

MARIOLA ANDREJKO

UNIWERSYTET MARII CURIE - SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE

**AKTYWOWANIE I PRZEŁAMYWANIE HUMORALNEJ ODPOWIEDZI
IMMUNOLOGICZNEJ GĄSIENIC *GALLERIA MELLONELLA* PRZEZ ENZYMY
PROTEOLITYCZNE BAKTERII *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

AUTOREFERAT

LUBLIN 2013

dr Mariola Andrejko
 Zakład Immunobiologii
 Wydział Biologii i Biotechnologii
 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
 ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
mariola.andrejko@poczta.umcs.lublin.pl
 tel.: (081) 537-50-50, fax: (081) 537-50-50

AUTOREFERAT

1. IMIĘ I NAZWISKO

Mariola Andrejko

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

1985 r.	Dyplom magistra biologii specjalność biologia środowiskowa Praca magisterska pt.: „Badania porównawcze bakterii nematofilnych z rodzaju <i>Xenorhabdus</i> ” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) UMCS. Promotor: prof. dr hab. Jan Jarosz
1995 r.	Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii. Praca doktorska pt.: „Badania nad rolą egzoproteiny typu InA w patogenezie bakteryjnych chorób owadów” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) UMCS. Promotor: prof. dr hab. Jan Jarosz

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

1987-1995	Asystent w Zakładzie Patologii Owadów Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Od 01.01.1996 r.- obecnie	Adiunkt w Zakładzie Patologii Owadów (w 2001 r. zmieniony profil i nazwa zakładu na Zakład Immunologii Bezkręgowców a w 2012 r. zmiana nazwy na Zakład Immunobiologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ

Studia rozpoczęłam w 1980 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Na podstawie pracy magisterskiej p.t.: „Badania porównawcze bakterii nematofilnych z rodzaju *Xenorhabdus*” wykonanej w Zakładzie Patologii Owadów pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Jarosza w 1985 roku uzyskałam tytuł magistra biologii specjalność biologia środowiskowa. Głównym celem badawczym pracy magisterskiej była charakterystyka drobnoustrojów z rodzaju *Xenorhabdus*, mutualistycznie związanych z nicieniami owadobójczymi *Steinernema carpocapsae* i *Heterorhabditis bacteriophora*. W pracy wykazałam, że istnieją różnice we wrażliwości na sulfonamidy pomiędzy szczepami *X. nematophilus* (symbiont *S. carpocapsae*) bezpośrednio wyizolowanymi z zakażonych gąsienic a tymi samymi szczepami pasażowanymi na agarze odżywczym i inkubowanymi w temperaturze pokojowej. Prawdopodobnie było to związane ze zmianą środowiska rozwoju symbionta i z dymorfizmem – konwersją formy pierwotnej *Xenorhabdus* do formy wtórnej na sztucznym podłożu odżywczym. Obserwacja ta może być wykorzystana praktycznie jako prosty i wygodny test do odróżniania tych form bakterii na potrzeby praktyki masowej produkcji larw inwazyjnych nicienia na podłożach sztucznych.

Po ukończeniu studiów, przez dwa lata pracowałam w Wojewódzkiej Bibliotece Publicznej im H. Łopacińskiego w Lublinie. W styczniu 1987 roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta w Zakładzie Patologii Owadów kierowanym przez prof. dr hab. Jana Jarosza, wróciłam więc do Jednostki, w której wykonałam i obroniłam pracę magisterską. Zakład Patologii Owadów był jedną z pierwszych w Polsce jednostek zajmujących się odpornością przeciwzakaźną owadów. Jego powstanie wiązało się z dużym zainteresowaniem patologią owadów, wynikającym z faktu, że biologiczne zwalczanie owadzich szkodników stanowiło (i stanowi do dziś) dynamicznie rozwijający się kierunek ochrony środowiska.

W pierwszych latach pracy naukowej włączyłam się w większość tematów i zagadnień, realizowanych w Zakładzie. Kontynuowałam, między innymi, doświadczenia dotyczące wykorzystania nicieni owadobójczych, z którymi zetknęłam się po raz pierwszy przy wykonywaniu pracy magisterskiej, do zwalczania szkodników roślinnych w warunkach polowych. Celem tych eksperymentów było określenie wrażliwości larw obnażacza kwaśnicówki *Arge berberidis* (Hymenoptera: Argidae), jednego z najbardziej szkodliwych owadów dla berberysów, na nicienie owadobójcze *Steinernema feltiae* i *S. bibionis* oraz *H. bacteriophora*. Stwierdziłam, że w warunkach laboratoryjnych larwy badanych owadów

były wysoce wrażliwe na zarażenie, szczególnie nicieniami z rodzaju *Steinernema* (zabijały 100% owadów w ciągu 3 dni). Niższa śmiertelność w warunkach polowych (ponad 50%) była wyraźnie uzależniona od czynników środowiska, szczególnie wilgotności i temperatury. Wyniki tych eksperymentów zostały przedstawione w formie komunikatu na XVIII Międzynarodowym Kongresie Entomologicznym, który odbył się w Vancouver w Kanadzie w 1988 roku oraz w publikacji w Polskim Piśmie Entomologicznym (1993).

Współuczestniczyłam w badaniach dotyczących immunomodulacji odpowiedzi odpornościowej u owadów o przeobrażeniu zupełnym, realizowanych w Zakładzie w latach 1991-1994 w ramach grantu KBN pt.: „Sterowanie układem obronnym owadów,” w którym byłam wykonawcą. Wyniki tych eksperymentów zostały zaprezentowane m.in. na V Sympozjum Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN w 1996 roku w Krakowie.

Po kilku latach pracy, moje zainteresowania naukowe skupiły się wokół zagadnień dotyczących czynników wirulencji, określanych jako inhibitory immunologiczne typu A (InA), które hamowały aktywność skierowaną przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, w hemolimfie owadów. Badania miały na celu wyjaśnienie czy te czynniki mające charakter enzymów proteolitycznych uwalniane w porażonym owadzie stanowią ważne ogniwo w patogenezie bakteryjnych chorób owadów. Po raz pierwszy obecność takiego inhibitora immunologicznego wykazano u bakterii *Bacillus thuringiensis*, która znalazła szerokie zastosowanie w produkcji mikrobiologicznych pestycydów owadobójczych oraz u nicieni entomopatogennych *S. carpocapsae*. W tych badaniach jako organizmy modelowe stosowałam gąsienice i poczwarki dwu gatunków owadów – barciaka większego (*Galleria mellonella*) oraz bielinka kapustnika (*Pieris brassicae*). Do hamowania odpowiedzi immunologicznej stosowałam homogenaty zawierające czynniki wirulencji wytwarzane w zakażonym owadzie przez entomopatogenne bakterie tj.: *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* oraz entomopatogenne nicienie tj.: *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora*. Wykazałam, że po zakażeniu bakterią saprofityczną *Enterobacter cloacae*, w hemolimfie owadów znacznie wzrastała aktywność lizozymu oraz pojawiała się aktywność bakteriobójcza skierowana przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. U zakażonych poczwerek *G. mellonella* aktywność przeciwbakteryjna uwarunkowana była obecnością peptydów migrujących w żelu poliakrylamidowym w obszarze migracji cekropiny A, natomiast w hemolimfie poczwerek bielinka w obszarze migracji attacyn z *Hyalophora cecropia*. Bakteryjne patogeny owadów oraz entomopatogenne nicienie uwalniały w zakażonym owadzie zewnątrzkomórkowe proteazy, a ich aktywność wzrastała wraz z

postępującą bakteriami. Homogenaty z gąsienic porażonych entomopatogenami okazały się toksyczne dla gąsienic i poczwarek barciaka większego a ich toksyczność była w dużym stopniu skorelowana z aktywnością proteolityczną w zakażonych gąsienicach *G. mellonella*. Natomiast owady, którym inokulowałam homogenaty pozbawione aktywności proteolitycznej z gąsienic zabitych masowymi dawkami bakterii saprofitycznych, nie wykazywały żadnych objawów zatrucia. Przy zastosowaniu systemu *in vitro*, złożonego z hemolimfy owadów modelowych (zakażonych bakterią *E. coli*) i homogenatu zawierającego enzymy proteolityczne uwalniane w gąsienicach *Galleria* zakażonych entomopatogenami, udowodniłam efektywne blokowanie aktywności bakteriobójczej w hemolimfie. Przy czym, zdolność do selektywnego niszczenia tej aktywności w hemolimfie owadów skorelowana była w dużym stopniu z aktywnością proteolityczną. Szczególnie wysoką aktywnością inhibitorową w stosunku do cekropin *G. mellonella* i attacyn *P. brassicae* cechowały się proteazy uwalniane przez *P. aeruginosa* i *H. bacteriophora*. Oceniałam również wpływ homogenatów zawierających enzymy proteolityczne produkowane przez entomopatogeny na aktywność bakteriobójczą lizozymu owadów, w warunkach *in vitro*. Działanie to okazało się słabsze w porównaniu do obserwowanego w stosunku do polipeptydów odpornościowych. Dane te przemawiają za względnie selektywnym działaniem zewnątrzkomórkowych proteaz na substancje efektorowe odporności przeciwzakaźnej, warunkujące aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy owadów. Proteazy produkowane przez bakteryjne patogeny owadów i nicienie entomofilne, umożliwiają kolonizację i rozwój bakterii w zakażonym owadzie, należy je zatem uznać za jeden z ważnych czynników warunkujących zjadliwość entomopatogenów. Wyniki te stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Badania nad rolą egzoproteiny typu InA w patogenezie bakteryjnych chorób owadów,” której obrona odbyła się w 1995 roku. Praca, na wniosek recenzentów została wyróżniona Nagrodą JM Rektora UMCS. Najbardziej wartościowe wyniki tych eksperymentów zostały opublikowane w czasopismach *Entomonematologia* (1993) i *Folia biologica* (1999) oraz przedstawione jako doniesienie na międzynarodowym zjeździe (Second International Symposium on Molecular Insect Science) w Flagstaff w Stanach Zjednoczonych w 1993 roku.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki [Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami jak w Dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455])

4a. TYTUŁ

Osiągnięciem naukowym jest monotematyczny cykl publikacji naukowych przedstawiony pod tytułem:

AKTYWOWANIE I PRZEŁAMYWANIE HUMORALNEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ GAŚIENIC *GALLERIA MELLONELLA* PRZEZ ENZYMY PROTEOLITYCZNE BAKTERII *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4b. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

(8 oryginalnych prac eksperymentalnych)

1. **Andrejko Mariola**, Cytryńska Małgorzata, Jakubowicz Teresa,[#] Apolipoprotein III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters 243, 331-337, 2005. (IF - 2,057; 15 pkt)
2. **Andrejko Mariola**,[#] Mizerska-Dudka Magdalena, Jakubowicz Teresa, Changes in *Galleria mellonella* apolipoprotein III level during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Journal of Invertebrate Pathology 97, 14-19, 2008. (IF – 2,005; 24 pkt)
3. **Andrejko Mariola**,[#] Mizerska-Dudka Magdalena, Jakubowicz Teresa, Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Folia Microbiologica 53, 147-151, 2008. (IF – 1,172; 15 pkt)
4. **Andrejko Mariola**,[#] Mizerska-Dudka Magdalena, Jakubowicz Teresa, Antibacterial activity *in vivo* and *in vitro* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 152, 118-123, 2009. (IF – 1,607; 20 pkt)
5. **Andrejko Mariola**,[#] Mizerska-Dudka Magdalena, Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Invertebrate Pathology, 107, 16-26, 2011. (IF – 2,064; 32 pkt)
6. **Andrejko Mariola**,[#] Zdybicka-Barabas Agnieszka, Janczarek Monika, Cytryńska Małgorzata, Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. Acta Biochimica Polonica, 60, 83-90, 2013. (IF - 1,185; 15 pkt)

7. **Andrejko Mariola,[#]** Zdybicka-Barabas Agnieszka, Wawrzoszek Maria, Cytryńska Małgorzata, Diverse susceptibility of *Galleria mellonella* humoral immune response factors to the exoproteinase activity of entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Zoological Science, 30 (5), 345-351, 2013. **(IF – 1,076; 25 pkt)**
8. **Andrejko Mariola,[#]** Zdybicka-Barabas Agnieszka, Cytryńska Małgorzata, Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Invertebrate Pathology, 2013, DOI: 10.1016/j.jip.2013.10.006 **(IF – 2,669; 40 pkt)**

([#] autor korespondencyjny)

Sumaryczny *impact factor* - IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **13,835**
Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: **186 pkt**

4c. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Aktywowanie i przełamywanie humoralnej odpowiedzi immunologicznej gąsienic *Galleria mellonella* przez enzymy proteolityczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

1. Wstęp

Bakteria *Pseudomonas aeruginosa* jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Naturalnym miejscem występowania tej bakterii są gleba, woda, ścieki, powietrze, powierzchnia roślin, organizmy ludzi i zwierząt. Jest groźnym oportunistycznym patogenem człowieka. U ludzi z upośledzoną odpornością, wywołuje zakażenia układu oddechowego (zwłaszcza u osób z mukowiscydozą), zakażenia ran, układu moczowego, kości, stawów, skóry oraz zapalenie rogówki. Małe wymagania odżywcze, różnorodne mechanizmy oporności na antybiotyki, niewrażliwość na stosowane powszechnie środki dezynfekcyjne, łatwość rozprzestrzeniania się w środowisku wodnym sprawiają, że bakteria *P. aeruginosa* należy do najpowszechniejszych i najgroźniejszych czynników etiologicznych wielu postaci zakażeń szpitalnych. Warunkiem efektywnego leczenia infekcji spowodowanych pałeczką *Pseudomonas* jest dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za chorobotwórczość tej bakterii.

