

MODULACJA HUMORALNEJ ODPOWIEDZI ODPORNOŚCIOWEJ GĄSIENIC *GALLERIA MELLONELLA* PRZEZ ENZYMY PROTEOLITYCZNE BAKTERII *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mariola Andrejko^{1*}

¹ Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS

Wpłynęło w październiku 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy. 3. Wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na zakażenie *P. aeruginosa*. 4. Wpływ proteaz *P. aeruginosa* na reakcje immunologiczne gąsienic *G. mellonella*. 4.1. Układ oksydazy fenolowej. 4.2. Lizozym (muramidaza, glikohydrolaza mukopeptydowa, EC 3.2.1.17). 4.3. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (peptydy odpornościowe). 4.4. Apolipoforyna III (apoLp-III). 5. Podsumowanie

Modulation of the humoral immune response in *Galleria mellonella* larvae by proteolytic enzymes produced by *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract: The greater wax moth *G. mellonella* is a useful model organism for investigations of pathogenicity and identification of *P. aeruginosa* virulence factors. Strains differing in the protease profiles elicit different responses of the *G. mellonella* immune system to infection. The immune response depends on the bacterial strain used and the composition of the bacterial culture medium. Proteases in the initial phase of infection activate the immune system (involving increased lysozyme synthesis, induction of synthesis of immune peptides and metalloproteinase inhibitors, and altered apolipoprotein III levels), thereby increasing the antibacterial activity of insect hemolymph. As bacteraemia progresses, they overcome the humoral immune response of the host by inhibiting the phenoloxidase activity, degradation of immune peptides and apolipoprotein III. Different proteases exhibit different involvement in the degradation of key elements of insect immune response and/or proteins, while immune peptides display varied sensitivity to proteolytic activity. Elastase B has a double role during infection: it is an inducer of immune response (involving induction of antimicrobial peptide synthesis and metalloproteinase inhibitors, and increasing expression and activity of lysozyme and the level of apolipoprotein III) and a virulence factor involved in the degradation of antimicrobial peptides. Increased quantities and activity of lysozyme in the hemolymph of larvae infected with the *P. aeruginosa* indicates that lysozyme is not very sensitive to the activity of bacterial proteases. Induction of synthesis of humoral immune response factors in *G. mellonella* larvae in the presence of metalloproteinases (elastase B) implies the “danger” resistance model in this organism.

1. Introduction. 2. Greater wax moth *Galleria mellonella* as a model system. 3. Sensitivity of *G. mellonella* larvae to infection with *P. aeruginosa*. 4. Effect of *P. aeruginosa* proteases on *G. mellonella* immune response. 4.1. Phenoloxidase system. 4.2. Lysozyme (muramidase, mucopolysaccharide glycohydrolase, EC2.2.1.17). 4.3. Antimicrobial peptides (immune peptides). 4.4. Apolipoprotein-III. 5. Summary

Słowa kluczowe: enzymy proteolityczne *Pseudomonas aeruginosa*, humoralna odpowiedź immunologiczna *Galleria mellonella*, owad modelowy

Key words: humoral immune response of *Galleria mellonella*, model host, *Pseudomonas aeruginosa* proteolytic enzymes

1. Wstęp

Bakteria *Pseudomonas aeruginosa* jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Naturalnym miejscem występowania tej bakterii są gleba, woda, ścieki, powietrze, powierzchnia roślin, organizmy ludzi i zwierząt. Jest groźnym oportunistycznym patogenem człowieka. U ludzi z upośledzoną odpornością, wywołuje zakażenia układu oddechowego (zwłaszcza u osób z mukowiscydozą), zakażenia ran, układu moczowego, kości, stawów, skóry oraz zapalenie rogówki. Małe wymagania odżywcze, różnorodne mechanizmy oporności na antybiotyki, niewrażliwość na stosowane powszechnie środki dezynfekcyjne, łatwość rozprzestrzeniania się w środowisku wodnym

sprawiają, że bakteria *P. aeruginosa* należy do najpowszechniejszych i najgroźniejszych czynników etiologicznych wielu postaci zakażeń szpitalnych. Warunkiem efektywnego leczenia infekcji spowodowanych pałeczką *Pseudomonas* jest dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za chorobotwórczość tej bakterii.

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* charakteryzują się szeregiem mechanizmów i czynników warunkujących zjadliwość tego organizmu. Czynniki te można podzielić na związane z powierzchnią komórki bakteryjnej: lipopolisacharydy (LPS), fimbrie, rzęski, śluz, lektyny oraz uwalniane na zewnątrz komórki: egzotoksynę A, egzoenzymy S, T, U i Y, enzymy proteolityczne, neuraminidazę, fosfolipazę hemolityczną i niehemolityczną oraz barwnik piocyjaninę. Enzymy proteolityczne

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; e-mail: mariola.andrejko@poczta.umcs.lublin.pl

warunkują inwazyjność i rozprzestrzenianie się patogenu (degradacja tkanek, liza komórek), modulację mechanizmów odpowiedzi odpornościowej gospodarza (degradacja czynników immunologicznych, aktywacja cytotoksycznych mediatorów gospodarza) a także aktywację toksyn bakteryjnych. Pałeczki *Pseudomonas* wytwarzają co najmniej cztery proteazy zewnątrzkomórkowe: elastazę B (LasB), elastazę A (LasA), serynową proteazę IV oraz alkaliczną proteazę [17].

U ludzi elastaza B jest ważnym czynnikiem wirulencji w infekcjach układu oddechowego, zakażeniach rogówki, tkanki łącznej i skóry po oparzeniach [64]. Uszkodzenie tkanek gospodarza związane jest z degradacją elastyny i kolagenu typu IV jak również z aktywacją tkankowych metaloproteaz (MMP's) [62, 79]. Obserwowano ponadto udział tej proteazy w modulacji mechanizmów odpowiedzi odpornościowej gospodarza przez degradację m.in. immunoglobulin IgA i IgG, białek surfaktantu SP-A i SP-D, elementów układu dopełniacza (C5a i C3) oraz peptydów antybakteryjnych (α -defensyn i LL-37) [61, 78]. Należąca do metaloproteaz elastaza A, degraduje elastynę, zwiększa aktywność elastolityczną elastazy B poprzez modyfikację substratu, dzięki czemu jest zaangażowana w rozwój infekcji rogówki i chronicznych infekcji układu oddechowego [72]. Serynowa proteaza IV o masie cząsteczkowej 26 kDa jest aktywna wobec składników układu dopełniacza C3 i C1, immunoglobuliny IgG, plazminogenu, fibrynogenu. Enzym ten degraduje również komórki nabłonkowe rogówki, przez co stanowi ważny czynnik etiologiczny zakażeń rogówki. Alkaliczna proteaza (AP) odgrywa istotną rolę w rozwoju zapalenia rogówki, bakteriemii, infekcji ucha środkowego, zakażeń układu oddechowego u chorych na mukowiscydozę. AP degraduje składniki układu dopełniacza C1q i C3, fibrynogen, fibrynę, lamininę, jak również interferon (INF- γ) i czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) [17].

W badaniach patogenności i czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa* stosowane są organizmy modelowe takie jak *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oraz coraz częściej barciak większy *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Ten ostatni organizm wydaje się być niedoceniany przez wielu badaczy choć należy odnotować, że w ciągu 12 lat (od 2000 do 2012 roku) ponad 7-krotnie wzrosła ilość oryginalnych prac dostępnych w bazie Web of Science, opisujących badania wirulencji ludzkich patogenów z użyciem gąsienic *G. mellonella* [29]. Pomimo tego, niewiele jest publikacji dotyczących zależności w układzie gospodarz (*G. mellonella*) – patogen (*P. aeruginosa*). Dokładne poznanie mechanizmów patogenyzy bakterii *P. aeruginosa*, jest ważne ze względu na opracowanie skutecznych sposobów unieszkodliwienia tego groźnego patogenu. Natomiast poznanie procesów składających się na wrodzoną odpowiedź odpornościową owada może

przyczynić się do odkrycia nowych skutecznych metod zwalczania szkodników. Poniższe opracowanie dotyczy molekularnych i biochemicznych aspektów interakcji tych dwóch organizmów, ze szczególnym uwzględnieniem roli bakteryjnych enzymów proteolitycznych w procesie indukowania i przełamania odpowiedzi odpornościowej gąsienic barciaka większego.

2. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy

Barciak większy w naturalnych warunkach jest szkodnikiem pasiek. Jest organizmem kosmopolitycznym, łatwo namnaża się na sztucznych pożywkach a koszty hodowli dużej liczby owadów są niskie. Gąsienice mają względnie duży rozmiar (12–20 mm), co umożliwia stosunkowo łatwą iniekcję badanych patogenów a także pobieranie próbek np. hemolimfy, ciała tłuszczowego i in. Znacznym ułatwieniem dla eksperymentatora jest możliwość precyzyjnego zaaplikowania dokładnej ilości komórek mikroorganizmów, miejscowo, *per os* czy też przez iniekcję, co jest utrudnione u większości gospodarzy nie będących ssakami. Dodatkową zaletą jest możliwość uzyskania wyników w krótkim czasie, nawet w ciągu 24–48 godzin. Ponadto, hodowla barciaka w laboratorium może być prowadzona w zakresie temperatur od 25 do 37°C, co jest istotne ze względu na udowodniony wpływ temperatury na wytwarzanie czynników wirulencji przez drobnoustroje [19, 36, 45, 83]. Należy podkreślić, że w ostatnich latach zwrócono uwagę na duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pomiędzy wieloma składnikami wrodzonej odporności ssaków i owadów. Dlatego też, użycie bezkręgowców jako organizmu modelowego jest wskazane szczególnie gdy celem badań są interakcje pomiędzy patogenem a wrodzonym układem odpornościowym gospodarza, ponieważ owady nie mają odporności nabytej, opartej na limfocytach pamięci immunologicznej, które powstały u kręgowców podczas ewolucji. Wirulencja wielu patogenów jest podobna u gąsienic *G. mellonella* i ssaków, włączając człowieka, dlatego też poznanie mechanizmów regulujących funkcjonowanie układu odpornościowego owadów może dostarczyć cennych informacji na temat wrodzonego układu odpornościowego ssaków [45, 50, 83].

Chociaż genom barciaka większego *G. mellonella* nie został dotychczas zsekwencjonowany, w laboratoriach na całym świecie coraz chętniej stosuje się gąsienice barciaka większego *G. mellonella* jako alternatywny organizm modelowy w badaniach:

- interakcji patogen-gospodarz,
- mechanizmu patogenyzy drobnoustrojów (w tym mikroorganizmów patogennych dla człowieka),

- czynników wirulencji drobnoustrojów,
- skuteczności leków terapeutycznych.

Barciak większy *G. mellonella* okazał się przydatnym modelem mini gospodarza w badaniach infekcji patogennymi grzybami, jak również odpowiedzi odpornościowej gospodarza po zakażeniu tymi drobnoustrojami, a także do testowania skuteczności substancji przeciwko grzybom [19, 83]. Jak podkreśla wielu autorów, owad ten zapewnia wyjątkową możliwość jednoczesnego zbadania molekularnych mechanizmów patogenności grzybów oraz działania środków przeciugrzybowych. Szczególnie obiecujące rezultaty otrzymano stosując gąsienice *G. mellonella* w badaniach infekcji takimi grzybami jak *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. czyli gatunkami ważnymi ze względu na szerokie rozprzestrzenienie i częstość występowania zakażeń u ludzi. W większości badań stwierdzono znaczącą korelację pomiędzy wirulencją tych organizmów u barciaka oraz u modelowych organizmów ssaków. Należy zaznaczyć, że istotną zaletą gąsienic *G. mellonella* w przypadku badań infekcji patogennymi grzybami jest możliwość wykonywania eksperymentów w temperaturze fizjologicznej ssaków, co jest niemożliwe w przypadku innych modeli bezkręgowych, u których doświadczenia są standardowo wykonywane w temperaturze 22–30°C.

Gąsienice *G. mellonella* są z powodzeniem stosowane do analizowania patogenności drożdży z gatunku *C. albicans*. Na przykład, uszeregowano szczepy *Candida* według wzrastającej zjadliwości w stosunku do gąsienic *Galleria*, co w dużym stopniu odpowiada wirulencji szczepów obserwowanej u ssaków, w tym u człowieka [24]. W badaniach tych wykorzystywano m.in. obserwacje zmian w gęstości hemocytów występujących w hemolimfie owadów. Otrzymane wyniki sugerują, że bakterie patogenne powodują wyraźny spadek ilości hemocytów podczas gdy szczepy niepatogenne tylko nieznacznie zmieniają ilość tych komórek. Zaobserwowano też, że o stopniu zjadliwości badanych szczepów mogą świadczyć zmiany w ekspresji wybranych przeciwdrobnoustrojowych peptydów pojawiających się w hemolimfie zakażonego owada. Ponadto wykazano, że pre-ekspozycja na drożdże chroni gąsienice przed letalną infekcją *C. albicans*, co jest związane z większą ekspresją peptydów przeciwdrobnoustrojowych w organizmie owada [13, 14]. Wykorzystanie *G. mellonella* pozwoliło zidentyfikować wiele czynników wpływających na wirulencję mutantów *C. albicans* [33].

Gąsienice *G. mellonella* są stosowane w badaniach korelacji pomiędzy produkcją toksyn a wirulencją grzyba z gatunku *A. fumigatus*. Na przykład, owady stosowano do ustalenia roli gliotoksyny, metabolitu który wykazuje immunosupresyjną i apoptotyczną aktywność w stosunku do efektorowych komórek odpornościowych w warunkach *in vitro* [74]. Wyka-

zono również, że zjadliwość grzybów wobec gąsienic barciaka jest zależna od stadium kiełkowania konidiów, co jest związane z różnicami w skuteczności przebiegu procesu fagocytozy [75].

Stwierdzono, że te same geny ulegają ekspresji w czasie zakażenia grzybem *C. neoformans* ssaków oraz gąsienic *G. mellonella*, co może ułatwić badania czynników wirulencji *in vivo* oraz skuteczności terapii przeciugrzybowej. Można wymienić kilka genów takich jak CAP59, GRA1, RAS1, PKA1 uznanych za istotne w procesie infekcji ssaków, pełniących jak się okazało podobną rolę w interakcji z układem odpornościowym *Galleria* [83]. W jednym z wielu badań dotyczących działania czynników przeciugrzybowych, testowano działanie dwu antybiotyków amfoterycyny B i flucytozyny do zwalczania infekcji *C. neoformans*. Okazało się, że zastosowanie mieszanki antybiotyków jest skuteczniejsze i znacznie przedłuża życie gąsienic *G. mellonella* w porównaniu z terapią z użyciem jednego antybiotyku [65].

Gąsienice *Galleria* są wrażliwe zarówno na kliniczne jak i środowiskowe szczepy grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz podobnie jak w przypadku wcześniej opisanych gatunków grzybów, zaobserwowano pozytywną korelację w szybkości uśmiercania owadów oraz myszy przez ten mikroorganizm. Ponadto okazało się, że gąsienice skuteczniej i szybciej zamierają w temperaturze 30°C w porównaniu z temperaturą 37°C, dlatego też wyciągnięto wniosek, że na efektywność działania grzybów *Fusarium* oprócz takich czynników jak rodzaj szczepu, dawka konidiów, którą infekowane są zwierzęta, duży wpływ ma temperatura w jakiej rozwija się zakażenie [23].

Barciak większy *G. mellonella* jest wrażliwy na szereg bakterii patogennych dla człowieka, dlatego też jest wykorzystywany w badaniach czynników wirulencji tych mikroorganizmów, oraz do testowania skuteczności przeciwbakteryjnej różnych antybiotyków. Owad uznany został za alternatywny model organizmu-gospodarza do badania przebiegu infekcji różnych gatunków *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Wykazano związek zmniejszonej wirulencji Bcc ze zwiększoną przeżywalnością gąsienic *G. mellonella* kiedy porównywano odpowiednio zmutowany szczep Bcc do szczepu dzikiego [81, 83]. Mutanty *B. mallei* mające mniejszą zjadliwość w przypadku chomików i myszy wykazują podobnie obniżoną zjadliwość w stosunku do gąsienic *G. mellonella*. Ponadto, udało się zidentyfikować trzy nowe geny wirulencji, stąd wykorzystanie gąsienic barciaka daje możliwość szybkiej i precyzyjnej identyfikacji genów w przypadku *B. mallei*, *B. pseudomallei* i innych patogenów [77].

Celem kolejnych przykładowych badań, w których stosowane są gąsienice *G. mellonella* jest analiza czynników wirulencji, szczególnie enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez *Enterococcus faecalis*.

Zaobserwowano, że bakteria produkuje metaloproteinazy niszczące czynniki układu odpornościowego obecne zarówno w hemolimfie barciaka jak i w ludzkiej surowicy. Na przykład, pozakomórkowa żelatynaza (GelE) degradowuje indukowane peptydy odpornościowe (cekropiny), które odgrywają kluczową rolę w obronie gospodarza we wczesnej fazie zakażenia bakteryjnego. Przepuszczalnie GelE może też odgrywać istotną rolę w patogenezie enterokoków u ludzi. Natomiast, nie stwierdzono wpływu proteaz serynowych (SprE) wytwarzanych przez bakterię *E. faecalis* na składniki układu odpornościowego zarówno u owadów jak i u ludzi [70, 83].

Gąsienice *G. mellonella* wykorzystywane są w badaniach patogenezy bakterii *Yersinia pseudotuberculosis*, głównie w badaniach interakcji patogenu z fagocytami. Został skonstruowany mutant mający mutacje w genie dla dysmutazy nadadtlenkowej (*sodC*), wykazujący większą wrażliwość na nadtlenki w porównaniu ze szczepem dzikim. Wykazano, że w temperaturze 37°C, bakterie mają obniżoną zdolność do kolonizacji organizmu owada, podobnie ich działanie jest osłabione w stosunku do myszy. Ponadto, wyniki tych testów przyczyniły się do potwierdzenia istotnej roli dysmutaz nadadtlenkowych w przełamaniu odporności komórkowej podczas zakażenia zarówno organizmu owada jak i ssaka [20].

