES 2004, PEREIRA i współaut. 2020). Proces ten jest ściśle kontrolowany przez inhibitory proteaz serynowych, ze względu na fakt, że produkty pośrednie reakcji katalizowanych przez PO są wysoce reaktywne i mogą powodować uszkodzenia komórek gospodarza (ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2014).

W odpowiedzi na zakażenie, po rozpoznaniu determinantów mikroorganizmów przez układ odpornościowy owada, w ciele tłuszczowym i w hemocytach syntetyzowane są peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Szlaki aktywujące ekspresję genów peptydów odpornościowych, głównie Toll i Imd, aktywowane są odpowiednio przez bakterie Gram-dodatnie i grzyby oraz bakterie Gram-ujemne. Owadzie szlaki Toll i Imd regulują aktywność czynników transkrypcyjnych, odpowiednio Dif (szlak Toll) i Relish (szlak Imd), które są homologami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (STOKES i współaut. 2015). Peptydy odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi humoralnej ze względu na właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec szerokiego spektrum patogenów. U *G. mellonella* poznano dotąd kilkanaście peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Są wśród nich peptydy -helikalne (cekropiny A i D, moricyny), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyna), peptydy bogate w prolinę, w glicynę (głoweryny), a także peptydy anionowe (CYTRYŃSKA i współaut. 2007, LI i współaut. 2012). AMPs owadzie wykazują duże podobieństwo do peptydów syntetyzowanych przez organizmy ssące, w tym do peptydów ludzkich. Dotychczasowe badania wykazały, że ich produkcja jest regulowana niekodującym, niskocząsteczkowym RNA (miRNA), tak jak ma to miejsce w organizmach ssaków, natomiast profil syntetyzowanych AMPs jest skorelowany z rodzajem zidentyfikowanego patogenu (MUKHERJEE i współaut. 2020). Różnice w zestawie peptydów i kinetyce ich pojawiania się w hemolimfie *G. mellonella* obserwowano po zakażeniu owadów różnymi bakteriami i grzybami (MAK i współaut. 2010, ANDREJKO i współaut. 2021). Należy zaznaczyć, że badania sugerują możliwość funkcjonowania pamięci immunologicznej u owadów i innych bezkręgowców, ale z udziałem innych mechanizmów niż występujące u kręgowców (WOJDA 2017, ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2017).

## WYKORZYSTANIE BARCIAKA WIĘKSZEGO W BADANIACH INTERAKCJI PATOGEN-GOSPODARZ

W dotychczasowych badaniach z powodzeniem wykorzystywano gąsienice *G. mellonella* do testowania wielu drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka, w tym patogennych bakterii, takich jak *Francisella tularensis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* i *Cryptococcus* oraz grzybów strzępkowych *Aspergillus fumigatus* i *A. flavus* (PEREIRA i współaut. 2020). Wykazano analogię między wirulencją m. in. bakterii *P. aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* oraz grzybów *C. albicans* i *A. fumigatus* w stosunku do myszy i gąsienic *G. mellonella* (BROWNE i współaut. 2013, BINDER i współaut. 2016, TSAI i współaut. 2016). Poniżej przedstawione zostały wybrane wyniki badań mechanizmów patogenyzy oraz roli czynników wirulencji groźnych ludzkich patogenów, takich jak Gram-dodatnia bakteria *S. aureus*, Gram-ujemna pałeczka *P. aeruginosa* i drożdżak *C. albicans*.

### GRONKOWIEC ŻŁOCISTY *Staphylococcus aureus*

Gram-dodatnia bakteria *S. aureus* została sklasyfikowana przez WHO jako jeden z najgroźniejszych patogenów, a badania nad nowymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi zwalczającymi tę bakterię uznano za priorytetowe. Cechą charakterystyczną bakterii jest zdolność do produkcji szerokiego spektrum czynników wirulencji wywołujących zróżnicowane schorzenia, m.in. zespół wstrząsu toksycznego, sepsę, zapalenie wsierdza, zatrucie pokarmowe, infekcje skóry i tkanek miękkich (TAYLOR i UNAKAL 2022). Najczęściej badanymi czynnikami wirulencji tej bakterii są białka umożliwiające adhezję komórek patogenu, takie jak czynniki adhezyjne A i B (ClfA i ClfB), białka wiążące fibronektynę (FnBPs), adhezyny wiążące kolagen (Cna) i elastynę (Ebps) oraz białka umożliwiające agregację i tworzenie biofilmów (LAABEI i współaut. 2015, MA i współaut. 2019). Kolejną grupą czynników są toksyny (hemolizyny, leukotoksyny), których główną rolą jest osłabianie reakcji obronnych gospodarza przez modulację mechanizmów wrodzonej i nabytej odpowiedzi odpornościowej. Bakteria *S. aureus* produkuje również liczne enzymy odpowiedzialne za pozyskanie składników odżywczych (koagulaza, stafylokinaza, nukleazy, proteazy serynowe i cysteinowe, metaloproteazy, lipazy) (OLIVEIRA i współaut. 2018, TAM i TORRES 2019).

Wyniki licznych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem gąsienic *G. mellonella* pozwoliły lepiej zrozumieć rolę biofilmu wytwarzanego

w procesie patogenezy przez badaną bakterię. Na przykład w doświadczeniach opisanych przez GRAF i współaut. (2019) owady stosowano do ustalenia roli czynników wirulencji wyizolowanych metodą multiomiczną z macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmów *S. aureus*. Bezkomórkowy supernatant biofilmu, zawierający zidentyfikowane czynniki (białka otoczki, hemolizyny, leukotoksyny i lipazy), wstrzykiwano do hemocelu gąsienic *G. mellonella*. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano wyraźną korelację pomiędzy zjadliwością szczerpów a wytwarzaniem biofilmu.

Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych przez ZHAO i współaut. (2019) wykazały, że zjadliwość *S. aureus* jest bezpośrednio związana z profilem egzoproteomu bakterii, a dzięki analizie przeżywalności *G. mellonella* możliwe było dokładne rozróżnienie tych profili. Obecność białek takich jak: IsaA (ang. immunodominant staphylococcal antigen A), IsdA, IsdB, IsdE, IsdH (ang. iron-regulated surface determinants A, B, E, H) i chitynazy B, skutkowała zwiększoną śmiertelnością larw, z kolei gąsienice zakażone mutantami delecyjnymi niezdolnymi do syntezy tych białek cechowały się zwiększoną przeżywalnością. Ponadto bakteria *S. aureus* indukowała syntezę peptydów odpornościowych w hemolimfie *G. mellonella*, takich jak gloweryny, peptyd cekropino-D-podobny czy peptyd morycynopodobny, a także tworzenie guzków podobnych pod względem budowy i funkcji do ropni powszechnie występujących podczas infekcji skóry i tkanek miękkich u ludzi (SHEEHAN i współaut. 2019). Uzyskane wyniki dowiodły, że czynniki wirulencji *S. aureus* są rozpoznawane przez układ odpornościowy gąsienic, a ich eliminacja następuje poprzez mechanizmy podobne do występujących u naturalnych (ludzkich) gospodarzy. Innym przykładem zastosowania gąsienic *G. mellonella* do analizy procesów patogenezy *S. aureus* są badania przeprowadzone przez MÉNARD i współaut. (2021). Udowodniono, że stopień zjadliwości danego szczepu gronkowca jest regulowany przez ekspresję określonych fragmentów sRNA. Wykorzystując *G. mellonella* jako model infekcji zaobserwowano, że szczepy zdolne do ekspresji fragmentu *spr dsRNA* są bardziej zjadliwe, niż pozostałe badane szczepy. Stwierdzono, że ten model owadzi zapewnia szybką i łatwą metodę monitorowania udziału sRNA w patogenezie *S. aureus* i może być również stosowany do innych ludzkich patogenów bakteryjnych.

Gąsienice *G. mellonella* wykorzystano również do oceny różnic w zjadliwości pomiędzy testowanymi szczepami *S. aureus* opornymi na rymfapicynę o fenotypie SCV (ang. Small Colony Variants) a odpowiadającymi im szczepami rodzicielskimi. Wykazano, że zmianie fenotypu

towarzyszyły zmiany w zjadliwości, a śmiertelność gąsienic zakażonych *S. aureus* SCV była niższa niż w przypadku odpowiednich szczepów rodzicielskich (ZHENG i współaut. 2021).

Ponadto gąsienice barciaka były z powodzeniem stosowane w poszukiwaniach nowych związków bioaktywnych chroniących przed infekcją *S. aureus*. SILVA i współaut. (2017) wykazali, że zastosowanie mirycetyny, roślinnego flawonoidu, stymuluje przeżywalność larw *G. mellonella* zainfekowanych gronkowcem, jak również hamuje syntezę czynników wirulencji tego patogenu, zmniejszając jego zdolności do adhezji i formowania biofilmu. Natomiast GIBREEL i UPTON (2013) wykazali, że syntetyczny peptyd epidermicyna, chronił owady przed zakażeniem zarówno szczepami podatnymi na metycylinę, jak i opornymi na ten antybiotyk (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA). Ciekawym wynikiem badań przeprowadzonych przez HESKETH-BEST i współaut. (2021) było wykazanie, że po infekcji gąsienic *G. mellonella* bakterią *S. aureus* oporną na metycylinę nastąpił spadek masy lipidów w organizmie owadów, co uznano za nowy parametr odpowiedzi immunologicznej. Innym przykładem może być wykorzystanie gąsienic barciaka do oceny skuteczności inhibitorów sortazy (SrtA). Ta związana z błoną transpeptydaza cysteinowa jest odpowiedzialna za kotwiczenie białek powierzchniowych do peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. GUAN i współaut. (2022) wykazali, że ML346 (związek kwasu barbiturowego i aldehydu cynamonowego) jest w pełni bezpieczny i nietoksyczny dla gąsienic *G. mellonella*, jak również skutecznie chroni je przed zakażeniem *S. aureus* poprzez nieodwracalną inhibicję SrtA.

#### PAŁECZKA ROPY BŁĘKITNEJ *Pseudomonas aeruginosa*

Gram-ujemna pałeczka *P. aeruginosa*, powszechnie występująca w środowisku, jest groźnym oportunistycznym patogenem człowieka. U ludzi z odpornością upośledzoną z różnych przyczyn wywołuje zakażenia m. in. układu oddechowego, skóry i tkanek miękkich, układu moczowego i krwionośnego (URBANOWICZ i GNIADKOWSKI 2017). Zagrożenie dotyczy również osób starszych, szczególnie hospitalizowanych wielokrotnie lub długo, pacjentów po zabiegach inwazyjnych, z ranami oparzeniowymi lub odleżynami. Inną grupę podwyższonego ryzyka stanowią chorzy na mukowiscydozę. Patogen ten jest jednym z najgroźniejszych drobnoustrojów powodujących zakażenia szpitalne, których leczenie jest trudne ze względu na oporność bakterii *Pseudomonas* na liczne antybiotyki stosowane w terapii oraz niewrażliwość na stosowane powszechnie środki dezyn-

fekcyjne (GELLATLY i HANCOOCK 2013, URBANOWICZ i GNIADKOWSKI 2017).

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* charakteryzują się szeregiem mechanizmów i czynników warunkujących zjadliwość tego organizmu. Można je podzielić na: związane ze ścianą komórkową, tj. LPS, rzęski i pile, oraz na substancje wydzielane pozakomórkowo, takie jak egzotoksyny, hemolizyny, barwniki (piowerdyna i piocyjanina) i proteazy. Pile typu IV biorą udział w adhezji do komórek gospodarza, a także odpowiadają za tropizm tkankowy. Z kolei LPS uczestniczy w inicjacji oraz modulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej, stanowi także czynnik etiologiczny stanów zapalnych. Najczęściej badaną grupą czynników wirulencji *P. aeruginosa* są cytotoksyny (egzotoksyny). Ich rolą jest modulacja odpowiedzi odpornościowej gospodarza, m.in. przez reorganizację cytoszkieletu komórki eukariotycznej (egzotoksyna Y), cytotoksyczność względem komórek nabłonka i makrofagów (egzotoksyna U), spowalnianie procesu fagocytozy (egzotoksyna T), zaburzanie procesu transkrypcji (egzotoksyna S) oraz hamowanie syntezy białek (egzotoksyna A) (URBANOWICZ i GNIADKOWSKI 2017).

Innymi czynnikami wirulencji bakterii znajdującymi się w centrum zainteresowania naukowców są enzymy proteolityczne, takie jak proteaza IV, proteaza alkaliczna oraz elastazy A i B. Ich zadaniem, oprócz przełamania odpowiedzi odpornościowej gospodarza, jest dostarczenie substancji odżywczych komórkom patogenu. Szczególne znaczenie mają elastazy zdolne do lizy białek strukturalnych: laminin i kolagenów. Biorą one również udział w degradacji połączeń między komórkami nabłonkowymi oraz inaktywują immunologicznie kompetentne cząsteczki, takie jak ludzki inhibitor proteinaz -1 oraz immunoglobuliny IgG i IgA (MORIHARA i HOMMA 2018).

Do czynników wirulencji *P. aeruginosa* możemy też zaliczyć systemy sekrecyjne, odpowiedzialne za wydzielanie określonych białek efektorowych bezpośrednio do wnętrza komórek eukariotycznych lub do przestrzeni międzykomórkowych, oraz wydzielany zewnątrzkomórkowo polisacharyd alginian, stanowiący jeden z głównych składników struktury biofilmów. Produkcja wielu czynników zjadliwości bakterii zależna jest od mechanizmu wyczuwania obecności (ang. quorum sensing, QS), pełniącego istotną rolę w kontroli ekspresji wielu genów. Mechanizmy działania większości czynników wirulencji bakterii są dość dokładnie poznane, jednak badania te prowadzono głównie z wykorzystaniem linii komórkowych. Dokładna rola tych substancji w patogenie u ludzi często nie jest do końca wyjaśniona (D'AGATA 2015).

Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu gąsienic *G. mellonella* w badaniach patogeny oraz czynników wirulencji *P. aeruginosa* zostały opublikowane ponad 60 lat temu (LYSENKO 1963, CHADWICK i VILK 1969). Barciak większy jest owadem bardzo wrażliwym na zakażenie bakterią *P. aeruginosa* inokulowaną do hemolimfy; średnia dawka śmiertelna (LD<sub>50</sub>) wynosi mniej niż 10 komórek. W jednym z pierwszych badań MADZIARA-BORUSEWICZ i LYSENKO (1971) zaobserwowali niszczenie hemocytów w hemolimfie barciaka przez proteazę *P. aeruginosa*. Ponadto zaobserwowano zdolność układu odpornościowego owada do wykrywania różnic w patogenności mutantów LPS *P. aeruginosa* (DUNPHY i współaut. 1986). Gąsienice *G. mellonella* okazały się dobrym modelem w badaniach mających na celu wyjaśnienie mechanizmów działania i roli systemu sekrecji typu III (SS3) w patogenie *P. aeruginosa*. Stwierdzono m.in. że mutanty z nieaktywnym SS3 są znacznie mniej zjadliwe niż ich odpowiedniki z aktywnym systemem ekspresji (MIYATA i współaut. 2003).

Barciak większy został uznany za alternatywny model organizmu-gospodarza do analizy interakcji enzymów proteolitycznych bakterii *P. aeruginosa* z elementami układu odpornościowego owada. Wykazano, że proteazy powodują degradację białek/peptydów odpornościowych w hemolimfie *G. mellonella*: serynowa proteaza IV degradowała apoLp-III, białko homologiczne względem ludzkiej apolipoproteiny E w warunkach *in vitro* (ANDREJKO i współaut. 2005) i *in vivo* (ANDREJKO i współaut. 2008). Natomiast indukowane peptydy przeciwdrobnoustrojowe były degradowane przez elastazę B i alkaliczną proteazę. Zaobserwowano również, że proteazy *P. aeruginosa* podane owadom w dawce subletalnej są odpowiedzialne za aktywację układu odpornościowego gospodarza (ANDREJKO i współaut. 2009, ANDREJKO i SIEMIŃSKA 2016). Warto wspomnieć, że obserwowano zmiany jakościowe i ilościowe w profilu produkowanych przez owady AMPs w odpowiedzi na infekcję szczepami *P. aeruginosa* produkującymi odmienny zestaw enzymów proteolitycznych (ANDREJKO i współaut. 2021). Ponadto stwierdzono odmienny wpływ izolatów klinicznych pałeczki ropy błękitnej na reakcje odpornościowe *G. mellonella*, co wskazuje, że owad ten może być z powodzeniem wykorzystywany do analizy czynników wirulencji różnych szczepów *P. aeruginosa* (ANDREJKO i współaut. 2014).

Z kolei w innych badaniach udowodniono, że wytwarzające biofilm szczepy *P. aeruginosa* są znacznie bardziej podatne na działanie antybiotyków w warunkach *in vivo*, przede wszystkim z wykorzystaniem *G. mellonella*, niż podczas testów *in vitro*. Wyniki tych analiz



pozwoły lepiej zrozumieć zarówno proces tworzenia biofilmu, jak i interakcje zachodzące pomiędzy patogenem, elementami wrodzonego układu odpornościowego oraz antybiotykami podczas infekcji bakterią *P. aeruginosa* (BENTHALL i współaut. 2015).