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* charakteryzują się szeregiem mechanizmów i czynników warunkujących zjadliwość tego organizmu. Czynniki te można podzielić na związane ze ścianą komórkową, sekrecyjne, związane z systemem sekrecji typu III oraz mechanizmem „wyczuwania zagęszczenia” – *quorum sensing* (Kipnis i in. 2006). Do czynników warunkujących zjadliwość szczepów *P. aeruginosa* zaliczamy również enzymy proteolityczne. Warunkują one przede wszystkim inwazyjność i rozprzestrzenianie się patogenu (degradacja tkanek, liza komórek), modulację mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza (degradacja czynników immunologicznych, aktywacja cytotoksycznych mediatorów gospodarza) a także aktywację toksyn bakteryjnych (Armstrong 2006). Pałeczki *Pseudomonas* wytwarzają co najmniej cztery proteazy zewnątrzkomórkowe, tj.: elastazę B (LasB), elastazę A (LasA), serynową proteazę IV oraz alkaliczną proteazę (Caballero i in. 2001).

U ludzi elastaza B jest ważnym czynnikiem wirulencji w infekcjach układu oddechowego, zakażeniach rogówki, tkanki łącznej i skóry po oparzeniach (Myioshi i Shinoda 2000). Związane jest to m.in. z degradacją elastyny i kolagenu typu IV (Schmidtchen i in. 2003). Uszkodzenie tkanek gospodarza może odbywać się również w wyniku aktywacji tkankowych metaloproteaz (MMP's) przez LasB (Matsumoto i in. 1992). Obserwowano ponadto udział tej proteazy w modulacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez degradację m.in. immunoglobulin IgA i IgG, białek surfaktantu SP-A i SP-D, elementów układu dopełniacza (C5a i C3) oraz peptydów antybakteryjnych (α -defensyn i LL-37) (Mariencheck i in. 2003; Schmidtchen i in. 2002; Schulz i Miller 1974). LasB bierze udział w hamowaniu proliferacji limfocytów poprzez degradację interleukiny 2 (IL-2) (Theander i in. 1988).

Należąca do metaloproteaz elastaza A (LasA), degraduje elastynę, zwiększa aktywność elastolityczną elastazy B poprzez modyfikację substratu, dzięki czemu jest zaangażowana w rozwój infekcji rogówki i chronicznych infekcji układu oddechowego (Peters i Galloway 1990).

Serynowa proteaza IV o masie cząsteczkowej 26 kDa jest aktywna wobec składników układu dopełniacza C3 i C1, immunoglobuliny IgG, plazminogenu, fibrynogenu. Enzym ten degradowuje również komórki nabłonkowe rogówki, przez co stanowi ważny czynnik etiologiczny zakażeń rogówki (Engel i in 1998).

Alkaliczna proteaza (AP) odgrywa istotną rolę w rozwoju zapalenia rogówki, bakteriemii, infekcji ucha środkowego, zakażeń układu oddechowego u chorych na mukowiscydozę. AP degradowuje składniki układu dopełniacza C1q i C3, fibrynogen, fibrynę,

lamininę, jak również interferon (INF- γ) i czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) (Caballero i in. 2001).

Poznanie mechanizmów patogenezы *P. aeruginosa* jest niezbędne do opracowania skutecznych metod walki z tym groźnym ludzkim patogenem. Moje badania naukowe dotyczą mechanizmów działania oraz roli enzymów proteolitycznych w procesie patogenezы *P. aeruginosa*. Jako organizm modelowy w doświadczeniach stosowałam gąsienice barciaka większego *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Owad ten jest dość powszechnie wykorzystywany jako organizm modelowy w badaniach nad patogennością i czynnikami wirulencji drobnoustrojów, w tym także drobnoustrojów patogennych dla człowieka m.in. *P. aeruginosa* (Miyata i in. 2003), *Francisella tularensis* (Aperis i in. 2007), *Staphylococcus aureus* (Garcia-Lara i in. 2005), *Listeria monocytogenes* (Mukherjee i in. 2010) i *Legionella pneumophila* (Harding i in. 2012). Ponadto, w ostatnich latach stwierdzono, że wrodzony układ odporności owadów i ssaków wykazuje wysoki stopień strukturalnej i funkcjonalnej homologii, dlatego też analiza mechanizmów odpowiedzi immunologicznej owada na patogeny może dostarczyć istotnych informacji dotyczących funkcjonowania układu odpornościowego ssaków (Kavanagh i Reeves 2004).

Gąsienice barciaka są bardzo wrażliwe na zakażenie bakterią *P. aeruginosa* (LD₅₀ wynosi 10 - 20 komórek). Podczas zakażenia owada bakteria wykorzystuje prawdopodobnie te same czynniki wirulencji, co w przypadku infekcji u człowieka. Wyjaśnienie fizjologicznych aspektów interakcji gospodarz-patogen (*G. mellonella* - *P. aeruginosa*) a także procesów składających się na wrodzoną odpowiedź immunologiczną owada może przyczynić się do odkrycia nowych skutecznych metod zwalczania szkodników. Natomiast dokładne poznanie mechanizmów działania enzymów proteolitycznych *P. aeruginosa*, jest ważne ze względu na opracowanie skutecznych sposobów unieszkodliwienia tego groźnego patogena.

Moje wieloletnie obserwacje wskazywały, że zakażenie gąsienic *G. mellonella* entomopatogennym szczepem *P. aeruginosa* powodowało śmierć osobników po 38-40 godzinach od infekcji. Po śmierci gąsienice były silnie zmelanizowane, traciły turgor oraz niekiedy integralność. Stwierdziłam również destrukcję tkanek i organów wewnętrznych. Ponieważ entomopatogenny szczep *Pseudomonas* należy do bakterii wytwarzających barwnik - piocyjaninę, owady przybierały charakterystyczne niebieskozielone zabarwienie. Gąsienice przeżywały natomiast iniekcje bardzo dużych dawek (nawet 6×10^8) saprofitycznej bakterii *E. coli*.

Kolejnym krokiem było porównanie aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu entomopatogennym szczepem *P. aeruginosa* lub bakterią saprofityczną *E. coli*. Zaobserwowałam wyraźne różnice w kinetyce pojawiania się i zanikania aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów. Po zakażeniu gąsienic bakterią *E. coli* aktywność pojawiała się już po 5 godzinach, natomiast po iniekcji bakterii *P. aeruginosa* aktywność przeciwbakteryjna była wykrywana dopiero po 9 godzinach zakażenia. Maksymalną aktywność w przypadku entomopatogena obserwowałam po 18 godzinach, po czym następował drastyczny spadek aktywności, aż do całkowitego jej zaniku po około 38 godzinach od zakażenia. W przypadku bakterii *E. coli* najwyższą aktywność stwierdziłam po 30 godzinach i po tym czasie utrzymywała się na podobnym poziomie w kolejnych godzinach po infekcji (Fig. 1).

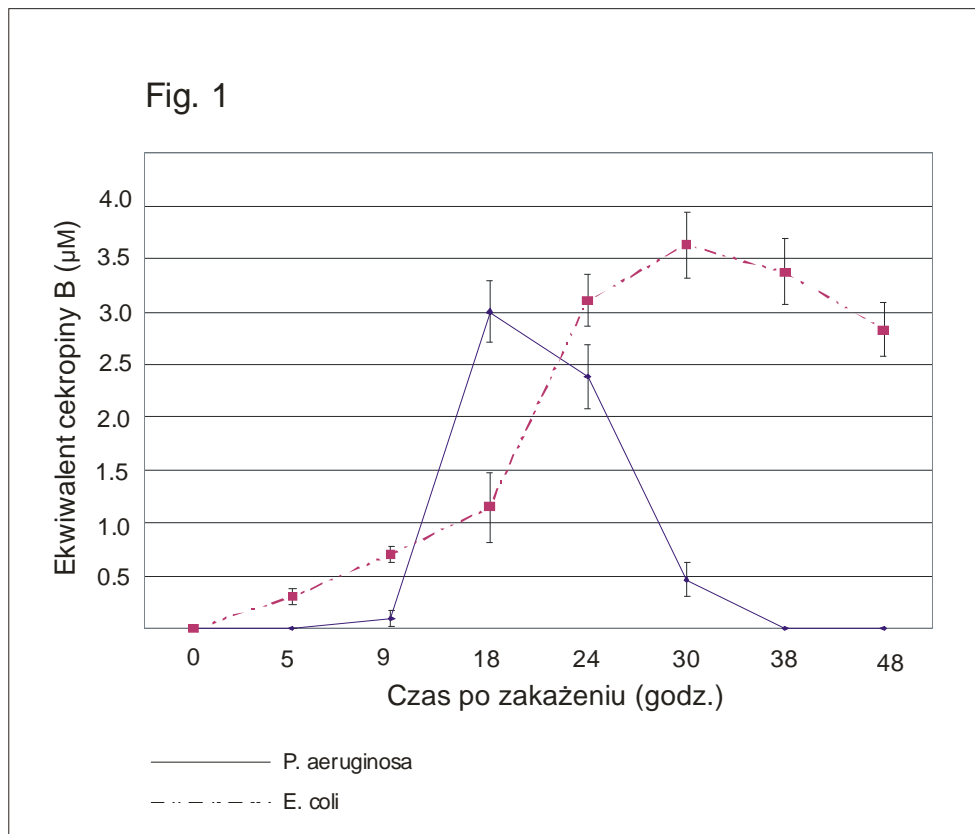


Figura 1. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu entomopatogennym szczepem ATCC 27853 *P. aeruginosa* lub bakterią saprofityczną *E. coli*. Aktywność przeciwbakteryjną oznaczano metodą dyfuzji radialnej w podłożu agarowym zawierającym bakterię wskaźnikową *E. coli* D31. Hemolimfa była zbierana po czasie od podania komórek bakterii wskazanym na wykresie. Średnia \pm SD.

Ponadto zaobserwowałam, że aktywność proteolityczna w hemolimfie znacznie wzrastała w miarę rozwoju bakteriemii *P. aeruginosa*, co wskazywało na uwalnianie przez bakterię enzymów proteolitycznych podczas zakażenia. Na podstawie tych obserwacji wywnioskowałam, że w ciągu pierwszych godzin zakażenia owadów bakterią *P. aeruginosa*, podobnie jak w przypadku *E. coli*, następuje aktywacja reakcji obronnych gospodarza.

Następnie w miarę rozwoju infekcji, dochodzi do przełamania tych reakcji i ten etap jest charakterystyczny tylko dla zakażenia bakterią entomopatogenną. Pojawiło się w takim razie pytanie, jaką rolę w aktywowaniu jak i przełamaniu reakcji obronnych owada odgrywają enzymy proteolityczne, których poziom wyraźnie ulegał zwiększeniu w czasie trwania infekcji.

Te rozważania skłoniły mnie do przeprowadzenia eksperymentów, w których wykazałam, że bakteria *Pseudomonas* uwalnia enzymy proteolityczne również w podłożu hodowlanym. Założyłam, że w warunkach *in vitro* bakteria wytwarza podobny zestaw enzymów proteolitycznych jak w zakażonym owadzie. Tym bardziej, że gąsienice *G. mellonella* po iniekcji płynu pochodzącego wykazywały symptomy typowe dla infekcji bakterią *P. aeruginosa*. Ponadto stwierdziłam, że ta sama bakteria hodowana w różnych pożywkach wytwarza inny zestaw enzymów, co wykorzystałam jako metodę wstępnego oczyszczania proteaz, uzyskując w niektórych przypadkach nawet pojedyncze enzymy. Dlatego też płyn pochodzący (supernatant) zawierający zewnątrzkomórkowe proteazy, mogłam z powodzeniem stosować w dalszych badaniach jako wygodny materiał do analizowania roli oraz poznania mechanizmów działania poszczególnych enzymów proteolitycznych *P. aeruginosa* w procesie patogenezy.

2. Profil zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych *Pseudomonas aeruginosa*

W celu dokonania szczegółowej analizy porównawczej wpływu enzymów proteolitycznych bakterii *P. aeruginosa* na układ odpornościowy *G. mellonella* w badaniach zastosowano trzy szczepy bakteryjne różniące się profilem wytwarzanych proteaz tj.: entomopatogeny ATCC 27853 oraz kliniczne PA9 i PA18. Szczepy kliniczne *P. aeruginosa* PAC124/9 (nazywany dalej PA9) oraz PA02/18 (nazywany dalej PA18) otrzymałam dzięki uprzejmości Prof. M. Trafny z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie.

