Streszczenie w języku polskim

Znajomość mechanizmów interakcji gospodarz–patogen pozwala na zrozumienie molekularnej roli poszczególnych elementów układu odpornościowego owada i czynników wirulencji patogenu, a także przyczynia się do rozwoju nauk przyrodniczych, medycznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych (Suesdek, 2019; Grether i Okhamoto, 2022). Barciak większy *Galleria mellonella* jest modelem doświadczalnym wykorzystywanym w badaniach naukowych z dziedziny immunobiologii, w tym w analizie molekularnych interakcji z patogenami (Cook i McArthur, 2013). Z kolei *Pseudomonas entomophila* to szczep bakteryjny wyizolowany z przewodu pokarmowego muszki owocowej *Drosophila melanogaster.* Zsekwencjonowanie genomu bakterii ujawniło, że koduje on szereg potencjalnych czynników wirulencji, w tym możliwe związki przeciwowadzie (Vodovar i in., 2006). Do zakażenia bakteriami *P. entomophila* dochodzi drogą pokarmową lub wskutek uszkodzenia kutykuli. Dotychczas przeprowadzone badania skupiały się jedynie na ogólnym poznaniu mechanizmu zakażenia *D. melanogaster* (Dieppois i in., 2015). Nie przeprowadzono badań pozwalających szczegółowo zbadać mechanizmy interakcji nowopoznanej bakterii z owadzim gospodarzem.

Badania podjęte w ramach niniejszej pracy miały na celu prześledzenie interakcji pomiędzy larwami *G. mellonella*, a bakteriami *P. entomophila.* Analizowano przeżywalność larw, oraz zmiany zachodzące w organizmie zakażonych owadów. Obserwowano spadek przeżywalność zwierząt, która zmniejszała się wraz ze wzrostem dawki zakaźnej bakterii. Na podstawie analizy krzywych przeżywalności, wytypowano dwie dawki zakaźne tj. 10^3 CFU *P. entomophila* (tzw. niższa dawka bakterii) oraz 10^5 CFU *P. entomophila* (tzw. wyższa dawka bakterii), które posłużyły do dalszych badań.

Analiza histologiczna przekrojów poprzecznych jelit larw *G. mellonella* wykazała, że nasilenie infekcji jest skorelowane z dawką bakterii jaką podawano owadom i zwiększa się proporcjonalnie do czasu upływającego od zakażenia. Obserwowano destrukcję jelita w zaawansowanym stadium. Prześledzenie wybranych aspektów humoralnej reakcji odpornościowej wskazało, że aktywność przeciwbakteryjna w pełnej hemolimfie pojawia się jedynie po zakażeniu owadów niższą dawką bakterii, jednak na podstawie rozdziału elektroforetycznego białek niskocząsteczkowych hemolimfy oraz analizy ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazano, że obecne są one w obu grupach badawczych i posiadają właściwości przeciwbakteryjne. O aktywacji reakcji odpornościowej owadów, po podaniu

każdej z dawek bakterii świadczyła indukcja ekspresji analizowanych genów, zarówno na poziomie lokalnym (w jelitach), jak i systemowym (w ciele tłuszczowym). Nie zaobserwowano jednorodnej tendencji ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe w odniesieniu do relacji między dawką a poziomem ekspresji genów.

