

IWONA WOJDA, LIDIJA VERTYPOROKH

Zakład Immunobiologii
Instytut Biologii i Biochemii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
e-mail: wojda@hektor.umcs.lublin.pl

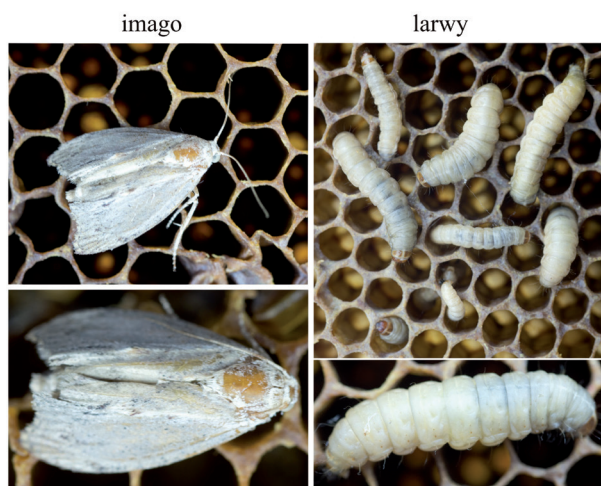
UKŁAD ODPORNOŚCIOWY OWADÓW W OBRONIE INTEGRALNOŚCI ORGANIZMU

WSTĘP

Sprawnie działające mechanizmy obronne owadów w znacznym stopniu przyczyniły się do ich ewolucyjnego sukcesu (CYTRYŃSKA i współaut. 2016). Ta gromada zwierząt zasiedla bowiem wszystkie lądowe nisze ekologiczne. Odporność owadów może być modulowana przez czynniki zarówno abiotyczne, jak i biotyczne. Do tych pierwszych można zaliczyć zmiany temperatury otoczenia, wilgotności, dostępność pożywienia. Zmiany te mogą zachodzić równolegle z przebiegającą infekcją lub poprzedzać ją. Zarówno w pierwszym, jak i w drugim przypadku doświadczanie stresu może mieć wpływ na przebieg odpowiedzi immunologicznej owada. Czynniki biotyczne, to przede wszystkim zagrożenie ze strony organizmów patogennych. Okazuje się, że mimo braku mechanizmów odporności nabytej, przebyta infekcja może odciskać piętno na mechanizmach odpornościowych owada w trakcie ponownego zakażenia. Wszystko to składa się na tzw. plastyczność odpowiedzi immunologicznej (CHAMBERS i SCHNEIDER 2012). Warto wspomnieć, że mechanizmy odpornościowe owadów są przedmiotem zainteresowania nie tylko biologów, ale także medyków. Ich mechanizmy odporności zawierają bowiem wiele wspólnych cech z odpornością wrodzoną człowieka, a brak „zakłócenia” odpornością nabytą umożliwia badanie wrodzonych mechanizmów w czystej postaci.

GALLERIA MELLONELLA JAKO OWADZI ORGANIZM MODELOWY

Barciak większy (*Galleria mellonella*), nazywany również molem woskowym, to motyl z rodziny omacnicowatych. Jego występowanie jest ściśle skorelowane z występowaniem pszczoły miodnej. Kolonizuje słabe rodziny pszczele, chociaż częściej zasiedla plastry woszczyny składowane do przetopienia na wosk, co określa się mianem galleriozy. Osobniki dorosłe mają długość około 12–20 mm i kolor brunatnoszary. Nie pobierają pokarmu i żyją krótko, około 14 dni, bowiem ich zadaniem jest jedynie kopulacja i złożenie przez samicę jaj (KWADHA i współaut. 2017). Jaja składane są w szczelinach ula lub bezpośrednio w plastrach wosku. Wylęgają się z nich larwy, które żerując na woszczynie i niszcząc plastry z czerwem, w warunkach optymalnych przechodzą 7 stadiów wylinkowych. Mają one zdolność do trawienia wosku w przewodzie pokarmowym, przy udziale symbiotycznych bakterii. Co ciekawe, w bieżącym roku opisano zdolność gąsienic barciaka do trawienia polietyleny (BOMBELLI i współaut. 2017). Gąsienice barciaka są powszechnie wykorzystywane jako pokarm w terrarystyce. Ostatnie stadium larwalne osiągają po kilku tygodniach, a tempo wzrostu zależy od warunków, głównie temperatury. Larwy z końca ostatniego stadium, mające około 2 cm długości, zaprzestają żerowania, przemieszczają się poza



Ryc. 1. Morfologia barciaka większego *Galleria mellonella* (fot. Marek Kucharczyk).

woszczynę i, po wytworzeniu jedwabnego oprzędu, przechodzą w stadium poczwarki, które trwa 1-2 tygodnie. Po przeobrażeniu, na świat wydostają się imagines, prowadzące nocny tryb życia (SCHMOLZ i LAMPRECHT 2004, RAMARAO i współaut. 2012). Morfologię *G. mellonella* przedstawia Ryc. 1.

Larwy barciaka większego z powodzeniem stosowane są w badaniach dotyczących mechanizmów odporności wrodzonej. *Galleria mellonella* ma bowiem wszystkie zalety organizmu modelowego. Należą do nich m.in.: (i) powszechność występowania – jest to gatunek kosmopolityczny, (ii) stosunkowo duży rozmiar gąsienic (około 2 cm), dzięki czemu możliwa jest iniekcja do hemocelu precyzyjnej liczby mikroorganizmów, a także izolacja hemolimfy oraz preparatyka poszczególnych organów, (iii) relatywnie niski koszt hodowli, (iv) krótki cykl życiowy, umożliwiający uzyskanie wyników w krótkim czasie, (v) dzięki możliwości prowadzenia hodowli w temperaturze zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała, można badać wirulencję patogenów ludzkich (CHAMPION i współaut. 2016).

UKŁAD ODPORNOŚCIOWY OWADÓW

Ze względu na podobieństwo mechanizmów obronnych owadów i ssaków, układ odpornościowy tych pierwszych nazywany jest w literaturze naukowej „korzeniami ludzkiej odporności wrodzonej” (VILMOS i KURUCZ 1998). Na obronę tej gromady zwierząt składają się: (i) bariery anatomiczno-fizjologiczne, (ii) mechanizmy odpowiedzi komórkowej, angażujące upostaciowane składniki hemolimfy, oraz (iii) mechanizmy odpowiedzi humoralnej, czyli wykorzystujące rozpuszczalne cząsteczki o funkcjach obronnych.

