

Interakcje gospodarz-patogen w przebiegu zakażenia barciaka większego (*Galleria mellonella*) grzybami *Beauveria bassiana* i *Candida albicans*

Streszczenie w języku polskim

Badania interakcji gospodarz-patogen są ważnym przedmiotem zarówno nauk stosowanych (medycyny, weterynarii, fitopatologii), jak i niezbędnym warunkiem zrozumienia biologii żywych organizmów oraz ich ewolucji. Wykorzystanie owadów, takich jak gąsienice barciaka większego *Galleria mellonella*, jako organizmów modelowych ma szereg zalet: nie ma etycznych ograniczeń na ich stosowanie, jak jest to w przypadku kręgowców; krótki cykl rozwojowy i łatwość namnażania pozwalają przeprowadzać eksperymenty na dużej liczbie osobników oraz śledzić procesy w obrębie kilku generacji; brak nabytych mechanizmów odpornościowych (homologicznych do tych, jakimi dysponują kręgowce) pozwala na skupienie się na wrodzonej odpowiedzi owadów – ewolucyjnym korzeniu wrodzonych mechanizmów odpornościowych ssaków (Vilmos i Kurucz, 1998). W naturze organizmy są ciągle narażane na działanie zmieniających się czynników środowiskowych. Koncepcja „trójkąta chorobowego” postuluje proces infekcyjny jako funkcję genotypu gospodarza, patogenu oraz warunków środowiskowych (Horsfall i Cowling, 1980). Wiadomo, że zarówno abiotyczne, jak i biotyczne czynniki są w stanie znacznie zmieniać przebieg choroby (przykłady: Springate i Thomas, 2005; Bergin i in., 2006; Fallon i in., 2011; Richards i in., 2017).

Przedmiotem niniejszej pracy było zbadanie reakcji odpornościowej gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu grzybami *Beauveria bassiana* i *Candida albicans* oraz mechanizmów wpływu na przebieg infekcji wybranych czynników. Wymienione patogeny grzybowe zostały wybrane ze względu na oczekiwane odmienności w interakcji z gospodarzem. *B. bassiana* jest entomopatogenem, którego z *G. mellonella* łączy trwały proces antagonistycznej koewolucji. *C. albicans* natomiast jest oportunistycznym patogenem człowieka, zdolnym do zakażenia owadów w razie dostania się do hemocelu. Przy zakażeniu tym grzybem oczekiwano uruchamiania mechanizmów ogólnej reakcji odpornościowej.

Do określenia reakcji na zakażenie zostały zastosowane takie parametry jak aktywność odpornościowa hemolimfy larw, a mianowicie aktywność przeciwgrzybowa, przeciwbakteryjna i typu lizozymu oraz poziom ekspresji genów kodujących białka i peptydy o znaczeniu immunologicznym, w tym: peptydy odpornościowe, owadzi inhibitor metaloproteinaz oraz cząsteczki uczestniczące w rozpoznawaniu patogenów. Ponadto analizowano profile białkowe hemolimfy oraz dokonano analizy histologicznej zakażonych larw w celu ustalenia charakteru kolonizacji ciała gospodarza przez badane grzyby. W poszczególnych przypadkach analizowano modulację reakcji odpornościowej przez czynnik abiotyczny, którym była podwyższona temperatura, wywołująca szok termiczny, lub czynnik biotyczny, czyli poprzedni kontakt z nieletalną dawką patogenu.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy pozwoliły wykryć odmierności w przebiegu zakażenia grzybami *B. bassiana* i *C. albicans*. Chociaż oba patogeny po dostaniu się do organizmu gospodarza indukowały ekspresję genów kodujących białka i peptydy odpornościowe, w zaawansowanym stadium infekcji *B. bassiana* obserwowano zmniejszenie poziomu ekspresji niektórych genów, co mogło być związane z działaniem czynników wirulencji oraz z obserwowaną mechaniczną destrukcją organu, odpowiedzialnego za syntezę białek i peptydów – ciała tłuszczowego. Otrzymane wyniki oraz dane literaturowe wskazują również na odmierności we wpływie czynników środowiskowych na przebieg infekcji spowodowanej tymi dwoma patogenami. Krótkotrwałe działanie szoku cieplnego na larwy barciaka zwiększało ich odporność na zakażenie *B. bassiana* (Wojda i in., 2009), ale nie *C. albicans* (Walczak, 2017). W niniejszej pracy została wykryta korelacja między pozytywnym wpływem szoku cieplnego na przeżywalność larw zakażonych *B. bassiana* oraz wyższym poziomem ekspresji genu kodującego apolipoforynę III – wielofunkcyjne białko, uczestniczące m.in. w zwalczaniu i rozpoznawaniu patogenów.

Zjawisko piętnowania immunologicznego polega na wzmocnieniu odporności przy powtórny kontakcie z patogenem. Wyraża się to przede wszystkim zwiększoną przeżywalnością tzw. piętnowanych osobników. Jest to funkcjonalny analog nabytej odporności kręgowców (Little i Kraaijeveld, 2004). W niniejszej pracy piętnowanie immunologiczne zostało wybrane jako czynnik biotyczny, modulujący reakcję odpornościową. Wiadomo, że podanie nieletalnej dawki *C. albicans* powodowało zwiększenie odporności larw barciaka większego na powtórne zakażenie letalną dawką tego grzyba (Bergin i in., 2006). Natomiast w przypadku *B. bassiana* nie udało się uzyskać dawki nieletalnej, to znaczy

piętnować układ odpornościowy *G. mellonella* żywymi komórkami tego patogenu. Podanie termicznie zabitych komórek nie spowodowało zwiększenia odporności larw na powtórne zakażenie. W pracy podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu zjawiska piętnowania immunologicznego barciaka większego grzybami *C. albicans*. W tym celu zbadano humoralną reakcję odpornościową larw mających pierwszy oraz powtórny kontakt z *C. albicans*. Uzyskane wyniki wskazują na zdolność *G. mellonella* do modyfikacji swojej reakcji odpornościowej po powtórny kontakt z patogenem, przy czym, wbrew oczekiwaniom, dobę po drugim zakażeniu nie zaobserwowano zwiększenia syntezy peptydów i białek odpornościowych w porównaniu z larwami niepiętnowanymi, czyli takimi, które zostały narażone na kontakt z grzybem po raz pierwszy. Natomiast reakcja odpornościowa piętnowanych larw wykazała większą specyficzność wobec *C. albicans*, co zostało potwierdzone brakiem obserwacji zjawiska piętnowania heterologicznego, to znaczy takiego, kiedy gąsienice *G. mellonella* po podaniu nieletalnej dawki *C. albicans* zostały zakażone innym patogenem. Dokonane obserwacje pozwoliły przypuścić, że zjawisko piętnowania związane jest ze zmianą arsenału syntetyzowanych białek i peptydów odpornościowych w taki sposób, że uzyskana reakcja odpornościowa jest bardziej skuteczna przeciw *C. albicans*.

Badania, prezentowane w niniejszej pracy, rozszerzają obecną wiedzę na temat interakcji gospodarz-patogen oraz wpływu na te interakcje wybranych czynników. Wykryte zostały nowe, prawdopodobne mechanizmy zwiększenia odporności larw *G. mellonella* zakażonych grzybem *B. bassiana* pod wpływem szoku cieplnego oraz po piętnowaniu ich układu odpornościowego nieletalną dawką *C. albicans*.

Słowa kluczowe: *G. mellonella*, *B. bassiana*, *C. albicans*, interakcje gospodarz-patogen, modulacja reakcji odpornościowej, szok cieplny, piętnowanie immunologiczne