W przypadku pałeczki ropy błękitnej gąsienice *G. mellonella* znalazły również zastosowanie do testowania substancji aktywnych mających zwalczać zakażenia tym patogenem. THOMAZ i współaut. (2020) wykazali, że podanie gąsienicom nanocząsteczek srebra znacząco zwiększa przeżywalność owadów zakażonych *P. aeruginosa*, jak i stymuluje parametry ich odpowiedzi odpornościowej. Podobne rezultaty uzyskano wykorzystując kombinacje antybiotyku levofloksacyliny i roślinnych alkaloidów. Badane owady charakteryzowały się większą przeżywalnością, nawet po zakażeniu wielolekoopornymi szczepami *P. aeruginosa* (SIRIYONG i współaut. 2018).

#### DROŹDZAK *Candida albicans*

Oprócz badań nad patogennością bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, gąsienice *G. mellonella* są z powodzeniem wykorzystywane także jako organizm modelowy w badaniach dotyczących grzybów. Najczęściej badanym, a jednocześnie zdecydowanie najbardziej rozpowszechnionym grzybem chorobotwórczym u ludzi, jest *C. albicans*, który może powodować szerokie spektrum schorzeń (kandydozy), w tym choroby skóry, błon śluzowych, zakażenia układowe i ogólnoustrojowe (MAYER i współaut. 2013). Ten oportunistyczny patogen jest szczególnie niebezpieczny w środowiskach szpitalnych, gdzie kolonizuje powierzchnie narzędzi chirurgicznych, aparatury medycznej i wyposażenia sal operacyjnych poprzez formowanie biofilmu. Do najważniejszych czynników wirulencji *C. albicans* można zaliczyć białka adhezyjne, proteazy, fosfolipazy i hemolizyny (NOBILE i współaut. 2015, STANISZEWSKA i współaut. 2015).

Powszechne występowanie i ciężki przebieg infekcji wywoływanych przez *C. albicans* wskazują na konieczność opracowania nowych metod terapii oraz szczegółowego poznania procesu patogenezy, a także mechanizmów działania poszczególnych czynników wirulencji. W tym przypadku gąsienice barciaka większego *G. mellonella* znalazły zastosowanie jako organizm modelowy i są z powodzeniem wykorzystywane m.in. w badaniach enzymów proteolitycznych produkowanych przez *C. albicans*, takich jak proteazy aspartanowe (SAP). Ich główną rolą podczas zakażenia jest uszkodzenie tkanek, modulowanie odpowiedzi odpornościowej i udział w formowaniu biofilmu. Zaobserwowano, że liczba i rodzaj wytwarzanych proteaz ma duży wpływ na zjadliwość

szczepu oraz przebieg infekcji (ROSSONI i współaut. 2013, SHEEHAN i współaut. 2019).

Inną grupę czynników wirulencji syntetyzowanych przez *C. albicans* stanowią fosfolipazy. Ich głównym zadaniem jest dostarczanie komórkom substancji odżywczych, formowanie biofilmu, inicjacja procesów zapalnych poprzez modulowanie funkcjonowania komórek odpornościowych gospodarza oraz liza konkurencyjnej mikroflory, co zapewnia przewagę komórkom patogenu (HÖFS i współaut. 2016). Owady z powodzeniem wykorzystano też do opracowania nowych, szybkich metod identyfikacji gatunków *Candida* spp. na podstawie różnic w przeżywalności zainfekowanych owadów (ROSSONI i współaut. 2013). Pamiętać należy, że badane gatunki grzybów wytwarzają odmienny profil czynników wirulencji podczas infekcji (GAGO i współaut. 2014).

SOWA-JASHEK i współaut. (2016) badali wpływ lizozymu na komórki *C. albicans*, wykorzystując larwy *G. mellonella* jako organizm modelowy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że komórki patogenu są podatne na działanie lizozymu, zarówno ssaczego, jak i obecnego w hemolimfie barciaka większego. Badania przeprowadzone przez RAJENDRAN i współaut. (2015) wykazały, iż podanie acetylocholino chroni gąsienice *G. mellonella* przed zakażeniem tym patogennym grzybem poprzez hamowanie powstawania biofilmu, jak również stymuluje mechanizmy komórkowej odpowiedzi odpornościowej owadów. VILELA i współaut. (2015) osiągnęli podobne rezultaty poprzez koinfekcję gąsienic *G. mellonella* bakteriami *Lactobacillus acidophilus* i patogenem *C. albicans*.

Innej grupie badaczy udało się wykazać, że infekcje wywołane przez *C. albicans* mają o wiele łagodniejszy przebieg, jeżeli organizm miał wcześniej kontakt z innymi gatunkami *Candida* spp. Zaobserwowano znaczny wzrost przeżywalności gąsienic *G. mellonella* zakażonych grzybem w grupie immunizowanej wcześniej subletalnymi dawkami *C. glabrata*. Wyniki te pozwoliły wyjaśnić różnice w przebiegu infekcji *C. albicans* oraz mogą przyczynić się do opracowania nowych środków zapobiegania infekcji tym groźnym patogenem (HUANG i współaut. 2020).

#### WYKORZYSTANIE BARCIAKA WIĘKSZEGO DO TESTOWANIA SUBSTANCJI CZYNNYCH

Oprócz badań podstawowych mających na celu szczegółową analizę mechanizmów interakcji gospodarz-patogen, gąsienice barciaka większego są również intensywnie wykorzystywane w biotechnologii i farmakologii jako organizmy testowe dla nowych antybiotyków, chemoterapeutyków i w terapiach alternatyw-

nych. Zakażenia wywołane przez odporne na antybiotyki mikroorganizmy stanowią duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Wykorzystanie *G. mellonella* jako organizmu modelowego oraz wyniki badań podstawowych ułatwiły zarówno projektowanie nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, jak i usprawniły proces ich wdrożenia do powszechnego użytku.

HILL i współaut. (2014) wykorzystali w swoich badaniach gąsienice *G. mellonella* do określenia skuteczności antybiotyków takich jak: cefotaxim (CTX), pipeacylina (PIP), meropenem (MEM), amikacyna (AMK), levofloksacyna (LVX), kolastyna (CST), ich kinetyki oraz stopnia, w jakim badane czynniki obciążają organizm podczas infekcji *P. aeruginosa*. Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano kombinację dwóch antybiotyków (CTX+PIP), która okazała się najbardziej skuteczna w zwalczaniu bakterii *P. aeruginosa* w porównaniu z innymi badanymi wariantami.

Podobne doświadczenia zostały przeprowadzone przez KREZDORN i współaut. (2014). Ich celem było opracowanie kombinacji antybiotyków o zwiększonej efektywności przeciwko wielolekoopornym szczepom *P. aeruginosa*, głównie przeciw izolatom klinicznym odpowiedzialnym za najcięższe infekcje. Testy przeprowadzone z użyciem gąsienic *G. mellonella* pozwoliły opracować terapię opartą o kombinację 3 antybiotyków (cefotaxim, pipeacylina, meropenem) wykazującą bardzo dużą skuteczność biobójczą.

Innym przykładem jest wykorzystanie larw *G. mellonella* do testowania synergistycznego działania substancji biologicznie aktywnych zwalczających *S. aureus*. Z grupy 15 testowanych związków podanie czynników z grupy pleuromutylin skutkowało wzrostem przeżywalności owadów. Umożliwiło to opracowanie i wdrożenie nowej terapii zwalczającej infekcje wywołane przez szczepy *S. aureus*, w tym przez szczególnie niebezpieczne szczepy wielolekooporne (DONG i współaut. 2017).

Jednym z bardziej atrakcyjnych rozwiązań problemu antybiotykooporności są alternatywne metody terapii zakażeń, np. oparte na wykorzystaniu wirusów prokariotycznych – bakteriofagów (GOLKAR i współaut. 2014). Badania nad ich zastosowaniem trwają na całym świecie, jednak zanim bakteriofagi będą mogły zostać wdrożone do powszechnego użytku, konieczna jest ocena ich skuteczności i dokładne poznanie interakcji zachodzących w układzie gospodarz-patogen-bakteriofag. W tej dziedzinie barciak większy również znalazł zastosowanie zarówno jako model do oceny skuteczności preparatów fagowych, jak i w badaniach podstawowych nad interakcjami gospodarz-patogen-

-wirus zachodzącymi po zaaplikowaniu preparatu do organizmu.

MANOHAR i współaut. (2018) wykorzystali gąsienice *G. mellonella* do oceny skuteczności trzech preparatów fagowych w zwalczaniu zakażeń bakteriami *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Wyniki badań wykazały znaczący wzrost przeżywalności owadów po aplikacji bakteriofagów, nawet w przypadku infekcji wywołanych przez wielolekooporne szczepy *K. pneumoniae*. THIRY i współaut. (2019) uzyskali podobne wyniki izolując bakteriofagi bezpośrednio ze środowiska szpitalnego oraz testując ich skuteczność na szerokiej gamie szczepów *K. pneumoniae* z wykorzystaniem larw *G. mellonella*. Wykazano 70% spadek śmiertelności owadów po podaniu preparatów zawierających wyizolowane wirusy prokariotyczne.

W innych badaniach WANG i współaut. (2020) zastosowali połączenie klasycznej antybiotykoterapii i bakteriofagów, opracowując podstawy projektowania nowych metod zwalczania szczepów *E. coli* wytwarzających biofilm. Użycie gąsienic *G. mellonella* pozwoliło zidentyfikować połączenie ciprofloksacyny i faga

WL-3, które okazało się skuteczne w terapii zapaleń sztucznych stawów. Natomiast FORTI i współaut. (2018) zaprojektowali 6-fagowy koktajl, który był zdolny do lizy klinicznych szczepów *P. aeruginosa* zarówno w kulturach planktonowych, jak i w biofilmach oraz leczył ostrą infekcję dróg oddechowych u myszy i bakteriamię u *G. mellonella*.

## PODSUMOWANIE

Gąsienice barciaka większego (*G. mellonella*) są popularnym organizmem modelowym powszechnie stosowanym w badaniach nad mechanizmami patogenezы, działaniem czynników wirulencji i interakcji gospodarz-patogen. Ze względu na wysoki stopień podobieństwa odpowiedzi odpornościowej owadów do mechanizmów odporności wrodzonej ssaków możliwe jest wykorzystanie *G. mellonella* jako substytutu dla ssaczych organizmów modelowych. Liczne zalety owada przekonały wielu badaczy do wyboru tego organizmu jako modelu również w badaniach biotechnologicznych i farmakologicznych, m. in. do projektowania nowych substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, opracowywania skuteczniejszych terapii klasycznych, jak i pionierskich terapii alternatywnych, mających na celu zastąpienie antybiotyków.

### Streszczenie

Barciak większy (*Galleria mellonella*) jest coraz częściej stosowanym owadziim organizmem modelowym. Do zalet gatunku można zaliczyć powszechność występowania, krótki cykl życiowy, oraz stosunkowo duży rozmiar gąsienic, znacznie ułatwiający manipulacje laboratoryjne. Istot-

ne jest to, że owady mogą być inkubowane w temperaturze 37°C, koniecznej w badaniach dotyczących ludzkich patogenów. Warto wspomnieć, że wykazano pozytywną korelację między odpowiedzią gospodarza a wirulencją wielu patogenów w modelach ssaków i owadów. Gąsienice *G. mellonella* z powodzeniem są wykorzystywane w badaniach interakcji patogen-gospodarz, mechanizmów patogenyzy i czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka, m.in. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Owady okazały się również odpowiednie do testowania skuteczności substancji biologicznie czynnych czy też w terapiach alternatywnych mających na celu zastąpienie antybiotyków.

## LITERATURA

- ANDREJKO M., SIEMIŃSKA A., 2016. *The role of Pseudomonas aeruginosa alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in Galleria mellonella larvae*. Invertebr. Surviv. J. 13, 269-280.
- ANDREJKO M., CYTRYŃSKA M., JAKUBOWICZ T., 2005. *Apolipophorin III is a substrate for protease IV from Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 243, 331-337.
- ANDREJKO M., MIZERSKA-DUDKA M., JAKUBOWICZ T., 2008. *Changes in Galleria mellonella apolipophorin III level during Pseudomonas aeruginosa infection*. J. Invertebr. Pathol. 97, 14-19.
- ANDREJKO M., MIZERSKA-DUDKA M., JAKUBOWICZ T., 2009. *Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of Galleria mellonella infected with Pseudomonas aeruginosa*. Comp. Biochem. Physiol. B 152, 118-123.
- ANDREJKO M., ZDYBICKA-BARABAS A., CYTRYŃSKA M., 2014. *Diverse effects of Galleria mellonella infection with entomopathogenic and clinical strains of Pseudomonas aeruginosa*. J. Invertebr. Pathol. 115, 14-25.
- 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.
- BENTHALL G., TOUZEL R. E., HIND C. K., TITBALL R. W., SUTTON J. M., THOMAS R. J., WAND M. E., 2015. *Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae in Galleria mellonella*. Int. J. Antimicrob. Agents. 46, 538-545.
- BINDER U., MAURER E., LASS-FLÖRL C., 2016. *Galleria mellonella: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species*. Fungal Biol. 120, 288-95.
- BOLOURI MOGHADDAM M. R., TONK M., SCHREIBER C., SALZIG D., CZERMAK P., VILCINSKAS A., RAHNAEIAN M., 2016. *The potential of the Galleria mellonella innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides*. Biol. Chem. 397, 939-945.
- BROWNE N., HEELAN M., KAVANAGH K., 2013. *An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes*. Virulence 1, 597-603.
- CHADWICK J. S., VILK E., 1969. *Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against Pseudomonas aeruginosa in Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 13, 410-415.
- CHAMPION O. L., WAGLEY S., TITBALL R. W., 2016. *Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxin research*. Virulence 2, 840-845.
- CYTRYŃSKA M., 2009. *O odporności bez przeciwciał...* Post. Biol. Komórki 36, 309-324.
- CYTRYŃSKA M., MAK P., ZDYBICKA-BARABAS A., SUDER P., JAKUBOWICZ T., 2007. *Purification and characterization of eight peptides from Galleria mellonella immune hemolymph*. Peptides 28, 533-546.
- D'AGATA E., 2015. *Pseudomonas aeruginosa and other Pseudomonas species*. [W:] *Principles and practice of infectious diseases*. BENNET J.E., DOLIN R., BLASER M. (red.). Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2518-2532.
- DONG C. L., LI L. X., CUI Z. H., CHEN S. W., XIONG Y. Q., LU J. Q., LIAO X. P., GAO Y., SUN J., LIU Y. H., 2017. *Synergistic effect of pleuromutilins with other antimicrobial agents against Staphylococcus aureus in vitro and in an experimental Galleria mellonella model*. Front. Pharmacol. 8, 553.
- DUNPHY G. B., MORTON D. B., KROPINSKI A., CHADWICK J. M., 1986. *Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of Pseudomonas aeruginosa for larvae of Galleria mellonella: bacterial properties associated with virulence*. J. Invertebr. Pathol. 47, 48-55.
- FORTI F., ROACH D. R., CAFORA M., PASINI M. E., HORNER D. S., FISCARELLI E. V., ROSSITTO M., CARIANI L., BRIANI F., DEBARBIEUX L., GHISOTTI D., 2018. *Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces Pseudomonas aeruginosa biofilms and treats acute infections in two animal models*. Antimicrob. Agents Chemother. 25, e02573-17.
- GAGO S., GARCÍA-RODAS R., CUESTA I., MELLADO E., ALASTRUEY-IZQUIERDO A., 2014. *Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis virulence in the non-conventional host Galleria mellonella*. Virulence 5, 278-285.
- GELLATLY S. L., HANCOCK R. E., 2013. *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*. Pathog. Dis. 67, 159-173.
- GIBREEL T. M., UPTON M., 2013. *Synthetic epidermicin NI01 can protect Galleria mellonella larvae from infection with Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2269-2273.
- GOLKAR Z., BAGASRA O., PACE DG., 2014. *Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis*. J. Infect. Dev. Ctries 13, 129-136.
- GRAF A. C., LEONARD A., SCHÄUBLE M., RIECKMANN L. M., HOYER J., MAASS S., LALK M., BECHER D., PANÉ-FARRÉ J., RIEDEL K., 2019. *Virulence factors produced by Staphylococcus aureus biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity*. Mol. Cell Proteomics. 18, 1036-1053.
- GUAN X. N., ZHANG T., YANG T., DONG Z., YANG S., LAN L., YANG C. G., 2022. *Covalent sortase A inhibitor ML346 prevents Staphylococcus aureus infection of Galleria mellonella*. RSC Med. Chem. 13, 138-149.
- HESKETH-BEST P. J., MOURITZEN M. V., SHANDLEY-EDWARDS K., BILLINGTON R. A., UPTON M., 2021. *Galleria mellonella larvae exhibit a weight-dependent lethal median dose when infected with methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Pathog. Dis. 79, ftab003.