W zapobieganiu zakażeniom istotną rolę odgrywa okrywa ciała. Stanowi ją wysycony chityną integument, zbudowany z jednowarstwowego nabłonka, zawierającego woski, kwasy tłuszczowe i sterole. Ponadto, tchawki oraz jelito przednie i tylne, także wyścielone są chityną (MOUSSIAN 2010). Z kolei jelito środkowe, wyścielone jest błoną perytroficzną, zaś wysokie pH treści pokarmowej, obecność enzymów proteolitycznych, bakterii wspomagających procesy trawienne, stanowi niekorzystne środowisko dla niepożądanych mikroorganizmów. Przerwanie integralności barier przeciwzakaźnych zakłóca homeostazę owadów. Z jednej strony, powoduje utratę płynów fizjologicznych czy wyciek treści jelita, zaś z drugiej, stanowi tzw. wrota zakażenia. Aby zraniony organizm przeżył, niezbędne jest więc zagojenie powstałej rany i uruchomienie mechanizmów obronnych.

Gojenie ran jest procesem angażującym zarówno komórkowe, jak i humoralne mechanizmy odpornościowe. Nieznane są szczegóły tego procesu u owadów. Wiadomo natomiast, że jest on wywołany przez co najmniej dwa, powiązane ze sobą czynniki. Pierwszy z nich to kontakt hemolimfy z tlenem atmosferycznym, zaś drugi to powstanie tzw. sygnału uszkodzenia. W wyniku mechanicznego uszkodzenia komórek nabłonka na zewnątrz wydostają się np. kwasy nukleinowe czy białka szoku cieplnego. Jest to sygnał informujący o mechanicznym uszkodzeniu tkanek. Jego gradientowe rozprzestrzenienie wokół miejsca zranienia, wspomagane przez mechanizmy rozpoznające obecność mikroorganizmów, powoduje naciek hemocytów. Hemocyty wyrzucają zawartość granul oraz tworzą tzw. mikrocząsteczki, które wykazują odwróconą polarność, tzn. wewnątrzna, ujemnie naładowana warstwa lipidów znajduje się w nich na zewnątrz. Lipidy te są rozpoznawane przez receptory, np. *Croquemort* u *Drosophila* lub inne podobne do CD36+ kręgowców, znajdujące się na powierzchni hemocytów. Hemocyty mogą uwalniać związki będące atraktantami dla pozostałych komórek i tzw. koagulanty komórkowe. W hemolimfie zaś znajdują się tzw. koagulanty humoralne. Koagulanty to związki, które po przekształceniu enzymatycznym tworzą nierozpuszczalny żel. U owadów koagulantami humoralnymi mogą być m.in. lipoforyny. Z granul, bądź uszkodzonych komórek uwalniany jest następnie enzym, transglutaminaza, która katalizuje przekształcenie koagulantów w nierozpuszczalną sieć białek, co prowadzi do powstania tzw. skrzepu miękkiego, zamykającego ranę (THEOPOLD i współaut. 2002, HAINE i współaut. 2007). Jednocześnie, zranienie, potęgowane przez wykrycie obecności mikroorganizmów,

aktywuje układ oksydazy fenolowej, prowadząc do syntezy i odkładania melaniny w powstałym skrzepie. Tworzy się tzw. skrzep twardy, który zabezpiecza ranę do czasu odtworzenia ciągłości oskórka (LI i współaut. 2002).

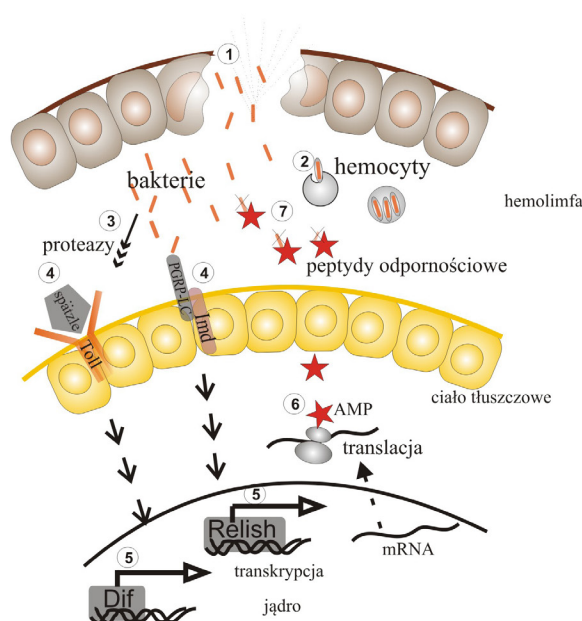
Po sforsowaniu barier anatomiczno-fizjologicznych, obecność mikroorganizmów jest rozpoznawana przez układ odpornościowy gospodarza. Obecność składników ścian komórkowych, jak peptydoglikan typu lizynowego – u większości bakterii Gram-dodatnich, lub typu diaminopimelinowego – u bakterii Gram-ujemnych, oraz β -glukan ścian komórkowych grzybów, to tzw. wzorce molekularne związane z patogenem (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Rozpoznawane one są przez cząstki określane jako PRRs (ang. pattern recognition receptors), do których należą między innymi białka rozpoznające peptydoglikan (ang. peptidoglycan recognising proteins, PGRP) oraz β -GBP (ang. β -glucan binding proteins) rozpoznające β -glukan (WERNER i współaut. 2000, ROYET 2004). W hemolimfie znajdują się również białka zwane opsoninami, które wiążą się do mikroorganizmów, ułatwiając ich fagocytozę.

Pierwszą linią obrony, która jest uruchamiana natychmiast po wnikięciu patogennego mikroorganizmu, jest odpowiedź komórkowa. Obecność ciała obcego jest rozpoznawana przez opsoniny lub bezpośrednio przez receptory na powierzchni hemocytów. U barciaka większego jest 5 rodzajów hemocytów: prohemocyty, plazmatocyty, granulocyty, sferulocyty i enocytoidy (WOJDA 2017a). Plazmatocyty i granulocyty są komórkami adherentnymi, tzn. mającymi zdolność do opłaszczania ciał obcych. Eliminują one mikroorganizmy drogą fagocytozy. Sferulocyty transportują składniki do budowy kutikuli, zaś enocytoidy zawierają prekursor oksydazy fenolowej, o którym będzie mowa w dalszej części niniejszego artykułu. W przypadku, gdy do organizmu dostaną się duże skupiska bakterii, co uniemożliwia ich eliminację przez poszczególne komórki hemolimfy, zamykane one są w strukturach zwanych nodulami, złożonymi z wielu hemocytów. Z kolei, duże ciała obce, jak np. jaja pasożytów, zamykane są w tzw. kapsułach (LAVINE i STRAND 2002). Czasami, na powierzchni takich struktur odkładana jest melanina. Takie „zorganizowane” działanie wielu hemocytów izoluje intruza i uniemożliwia jego rozwój lub namnażanie w ciele owada. Bakterie czy jaja pasożytów mogą być tam zabijane na skutek braku dopływu tlenu lub/i wydzielania toksycznych związków, jak wolne rodniki, powstające w procesie syntezy melaniny (BUCZEK i współaut. 2000, LAVINE i