Przeprowadzono analizę i identyfikację wybranych związków bioaktywnych w hemolimfie owadów zakażonych bakteriami i zbadano właściwości wybranych białek niskocząsteczkowych i peptydów. Wśród nich, zidentyfikowano szereg białek i peptydów, w tym całkowicie nieznane, lub takie, których rola w reakcji odpornościowej owadów nie była określona. Szczególną uwagę zwrócono na białka i peptydy, których ilość zmniejszała się po zakażeniu wyższą dawką bakterii względem grupy zakażonej niższą dawką, co było zbieżne z obserwacjami dotyczącymi braku aktywności przeciwbakteryjnej w pełnej hemolimfie larw zakażonych wyższą dawką bakterii. Grupa ta stanowiła najliczniejszą spośród wszystkich analizowanych. W hemolimfie zidentyfikowano m.in.: peptyd prolinowy 1, nieznane białko–produkt genu LOC1135102370 (białko 32), oraz lizozym, które brały udział w reakcji odpornościowej owadów, na co wskazywał wzrost ekspresji genów kodujących badane białka i peptydy. W przypadku białka 32 obserwowano spadek jego ilości po zakażeniu wyższą dawką w porównaniu do pozostałych grup (porównawczej i po niższej dawce), mimo że ekspresja genu wykazywała wyższy poziom po zakażeniu wyższą dawką bakterii. Białko 32 może być więc celem czynników wirulencji *P. entomophila*. Ponadto, wykazano że peptyd prolinowy 1, białko 32 oraz lizozym wykazują aktywność przeciw bakteriom *P. entomophila* w warunkach *in vitro*. Ponadto, w hemolimfie zakażonych owadów wykazano obecność białka *Gm cationic protein 8* (GmCP8), polipeptydu receptorowego owadów, działającego jako opsonina. Poziom ekspresji genu kodującego białko GmCP8 oraz jego ilość była na tym samym poziomie we wszystkich grupach, niezależnie od zakażenia bakteriami. Przeprowadzone badania wykazały, że białko to posiada *in vitro* aktywność przeciwdrobnoustrojową, a także prowadzi do zmian topografii i właściwości nanomechanicznych powierzchni komórek patogenów. Uzyskane wyniki wskazują na rolę białka GmCP8 w reakcjach odpornościowych *G. mellonella.* W analizowanym materiale wykryto także dwa polipeptydy należące do grupy białek wiążących odoranty (ang. *odorant binding protein*), których rola w reakcji odpornościowej *G. mellonella* nie była dotąd poznana. Pierwsze z nich, białko Ebsp3 (*Ejaculatory bulb–specific protein 3–like isoform X1*), posiada zdolność do wiązania feromonów. Obserwowano wzrost ekspresji genu kodującego Ebsp3 jedynie w materiale pobranym od owadów zakażonych niższą dawką *P. entomophila* co odpowiadało analizie ilości białka Ebsp3 w ekstraktach hemolimfy po zakażeniu entomopatogenem. Analiza właściwości

przeciwdrobnoustrojowej *in vitro*, wskazała, że posiada ono aktywność przeciw wybranym mikroorganizmom w bardzo niskich stężeniach, a charakter jego działania jest cytostatyczny. Ponadto, wykazano że inkubacja białka Ebsp3 z płynem pohodowlanym *P. entomophila* prowadzi do degradacji polipeptydu, co może świadczyć o jego ważnej roli w odporności *G. mellonella.* Białko to, jest prawdopodobnie „celem" czynników wirulencji *P. entomophila.* W przypadku białka OBP7, drugiego z analizowanych polipeptydów należącego do grupy wiążących odoranty, notowano wzrost ekspresji genu w grupach stymulowanych zakażeniem oraz jego aktywność przeciwdrobnoustrojową *in vitro.* Jednak, w ekstraktach hemolimfy ilość białka OBP7 ulegała obniżeniu wraz ze zwiększeniem dawki zakaźnej *P. entomophila.* Przedstawione wyniki wskazują, że białko OBP7 także może stanowić jeden z potencjalnych celów wirulencji entomopatogenu.

Przeprowadzone badania pozwoliły na prześledzenie mechanizmu zakażenia larw *G. mellonella* przez bakterie *P. entomophila* i potwierdziły entomopatogenne właściwości badanego mikroorganizmu. W toku przeprowadzonych analiz udało się zidentyfikować szereg mało znanych białek i peptydów *G. mellonella,* poznać ich rolę w reakcji odpornościowej i potencjał przeciwdrobnoustrojowy.

Jakub Kowalczyk