- HILL L., VELI N., COOTE P. J., 2014. *Evaluation of Galleria mellonella larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against Pseudomonas aeruginosa infection*. Int. J. Antimicrob. Agents 43, 254-261.
- HÖFS S., MOGAVERO S., HUBE B., 2016. *Interaction of Candida albicans with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota*. J. Microbiol. 54, 149-169.
- HUANG X. W., XU M. N., ZHENG H. X., WANG M. L., LI L., ZENG K., LI D. D., 2020. *Pre-exposure to Candida glabrata protects Galleria mellonella against subsequent lethal fungal infections*. Virulence 11, 1674-1684.
- JUNQUEIRA J. C., 2012. *Galleria mellonella as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives*. Virulence 3, 474-476.
- KAVANAGH K., REEVES E. P., 2004. *Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens*. FEMS Microbiol. Rev. 28, 101-112.
- KREZDORN J., ADAMS S., COOTE P. J., 2014. *A Galleria mellonella infection model reveals double and triple antibiotic combination therapies with enhanced efficacy versus a multidrug-resistant strain of Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Microbiol. 63, 945-955.
- LAABEI M., UHLEMANN A. C., LOWY F. D., AUSTIN E. D., YOKOYAMA M., OUADI K., FEIL E., THORPE H. A., WILLIAMS B., PERKINS M., PEACOCK S. J., CLARKE S. R., DORDEL J., HOLDEN M., VOTINTSEVA A. A., BOWDEN R., CROOK D. W., YOUNG B. C., WILSON D. J., RECKER M., MASSEY R. C., 2015. *Evolutionary trade-offs underlie the multi-faceted virulence of Staphylococcus aureus*. PLoS Biol. 13, e1002229.
- LANGE A., SCHÄFER A., BENDER A., STEIMLE A., BEIER S., PARUSEL R., FRICK J. S., 2018. *Galleria mellonella: A novel invertebrate model to distinguish intestinal symbionts from pathobionts*. Front Immunol. 9, 211-214.
- LAVINE M. D., STRAND M. R., 2002. *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295-1309.
- LI Y., XIANG Q., ZHANG Q., HUANG Y., SU Z., 2012. *Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application*. Peptides. 37, 207-15.
- LIONAKIS M. S., 2011. *Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology*. Virulence 2, 521-527.
- LYSENKO O., 1963. *The mechanisms of pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula 1. The pathogenicity of strain N-06 for the larvae of the greater wax moth, Galleria mellonella (Linnaeus)*. J. Insect Pathol. 5, 78-82.
- MA D., MANDELL J. B., DONEGAN N. P., CHEUNG A. L., MA W., ROTHENBERGER S., SHANKS R. M. Q., RICHARDSON A. R., URISH K. L., 2019. *The toxin-antitoxin MazEF drives Staphylococcus aureus biofilm formation, antibiotic tolerance, and chronic infection*. mBio 10, e01658-19.
- MADZIARA-BORUSIEWICZ K., LYSENKO O., 1971. *The mechanism of pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa: VII. The influence of toxic proteinase on hemocytes of Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 17, 138-140.
- MAK P., ZDYBICKA-BARABAS A., CYTRYŃSKA M., 2010. *A different repertoire of Galleria mellonella antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi*. Dev. Comp. Immunol. 34, 1129-1136.
- MANOHAR P., NACHIMUTHU R., LOPES B. S., 2018. *The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using Galleria mellonella infection model*. BMC. Microbiol. 18, 1-11.
- MAYER F. L., WILSON D., HUBE B., 2013. *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence 4, 119-128.
- MÉNARD G., ROUILLON A., GHUKASYAN G., EMILY M., FELDEN B., DONNIO P. Y., 2021. *Galleria mellonella larvae as an infection model to investigate sRNA-mediated pathogenesis in Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 631710.
- MIKULAK E., GLINIEWICZ A., PRZYGOZDZKA M., SOLECKA J., 2018. *Galleria mellonella L. as model organism used in biomedical and other studies*. Przegl. Epidemiol. 72, 57-73.
- MİYATA S., CASEY M., FRANK D. W., AUSUBEL F. M., DRENKARD E., 2003. *Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Infect. Immun. 71, 2404-2413.
- MORIHARA K., HOMMA J. Y., 2018. *Pseudomonas proteases*. [W:] *Bacterial enzymes and virulence*. MORIHARA K., HOMMA J. Y. (red.). CRC Press, 41-80.
- MUKHERJEE K., AMSEL D., KALSY M., BILLION A., DOBRINDT U., VILCINSKAS A., 2020. *MicroRNAs regulate innate immunity against uropathogenic and commensal-like Escherichia coli infections in the surrogate insect model Galleria mellonella*. Sci. Rep. 10, 1-11.
- NOBILE C. J., JOHNSON A. D., 2015. *Candida albicans biofilms and human disease*. Annu. Rev. Microbiol. 69, 71-92.
- OLIVEIRA D., BORGES A., SIMÕES M., 2018. *Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases*. Toxins (Basel) 10, 252.
- PEREIRA M. F., ROSSI C. C., DA SILVA G. C., ROSA J. N., BAZZOLLI D. M. S., 2020. *Galleria mellonella as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application*. Pathog Dis. 78, ftaa056.
- RAJENDRAN R., BORGHI E., FALLENI M., PERDONI F., TOSI D., LAPPIN D. F., NILE C., 2015. *Acetylcholine protects against Candida albicans infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a Galleria mellonella infection model*. Eukaryot. Cell. 14, 834-844.
- RAMARAO N., NIELSEN-LEROUX C., LERECLUS D., 2012. *The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis*. J. Vis. Exp. 70, e4392.
- ROSSONI R. D., BARBOSA J. O., VILELA S. F. G., SANTOS J. D. D., JORGE A. O. C., JUNQUEIRA J. C., 2013. *Correlation of phospholipase and proteinase production of Candida with in vivo pathogenicity in Galleria mellonella*. Brazilian J. Oral Sci. 12, 199-204.
- SHEEHAN G., DIXON A., KAVANAGH K., 2019. *Utilization of Galleria mellonella larvae to characterize the development of Staphylococcus aureus infection*. Microbiology 165, 863-875.
- SILVA L. N., DA HORA G. C. A., SOARES T. A., BOJER M. S., INGMER H., MACEDO A. J., TRENTIN D. D. S., 2017. *Myricetin protects Galleria mellonella against Staphylococcus aureus infection and inhibits multiple virulence factors*. Sci. Rep. 7, 1-16.

- SIRIYONG T., VORAVUTHIKUNCHAI S. P., COOTE P. J., 2018. Steroidal alkaloids and conessine from the medicinal plant *Holarrhena antidysenterica* restore antibiotic efficacy in a *Galleria mellonella* model of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Complement Altern. Med.* 18, 1-10.
- SOWA-JASIEK A., ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., WYDRYCH J., SKRZYPIEC K., MAK P., DERYŃO K., TCHÓRZEWSKI M., CYTRYŃSKA M., 2016. *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells. *Microbiol. Res.* 193, 121-131.
- STANISZEWSKA M., BONDARYK M., PIAT J., SIENICKA K., MAGDA U., KURZATKOWSKI W., 2015. Virulence factors of *Candida albicans*. *Przegl. Epidemiol.* 66, 629-633.
- STOKES B. A., YADAV S., SHOKAL U., SMITH L. C., ELEFThERIANOS I., 2015. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front. Microbiol.* 6, 1-9.
- STĄCZEK S., ZDYBICKA-BARABAS A., MAK P., 2018. Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipophorin III during immune response against different pathogens. *J. Insect Physiol.* 105, 18-27.
- TAM K., TORRES V. J., 2019. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol. Spectr.* 7, 10.1128.
- TAYLOR T. A., UNAKAL C. G., 2022. *Staphylococcus aureus*. [Updated 2022 Feb 14]. [W]: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- THIRY D., PASSET V., DANIS-WŁODARCZYK K., LOOD C., WAGEMANS J., DE SORDI L., VAN NOORT V., DUFOUR N., DEBARBIEUX L., MAINIL J. G., BRISSE S., LAVIGNE R., 2019. New Bacteriophages against emerging lineages ST23 and ST258 of *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae. *Viruses* 11, 411.
- THOMAZ L., GUSTAVO DE ALMEIDA L., SILVA F. R., CORTEZ M., TABORDA C. P., SPIRA B., 2020. In vivo activity of silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Galleria mellonella*. *Front. Microbiol.* 11, 582107.
- TSAI C. J., LOH J. M., PROFT T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2, 214-229.
- URBANOWICZ P., GNIADKOWSKI M., 2017. „Ciężkozbójny” *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne. *Kosmos* 66, 11-29.
- VILELA S. F., BARBOSA J. O., ROSSONI R. D., SANTOS J. D., PRATA M. C., ANBINDER A. L., JUNQUEIRA J. C., 2015. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence* 6, 29-39.
- VOGEL H., ALTINCICEK B., GLÖCKNER G., VILCINSKAS A., 2011. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genom.* 12, 308.
- WANG L., TKHILAISHVILI T., ANDRES B. B., TRAMPUZ A., MORENO M. G., 2020. Bacteriophage-antibiotic combinations against ciprofloxacin/ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* in vitro and in an experimental *Galleria mellonella* model. *Int. J. Antimicrob. Agents* 56, 106200.
- WOJDA I., 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 24, 342-357.
- WOJDA I., STANIEC B., SUEK M., KORDACZUK J., 2020. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog. Dis.* 78, ftaa057.
- WU G., LIU Y., YI Y., 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: cell types and their role in innate immunity. *Tissue Cell* 48, 297-304.
- ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., MAK P., SKRZYPIEC K., MENDYK E., CYTRYŃSKA M., 2013. Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1449-1456.
- ZDYBICKA-BARABAS A., MAK P., JAKUBOWICZ T., CYTRYŃSKA M., 2014. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 87, 1-12.
- ZDYBICKA-BARABAS A., SOWA-JASIEK A., STĄCZEK S., JAKUBOWICZ T., CYTRYŃSKA M., 2015. Different forms of apolipophorin III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides* 68, 105-112.
- ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., CYTRYŃSKA M., 2017. Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców. *Kosmos* 66, 563-574.
- ZHAO X., PALMA MEDINA L. M., STOBERNACK T., GLASNER C., DE JONG A., UTARI P., SETROIKROMO R., QUAX W. J., OTTO A., BECHER D., BUIST G., VAN DIJL J. M., 2019. Exoproteome heterogeneity among closely related *Staphylococcus aureus* t437 isolates and possible implications for virulence. *J. Proteome Res.* 18, 2859-2874.
- ZHENG X., FANG R., WANG C., TIAN X., LIN J., ZENG W., XU C., 2021. Resistance profiles and biological characteristics of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *Infect. Drug Resist.* 21, 1527-1536.



**KOSMOS Vol. 72, 3, 203-213, 2022**

BARTOMIEJ IWAŃSKI, MARIOLA ANDREJKO

*Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University,  
19 Akademicka Str., 20-033 Lublin, E-mail: iwanski.bartlomiej11@vp.pl, mariola.andrejko@mail.umcs.pl*

GREATER WAX MOTH (*Galleria mellonella*) AS A MODEL ORGANISM IN BIOMEDICAL RESEARCH

Summary

The greater wax moth *Galleria mellonella* is widely used as non-vertebrate model host. The advantages of the species include its common occurrence, short development cycle, relatively large size of larvae, which greatly facilitates laboratory manipulations. Importantly, insects can be incubated at 37°C, which is necessary for research on human pathogens. A positive correlation has been shown between the host response and the virulence of many pathogens in mammalian and insect models. *G. mellonella* larvae are successfully used in studies of pathogen-host interactions, mechanisms of pathogenesis and virulence factors of human pathogens e.g. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Insects have also been shown to be suitable for testing the efficacy of biologically active substances or in alternative therapies to replace antibiotics.

Key words: *Candida albicans*, *Galleria mellonella*, model organism, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

## **Publikacja 2**

Iwański Bartłomiej, Andrejko Mariola

Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response.

doi: [10.1016/j.jip.2021.107706](https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107706)

**Impact Factor<sub>(2023)</sub> = 2,795**

**Punkty MNiSW<sub>(2023)</sub> = 140**



# Host-pathogen interactions: The role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response

Bartłomiej Iwański<sup>\*</sup>, Mariola Andrejko

Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 St., Lublin 20-033, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Galleria mellonella*  
Immune response  
*Pseudomonas aeruginosa*  
exotoxin A  
Host-pathogen interactions

## ABSTRACT

The role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in the modulation of humoral immune response parameters in the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae was investigated. Our results indicate that exoA can play a role of a virulence factor by inhibiting insect PO, lysozyme, and antibacterial activity and decreasing the apoLp-III protein level significantly. No peptide bands with molecular mass below 6.5 kDa were detected in the hemolymph of exoA-treated larvae. We provided evidence for involvement of exoA in the pathogenicity of *P. aeruginosa* against *G. mellonella* and the usefulness of the insect as a model for analysis of *P. aeruginosa* toxins.

## 1. Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a common environmental human opportunistic pathogen responsible for a wide range of acute and chronic infections. The pathogenesis of bacteria involves the production of several virulence factors, e.g. exotoxin A (exoA), an important virulence factor in septicemia as well as corneal and lung infection (Michalska and Wolf, 2015; Wick et al., 1990). In eukaryotic cells, exoA inhibits protein synthesis through ADP-ribosylation of elongation factor-2 (EF-2). ExoA displays high toxicity for macrophages and T lymphocytes, inhibits proliferation of granulocytes and macrophages (Wilson and Dowling, 1998) but stimulates proliferation of mouse thymocytes (Legaard et al., 1991). Multiple studies have demonstrated that exoA influences the immune system also at non-cytotoxic doses: exoA changes the antibody response to antigens (Holt and Misfeldt, 1986), profoundly inhibits TNF, IL-6, IL-8, and IL-10 production in blood (Schultz et al., 2000), and transiently inhibits IL-2 synthesis by T-cells and the expression of CD14 molecules on monocytes (Michalkiewicz et al., 1998). It has been shown that exoA produced by *P. aeruginosa* is toxic to silkworm *Bombyx mori* (Chieda et al., 2011; Hossain et al., 2006) and *Drosophila melanogaster* (Sharama and Fitzgerald, 2010); however, the exoA-insect interactions are unknown.

The greater wax moth *Galleria mellonella* is a good model host to study insect immune response and virulence factors of many human pathogens, e.g. *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, and *Aspergillus fumigatus*

(Gibree and Upton, 2013; Gomez-Lopez et al., 2014; Koch et al., 2014; Miyata et al., 2003; Muñoz-Gómez et al., 2014). This species can be reared at human physiological temperature (37 °C), which is essential for production of many microbial virulence factors (Mylonakis et al., 2007). We have provided evidence that *G. mellonella* larvae can be used as an animal model for studying host-*P. aeruginosa* interactions (Andrejko et al., 2014, 2021a; Andrejko and Siemińska, 2016).

Since exoA influences the virulence of *P. aeruginosa*, we considered it interesting to study the effect of exoA on host defense mechanisms activated during infection with this pathogen. In this *in vivo* study, the toxicity of exoA to *G. mellonella* larvae was assessed and the essential humoral immune parameters, i.e. phenoloxidase, lysozyme, and antibacterial activity and the apolipoprotein III (apoLp-III) level in larvae treated with a sublethal dose of exoA, were examined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological species and toxin

Last instar larvae of the greater wax moth *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) reared in a continuous laboratory culture on honeybee nest debris at 30 °C were used in all experiments.

LPS-defective and streptomycin- and ampicillin-resistant *Escherichia coli* K12 strain D31 (CGSC 5165) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27 853) grown in LB medium at 37 °C were used. Purified and lyophilized *P. aeruginosa* exotoxin A was purchased commercially (Sigma-

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [bartlomiej.iwanski11@wp.pl](mailto:bartlomiej.iwanski11@wp.pl) (B. Iwański).

Aldrich).

## 2.2. Survival analysis

The *G. mellonella* larvae were injected with two doses of exoA (20 and 30 ng in 5 µl of non-pyrogenic water/larva; 6 larvae per group). For analysis of the effect of the co-injection of *P. aeruginosa* cells and exoA on *G. mellonella* mortality, the larvae were challenged with exoA (20 ng in 5 µl of non-pyrogenic water; 6 larvae per group), *P. aeruginosa* cells (approx. 10 cells in 5 µl of non-pyrogenic water; 6 larvae per group), or a mixture where the injection volume of 5 µl contained a combination of both (6 larvae per group). The control insects (6 larvae) were treated with non-pyrogenic water (5 µl). Five independent experiments were performed using a total number of 90 (for testing the effect of 20 and 30 ng of exoA) and 120 individuals (for testing the effect of co-injection). The survival rate was monitored every 12 h over 72 h of the experiments.

## 2.3. Insect immune challenge, hemolymph collection, and preparation of hemolymph extracts

The larvae were injected with a sublethal dose of exoA (20 ng in 5 µl of non-pyrogenic water/larva) at the base of the last proleg of larvae using a Hamilton syringe ( $\phi = 0.73$  mm). The control larvae were injected with non-pyrogenic water (5 µl). Hemolymph samples were obtained by puncturing the larval abdomen with a sterile needle. Hemolymph was collected 1–24 h after the treatment (20 µl/larva; 10 larvae/group) and the samples from one time point were combined. Cell-free hemolymph and acidic/methanolic hemolymph extracts were obtained as described previously (Andrejko et al., 2005; 2014; Cytryńska et al., 2007). The experiment was performed three times independently.