W pierwszym etapie badań określony został profil enzymów proteolitycznych szczepów *P. aeruginosa*. W tym celu, bakterie hodowano w dwu różniących się składem podłożach: bulionowym (LB) oraz minimalnym (syntetycznym M9). Enzymy proteolityczne

zidentyfikowano przy użyciu testów biochemicznych z wykorzystaniem specyficznych substratów (elastin Congo red - elastaza B; aktywność wobec *Staphylococcus aureus* – elastaza A; Chromozym PL – proteaza IV; Hide powder azure – alkaliczna proteaza) oraz dodatkowo za pomocą zymografii po uprzednim rozdziale elektroforetycznym (żele separujące zawierały żelatynę lub kazeinę jako substraty).

Wytrawiony w żelu z kazeiną/żelatyną prążek o masie powyżej 200 kDa, odpowiada proteazie IV (Caballero i in. 2001; **Andrejko i in. 2013a**). Przejąszenie na wysokości około 160 kDa oraz aktywność stafilolityczna świadczą o obecności w supernatancie elastazy A (Caballero i in. 2001; **Andrejko i in. 2013a**). Elastaza B migruje w żelu tworząc prążek o masie cząsteczkowej 160 kDa (w przypadku szczepu entomopatogenicznego i klinicznego PA18) oraz o masie 120 kDa (w przypadku szczepu klinicznego PA9) (**Andrejko i in. 2013a**). Inni autorzy również obserwowali obecność dwu prążków odpowiadających elastazie B o masie cząsteczkowej 116 kDa lub 163 kDa (Engel i in. 1997; Stępińska i in. 2010). Alkaliczna proteaza wytwarzana przez wszystkie badane szczepy *P. aeruginosa* w podłożu M9, migruje w żelu jako prążek o masie cząsteczkowej 52-53 kDa (Engel i in. 1997; **Andrejko i in. 2013a**). Uzyskane wyniki zostały potwierdzone przy użyciu oczyszczonych enzymów (proteaza IV, elastaza B), które uzyskałam z płynu pochodzącego bakterii entomopatogenicznej metodą chromatografii jonowymiennej (**Andrejko i in. 2005; 2008b**). Ostatnio udało mi się również otrzymać oczyszczoną alkaliczną proteazę dwu szczepów *P. aeruginosa* (entomopatogenicznego i klinicznego PA18) metodą chromatografii jonowymiennej z hodowli bakteryjnej na podłożu M9 (dane niepublikowane).

Rezultaty badań wyraźnie wskazują, że profil enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez dany szczep *P. aeruginosa* zależy od składu podłoża, w którym prowadzi się hodowlę bakterii (**Andrejko i in. 2013a**). Szczep entomopatogeniczny wytwarzał w podłożu bulionowym (LB) trzy proteazy: proteazę IV, elastazę B i elastazę A, natomiast w podłożu minimalnym (M9) – tylko proteazę alkaliczną. Szczepy kliniczne produkowały dwa enzymy proteolityczne: elastazę B (w LB) oraz proteazę alkaliczną (w M9) a ich ekspresja była wyraźnie uwarunkowana składem podłoża. Analiza PCR (polymerase chain reaction) potwierdziła obecność genu *lasB* kodującego elastazę B oraz genu *aprA* kodującego alkaliczną proteazę w genomach wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa* (**Andrejko i in. 2013a**).

Inni autorzy również wykazali, że kliniczne izolaty *P. aeruginosa* różnią się ekspresją elastazy B i alkalicznej proteazy (Woods i in. 1986; Schmidtchen i in. 2001). Ponadto, odmienne czynniki wirulencji są wytwarzane w zależności od miejsca czy też czasu trwania

infekcji (Rumbaugh i in. 1999). Ekspresja wielu czynników zjadliwości, tj. elastaza B (*lasB*), elastaza A (*lasA*), proteaza alkaliczna (*aprA*) jest regulowana przez systemy *quorum sensing* (QS). Komórki *P. aeruginosa* dysponują dwoma systemami *quorum sensing* homologicznymi do LuxR1: system *las* obejmujący białka LasR i LasI i system *rhl* obejmujący białka RhlR i RhlI (Winzer i Williams 2001). Duan i Surette (2007) wykazali, że poziom ekspresji składników systemu QS był zależny od warunków wzrostu, wpływając tym samym na ekspresję czynników zjadliwości regulowanych przez ten system np. ekspresja genu *aprA* w podłożu M9 zaczynała się już w fazie logarytmicznej podczas gdy w bogatym podłożu LB we wczesnej fazie stacjonarnej.

3. Toksyczność płynów pohodowlanych *Pseudomonas aeruginosa* dla gąsienic *Galleria mellonella*

Toksyczność płynów pohodowlanych zawierających zewnątrzkomórkowe proteazy *P. aeruginosa* uzależniona była od rodzaju podłoża. Wartości dawek LD₅₀ płynów pohodowlanych pochodzących z podłoża M9, okazały się 50-krotnie (ATCC), 22-krotnie (PA18) oraz 32-krotnie (PA9) mniejsze w porównaniu do dawek LD₅₀ płynów pohodowlanych pochodzących z LB. Należy zwrócić uwagę, że znacznie bardziej toksyczne okazały się supernatanty zawierające alkaliczną proteazę, w porównaniu do tych zawierających głównie elastazę B, co może wskazywać na istotną rolę alkalicznej proteazy w przełamaniu mechanizmów obronnych owada (Andrejko i in. 2013a). Nie można jednak wykluczyć obecności innych czynników w płynie pohodowlanym, które mogą dodatkowo zwiększać toksyczność tych preparatów. Na przykład, Miyata i in. (2003) podkreślają znaczącą rolę ADP-rybozylotransferazy (ExoT) i fosfolipazy (ExoU) *P. aeruginosa* w zabijaniu gąsienic *G. mellonella*.

Należy podkreślić, że wytwarzanie elastazy B oraz alkalicznej proteazy zarówno przez entomopatogeny jak i kliniczne szczepy *P. aeruginosa* potwierdzono w warunkach *in vivo*, w homogenatach otrzymanych z zakażonych gąsienic *G. mellonella*, co wyraźnie sugeruje, że te dwa czynniki wirulencji pełnią istotną rolę podczas infekcji bakterią *P. aeruginosa* (Andrejko i in. 2013c).

4. Wpływ proteaz *Pseudomonas aeruginosa* na reakcje immunologiczne *Galleria mellonella*

W kolejnej serii eksperymentów przeprowadzonych w warunkach *in vivo* wykazano, że badane szczepy *P. aeruginosa*, charakteryzujące się odmiennym profilem enzymów

proteolitycznych, wywołują zróżnicowaną reakcję układu odpornościowego *G. mellonella* w odpowiedzi na infekcję tymi bakteriami. Końcowy efekt zakażenia w każdym przypadku był jednakowy, bakterie powodowały śmierć owada po około 38-40 godzinach od iniekcji, jednak zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu odpowiedzi immunologicznej, zależne od użytego szczepu *P. aeruginosa* oraz od składu podłoża (LB lub M9), w którym bakterie były hodowane (**Andrejko i in. 2013c**).

Owady wykształciły bardzo sprawnie działający układ odpornościowy, zapewniający wysoką skuteczność obrony przeciwzakaźnej, składający się z zewnętrznych barier ochronnych, do których należą bariery fizykochemiczne i odporność behawioralna, oraz z wewnętrznych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej (odpowieź komórkowa i humoralna) (Gliński i Jarosz, 1997). Oparta na nieswoistej odpowiedzi immunologicznej reakcja owada na zakażenie patogenem, wykazuje wiele elementów wspólnych z występującą u człowieka. U kręgowców możemy wyróżnić dwa typy odporności: wrodzoną oraz nabytą, podczas gdy bezkręgowce jako filogenetycznie starsze dysponują tylko dobrze rozwiniętym systemem odporności wrodzonej, nie wytwarzają przeciwciał jak również komórek o charakterze limfocytów. Jednakże przeprowadzone w ostatnich latach badania sugerują możliwość specyficznego rozpoznawania patogenów oraz funkcjonowanie mechanizmów pamięci immunologicznej u owadów i innych bezkręgowców, co może świadczyć o istnieniu alternatywnych mechanizmów nabytej odporności (Cytryńska 2009). Odpowiedź humoralna u owadów indukowana jest w wyniku zranienia lub zakażenia organizmu. Obejmuje głównie działanie składników rozpuszczonych w hemolimfie, do których zalicza się między innymi, 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.

4.1. Układ oksydazy fenolowej

Aktywacja układu oksydazy fenolowej jest jedną z najszybszych reakcji immunologicznych organizmu owada. W układ zaangażowana jest oksydaza fenolowa typu lakazy, która bierze udział w procesach ciemnienia i twardnienia oskórka oraz gojenia ran, oraz oksydaza fenolowa typu tyrozynazy (fenolaza), która uczestniczy w rozpoznawaniu ciał obcych, tworzeniu toksycznych chinonów oraz zmelanizowanych otoczek w trakcie inkapsulacji. Wpływ patogenów na układ oksydazy fenolowej owada może przybierać różne formy. U gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych nicieniem *Steinernema feltiae* obserwowano zmniejszenie aktywności układu profenolooksydazy (proPo) (Brivio i in. 2002). Natomiast

owadobójcze białka produkowane przez Gram-ujemne bakterie *Xenorhabdus* spp., symbionta entomopatogennych nicieni, aktywowały układ proPO prowadząc do intensywnego tworzenia melaniny i w konsekwencji do śmierci owadów (Yang i in. 2012).

U gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych badanymi szczepami bakterii *P. aeruginosa* pojawiały się brunatne plamy na powierzchni ciała świadczące o aktywacji układu fenolooksydazy, która prowadziła do całkowitej melanizacji ciała w momencie śmierci. Poziom jak i kinetyka zmian aktywności układu profenolooksydazy wyraźnie zależały od użytego do infekcji szczepu bakteryjnego (**Andrejko i in. 2013c**). W przypadku bakterii hodowanych w podłożu M9 oraz szczepu entomopatogennego pochodzącego z LB, notowano wzrost poziomu aktywności enzymu po pierwszych 6 godzinach od zakażenia. Następnie, we wszystkich próbach, wraz z rozwojem bakteriemii w hemolimfie notowano stopniowy spadek aktywności oksydazy fenolowej (**Andrejko i in. 2013c**).

Wiadomo, że warunki środowiskowe regulują ekspresję wielu czynników zjadliwości, dzięki czemu bakteria szybko adaptuje się do zmian otoczenia np. wytwarzanie przez bakterię egzotoksyny A, elastazy B i alkalicznej proteazy jest uzależnione od obecności żelaza (Shigematsu i in. 2001). Zastosowanie do hodowli bakterii podłoży znacznie różniących się składem (bogate - LB lub minimalne - M9) mogło wywołać zmiany składników powierzchniowych komórki, włącznie z czynnikami wirulencji, co z kolei mogło utrudnić prawidłowe rozpoznanie bakterii przez układ odpornościowy *G. mellonella* oraz spowodować odmienną reakcję układu profenylooksydazy.

Rozpoznanie ciał obcych w zainfekowanym organizmie jest istotnym elementem odpowiedzi immunologicznej. U owadów w rozpoznanie immunologiczne zaangażowane są receptory PRR (pattern recognition receptors) układu obronnego gospodarza. Receptory rozpoznają powierzchniowe determinanty o określonej strukturze molekularnej (PAMPs, pathogen associated molecular patterns) zlokalizowane w ścianach komórkowych mikroorganizmów. Te charakterystyczne dla mikroorganizmów struktury nie występują w komórkach gospodarza i dzięki temu możliwe jest odróżnienie obcych elementów struktury (non self) od własnych (self).

Na podstawie otrzymanych rezultatów można przypuszczać, że wpływ na aktywność systemu proPO jest jedną ze strategii stosowanych przez bakterię *P. aeruginosa* do przełamania odpowiedzi immunologicznej zainfekowanych owadów (**Andrejko i in. 2013c**). Aktywacja proPO następuje w rezultacie uruchomienia kaskady enzymów proteolitycznych, określanej jako układ oksydazy fenolowej lub system profenolooksydazy. Układ oksydazy fenolowej jest zespołem reakcji biochemicznych zależnych od jonów Ca^{+2} , w które

zaangażowane są przynajmniej dwie proteazy serynowe. Końcową reakcją systemu proPO jest konwersja profenoloksydazy do formy aktywnej drogą ograniczonej proteolizy.

4.2. Lizozym

Innym składnikiem hemolimfy owada, którego poziom i aktywność wzrasta podczas zakażenia bakteryjnego jest lizozym (muramidaza lub glikohydrolaza mukopeptydowa, EC 3.2.1.17). Enzym wykazuje aktywność bakteriolityczną - degraduje peptydoglikan, budujący ścianę komórkową bakterii poprzez hydrolizę wiązania β -1,4-glikozydowego. Lizozym wywiera działanie w stosunku do żywych i martwych bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak i niektórych Gram-ujemnych oraz grzybów (Hultmark 1996; Vilcinskas i Matha 1997). U *G. mellonella* jest białkiem odpornościowym konstytutywnie obecnym w hemolimfie na niskim poziomie a jego aktywność wzrasta gwałtownie po zakażeniu i immunizacji (Yu i in. 2002). Stwierdzono, że lizozym owadów wykazuje synergistyczne działanie z peptydami przeciwbakteryjnymi i apolipoforyną III, obecnymi w hemolimfie *G. mellonella*. Aktywność muramidazowa lizozymu ułatwia dostęp peptydów antybakteryjnych do błony komórkowej komórek bakteryjnych (Zdybicka-Barabas i in. 2012, 2013).