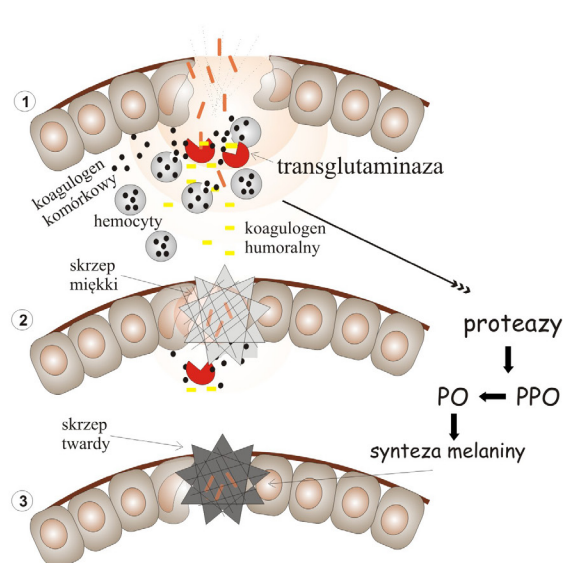
STRAND 2002). Odpowiedź komórkowa, angażująca upostaciowane składniki hemolimfy, hemocyty, wspomagana jest przez mechanizmy humoralne. Biorą w nich udział rozpuszczalne związki posiadające bezpośrednio aktywność przeciwdrobnoustrojową lub posiadające funkcje regulacyjne. Większość z nich syntetyzowana jest dopiero po rozpoznaniu infekcji (BROWN i współaut. 2009, VOGEL i współaut. 2011). W jej wyniku dochodzi do aktywacji szlaków przekazywania sygnałów komórkowych. Szlaki aktywujące ekspresję genów peptydów odpornościowych, głównie Toll i Imd, aktywowane są odpowiednio przez bakterie Gram-dodatnie i grzyby oraz bakterie Gram-ujemne. Mimo że owady i ssaki są ewolucyjnie bardzo odległe, składniki obydwu wymienionych szlaków wykazują wysoką homologię ze składnikami szlaków TLR i TNF u ludzi. Owadzie szlaki Toll i Imd regulują aktywność czynników transkrypcyjnych, odpowiednio Dif (szlak Toll) i Relish (szlak Imd), które są homologami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (STOKES i współaut. 2015). W wyniku ich aktywacji syntetyzowany jest cały arsenał tzw. peptydów odpornościowych. Głównym źródłem peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hemolimfie owadów jest tzw. ciało tłuszczowe, które często określane jest jako analog wątroby kręgowców. Peptydy odpornościowe, syntetyzowane w odpowiedzi na zakażenie, są wydzielane do hemolimfy, zwalczając niepożądane mikroorganizmy i przywracając homeostazę (DE GREGORIO i współaut. 2002, VOGEL i współaut. 2011). Mechanizm ich działania polega na perforacji błon komórkowych mikroorganizmów, choć niektóre z nich mogą dostawać się do wnętrza komórek i zakłócać ich metabolizm. Peptydom odpornościowym poświęcony jest inny artykuł w tym zeszycie KOSMOSU, do którego Czytelnik jest odsyłany (patrz ZDYBICKA-BARABAS i współaut.). Schemat aktywacji mechanizmów odpornościowych i tworzenia skrzepu przedstawia Ryc. 2.

Elementem odpowiedzi humoralnej owadów jest także układ oksydazy fenolowej. Oksydaza fenolowa syntetyzowana jest w postaci nieaktywnej profenolooksydazy (PPO), która u Lepidoptera znajduje się w enocytoidach, skąd, po rozpoznaniu zakażenia, jest uwalniana w wyniku rozpadu komórek. Ulega tam aktywacji poprzez ograniczoną proteolizę, która jest skutkiem kaskadowej aktywacji enzymów proteolitycznych. Aktywna oksydaza fenolowa jest glikoproteina, zawierająca miedź w centrum aktywnym cząsteczki. Katalizuje ona przekształcenie tyrozyny do dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) oraz utlenianie orto-difenoli do chinonów, a następnie do melaniny (KANOST i GORMAN 2008).

A. Aktywacja odpowiedzi immunologicznej



B. Tworzenie skrzepu



Ryc. 2. Uproszczony model aktywacji układu odpornościowego owadów i tworzenia skrzepu po zakażeniu spowodowanym uszkodzeniem powłok ciała.

W celu zachowania przejrzystości obydwa mechanizmy przedstawiono oddzielnie. (A) Zraniony oskórek stanowi tzw. wrota zakażenia przez które mikroorganizmy dostają się do wnętrza ciała owada (1). Obecność mikroorganizmów, a dokładnie ich wzorców molekularnych (PAMPs) jest rozpoznawana i aktywowane są mechanizmy obronne. Mikroorganizmy są fagocytowane przez hemocyty (2). Równolegle ma miejsce kaskadowa aktywacja proteaz, prowadząca do przekształcenia Prospätzle w cytokinę Spätzle (3) oraz rozpoznawanie peptydoglikanu bakteryjnego przez białka PGRP, np. PGRP-LC, prowadzące odpowiednio do aktywacji szlaków, Toll i Imd (4). W jej wyniku ma miejsce transkrypcja genów (5), a następnie translacja, czyli synteza peptydów odpornościowych (6), które wydzielane do hemolimfy niszczą obecne komórki intruzy (7). (B) Uszkodzenie nabłonka powoduje uwolnienie tzw. sygnału uszkodzenia, tj. cząstek, rozmieszczonych gradientowo, przyciągających hemocyty do miejsca zranienia (oznaczony jako gradient natężenia koloru). Hemocyty degranulują, uwalniając koagulogeny komórkowe (1). Transglutaminaza, dla której substratami są koagulogeny komórkowe i humoralne katalizuje sieciowanie białek, prowadząc do powstania tzw. skrzepu miękkiego (2), w którym unieruchomiane mogą być mikroorganizmy. Jednocześnie z hemocytów uwalniany jest układ profenoloksydazy (PPO). Proenzym ulega aktywacji proteolitycznej, prowadząc do powstania aktywnej oksydazy fenolowej (PO). Syntetyzowana jest melanina, która jest odkładana w powstałym skrzepie utwardzając go (3).

Melanina odkładana na powierzchni patogenu powoduje jego izolację, co utrudnia jego namnażanie się. Ponadto, melanina wzmacnia efektywność innych składników hemolimfy o działaniu odpornościowym, zaś produkty pośrednie w syntezie tego barwnika, takie jak: DOPA, chinony i wolne rodniki, ze względu na ich wysoką toksyczność, przyczyniają się do eliminacji patogenu. Z tego też względu proces ten jest ściśle kontrolowany przez inhibitory proteaz serynowych, serpiny, aby zapobiec nadmiernej produkcji związków toksycznych, które uszkodziłyby tkanki owada. Jak wcześniej wspomniano, proces melanizacji towarzyszy komórkowym reakcjom odpornościowym, w których ciała obce są unieruchamiane w nodulech czy kapsułach, zaś związki wytwarzane w szlaku syntezy melaniny działają toksycznie na za-

mknięte wewnątrz takiej struktury mikroorganizmy (KANOST i GORMAN 2008). Ponadto, melanizacja kutikuli, czyli zewnętrznej okrywy ciała, powoduje jej sklerotyzację i twardnienie, zwiększając stopień ochrony przed niekorzystnymi czynnikami środowiska zewnętrznego. Wykazano, że tzw. ciemniejsza odmiana barciaka większego, której kutikula zmelanizowana jest w większym stopniu, jest bardziej odporna na zakażenie grzybem entomopatogennym *Beauveria bassiana* (DUBOVSKIY i współaut. 2013a).