## 2.4. Phenoloxidase activity assay

Phenoloxidase activity was determined as reported previously (Andrejko et al., 2014; 2021b). Two µl of 10x diluted hemolymph were combined with 18 µl of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> and incubated for 20 min. Next, 180 µl of 2 mM dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, were added. Absorbance was measured at 490 nm for 90 min. The analysis was performed three times independently with five technical repetitions for each hemolymph sample.

## 2.5. Antimicrobial activity assays

Detection of anti-*E. coli* activity after SDS-PAGE and subsequent renaturation of polypeptides in the gels was performed as described elsewhere (Cytryńska et al., 2007).

Lysozyme activity was detected with a radial diffusion method using agarose plates with Sørensen buffer (0.066 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.066 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.4) containing lyophilized *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich). The wells were filled with 4 µl of cell-free hemolymph and the plates were incubated at 28 °C for 24 h. Peptidoglycan digestion zones were measured and the activity was defined as an equivalent of EWL activity (Jarosz, 1995).

## 2.6. Immunodetection of apolipophorin III

After electrophoretic separation (Tris-tricine SDS-PAGE), the polypeptides (20 µg) were electrotransferred onto polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes and probed with anti-*G. mellonella* apoLp-III antibodies (1:2500) (custom ordered; Agrisera, Sweden) (Andrejko et al., 2014).

## 2.7. Other methods

The protein concentration was estimated with the Bradford method (Bradford, 1976). Polyacrylamide gel electrophoreses of proteins/peptides were performed by 13.8 % Tris-glycine SDS-PAGE (Laemmli, 1970) or Tris-tricine SDS-PAGE (16.5 % T, 3% C) (Schägger and von Jagow, 1987). For all performed tests, the statistical significance level was set at  $\alpha = 0.05$ . Normality of data was checked with the Shapiro-Wilk test. Time-dependent larval survival was estimated using the Kaplan-Meier method, and comparison between curves was done with the log-rank test (Kishore et al., 2010). Statistical significance was analyzed using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *post-hoc* tests. The data are presented as the average  $\pm$  standard deviation (SD).

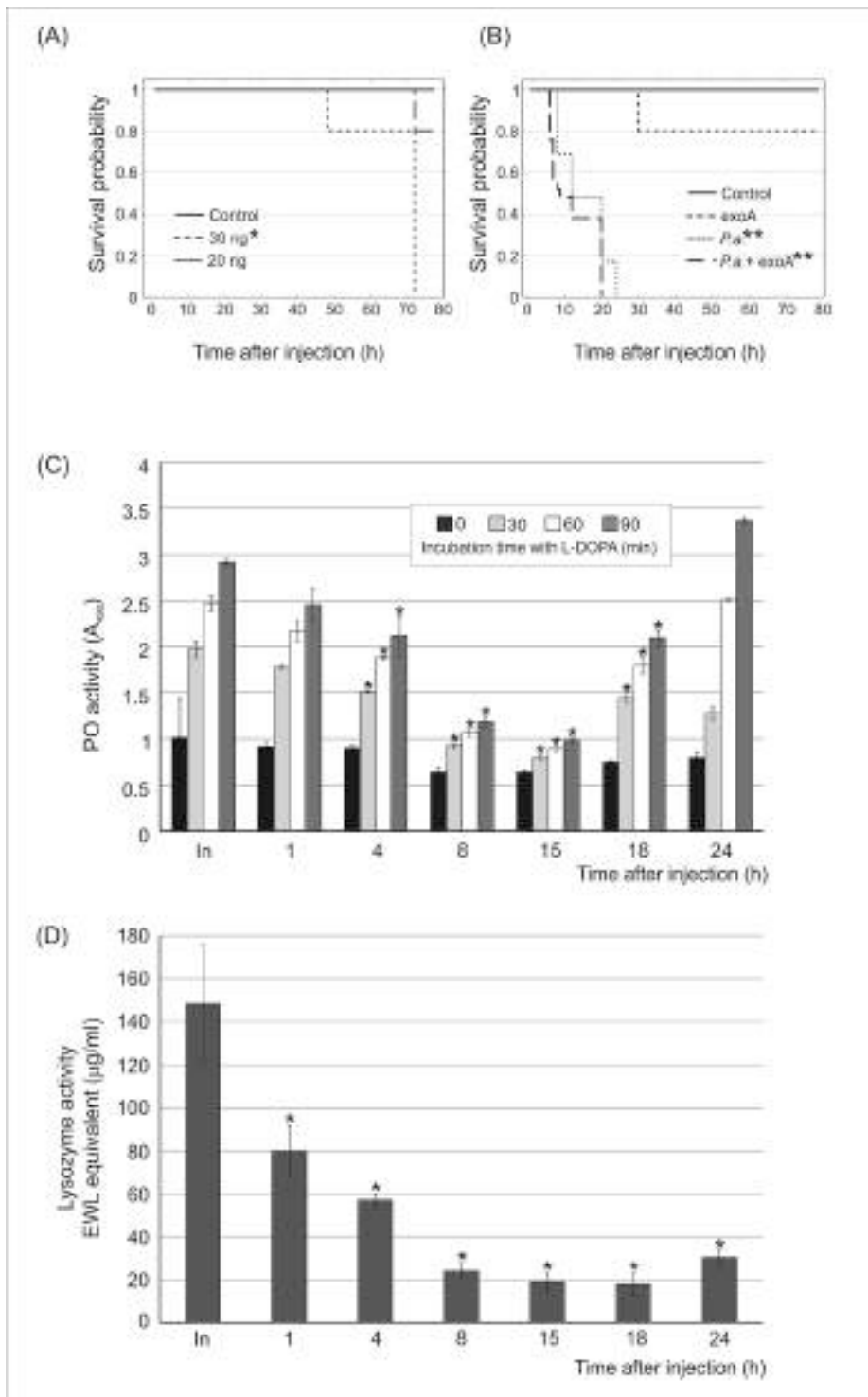
## 3. Results and discussion

The insects were injected with different doses of exoA and the dose showing no toxic effects up to 48 h, i.e. 20 ng/larva, was chosen for the next experiments (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B, the administration of *P. aeruginosa* cells combined with exoA resulted in accelerated mortality of *G. mellonella* larvae ( $\chi^2 = 5.400556$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.02013$ ), supporting the proposed role of exoA as a virulence factor.

The humoral immune parameters were evaluated in the hemolymph of the *P. aeruginosa* exoA-challenged insects collected 1–24 h after the treatment. One of the first responses of the insect immune system to infection is activation of the phenoloxidase (PO) system (Sugumaran, 2002; Whitten and Coates, 2017). It was shown that *G. mellonella* PO was activated in response to immune challenge with many bacteria (Joyce and Gahan, 2010; Zdybicka-Barabas et al., 2014). In contrast, our previous results showed that PO activity significantly decreased in *P. aeruginosa* infected larvae (Andrejko et al., 2021b). In the exoA-challenged larvae a slight but statistically significant decrease in the PO activity was detected 4 h after the treatment (Fig. 1C). However, 8 h and 15 h after the challenge, the level of PO activity decreased approx. 3-fold, and then slowly returned to the level observed in the control larvae. We reported previously that immunization of insects with *P. aeruginosa* alkaline protease led to an increase in PO activity in hemolymph 2–8 h after the injection; however, almost no PO activity was detected 15 h post-treatment (Andrejko et al., 2021b).

The effect of the *P. aeruginosa* exoA on *G. mellonella* lysozyme activity was investigated using a well diffusion assay. The activity of lysozyme decreased by 45% compared to the control (approx. 145 µg/ml EWL) 1 h after the challenge. The enzyme activity in hemolymph collected at 8 h decreased by 85% and remained at a similar level up to 18 h (Fig. 1D). The inhibition of both lysozyme and PO by exoA was most evident after 8–15 h, suggesting that exoA was most effective at inhibiting protein synthesis at this time. However, this effect in the case of PO was transient. At the present stage of research, it is difficult to indicate a specific mechanism responsible for these results. ExoA appears to have a different effect on proteins in the hemolymph, which depends on the level of the protein and/or the regulation of its activity. The decrease in lysozyme activity observed in our study 1–4 h after the treatment may have been caused by high levels of PO in the initial phase of the immune response, which could be related to the already synthesized enzyme released from oenocytoids. In turn, 24 h later, when the effect of exoA decreased, most probably because of its consumption, more PO was synthesized and released from the newly proliferated oenocytoids, which further inhibited lysozyme activity. The results are to some extent consistent with data published by Stączek et al. (2020), who indicated that the higher lysozyme activity in *G. mellonella* hemolymph after administration of  $\alpha$ -1,3-glucan correlated well with inhibition of PO activity and suggested negative regulation thereof by lysozyme. Interestingly, it was reported that lysozyme, *Galleria* defensin, proline-rich peptide 1, and anionic peptide 2 decreased the PO activity considerably in *G. mellonella* hemolymph (Zdybicka-Barabas et al., 2014).

Antimicrobial peptides and proteins constitute key factors in insect



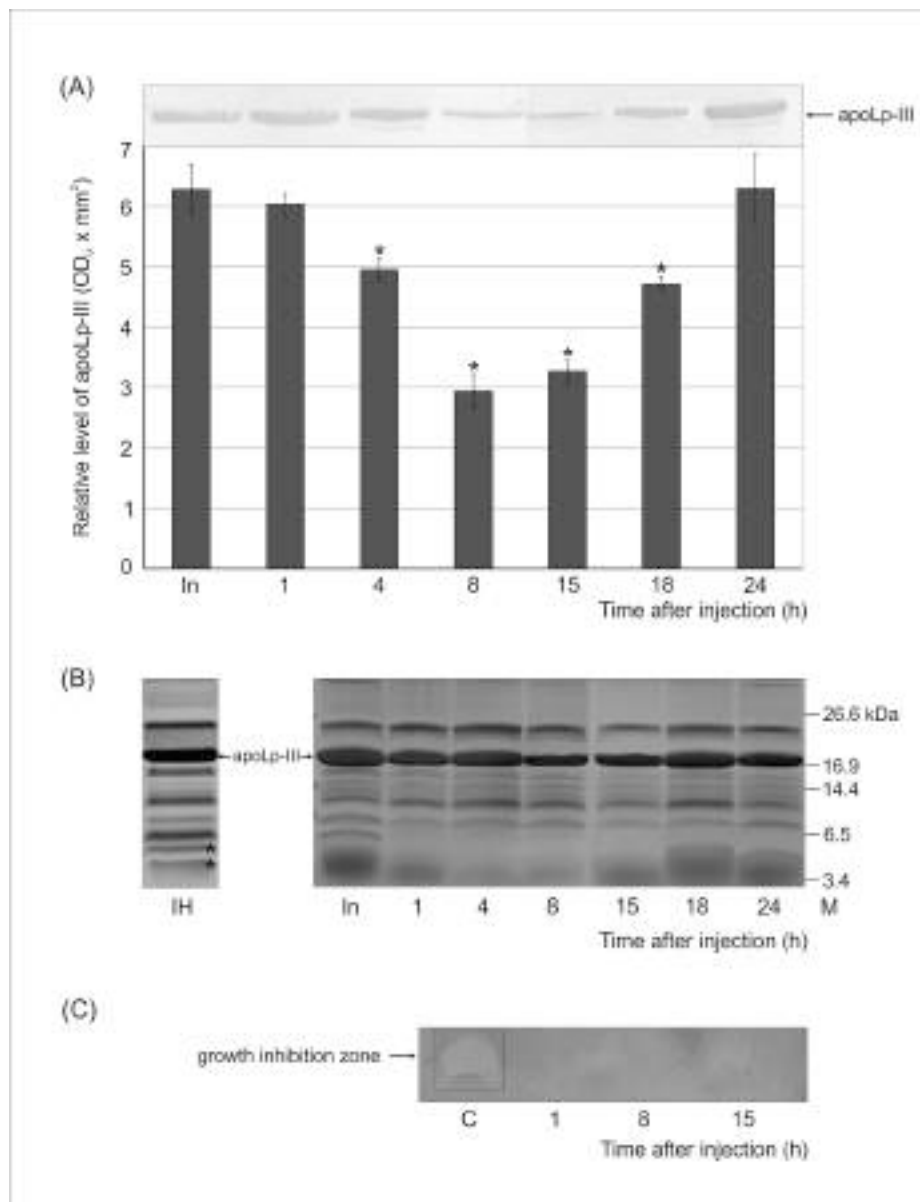
**Fig. 1.** (A) Kaplan-Meier survival analysis of *G. mellonella* larvae injected with different doses of *P. aeruginosa* exotoxin A or (B) with exoA (20 ng/larva), living *P. aeruginosa* (approx. 10 cells), or a mixture containing *P. aeruginosa* and exoA. Control larvae were injected with non-pyrogenic water. Five independent experiments were performed on the total number of 90 (A) and 120 (B) individuals. The curves were compared to the respective control curves by the log-rank test (A: 20 ng:  $\chi^2 = 2.923007$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.087321$ ; 30 ng:  $\chi^2 = 6.047424$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.013927$ ; B: exoA:  $\chi^2 = 2.923007$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.087321$ ; *P. aeruginosa*:  $\chi^2 = 62.788699$ ,  $df = 1$ ,  $p = 2.33 \times 10^{-13}$ ; *P. aeruginosa* + exoA:  $\chi^2 = 59.213464$ ,  $df = 1$ ,  $p = 1.41 \times 10^{-14}$ ). Statistical significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . (C) Phenoloxidase and (D) lysozyme activity in *G. mellonella* hemolymph collected 1–24 h after the injection with *P. aeruginosa* exoA (20 ng/larva). The graph (C) shows the PO activity at the selected time points: 0, 30, 60, and 90 min incubation of the hemolymph with L-DOPA as a substrate. Statistically significant differences (\* $p < 0.05$ ) between the control and exoA-challenged samples were determined with Kruskal-Wallis test (T0:  $\chi^2 = 0.0993$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.75271$ ; T30:  $\chi^2 = 35.1805$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.0000015$ ; T60:  $\chi^2 = 35.7073$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.0000017$ ; T90:  $\chi^2 = 34.8878$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.0000018$ ) and Mann-Whitney *post-hoc* test (T30: 4 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30816$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00094$ ; 8 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30818$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00095$ ; 15 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30814$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00093$ ; 18 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.3082$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00097$ ; T60: 4 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30821$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00094$ ; 8 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30814$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00092$ ; 15 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30815$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00094$ ; 18 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30814$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00094$ ; T90: 4 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.30815$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00094$ ; 8 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.3082$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00097$ ; 15 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.3082$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00095$ ; 18 h:  $U = 0$ ,  $z = 3.3082$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00094$ ). (D) Lysozyme activity was determined by the radial diffusion assay and presented as an equivalent of EWL activity. The results from three independent experiments are presented as means ( $\pm$ SD). Statistical significance (\* $p < 0.05$ ) with respect to the control larvae at the particular time point was determined with Kruskal-Wallis test ( $\chi^2 = 27.0928$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.00002$ ) and Mann-Whitney *post-hoc* test (1 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8022431$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0051214$ ; 4 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8022432$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0051211$ ; 8 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8022436$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0051210$ ; 15 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8022430$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0051213$ ; 18 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8022433$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0051225$ ; 24 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8022430$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0051238$ ). In - hemolymph of control larvae injected with non-pyrogenic water.

humoral immune response against invading pathogens. It has been shown that, after bacterial infection, apoLp-III levels in larval hemolymph increased in relation to hemolymph from non-infected larvae (Zdybicka-Barabas and Cytryńska, 2013; Zdybicka-Barabas et al., 2015). Our previous study demonstrated an increase in the apoLp-III level a short time after *P. aeruginosa* infection and then a significant decrease after a prolonged infection time. We also showed that this protein was a substrate for *P. aeruginosa* virulence factors, i.e. protease IV and elastase B (Andrejko and Mizerska-Dudka, 2012; Andrejko et al., 2005). To assess the apoLp-III level in the hemolymph of larvae challenged with

exoA, the protein was detected using immunoblotting with antibodies against *G. mellonella* apoLp-III (Fig. 2A). The analysis of immunoreactive bands revealed a considerable decrease in the apoLp-III level 8–15 h after the challenge, i.e. up to approx. 50% in comparison to the control group, which correlated well with the results of PO activity, indicating that exoA contributes to a decrease in the protein level and activity in hemolymph.