Podczas zakażenia gąsienic *G. mellonella* bakterią *P. aeruginosa* zmiany poziomu aktywności lizozymu w hemolimfie były zależne od użytego do zakażenia szczepu oraz od stosowanej do hodowli drobnoustrojów pożywki (Andrejko i in. 2013c). Iniekcja owadom bakterii pochodzących z LB, spowodowała początkowo wyraźny spadek, a po 12 godzinach od infekcji wzrost aktywności lizozymu (nawet 2-krotny w porównaniu do aktywności w hemolimfie owadów niezakażonych). W przypadku szczepów pochodzących z podłoża minimalnego, zwiększoną aktywność bakteriolityczną w porównaniu z poziomem kontrolnym, obserwowano jedynie po około 18 godzinach od infekcji szczepem klinicznym PA9 (Andrejko i in. 2013c). Spadek aktywności lizozymu w pierwszych godzinach od zakażenia może być spowodowany mobilizacją układu immunologicznego, a tym samym zaangażowaniem lizozymu w różne mechanizmy przeciwzakaźne.

Wzrost aktywności lizozymu był skorelowany ze wzrostem jego poziomu, co wykazano w hemolimfie gąsienic zakażonych szczepem entomopatogennym ATCC 27853 (Andrejko i in. 2008a). Od około 18 do 30 godziny infekcji, prążek białkowy o masie cząsteczkowej 14 kDa, odpowiadający lizozymowi, widoczny na membranie po immunoblotingu z przeciwciałami skierowanymi przeciwko lizozymowi *G. mellonella*, był ponad 60 % większy w porównaniu z prążkiem obserwowanym w próbie kontrolnej. Dopiero po około 42 godzinach zanotowano stopniowy spadek ilości lizozymu, co można tłumaczyć

zahamowaniem biosyntezy enzymu spowodowanym intensywnym rozwojem bakterii *P. aeruginosa* w hemolimfie zakażonych gąsienic.

Ilość lizozymu w hemocytach i ciele tłuszczowym, które zostały wyizolowane z gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych szczepem entomopatogennym, stopniowo wzrastała a następnie po 24-30 godzinach, uległa zmniejszeniu, co mogło być rezultatem intensywnej sekrecji tego białka z miejsca syntezy do hemolimfy, jak również osłabienia funkcji ciała tłuszczowego spowodowane rozprzestrzeniającą się infekcją bakteryjną (**Andrejko i in. 2008a**). Wzrost zarówno ilości jak i aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wskazuje, że enzym ten jest mało wrażliwy na działanie proteaz wytwarzanych przez bakterię podczas patogenezы.

Z danych literaturowych wiadomo, że metaloproteazy wytwarzane przez organizmy patogenne funkcjonują nie tylko jako czynniki wirulencji, ale również mogą uczestniczyć w mechanizmach indukcji odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Altancicek i in. 2007). Elastaza B *P. aeruginosa* należy do rodziny metaloproteaz podobnych do termolizyny, znanego induktora mechanizmów odpowiedzi immunologicznej (Griesch i in. 2000). Elastaza B podana w dawce subletalnej do hemolimfy gąsienic, okazała się doskonałym induktorem odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* powodując m.in. wzrost aktywności lizozymu. Immunodetekcja tego białka wykazała, że było to związane ze wzrostem poziomu lizozymu w hemolimfie. Jednak na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić czy było to związane ze zwiększoną sekrecją białka z miejsc syntezy, jakimi są komórki ciała tłuszczowego i hemocyty, czy może ze zwiększoną ekspresją lizozymu (**Andrejko i Mizerska-Dudka 2011**).

Należy zaznaczyć, że w eksperymentach *in vitro*, w których inkubowano frakcje zawierające proteazy, wytwarzane przez szczep entomopatogeny lub szczepy kliniczne *P. aeruginosa* z pełną hemolimfą owadów, aktywność lizozymu nie ulegała zmianie i pozostawała na poziomie kontrolnym. Znaczny spadek aktywności enzymu (o około 60 %), zaobserwowano jeśli jako źródło lizozymu stosowane były ekstrakty otrzymane z hemolimfy gąsienic zakażonych bakteriami *E. coli*. Ekstrakty, zawierające białka o masie poniżej 30 kDa, otrzymywane były z hemolimfy przez ekstrakcję kwasem octowym i metanolem (**Andrejko i in. 2013b**). Te obserwacje mogą wskazywać na obecność w hemolimfie, ale nie w ekstrakcie z hemolimfy, inhibitorów hamujących aktywność proteaz. Obecność w hemolimfie *G. mellonella* inhibitorów, które są aktywne przeciwko metaloproteazom (IMPI) jak również serynowym proteazom (ISPI) obserwowali m.in. Wedde i in. (1998) oraz Fröbius i in. (2000). IMPI's wykazują aktywność w stosunku do metaloproteaz z rodziny M4

wytwarzanych przez bakterie patogenne jako czynniki wirulencji m.in. w stosunku do elastazy B *P. aeruginosa* (Clermont i in. 2004). W pracy (Andrejko i Mizerska-Dudka 2011) przedstawiono, że iniekcja gąsienicom elastazy B indukuje syntezę inhibitorów hamujących aktywność metaloproteaz na porównywalnym poziomie do termolizyny. Ponadto, obserwowano wzrost przeżywalności gąsienic po podaniu letalnej dawki termolizyny, co potwierdza obecność w hemolimfie czynników hamujących aktywność metaloproteaz (Andrejko i Mizerska-Dudka 2011).

Ponieważ frakcje proteolityczne, które okazały się aktywne *in vitro* przeciwko lizozymowi, zawierały przede wszystkim alkaliczną proteazę, może to sugerować, że właśnie ten enzym jest zaangażowany w degradację lizozymu, co wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach. Natomiast proteaza serynowa *P. aeruginosa* – proteaza IV, nie powodowała degradacji lizozymu w warunkach *in vitro*, pomimo tego, że enzym zawiera w swojej strukturze 13 reszt lizyny, które mogą stanowić potencjalne miejsca cięcia dla tej proteazy (Andrejko i in. 2005).

4.3. Peptydy odpornościowe

W humoralnej odpowiedzi immunologicznej owadów, kluczową rolę odgrywają peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP's), które są aktywowane bądź syntetyzowane *de novo* głównie w ciele tłuszczowym i hemocytach, skąd są wydzielane do hemolimfy zakażonych gąsienic. U *G. mellonella* poznano jak dotąd kilkanaście peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Są wśród nich peptydy α -helikalne (cekropiny A i D, moricyny), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyna), peptydy bogate w prolinę, peptydy bogate w glicynę (gloweryny) a także peptydy anionowe (Brown i in. 2009; Cytryńska i in. 2007). Peptydy oddziałują na ujemnie naładowaną błonę komórkową bakterii, prowadząc do utworzenia w niej kanałów i depolaryzacji a nawet fragmentacji, czego efektem jest śmierć drobnoustroju. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych to zazwyczaj niewielkie cząsteczki o charakterze kationowym, zawierające 12-50 aminokwasów o masie cząsteczkowej 3-10 kDa. Każdy gatunek wytwarza zazwyczaj zestaw peptydów odpornościowych zróżnicowanych pod względem właściwości biochemicznych i spektrum aktywności. Różnice w zestawie peptydów i kinetyce ich pojawiania się w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* obserwowano po zakażeniu owadów różnymi bakteriami i grzybami (Mak i in. 2010).

W wyniku zakażenia gąsienic szczepami *P. aeruginosa* różniącymi się profilem wytwarzanych enzymów proteolitycznych, następuje indukcja syntezy peptydów

odpornościowych, podobnie jak po podaniu do hemocelu komórek saprofitycznej bakterii *E. coli* (Andrejko i in. 2009; 2013c). W hemolimfie gąsienic obserwowano pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej, ale czas pojawienia się oraz poziom tej aktywności był wyraźnie zróżnicowany w zależności od szczepu. Zdecydowanie najlepszym induktorem aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie okazał się szczep entomopatogeny ATCC 27853. Najwyższy poziom aktywności, odpowiadający 20 μ M cekropiny B, oceniony metodą dyfuzyjną na podstawie strefy zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowej *E. coli*, stwierdzono w hemolimfie gąsienic zakażonych tym szczepem pochodzącym z podłoża bulionowego, po 18 godzinach infekcji. Natomiast, szczepy kliniczne mało efektywnie indukowały aktywność przeciwbakteryjną u zainfekowanych owadów. Należy zaznaczyć, że już po 30 godzinach od zakażenia, we wszystkich próbkach hemolimfy nie obserwowano aktywności przeciwko *E. coli* (Andrejko i in. 2013c).

Aktywność przeciwbakteryjna indukowana obecnością w hemolimfie patogena *P. aeruginosa* była zdecydowanie niższa w porównaniu z aktywnością obserwowaną po zakażeniu owadów bakterią saprofityczną *E. coli*. Ponadto, w tym przypadku aktywność utrzymywała się na wysokim poziomie nawet do 48 godzin po iniekcji bakterii (Andrejko i in. 2009). Pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie było związane z syntezą peptydów o masie poniżej 6,5 kDa, co zostało potwierdzone metodą elektroforetyczną (Tris-tricine SDS-PAGE) (Andrejko i in. 2013c) oraz metodą bioautografii (Andrejko i in. 2009). Udział poszczególnych proteaz *P. aeruginosa* w indukcji peptydów odpornościowych w hemolimfie barciaka większego wymaga szczegółowych badań. Dotychczas udało się wykazać, że po iniekcji do jamy ciała owada elastazy B, enzym ten powodował stymulację humoralnej reakcji obronnej gąsienic *G. mellonella*, m.in. poprzez zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie na skutek indukcji syntezy peptydów odpornościowych (Andrejko i in. 2009).

Badania przeprowadzone na gąsienicach *G. mellonella* i *D. melanogaster* dowiodły, że obecność enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez mikroorganizmy patogenne, jest odbierana przez organizm gospodarza jako „sygnał zagrożenia”. W wyniku aktywności proteinaz endo- i egzogennych w hemolimfie powstają fragmenty peptydowe mające zdolność do indukcji syntezy humoralnych czynników odpowiedzi immunologicznej. Proteinazy biorą też udział w bezpośredniej aktywacji kaskad sygnałowych indukujących syntezę peptydów odpornościowych. U *G. mellonella* stwierdzono, że w wyniku działania termolizyny wytwarzane są fragmenty peptydowe (o masie cząsteczkowej < 3 kDa) wykazujące zdolność do indukcji humoralnych czynników odpowiedzi immunologicznej

(Griesch i in. 2000). Substratem dla metaloproteinaz jest kolagen typu IV (Altancicek i Vilcinskas 2006).

Wiadomo, że czynniki wirulencji takie jak enzymy proteolityczne, wytwarzane przez bakterie podczas zakażenia, przede wszystkim niszczą struktury ciała owada bądź osłabiają lub niszczą komórkowe i humoralne odczyny obronne. Na przykład, selektywna degradacja cekropin i attacyn w hemolimfie *Hyalophora cecropia* zachodziła pod wpływem proteaz wytwarzanych przez bakterie *B. thuringiensis* (Dalhammar i Steiner 1984) jak również przez bakterie *Xenorhabdus nematophilus* związane mutualistycznie z nicieniami *Steinernema carpocapsae* (Götz i in. 1981). Proteazy produkowane przez takie patogeny jak *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* degradowały peptydy przeciwbakteryjne występujące u człowieka, LL-37 i α -defensyny (Schmidtchen i in. 2002). Obserwowany w warunkach *in vivo* niski poziom aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie *G. mellonella* (w przypadku zakażenia szczepami klinicznymi *P. aeruginosa*) oraz spadek aktywności w czasie trwania infekcji (po 30 godzinach) mógł być rezultatem degradacji peptydów spowodowanej przez enzymy proteolityczne wytwarzane przez *P. aeruginosa* w czasie patogenezы (**Andrejko i in. 2013c**).