PLASTYCZNOŚĆ REAKCJI ODPORNOŚCIOWYCH OWADÓW

Przebieg reakcji mających za zadanie przywrócić homeostazę organizmu zależy od wielu czynników. Reakcje obronne, po-

mimo że obejmują jedynie mechanizmy odporności wrodzonej, cechuje plastyczność. Uprzednie doświadczenie stresu może w istotny sposób wpływać na reakcje odpornościowe w przebiegu następującego po nim zakażenia (CHAMBERS i SCHNEIDER 2012). Jednocześnie, zakażone organizmy mogą równolegle doświadczać stresu abiotycznego, jak np. zmiany temperatury otoczenia (WOJDA 2017a). Jednym z głównych abiotycznych czynników wpływających na odporność owadów są zmiany temperatury środowiska zewnętrznego.

TEMPERATURA JAKO ABIOTYCZNY CZYNNIK
MODULUJĄCY ODPORNOŚĆ
GALLERIA MELLONELLA

Wykazano, że przetrzymywanie immunizowanych mikroorganizmami niepatogennymi larw *G. mellonella* w podwyższonej temperaturze, skutkowało zwiększeniem aktywności odpornościowej hemolimy, skorelowanej ze zwiększoną ekspresją genów kodujących peptydy odpornościowe w ciele tłuszczowym owada (WOJDA i JAKUBOWICZ 2007). Ponadto, ekspozycja gąsienic barciaka na działanie podwyższonej temperatury bezpośrednio przed zakażeniem entomopatogenami lub w trakcie zakażenia, skutkowało stymulacją odpowiedzi immunologicznej i wzmacniało ich odporność (WOJDA i współaut. 2009, WOJDA i TASZŁOW 2013, TASZŁOW i WOJDA 2015, VERTYPOROKH i współaut. 2015). Stosowane w badaniach organizmy, będące ludzkimi patogenami oportunistycznymi, również wykazywały mniejszą wirulencję wobec larw poddanych działaniu podwyższonej temperatury (MOWLDS i KAVANAGH 2008, BROWNE i współaut. 2014). W świetle przytoczonych przykładów rodzi się pytanie, jak wytłumaczyć pozytywną korelację między ekspozycją barciaka na szok cieplny a stymulacją jego mechanizmów odpornościowych? Samo doświadczenie stresu termicznego nie indukowało ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe w ciele tłuszczowym (WOJDA i JAKUBOWICZ 2007). Ponadto, długotrwała ekspozycja owadów na działanie podwyższonej temperatury (ok. 43°C) jest dla nich letalna (VERTYPOROKH i współaut. 2015). Dlaczego więc krótkotrwała ekspozycja na tak silny stres, bezpośrednio przed zakażeniem, skutkuje zwiększoną odpornością barciaka? Odpowiedź, przynajmniej częściowo, może leżeć w mechanizmach tzw. ogólnej odpowiedzi na stres. W niekorzystnych warunkach środowiska zewnętrznego, w tym w warunkach szoku cieplnego, ma miejsce wzmożona synteza tzw. białek opiekuńczych, zwanych także chaperonami lub „molekularnymi przyzwoitkami” (WOJDA 2010). Ich zadaniem

jest m.in. przywrócenie zdenaturowanym białkom ich prawidłowej konformacji. Być może ich synteza, bezpośrednio przed zakażeniem, zapewnia do pewnego stopnia protekcję polipeptydom gospodarza w trakcie późniejszego zakażenia. Ponadto, obydwa rodzaje stresu, tj. szok cieplny i zakażenie, mogą indukować te same komponenty poszczególnych szlaków przekazywania sygnałów komórkowych. Istotnie, wspólnym komponentem, którego synteza zwiększa się zarówno w szoku cieplnym, jak i podczas infekcji, jest białko szoku cieplnego Hsp90. Jest prawdopodobne, że białko to może stanowić dla organizmu tzw. sygnał zagrożenia (ang. danger signal), stymulujący odpowiedź immunologiczną (WOJDA i JAKUBOWICZ 2007). Ponadto wykazano, że aktywacja układu immunologicznego *G. mellonella* powoduje fosforylację kinazy JNK, należącej do rodziny kinaz białkowych MAP, których nazwa pochodzi od nazwy kinazy, ostatniej w trzyczęściowej kaskadzie kinaz MAPKKK, MAPKK i MAPK. Są to kinazy ERK, p38 i JNK. Kinaza JNK, jak również kinaza ERK, biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej barciaka w podwyższonej temperaturze (WOJDA i współaut. 2004, WOJDA i JAKUBOWICZ 2007).

Jakie znaczenie mają przytoczone powyżej obserwacje, wskazujące na rolę zmian temperatury w odporności barciaka większego? Otóż, dzięki zawartości białka zwanego termogeniną, które wytwarza energię cieplną zamiast chemicznej, gąsienice barciaka wytwarzają znaczną ilość ciepła (SCHMOLZ i SHULZ 1995). Ciepło to musi być jednak oddawane do otoczenia (stąd bardzo ważna jest wentylacja prowadzonej hodowli). Żerujące w zaatakowanym plastrze woszczyny larwy mogą przemieszczać się z większych skupisk do mniejszych, z góry na dół, behawioralnie regulując temperaturę swojego ciała. Może to w istotny sposób wpływać na przebieg trwającej lub następującej później infekcji.

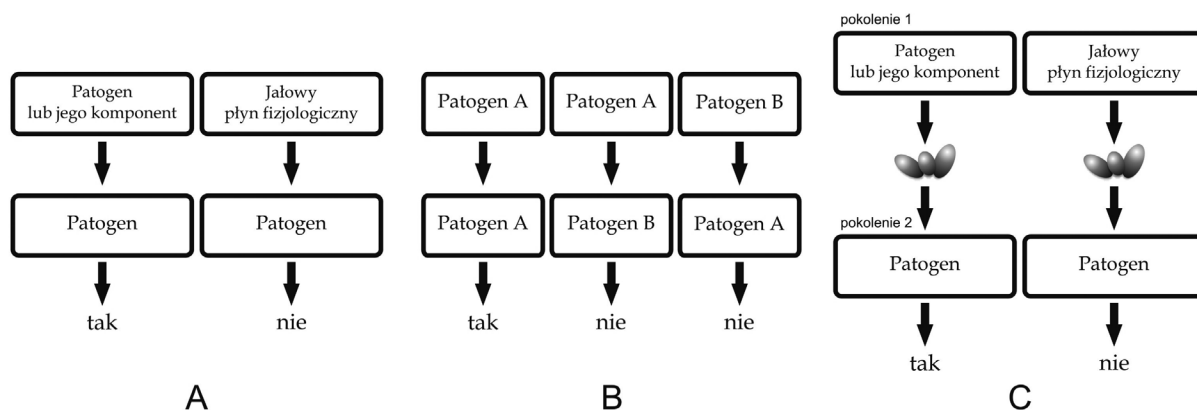
Warto podkreślić, że opisanych powyżej zależności pomiędzy stresem temperaturowym a odpornością owadów nie można generalizować i przekładać na wszystkie owady. Naszym celem jest jedynie podanie przykładu współzależności między czynnikami środowiskowymi a odpornością danego gatunku. Wpływ temperatury na odporność innych gatunków owadów może być różny. Co więcej, zakażone owady, jako organizmy zmienneocielne, mogą przemieszczać się do środowiska o wyższej temperaturze, wzmagając reakcje odpornościowe, co określa się mianem gorączki behawioralnej. Zależności między odpornością owadów a stresem temperaturowym opisane są w pracy przeglądowej WOJDY (2017b).