Kolejnym przykładem zastosowania *G. mellonella* są badania dotyczące przebiegu infekcji bakterii *Streptococcus*. Autorzy zaobserwowali prawie liniową pozytywną korelację pomiędzy dawkami LD₅₀ tej bakterii u gąsienic *G. mellonella* oraz u myszy infekowanych różnymi klinicznymi szczepami *Streptococcus* [51, 68].

Gąsienice *G. mellonella* są też coraz częściej wykorzystywane w badaniach aktywności przeciwbakteryjnej różnych antybiotyków wobec wielu bakterii patogenych m.in. *Acinetobacter baumannii* czy *Francisella tularensis*. Zamieszczone poniżej przykładowe badania ilustrują potencjał *G. mellonella* jako wygodnego układu do wstępnego testowania skuteczności antybiotyków przed ich zastosowaniem w modelowych organizmach ssaków.

Po zainfekowaniu owadów referencyjnym szczepem bakterii *A. baumannii* zaobserwowano, że liczba zabitych gąsienic zależy nie tylko od podanej dawki bakterii ale i od poinfekcyjnej temperatury inkubacji. W temperaturze 37°C uzyskano zdecydowanie wyższą śmiertelność owadów niż w temperaturze 30°C. Ponadto stwierdzono, że zastosowanie antybiotyków mających aktywność *in vitro* w stosunku do zakażających szczepów bakterii znacznie wydłużało przeżycie gąsienic barciaka w porównaniu z antybiotykami, na które bakteria jest oporna [71].

Barciak większy jest stosowany do testowania aktywności przeciwbakteryjnej antybiotyków w warunkach *in vivo* w przypadku jednego z groźniejszych dla ludzi

patogenów bakteryjnych *Francisella tularensis* LVS, bakterii będącej przyczyną tularemii. Zastosowanie terapii antybiotykami takimi jak ciprofloksacyna, lewofloksacyna oraz streptomycyna przed lub po inokulacji bakterii znacznie przedłużało okres przeżycia owadów [11].

Jednymi z pierwszych, którzy opublikowali wyniki badań dotyczące patogenezy oraz czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*, w których użyte zostały gąsienice barciaka byli m.in. Aston i wsp. [12], Chadwick i Aston [18], Lysenko [47–48, 52–55], Lysenko i Kučera [56]. Niszczenie hemocytów w hemolimfie *G. mellonella* przez proteinazę *P. aeruginosa* zaobserwowali Madziara-Borusewicz i Lysenko [58]. Należy jeszcze wspomnieć o badaniach dotyczących toksyczności proteazy *P. aeruginosa* dla gąsienic barciaka oraz badaniach, w których wykazano różnice w patogenności mutantów LPS *P. aeruginosa* [32, 44].

W ostatnich latach coraz częściej, stosuje się gąsienice *G. mellonella* w badaniach dotyczących mechanizmów patogenezy bakterii *P. aeruginosa*. Między innymi, zaobserwowano korelację pomiędzy wzrostem wartości dawki LD₅₀ oszacowanej na podstawie śmiertelności gąsienic barciaka większego a zwiększoną przeżywalnością myszy zakażonych różnymi mutantami klinicznego szczepu *Pseudomonas* (PA14) [43].

Inni badacze stosują gąsienice *G. mellonella* w badaniach dotyczących roli oraz komponentów systemu sekrecji typu III (TTSS) w patogenezie *P. aeruginosa*. Stwierdzono m.in. że główną rolę w zabijaniu barciaka odgrywają białka efektorowe ExoT i ExoU, które wykazują również toksyczność w stosunku do komórek jajnika chomika chińskiego linii komórkowej CHO [63]. Gąsienice *G. mellonella* stosowane są również jako model badawczy do wyjaśnienia fizjologicznych aspektów interakcji gospodarz-patogen (*G. mellonella* – *P. aeruginosa*) a także procesów składających się na wrodzoną odpowiedź odpornościową owada [3–10]. Praca ta powstała w dużym stopniu w oparciu o badania własne, wskazujące na przydatność tego organizmu do testowania zjadliwości jak i identyfikacji czynników wirulencji *Pseudomonas*.

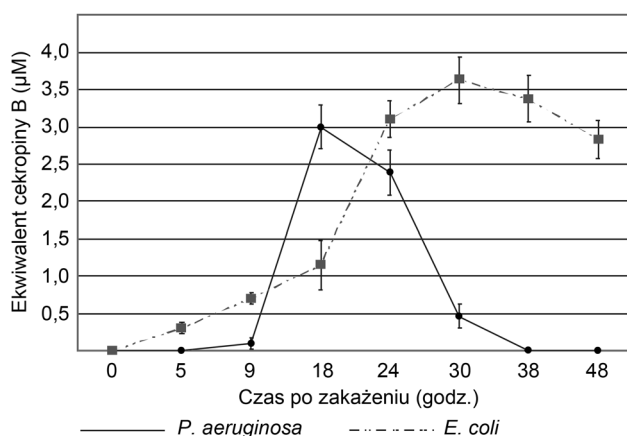
3. Wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na zakażenie *P. aeruginosa*

Zakażenie gąsienic *G. mellonella* bakteriami *P. aeruginosa* (LD₅₀ wynosi 10–20 komórek) powoduje śmierć osobników po 38–40 godzinach od infekcji. Zmarłe gąsienice są silnie zmelanizowane, tracą turgor oraz niekiedy integralność. Zaobserwowano również destrukcję tkanek i organów wewnętrznych. Po zakażeniu entomopatogennym szczepem *Pseudomonas* wytwarzającym barwnik – piocyjaninę, owady przybierają charakterystyczne niebieskozielone zabarwienie.

Należy zaznaczyć, że gąsienice przeżywają zakażenie bardzo dużymi dawkami (nawet 6×10^8) saprofitycznej bakterii *E. coli*, ponadto w tych warunkach następuje aktywacja układu odpornościowego owada. Po infekcji bakterią *P. aeruginosa* również następuje indukcja odpowiedzi odpornościowej, ale zaobserwowano wyraźne różnice w kinetyce pojawiania się i zanikania aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów zakażonych bakteriami saprofitycznymi i entomopatogennymi. Po zakażeniu gąsienic bakterią *E. coli* aktywność przeciwbakteryjna pojawia się już po 5 godzinach, natomiast po iniekcji bakterii *P. aeruginosa* aktywność jest wykrywana dopiero po 9 godzinach zakażenia. Maksymalną aktywność w przypadku entomopatogena obserwuje się po 18 godzinach, po czym następuje drastyczny spadek aktywności, aż do całkowitego jej zaniku po około 38 godzinach od zakażenia. W przypadku bakterii *E. coli* najwyższą aktywność notuje się zwykle po około 30 godzinach i na podobnym poziomie utrzymuje się w kolejnych godzinach po infekcji (rys. 1).

Na podstawie powyższych obserwacji można wywnioskować, że w ciągu pierwszych godzin zakażenia owadów bakterią *P. aeruginosa*, podobnie jak w przypadku *E. coli*, następuje aktywacja reakcji obronnych gospodarza. Następnie w miarę rozwoju infekcji, dochodzi do przełamania tych reakcji i ten etap jest charakterystyczny tylko dla zakażenia bakterią entomopatogenną. Zaobserwowano również, że w czasie trwania infekcji wyraźnie wzrasta poziom aktywności proteolitycznej w hemolimfie owada. Pojawia się w takim razie pytanie, jaką rolę w modulacji reakcji obronnych owada odgrywają enzymy proteolityczne?

Toksyczność płynów pochodzących z hodowli zawierających zewnątrzkomórkowe proteazy *P. aeruginosa*, dla gąsienic barciaka uzależniona jest od rodzaju podłoża,



Rys. 1. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu entomopatogennym szczepem ATCC 27853 *P. aeruginosa* lub bakterią saprofityczną *E. coli*. Aktywność przeciwbakteryjną oznaczano metodą dyfuzji radialnej w podłożu agarowym zawierającym bakterię wskaźnikową *E. coli* D31. Hemolimfa była zbierana po czasie od podania komórek bakterii wskazanym na wykresie. Średnia \pm SD.

w którym namnażane są bakterie. Wartości średnich dawek śmiertelnych (LD_{50}) płynów pochodzących z podłoża minimalnego – M9, okazały się kilkudziesięciokrotnie mniejsze w porównaniu do dawek LD_{50} płynów pochodzących z podłoża LB. Znacznie bardziej toksyczne są supernatanty zawierające alkaliczną proteazę, w porównaniu do tych zawierających głównie elastazę B, co może wskazywać na istotną rolę alkalicznej proteazy w przełamaniu mechanizmów obronnych owada [9]. Nie można jednak wykluczyć obecności innych czynników w płynie pochodzącym, które mogą dodatkowo zwiększać toksyczność tych preparatów. Na przykład, Miyata i wsp. [63] podkreślają znaczącą rolę ADP-rybozylotransferazy (ExoT) i fosfolipazy (ExoU) *P. aeruginosa* w zabijaniu gąsienic *G. mellonella*. Należy podkreślić, że wytwarzanie elastazy B oraz alkalicznej proteazy zarówno przez szczep entomopatogenny jak i kliniczne szczepy *P. aeruginosa* potwierdzono w warunkach *in vivo*, w zakażonych gąsienicach *G. mellonella*, co wyraźnie sugeruje, że te dwa czynniki wirulencji pełnią istotną rolę podczas infekcji bakterią *P. aeruginosa*. Analiza PCR potwierdziła obecność genu *lasB* kodującego elastazę B oraz genu *aprA* kodującego alkaliczną proteazę w genomach wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa* [8, 9].