Podatność peptydów przeciwbakteryjnych na proteazy sprawdzono w badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* (**Andrejko i in. 2013b**). Okazało się, że aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie owadów zakażonych bakterią *E. coli* była całkowicie hamowana przez płyny pochodowlane zawierające enzymy produkowane przez szczep entomopatogeny ATCC 27853. Ponadto, supernatanty wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa* hodowanych w podłożu M9, miały mniejszy wpływ na aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu do frakcji pochodzących z LB. Jak wcześniej wykazano (**Andrejko i in. 2013a**) w podłożu minimalnym produkowana jest głównie alkaliczna proteaza, dlatego też uzyskane wyniki wskazują, że ten enzym tylko w niewielkim stopniu ma wpływ na degradację peptydów odpowiedzialnych za aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie zakażonych owadów. Jednym z enzymów wytwarzanych przez badane bakterie w podłożu bulionowym jak i podczas zakażenia jest elastaza B (**Andrejko i in. 2013c**) Udział tej metaloproteazy wytwarzanej przez *P. aeruginosa*, w degradacji peptydów odpornościowych został potwierdzony w warunkach *in vitro* (**Andrejko i in. 2009**) Wyniki w tej serii doświadczeń, uzyskane metodą dyfuzyjną oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej oraz metodą zymografii, wykazały znoszenie aktywności przeciwko *E. coli* w hemolimfie owadów inkubowanej z elastazą B (oczyszczoną z płynu pochodowlanego entomopatogennego szczepu *P. aeruginosa* metodą chromatografii jonowymiennej). W próbach, w których

elastaza B była wcześniej preinkubowana z 6mM EDTA, w celu zahamowania aktywności enzymu, aktywność przeciwbakteryjna była wykrywana, co potwierdza degradację peptydów przeciwbakteryjnych przez LasB (Andrejko i in. 2009). Wstępnie ustalono również, że peptydy przeciwbakteryjne nie były degradowane przez serynową proteazę IV w warunkach *in vitro* (Andrejko i in. 2009). Otrzymane wyniki wskazują na zróżnicowane zaangażowanie proteaz w degradację peptydów odpornościowych i/lub na różną wrażliwość peptydów na proteolityczną aktywność tych czynników.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że pojawienie się bakterii patogenicznej *P. aeruginosa* w hemocelu owada jest sygnałem dla układu odpornościowego gospodarza do uruchomienia reakcji obronnej. Wydaje się, że w procesie patogenezy enzymy proteolityczne mogą odgrywać odmienną rolę, co zostało wykazane szczególnie na przykładzie elastazy B, w początkowej fazie infekcji powodują aktywację układu obronnego, tym samym zwiększając aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy zakażonego owada, następnie w miarę postępującej bakteriemii, mogą degradować niektóre białka/peptydy np. peptydy odpornościowe.

4.4. Apolipoforyna III

Zmiany w poziomie aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie *G. mellonella* w warunkach *in vitro* były skorelowane ze zmianami w profilu białkowo/peptydowym hemolimfy inkubowanej w obecności enzymów proteolitycznych badanych szczepów *P. aeruginosa* (Andrejko i in. 2013c). Jednak tylko w przypadku entomopatogenicznego szczepu ATCC 27853, obserwowano wyraźną degradację białek i peptydów hemolimfy, między innymi zwraca uwagę, prawie całkowity brak na żelu elektroforetycznym prążka białkowego o masie cząsteczkowej 18 kDa, który odpowiada u gąsienic *G. mellonella* - apolipoforynie III (apoLp-III).

Apolipoforyna jest ważnym składnikiem hemolimfy owadów zaangażowanym w transport lipidów, aktywację układu immunologicznego, rozpoznawanie determinant molekularnych drobnoustrojów oraz w procesie apoptozy (Oztug i in. 2012). ApoLp-III należy do rodziny wymiennych apolipoprotein opisanych zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców. Cechą wspólną tych białek jest obecność w strukturze cząsteczki amfipatycznych α -helis (Narayanaswami i Ryan 2000). Synteza apoLp-III u owadów zachodzi głównie w ciele tłuszczowym, skąd białko jest uwalniane do hemolimfy. Wiadomo, że apoLp-III może wiązać kwasy lipotejchojowe, które są składnikami ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich, lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych oraz β -1,3-glukan obecny

w ścianie komórkowej drożdży. Stwierdzono także, że apoLp-III uczestniczy w detoksykacji składników ściany komórkowej drobnoustrojów (Whitten i in. 2004). Poziom apoLp-III w hemolimfie barciaka znacznie wzrasta po zakażeniu bakteriami Gram-ujemnymi, takimi jak *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*, czy też bakterią Gram-dodatnią *Micrococcus luteus* (Zdybicka-Barabas i Cytryńska 2011). Dane literaturowe wskazują, że apoLp-III zwiększa aktywność bakteriolityczną lizozymu oraz bierze udział w aktywacji syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Dettloff i in. 2001). ApoLp-III może współpracować z peptydami odpornościowymi zwiększając ich skuteczność w zwalczaniu drobnoustrojów, wzmacniać odpowiedź komórkową (fagocytoza i enkapsulacja) oraz aktywować kaskadę oksydazy fenolowej.

W badaniach *in vitro* (Andrejko i in. 2013b) zaobserwowano, że płyn pochodzący z entomopatogenicznego szczepu *P. aeruginosa* pochodzący z podłoża bulionowego, powodował całkowitą degradację apoLp-III, natomiast supernatant tego samego szczepu uzyskany z podłoża minimalnego okazał się mniej efektywny, spowodował tylko około 48 % spadek poziomu tego białka. Wśród szczepów klinicznych, jedynie płyn pochodzący z bakterii PA18 nieznacznie zmniejszył poziom apoLp-III (12-17%) w porównaniu do poziomu obserwowanego w hemolimfie kontrolnej. Zaobserwowane różnice w poziomie apoLp-III wiążą się z odmiennym profilem zewnątrzkomórkowych proteaz wytwarzanych przez badane szczepy *P. aeruginosa*.

Zdecydowany wpływ szczepu entomopatogenicznego na spadek poziomu apoLp-III może być związany z działaniem proteazy IV, która jest wytwarzana przez tę bakterię w podłożu bulionowym (Andrejko i in. 2013a). Gdy ekstrakt z hemolimfy, będący źródłem apoLp-III, inkubowano z frakcją zawierającą oczyszczoną chromatograficznie proteazę IV, uzyskano całkowitą degradację białka o masie 18 kDa (Andrejko i in. 2005). ApoLp-III była stopniowo degradowana, o czym świadczy pojawienie się czterech produktów o masie cząsteczkowej 15, 13,3, 11,9 oraz 9,5 kDa (po 30 minutach inkubacji) oraz tylko pojedynczego produktu degradacji o masie 5,6 kDa - po 60 minutach inkubacji (Andrejko i in. 2005).

Proteaza IV jest serynową proteazą, która hydrolizuje białka po karboksylowej stronie lizyny. Analiza strukturalna apoLp-III uwidoczniała obecność 8 reszt lizyny na N-końcu (reszty 1-70) oraz 9 reszt na C-końcu (118-163), które są potencjalnymi miejscami cięcia dla proteazy IV. Fragment cząsteczki od 71 do 117 aminokwasu nie zawiera reszt lizyny a obliczona teoretycznie masa cząsteczkowa tego fragmentu wynosi około 5,515 kDa. Na podstawie przeprowadzonej analizy elektroforetycznej oraz immunoblotingu z przeciwciałami

anty-apoLp-III *G. mellonella* stwierdzono, że uzyskany końcowy produkt degradacji apoLp-III ma masę 5,6 kDa. Analiza sekwencji peptydu wykazała, że produkt ten stanowi fragment apoLp-III licząc od 71 aminokwasu dojrzałego białka (**Andrejko i in. 2005**). Wyniki te wyraźnie wskazują, że apoLp-III *G. mellonella* jest substratem dla proteazy serynowej *P. aeruginosa*.

Po zakażeniu owada entomopatogenną bakterią *P. aeruginosa*, przeanalizowano poziom apoLp-III w hemolimfie, hemocytach oraz ciele tłuszczowym *G. mellonella* i potwierdzono degradację tego białka również w warunkach *in vivo* (**Andrejko i in. 2008b**). Spadek ilości apoLp-III w hemocytach i ciele tłuszczowym, obserwowany odpowiednio po 3,5 oraz 24 godzinach od zakażenia, był prawdopodobnie rezultatem intensywniejszej sekrecji tego białka do hemolimfy, gdzie bierze udział w odpowiedzi immunologicznej. Natomiast w hemolimfie w krótkim czasie po infekcji zanotowano wzrost poziomu apoLp-III, a po 24 godzinach ilość białka zaczęła się zmniejszać i pojawiły się produkty degradacji. Prążki białkowe o masie około 15 i 13,3 kDa były szczególnie dobrze widoczne po 24 godzinach, natomiast po 48 godzinach od zakażenia dominowały produkty degradacji o masie 12 i 9,5 kDa. Należy zaznaczyć, że obserwowane w hemolimfie produkty degradacji były podobne do tych, które obserwowano w doświadczeniach *in vitro* (**Andrejko i in. 2008b**). Wyniki te wskazują, że w warunkach *in vivo*, w zakażonym owadzie, w proteolityczną degradację apoLp-III zaangażowana jest serynowa proteaza IV. Należy dodać, że degradacja apoLp-III i innych elementów układu obronnego, wydaje się być skorelowana z ogólnym wzrostem aktywności proteolitycznej, który zaobserwowano w hemolimfie gąsienic zakażonych entomopatogenną bakterią *P. aeruginosa* po upływie 22 godzin infekcji (**Andrejko i in. 2008b**).

Kontynuując badania w warunkach *in vivo*, owady zostały zakażone entomopatogennym szczepem *P. aeruginosa*, ale pochodzącym z hodowli w podłożu M9. Zaobserwowano, że w początkowym etapie infekcji nastąpił zdecydowany wzrost a następnie po około 24 godzinach, spadek poziomu apoLp-III, ale nawet w tym czasie poziom białka był wyższy w porównaniu z poziomem w hemolimfie kontrolnej (**Andrejko i in. 2013c**). Po zakażeniu owadów szczepami klinicznymi, PA9 i PA18, nie zaobserwowano wyraźnych zmian poziomu apoLp-III w hemolimfie gąsienic (**Andrejko i in. 2013c**), podobnie jak w warunkach *in vitro* (**Andrejko i in. 2013b**). Wyniki uzyskane w tych eksperymentach wskazują, że alkaliczna proteaza, która jest głównym enzymem produkowanym w podłożu syntetycznym przez *P. aeruginosa*, ma niewielki udział w proteolitycznej degradacji apoLp-III *G. mellonella*.

Wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie gąsienic, obserwowany po zakażeniu bakteryjnym jest dowodem, że wydzielane przez patogena proteazy mogą stymulować humoralne odczyny obronne owada. Wiadomo, że u bezkręgowców indukcja mechanizmów odpowiedzi immunologicznej następuje po rozpoznaniu PAMPs, albo po rozpoznaniu sygnału zagrożenia (model odporności „danger”) (Chamy i in. 2008). Istotną rolę w tym modelu indukcji odpowiedzi immunologicznej odgrywają metaloproteazy z rodziny termolizyny, do której należy elastaza B *P. aeruginosa*. Enzym ten spowodował znaczny wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie owadów, którym podano przez iniekcję subletalną dawkę LasB (0,1µg/gąsienice). Ilość apoLp-III wzrosła 1,6 krotnie w przypadku LasB oraz 1,3 krotnie w przypadku termolizyny w hemolimfie zebranej po 24 godzinach od iniekcji tych enzymów (Andrejko i Mizerska-Dudka 2011).

Odmierna wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na różnorodne szczepy i mutanty najprawdopodobniej odzwierciedla różnice w wytwarzanych czynnikach wirulencji, zarówno tych związanych ze ścianą komórkową jak i sekrecyjnych (Inglis i in. 2009; Lore i in. 2012). Na przykład, układ odpornościowy *G. mellonella* jest w stanie wykryć różnice w zjadliwości mutantów LPS *P. aeruginosa* (Dunphy i in. 1986). Wyniki badań przedstawione w tym opracowaniu, sugerują że odmienny wpływ badanych szczepów bakteryjnych na apolipoporynę i inne elementy układu odpornościowego *G. mellonella* można wytłumaczyć różnym profilem enzymów proteolitycznych produkowanych przez badane szczepy *P. aeruginosa* podczas zakażenia gąsienic *G. mellonella*.

Podsumowanie najważniejszych wyników, które stanowią osiągnięcie naukowe dotyczące aktywowania i przełamania humoralnej odpowiedzi immunologicznej gąsienic *Galleria mellonella* przez enzymy proteolityczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*:

1. Barciak większy *G. mellonella* jest przydatnym organizmem modelowym do badań na poziomie całego organizmu jak i cząstkowych reakcji składających się na odpowiedź immunologiczną owadów oraz do testowania patogenności i identyfikacji czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*.
2. Gąsienice *G. mellonella* są bardzo wrażliwe na zakażenie zarówno przez entomopatogeny (ATCC 27853) jak i kliniczne szczepy (PA9 i PA18) bakterii *P. aeruginosa*. Toksyczne dla owadów są również płyny pochodzące z zawiesin zawierające zewnątrzkomórkowe proteazy

wytwarzane przez te bakterie. Śmierć owadów następuje po około 38-40 godzinach od iniekcji bakterii lub płynu pochodzącego z objawami typowymi dla zakażenia bakterią *P. aeruginosa*. Toksyczność płynów pochodzących z podłoża, w którym bakterie rosną. Wartości dawek LD₅₀ supernatantów pochodzących z podłoża syntetycznego M9 są 50-krotnie (ATCC), 22-krotnie (PA18) oraz 32-krotnie mniejsze w porównaniu do dawek LD₅₀ płynów pochodzących z podłoża bulionowego LB.