CZYNNIKI BIOTYCZNE WPLYWAJĄCE NA PRZEBIEG ZAKAŻENIA – PIĘTNOWANIE UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO OWADÓW

Nieco więcej uwagi poświęcimy zjawisku, które w literaturze anglojęzycznej nosi nazwę „immune priming”. Czasownik „to prime” oznacza między innymi „przygotować do pewnego celu lub operacji”. W immunologii słowem „priming” określa się pierwszy kontakt limfocytów z antygenem, który inicjuje ich specjalizację (innymi słowy, kontakt z antygenami „przygotowuje” limfocyty do pełnienia ich funkcji). Oczywiście, bezkręgowce nie posiadają limfocytów. Jednak to nie oznacza, że pierwszy kontakt z patogenem nie może „przygotować” owada do powtórne go zakażenia. W 1992 r. FAULHABER i KARP opublikowali pracę, która podważała istniejącą wówczas teorię, że owady (i inne bezkręgowce) nie posiadają pamięci immunologicznej. W doświadczeniach nad przybyszka amerykańską (*Periplaneta americana*) dowiedli, że podawanie owadom martwych komórek *Pseudomonas aeruginosa* chroni przed powtórny zakażeniem tą samą bakterią. W tym samym czasie, kontakt z martwymi komórkami bakterii *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus lactis* i *Micrococcus lysodeikticus* nie wpływał na następne zakażenie *P. aeruginosa*. Przypominało to pewien rodzaj „szczepienia”. Schemat doświadczenia zaproponowany przez Faulhabera i Karp (Ryc. 3A) był wielokrotnie wykorzystywany przez badaczy na innych organizmach modelowych. Wzrastająca liczba publikacji dokumentujących wpływ poprzedniego kontaktu z patogenami na przebieg zakażenia wskazała na możliwość istnienia „adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej” u owadów.

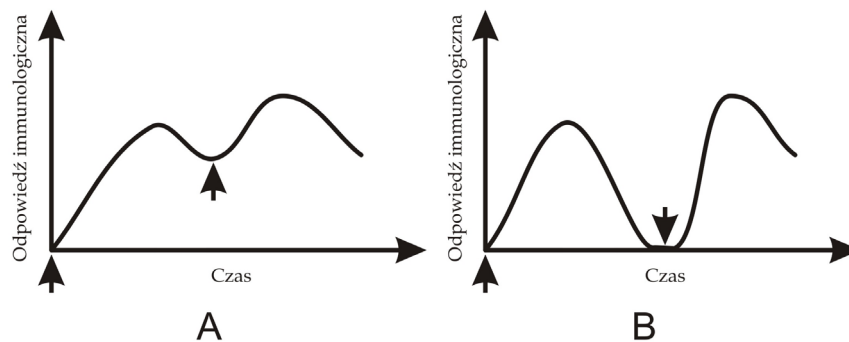
Przyjrzyjmy się jednemu z późniejszych doświadczeń (MORET i SIVA-JOTHY 2003). Wykorzystując mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) naukowcy wykazali, że iniekcja bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS), związku aktywującego układ odpornościowy, zmniejsza współczynnik umieralności po zakażeniu grzybem entomopatogennym *Metarhizium anisopliae*. Ponadto, Moret i Siva-Jothy zauważyli, że aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy owadów wzrastała po iniekcji LPS, lecz zmniejszała się do poziomu u owadów z grupy kontrolnej po siedmiu dniach. Dlatego infekcję grzybem przeprowadzano czwartego i siódmego dnia po iniekcji LPS: w obu przypadkach owady były bardziej odporne na infekcję grzybową. MORET i SIVA-JOTHY (2003) sugerowali, że obserwowane zjawisko jest rodzajem odpowiedzi adaptacyjnej, lecz nie nadali mu specjalnej nazwy. Zrobili to LITTLE i KRAALJEVELD w 2004 r. w swojej pracy przeglądowej. Wiedząc, że mechanizmy „odpowiedzi adaptacyjnej” bezkręgowców są zupełnie inne niż odpowiedzi adaptacyjnej kręgowców, autorzy zaproponowali w odniesieniu do owadów termin „immunological priming”. W trochę zmienionej formie, a mianowicie, jako „immune priming”, nazwa ta została przyjęta przez środowisko naukowe. Tłumacząc ten termin na język polski wyobraźmy sobie, że każdy kontakt z patogenem „odciska na organizmie piętno”, więc będziemy dalej mówić o piętnowaniu układu odpornościowego czynnikami biotycznymi.

Przypomnijmy pracę MORET i SIVA-JOTHY (2003): piętnowanie było obserwowane w dwóch przypadkach: (i) kiedy aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy, spowodowana iniekcją LPS, była podwyższona w momencie zakażenia grzybem patogennym i (ii) kiedy



Ryc. 3. Schemat doświadczenia dla: (A) wykrywania zjawiska piętnowania immunologicznego, (B) sprawdzania specyficzności piętnowania, (C) wykrywania zjawiska piętnowania między pokoleniami.

„Tak” – obserwacja wzmocnionej odpowiedzi odpornościowej (na przykład niższy współczynnik umieralności), „nie” – brak podobnych obserwacji. Podano warianty obserwacji dla doświadczeń wykazujących: (A) zjawisko piętnowania; (B) specyficzność piętnowania; (C) zjawisko piętnowania między pokoleniami.



Ryc. 4. Dwa możliwe scenariusze wywołania piętnowania.

