mgr Paulina Taszłow Lublin, 25.04.2017

Zakład Immunobiologii

Instytut Biologii i Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Modulacja humoralnej odpowiedzi immunologicznej barciaka większego (*Galleria mellonella*) w przebiegu zakażenia bakteriami *Bacillus thuringiensis***

Modulation of humoral immune response of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) during infection with bacteria *Bacillus thuringiensis*

**Streszczenie**

Owady są grupą zwierząt, których układ immunologiczny działa jedynie w oparciu o mechanizmy odporności wrodzonej. Cechę tę niejednokrotnie przekuwano w zaletę, między innymi podczas prowadzenia badań nad mechanizmami odporności nieswoistej, w których wykorzystywano różnych przedstawicieli gromady *Insecta*. Jedna z gałęzi immunologii bezkręgowców poświęcona jest korelacjom, jakie występują pomiędzy poziomem aktywności układu immunologicznego, a warunkami środowiska oddziałującymi na zainfekowany organizm. Czynnikami wpływającymi na zjawiska odpornościowe owadów mogą być: urazy mechaniczne, dostępność składników odżywczych, temperatura otoczenia, a także przebyte lub trwające infekcje. Badania prowadzone z wykorzystaniem owadów pokazują, że temperatura środowiska oraz wcześniejsze zakażenie nieletalną dawką patogenu mogą wpływać na rozwijanie odpowiedzi immunologicznej (przykładowe prace o tej tematyce: Adamo, 1998; Blanford i Thomas, 1999; Konkel i Tilly, 2000; Arthurs i Thomas, 2001; Elliot i in., 2002; Thomas i Blanford, 2003; Ouedraogo i in., 2003; Bundey i in., 2003; Sadd i Schmid-Hempel, 2006; Pham i in., 2007; Linder i in., 2008; Roth i in., 2009; Rodrigues i in., 2010; Catalán i in., 2012; Anderson i in., 2013; Wu i in., 2015; Wu i in., 2016). Jednak czy wspomniane czynniki, działające na organizm owada zanim zostanie on zainfekowany, mogą modulować poziom odpowiedzi immunologicznej w razie następującej później inwazji patogenu?

W ramach niniejszej pracy badano przebieg odpowiedzi immunologicznej larw barciaka większego *Galleria mellonella* na zakażenie bakteriami *Bacillus thuringiensis*, po uprzedniej ekspozycji tych owadów na: działanie podwyższonej temperatury lub kontakt z patogenem. W pracy skupiono się na humoralnej części mechanizmów odporności. Stopień pobudzenia układu immunologicznego określano w oparciu o parametry takie jak: aktywność przeciwbakteryjna wykrywana w hemolimfie oraz ekspresja genów kodujących białka i peptydy odpornościowe w ciele tłuszczowym.

Poziom aktywności przeciwbakteryjnej określano na podstawie zdolności składników hemolimfy do hamowania wzrostu bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli* D31) oraz Gram-dodatnich (*Bacillus* *circulans*). Strefy zahamowania wzrostu bakterii badano nie tylko w pełnej hemolimfie (metodą dyfuzyjną), ale także wokół niektórych peptydów obecnych w hemolimfie poddanej wcześniej rozdziałowi elektroforetycznemu (metodą bioautografii). W pełnej hemolimfie sprawdzano ponadto zdolność do rozkładu peptydoglikanu bakteryjnego *Micrococcus* *lysodeikticus* (tzw. aktywność typu lizozymu) oraz aktywność oksydazy fenolowej. Ogólnie rzecz ujmując, parametry te świadczą o sile pobudzenia układu immunologicznego gąsienic *G. mellonella* przez dany immunogen. Poziom aktywności odpornościowej wykrywanej w hemolimfie larw barciaka większego analizowano w odniesieniu do ekspresji genów kodujących białka i peptydy wykazujące działanie przeciwbakteryjne lub rozpoznające i opsonizujące patogen. Wśród nich wymienić należy cekropinę, gallerymycynę, galiomycynę, peptyd anionowy II, inhibitor metaloproteinaz IMPI, hemolinę oraz apolipoforynę III. Ekspresję tych polipeptydów określano na podstawie ilości transkryptów mRNA, wykrywanych za pomocą odwrotnej transkrypcji i Real-Time qPCR w ciele tłuszczowym badanych owadów. Dodatkowo porównywano profile białkowe hemolimfy gąsienic *G. mellonella*, a do ich uzyskania stosowano rozdział jedno- i dwukierunkowy (SDS-PAGE i IEF SDS-PAGE) oraz rozdział białek niskocząsteczkowych i peptydów (tzw. elektroforezę trycynową). W obrazach jednokierunkowych sprawdzano także ilość apolipoforyny III, w tym celu używano specyficznych przeciwciał rozpoznających to białko (metoda immunodetekcji).