An impressive arsenal of defense peptides differing in biochemical and antimicrobial properties has been reported in hemolymph of immune-challenged *G. mellonella* larvae (Brown, et al., 2009; Cytryńska





**Fig. 2.** (A, B) Analysis of the protein and peptide profile in the hemolymph of *P. aeruginosa* exoA-challenged *G. mellonella* larvae. The methanolic extracts were prepared from the hemolymph of the control larvae (In) and the hemolymph collected at the indicated time points from larvae injected with exoA (20 ng/larva). The proteins and peptides were resolved by Tris-tricine SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF membranes for apoLp-III identification using anti-apoLp-III antibodies (A) or stained with Coomassie Brilliant Blue (B). The diagram (A) shows the relative apoLp-III level in comparison with the control larvae calculated on the basis of densitometric analysis of the bands using ImageJ software after imaging with the ChemiDoc imaging system (Bio-Rad). The data are presented as means ( $\pm$ SD) of three independent experiments. Statistical significance ( $*p < 0.05$ ) with respect to the control larvae at the particular time point was determined using Kruskal-Wallis test ( $\chi^2 = 26.5462$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.00002$ ) and Mann-Whitney *post-hoc* test (4 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.80224$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00512$ ; 8 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.80225$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00511$ ; 15 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.80224$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00512$ ; 18 h:  $U = 0$ ,  $z = 2.8224$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.00512$ ). M - molecular weight standards. The apoLp-III band is indicated by an arrow. (B) The antimicrobial peptide bands are indicated by asterisks (\*). In - hemolymph of control larvae injected with non-pyrogenic water. IH - hemolymph of heat-killed (98 °C, 30 min.) *P. aeruginosa*-challenged larvae. (C) Bioautography of antibacterial polypeptides of *G. mellonella* larvae after injection with *P. aeruginosa* exoA. The cell-free hemolymph samples (120  $\mu$ g of total protein) collected at the indicated time points after exoA injection were separated by glycine SDS-PAGE and the gels were washed in 2.5% Triton X-100 (Bio-Rad) for SDS removal. The polypeptides were next renatured in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and in LB broth, overlaid with nutrient agar containing viable *E. coli* D31 cells and egg white lysozyme (EWL, 2 mg/ml; Sigma-Aldrich), and incubated at 37 °C. Zones of bacterial growth inhibition were analyzed. The figure presents a fragment of representative gel from three independent experiments. C - *E. coli* growth inhibition zone caused by synthetic cecropin B (2  $\mu$ g).

et al., 2007). The Tris-tricine SDS-PAGE analysis of hemolymph proteins and peptides of the exoA-treated larvae showed no peptide bands with molecular mass below 6.5 kDa (Fig. 2B). Additionally, no *E. coli* growth inhibition zones were detected when corresponding hemolymph samples were tested by bioautography (Fig. 2C). This may be caused by a failure in recognition of exoA as a threat by the host (hence, the peptide synthesis will not be induced) or by the ability of exoA to disrupt host protein synthesis. In the latter case, the peptide expression would be induced but not completed. In contrast to our results, Chieda et al. (2011) indicated that exotoxin A did not affect AMP production in the hemolymph of *B. mori*. The changes in the apoLp-III level as well as phenoloxidase and antibacterial activity suggest that the primary function of exoA is to suppress host immune response. To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that exoA can be lethal to *G. mellonella* and affects insect humoral immune response. We propose that *G. mellonella* can be used as an animal model for studying *P. aeruginosa* exotoxins.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

The authors thank Prof. Małgorzata Cytryńska for her helpful remarks concerning the realized studies and the present paper. We thank Monika Koziej, M.Sc. for conducting *G. mellonella* breeding and for preparing the insects to the experiments.

## References

- Andrejko, M., Cytryńska, M., Jakubowicz, T., 2005. Apolipoprotein III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 243, 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.024>.
- Andrejko M., Mak, P., Siemińska-Kuczer, A., Iwański, B., Wojda, I., Suder, P., Kuleta, P., Regucka, K., Cytryńska, M., 2021a. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104239>.
- Andrejko, M., Mizerska-Dudka, M., 2012. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase B on level and activity of immune proteins/peptides of *Galleria mellonella* hemolymph. *J. Insect Sci.* 12, 88. <https://doi.org/10.1673/031.012.8801>.
- Andrejko, M., Siemińska, A., 2016. The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in *Galleria mellonella* larvae. *Invertebr. Surviv. J.* 13, 269–280. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.269-280>.
- Andrejko, M., Siemińska-Kuczer, A., Iwański, B., Cytryńska, M., 2021b. Overcoming insect immune response: The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in phenoloxidase inhibition. *Physiol. Entomol.* 46 (2), 145–156. <https://doi.org/10.1111/phen.12354>.
- Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., 2014. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* 115, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.006>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–410. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Brown, S.E., Howard, A., Kasprzak, A.B., Gordon, K.H., East, P.D., 2009. A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.004>.
- Chieda, Y., Iiyama, K., Lee, J.M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C., Shimizu, S., 2011. Virulence of an exotoxin A-deficient strain of *Pseudomonas aeruginosa* toward the silkworm. *Bombyx mori*. *Microb. Pathog.* 51 (6), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.jmicpath.2011.09.002>.
- Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., Jakubowicz, T., 2007. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 28 (3), 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.010>.
- Gibrel, T.M., Upton, M., 2013. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2269–2273. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt195>.
- Goel, M.K., Khanna, P., Kishore, J., 2010. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int. J. Ayurveda Res.* 1, 274–278. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.76794>.
- Gomez-Lopez, A., Forastiero, A., Cendejas-Bueno, E., Gregson, L., Mellado, E., Howard, S. J., Livermore, J.L., Hope, W.W., Cuenca-Estrella, M., 2014. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance. *Med. Mycol.* 52, 311–319. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt022>.
- Holt, P.S., Misfeldt, M.L., 1986. Variables which affect suppression of the immune response induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect. Immun.* 52 (1), 96–100. <https://doi.org/10.1128/iai.52.1.96-100.1986>.
- Hossain, M.S., Hamamoto, H., Matsumoto, Y., Razanajatovo, I.M., Larranaga, J., Kaito, C., Kasuga, H., Sekimizu, K., 2006. Use of silkworm larvae to study pathogenic bacterial toxins. *J. Biochem.* 140 (3), 439–444. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj171>.
- Jaros, J., 1995. Haemolymph immune proteins protect the insect body cavity from invading bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. C* 111, 213–220. [https://doi.org/10.1016/742-8413\(95\)00038-P](https://doi.org/10.1016/742-8413(95)00038-P).
- Joyce, S.A., Gahan, C.G.M., 2010. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology* 156 (11), 3456–3468. <https://doi.org/10.1099/mic.0.040782-0>.
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R.H., Quax, W.J., 2014. Assessing *Pseudomonas* virulence with nonmammalian host: *Galleria mellonella*. *Methods Mol. Biol.* 1149, 681–688. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_52](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_52).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Legaard, P.K., LeGrand, R.D., Misfeldt, M.L., 1991. The superantigen *Pseudomonas* exotoxin A requires additional functions from accessory cells for T lymphocyte proliferation. *Cell. Immunol.* 135 (2), 372–382. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90282-g](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90282-g).
- Michalkiewicz, J., Stachowski, J., Barth, C., Patzer, J., Dzierzanowska, D., Runowski, D., Madalinski, K., 1998. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on CD3-induced human T-cell activation. *Immunol. Lett.* 61, 79–88. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(97\)00169-7](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(97)00169-7).
- Michalska, M., Wolf, P., 2015. *Pseudomonas* exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol.* 6, 963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D.W., Ausubel, F.M., Drenkard, E., 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71 (5), 2404–2413. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2404-2413.2003>.
- Muñoz-Gómez, A., Corredor, M., Benítez-Páez, A., Peláez, C., Mylonakis, E., 2014. Development of quantitative proteomics using iTRAQ based on the immunological response of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Fusarium oxysporum* microconidia. *PLoS ONE* 9 (11), e112179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112179>.
- Mylonakis, E., Casadevall, A., Ausubel, F., 2007. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model system to study the virulence of human pathogen fungi. *PLoS Pathogens* 3, 0859–0865. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030101>.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 (2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- Schultz, M.J., Speelman, P., Zaat, S.A.J., Hack, C.E., Deventer, S.J.H., Poll, T., 2000. The effect of *Pseudomonas* exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol. Med.* 29 (3), 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01527.x>.
- Sharma, A.K., Fitzgerald, D., 2010. *Pseudomonas* exotoxin kills *Drosophila* S2 cells via apoptosis. *Toxicol.* 56 (6), 1025–1034. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.07.007>.
- Stączek, S., Zdybicka-Barabas, A., Pleszczyńska, M., Wiater, A., Cytryńska, M., 2020. *Aspergillus niger*  $\alpha$ -1,3-glucan acts as a virulence factor by inhibiting the insect phenoloxidase system. *J. Invertebrate Pathol.* 171, 107341. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107341>.
- Sugumar, M., 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15 (1), 2–9. <https://doi.org/10.1034/j.jip.2002.00056.x>.
- Whitten, M.M.A., Coates, C.J., 2017. Re-evaluation of insect melanogenesis research: Views from the dark side. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30 (4), 386–401. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12590>.
- Wick, M.J., Frank, D.W., Storey, D.G., Iglewski, B.H., 1990. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu. Rev. Microbiol.* 44 (1), 335–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002003>.
- Wilson, R., Dowling, R.B., 1998. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* 53 (3), 213–219. <https://doi.org/10.1136/thx.53.3.213>.
- Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., 2013. Apolipoporphins and insects immune response. *Invertebr. Surviv. J.* 10, 58–68. <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/287>.
- Zdybicka-Barabas, A., Mak, P., Jakubowicz, T., Cytryńska, M., 2014. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*: Phenoloxidase control in *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 87 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/arch.21175>.
- Zdybicka-Barabas, A., Sowa-Jasitek, A., Stączek, S., Jakubowicz, T., Cytryńska, M., 2015. Different forms of apolipoporphin III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides* 68, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.12.013>.

### **Publikacja 3**

Iwański Bartłomiej, Mizerska-Kowalska Magdalena, Andrejko  
Mariola

*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria  
mellonella* hemocytes.

doi:[10.1016/j.jip.2023.107884](https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884)

**Impact Factor<sub>(2023)</sub> = 2,795**

**Punkty MNiSW<sub>(2023)</sub> = 140**





## *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes

Bartłomiej Iwański<sup>a,\*</sup>, Magdalena Mizerska-Kowalska<sup>b</sup>, Mariola Andrejko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka, 19 St., 20-033 Lublin, Poland

<sup>b</sup> Department of Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka, 19 St., 20-033 Lublin, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Galleria mellonella*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
Exotoxin A  
Insect hemocytes  
Apoptosis  
Host-pathogen interactions

### ABSTRACT

The cellular immune response of the greater wax moth *Galleria mellonella* to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A was investigated for the first time. The insects were challenged with a sublethal dose of exoA, and then hemocyte parameters were assessed. The analysis showed a statistically significant decrease in the total hemocyte count (THC), which was associated with significant decreases in the number of granulocytes and plasmatocytes. In turn, no statistically significant changes were observed in the number of spherulocytes and oenocytoides. Fluorescent staining indicated that cells collected from the exoA-challenged larvae exhibited features characteristic for apoptotic and autophagic cell death, e.g. cytoplasm vacuolization and chromatin condensation. The flow cytometry analysis revealed a significant increase in the number of phosphatidylserine- and active caspase 3-positive hemocytes challenged with exoA, which proved apoptosis induction. Our results will help in understanding the role of exotoxin A during *P. aeruginosa* infections not only in insects but also in mammals, including humans.

### 1. Introduction

The necessity to overcome the physiological barriers of the host by pathogens is a versatile phenomenon during infections of both vertebrates and invertebrates, which is accompanied by activation of systemic immune response mechanisms. These mechanisms consist of humoral and cellular response and are activated after recognition of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) or DAMPs (damage-associated molecular patterns). The humoral immune response of invertebrates, including insects, involves hemolymph melanization, clotting, and synthesis of induced AMPs (antimicrobial peptides). In turn, the cellular immune response involves phagocytosis, encapsulation, or nodulation of foreign bodies by cells present in the hemolymph, i.e. hemocytes (Cytryńska, 2009). Hemocytes perform many functions, including the recognition of PAMPs and the synthesis of reactive oxygen forms, proteins, and peptides involved in humoral immune response. They are divided into five groups based on their function and morphological differences: prohemocytes (Ph), granulocytes (Gr), plasmatocytes (Pl), spherulocytes (Sp), and oenocytoides (Oe) (Tan et al., 2013; Wojda, 2017; Wu et al., 2016). Gr and Pl are primary immunocompetent

cells responsible for phagocytosis, encapsulation, and nodulation. They are the only hemocytes capable of adhering to foreign bodies and recognizing PAMPs, thus initiating more sophisticated immune response mechanisms. Oenocytoides are involved in the synthesis and transportation of phenoloxidase, an important element of humoral immune response. Oe can also release nucleic acids, which are alarm signals informing about an infection (Altincicek et al., 2008). Spherulocytes are responsible for the synthesis and transport of mucopolysaccharide components of the cuticle. Prohemocytes are considered as stem cells capable of mitotic divisions and differentiation into specialized hemocytes (Ribeiro and Brehélin, 2006).

It has been shown that the innate immune systems of mammals and insects share a high degree of structural and functional homology; hence, different species of insects are convenient model organisms in studies on common innate immunity mechanisms and host-pathogen interactions (Tsai et al., 2016). One of the most important insect models is the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae), which has been widely used in studies on diverse human pathogens including *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, and

\* Corresponding author.

E-mail address: [bartlomiej.iwanski11@wp.pl](mailto:bartlomiej.iwanski11@wp.pl) (B. Iwański).

*Aspergillus fumigatus* (Gibree and Upton, 2013; Gomez-Lopez et al., 2014; Koch et al., 2014; Miyata et al., 2003; Munoz-Gomez et al., 2014). Another advantageous feature of *G. mellonella* as a model organism is that this species can be reared at human physiological temperature (37 °C), which is essential for proper synthesis and activity of many bacterial and fungal virulence factors mediating the host-pathogens interactions (Mylonakis, 2008).

The aforementioned virulence factors are utilized by pathogens for e.g. overcoming host immune response mechanisms. The Gram-negative bacterium *P. aeruginosa* is an opportunistic human pathogen omnipresent in the environment and responsible for many types of infectious diseases. The pathogenesis of bacterial infection is related to the production of many proteins, including such enzymes as lipase, phospholipase C, exotoxins (A, S, T, U, Y), and several proteinases (Urbanowicz and Gniadkowski, 2017). Exotoxin A (exoA) is regarded as one of the most dangerous and most important virulence factors synthesized by *P. aeruginosa*. It acts as an inhibitor of protein synthesis by ribosylation of elongation factor 2 (EF2), which causes disruption in cell protein homeostasis and directs the cell towards apoptosis. It has been proved to be cytotoxic to granulocytes and macrophages and responsible for disruption of intercellular communication pathways (Michalska and Wolf, 2015).

Our previous studies provided evidence that *G. mellonella* larvae can be used as an animal model for studying host-*P. aeruginosa* interactions (Andrejko et al., 2014; Andrejko et al., 2021a, 2021b; Andrejko and Siemińska, 2016; Mizerska-Dudka and Andrejko, 2014). Namely, it has been shown that *P. aeruginosa* exotoxin A (exoA) is lethal to *G. mellonella* larvae and affects insect humoral immune response i.e., phenoloxidase, lysozyme, antibacterial activity, and the apolipoprotein III level (Iwański and Andrejko, 2022). This prompted us to investigate the cellular immune response of exotoxin-treated larvae. Hence, our cell-based studies were aimed at analysis of quantitative and morphological changes in hemocytes collected after treatment of *G. mellonella* larvae with exoA. We also examined the live/dead status of cells by means of Hoechst 33342/propidium iodide and acridine orange staining. In addition, flow cytometry analysis of apoptosis induction and caspase 3 activation in the hemocytes was performed. The results presented in this study not only provide a better understanding of host-pathogen interactions taking place in *G. mellonella* during *P. aeruginosa* infections, but also give new insights and prove the suitability of the wax moth as a model organism in biological studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological species and toxin

The larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) were reared on a natural diet consisting of honeybee nest debris at 30 °C in the dark and 70–80 % humidity. 7th instar larvae were used for all experiments. Before each manipulation, larval body surfaces were sterilized in 70 % ethanol.

Commercially available purified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (Sigma-Aldrich) suspended in IPS buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 M Tris-HCl pH = 6.9) was used for all experiments.

### 2.2. Insect immunization

A sublethal dose of exotoxin A (20 ng suspended in 5 µl of IPS buffer/larva) was administered by injection into the last proleg of the larvae using a Hamilton syringe (needle gauge  $\phi$  = 0.73 mm) as described elsewhere (Iwański and Andrejko, 2022). The controls comprised non-immunized (NH) larvae and larvae injected with an equal volume of IPS buffer (IPS). After immunization, the larvae were placed on sterile Petri dishes and incubated at 37 °C in the dark. Hemolymph and hemocytes were isolated from exoA-challenged and control larvae at 1, 4, 8, 15, 18, or 24 h after the injection.

### 2.3. Hemolymph collection and hemocyte isolation

The hemolymph samples were obtained via abdominal puncture. The outflowing hemolymph was immediately collected to sterile chilled Eppendorf tubes and mixed with either IPS buffer supplemented with 0.002 % PTU to prevent melanization or with an anticoagulant solution (100 mM glucose, 93 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH = 4.6), depending on the analysis requirements (Bergin et al., 2005; Mizerska-Dudka and Andrejko, 2014).

### 2.4. Microscopic analysis of morphological changes in hemocytes

Morphological changes in hemocytes were determined using a contrast-phase microscope (Olympus BH-2). All glassware was wiped with 70 % ethanol before use. Ten microliters of hemolymph collected individually from 5 larvae per time point were diluted 2-fold in an IPS/PTU solution, placed on sterile microscopic slides, covered with a cover slip, and examined at x200 magnification. Three independent observations were performed for each time point. In total, 180 larvae were used.