4. Wpływ proteaz *Pseudomonas aeruginosa* na reakcje odpornościowe *Galleria mellonella*

Owady wykształciły bardzo sprawnie działający układ odpornościowy, zapewniający wysoką skuteczność obrony przeciwzakaźnej, składający się z zewnętrznych barier ochronnych, do których należą bariery fizykochemiczne i odporność behawioralna, oraz z wewnętrznych mechanizmów odpowiedzi odpornościowej (odpowiedź komórkowa i humoralna) [37]. Oparta na nieswoistej odpowiedzi odpornościowej reakcja owada na zakażenie patogenem, wykazuje wiele elementów wspólnych z występującą u człowieka. U kręgowców możemy wyróżnić dwa typy odporności: wrodzoną oraz nabytą, podczas gdy bezkręgowce jako filogenetycznie starsze dysponują tylko dobrze rozwiniętym układem odporności wrodzonej, nie wytwarzają przeciwciał jak również komórek o charakterze limfocytów. Jednakże uzyskane w ostatnich latach wyniki badań sugerują możliwość specyficznego rozpoznawania patogenów oraz funkcjonowanie mechanizmów pamięci immunologicznej u owadów i innych bezkręgowców, co może świadczyć o istnieniu alternatywnych mechanizmów odporności [25].

W badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vivo* wykazano, że szczepy *P. aeruginosa*, charakteryzujące się odmiennym profilem enzymów proteolitycznych, wywołują zróżnicowaną reakcję układu

odpornościowego *G. mellonella* w odpowiedzi na infekcję tymi bakteriami. Końcowy efekt zakażenia w każdym przypadku jest jednakowy, bakterie powodują śmierć owada po około 38–40 godzinach od iniekcji, jednak zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu odpowiedzi odpornościowej, zależne od użytego szczepu *P. aeruginosa* oraz od składu podłoża, w którym bakterie są hodowane [8]. Inni autorzy wykazali, że kliniczne izolaty *P. aeruginosa* różnią się ekspresją elastazy B i alkalicznej proteazy [80, 90]. Ponadto, odmienne czynniki wirulencji są wytwarzane w zależności od miejsca czy też czasu trwania infekcji [76]. Ekspresja wielu czynników zjadliwości, takich jak: elastaza B (*lasB*), elastaza A (*lasA*), proteaza alkaliczna (*aprA*) jest regulowana przez systemy *quorum sensing* (QS). Komórki *P. aeruginosa* dysponują dwoma systemami QS homologicznymi do LuxR1: system *las* obejmujący białka LasR i LasI i system *rhl* obejmujący białka RhlR i RhlI [89]. Duan i Surette [31] wykazali, że poziom ekspresji składników systemu *quorum sensing* jest zależny od warunków wzrostu, wpływając tym samym na ekspresję czynników zjadliwości regulowanych przez ten system np. ekspresja genu *aprA* w podłożu M9 zaczyna się już w fazie logarytmicznej podczas gdy w bogatym podłożu LB we wczesnej fazie stacjonarnej.

Odpowiedź humoralna u owadów indukowana jest w wyniku zranienia lub zakażenia organizmu. Obejmuje głównie działanie składników rozpuszczonych w hemolimfie, do których zalicza się między innymi, układ oksydazy fenolowej, lizozym, peptydy odpornościowe oraz inne białka, które oprócz podstawowych dla nich funkcji biorą udział w reakcjach obronnych organizmu, jak np. apolipoforyna III.

4.1. Układ oksydazy fenolowej

Aktywacja układu oksydazy fenolowej jest jedną z najszybszych reakcji immunologicznych organizmu owada. W układ zaangażowana jest oksydaza fenolowa typu lakazy, która bierze udział w procesach ciemnienia i twardnienia oskórka oraz gojenia ran, oraz oksydaza fenolowa typu tyrozynazy (fenolaza), która uczestniczy w rozpoznawaniu ciał obcych, tworzeniu toksycznych chinonów oraz zmelanizowanych otoczek w trakcie inkapsulacji. Aktywacja proPO następuje w rezultacie uruchomienia kaskady enzymów proteolitycznych, określanej jako układ oksydazy fenolowej lub system profenolooksydazy. Układ oksydazy fenolowej jest zespołem reakcji biochemicznych zależnych od jonów Ca^{+2} , w które zaangażowane są przynajmniej dwie proteazy serynowe. Końcową reakcją systemu proPO jest konwersja profenolooksydazy do formy aktywnej drogą ograniczonej proteolizy.

Wpływ patogenów na układ oksydazy fenolowej owada może przybierać różne formy. U gąsienic *G. mel-*

lonella zainfekowanych nicieniem *Steinernema feltiae* obserwowano zmniejszenie aktywności układu profenolooksydazy (proPo) [15]. Natomiast owadobójcze białka produkowane przez Gram-ujemne bakterie *Xenorhabdus* spp., symbionta entomopatogennych nicieni, aktywują układ proPO prowadząc do intensywnego tworzenia melaniny i w konsekwencji do śmierci owadów [91].

U gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych bakterią *P. aeruginosa* pojawiają się brunatne plamy na powierzchni ciała świadczące o aktywacji układu fenolooksydazy, który prowadzi do całkowitej melanizacji ciała w momencie śmierci. Stwierdzono, że szczepy *Pseudomonas* indukują wzrost aktywności układu profenolooksydazy w hemolimfie, ale zarówno poziom jak i kinetyka tych zmian wyraźnie zależą od użytego do infekcji szczepu bakteryjnego. W przypadku bakterii produkujących alkaliczną proteazę, notuje się wyraźny wzrost poziomu aktywności enzymu już w pierwszych 6 godzinach od zakażenia. Następnie, wraz z rozwojem bakteriemii w hemolimfie następuje stopniowy spadek aktywności oksydazy fenolowej. Warto wspomnieć, że poziom aktywności enzymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* immunizowanych zabitymi wysoką temperaturą komórkami *P. aeruginosa* okazał się zdecydowanie wyższy (nawet 4,5-krotnie) niż po iniekcji żywych bakterii [8].

Wiadomo, że warunki środowiskowe regulują ekspresję wielu czynników zjadliwości, dzięki czemu bakteria szybko adaptuje się do zmian otoczenia, na przykład wytwarzanie przez bakterię egzotoksyny A, elastazy B i alkalicznej proteazy jest uzależnione od obecności żelaza [82]. Zastosowanie do hodowli bakterii podłoży znacznie różniących się składem (bogate – LB lub minimalne – M9) może wywoływać zmiany składników powierzchniowych komórki, włącznie z czynnikami wirulencji, co z kolei może utrudniać prawidłowe rozpoznanie bakterii przez układ odpornościowy *G. mellonella* oraz spowodować odmienną reakcję układu profenolooksydazy. Rozpoznanie ciał obcych w zainfekowanym organizmie jest istotnym elementem odpowiedzi odpornościowej. U owadów w rozpoznaniu immunologiczne zaangażowane są receptory PRR (pattern recognition receptors) układu odpornościowego gospodarza, które rozpoznają powierzchniowe determinanty o określonej strukturze molekularnej (PAMPs, pathogen associated molecular patterns, wzorce molekularne związane z patogenami) zlokalizowane w ścianach komórkowych mikroorganizmów. Można przypuszczać, że wpływ na aktywność systemu proPO jest jednym z mechanizmów stosowanych przez bakterię *P. aeruginosa* do przełamania odpowiedzi odpornościowej zainfekowanych owadów. Natomiast, wykryte różnice w kinetyce i poziomie aktywności oksydazy, zależne od szczepu bakteryjnego zakażającego owada, mogą sugerować że bakteria *P. aerugi-*

nosa wykorzystuje podczas patogenezы różne czynniki wirulencji i/lub różne strategie przełamывania odporności gospodarza [8].