Strzałkami zaznaczono czas podawania pierwszej i drugiej dawki patogenu. **(A)** Podanie drugiej dawki w momencie, kiedy aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest nadal podwyższona po podaniu pierwszej dawki. **(B)** Podanie drugiej dawki po „wyciszeniu” odpowiedzi immunologicznej spowodowanej pierwszą dawką. W tym wypadku piętnowanie jest „dwufazowym” i przypomina efekt pamięci immunologicznej.

aktywność ta „wygasła”. Jest to ważne, ponieważ rodzi dyskusję, czym są obserwowane zjawiska piętnowania: bardziej efektywną odpowiedzią organizmu już posiadającego podwyższony poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej czy „pamięcią” o przeżytym zakażeniu po całkowitym wyzdrowieniu? Przytoczmy dwa przykłady. Zakażenie larw barciaka większego niską dawką *Candida albicans* chroni przed następnym zakażeniem śmiertelną dawką *C. albicans* (BERGIN i współaut. 2006). Autorzy wysunęli hipotezę, że to zjawisko spowodowane jest podwyższoną aktywnością przeciwdrobnoustrojową hemolimfy piętnowanych larw i wykazali, że piętnowane larwy w momencie podawania drugiej dawki mają wyższy poziom ekspresji wybranych genów kodujących peptydy odpornościowe (Ryc. 4A). Jednak w badaniu piętnowania barciaka większego z udziałem bakterii entomopatogennej *Bacillus thuringiensis* (TASZŁOW i współaut. 2017) wykazano, że w momencie podawania drugiej dawki, aktywność przeciwbakteryjna hemolimfy wracała do poziomu aktywności hemolimfy larw z grupy kontrolnej (Ryc. 4B). Co więcej, po podaniu drugiej dawki, poziom ekspresji szeregu genów kodujących peptydy odpornościowe był niższy, niż u owadów niepiętnowanych. Może to świadczyć w tym konkretnym przypadku, że piętnowanie polega na bardziej efektywnej i ergonomicznej aktywacji odpowiedzi immunologicznej podczas powtórnego kontaktu z patogenem.

Ergonomiczność odpowiedzi immunologicznej podczas piętnowania jest ważna, ponieważ aktywacja mechanizmów odpornościowych i utrzymanie podwyższonej aktywności są energetycznie kosztowne (MORET i SIVA-JOTHY 2003, LITTLE i KRAALJEVELD 2004). Organizmy zdolne uruchamiać spe-

cyficzną odpowiedź, maksymalnie efektywną wobec konkretnego patogenu, mają przewagę nad organizmami, które uruchamiają cały swój arsenał immunologiczny, tym samym wyczerpując energetyczne zasoby potrzebne do wzrostu i rozmnażania się. Również może się okazać, że koszt podtrzymywania podwyższonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest o wiele niższy niż koszt jej uruchamiania. Z drugiej strony, ten ostatni fakt został wykorzystany w krytyce tłumaczenia zjawiska piętnowania, jako odpowiedzi adaptacyjnej: podwyższony poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej może być skutkiem tego, że białka i peptydy odpornościowe są po prostu chemicznie stabilne (LITTLE i KRAALJEVELD 2004). Tłumaczenie piętnowania poprzez zwiększoną ergonomiczność i specyficzność odpowiedzi immunologicznej wymaga całościowej wizji procesów zachodzących w organizmie owada. Jednak całościowe ujęcie wydaje się być zbyt obszernym zadaniem dla pojedynczego zespołu badawczego, z powodu ogromnej liczby mechanizmów obronnych, którymi dysponują owady.

Wróćmy ponownie do pracy MORET i SIVA-JOTHY (2003): iniekcja LPS zwiększała odporność owadów na zakażenie *Metarhizium anisopliae*, innymi słowy, kontakt z elementem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych chronił owada przed infekcją grzybową. Mamy tutaj do czynienia z tak zwanym piętnowaniem heterologicznym, tzn. kontakt z patogenem A (lub jego wzorcem molekularnym) zwiększa odporność na patogen B (Ryc. 3B). Jednak w innej, wspomianej wcześniej pracy, piętnowanie miało miejsce tylko w układzie „martwe komórki *Pseudomonas aeruginosa* – żywe komórki *P. aeruginosa*” (piętnowanie homologiczne), a piętnowania heterologicznego nie zaobserwowano

Tabela 1. Badania zjawiska piętnowania układu odpornościowego *G. mellonella*.

Pierwszy kontakt z patogenem lub jego komponentem	Drugi kontakt z patogenem	Obserwacje	Źródło
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Piętnowanie	TASZŁOW i współaut. 2017
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Candida albicans</i>	Zjawisko odwrotne piętnowaniu – po zakażeniu bakteryjnym owady są bardziej podatne na infekcję <i>C.albicans</i>	TASZŁOW i współaut. 2017
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Brak efektu	TASZŁOW i współaut. 2017
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brak efektu	TASZŁOW i współaut. 2017
LPS <i>Photobacterium luminescens</i>	<i>Photobacterium luminescens</i>	Piętnowanie	WU i współaut. 2015a
Toksyna PirA ₂ B ₂ <i>Photobacterium luminescens</i>	<i>Photobacterium luminescens</i>	Brak efektu	WU i współaut. 2015b
Martwe komórki <i>Photobacterium luminescens</i>	<i>Photobacterium luminescens</i>	Piętnowanie	WU i współaut. 2014
Martwe komórki <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Photobacterium luminescens</i>	Piętnowanie	WU i współaut. 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Piętnowanie	FALLON i współaut. 2011
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Piętnowanie	BERGIN i współaut. 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>	Piętnowanie	BERGIN i współaut. 2006
Glukan	<i>Candida albicans</i>	Piętnowanie	BERGIN i współaut. 2006
Laminaryna	<i>Candida albicans</i>	Piętnowanie	BERGIN i współaut. 2006

(FAULHABER i KARP 1992). Widzimy, że przy użyciu różnych organizmów modelowych możemy uzyskać zarówno piętnowanie niespecyficzne, jak i specyficzne. Drugie, zdecydowanie przypomina nam pamięć immunologiczną kręgowców, chociaż oba rodzaje piętnowania są funkcjonalnie adaptacyjne (KURTZ 2005). Niestety, nie zostało to jeszcze wytłumaczone, dlatego nie możemy przewidzieć, jakie owady i przeciwko jakim patogenom wykażą piętnowanie specyficzne lub niespecyficzne i czy wykażą w ogóle.

W Tabeli 1 podano wszystkie znane dotychczas przypadki piętnowania u *G. mellonella*. Według dostępnych danych (patrz Tabela 1) heterologiczne piętnowanie miało miejsce w dwóch wypadkach: zakażenia *C. albicans* po iniekcji *S. cerevisiae* oraz zakażenia *P. luminescens* po iniekcji martwymi komórkami *B. thuringiensis*.

W kwestii specyficzności piętnowania ciekawe jest doświadczenie przeprowadzone przez SADD i SCHMID-HEMPEL (2006). Do piętnowania odpowiedzi immunologicznej trzmiecia ziemnego (*Bombus terrestris*) wykorzystali dwie spokrewnione bakterie Gram-dodatnie oraz jedną Gram-ujemną. We

wszystkich możliwych kombinacjach piętnowanie miało miejsce, jeżeli odstęp czasowy między pierwszą a drugą dawką wynosił osiem dni. Jednak, przy jego wydłużeniu do 22 dni, obserwowano wyłącznie piętnowanie homologiczne.

