

## Streszczenie w języku polskim

„Humoralna odpowiedź odpornościowa gąsienic *Galleria mellonella* na zakażenie bakterią *Pseudomonas aeruginosa*”

Zwiększająca się lekooporność drobnoustrojów jest jednym z głównych zagrożeń dla zdrowia publicznego. Poszukiwanie nowych leków wymaga dokładnego poznania mechanizmów patogenezы bakterii opornych na antybiotyki. Jednym z takich patogenów jest Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*), która wytwarza liczne czynniki zjadliwości, m. in. enzymy proteolityczne. Gąsienice barciaka większego (*Galleria mellonella*) są coraz częściej stosowanym organizmem modelowym w badaniach dotyczących patogenezы i czynników wirulencji bakterii. Wrodzony układ odpornościowy owadów i ssaków wykazuje wysoki stopień strukturalnej i funkcjonalnej homologii. Warto wspomnieć, że wykazano pozytywną korelację w wirulencji *P. aeruginosa* modelach ssaków oraz bezkręgowców. W walce z drobnoustrojami organizm owada uruchamia mechanizmy odpowiedzi humoralnej, w których ważną rolę odgrywają peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz układ oksydazy fenolowej.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe zwane peptydami odpornościowymi są syntetyzowane w odpowiedzi na zakażenie głównie w ciele tłuszczowym oraz w hemocytach. Do aktywacji układu oksydazy fenolowej dochodzi w wyniku konwersji zymogenu profenolooksydazy (proPO) do oksydazy fenolowej (PO) przeprowadzanej przez enzym aktywujący profenolooksydazę (PPAE, ang. *prophenoloxidase activating enzyme*). Produktem końcowym reakcji katalizowanej przez oksydazę fenolową jest melanina, która wspomaga organizm gospodarza w walce z patogenami.

Podjęte badania miały na celu prześledzenie wybranych aspektów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella* po zakażeniu gąsienic dwoma szczepami bakterii *P. aeruginosa* (entomopatogennym i izolatem klinicznym) oraz po iniekcji do hemocelu bakteryjnego czynnika wirulencji – alkalicznej proteazy. Stosowane w badaniach szczepy bakteryjne wytwarzają różny zestaw zewnątrzkomórkowych proteinaz. Alkaliczną proteazę oczyszczano z płynu pochodzącego z szczepu klinicznego bakterii *P. aeruginosa* metodą chromatografii jonowymiennej i potwierdzono jej obecność

w otrzymanej frakcji chromatograficznej metodą LC-MS-MS/MS oraz metodą immunoblotting'u.

Za pomocą metody dyfuzji radialnej oraz metody bioautografii wykazano, że zakażenie owadów bakterią *P. aeruginosa* powoduje zwiększenie zarówno aktywności przeciwbakteryjnej, jak i przeciwgrzybowej w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*. Wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie był związany między innymi z indukcją syntezy niskocząsteczkowych peptydów odpornościowych. W badaniach przeanalizowano także profil białkowo-peptydowy w ekstraktach hemolimfy zakażonych gąsienic z zastosowaniem różnych technik elektroforetycznych (Tricine SDS-PAGE i IEF SDS-PAGE) oraz chromatografii RP-HPLC. Po raz pierwszy wykazano, że zakażenie owadów pałeczką ropy błękitnej powodowało indukcję syntezy sześciu peptydów odpornościowych, których ilość istotnie wzrastała wraz z rozwojem bakteriemii. Już po 8 godzinach od zainfekowania gąsienic zwiększał się poziom trzech peptydów, tj. Gm defensyny, peptydu anionowego-1 oraz peptydu bogatego w prolinę-2, natomiast po 15 godzinach wzrastała ilość trzech kolejnych peptydów a mianowicie cekropino-D-podobnego, moricino-B-podobnego oraz peptydu bogatego w prolinę-1. Poziom konstytutywnie obecnych w hemolimfie peptydów, takich jak peptyd anionowy-2, apolipoforycyna oraz Gm gallerimycyna nie ulegał zmianie po zakażeniu owadów badanym patogenem. Ponadto po 15 godzinach od iniekcji bakterii w badanych ekstraktach wyraźnie zwiększyła się ilość dysmutazy ponadtlenkowej odgrywającej ważną rolę w zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych w organizmie.

Po immunizacji gąsienic niewielką dawką alkalicznej proteazy *P. aeruginosa* obserwowano podobny zestaw peptydów w ekstraktach z hemolimfy, w porównaniu do peptydów zidentyfikowanych po zakażeniu owadów. Ponadto w wyniku przeprowadzonych badań z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej oraz elektroforetycznej zaobserwowano aktywację układu oksydazy fenolowej w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* immunizowanych alkaliczną proteazą w pierwszych godzinach od iniekcji. Jednak po około 15 godzinach dochodziło do zależnego od dawki, prawie całkowitego zahamowania aktywności oksydazy fenolowej. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że alkaliczna proteaza nie wpływa na zaktywowaną oksydazę fenolową, ale wyraźnie hamuje proces aktywacji proPO. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że rola alkalicznej proteazy podczas zakażenia zależy od stanu zaawansowania infekcji. Z jednej strony enzym jest w stanie zapoczątkować wystąpienie

reakcji immunologicznych, a z drugiej przełamać humoralną odpowiedź odpornościową gąsienic *G. mellonella*.

Barciak większy *G. mellonella* okazał się przydatnym organizmem modelowym do badań reakcji składających się na odpowiedź odpornościową owadów oraz do testowania patogenności i czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*. Poznanie interakcji zachodzących w układzie gospodarz-opportunista patogen może przyczynić się do odkrycia potencjalnego celu terapeutycznego do walki z zakażeniem wywołanym przez pałeczkę ropy błękitnej, tj. hamowanie aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych.

**Słowa kluczowe:** układ oksydazy fenolowej, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, *Galleria mellonella*, alkaliczna proteaza, *Pseudomonas aeruginosa*