

Mgr Aneta Sowa-Jasiłek
Zakład Immunobiologii,
Instytut Biologii i Biochemii,
Wydział Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 17.06.2016 r.

Przeciwgrzybowe właściwości lizozymu i peptydu anionowego 2 *Galleria mellonella*

(Antifungal properties of *Galleria mellonella* lysozyme
and anionic peptide 2)

Streszczenie

Lizozym i peptyd anionowy 2 (AP2) są konstytutywnie obecne w hemolimfie *Galleria mellonella* i stanowią część pierwszej linii obrony w infekcjach spowodowanych przez różne mikroorganizmy. Lizozym *G. mellonella* wykazuje wysoką aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, co jest związane z jego dobrze udokumentowaną aktywnością muramidazową (Yu K. H., Kim K. N., Lee J. H., Lee H. S., Kim S. H., Cho K. Y., Nam M. H., Lee I. H., 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev Comp Immunol* 26: 707-713). Białko to przejawia ponadto aktywność nieenzymatyczną w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, *Escherichia coli* (Zdybicka-Barabas A., Mak P., Klys A., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiołka M. J., Cytryńska M., 2012. Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2623-2635). Dane literaturowe wskazują, że lizozym *G. mellonella* wykazuje również działanie przeciwgrzybowe wobec *Saccharomyces cerevisiae* (Vilcinskas A., Matha V., 1997. Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defence reactions in *Galleria mellonella*. *Anim Biol* 6: 19-29). Jednakże, w przeciwieństwie do dobrze poznanego sposobu działania lizozymu wobec bakterii,

mechanizm jego przeciwgrzybowej aktywności nie został dotąd w pełni wyjaśniony. AP2 *G. mellonella* wykazuje niską aktywność *in vitro* przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i grzybom z rodzaju *Pichia* (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). Ponadto, AP2 zwiększa aktywność nieenzymatyczną lizozymu przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, gdyż wzmacnia perforację błony bakteryjnej przez lizozym (Zdybicka-Barabas A., Mak P., Klys A., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiołka M. J., Cytryńska M., 2012. Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2623-2635). Można postulować, że te dwa czynniki odgrywają istotną rolę zarówno w odpowiedzi przeciwbakteryjnej, jak również przeciwgrzybowej *G. mellonella*.

Celem badań było określenie wpływu lizozymu i peptydu anionowego 2 *G. mellonella* na komórki *Candida albicans* oraz wyjaśnienie mechanizmu przeciwgrzybowego działania lizozymu *G. mellonella*, który – podobnie jak jego ludzki odpowiednik – należy do rodziny lizozymów typu c. *C. albicans* bytuje w ludzkim przewodzie pokarmowym i drogach rodnych kobiet jako część mikroflory fizjologicznej. Zwykle grzyb ten jest tolerowany przez organizm gospodarza, jednakże u osób z obniżoną odpornością może powodować infekcje nazywane kandydozami. W badaniach biologicznych coraz częściej stosowane są gąsienice *G. mellonella* jako organizmy modelowe do badania patogenezy i czynników wirulencji różnych bakterii i grzybów chorobotwórczych, w tym *C. albicans*.

Do określenia przeciwgrzybowego działania lizozymu i AP2 *G. mellonella* zastosowano metodę zliczania kolonii na płytkach z podłożem stałym. Zbadano także aktywność metaboliczną komórek *C. albicans* po inkubacji z tymi czynnikami, wykorzystując barwienie metodą LIVE/DEAD. Za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz elektronowej mikroskopii transmisyjnej (TEM) przeanalizowano zmiany topografii i nanomechaniczne właściwości powierzchni komórek *C. albicans* oraz zmiany ultrastruktury komórek grzybowych wywołane przez lizozym i AP2 *G. mellonella*. W dalszej części badań, przy użyciu lizozymu znakowanego FITC zobrazowano oddziaływanie lizozymu *G. mellonella* ze ścianą komórkową i błoną komórkową *C. albicans* oraz translokację lizozymu do wnętrza komórek. Przeprowadzono także badania aktywności beta-glukanazowej i chitynolitycznej lizozymu. Ponadto, wykorzystano dwa barwniki fluorescencyjne, Congo Red i Calcofluor White, mające powinowactwo, odpowiednio, do beta-glukanów i chityny, w celu obrazowania zmian zawartości tych składników w ścianie komórkowej *C. albicans* po inkubacji z lizozymem *G. mellonella*. Zbadano również możliwość indukcji apoptozy, jako

ewentualnego mechanizmu przeciwgrzybowego działania lizozymu *G. mellonella*, wykonując barwienie poddanych działaniu lizozymu komórek *C. albicans* za pomocą aneksyny V sprzężonej z FITC, a także barwników JC-1 i Hoechst. Przeprowadzono ponadto analizę wpływu jonów tetraetyloamoniowych (TEA), inhibitorów błonowych kanałów potasowych, na efektywność przeciwgrzybowego działania lizozymu *G. mellonella*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że lizozym *G. mellonella* w stosunkowo niskim stężeniu (0,5 μ M), odpowiadającym jego konstytutywnemu stężeniu w hemolimfie, skutecznie ogranicza przeżywalność *C. albicans*. AP2 również obniża przeżywalność komórek grzybów. Ponadto, aktywność metaboliczna komórek *C. albicans* spada pod wpływem lizozymu i AP2 *G. mellonella*, a morfologia, topografia i nanomechaniczne właściwości powierzchni komórek grzybów ulegają zmianie w zależności od zastosowanego czynnika. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że lizozym i AP2 stanowią istotne składniki pierwszej linii obrony przeciwgrzybowej *G. mellonella*. Dalsze badania dowiodły, że lizozym *G. mellonella* oddziałuje z powierzchnią komórek *C. albicans* i ulega translokacji do wnętrza komórek grzybów. Jednakże, lizozym *G. mellonella* nie przejawia aktywności enzymatycznej w stosunku do głównych składników ściany komórkowej *C. albicans* (β -glukan i chityna), więc jego przeciwgrzybowa aktywność opiera się najprawdopodobniej na mechanizmie innym niż enzymatyczny. Wykazano, że przeciwgrzybowe działanie lizozymu *G. mellonella* związane jest z zaburzeniem funkcjonowania kanałów potasowych w błonie komórkowej *C. albicans*. Ponadto, komórki *C. albicans* poddane działaniu lizozymu *G. mellonella* wykazują cechy komórek ulegających apoptozie: eksternalizację fosfatydyloseryny, zmiany aktywności mitochondriów oraz kondensację chromatyny i zmianę morfologii jąder komórkowych. Podsumowując, można stwierdzić, że aktywność przeciwgrzybowa lizozymu *G. mellonella* w stosunku do *C. albicans* związana jest z indukcją apoptozy.

Słowa kluczowe: lizozym, peptyd anionowy 2, *Galleria mellonella*, *Candida albicans*, apoptoza, mikroskopia sił atomowych, elektronowa mikroskopia transmisyjna