Na podstawie danych uzyskanych w ramach niniejszej pracy można stwierdzić, że zarówno zmiana warunków temperaturowych, jak i wcześniejsze doświadczenie immunologiczne, mogą w istotny sposób modulować odporność gąsienic *G. mellonella* w czasie infekcji wywołanej przez bakterie *B. thuringiensis*. Przy czym w zależności od stosowanego immunomodulatora (podwyższonej temperatury lub wcześniejszego kontaktu z patogenem), zmianom podlegały różne parametry odpowiedzi humoralnej. Ekspozycja larw barciaka większego na działanie podwyższonej temperatury bezpośrednio przed aplikacją patogenu, powodowała zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej w pełnej hemolimfie - w porównaniu do poziomu obserwowanego u gąsienic zakażonych, hodowanych stale w temperaturze optymalnej. Dostrzeżono korelację tych prawidłowości ze wzmożoną ekspresją genów kodujących peptydy odpornościowe (cekropinę, gallerymycynę i galiomycynę) w ciele tłuszczowym gąsienic poddawanych stresowi cieplnemu przed zakażeniem, w odniesieniu do ekspresji tych genów u larw infekowanych i przetrzymywanych w warunkach optymalnych. Doświadczenie stresu cieplnego bezpośrednio przed iniekcją *B. thuringiensis* nie powodowało zmian w ekspresji genu kodującego IMPI, jak również genu kodującego apoLp-III w ciele tłuszczowym badanych gąsienic. Natomiast uprzedni kontakt układu immunologicznego gąsienic *G. mellonella* z komórkami patogenu, zwiększał poziom aktywności przeciwbakteryjnej generowanej w odpowiedzi na ponowną infekcję. Efekt ten nie wynikał jednak z podwyższonej ekspresji genów kodujących wybrane peptydy odpornościowe (cekropinę, gallerymycynę i galiomycynę). Podczas analizy aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy owadami mającymi kontakt z *B. thuringiensis* po raz pierwszy, a zakażanymi ponownie. Wykazano natomiast, że efekt modulowania wybranych aspektów humoralnej odpowiedzi larw *G. mellonella* na skutek ich wcześniejszej styczności z patogenem, zależny był od dawki oraz wirulentności bakterii *B. thuringiensis*. Zjawisko zwiększonej odporności gąsienic barciaka większego na ponowną infekcję powiązano z tzw. piętnowaniem odporności (ang. *immune priming*), które wiąże się z wykształcaniem swego rodzaju „pamięci immunologicznej” u owadów mających ponowny kontakt z patogenem.

Prezentowane badania stanowią cenny wkład w wiedzę dotyczącą modulacji odporności owadów przez czynniki środowiskowe. Niniejsza praca ukazuje, że funkcjonowanie układu odpornościowego owadów jest wypadkową oddziaływań różnorodnych czynników środowiskowych na poszczególne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej.

**Słowa kluczowe:** *G. mellonella*, *B. thuringiensis*, modulacja odpowiedzi immunologicznej, stres temperaturowy, piętnowanie odporności (ang. *immune priming*)

**Literatura:**

* Adamo S.A., 1998, The specificity of behavioural fever in the cricket *Acheta domesticus*, *Journal of Parasitology*, 84, s.: 529-533
* Anderson R.D., Blanford S., Jenkins N.E., Thomas M.B., 2013, Discriminating fever behavior in house flies, *PLoS ONE*, 8 (4), nr artykułu e62269, s.: 1-4
* Arthurs S., Thomas M.B., 2001, Effect of dose, pre-mortem host incubation temperature and thermal behaviour on host mortality, mycosis and sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. acridum in *Schistocerca gregaria*, *Biocontrol* *Science and Technology*, 11, s.: 411-420
* Blanford S., Thomas M.B., 1999, Host thermal biology: the key to understanding host–pathogen interactions and microbial pest control?, *Agricultural and Forest Entomology*, 1, s.: 195-202
* Bundey S., Raymond S., Dean P., Roberts S.K., Dillon R.J., Charnley A.K., 2003, Eicosanoid involvement in the regulation of behavioral fever in the desert locust *Schistocerca* *gregaria*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 52 (4), s.: 183-192
* Catalán T.P., Wozniak A.,Niemeyer H.M.,Kalergis A.M., Bozinovic F., 2012, Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge, *Journal of Insect Physiology*, 58, s.: 310–317
* Elliot S.L., Blanford S., Thomas M.B., 2002, Host–pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269, s.: 1599–1607
* Konkel M.E., Tilly K., 2000, Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes, *Microbes and Infection*, 2, s.: 157-166
* Linder J.E., Owers K.A., Promislow D.E.L., 2008, The effects of temperature on host–pathogen interactions in *D. melanogaster*: Who benefits?, *Journal of Insect Physiology*, 54,s.: 297–308
* Ouedraogo R., Cusson M., Goettel M., Brodeur J., 2003, Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, s.: 103-109
* Pham L.N., Dionne M.S., Shirasu-Hiza M., Schneider D.S., 2007, A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes, *PLoS* *Pathogens*, 3 (3), numer artykułu e26, s.: 1-8
* Rodrigues J., Brayner F.A., Alves L.C., Dixit R., Barillas-Mury C., 2010, Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes, *Science*, 329 (5997), s.: 1353-1355
* Roth O., Sadd B.M., Schmid-Hempel P., Kurtz J., 2009, Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276 (1654), s.: 145-151
* Sadd B.M., Schmid-Hempel P., 2006, Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure, *Current Biology*, 16, s.: 1206-1210
* Thomas M.B., Blanford S., 2003, Thermal biology in insect–parasite interactions, *Trends in Ecology and Evolution*, 18, s.: 344-350
* Wu G., Xu L., Yi Y., 2016, *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionatal cellular and humoral immuneresponses, *Immunology Letters*, 174, s.: 45-52
* Wu G.Q., Yi Y.H., 2015, Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria* *mellonella* larvae, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 167, s.: 131-139