### 2.5. Quantitative analysis of hemocytes

The hemocytogram analysis was performed as described previously (Stączek et al., 2020). The hemolymph was collected individually (20 µl/larva) from 5 larvae per time point, diluted 2-fold in the anticoagulant, and immediately placed in a Bürker chamber for observations. The total number of hemocytes of individual larva (THC) was examined in 60 squares of the Bürker chamber grid using a contrast phase microscope (Olympus BH-2, magnification 400x). The number of hemocytes ( $N_H$ ) in 1 µl of hemolymph was calculated according to the formula:

$$NH = \frac{n^*a}{V}$$

where:

NH = number of hemocytes in 1 µl of hemolymph.

n = average number of hemocytes in 1 square of the Bürker chamber.

a = dilution of the hemolymph.

V = nominal volume of the hemolymph in one square of the Bürker chamber.

Additionally, for determination of the differential hemocyte count (DHC), cells were collected and different types of hemocytes, i.e., granulocytes, plasmatocytes, spherulocytes, and oenocytoides, were counted based on their morphological features as described above (Lavine and Strand, 2002). The results are presented as means  $\pm$  SD of absolute numerical values (THC) or values of hemocytes of individual types (DHC) obtained from three independent experiments. In total, 180 larvae were used.

### 2.6. Microscopic analysis of the live/dead status of hemocytes

The live/dead status of hemocytes after the treatment of *G. mellonella* larvae with exoA was examined by means of light and fluorescence microscopy. For this purpose, hemolymph (20 µl/larva) was collected from 5 individuals per time point and combined to obtain pooled samples. Then, the hemocytes were stained with appropriate dyes.

For light microscopy analysis, the hemocytes were stained with 0.2 % Trypan Blue in IPS for 20 min as in Dean et al. (2004) with modifications. Trypan Blue is a non-permeable dye widely recognized as a means to differentiate between live and dead cells, as it stains only dead cells with a disrupted membrane blue. The stained cells were examined under a fluorescence microscope (Olympus BX-51) at x400 magnification. Three independent observations were performed for each time point. In total, 180 larvae were used.

The fluorescence microscopy analysis was carried out to observe changes in cell membrane permeability and hemocyte nuclei. To this end, the hemocytes were stained with acridine orange (AO) or a mixture of Hoechst 33342 (H) and propidium iodide (PI) as described elsewhere (Mizerska-Dudka and Andrejko, 2014). As a cell membrane-permeable dye, Hoechst 33342 stains DNA in the nucleus of both live and dead cells blue. Propidium iodide is a commonly used fluorescence dye distinguishing live and dead cells with a disrupted cell membrane. The latter are stained red with propidium iodide. Acridine orange is a cell-permeable fluorescent dye interacting with DNA and RNA. This dye enters acidic compartments such as lysosomes, phagolysosomes, or autophagal vacuoles. In low pH conditions, it emits orange light. Dead cells with a disrupted membrane are stained red with acridine orange. The pooled hemocytes were stained with acridine orange (5 µg/ml) or Hoechst (0.2 µg/ml)/propidium iodide (0.37 µg/ml) solutions in IPS/PTU for 10 min at 28 °C in darkness. After staining, the cells were pelleted by centrifugation (1 min, 4 °C, 100g), the dye was discarded, and the hemocytes were suspended in 100 µl of IPS/PTU. The stained cells were examined under a confocal microscope Axiovert 200 M at x200 magnification. Three independent experiments were carried out. In total, 180 larvae were used.

### 2.7. Flow cytometry analysis of apoptosis induction and caspase 3 activation

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) along with a modified annexin V/propidium iodide protocol (FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit II, BD Pharmingen™) was performed to quantify the level of apoptosis and necrosis in the hemocytes after the treatment of *G. mellonella* larvae with exoA. In turn, the level of active caspase 3 (executor caspase and indicator of apoptosis induction) was determined using the PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen™). Briefly, the cells were collected 1–24 h after the treatment (20 µl/larva, 10 individuals/time point) to sterile chilled Eppendorf tubes and centrifuged (100g, 1 min, 4 °C). Next, the supernatant was discarded and the hemocytes were suspended in 100 µl of IPS. After harvesting, the cells were fluorescently stained according to the manufacturer's instruction. Finally, FACS data were acquired on a FACS Calibur (BD Biosciences) and analyzed using Cell Quest software (BD Biosciences) for the Macintosh operating system. The presented results were calculated as a percent of early and late apoptotic and necrotic cells or cells with active caspase 3 among all the analyzed cells, respectively. Three independent observations were performed for each time point. In total, 540 larvae were used.

### 2.8. Statistical analysis

All tests were performed with the significance level  $\alpha = 0.05$ . The statistical significance of the results of the quantitative analysis of hemocytes was examined using the Kruskal-Wallis test and the *post-hoc* Mann-Whitney test. The flow cytometry results were analyzed statistically with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test using GraphPad Prism 5.0. All the results were presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD),

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 3. Results

### 3.1. Changes in *G. mellonella* hemocytogram after immune-challenge with *P. aeruginosa* exoA

To explore the influence of exoA on the cellular components of *G. mellonella* immunity, the total hemocyte count (THC) was calculated at first (Fig. 1). The analysis of THC showed a severe decrease (over 60 %) in the total number of hemocytes in the hemolymph collected from the exoA-challenged larvae at 8 h after the injection, lasting up to 24 h

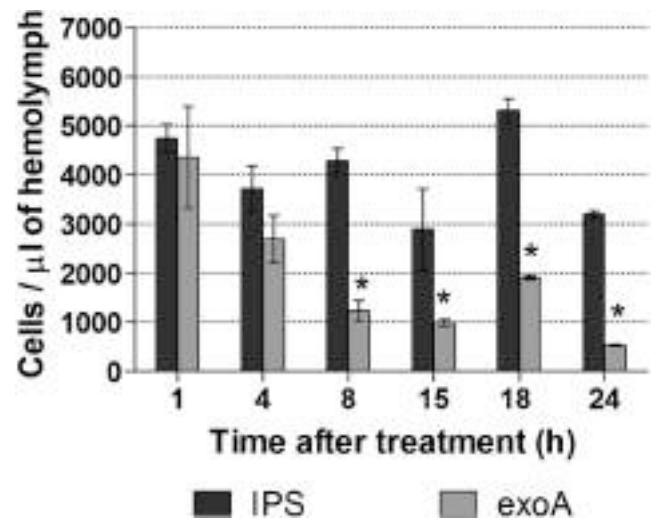


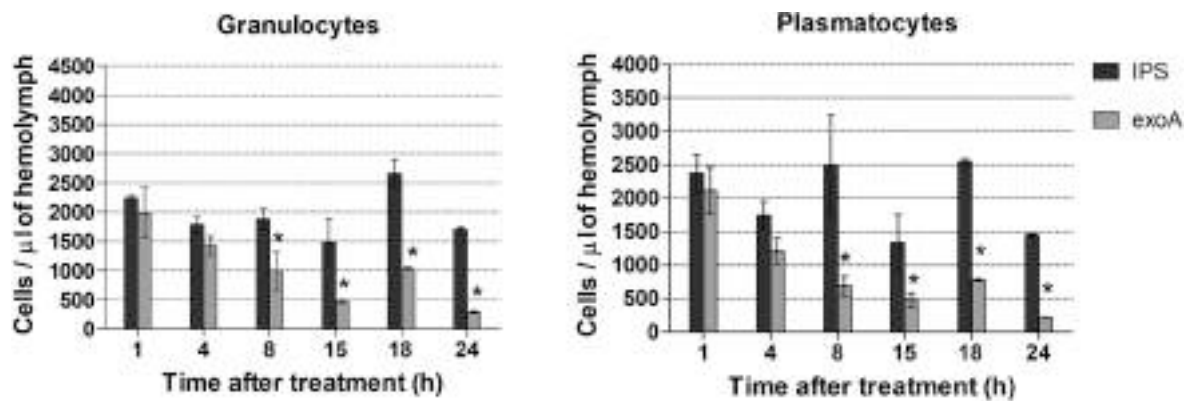
Fig. 1. Changes in the total number of hemocytes (THC) after challenging *G. mellonella* larvae with a sublethal dose of exoA (20 ng in 5 µl IPS/larva) or IPS buffer (5 µl/larva). Hemocytes were counted in the Bürker chamber in samples from freshly harvested hemolymph (20 µl/larva, 5 larvae per time point) at 1, 4, 8, 15, 18, and 24 h after the injection. The results from three independent experiments are presented as mean  $\pm$  SD. Statistically significant differences at the particular time points between the IPS- and exoA-challenged groups determined using the Kruskal-Wallis test and the *post-hoc* Mann-Whitney test are marked with an asterisk: \* $p < 0.05$ .

(an over 80 % decrease), compared to the IPS injection. It should be noted that no statistically significant differences were detected between the non-immunized and IPS-challenged larvae at the indicated time points (data not shown).

In order to better understand the observed quantitative changes, the number of the different types of hemocytes (DHC) in the hemolymph of larvae immunized with exoA was analyzed. A statistically significant decrease in the number of granulocytes and plasmatocytes was observed at 8–24 h after the immune challenge, compared to the IPS injection. The number of hemocytes in the hemolymph of larvae immunized with exoA decreased by over 50 % and 70 % in the case Gr and Pl, respectively, at 8 h after the injection (Fig. 2). Next, the amount of hemocytes slightly increased at 18 h after the challenge; in turn, the number of granulocytes and plasmatocytes after 24 h was lower by about 85 %, compared to respective controls. No statistically significant changes were observed in the number of spherulocytes and oenocytoides. The number of these cells was the same as in the control group throughout the experiment (Supplementary Materials, Fig. S1). Based on these results, it was concluded that the changes in the total number of hemocytes in the hemolymph collected from the exoA-challenged larvae resulted from the influence of exoA on granulocytes and plasmatocytes.

### 3.2. Morphological changes in hemocytes

The aforementioned results indicated that the exoA treatment reduced the number of granulocytes and plasmatocytes. Taking into account the activities of exoA, the observed effects may have resulted from the exoA-induced death of the hemocytes. Hence, to elucidate this issue, the next studies were aimed at examination of morphological changes in the exoA-treated hemocytes, as characteristic morphological features are hallmarks of specific types of cell death. The microscopic analysis of hemocytes collected from the exoA-challenged larvae revealed severe morphological changes, whereas no changes were observed in the IPS-challenged group (Fig. 3A). At first, these changes consisted of multiple aggregations of cells (Fig. 3B and C). Additionally, the Trypan Blue staining revealed that the cells became bigger, swollen, and rounded after 8 h of the treatment. Moreover, the hemocytes were



**Fig. 2.** Changes in the number of granulocytes and plasmatocytes (DHC) after challenging *G. mellonella* larvae with a sublethal dose of exoA (20 ng in 5  $\mu$ l IPS/larva) or IPS buffer (5  $\mu$ l/larva). Hemocytes were counted in the Bürker chamber in samples from freshly harvested hemolymph (20  $\mu$ l/larva, 5 larvae per time point) at 1, 4, 8, 15, 18, and 24 h after the injection and identified based on their morphology. The results from three independent experiments are presented as mean  $\pm$  SD. Statistically significant differences at the particular time points between the IPS- and exoA-challenged groups determined using the Kruskal-Wallis test and the *post-hoc* Mann-Whitney test are marked with an asterisk: \* $p < 0.05$ .

characterized by the presence of vacuoles near the nucleus and membrane blebbing. Some of the observed cells were fully stained dark-blue (Fig. 3D and E).

### 3.3. Fluorescent staining of hemocytes

The results described above suggested that exoA induced both necrotic and apoptotic cell death in the hemocytes. To look deeper into the *P. aeruginosa* virulence mechanisms towards *G. mellonella* cellular immunity, the next studies were aimed at examination of the cell death of hemocytes caused by exoA. For this purpose, the cells harvested from the IPS- and exoA-challenged larvae were stained with acridine orange or Hoechst 33342/propidium iodide and observed under a confocal microscope. The staining with AO revealed that both the nucleus and the cytoplasm of the control hemocytes collected from the IPS-challenged larvae were stained green, i.e. a characteristic pattern for live cells observed at each time point of the examination (Fig. 4A). In turn, after challenging the larvae with exotoxin A, the hemocytes were aggregated and had numerous vacuoles stained red (Fig. 4B-G). In turn, the staining with H/PI showed only the nucleus of the control hemocytes stained blue with Hoechst 33,342 (Fig. 5A). The hemocytes collected from the larvae at 1–8 h after the challenge with exoA exhibited red-stained cytoplasm and blue-stained nuclei with condensed chromatin (Fig. 5 B-D). Interestingly, a significantly decreased number of the above-mentioned cells accompanied by a predominance of intensively blue fluorescent cells were observed at 15 h after the challenge (Fig. 5E). Moreover, these cells exhibited characteristic apoptosis indicators, i.e. apoptotic bodies and condensed chromatin (Fig. 5F and G).

### 3.4. Apoptosis induction and caspase 3 activation in hemocytes

The Hoechst 33342/propidium iodide staining assay indicated that the hemocytes collected from the exoA-treated *G. mellonella* larvae at the specific time points, e.g., 1–8 h and 15–24 h after the treatment, exhibited features characteristic for necrotic and apoptotic cells, respectively. Hence, to elucidate the possible mechanism of the exoA activity towards *G. mellonella* hemocytes, necrosis and apoptosis were determined in hemocyte samples collected at 8 and 24 h after the challenge by means of AnnexinV/PI staining and flow cytometry analysis. The obtained results indicated a significant increase in both necrotic and apoptotic hemocytes after the 8-hour exoA treatment in comparison with the untreated control cells (Fig. 6A and B). The mean number of necrotic cells was 9.3 % in the control samples, 12.6 % in the IPS-treated samples, and 14.5 % in the exoA-treated variant, whereas the mean number of apoptotic cells was 11.3 %, 17.7 %, and 23 %,

respectively. In turn, the 24-hour treatment with exoA led to a significant increase in the number of only apoptotic cells, in comparison with the untreated and IPS-treated larvae and samples collected at 8 h after the challenge, i.e., there were about 20 % of apoptotic cells in both control samples and 46 % in the exoA-treated larvae. Additionally, this was concomitant with a significant decrease in the number of necrotic cells, i.e., up to 6.44 % in the control, 7.5 % in the IPS-treated cells, and 9.4 % in the exoA-treated samples, in comparison with samples collected at 8 h after the challenge (Fig. 6 C and D).

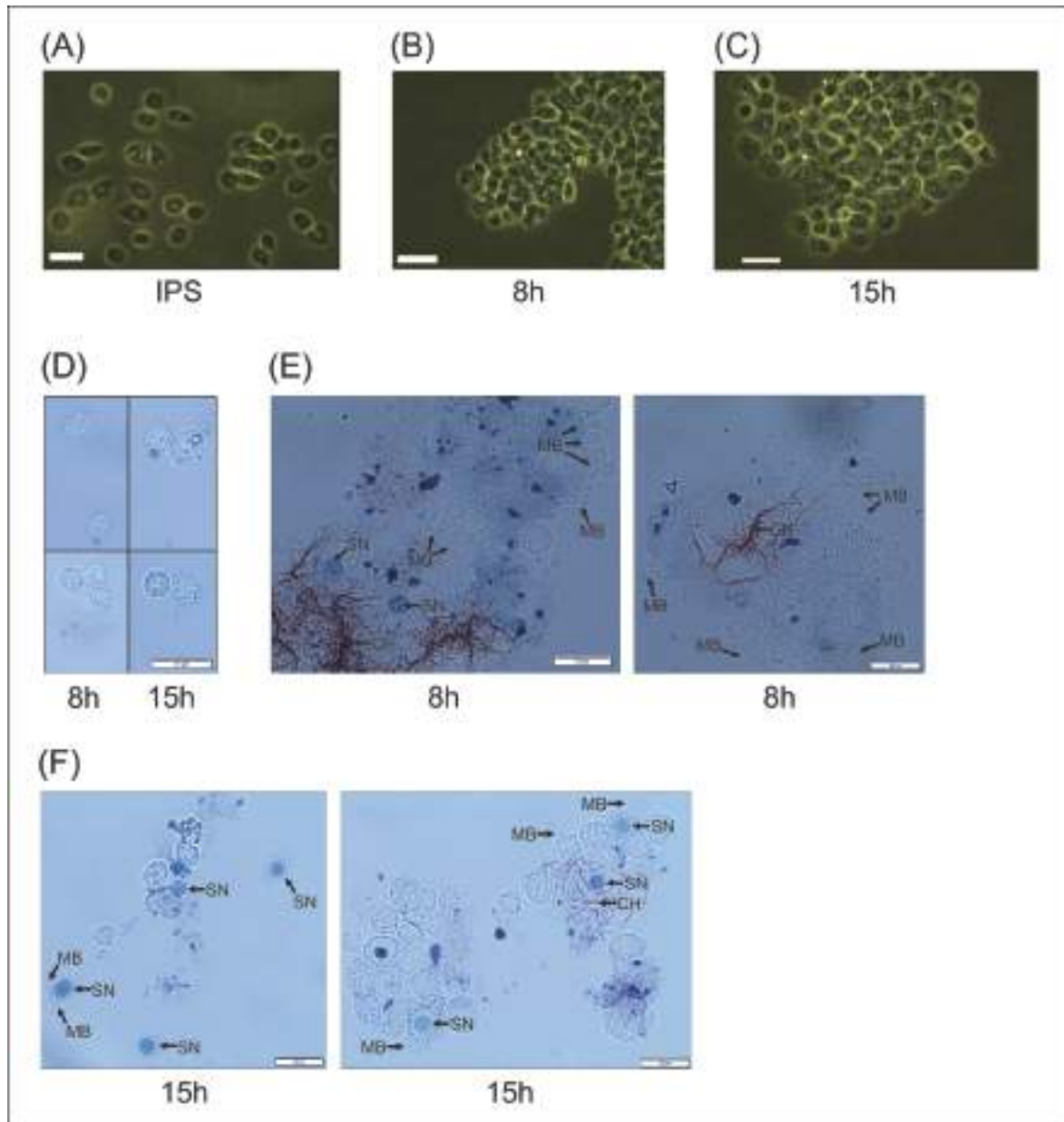
Since the AnnexinV/PI staining indicated the activation of apoptosis, the level of active caspase 3, i.e. an executor caspase and apoptosis marker, was determined in cells collected after the 24-hour treatment with exotoxin to elucidate the mechanisms of exoA activity towards hemocytes. The obtained results indicated that the apoptosis induction in the hemocytes by exoA was concomitant with a significant increase in the number of cells with an active form of caspase 3, in comparison with both control untreated and IPS-treated samples, as the percent of hemocytes with active caspase 3 was 8 %, 1 %, and 3 %, respectively (Fig. 7 A and B).