4.2. Lizozym (muramidaza, glikohydrolaza mukopeptydowa, EC 3.2.1.17)

Innym składnikiem hemolimfy owada, którego poziom i aktywność wzrasta podczas zakażenia bakteriynego jest lizozym. Enzym wykazuje aktywność bakteriologiczną – degraduje peptydoglikan, budujący ścianę komórkową bakterii poprzez hydrolizę wiązania β -1,4-glikozydowego. Lizozym *G. mellonella* wywiera działanie w stosunku do żywych i martwych bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak i niektórych Gram-ujemnych oraz grzybów [42, 84]. Jest białkiem odpornościowym konstytutywnie obecnym w hemolimfie na niskim poziomie a jego aktywność wzrasta gwałtownie po zakażeniu i immunizacji [60, 92]. W oparciu o doświadczenia wykonane z użyciem EWL stwierdzono, że lizozym *G. mellonella* wykazuje synergistyczne działanie z niektórymi peptydami przeciwbakteryjnymi i apolipoforyną III, obecnymi w hemolimfie owada. Aktywność muramidazowa lizozymu ułatwia dostęp peptydów antybakteryjnych do błony komórkowej bakterii [95, 96]. Obserwowano również, że w obecności lizozymu bakteria *E. coli* staje się bardziej wrażliwa na attacyny, cekropiny i defensyny [34].

Podczas zakażenia gąsienic *G. mellonella* bakterią *P. aeruginosa* zmiany poziomu aktywności lizozymu w hemolimfie są zależne od użytego do zakażenia szczepu oraz od stosowanej do hodowli drobnoustrojów pożywki. Iniekcja owadom bakterii produkujących elastazę B jak również szczepów wytwarzających zarówno elastazę B jak i elastazę A i proteazę IV, powoduje początkowo wyraźny spadek, a po około 12 godzinach od infekcji wzrost aktywności lizozymu (nawet 2-krotny w porównaniu do aktywności w hemolimfie owadów niezakażonych). W przypadku szczepów wytwarzających alkaliczną proteazę aktywność bakteriologiczna nie wykazuje istotnych zmian w porównaniu z poziomem kontrolnym. Zaobserwowany spadek aktywności lizozymu w pierwszych godzinach od zakażenia może być spowodowany mobilizacją układu odpornościowego, a tym samym zaangażowaniem lizozymu w różne mechanizmy przeciwważne [8].

Wyniki badań wskazują, że wzrost aktywności lizozymu jest skorelowany ze wzrostem jego poziomu w hemolimfie zainfekowanych owadów. Po 18–30 godzinach infekcji obserwowano nawet ponad 60% wzrost stężenia lizozymu w hemolimfie, w porównaniu z niezakażonymi owadami kontrolnymi. Dopiero po około 42 godzinach następuje stopniowy spadek stężenia lizozymu, co można tłumaczyć zahamowaniem biosyntezy enzymu spowodowanym intensywnym rozwojem bak-

terii *P. aeruginosa* w hemolimfie zakażonych gąsienic [5]. Stężenie lizozymu w hemocytach i ciele tłuszczowym gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych szczepem entomopatogennym *P. aeruginosa*, stopniowo wzrasta a następnie po 24–30 godzinach, ulega zmniejszeniu, co może być rezultatem intensywnej sekrecji tego białka z miejsca syntezy do hemolimfy, jak również osłabienia funkcji ciała tłuszczowego spowodowane rozprzestrzeniającą się infekcją bakteriyną. Wzrost zarówno stężenia jak i aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wskazuje, że enzym ten jest mało wrażliwy na działanie proteaz wytwarzanych przez bakterię podczas patogenezы [5].

Z danych literaturowych wiadomo, że metaloproteazy wytwarzane przez mikroorganizmy patogenne funkcjonują nie tylko jako czynniki wirulencji, ale również mogą uczestniczyć w mechanizmach indukcji odpowiedzi odpornościowej gospodarza [1]. Elastaza B *P. aeruginosa*, należąca do rodziny metaloproteaz podobnych do termolizyny, okazała się doskonałym induktorem odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella* powodując m.in. wzrost aktywności i poziomu lizozymu. Jednak na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić czy jest to spowodowane zwiększoną sekrecją białka z miejsc syntezy, jakimi są komórki ciała tłuszczowego i hemocyty, czy może ze zwiększoną ekspresją lizozymu [4]. Należy zaznaczyć, że w eksperymentach *in vitro*, po ekspozycji hemolimfy owadów na działanie enzymów proteolitycznych, wytwarzanych przez różne szczepy *P. aeruginosa*, aktywność lizozymu nie ulega zmianie i pozostaje na poziomie kontrolnym. Te obserwacje mogą wskazywać na obecność w hemolimfie, inhibitorów hamujących aktywność proteaz. Obecność w hemolimfie *G. mellonella* inhibitorów, które są aktywne przeciwko metaloproteazom (IMPI) jak również serynowym proteazom (ISPI) obserwowali m.in. Wedde i wsp. [85] oraz Fröblius i wsp. [35]. IMPI's wykazują aktywność w stosunku do metaloproteaz z rodziny M4 wytwarzanych przez bakterie patogenne jako czynniki wirulencji m.in. w stosunku do elastazy B *P. aeruginosa* [22]. Po iniekcji gąsienicom barciaka elastazy B następuje indukcja syntezy inhibitorów hamujących aktywność metaloproteaz na porównywalnym poziomie do termolizyny [4].

Fracje proteolityczne, które wykazują nieznaczną aktywność w warunkach *in vitro* przeciwko lizozymowi, zawierają przede wszystkim alkaliczną proteazę, co może sugerować, że właśnie ten enzym jest zaangażowany w degradację lizozymu, wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach. Natomiast proteaza serynowa *P. aeruginosa* – proteaza IV, nie powoduje degradacji lizozymu w warunkach *in vitro*, pomimo tego, że enzym zawiera w swojej strukturze 13 reszt lizyny, które mogą stanowić potencjalne miejsca cięcia dla tej proteazy [3].

4.3. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (peptydy odpornościowe)

W humoralnej odpowiedzi odpornościowej owadów, kluczową rolę odgrywają peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP's), które są aktywowane bądź syntetyzowane *de novo* głównie w ciele tłuszczowym i hemocytach, skąd są wydzielane do hemolimfy zakażonych gąsienic. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych to zazwyczaj niewielkie cząsteczki o charakterze kationowym, zawierające 12–50 aminokwasów o masie cząsteczkowej od 3 do 10 kDa. Peptydy oddziałują na ujemnie naładowaną błonę komórkową bakterii, prowadząc do utworzenia w niej kanałów i depolaryzacji a nawet fragmentacji, czego efektem jest śmierć drobnoustroju. Każdy gatunek wytwarza zazwyczaj zestaw peptydów odpornościowych zróżnicowanych pod względem właściwości biochemicznych i spektrum aktywności. U *G. mellonella* poznano jak dotąd kilkanaście peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Są wśród nich peptydy α -helikalne (cecropiny A i D, moricyny), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyna), peptydy bogate w prolinę, peptydy bogate w glicynę (głoweryny) a także peptydy anionowe [16, 26, 41, 46, 49, 59, 67, 88]. Różnice w zestawie peptydów i kinetyce ich pojawiania się w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* obserwowano po zakażeniu owadów różnymi bakteriami i grzybami [60].

W wyniku zakażenia gąsienic bakteriami *P. aeruginosa*, następuje indukcja syntezy peptydów odpornościowych, podobnie jak po iniekcji do hemocelu komórek saprofitycznej bakterii *E. coli*. W hemolimfie gąsienic obserwowano pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej, ale czas pojawienia się oraz poziom tej aktywności jest wyraźnie zależny od użytego do infekcji szczepu *Pseudomonas*. Zdecydowanie najlepszym induktorem aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie okazała się bakteria entomopatogenna (ATCC 27853), wytwarzająca cztery proteazy wykorzystywane jako czynniki wirulencji. Najwyższy poziom aktywności, odpowiadający 20 μ M cecropiny B, oceniony metodą dyfuzyjną na podstawie strefy zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowej *E. coli*, stwierdzono w hemolimfie gąsienic po 18 godzinach infekcji. Natomiast, szczepy kliniczne *P. aeruginosa* wytwarzające przede wszystkim alkaliczną proteazę, mało efektywnie indukują syntezę peptydów odpornościowych u zainfekowanych owadów. Należy zaznaczyć, że aktywność przeciwbakteryjna indukowana obecnością w hemolimfie bakterii patogennej *P. aeruginosa* okazała się zdecydowanie niższa w porównaniu z aktywnością obserwowaną po zakażeniu owadów bakterią saprofityczną *E. coli*. Ponadto, w przypadku saprofita aktywność przeciwbakteryjna pozostaje na wysokim poizo-

mie nawet po 48 godzinach po iniekcji bakterii do jamy ciała owada. Natomiast, po zakażeniu patogenem nie obserwuje się aktywności przeciwko *E. coli* w hemolimfie owadów, już po 30 godzinach [7, 8]. Pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie jest związane z syntezą peptydów o masie poniżej 6,5 kDa. Udział poszczególnych proteaz *P. aeruginosa* w indukcji peptydów odpornościowych w hemolimfie barciaka większego wymaga szczegółowych badań. Dotychczas udało się wykazać, że stymulacja humoralnej reakcji obronnej gąsienic *G. mellonella*, m.in. poprzez zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie na skutek indukcji syntezy peptydów odpornościowych ma miejsce po iniekcji do hemocelu owada elastazy B [7, 8].