3. Profil enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez badane szczepy bakterii *P. aeruginosa* w warunkach *in vitro* zależy od składu podłoża, w którym prowadzi się hodowlę bakterii (Tabela 1)

Tabela 1. Profil enzymów proteolitycznych badanych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*

Podłoże	Szczep	Elastaza A	Elastaza B	Proteaza IV	Alkaliczna proteaza
LB	ATCC	+	+++	+	-
	PA9	-	+	-	-
	PA18	-	+	-	-
M9	ATCC	-	++	-	+++
	PA9	-	+	-	++
	PA18	-	+	-	++

Aktywność enzymów proteolitycznych identyfikowano przy użyciu testów biochemicznych z wykorzystaniem specyficznych substratów oraz za pomocą zymografii, +++ duża aktywność; ++ średnia aktywność; + mała aktywność; - brak aktywności.

4. Szczepy *P. aeruginosa* różniące się profilem enzymów proteolitycznych wywołują zróżnicowaną reakcję układu odpornościowego *G. mellonella* w odpowiedzi na infekcję tymi bakteriami. W każdym przypadku efektem zakażenia jest śmierć owadów, jednak zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu odpowiedzi immunologicznej, zależne od użytego szczepu oraz od składu podłoża, w którym bakterie były hodowane.
5. Enzymy proteolityczne wytwarzane przez bakterię *P. aeruginosa* pełnią istotną rolę podczas zakażenia gąsienic *G. mellonella*. W początkowej fazie infekcji powodują aktywację układu obronnego, tym samym zwiększając aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy zakażonych owadów a następnie w miarę rozwoju bakteriemii przełamują humoralną odpowiedź immunologiczną gospodarza.

6. Aktywacja układu obronnego owada po zakażeniu bakterią *P. aeruginosa* polega na zwiększeniu syntezy lizozymu, indukcji syntezy peptydów odpornościowych i inhibitorów metaloproteaz oraz zmianie poziomu apolipoporyny III w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*.
7. Udział enzymów proteolitycznych *P. aeruginosa* w przełamywaniu odpowiedzi immunologicznej gąsienic *G. mellonella* związany jest z hamowaniem aktywności układu oksydazy fenolowej, degradacją peptydów odpornościowych oraz apolipoporyny III w hemolimfie zakażonych owadów. Poszczególne proteazy wykazują zróżnicowane zaangażowanie w degradację tych kluczowych elementów odpowiedzi immunologicznej owadów i/lub różna też jest wrażliwość białek i peptydów odpornościowych na aktywność proteolityczną. Peptydy przeciwbakteryjne są podatne na proteolizę pod wpływem elastazy B oraz w niewielkim stopniu alkalicznej proteazy. Apolipoporyna III jest substratem dla proteazy IV oraz alkalicznej proteazy. Peptydy przeciwbakteryjne są niewrażliwe na proteolizę pod wpływem proteazy IV w warunkach *in vitro*.
8. Elastaza B - metaloproteaza bakterii *P. aeruginosa* pełni podczas zakażenia podwójną rolę: induktora odpowiedzi immunologicznej gąsienic *G. mellonella* oraz czynnika wirulencji. Rola elastazy B jako czynnika aktywującego mechanizmy odpowiedzi immunologicznej polega na indukcji syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz czynników o aktywności inhibitorów metaloproteaz, zwiększeniu poziomu ekspresji i aktywności lizozymu oraz poziomu apolipoporyny III. Elastaza B jako czynnik wirulencji bierze udział w degradacji peptydów przeciwbakteryjnych.
9. Wzrost ilości jak i aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wskazuje, że lizozym jest mało wrażliwy na działanie proteaz tej bakterii, na przykład, proteaza serynowa IV nie powoduje degradacji lizozymu w warunkach *in vitro*, pomimo tego, że enzym zawiera w swojej strukturze reszty lizyny, stanowiące potencjalne miejsca cięcia dla tej proteazy.
10. Indukcja syntezy humoralnych czynników odpowiedzi immunologicznej u gąsienic *G. mellonella* w obecności metaloproteaz (elastaza B) świadczy o funkcjonowaniu u tego organizmu modelu odporności „danger” Wydaje się, że u *G. mellonella* w indukcję syntezy białek i peptydów przeciwdrobnoustrojowych zaangażowane są różne mechanizmy tj. zależny od obecności obcych struktur (model odporności „infectious-non self) jak i czynników wirulencji (model odporności „danger”).
11. Obecność elastazy B i alkalicznej proteazy w zakażonych gąsienicach w warunkach *in vivo* wyraźnie wskazuje, że te dwa czynniki wirulencji pełnią istotną rolę podczas infekcji

bakterią *P. aeruginosa*. Analiza PCR potwierdziła obecność genu *lasB* kodującego elastazę B oraz genu *aprA* kodującego alkaliczną proteazę w genomach wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa*.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 8 pracach naukowych. We wszystkich pracach byłam autorem koncepcji badań i głównym wykonawcą doświadczeń. Byłam odpowiedzialna za opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptów oraz pełniłam rolę autora korespondencyjnego. Wyniki opisane w powyższych publikacjach składające się na monotematyczny cykl badań „Aktywowanie i przełamywanie humoralnej odpowiedzi immunologicznej gąsienic *Galleria mellonella* przez enzymy proteolityczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*” zostały uzyskane w ramach grantów, w których byłam wykonawcą:

1. Projekt badawczy MNiSW nr 2 PO4C 08029 realizowany w latach 2005-2008:
„Rola apolipoforyny III i mechanizm transmisji sygnałów w odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella*”
2. Projekt badawczy MNiSW nr N N303580239 realizowany w latach 2010 – 2012:
„Apolipoforyna III *Galleria mellonella* – białko o wielu funkcjach”

Literatura:

- Altancicek B., Linder M., Linder D., Preissner K.T., Vilcinskas A. 2007. Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activated innate immune response in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* 75, 175-183.
- Altancicek B., Vilcinskas A. 2006. Metamorphosis and collagen-IV-fragments stimulate innate immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1108–1118.
- Andrejko M.**, Cytryńska M., Jakubowicz T. 2005. Apolipophorin III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Letters* 243, 331-337.
- Andrejko M.**, Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T. 2008a. Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Folia Microbiol.* 53 (2), 147-151.
- Andrejko M.**, Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T. 2008b. 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. Part B*, 152, 118-123.
- Andrejko M.**, Mizerska-Dudka M. 2011. Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 107, 16-26.
- Andrejko M.**, Zdybicka-Barabas A., Janczarek M., Cytryńska M. 2013a. Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim. Polonica* 60(1), 83-90.

- Andrejko M.**, Zdybicka-Barabas A., Wawrzoszek M., Cytryńska M. 2013b. Diverse susceptibility of *Galleria mellonella* humoral immune response factors to the exoprotease activity of entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zoolog. Sci.* 30 (5), 345-351.
- Andrejko M.**, Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M. 2013c. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* DOI:10.1016/j.jip.2013.10.006.
- Aperis G., Fuchs B.B., Anderson C.A., Warner J.E., Calderwood S.B., Mylonakis E. 2007. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microb. Infect.* 9, 729–734.
- Armstrong P.B. 2006. Protease and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* 211, 263-281.
- Brivio M.F., Pagani M., Restelli S. 2002. Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticule. *Exp. Parasitol.* 1001, 149-156.
- Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B. et al. 2009. A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol. Biol.* 39, 792-800.
- Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O’Callaghan R.J. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochem.* 290, 330-337.
- Chamy L.E., Leclerc V., Caldelari I., Reichhart J.M. 2008. Sensing of “danger signals” and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways “upstream” Toll. *Nat. Immunol.* 9, 1165-1170.
- Clermont A., Wedde M., Seitz V., Podsiadlowski L., Lenze D., Hummel M., Vilcinskas A. 2004. Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. *Biochem. J.* 382, 315–322.
- 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.
- Dalhammar G., Steiner H. 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* 139, 247–252.
- Dettloff M., Kaiser B., Wiesner A. 2001. Localization of injected apolipoprotein III *in vivo* – new insights into the immune activation process directed by this protein. *J. Insect Physiol.* 47, 789–797.
- Duan K., Surette M.G. 2007. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J. Bacteriol.* 189, 4827-4836.
- 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.
- Engel L.S., Hill J.M., Caballero A.R., Green L.C., O’Callaghan R.J. 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273, 16792–16797.
- Engel L.S., Hobden J.A., Moreau J.M., Callegan M.C., Hill J.M., O’Callaghan R.J. 1997. *Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1535–1542.

- Fröblius A.C., Kanost M.R., Götz P., Vilcinskis A. 2000. Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Eur. J. Biochem. 267, 2046-2053.
- Garcia-Lara J., Needham A., Foster S. 2005. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43, 311-323.
- Gliński Z., Jarosz J. 1997. Zjawiska odporności przeciwwzakaźnej u bezkręgowców. Wyd. UMCS, Lublin.
- Götz P., Boman H.G., Boman A. 1981. Interaction between insect immunity and insect pathogenic nematode with symbiotic bacteria. Proc. R. Soc. London, Ser. B 212, 333-350.
- Griesch J., Wedde M., Vilcinskis A. 2000. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*, a new pathway mediating induction of humoral immune responses. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 461-472.
- Harding C.R., Schroeder G.N., Reynolds S., Kosta A., Collins J.W., Mousnier A., Frankel G. 2012. *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. Infect Immun 80, 2780-2790.
- Hultmark D. 1996. Insect lysozymes, in: P. Jollès (Ed.), Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 87-102.
- Inglis R.F., Gardner A., Cornelis P., Buckling A. 2009. Spite and virulence in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 5703-5707.
- 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.
- Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med. Maladies Infect. 36, 78-91.
- Lorč N.I., Cigana C., De Fino I., Riva C., Juhas M., Schwager S., et al. 2012. Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. PLoS One 7: e35648.
- 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.
- Mariencheck W.I., Alcorn J.F., Palmer S.M., Wright J.R. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. Am. J. Respir. Cell Mol. 28, 528-537.
- Matsumoto K., Shams N.B., Hannin L.A., Kenyon K.R. 1992. Proteolytic activation of corneal matrix metalloproteases by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Curr. Eye Res. 11, 1105-1109.
- 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.
- Miyoshi S-I., Shinoda S. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes Infect. 2, 91-98.
- Mukherjee K., Altincicek B., Hain T., Domann E., Vilcinskis A., Chakraborty T. 2010. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 76, 310-317.
- Narayanaswami V., Ryan R.O. 2000. Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. Biochim. Biophys. Acta 1438, 15-36.
- Oztug M., Martinon D., Weers P.M.M. 2012. Characterization of the apolp-III/LPS complex: insight into the mode of binding interaction. Biochemistry 51, 6220-6227.

- Peters J.E., Galloway D.R. 1990. Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J Bacteriol* 172, 2236–2240.
- Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Hamood A.N. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. *J. Hosp. Infect.* 43, 211-218.
- Schmidtchen A., Wolff H., Hansson C. 2001. Differential proteinase expression by *Pseudomonas aeruginosa* derived from chronic leg ulcers. *Acta Derm. Venereol.* 81, 406-409.
- Schmidtchen A., Frick I-M., Anderson E., Tapper H., Björck L. 2002. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 46, 157-168.
- Schmidtchen A., Holst E., Tapper H., Björck L. 2003. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb. Pathogenesis* 34, 47-55.
- Schultz D.R., Miller K.D. 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect. Immun.* 10, 128-135.
- Shigematsu T., Fukushima J., Oyama M., Tsuda M., Kawamoto S., Okuda K. 2001. Iron-mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 45, 579–590.
- Stępińska M.A., Oldak E., Trafny E.A. 2010. Proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with TTSS-mediated cytotoxicity and invasiveness to host cells. *Curr Microbiol.* 60, 360–364.
- Theander T.G., Kharazmi A., Pedersen B.K., Christensen L.D., Tvede N.T et al. 1988. Inhibition of human lymphocyte proliferation and cleavage of interleukin-2 by *Pseudomonas aeruginosa* proteases. *Infect. Immun.* 56, 1673-1577.
- Vilcinskis A., Matha V. 1997. Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defense reactions in *Galleria mellonella*. *Anim. Biol.* 6, 19-29.
- Wedde M., Weise C., Kopacek P., Franke P., Vilcinskis A. 1998. Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* 255, 535-543.
- Whitten M.M.A., Tew I.F., Lee B.L., Ratcliffe N.A. 2004. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in β -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J. Immunol.* 172, 2177-2185.
- Winzer K., Williams P. 2001. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 131-143.
- Woods D.E., Schaffer M.S., Rabin H.R., Campbell G.D., Sokol P.A. 1986. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J. Clin. Microbiol.* 24, 260-264.
- Yang J., Zeng H.-M., Lin H.-F., Yang X.-F., Liu Z., Guo L.-H., Yuan J.-J., Qiu D.-W. 2012. An insecticidal protein from *Xenorhabdus budapestensis* that results in prophenoloxidase activation in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 60-67.
- Yu K.H., Kim K., Lee J., Lee H., Kim S., Cho K., et al. 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.
- Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M. 2011. Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 158, 90-98.
- 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. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1449-1456.

Zdybicka-Barabas A., Mak P., Kłys 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.

5. INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

OMÓWIENIE INNYCH PRAC NAUKOWO-BADAWCZYCH NIE WLICZANYCH DO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych zostałam zatrudniona w 1996 roku w Zakładzie Patologii Owadów na stanowisku adiunkta. W tym czasie moja praca naukowa nadal skupiała się wokół zagadnień związanych z czynnikami wirulencji określanymi jako inhibitory immunologiczne typu InA, wytwarzanymi między innymi przez różne szczepy bakterii entomopatogennej *S. marcescens*. Stwierdziłam, że poziom aktywności proteolitycznej wzrastał wraz z rozwojem bakteriomii *S. marcescens* w gąsienicach *G. mellonella*, szczególnie po zakażeniu owadów szczepem bakteryjnym CCM 2222. Ten szczep jako jedyny wytwarzał też proteazy w stacjonarnych hodowlach bulionowych. Homogenaty uzyskane z zakażonych gąsienic jak i filtraty z hodowli bulionowych bakterii *S. marcescens* posłużyły następnie do badania zdolności blokowania aktywności bakteriobójczej hemolimfy owadów. W doświadczeniach jako organizmy modelowe używałam zakażonych bakteriami *E. coli* poczwerek *P. brassicae* oraz *G. mellonella*. Wykazałam, że jedynie szczep bakteryjny CCM 2222 skutecznie hamował aktywność bakteriobójczą w hemolimfie badanych poczwerek. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że proteinazy uwalniane przez ten szczep *S. marcescens* w zakażonym owadzie mogą być funkcjonalnie identyczne z inhibitorem immunologicznym typu InA opisanym u *B. thuringiensis*. Wyniki tych eksperymentów zamieszczone zostały w pracy:

- **Andrejko Mariola**, Stefaniak Małgorzata, Proteinaza typu InA w gąsienicach *Galleria mellonella* zakażonych *Serratia marcescens*. *Annales Universitatis Mariae Curie- Skłodowska Lublin – Polonia section C*, vol. LI, 7-12, 1996

Inny kierunek badawczy realizowany w Zakładzie, w którym uczestniczyłam dotyczył odpowiedzi immunologicznej u krocionogów (*Diplopoda*). Przeanalizowano hemolimfę ośmiu gatunków krocionogów pod kątem obecności aktywności przeciwbakteryjnej. U większości gatunków obserwowano niskie stężenia lizozymu w hemolimfie, które nie

ulegały zmianie zarówno po iniekcji bakterii *E. cloacae* jak i bulionu odżywczego. Śladową aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, stwierdzono w hemolimfie niczym nie traktowanych osobników z gatunku *Unciger foetidus*, ale jej poziom nie ulegał zmianie po iniekcji zarówno bakterii jak i bulionu. U trzech gatunków krocionogów tj. *Megaphyllum projectum kochi*, *Polydesmus complanatus*, *Oxidus gracilis* zarówno po podaniu bakterii saprofitycznej jak i bulionu nie stwierdzono aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie. Natomiast śladowa aktywność pojawiała się, po zakażeniu bakterią *E. cloacae* w przypadku *Ommatoiulus sabulosus* a po iniekcji bulionu w przypadku *Glomeris connexa*. Rezultaty tych badań, wskazujące na niewielki udział odpowiedzi humoralnej w obronie przeciwbakteryjnej u krocionogów zostały zamieszczone w pracy:

- Kania Grzegorz, Jarosz Jan, **Andrejko Mariola**, Stefaniak Małgorzata, Evidence for antibacterial activity in haemolymph of *Diplopoda*: preliminary results. Acta Myriapodologica 169, 431-435, 1996

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących immunomodulacji odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella*, za pomocą ksenobiotyków, głównie pestycydów owadobójczych z grupy węglowodorów polichlorowych, estrów fosforoorganicznych, karbaminianów i pyretroidów. Pestycydy inokulowane pobudzonym immunologicznie owadom obniżały aktywność lizozymu w hemolimfie oraz aktywność bakteriobójczą uwarunkowaną polipeptydami odpornościowymi. Stwierdzono jednak, że dysfunkcje układu odpornościowego w zatruciach pestycydami były raczej efektem zaburzeń procesów fizjologicznych i ogólnego zatrucia organizmu owada a nie następstwem działania pestycydów na poszczególne składowe układu odpornościowego. Zatrucie zaburzało mechanizmy życiowe owada, a w konsekwencji blokowało lub upośledzało syntezę białek w ciele tłuszczowym, w tym białek odpornościowych o aktywności przeciwbakteryjnej. Znacząca część tych badań została wykonana w ramach grantu KBN pt.: Modulacja odczynów odpornościowych u owadów w zatruciach pestycydami realizowanego w Zakładzie w latach 1997-1999, w którym byłam wykonawcą. Wyniki tego cyklu doświadczeń przedstawione zostały na VI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, który odbył się w Nałęczowie w 1996 roku.

W 2000 roku po tragicznej śmierci prof. dr hab. Jana Jarosza, kierownictwo Zakładu objęła prof. dr hab. Teresa Jakubowicz z Zakładu Biologii Molekularnej UMCS. W związku z powyższym w znaczący sposób został zmieniony profil i kierunek badawczy Zakładu oraz jego nazwa, na Zakład Immunologii Bezkręgowców (obecnie Zakład Immunobiologii). Dla mnie, absolwentki biologii środowiskowej te pierwsze lata w Zakładzie były okresem

wyższej pracy nad poznaniem nowych metod i technik badawczych: biochemicznych, immunologicznych, mikrobiologicznych oraz z zakresu biologii molekularnej niezbędnych do dalszej pracy naukowej. W tym czasie nieocenioną pomoc zarówno merytoryczną jak i praktyczną uzyskałam od Pani Prof. dr hab. Teresy Jakubowicz. Po ukierunkowaniu przez Panią Profesor kontynuowałam badania nad izolacją i charakterystyką czynników wirulencji wytwarzanych przez mikroorganizmy entomopatogenne. Za główny cel moich badań przyjąłm wyjaśnienie mechanizmu działania i roli zewnątrzkomórkowych proteaz wytwarzanych przez bakterię *P. aeruginosa* w odniesieniu do odpowiedzi humoralnej organizmu modelowego *G. mellonella*. Do podjęcia badań w tym kierunku skłoniła mnie niewielka ilość doniesień opisujących rolę tych enzymów podczas zakażenia owadów, na tle szeregu danych literaturowych wskazujących istotną rolę enzymów proteolitycznych *P. aeruginosa* podczas zakażenia u ludzi. Są to badania ważne zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia, ze względu na fakt że *P. aeruginosa* jest groźnym oportunistycznym patogenem człowieka. Należy zaznaczyć, że stwierdzono wysoki stopień korelacji pomiędzy zjadliwością bakterii *Pseudomonas* w badaniach prowadzonych z użyciem barciaka większego jak i modeli ssaczy. Wyniki tych kilkuletnich badań zaprezentowałam w monotematycznym cyklu publikacji pod wspólnym tytułem „Aktywowanie i przełamywanie humoralnej odpowiedzi immunologicznej gąsienic *Galleria mellonella* przez enzymy proteolityczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.” Natomiast inne rezultaty moich badań nie wliczone do osiągnięcia naukowego, przedstawiłam poniżej.

Rozpoczęcie pracy, z tym samym modelem badawczym (gąsienice *G. mellonella*), ale z zastosowaniem zupełnie nowych metod wymagało nabycia określonych umiejętności, m.in. właściwej izolacji ciała tłuszczowego i hemocytów *G. mellonella*. Dlatego też w 2001 i 2002 roku odbyłam dwa szkolenia w tym zakresie w Instytucie Biologii Eksperymentalnej UAM w Poznaniu u prof. dr hab. Grzegorza Rosińskiego oraz w Instytucie Parazytologii PAN w Warszawie u prof. dr hab. Mieczysławy Boguś.

W jednej z pierwszych opublikowanych przeze mnie prac w Zakładzie Immunologii Bezkręgowców wykazałam, że aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakteriami saprofitycznymi *E. coli* była niszczone po inkubacji z płynem pochodzonym bakterii *P. aeruginosa*. Płyn pochodzący zawierał zewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne wytwarzane przez tę bakterię w podłożu bulionowym. Natomiast nie stwierdziłam zmian zarówno w poziomie jak i aktywności lizozymu, co wskazuje, że enzym nie był degradowany przez badane czynniki wirulencji *P. aeruginosa*. Poziom lizozymu w hemolimfie oceniałam stosując metodę immunoblotingu

ze specyficznymi przeciwciałami przeciwko lizozymowi *G. mellonella*, natomiast aktywność – metodą bioautografii. Należy dodać, że znaczny spadek aktywności lizozymu w hemolimfie niezakażonych jak i zakażonych owadów ekspozowanej na działanie płynu pochodzącego *P. aeruginosa* zaobserwowałam stosując metodę dyfuzyjną. Do tej pory nie udało się zidentyfikować czynników obecnych w płynie pochodzącym wpływających na zmianę aktywności lizozymu. Należy dodać, że w tych badaniach po raz pierwszy został zastosowany ekstrakt z hemolimfy zawierający peptydy o masie poniżej 30 kDa, którego metoda otrzymywania została opracowana w Zakładzie. Wyniki tych badań opisane zostały w pracy:

- **Andrejko Mariola**, Effect of *Pseudomonas aeruginosa* crude proteolytic fraction on antibacterial activity of *Galleria mellonella* haemolymph. Folia biologica (Kraków) 52, 91-96, 2004.

Jeden z wiodących tematów realizowanych w Zakładzie Immunologii Bezkęgowców (obecnie Zakładzie Immunobiologii) dotyczy roli apolipoforyny III w funkcjonowaniu układu odpornościowego owadów. Dlatego też, podjęłam badania, których celem było sprawdzenie wrażliwości tego białka na zewnątrzkomórkowe proteazy wytwarzane przez *P. aeruginosa*. Doświadczalnie, zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* wykazałam, że apoLp-III jest substratem dla serynowej proteazy IV *P. aeruginosa*. Te obserwacje zamieściłam w części autoreferatu zawierającej opis osiągnięcia. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że apoLp-III nie ulegała degradacji proteolitycznej po zakażeniu gąsienic *G. mellonella* bakterią patogenną *B. thuringiensis*. Wśród czynników wirulencji *Bacillus* znajduje się metaloproteaza (zależna od cynku) InhA2, wykazująca homologię do wcześniej zidentyfikowanej proteazy zewnątrzkomórkowej InhA, która hydrolizuje peptydy przeciwbakteryjne owadów, takie jak cekropiny i attacyny. W doświadczeniach stosowałam dwa szczepy tej bakterii tj.: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* oraz *B. thuringiensis* var. *alesti*. Zaobserwowałam nieznaczny wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie owadów, którym podano przez iniekcję badane bakterie. W warunkach *in vitro*, w próbkach zawierających ekstrakt z hemolimfy (źródło apoLp-III) oraz płyny pochodzące tych bakterii, również nie stwierdziłam zmniejszenia poziomu apoLp-III w porównaniu z kontrolą (ekstrakt z hemolimfy owadów niezakażonych). Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy:

- **Andrejko Mariola**, Mizerska-Dudka Magdalena, Changes in the apolipohorin-III level in the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae after bacterial infection. Annales Universitatis Mariae Curie –Skłodowska Lublin – Polonia, section c, vol. LXV, 2, 27-35, 2010.

Dostępność szeregu danych literaturowych opisujących niekorzystny wpływ proteaz wytwarzanych podczas zakażenia przez entomopatogeny na odpowiedź komórkową owadów, skłoniła mnie do podjęcia badań w tym kierunku. Ten cykl doświadczeń został zrealizowany we współpracy z dr M. Mizerską-Dudką - doktorantką, której byłam opiekunem naukowym, obecnie adiunktem w Zakładzie Wirusologii i Immunologii UMCS. Wykazano, że zakażenie gąsienic *G. mellonella* entomopatogennym szczepem *P. aeruginosa* powodowało znaczne zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne hemocytów (granulocytów i plazmatocytów) i w konsekwencji ich obumieranie. Od 18 godziny po zakażeniu gąsienic czyli od momentu gdy następuje znaczny rozwój bakterii *P. aeruginosa* obserwowano odpączkowywanie błony komórkowej oraz zwiększenie rozmiarów komórek i jąder komórkowych, w których chromatyna ulegała kondensacji. Poza tym w cytoplazmie hemocytów wykryto wakuole a struktury subkomórkowe (RER i mitochondria) ulegały pęcznieniu. Morfologiczne i ultrastrukturalne zmiany nie wskazywały jednoznacznie jaki typ śmierci komórkowej był indukowany w wyniku zakażenia, obserwowane bowiem cechy są typowe dla apoptozy jak i autofagowej śmierci komórkowej. Ponadto, zwrócono uwagę na nieprawidłową organizację cytoszkieletu aktynowego, co może powodować zaburzenia właściwości adhezyjnych hemocytów a tym samym zahamować fagocytozę czy enkapsulację. Hemocyty zakażonych gąsienic zachowywały jedynie zdolność do adhezji w porównaniu do hemocytów gąsienic zdrowych, które formowały wypustki i ulegały znacznemu rozpląszczeniu na powierzchni ciała obcego. Na podstawie uzyskanych wyników wysnuto przypuszczenie, że właśnie zmiany w organizacji cytoszkieletu pod wpływem sekrecyjnych czynników wirulencji są podstawą przełamania komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella*. Powyższe wyniki zostały opublikowane w pracach:

- Mizerska-Dudka Magdalena, **Andrejko Mariola**, The influence of *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors on hemocyte-mediated immune response of *Galleria mellonella*. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia*, section c, vol. LXV, 2, 37 – 47, 2010;
- Mizerska-Dudka Magdalena, **Andrejko Mariola**, *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 1 - 15, 2013; DOI:10.1002/jobm.201299273.