## 4. Discussion

Many reports have shown that *P. aeruginosa* exotoxin A (exoA) is a highly cytotoxic virulence factor affecting different types of mammalian cells, including epithelial and immunocompetent cells. It enables the pathogen to overcome the immunity and disseminate within the host organism (Michalska and Wolf, 2015; Urbanowicz and Gniadkowski, 2017; Wolf and Elsässer-Beile, 2009). It has been established that the toxicity of exoA towards mammalian cells is associated with direct induction of apoptosis via an extrinsic receptor-mediated caspase 8-dependent pathway or cell cycle arrest followed by apoptosis activation (Chang and Kwon, 2007; Jenkins et al., 2004). The latter effect is related to the fact that this virulence factor inactivates elongation factor-2 (eEF-2) via ADP-ribosylation and, consequently, terminates protein synthesis in target cells. There is evidence that exoA can also be cytotoxic towards invertebrate cells, namely *D. melanogaster* (Sharma and FitzGerald, 2010). Additionally, we have demonstrated that *P. aeruginosa* exotoxin A is lethal to *G. mellonella* larvae and affects insect humoral immune response (Iwański and Andrejko, 2022). Therefore, to gain more profound insight into the virulence mechanisms of *P. aeruginosa* in *G. mellonella*, the aim of this cell-based study was to determine whether exoA also influences the cellular immunity of this model organism.

Literature data indicate that changes in the total number of insect immunocompetent cells, i.e., hemocytes, and in their morphology are considered an important factor indicating the reaction of the insect



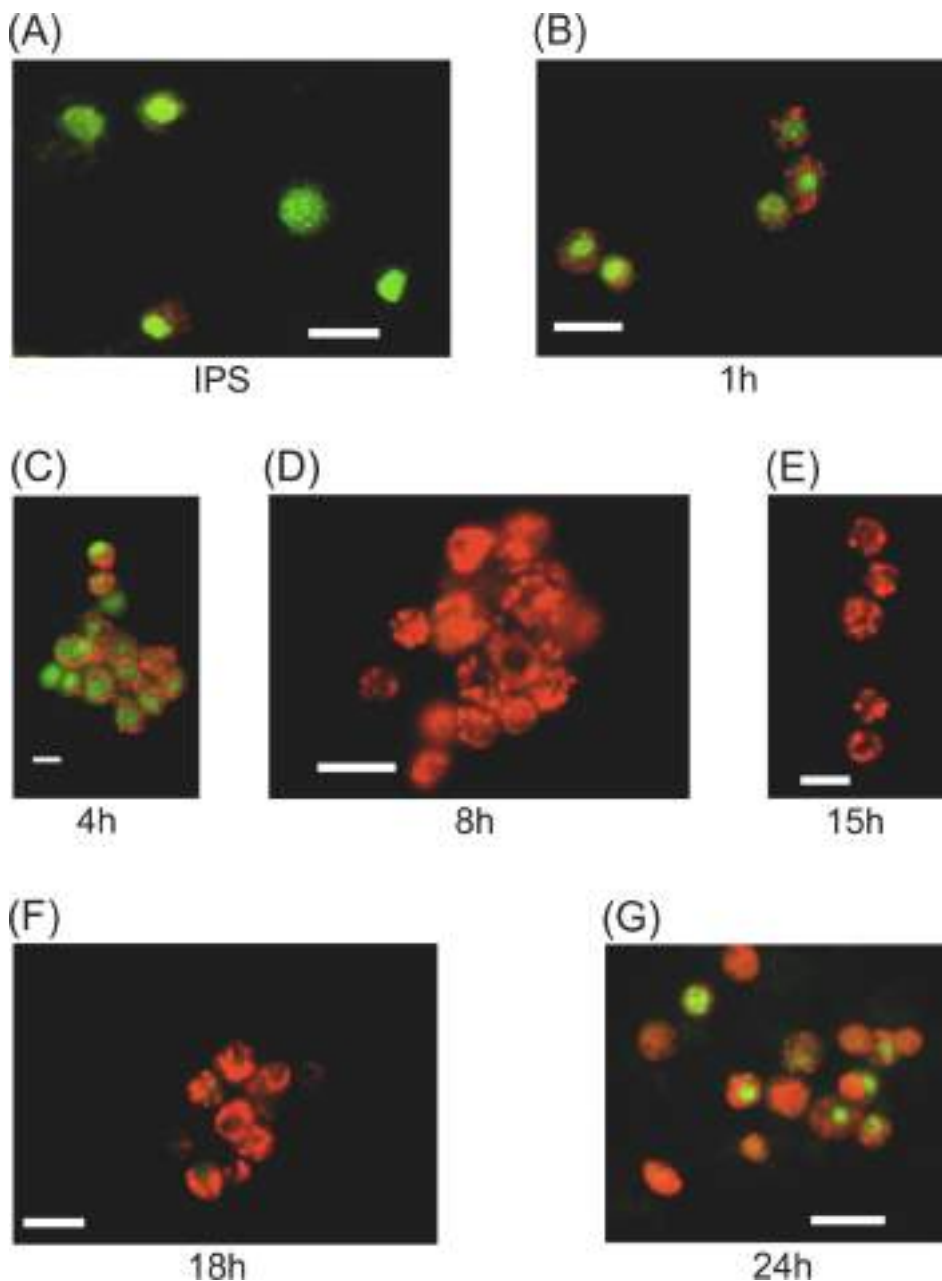


**Fig. 3.** Morphological changes in *G. mellonella* hemocytes treated with *P. aeruginosa* exoA or IPS. Hemocytes from control larvae injected with IPS (5 µl/larva) were collected 15 h after the treatment (A), whereas hemocytes from larvae injected with exoA (20 ng in 5 µl IPS/larva) were collected at the indicated time points after the treatment (B and C). Hemocytes were examined without (A-C) and with Trypan Blue staining (D-F). Live cells are not stained, while dead cells or cells with a disintegrated membrane are stained dark blue. SN – swollen nucleus; MB - membrane blebbing, CH – coagulated hemolymph. The images were obtained using contrast-phase microscope with magnification x200 (A-C) or fluorescence microscope with magnification x400 (D-F) – 20 µm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

immune system to infections and recognition of foreign bodies (Cytryńska et al., 2007; Pereira et al., 2018). There are reports showing an increased number of immunocompetent cells in response to infection or immunity stimulation (Fuchs et al., 2010). For example, Sheehan et al. (2018) and Stączek et al. (2020) showed an increase in the number of hemocytes after immunization of *G. mellonella* with *Aspergillus fumigatus* β-1,3-glucan, and *A. niger* α-1,3-glucan, respectively. This effect resulted from an increase in the number of plasmatocytes and granulocytes (Stączek et al., 2020). The results of this study showed contrary effects. There was a substantial decrease in the total number of hemocytes after challenging the *G. mellonella* larvae with *P. aeruginosa* exoA, which was associated with a statistically significant decrease in the number of granulocytes and plasmatocytes, although plasmatocytes seem to be more sensitive than granulocytes. Interestingly, no

statistically significant changes were observed in the number of spherulocytes and oenocytoides. In contrast, another report demonstrated an increase in the number of spherulocytes and oenocytoides after immunization of *G. mellonella* larvae with *A. niger* α-1,3-glucan, and administration of *A. niger* conidia (Stączek et al., 2020). These discrepancies between results reported by other authors and those presented in this study may have resulted from the role of the factors administered to the *G. mellonella* larvae. Namely, the main function of different forms of glucans is to serve as PAMPs, i.e., immunity stimulating molecules, which can be manifested by an increase in the number of hemocytes, whereas exoA is predominantly a virulence factor, i.e., a molecule targeted at depression of host immunity by e.g., reduction of the number of immunocompetent cells.

The changes observed in THC and DHC suggest that exoA influences

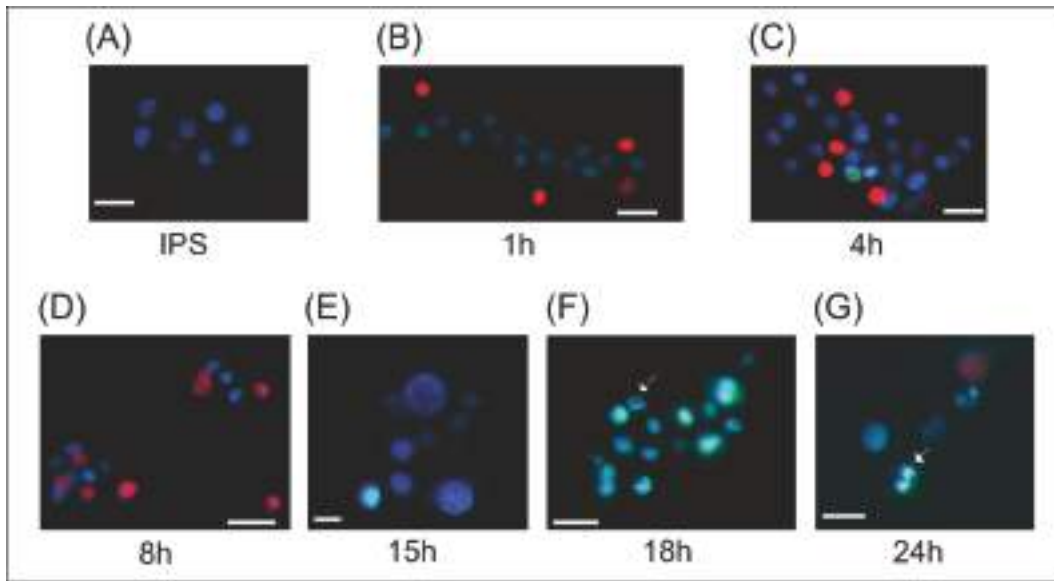


**Fig. 4.** *G. mellonella* hemocytes treated with *P. aeruginosa* exotoxin A stained with acridine orange. Hemocytes from control larvae injected with IPS (5 µl/larva) were collected 24 h after the injection (A), whereas hemocytes from larvae injected with exoA (20 ng in 5 µl IPS/larva) were collected at the indicated time points after the treatment (B-G). Live cells are stained green, while dead cells with a disrupted membrane are stained red, orange fluorescence show the presence of acidic compartments (such as acidic vacuoles, phagolysosomes). Representative photos were taken under a confocal microscope, magnification x200. – 20 µm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

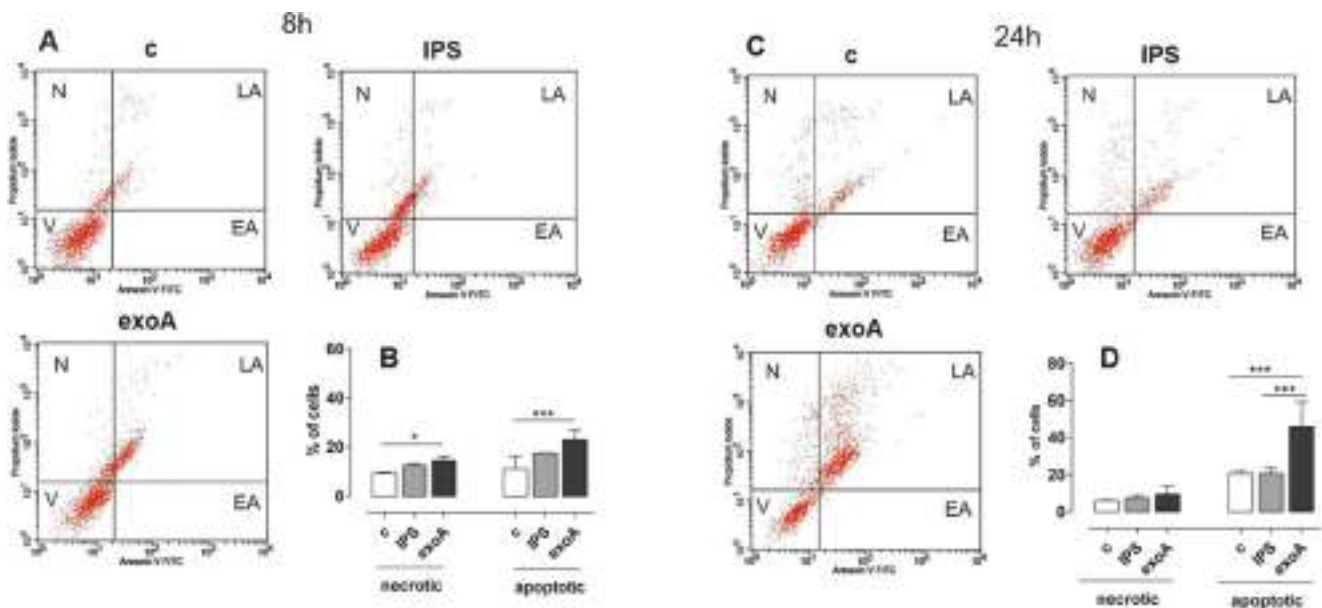
the number of hemocytes in hemolymph via either cytotoxic activity or inhibition of hemocyte proliferation (Michalska and Wolf, 2015; Urbanowicz and Gniadkowski, 2017). The observed morphological changes, i.e., membrane blebbing as well as cell and nucleus swelling, suggest that the changes in THC and DHC may have been caused by the exoA-induced death of hemocytes, although the cell death type was still unknown.