Badania przeprowadzone na gąsienicach *G. mellonella* i *D. melanogaster* dowiodły, że obecność enzymów proteolitycznych jest odbierana przez organizm gospodarza jako „sygnał zagrożenia”. W wyniku aktywności proteinaz endo- i egzogennych w hemolimfie powstają fragmenty peptydowe mające zdolność do indukcji syntezy humoralnych czynników odpowiedzi immunologicznej. Proteinazy biorą też udział w bezpośredniej aktywacji kaskad sygnałowych indukujących syntezę peptydów odpornościowych. U *G. mellonella* stwierdzono, że w wyniku działania termolizyny, znanego induktora mechanizmów odpowiedzi odpornościowej, wytwarzane są fragmenty peptydowe (o masie cząsteczkowej < 3 kDa) wykazujące zdolność do indukcji humoralnych czynników odpowiedzi odpornościowej [39]. Substratem dla metaloproteinaz jest kolagen typu IV [2].

Wiadomo, że czynniki wirulencji takie jak enzymy proteolityczne, wytwarzane przez bakterie podczas zakażenia, niszczą przede wszystkim struktury ciała owada bądź osłabiają lub niszczą komórki i humoralne odczyny obronne. Na przykład, selektywna degradacja cecropin i attacyn w hemolimfie *Hyalophora cecropia* zachodzi pod wpływem proteaz wytwarzanych przez bakterie *B. thuringiensis* [28] jak również przez bakterie *Xenorhabdus nematophilus* związane mutualistycznie z nicieniami *Steinernema carpocapsae* [38]. Proteazy produkowane przez takie patogeny jak *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* degradują peptydy przeciwbakteryjne występujące u człowieka, LL-37 i α -defensyny [78]. W przypadku gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wyraźny spadek aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów po 30 godzinach infekcji, może być rezultatem proteolitycznej degradacji peptydów spowodowanej przez enzymy wytwarzane przez tę bakterię w czasie patogenezы [8].

Wrażliwość peptydów przeciwbakteryjnych *Galleria* na proteazy produkowane przez *P. aeruginosa* udowodniono w warunkach *in vitro*. Na przykład, aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie immunizowanych owadów jest całkowicie hamowana po ekspozycji na

płyny pochodzące zawierające cztery enzymy proteolityczne (elastaza A, elastaza B, proteaza IV i alkaliczna proteaza) produkowane przez szczep entomopatogeny *P. aeruginosa*. Natomiast, bakterie hodowane w podłożu minimalnym M9 i wytwarzające w tych warunkach głównie alkaliczną proteazę, mają mniejszy wpływ na aktywność przeciwbakteryjną, co wskazuje, że ten enzym tylko w niewielkim stopniu wpływa na degradację peptydów odpowiedzialnych za aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie zakażonych owadów [9, 10]. Jednym z enzymów wytwarzanych przez większość szczepów *P. aeruginosa* jest elastaza B i udział tej metaloproteazy w degradacji peptydów odpornościowych *G. mellonella* został potwierdzony w warunkach *in vitro*. Wstępnie ustalono również, że w tych warunkach peptydy przeciwbakteryjne nie są degradowane przez serynową proteazę IV [7, 8].

Przedstawione wyniki badań wskazują na zróżnicowane zaangażowanie proteaz *P. aeruginosa* w degradację peptydów odpornościowych i/lub na różną wrażliwość peptydów na proteolityczną aktywność badanych enzymów. Można również wnioskować, że pojawienie się bakterii patogennej w hemocelu owada jest sygnałem dla układu odpornościowego gospodarza do uruchomienia reakcji obronnej. Wydaje się, że w procesie patogenyzy enzymy proteolityczne mogą odgrywać odmienną rolę, co zostało wykazane na przykładzie elastazy B, w początkowej fazie infekcji powodują aktywację układu odpornościowego, tym samym zwiększając aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy zakażonego owada, następnie w miarę postępującej bakteriemii, mogą degradować niektóre białka/peptydy np. peptydy odpornościowe.

4.4. Apolipoforyna III (apoLp-III)

Apolipoforyna jest ważnym składnikiem hemolimfy owadów zaangażowanym w transport lipidów, aktywację układu odpornościowego, rozpoznawanie determinant molekularnych drobnoustrojów oraz w procesie apoptozy [69, 94]. ApoLp-III należy do rodziny wymiennych apolipoprotein opisanych zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców. Cechą wspólną tych białek jest obecność w strukturze cząsteczki amfipatycznych α -helis [66]. Synteza apoLp-III u owadów zachodzi głównie w ciele tłuszczowym, skąd białko jest uwalniane do hemolimfy. Wiadomo, że apoLp-III wiąże kwasy lipotejchowe (LTA), które są składnikami ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich, lipopolisacharyd (LPS) bakterii Gram-ujemnych, β -1,3-glukan obecny w ścianie komórkowej drożdży oraz uczestniczy w ich detoksykacji [40, 57, 73, 87]. ApoLp-III wykazuje również aktywność przeciwbakteryjną [86, 93].

Poziom apoLp-III w hemolimfie barciaka znacznie wzrasta po zakażeniu bakteriami Gram-ujemnymi,

takimi jak *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*, czy też bakterią Gram-dodatnią *Micrococcus luteus* [93]. Dane literaturowe wskazują, że białko to zwiększa aktywność bakteriolityczną lizozymu oraz bierze udział w aktywacji syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych [30]. ApoLp-III może współpracować z peptydami odpornościowymi zwiększając ich skuteczność w zwalczaniu drobnoustrojów, wzmacniać odpowiedź komórkową (fagocytoza i enkapsulacja) oraz aktywować kaskadę oksydazy fenolowej. Wyniki badań wskazują, że trzy czynniki obecne konstytutywnie w hemolimfie *G. mellonella*, takie jak apoLp-III, lizozym oraz peptyd anionowy 2 (jeden z peptydów przeciwbakteryjnych), działają synergistycznie przeciwko bakteriom. Wydaje się że, apoLp-III zwiększa enzymatyczną aktywność lizozymu, podczas gdy peptyd stymuluje nie-enzymatyczną aktywność enzymu [96].

W warunkach *in vitro* zaobserwowano wyraźną degradację apoLp-III gąsienic *G. mellonella*, po inkubacji hemolimfy owada z płynami pochodzącymi bakterii entomopatogennej *P. aeruginosa*. W tym przypadku, zmniejszenie ilości białka a nawet jego całkowita degradacja jest prawdopodobnie związane z działaniem proteazy serynowej – proteazy typu IV. ApoLp-III jest degradowana stopniowo, o czym świadczy pojawienie się w hemolimfie czterech produktów o masie cząsteczkowej 15, 13,3, 11,9 oraz 9,5 kDa (po 30 minutach) oraz tylko pojedynczego produktu degradacji o masie 5,6 kDa – po 60 minutach inkubacji. Analiza sekwencji peptydu wykazała, że produkt ten stanowi fragment apoLp-III licząc od 71 aminokwasu dojrzałego białka. Wyniki te wyraźnie wskazują, że apoLp-III *G. mellonella* jest substratem dla proteazy serynowej *P. aeruginosa*, która hydrolizuje białka po karboksylowej stronie lizyny. Analiza strukturalna apoLp-III uwidoczniła obecność 8 reszt lizyny na N-końcu (reszty 1–70) oraz 9 reszt na C-końcu (118–163), które są potencjalnymi miejscami cięcia dla proteazy IV. Fragment cząsteczki od 71 do 117 aminokwasu nie zawiera reszt lizyny a obliczona teoretycznie masa cząsteczkowa tego fragmentu wynosi około 5,515 kDa [3, 9, 10].

Po zakażeniu owada entomopatogenną bakterią *P. aeruginosa*, wraz z czasem trwania infekcji, zmienia się poziom apoLp-III w hemolimfie, hemocytach oraz w ciele tłuszczowym gąsienic *G. mellonella*. Spadek ilości apoLp-III w hemocytach i ciele tłuszczowym, obserwowany odpowiednio po 3,5 oraz 24 godzinach od zakażenia, jest prawdopodobnie rezultatem intensywniejszej sekrecji tego białka do hemolimfy, gdzie bierze udział w odpowiedzi odpornościowej. W hemolimfie, w krótkim czasie po infekcji, poziom apoLp-III wzrasta, natomiast po 24 godzinach ilość białka zmniejsza się i pojawiają się produkty degradacji o masie około 15 i 13,3 kDa, które są szczególnie dobrze widoczne po 24 godzinach od zakażenia, natomiast po 48 godzinach

dominują produkty degradacji o masie 12 i 9,5 kDa. Wyniki uzyskane w warunkach *in vivo*, w zakażonym owadzie, potwierdziły, że w proteolityczną degradację apoLp-III zaangażowana jest serynowa proteaza IV. Należy dodać, że degradacja apoLp-III i innych elementów układu odpornościowego, wydaje się być skorelowana z ogólnym wzrostem aktywności proteolitycznej w hemolimfie gąsienic zakażonych entomopatogenną bakterią *P. aeruginosa* [6]. Natomiast na podstawie wyników badań uzyskanych po zakażeniu owadów szczepami klinicznymi *P. aeruginosa*, charakteryzującymi się obniżonym poziomem ekspresji proteaz, można stwierdzić, że alkaliczna proteaza, która jest głównym enzymem produkowanym przez te bakterie, ma niewielki udział w proteolitycznej degradacji apoLp-III *G. mellonella* [8, 10].

