

STRESZCZENIE

Składniki ściany komórkowej grzybów odgrywają kluczową rolę w interakcji pomiędzy patogenem a organizmem gospodarza. Część z nich stanowi struktury molekularne PAMPs (ang. *pathogen associated molecular patterns*), które rozpoznawane są przez odpowiednie receptory PRRs (ang. *pattern recognition receptors*) gospodarza. Jednym z polisacharydowych składników ściany komórkowej wielu gatunków grzybów patogennych dla człowieka, w tym z rodzajów: *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* i *Coccidioides*, jest α -1,3-glukan. Jego rola w indukcji odpowiedzi immunologicznej nie jest do końca wyjaśniona. Alfa-1,3-glukan opisywany jest jako cząsteczka, której obecność w ścianie komórkowej grzybów chroni je przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy gospodarza, poprzez maskowanie położonych w głębszych warstwach ściany cząsteczek uznawanych za PAMPs, ale nieliczne doniesienia naukowe wskazują na immunomodulacyjny charakter tego polisacharydu.

Z uwagi na fakt, że mechanizmy odporności wrodzonej ssaków i owadów wykazują wysoki stopień strukturalnego i funkcjonalnego podobieństwa, w badaniach dotyczących patogenów grzybowych, jak również odpowiedzi immunologicznej na składniki ich ściany komórkowej, wykorzystywane są owadzie organizmy modelowe. Jednym z nich jest barciak większy *Galleria mellonella*, stosowany w badaniach wirulencji grzybów, m. in.: *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, jak również w badaniach przebiegu odpowiedzi odpornościowej na podanie składników ich ściany komórkowej, np. β -1,3-glukanu.

Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących roli α -1,3-glukanu w indukcji odpowiedzi immunologicznej owadów, w ramach niniejszej pracy prześledzono reakcje odpornościowe gąsienic *G. mellonella* po podaniu tego polisacharydowego składnika ściany komórkowej *Aspergillus niger*. Celem badań było sprawdzenie, czy α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ immunologiczny *G. mellonella*, a także, czy jego obecność w hemocelu uruchamia odpowiedź komórkową oraz mechanizmy odpowiedzi humoralnej, takie jak aktywacja układu oksydazy fenolowej i synteza peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Białka hemolimfy gąsienic *G. mellonella*, które oddziaływały z α -1,3-glukanem *A. niger* zidentyfikowano po sekwencjonowaniu metodą degradacji Edmana, a także stosując spektrometrię mas oraz immunoblotting z wybranymi przeciwciałami. W celu określenia, czy układ immunologiczny gąsienic reaguje na podanie α -1,3-glukanu, oceniano poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie metodą dyfuzji radialnej wobec

Escherichia coli oraz *A. niger*. Aktywność przeciwbakteryjną potwierdzano metodą bioautografii. Celem wykazania różnic w profilach białkowo-peptydowych hemolimfy gąsienic *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem, przeprowadzono jednokierunkowe i dwukierunkowe rozdziały elektroforetyczne białek i peptydów w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, 2D IEF/SDS-PAGE). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe pojawiające się w hemolimfie *G. mellonella* w odpowiedzi na α -1,3-glukan *A. niger* identyfikowano po sekwencjonowaniu metodą degradacji Edmana, a zmiany ich poziomu w hemolimfie określano po rozdzielaniu z wykorzystaniem chromatografii RP-HPLC. Indukcję ekspresji genów wybranych peptydów odpornościowych (galiomycyna, gallerimycyna, cekropina, owadzi inhibitor metaloproteaz) w ciele tłuszczowym *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu analizowano z wykorzystaniem Real-Time qPCR. Oceniano ponadto udział białek konstytutywnie występujących w hemolimfie, lizozymu i apolipoporyny III (apoLp-III), w odpowiedzi na α -1,3-glukan *A. niger*. Wpływ immunizacji α -1,3-glukanem na poziom apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* określano metodą immunoblottingu, a lokalizację apoLp-III w hemocytach oceniano metodami immunocytochemicznymi z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko temu białku. Indukcję odpowiedzi komórkowej na podanie α -1,3-glukanu *A. niger* określano poprzez analizę zmian w hemocytogramie gąsienic *G. mellonella* oraz analizę procesu nodulacji.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, że α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ odpornościowy gąsienic *G. mellonella*, prawdopodobnie z udziałem receptorów rozpoznających β -1,3-glukan (β GRPs), które wiązały się do tego polisacharydu. Wśród białek hemolimfy *G. mellonella*, które oddziaływały z α -1,3-glukanem *A. niger*, zidentyfikowano ponadto: apolipoporynę I, apolipoporynę II, prooksydazę fenolową, czynnik aktywujący oksydazę fenolową, heksamerynę, aryloforynę oraz proteazę serynową podobną do peptydaz innych przedstawicieli rzędu Lepidoptera. Wykazano, że w reakcji na rozpoznanie α -1,3-glukanu *A. niger* dochodzi do indukcji ekspresji genów peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym *G. mellonella*, a w szczególności do znacznego wzrostu ekspresji genów peptydów przeciwgrzybowych, galiomycyny i gallerimycyny. Konsekwencją tego był wzrost poziomu peptydów przeciwgrzybowych w hemolimfie, m. in. galiomycyny, warunkujący pojawienie się aktywności przeciw *A. niger* w hemolimfie *G. mellonella*. Wykazano zahamowanie aktywności układu oksydazy fenolowej, jednego z pierwszych mechanizmów uruchamianych w odpowiedzi na zakażenie, w krótkim czasie po podaniu gąsienicom α -1,3-glukanu *A. niger*, prawdopodobnie na skutek wiązania profenolooksydazy oraz proteaz serynowych biorących udział w jej aktywacji, do tego

polisacharydu. Stwierdzone zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* po podaniu α -1,3-glukanu wskazują na jej udział w odpowiedzi na ten składnik ściany komórkowej grzybów, choć najprawdopodobniej nie jest ona zaangażowana w przekazywanie sygnału o obecności α -1,3-glukanu do hemocytów, gdyż nie wykazano wiązania się apoLp-III do tego polisacharydu. O uruchomieniu odpowiedzi komórkowej *G. mellonella* po immunizacji α -1,3-glukanem *A. niger* świadczyły zmiany w całkowitej liczbie hemocytów oraz zmiany udziału hemocytów poszczególnych typów, a także formowanie nodul.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują, że α -1,3-glukan *A. niger* jest rozpoznawany przez układ odpornościowy gąsienic *G. mellonella*, a w reakcji na ten składnik ściany komórkowej grzybów uruchamiana jest szczególnie odpowiedź przeciwgrzybowa. Alfa-1,3-glukan może zatem odgrywać rolę cząsteczki PAMP grzybów. Z drugiej strony, podanie α -1,3-glukanu *A. niger* powodowało przejściowe hamowanie reakcji odpornościowych owada, w tym aktywności oksydazy fenolowej, co może wskazywać, że pełni on rolę czynnika wirulencji *A. niger*.

Sylwia Mucel