Piętnowania immunologicznego nie można wytłumaczyć jedynie podwyższoną aktywnością przeciwdrobnoustrojową organizmu podczas powtórnego zakażenia. Być może wiąże się ona ze zwiększoną specyficznością, umożliwiającą efektywną odpowiedź przy możliwie niskim nakładzie energetycznym. Wspominane wcześniej szlaki przekazywania sygnałów są już mechanizmami determinacji między grzybami i Gram-dodatnimi bakteriami (szlak Toll) a bakteriami Gram-ujemnymi (szlak Imd). Kandydatem na źródło różnorodnych receptorów jest białko Dscam (ang. down syndrome cell adhesion molecule), którego mRNA ulega alternatywnemu składowaniu, dając ponad kilkadziesiąt tysięcy produktów (MILUTINOVIC i KURTZ 2016). Mechanizm powstawania różnych form receptorów Dscam, jest opisany w innym artykule tego zeszytu KOSMOSU (patrz WOJDA). Istnieją sugestie, że owady mające ponowny kontakt

z patogenem wykazują wydajniejszą fagocytozę (PHAM i współaut. 2007). Inny możliwy mechanizm osiągania coraz wyższej specyficzności to indukowane obecnością patogenu zmiany epigenetyczne: tj. metylacja DNA lub RNA lub acetylacja histonów, wpływające na poziom ekspresji genów gospodarza (CONTRERAS-GARDUÑO i współaut. 2016). Czytelnikom zainteresowanym zjawiskiem piętnowania polecamy dwie ostatnie prace przeglądowe (CONTRERAS-GARDUÑO i współaut. 2016, COOPER i ELEFTHERIANOS 2017).

Wyżej wspominaliśmy o piętnowaniu w obrębie jednego pokolenia. Jednak opisane są przypadki, kiedy kontakt matki z patogenem zwiększał odporność potomstwa (Ryc. 3C). Takie piętnowanie przechodzące między pokoleniami w literaturze anglojęzycznej nosi nazwę „trans-generation immune priming”. Zjawisko to jest opisane u kilku gatunków, w tym u barciaka większego (DUBOVSKIY i współaut. 2013b, FREITAK i współaut. 2014). Są trzy główne teorie mechanizmu piętnowania pomiędzy pokoleniami: przekazywanie potomstwu białek odpornościowych, zmiany epigenetyczne oraz bezpośrednie przekazywanie komponentów drobnoustrojów. Aktualną informację na temat piętnowania między pokoleniami można znaleźć w pracy przeglądowej KURTZ i ARMITAGE (2017).

Prawdopodobnie, Czytelnik już nie raz pomyślał o praktycznym zastosowaniu piętnowania dla ochrony korzystnych owadów oraz o komplikacjach w stosowaniu insektycydów biologicznych na bazie grzybów i bakterii entomopatogennych. Jednak ciekawsze jest pytanie, czy my sami posiadamy rodzaj pamięci w obrębie naszej odporności wrodzonej? Ostatnie badania wskazują, że prawdopodobnie tak. Zaobserwowana została tzw. krzyżowa protekcja, kiedy zakażenie jednym patogenem uodporniało organizm na działania innych patogenów w sposób niezależny od funkcji limfocytów. Żeby odróżnić ją od klasycznej odpowiedzi adaptacyjnej kręgowców i piętnowania owadów otrzymała ona nazwę odporność wykształcona (ang. trained immunity) (NETEA i współaut. 2011, VAN DER MEER i współaut. 2015). Badania w tym kierunku są bardzo obiecujące, np. szczepionki stworzone przeciwko jednemu patogenowi, w rzeczywistości mogą mieć szersze spektrum działania (GARLY i współaut. 2003).

PODSUMOWANIE

Barciak większy *G. mellonella* jest, obok muszki owocowej *D. melanogaster*, owadnim modelem badawczym, stosowanym do badania mechanizmów odporności wrodzonej, jak również do testowania wirulentności patogenów ludzkich. Ponadto, analiza przebie-

gu infekcji w kolejnych pokoleniach owada, wywołanej jednym z naturalnych patogenów, może dostarczyć wielu informacji dotyczących wzajemnej, antagonistycznej mikroewolucji gospodarz-patogen (DUBOVSKIY i współaut. 2013b). Mimo posiadania jedynie mechanizmów odporności wrodzonej, odpowiedź immunologiczna larw owada, może być modulowana zarówno czynnikami biotycznymi, jak i abiotycznymi. Rzuca to nowe światło na mechanizmy odporności wrodzonej, która okazuje się posiadać pewne cechy adaptacji i odgrywać istotną rolę w mechanizmach przystosowania organizmów do warunków środowiska zewnętrznego.

Streszczenie

Owady zasiedlają wszystkie lądowe nisze ekologiczne. Ewolucyjny sukces osiągnęły między innymi dzięki sprawnie funkcjonującym mechanizmom obronnym. Układ odpornościowy tej gromady zwierząt oparty jest jedynie na mechanizmach wrodzonych. Składa się on z humoralnych i komórkowych odczynów, które uzupełniają się nawzajem w walce z infekcją. W pracy zwięźle przedstawiono aktualny stan wiedzy, dotyczący układu odpornościowego owadów i zwrócono uwagę na jego rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Ponadto, na przykładzie barciaka większego *Galleria mellonella* omówiono modulację odpowiedzi immunologicznej przez zmiany temperatury otoczenia. Przedstawiono także aktualne informacje dotyczące zjawiska piętnowania immunologicznego owadów, ze szczególnym uwzględnieniem barciaka większego.

LITERATURA

- BERGIN D., MURPHY L., KEENAN J., CLYNES M., KAVANAGH K., 2006. *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*. Microb. Infect. 8, 2105-2112.
- BOMBELLI P., HOWE C. J., BERTOCCHINI F., 2017. *Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth Galleria mellonella*. Curr. Biol. 27, R292-R293.
- BROWN S. E., HOWARD A., KASPRZAK A. B., GORDON K. H., EAST P. D., 2009. *A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth Galleria mellonella*. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 792-800.
- BROWNE N., SURLIS C., KAVANAGH K., 2014. *Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in Galleria mellonella larvae*. J. Insect Physiol. 63, 21-26.
- BUCZEK J., DEPTUŁA W., GLIŃSKI Z., JAROSZ J., STOSIK M., WERNICKI A., 2000. *Immunologia porównawcza i rozwojowa zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- CHAMBERS M. C., SCHNEIDER D. S., 2012. *Pioneering immunology: insect style*. Curr. Opin. Immunol. 24, 10-14.
- CHAMPION O. L., WAGLEY S., TITBALL R. W. 2016. *Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxicological research*. Virulence 7, 840-845.
- CONTRERAS-GARDUÑO J., LANZ-MENDOZA H., FRANCO B., NAVA A., PEDRAZA-REYES M., CANALES-LAZCANO J., 2016. *Insect immune priming:*