Efektom współpracy z Zakładem Wirusologii i Immunologii UMCS jest też praca przeglądowa dotycząca przeciwwirusowych peptydów kationowych człowieka (defensyny, katelicydyny, laktoferyna i jej pochodna laktoferycyna) oraz owadów (melityna, cekropina A, alloferon 1 i 2, mirystylowany peptyd *Heliothis virescens*):

- Mizerska-Dudka Magdalena, **Andrejko Mariola**, Kandefer-Szerszeń Martyna, Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów. *Postępy Mikrobiologii* 50, 3, 209-216, 2011.

Moje badania przyczyniły się do wykazania, że elastaza B będąca ważnym czynnikiem wirulencji *P. aeruginosa*, bierze udział w indukcji humoralnych czynników odpowiedzi immunologicznej gąsienic *G. mellonella*. Szczegółowo wyniki te zostały opisane w części autoreferatu zawierającej osiągnięcie. Wykonałam również cykl eksperymentów, w których przeanalizowałam profil białkowo-peptydowy hemolimfy gąsienic *G. mellonella*, którym podano przez iniekcje elastazę B lub termolizynę. Stwierdziłam, że po podaniu owadom badanych metaloproteinaz wyraźnie ulegała zwiększeniu ilość apolipoporyny III oraz lizozymu. Ponadto w hemolimfie obserwowałam pojawienie się 11 nowo zsyntetyzowanych białek/peptydów. Należy zwrócić uwagę na białko o masie cząsteczkowej 18 kDa i punkcie izoelektrycznym 3, które może należeć do klasy peptydów przeciwbakteryjnych określanych jako attacyny. W obrazie elektroforezy dwukierunkowej hemolimfy owadów zaobserwowałam plamki odpowiadające indukowanym peptydom o masie cząsteczkowej poniżej 6,5 kDa. W hemolimfie owadów, którym podano elastazę B, pojawił się peptyd o masie cząsteczkowej około 4 kDa i pI 4, natomiast w przypadku iniekcji termolizyny obserwowałam dwa peptydy (4 kDa i pI 6 oraz 4 kDa i pI 10). Na podstawie uzyskanych wyników oraz danych literaturowych można przypuszczać, że należą one do peptydów przeciwdrobnoustrojowych *G. mellonella* opisanych przez zespół badawczy dr hab. M. Cytryńskiej z Zakładu Immunobiologii. Niektóre białka/peptydy obecne w hemolimfie gąsienic barciaka większego po iniekcji elastazy B lub termolizyny nie występowały w hemolimfie gąsienic kontrolnych, co może wskazywać, że są to produkty degradacji proteolitycznej białek hemolimfy. Badania te opisano w pracy:

- **Andrejko Mariola**, Mizerska-Dudka Magdalena, Analysis of *Galleria mellonella* hemolymph proteins profile after metalloproteinase immune challenge. *Annales Universitatis Mariae Curie –Skłodowska Lublin – Polonia*, section c, vol. LXVI, 1, 135-142, 2011

W dużej części moich badań zajmowałam się analizowaniem roli poszczególnych proteaz w procesie patogenezy bakterii *P. aeruginosa*. Wykazałam między innymi, że natywna elastaza B bierze czynny udział w degradacji peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej indukowanych po zakażeniu w hemolimfie owadów. Ponieważ enzym ten jest dostępny w postaci preparatu komercyjnego, przeprowadziłam szereg eksperymentów mających na celu sprawdzenie wrażliwości białek/peptydów hemolimfy

G. mellonella, przede wszystkim apolipoforyny III i peptydów przeciwbakteryjnych na komercyjną elastazę B. Ustaliłam, że polipeptydy o masie cząsteczkowej 6,5 oraz 4 kDa były degradowane po inkubacji z elastazą B, dzięki czemu potwierdziłam wyniki uzyskane po zastosowaniu elastazy B oczyszczonej z płynu pochodzącego bakterii metodą chromatografii jonowymiennej. Ciekawe rezultaty uzyskałam badając wrażliwość apoLp-III na elastazę B bakterii *P. aeruginosa*. Stosując metodę immunoblotingu z użyciem przeciwciał przeciwko apoLp-III *G. mellonella* oraz elektroforezę dwukierunkową, wykazałam, że białko o masie 18 kDa, odpowiadające apoLp-III, było bardzo efektywnie degradowane przez badaną metaloproteazę. Wydaje się, że elastaza B podobnie jak proteaza IV może być istotnym czynnikiem wirulencji przeprowadzającym skutecznie proteolityczną degradację tego białka. Zmniejszenie ilości apoLp-III w hemolimfie może mieć wpływ na przebieg zakażenia upośledzając odpowiedź immunologiczną owadów. Rezultaty te wymagają jeszcze dodatkowego potwierdzenia przy użyciu natywnej elastazy B. Wyniki tych badań zostały zamieszczone w pracy:

- **Andrejko Mariola**, Mizerska-Dudka Magdalena, Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase B on level and activity of immune proteins/peptides of *Galleria mellonella* hemolymph. Journal of Insect Science, 12 (88), 2012.

Niezależnie od pracy badawczej nad indukcją i przełamaniem reakcji obronnych owada przez zewnątrzkomórkowe proteazy patogenów, zajmuję się zagadnieniami dotyczącymi zanieczyszczenia środowiska oraz jego skutkami na zdrowie człowieka. Od wielu lat prowadzę wykłady z przedmiotu Toksykologia środowiska, do którego opracowałam swój autorski program. Efektem tych zainteresowań są napisane we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie i SGGW w Warszawie dwie monografie, tj.:

- Andrejko Dariusz, **Andrejko Mariola**, Zanieczyszczenia żywności. Źródła i oddziaływanie na organizm człowieka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 2009. ISBN 978-83-7259-179-1.
- **Andrejko Mariola**, Czarniecka-Skubina Ewa, Andrejko Dariusz, Kluza Franciszek, Zawiślak Kazimierz, Głuszak Andrzej, Pacek Mariusz, Zagrożenia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 2012. ISBN 978-83-7259-204-0.

Tematyka poruszana w obu opracowaniach skupia się wokół zanieczyszczeń żywności oraz niebezpieczeństw z tym związanych. Scharakteryzowane w nich zostały główne grupy zanieczyszczeń, opisano ich właściwości, drogi wnikania do organizmu, mechanizmy ich

wpływu na przemiany biochemiczne, procesy fizjologiczne oraz losy w organizmie. Dużo miejsca poświęcono zagadnieniom żywności na bazie surowców genetycznie zmodyfikowanych, napromieniowaniu żywności oraz dodatkom do żywności. Całość problematyki została powiązana z ogólną charakterystyką nadzoru nad bezpieczeństwem żywności. Omówiono systemy prowadzące do zapewnienia i podniesienia tego bezpieczeństwa oraz zintegrowany system zarządzania jakością. Przedstawiono najważniejsze regulacje prawne dotyczące tych zagadnień w ustawodawstwie unijnym i krajowym.

W 2012 roku uczestniczyłam w I Ogólnopolskiej Konferencji z Zakresu Patologii Owadów, która odbyła się w Instytucie Badawczym Leśnictwa w Sękocinie Starym. Efektem tego spotkania było opracowanie monografii pt. „Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce” stanowiącej kompendium wiedzy na temat historii oraz współczesnych kierunków badań prowadzonych w kraju z zakresu patologii owadów i metod biologicznej ochrony roślin. W opracowaniu znalazły się dwa rozdziały przygotowane w Zakładzie Immunobiologii, w których jestem współautorem:

- Wojda Iwona, **Andrejko Mariola**, Cytryńska Małgorzata, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Stączek Sylwia, Taszłow Paulina, Jakubowicz Teresa, Przełamywanie mechanizmów odporności gąsienic *Galleria mellonella* przez entomopatogeny. Rozdział w monografii pt. „Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce,” 334 – 342, 2012; ISBN 978-83-62830-11-42012.
- Zdybicka-Barabas Agnieszka, Cytryńska Małgorzata, Wojda Iwona, **Andrejko Mariola**, Stączek Sylwia, Jakubowicz Teresa, Mikroskopia sił atomowych jako narzędzie do analizy oddziaływań peptydów i białek odpornościowych *Galleria mellonella* z komórkami drobnoustrojów. Rozdział w monografii pt. „Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce,” 343 – 356, 2012; ISBN 978-83-62830-11-42012.

W rozdziale zatytułowanym „Przełamywanie mechanizmów odporności gąsienic *Galleria mellonella* przez entomopatogeny” przedstawiono badania dotyczące odpowiedzi immunologicznej barciaka większego *G. mellonella* po zakażeniu bakterią *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa* lub grzybem entomopatogennym *Beauveria bassiana*. Wyniki potwierdzają, że owady są wygodnym modelem do testowania wrodzonych mechanizmów odporności gospodarza oraz interakcji jakie zachodzą pomiędzy zainfekowanym organizmem a patogenem. Szczególnie istotne jest poznanie, w jaki sposób bakterie i grzyby są w stanie przełamywać bariery immunologiczne swoich gospodarzy. Wiedza ta może przyczynić się

z jednej strony do opracowania sposobów zwalczania infekcji u ludzi z drugiej zaś do wykorzystania naturalnych i bezpiecznych dla ludzi sposobów ochrony naszych upraw.

Drugi rozdział omawianej monografii nosi tytuł: „Mikroskopia sił atomowych jako narzędzie do analizy oddziaływań peptydów i białek odpornościowych *Galleria mellonella* z komórkami drobnoustrojów.” Mikroskop sił atomowych (AFM) jest idealnym narzędziem wykorzystywanym w badaniach zmian ultrastruktury powierzchni bakterii i grzybów, zachodzących pod wpływem działania różnych biologicznie aktywnych cząsteczek, w tym peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Na podstawie obrazów otrzymanych dzięki AFM stwierdzono, że pod wpływem apoLp-III powierzchnia wrażliwych komórek bakterii Gram-dodatnich *Bacillus circulans* stała się niejednorodna i porowata, a kapsuły otaczające komórki oraz rzęski widoczne na obrazach kontrolnych nie były obserwowane po inkubacji z badanym białkiem. Ponadto, obserwowano utratę cytoplazmy z komórek, co powodowało wzrost chropowatości powierzchni a zostało potwierdzone pomiarami szorstkości. Również powierzchnia komórek bakterii Gram-ujemnych *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium* pod wpływem apoLp-III była wyraźnie zmieniona w stosunku do bakterii kontrolnych. W obecności apoLp-III zanikał charakterystyczny wygląd powierzchni komórek *K. pneumoniae* przypominający korę mózgową, komórki traciły regularny kształt, a na powierzchni pojawiały się głębokie bruzdy. Ponadto, zanotowano zanikanie struktur przypominających kapsuły oraz obserwowano wyraźne uszkodzenia powierzchni w postaci dziur na biegunach komórek. Dzięki możliwościom AFM wykazano, że apoLp-III oddziałuje nie tylko z komórkami bakterii lecz także wywołuje zmiany u drożdży *Candida albicans* i *Zygosaccharomyces marxianus* oraz grzybów strzępkowych *Fusarium oxysporum*. Szczegółowe badania oddziaływań peptydów i białek odpornościowych *G. mellonella* z komórkami drobnoustrojów prowadzone z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych dostarczają ważnych informacji o funkcjonowaniu odpowiedzi humoralnej owadów.

Sumaryczny *impact factor* – IF ww. publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania: 3,177

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: 153

PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

W najbliższym czasie moje badania naukowe nadal będą skupiać się na poznaniu mechanizmów patogenezы po zakażeniu bakterią *P. aeruginosa*, na wyjaśnieniu fizjologicznych aspektów interakcji gospodarz – patogen (*G. mellonella* - *P. aeruginosa*) a także procesów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej owada. Obecnie zajmuję się przede wszystkim określeniem roli w patogenezie alkalicznej proteazy *P. aeruginosa*. W tych eksperymentach wykorzystuję stosowane do tej pory przeze mnie trzy szczepy *P. aeruginosa*, tj.: entomopatogeny 27853, oraz dwa kliniczne. Planuję uzyskać enzymy metodą nadekspresji w komórkach *E. coli*, co pozwoli otrzymać białko enzymatyczne w ilościach wystarczających do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów. Alkaliczne proteazy trzech szczepów zostaną scharakteryzowane pod względem biochemicznym, szczególny nacisk zostanie położony na zbadanie termostabilności tych proteaz, ponieważ w badaniach wstępnych zwróciła moją uwagę wyjątkowa odporność na temperaturę (ponad 90°) enzymu wytwarzanego przez kliniczny szczep PA 02/18. Badania te będą przedmiotem grantu, który zostanie przeze mnie złożony do Narodowego Centrum Nauki w grudniu 2013 roku.

Marcela Ambeyko