It is known that bacterial infections can trigger different modes of host cell death (Labbé and Saleh, 2008). In turn, this may result in various effects that determine both the fate of bacterial infection and the integrity of the host body. One of the strategies developed by pathogens is to trigger the death of host cells in order to eliminate immunocompetent cells, which allows their dissemination within the host body. The most common type of cell death induced by infections is apoptosis (Ashida et al., 2011). Hence, taking into account the proved proapoptotic activity of exoA and the results obtained in this study, further examinations were focused on establishment of the type of cell death caused by this toxin in *G. mellonella* hemocytes. Moreover, our

further analysis was focused on apoptosis because this type of cell death was reported by Mizerska and Andrejko (2014) after infecting larvae with *P. aeruginosa* and by Wieloch et al. (2011) after challenging larvae with coronatin-1, i.e., a toxin produced by the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. Additionally, there are other studies indicating apoptosis induction in invertebrate cells after pathogen infections. For example, the entomopathogenic nematode *Ovomermis sinensis* impairs *Helicoverpa armigera* immunity by triggering apoptosis in larval hemocytes (Jiao et al., 2018). Similarly, the infection of the silkworm *Bombyx mori* with *Serratia marcescens* and *Porphyromonas gingivalis* leads to caspase activation in immune cells and suppression of insect immunity (Ishii et al., 2010; 2012). The venom of parasitoids contains cytotoxic proteins that are capable of inducing apoptosis in host hemocytes (Wan et al. 2020). *Bacillus thuringiensis* is an example of an entomopathogenic bacterium producing pore-forming hemolysin (HlyII) to induce apoptosis of insect host hemocytes (Nielsen-LeRoux et al., 2012). Similar results were obtained after infecting *G. mellonella* larvae with *Helicobacter pylori* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Arteaga Blanco



**Fig. 5.** *G. mellonella* hemocytes treated with *P. aeruginosa* exotoxin A stained with a mixture of Hoechst 33,342 and propidium iodide. Hemocytes from control larvae injected with IPS (5 µl/larva) were collected 24 h after the injection (A), whereas hemocytes from larvae injected with exoA (20 ng in 5 µl IPS/larva) were collected at the indicated time points after the treatment (B-G). The nucleus of live and dead cells is stained blue (H), cells with fragmented DNA emit blue fluorescence (H), dead cells with a disrupted membrane are stained red (IP). Representative photos were taken under a confocal microscope, magnification x200. Arrows indicate apoptotic bodies, and asterisks indicate cells with condensed chromatin. — 20 µm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

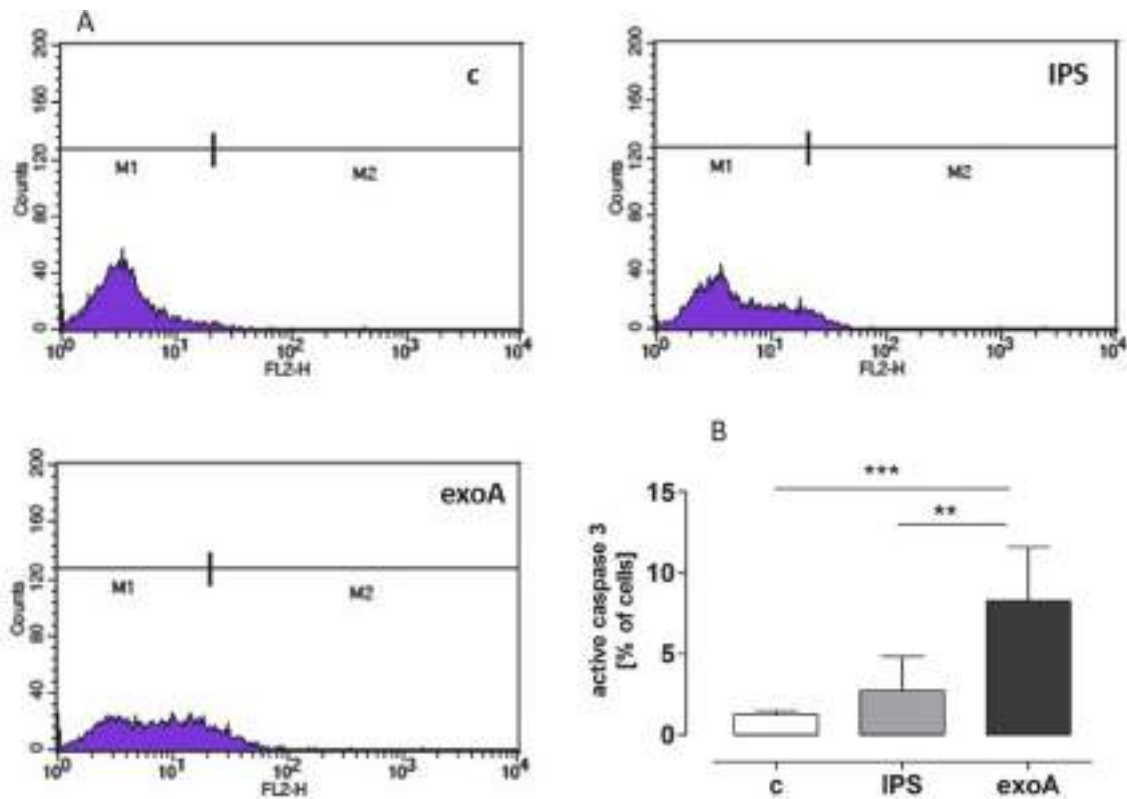


**Fig. 6.** Effect of the exoA treatment on necrosis and apoptosis induction in hemocytes. Larvae were treated with exotoxin for 8 h (A and B) and 24 h (C and D). The cells were stained with Annexin (An) V-FITC/propidium iodide (PI) and examined with flow cytometry. N - necrotic cells, LA — An+/PI + late apoptotic cells, V — An-/PI - viable cells, EA — An+/PI - early apoptotic cells. The presented dot plots (A and C) are representative and correspond with the mean number (% of cells) (B and D) of total apoptotic cells (early + late apoptosis) and necrotic cells in the control, untreated (C), IPS-treated (A), and exoA-treated larvae. All experiments were repeated independently at least three times, and data are expressed as mean ± SD; \**p* < 0.05 and \*\*\**p* < 0.001 in comparison to the control or the IPS-treated samples; one-way ANOVA test.

et al., 2017; Giannouli et al., 2014). We previously showed that *P. aeruginosa* infection led to severe morphological and ultrastructural changes in *G. mellonella* hemocytes. Membrane blebbing, cytoplasm vacuolization, cell and nucleus swelling, and chromatin condensation were observed as the bacteremia developed. These features are typical for apoptotic and autophagal cell death (Mizerska-Dudka and Andrejko, 2014). Available data indicate that *P. aeruginosa* exoA can cause both necrotic and apoptotic cell death (Michalska and Wolf, 2015; Wolf and

Elsässer-Beile, 2009). Hence, the results of this study provide a better understanding of the similarities and differences in the modes of pathogen interactions with insect hemocytes.

The apoptotic pathway involves characteristic morphological changes and biochemical processes, including cytoplasmic and nuclear condensation, phosphatidylserine extrusion, vacuolization, chromatin condensation, and DNA fragmentation (D’Arcy, 2019). Although apoptosis is known to occur in various groups of organisms, the process



**Fig. 7.** Effect of the *exoA* treatment on caspase 3 activation in the hemocytes of *G. mellonella* larvae. The larvae were treated with the exotoxin for 24 h. The presented histograms are representative (A) and correspond with the percentage of cells with active caspase 3 (M2 gate) detected by flow cytometry after cell staining with PE-conjugated anti-active caspase 3 antibodies (B). The results are mean values  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Statistically significant differences: \*\*  $p < 0.01$  or \*\*\*  $p < 0.001$  in comparison with the untreated and IPS-treated cells; one-way ANOVA test.

is not well understood in insects. Among all insects studied so far, the mechanisms of apoptosis have been described in *Drosophila* spp. (Kidera et al., 2020; Li et al., 2020; Zhou, 2019). In contrast, very little is known about apoptotic molecular pathways in the Lepidoptera.

In our research, necrotic cells were mainly observed at the initial steps of the challenge, whereas the features exhibited by the hemocytes mainly at the final steps of the challenge, e.g., chromatin condensation and numerous acidic vacuoles, did not clearly indicate the type of cell death, i.e., it was not clear whether the hemocytes collected from the *exoA*-challenged larvae were undergoing apoptosis or autophagy. Hence, further experiments examining apoptosis were performed. The flow cytometry analysis revealed a significant increase in the number of phosphatidylserine- and active caspase 3-positive hemocytes challenged with *exoA*, which proved apoptosis induction.

The results presented in this publication revealed for the first time that the severe morphological and quantitative changes in the *G. mellonella* hemocytes induced by *P. aeruginosa* exotoxin A seemed to be a result of necrotic cell death at the initial stages of the challenge and apoptosis induction at the final stages of the treatment. However, this issue needs further investigation to elucidate e.g., the mechanisms of apoptosis induction and whether this effect is associated with cell cycle disturbances.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

We thank Monika Koziej, M.Sc. for conducting *G. mellonella* breeding and for preparing the insects to the experiments.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884>.

#### References

- Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K.T., Vilcinskas, A., 2008. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *J. Immunol.* 181, 2705–2712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2705>.
- Andrejko, M., Mak, P., Siemińska-Kuczer, A., Iwański, B., Wojda, I., Suder, P., Kuleta, P., Regucka, K., Cytryńska, M., 2021a. 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 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104239>.
- Andrejko, M., Siemińska, A., 2016. The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in *Galleria mellonella* larvae. *Invertebr. Surviv. J.* 13, 269–280. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.269-280>.
- Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., 2014. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* 115, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.006>.
- Andrejko, M., Siemińska-Kuczer, A., Iwański, B., Cytryńska, M., 2021b. Overcoming insect immune response: The role of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease in phenoloxidase inhibition. *Physiol. Entomol.* 46 (2), 145–156. <https://doi.org/10.1111/phen.12354>.
- Arteaga Blanco, L.A., Crispim, J.S., Fernandes, K.M., de Oliveira, L.L., Pereira, M.F., Bazzoli, D.M.S., Martins, G.F., 2017. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell Tissue Res.* 370, 153–168. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2653-5>.



- Ashida, H., Mimuro, H., Ogawa, M., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., Sasakawa, C., 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell Biol.* 195, 931–942. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108081>.
- Bergin, D., Reeves, E.P., Renwick, J., Wientjes, F.B., Kavanagh, K., 2005. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect. Immun.* 73, 4161–4170. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.4161-4170.2005>.
- Chang, J.H., Kwon, H.Y., 2007. Expression of 14-3-3delta, cdc2 and cyclin B proteins related to exotoxin A-induced apoptosis in HeLa S3 cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 1185–1191. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.05.001>.
- Cytryńska, M., 2009. Immunity without antibodies. *Post. Biol. Komórki* 36, 309–324.
- Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., Jakubowicz, T., 2007. Protein kinase A activity and protein phosphorylation in the haemocytes of immune-challenged *Galleria mellonella* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 148, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.04.020>.
- D'Arcy, M.S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin>.
- Dean, P., Richards, E.H., Edwards, J.P., Reynolds, S.E., Charnaley, A.K., 2004. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.11.006>.
- Fuchs, B.B., O'Brien, E., El Khoury, J.B., Mylonakis, E., 2010. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1, 475–482. <https://doi.org/10.4161/viru.1.6.12985>.
- Giannouli, M., Palatucci, A.T., Rubino, V., Ruggiero, G., Romano, M., Triassi, M., Zarrilli, R., 2014. Use of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* 14, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0228-0>.
- Gibrel, T.M., Upton, M., 2013. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2269–2273. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0228-0>.
- Gomez-Lopez, A., Forastiero, A., Cendejas-Bueno, E., Gregson, L., Mellado, E., Howard, S. J., Cuenca-Estrella, M., 2014. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance. *Med. Mycol.* 52, 311–319. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt022>.
- Ishii, K., Hamamoto, H., Imamura, K., Adachi, T., Shoji, M., Nakayama, K., Sekimizu, K., 2010. *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J. Biol. Chem.* 285, 33338–33347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.12987>.
- Ishii, K., Adachi, T., Imamura, K., Takano, S., Usui, K., Suzuki, K., Hamamoto, H., Watanabe, T., Sekimizu, K., 2012. Serratia marcescens induces apoptotic cell death in host immune cells via a lipopolysaccharide- and flagella-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 287, 36582–36592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399667>.
- Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Host-pathogen interactions: The role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. *J. Invertebr. Pathol.* 187, 107706. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107706>.
- Jenkins, C.E., Swiatoniowski, A., Issekutz, A.C., Lin, T.J., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 37201–37207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405594200>.
- Jiao, Z., Wen, G., Tao, S., Wang, J., Wang, G., 2018. Induction of hemocyte apoptosis by *Ovimeris sinensis*: implications for host immune suppression. *J. Invertebr. Pathol.* 159, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.011>.
- Kidera, H., Hatabu, T., Takahashi, K.H., 2020. Apoptosis inhibition mitigates aging effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 148, 69–76. <https://doi.org/10.1007/s10709-020-00088-1>.
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R.H., Quax, W.J., 2014. Assessing *Pseudomonas* virulence with nonmammalian host: *Galleria mellonella*. In: [In]: *Pseudomonas Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, pp. 681–688. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_52](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_52).
- Labbé, K., Saleh, M., 2008. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 15, 1339–1349. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.91>.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00092-9).
- Li, Z., Wu, C., Ding, X., Li, W., Xue, L., 2020. Toll signaling promotes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila*. *Cell Div.* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13008-020-00062-5>.
- Michalska, M., Wolf, P., 2015. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front. Microbiol.* 6, 963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D.W., Ausubel, F.M., Drenkard, E., 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71, 2404–2413. <https://doi.org/10.1128/iai.71.5.2404-2413.2003>.
- Mizerska-Dudka, M., Andrejko, M., 2014. *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Basic Microbiol.* 54, 232–246. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200273>.
- Munoz-Gomez, A., Corredor, M., Benitez-Paez, A., Pelaez, C., 2014. Development of quantitative proteomics using iTRAQ based on the immunological response of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Fusarium oxysporum* microconidia. *PLoS One* 9, e112179.
- Mylonakis, E., 2008. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 165, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9082-z>.
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., Givaudan, A., 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.006>.
- Pereira, T.C., De Barros, P.P., Fugisaki, L.R.D.O., Rossoni, R.D., Ribeiro, F.D.C., De Menezes, R.T., Scorzoni, L., 2018. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J. Fungus* 4, 128. <https://doi.org/10.3390/jof4040128>.
- Ribeiro, C., Brehélin, M., 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 52, 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>.
- Sharma, A.K., FitzGerald, D., 2010. *Pseudomonas* exotoxin kills *Drosophila* S2 cells via apoptosis. *Toxicol.* 56, 1025–1034. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.07.007>.
- Sheehan, G., Clarke, G., Kavanagh, K., 2018. Characterisation of the cellular and proteomic response of *Galleria mellonella* larvae to the development of invasive aspergillosis. *BMC Microbiol.* 18, 63. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1208-6>.
- Stączek, S., Zdybicka-Barabas, A., Wiater, A., Pleszczyńska, M., Cytryńska, M., 2020. Activation of cellular immune response in insect model host *Galleria mellonella* by fungal  $\alpha$ -1,3-glucan. *Pathog. Dis.* 78, ftaa062. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa062>.
- Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S., Li, T., Cui, H., 2013. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 59, 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.008>.
- Tsai, C.J.Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7, 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.
- Urbanowicz, P., Gniadkowski, M., 2017. "Ciężkoobrojni" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tio genetyczne. *Kosmos* 66, 11–29.
- Wan, B., Yang, L., Zhang, J., Qiu, L., Fang, Q., Yao, H., Poirié, M., Gatti, J.-L., Ye, G., 2020. The venom of the ectoparasitoid wasp *Pachycrepoides vindemiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) induces apoptosis of *Drosophila melanogaster* hemocytes. *org/10.3390/insects11060363* *Insects* 11, 363. <https://doi.org/10.3390/insects11060363>.
- Wieloch, W., Boguś, M.I., Ligeza, M., Koszela-Piotrowska, I., Szweczyk, A., 2011. Coronatin-1 isolated from entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* kills *Galleria mellonella* hemocytes in vitro and forms potassium channels in planar lipid membrane. *Toxicol.* 58, 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2011.07.007>.
- Wojda, I., 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 24, 342–357. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>.
- Wolf, P., Elsässer-Beile, U., 2009. *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 161–176. <https://doi.org/10.1002/cam4.449>.
- Wu, G., Liu, Y., Ding, Y., Yi, Y., 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell* 48 (4), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.06.007>.
- Zhou, L., 2019. p53 and apoptosis in the *Drosophila* model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1167, 105–112. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8_6).

## Oświadczenia współautorów

### Publikacja 1

Iwański Bartłomiej, Andrejko Mariola

Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych.

dr hab. Mariola Andrejko, prof. UMCS  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Immunobiologii

Lublin, dn. 11.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. *Kosmos*, 72, 203-213. doi: [http://dx.doi.org/10.36921/kos.2022\\_2878](http://dx.doi.org/10.36921/kos.2022_2878) mój wkład w pracę polegał na: współdziałanie w opracowaniu koncepcji pracy, opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

  
Mariola Andrejko


Mgr inż. Bartłomiej Iwański  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Immunobiologii

Lublin, dn. 11.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. Kosmos, 72, 203-213. doi: [http://dx.doi.org/10.36921/kos.2022\\_2878](http://dx.doi.org/10.36921/kos.2022_2878) mój wkład w pracę polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu literatury, opracowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

  
Bartłomiej Iwański

## Oświadczenia współautorów

### Publikacja 2

Iwański Bartłomiej, Andrejko Mariola

Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response.

dr hab. Mariola Andrejko, prof. UMCS  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Immunobiologii

Lublin, dn. 11.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Iwański, B., Andrejko, M., 2022. Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, 187, 107706 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107706> mój wkład w pracę polegał na:

współdziałale w opracowaniu koncepcji pracy i projektu doświadczeń, nadzorowaniu prac badawczych, opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

  
Mariola Andrejko

Mgr inż. Bartłomiej Iwański  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Immunobiologii

Lublin, dn. 11.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, 187, 107706  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107706> mój wkład w pracę polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, analizie statystycznej wyników, opracowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

B. Iwański  
Bartłomiej Iwański

## Oświadczenia współautorów

### Publikacja 3

Iwański Bartłomiej, Mizerska-Kowalska Magdalena, Andrejko  
Mariola

*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes.



dr Magdalena Mizerska-Kowalska  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 09.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 197, 107884 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884> mój wkład w pracę polegał na: współdziałanie w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów wykorzystujących cytometrię przepływową, analizie statystycznej wyników i odpowiedzi na recenzje.

Magdalena Mizerska-Kowalska



dr hab. Mariola Andrejko, prof. UMCS  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Immunobiologii

Lublin, dn. 11.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 197, 107884 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884> mój wkład w pracę polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy i projektu doświadczeń, nadzorowaniu prac badawczych, opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

  
Mariola Andrejko


Mgr inż. Bartłomiej Iwański  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Katedra Immunobiologii

Lublin, dn. 11.05.2023

### Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M., 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 197, 107884 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884> mój wkład w pracę polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, analizie statystycznej wyników, opracowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

  
Bartłomiej Iwański