Należy zaznaczyć, że wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie gąsienic, obserwowany w krótkim czasie po zakażeniu bakterią *P. aeruginosa* jest dowodem, że wydzielane przez patogena proteazy mogą stymulować humoralne odczyny obronne owada. Wiadomo, że u bezkręgowców indukcja mechanizmów odpowiedzi immunologicznej następuje po rozpoznaniu PAMPs, albo po rozpoznaniu cząstek sygnałowych powstałych w wyniku uszkodzenia organizmu gospodarza przez ciało obce lub w wyniku działania czynników wirulencji patogenów [21]. Istotną rolę w tym modelu indukcji odpowiedzi immunologicznej odgrywają metaloproteazy z rodziny termolizyny, do której należy elastaza B (LasB) *P. aeruginosa*. W badaniach, w których jako organizm modelowy zastosowano barciaka większego zaobserwowano, że po iniekcji do hemolimfy LasB, w subletalnej dawce, ilość apoLp-III wzrasta nawet 1,6-krotnie po 24 godzinach od iniekcji enzymu, natomiast w przypadku termolizyny obserwowano tylko 1,3-krotny wzrost w porównaniu do poziomu obserwowanego u owadów kontrolnych.

5. Podsumowanie

Barciak większy *G. mellonella* okazał się przydatnym organizmem modelowym do badań na poziomie całego organizmu jak i cząstkowych reakcji składających się na odpowiedź odpornościową owadów oraz do testowania patogenności i identyfikacji czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*.

Wyniki badań przedstawione w opracowaniu sugerują, że odmienny wpływ różnych szczepów *P. aeruginosa* na poszczególne elementy układu odpornościowego *G. mellonella* można wytłumaczyć różnym profilem enzymów proteolitycznych produkowanych przez bakterie podczas zakażenia gąsienic. W każdym przypadku efektem infekcji jest śmierć owadów, jednak zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu odpowie-

dzi odpornościowej, zależne od użytego szczepu oraz od składu podłoża, w którym bakterie są hodowane. Odmienna wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na różnorodne szczepy i mutanty najprawdopodobniej odzwierciedla różnice w wytwarzanych czynnikach wirulencji, zarówno tych związanych ze ścianą komórkową jak i sekrecyjnymi.

Enzymy proteolityczne wytwarzane przez bakterię *P. aeruginosa* w początkowej fazie infekcji powodują aktywację układu odpornościowego przez: zwiększenie syntezy lizozymu, indukcję syntezy peptydów odpornościowych i inhibitorów metaloproteaz, zmianę poziomu apolipoforyny III, tym samym zwiększając aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy zakażonych owadów. W miarę rozwoju bakteriemii przełamują humoralną odpowiedź odpornościową gospodarza przez: hamowanie aktywności układu oksydazy fenolowej, degradację peptydów odpornościowych oraz apolipoforyny III.

Poszczególne proteazy wykazują zróżnicowane zaangażowanie w degradację tych kluczowych elementów odpowiedzi odpornościowej owadów i/lub różna też jest wrażliwość białek i peptydów odpornościowych na aktywność proteolityczną. Peptydy przeciwbakteryjne są podatne na proteolizę pod wpływem elastazy B oraz w niewielkim stopniu alkalicznej proteazy. Apolipoforyna III jest substratem dla proteazy IV oraz alkalicznej proteazy. Peptydy przeciwbakteryjne są niewrażliwe na proteolizę pod wpływem proteazy IV w warunkach *in vitro*.

Elastaza B bakterii *P. aeruginosa* pełni podczas zakażenia podwójną rolę: induktora odpowiedzi odpornościowej gąsienic oraz czynnika wirulencji. Jako czynnik aktywujący mechanizmy odpowiedzi odpornościowej powoduje indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych i inhibitorów metaloproteaz, oraz zwiększenie poziomu ekspresji i aktywności lizozymu a także poziomu apolipoforyny III. Elastaza B jako czynnik wirulencji bierze udział w degradacji peptydów przeciwbakteryjnych.

Wzrost stężenia jak i aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wskazuje, że lizozym jest mało wrażliwy na działanie proteaz tej bakterii, na przykład, proteaza serynowa IV nie powoduje degradacji lizozymu w warunkach *in vitro*, pomimo tego, że enzym zawiera w swojej strukturze reszty lizyny, stanowiące potencjalne miejsca cięcia dla tej proteazy.

Wydaje się, że u *G. mellonella* w indukcję syntezy humoralnych czynników odpowiedzi odpornościowej zaangażowane są różne mechanizmy tj. zależny od obecności obcych struktur (model odporności „infectious-non self”) jak i bakteryjnych czynników wirulencji odbieranych przez organizm gospodarza jako „sygnał zagrożenia”.

Piśmiennictwo

- Altancicek B., Linder M., Linder D., Preissner K.T., Vilcinskas A.: Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activated innate immune response in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* **75**, 175–183 (2007)
- Altancicek B., Vilcinskas A.: Metamorphosis and collagen-IV-fragments stimulate innate immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 1108–1118 (2006)
- Andrejko M., Cytryńska M., Jakubowicz T.: Apolipoprotein III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Letters* **243**, 331–337 (2005)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M.: Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **107**, 16–26 (2011)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T.: Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Folia Microbiol.* **53**, 147–151 (2008a)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T.: Changes in *Galleria mellonella* apolipoprotein III level during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Invertebr. Pathol.* **97**, 14–19 (2008b)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T.: Antibacterial activity *in vivo* and *in vitro* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **152**, 118–123 (2009)
- Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* **115**, 14–25 (2014)
- Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Janczarek M., Cytryńska M.: Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim. Polonica*, **60**, 83–90 (2013)
- Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Wawrzoszek M., Cytryńska M.: Diverse susceptibility of *Galleria mellonella* humoral immune response factors to the exoprotease activity of entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zool. Sci.* **30**, 345–351 (2013)
- Aperis G., Fuchs B.B., Anderson C.A., Warner J.E., Calderwood S.B., Mylonakis E.: *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microb. Infect.* **9**, 729–734 (2007)
- Aston W.P., Chadwick J.S., Henderson M.J.: Effect of cobra venom factor on the *in vivo* immune response in *Galleria mellonella* to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* **27**, 171–176 (1976)
- Bergin D., Brennan M., Kavanagh K.: Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* **5**, 1389–1395 (2003)
- Bergin D., Murphy L., Keenan J., Clynes M., Kavanagh K.: Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect.* **8**, 2105–2112 (2006)
- Brivio M.F., Pagani M., Restelli S.: Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle. *Exp. Parasitol.* **1001**, 149–156 (2002)
- Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D.: A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 792–800 (2009)
- Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O'Callaghan R.J.: *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochem.* **290**, 330–337 (2001)
- Chadwick J.S., Vilk E.: Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **13**, 410–415 (1969)
- Chamilos G.M., Lionakis R., Lewis R., Kontogiannis D.: Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 42–55 (2007)
- Champion O.L., Cooper I.A., James S.L., Ford D., Karlyshev A., Wren B.W., Duffield M., Oyston P.C., Titball R.W.: *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*, **155**, 1516–1522 (2009)
- Chamy L.E., Leclerc V., Caldelari I., Reichhart J.M.: Sensing of “danger signals” and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways “upstream” Toll. *Nat. Immunol.* **9**, 1165–1170 (2008)
- Clermont A., Wedde M., Seitz V., Podsiadlowski L., Lenze D., Hummel M., Vilcinskas A.: Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. *Biochem. J.* **382**, 315–322 (2004)
- Coleman J.J., Muhammed M., Kasperkovitz P.V., Vyas J.M., Mylonakis E.: *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol.* **115**, 1279–1289 (2011)
- Cotter G., Doyle S., Kavanagh K.: Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 163–169 (2000)
- Cytryńska M.: O odporności bez przeciwciał. *Post. Biol. Komórki*, **36**, 309–324 (2009)
- Cytryńska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Suder P., Jakubowicz T.: Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, **28**, 533–546 (2007)
- Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Jabłoński P., Jakubowicz T.: Detection of antibacterial polypeptide activity *in situ* after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **299**, 274–276 (2001)
- Dalhammar G., Steiner H.: 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* **139**, 247–252 (1984)
- Desbois A.P., Coote P.J.: Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity of efficacy of new antimicrobial agents. *Adv. Appl. Microbiol.* **78**, 25–49 (2012)
- Dettloff M., Kaiser B., Wiesner A.: Localization of injected apolipoprotein III *in vivo* – new insights into the immune activation process directed by this protein. *J. Insect Physiol.* **47**, 789–797 (2001)
- Duan K., Surette M.G.: Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J. Bacteriol.* **189**, 4827–4836 (2007)
- Dunphy G.B., Morton D.B., Kropinski A., Chadwick J.M.: Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for larvae of *Galleria mellonella*: bacterial properties associated with virulence. *J. Invertebr. Pathol.* **47**, 48–55 (1986)
- Dunphy G.B., Oberholzer U., Whiteway M., Zakarian R.J., Boomer I.: Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Gallieriae). *Can. J. Microbiol.* **49**, 514–524 (2003)
- Engström A., Engström P., Tao Z.J., Carlsson A., Bennich H.: Insect immunity: The primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **3**, 2065–2070 (1984)

35. Fröblius A.C., Kanost M.R., Götz P., Vilcinskas A.: Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2046–2053 (2000)
36. Fuchs B., Mylonakis E.: Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 346–351 (2006)
37. Gliński Z., Jarosz J.: Zjawiska odporności przeciwważkowej u bezkręgowców. Wydawnictwo UMCS, Lublin (1997)
38. Götz P., Boman H.G., Boman A.: Interaction between insect immunity and insect pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* **212**, 333–350 (1981)
39. Griesch J., Wedde M., Vilcinskas A.: Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*, a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 461–472 (2000)
40. Halwani A.E., Niven D.F., Dunphy G.B.: Apolipoprotein-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**, 233–241 (2000)
41. Hancock R.E.W., Brown K.L., Mookherjee N.: Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiol.* **211**, 315–322 (2006)
42. Hultmark D.: Insect lysozymes (w) Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology, red. P. Jollès, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 1996, s. 87–102
43. Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M.: Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* **182**, 3843–3845 (2000)
44. Jarrell K.F., Kropinski A.M.: The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**, 395–400 (1982)
45. Kavanagh K., Reeves E.P.: Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 101–112 (2004)
46. Kim C.H., Lee J.H., Kim I., Seo S.J., Son S.M., Lee K.Y., Lee I.H.: Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Mol. Cells*, **17**, 262–266 (2004)
47. Kučera M., Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* V. Isolation and properties of the proteinases toxic for larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. *Folia Microbiol.* **13**, 288–294 (1968)
48. Kučera M., Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* VIII. Isolation of hemolymph proteins from *Galleria mellonella* larvae and their digestibility by the toxic protease. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 203–210 (1971)
49. Lee Y.S., Yun E.K., Jang W.S., Kim I., Lee J.H., Park S.Y., Ryu K.S., Seo S.J., Kim C.H., Lee I.H.: Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol. Biol.* **13**, 65–72 (2004)
50. Lionakis M.S.: *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. *Virulence*, **2**, 521–527 (2011)
51. Loh J.M.S., Adenwalla N., Wiles S., Proft T.: *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*, **4**, 419–428 (2013)
52. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. I. The pathogenicity of strain N-06 for larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 78–82 (1963)
53. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. II. A toxic substance produced in filtrates of cultures. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 83–88 (1963)
54. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. III. The effect of N-06 toxin on the oxygen consumption of *Galleria* prepupae. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 89–93 (1963)
55. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. IV. The antigenic character of the toxin produced by strain N-06. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 94–97 (1963)
56. Lysenko O., Kučera M.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. VI. The toxicity of proteinases for larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. *Folia Microbiol.* **13**, 295–299 (1968)
57. Ma G., Hay D., Li D., Asgard S., Schmidt O.: Recognition and inactivation of LPS by lipophorin particles. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 619–626 (2006)
58. Madziara-Borusiewicz K., Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. VII. The influence of toxic proteinase on hemocytes of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 138–140 (1971)
59. Mak P., Chmiel D., Gacek G.J.: Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 1191–1195 (2001)
60. Mak P., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 1129–1136 (2010)
61. Mariencheck W.I., Alcorn J.F., Palmer S.M., Wright J.R.: *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol.* **28**, 528–537 (2003)
62. Matsumoto K., Shams N.B., Hanninen L.A., Kenyon K.R.: Proteolytic activation of corneal matrix metalloproteinases by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Curr. Eye Res.* **11**, 1105–1109 (1992)
63. Miyata S., Casey M., Frank D.W., Ausubel F.M., Drenkard E.: 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* **71**, 2404–2413 (2003)
64. Miyoshi S-I., Shinoda S.: Microbial metalloproteinases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 91–98 (2000)
65. Mylonakis E., Moreno R., El Khoury J.B., Idnurm A., Heitman J., Calderwood S.B., Ausubel F.M., Diener A.: *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* **73**, 3842–3850 (2005)
66. Narayanaswami V., Ryan R.O.: Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 15–36 (2000)
67. Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J.: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464–472 (2011)
68. Olsen R.J., Watkins M.E., Cantu C.C., Beres S.B., Musser J.M.: Virulence of serotype M3 group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* wax). *Virulence*, **2**, 111–119 (2011)
69. Oztug M., Martinon D., Weers P.M.M.: Characterization of the apolp-III/LPS complex: insight into the mode of binding interaction. *Biochemistry*, **51**, 6220–6227 (2012)
70. Park S., Kim K.M., Lee J.H., Seo S.J., Lee I.H.: Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect. Immun.* **75**, 1861–1869 (2007)
71. Peleg A.Y., Jara S., Monga D., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Jr., Mylonakis E.: *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2605–2609 (2009)
72. Peters J.E., Galloway D.R.: Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.* **172**, 2236–2240 (1990)
73. Pratt C.C., Weers P.M.M.: Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipoprotein III, from *Galleria mellonella*. *Biol. Chem.* **385**, 1113–1119 (2004)

74. Reeves E.P., Messina C.G., Doyle S., Kavanagh K.: Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*, **158**, 73–79 (2004)
75. Renwick J., Daly P., Reeves E.P., Kavanagh K.: Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia*, **161**, 377–384 (2006)
76. Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Hamood A.N.: *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. *J. Hosp. Infect.* **43**, 211–218 (1999)
77. Schell M.A., Lipscomb L., DeShazer D.: Comparative genomics and an insect model rapidly identify novel virulence genes of *Burkholderia mallei*. *J. Bacteriol.* **190**, 2306–2313 (2008)
78. Schmidtchen A., Frick I.-M., Anderson E., Tapper H., Björck L.: Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* **46**, 157–168 (2002)
79. Schmidtchen A., Holst E., Tapper H., Björck L.: Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb. Pathogenesis*, **34**, 47–55 (2003)
80. Schmidtchen A., Wolff H., Hansson C.: Differential proteinase expression by *Pseudomonas aeruginosa* derived from chronic leg ulcers. *Acta Derm. Venereol.* **81**, 406–409 (2001)
81. Seed K.D., Dennis J.J.: Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect. Immun.* **76**, 1267–1275 (2008)
82. Shigematsu T., Fukushima J., Oyama M., Tsuda M., Kawamoto S., Okuda K.: Iron-mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **45**, 579–590 (2001)
83. Vilcinskis A.: Lepidoptera as model mini-hosts for human pathogens and as a resource for peptide antibiotics (w) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*, red. M.R. Goldsmith, F. Marec, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2009, s. 293–305
84. Vilcinskis A., Matha V.: Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defense reactions in *Galleria mellonella*. *Anim. Biol.* **6**, 19–29 (1997)
85. Wedde M., Weise C., Kopaček P., Franke P., Vilcinskis A.: Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 535–543 (1998)
86. Weers P.M.M., Ryan R.O.: Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 231–240 (2006)
87. Whitten M.M.A., Tew I.F., Lee B.L., Ratcliffe N.A.: A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in β -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J. Immunol.* **172**, 2177–2185 (2004)
88. Wimley W.C., Hristova K.: Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J. Membr. Biol.* **239**, 27–34 (2011)
89. Winzer K., Williams P.: Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 131–143 (2001)
90. Woods D.E., Schaffer M.S., Rabin H.R., Campbell G.D., Sokol P.A.: Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 260–264 (1986)
91. Yang J., Zeng H.-M., Lin H.-F., Yang X.-F., Liu Z., Guo L.-H., Yuan J.-J., Qiu D.-W.: An insecticidal protein from *Xenorhabdus budapestensis* that results in prophenoloxidase activation in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 60–67 (2012)
92. Yu K.H., Kim K., Lee J., Lee H., Kim S., Cho K., Nam M., Lee I.: Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 707–713 (2002)
93. Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **158**, 90–98 (2011)
94. Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: Apolipoproteins and insect immune response. *ISJ*, **10**, 58–68 (2013)
95. Zdybicka-Barabas A., Mak P., Klys A., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiołka M.J., Cytryńska M.: Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 2623–2635 (2012)
96. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Cytryńska M.: Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 1449–1456 (2013)