- ecology and experimental evidences. *Ecol. Entomol.* 41, 351-366.
- COOPER D., ELEFThERIANOS I., 2017. *Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges.* *Front. Immunol.* 8, e539.
- CYTRYŃSKA M., WOJDA I., JAKUBOWICZ T., 2016. *How insects combat infections. [W:] Lessons in immunity: from single-cell organisms to mammals.* BALLARIN L., CAMMARATA M. (red.). Academic Press/Elsevier, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 117-128.
- DE GREGORIO E., SPELLMAN P. T., TZOU P., RUBIN G. M., LEMAITRE B., 2002. *The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila.* *EMBO J.* 21, 2568-2579.
- DUBOVSKIY I. M., WHITTEN M. M., KRYUKOV V. Y., YAROSLAVTSEVA O. N., GRIZANOVA E. V., GREIG C., MUKHERJEE K., VILCINSKAS A., MITKOVETS P. V., GLUPOV V. V., BUTT T. N., 2013a. *More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity.* *Proc. Biol. Sci.* 280, e20130584.
- DUBOVSKIY I. M., WHITTEN M. M., YAROSLAVTSEVA O. N., GREIG C., KRYUKOV V. Y., GRIZANOVA E. V., MUKHERJEE K., VILCINSKAS A., GLUPOV V. V., BUTT T. M., 2013b. *Can insects develop resistance to pathogenic fungi.* *PLoS One* 8, e60248.
- FALLON J., TROY N., KAVANAGH K., 2011. *Pre-exposure of Galleria mellonella larvae to different doses of Aspergillus fumigatus conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses.* *Virulence* 2, 413-421.
- FAULHABER L., KARP R., 1992. *A diphasic immune response against bacteria in the american cockroach.* *Immunology* 75, 378-381.
- FREITAK D., SCHMIDTBERG H., DICKEL F., LOCHNIT G., VOGEL H., VILCINSKAS A., 2014. *The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects.* *Virulence* 5, 547-554.
- GARLY M., MARTINS C., BALÉ C., BALDÉ M., HEDEGAARD K., GUSTAFSON P. i współaut., 2003. *BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa.* *Vaccine* 21, 2782-2790.
- HAINÉ E. R., ROLFF J., SIVE-JOTHY M. T. 2007. *Functional consequences of blood clotting in insects.* *Dev. Comp. Immunol.* 31, 456-564.
- KANOST M. R., GORMAN M. J., 2008. *Phenoloxidasases in insect immunity. [W:] Insect immunology.* BECKAGE N. E. (red.). Elsevier, Amsterdam, 69-96.
- KURTZ J., 2005. *Specific memory within innate immune systems.* *Trends Immunol.* 26, 186-192.
- KURTZ J., ARMITAGE S., 2017. *Dissecting the dynamics of trans-generational immune priming.* *Mol. Ecol.* 26, 3857-3859.
- KWADHA C. A., ONG'AMO G. O., NDEGWA P. N., RAINA S. K., FOMBONG A. T., 2017. *The biology and the control of the greater wax moth Galleria mellonella.* *Insects* 8, doi: 10.3390/insects8020061.
- LAVINE M. D., STRAND M. R., 2002. *Insect hemocytes and their role in immunity.* *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295-1309.
- LI D., SCHERFER C., KORAYEM A. M., ZHAO Z., SCHMIDT O., THEOPOLD U., 2002. *Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade.* *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 919-928.
- LITTLE T., KRAALJEVELD A., 2004. *Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates.* *Trends Ecol. Evol.* 19, 58-60.
- MILUTINOVIC B., KURTZ J., 2016. *Immune memory in invertebrates.* *Seminars Immunol.* 28, 328-342.
- MORET Y., SIVA-JOTHY M., 2003. *Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, Tenebrio molitor.* *Proc. Royal Soc. B, Biol. Sci.* 270, 2475-2480.
- MOUSSIAN B., 2010. *Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation.* *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 363-75.
- MOWLDS P., KAVANAGH K., 2008. *Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of Galleria mellonella to infection by Candida albicans.* *Mycopathologia* 165, 5-12.
- NETEA M., QUINTIN J., VAN DER MEER J., 2011. *Trained immunity: a memory for innate host defence.* *Cell Host Microbe* 9, 355-361.
- PHAM L., DIONNE M., SHIRASU-HIZA M., SCHNEIDER D., 2007. *A Specific primed immune response in Drosophila is dependent on phagocytes.* *Plos Pathogens* 3, e26.
- RAMARAO N., NIELSEN-LEROUX C., LERECLUS D., 2012. *The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis.* *J. Visual. Exp.* 70, e4392.
- ROYET J., 2004. *Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from Drosophila and other insect models.* *Mol. Immunol.* 41, 1063-1075.
- SADD B., SCHMID-HEMPPEL P., 2006. *Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure.* *Curr. Biol.* 16, 1206-1210.
- SCHMOLZ E., LAMPRECHT I., 2004. *Thermal investigations on social insects. [W:] The nature of biological systems as revealed by thermal methods.* LÖRINCZY D. (red.). Kluwer Academic Publishers, New York-Boston-Dordrecht-London-Moscow, s. 250-283.
- SCHMOLZ E., SCHULZ O., 1995. *Calorimetric investigations on thermoregulation and growth of wax moth larvae Galleria mellonella.* *Thermochim. Acta* 251, 241-245.
- STOKES B. A., YADAV S., SHOKAL U., SMITH L. C., ELEFThERIANOS I., 2015. *Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals.* *Front. Microbiol.* 6, 1-9.
- TASZŁOW P., WOJDA I., 2015. *Changes in the hemolymph protein profiles in Galleria mellonella infected with Bacillus thuringiensis involve apolipophorin III. The effect of heat shock.* *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 88, 123-143.
- TASZŁOW P., VERTYPOROKH L., WOJDA I., 2017. *Humoral immune response after repeated infection with Bacillus thuringiensis.* *J. Inverteb. Pathol.* 149, 87-96.
- THEOPOLD U., LI D., FABBRI M., SCHERFER C., SCHMIDT O., 2002. *The coagulation of insect hemolymph.* *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 363-372.
- VAN DER MEER J., JOOSTEN L., RIKSEN N., NETEA M., 2015. *Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence.* *Mol. Immunol.* 68, 40-44.
- VERTYPOROKH L., TASZŁOW P., SAMOREK-PIERÓG M., WOJDA I. 2015. *Short-term heat shock affects the course of immune response in Galleria mellonella naturally infected with the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana.* *J. Invert. Pathol.* 130, 42-51.

- VILMOS P., KURUCZ E., 1998. *Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system*. Immunol. Lett. 62, 59-66.
- VOGEL H., ALTINCICEK B., GLOCKNER G., VILCINSKAS A., 2011. *A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host Galleria mellonella*. BMC Genomics 12, 308.
- WERNER T., LIU G., KANG D., EKENGREN S., STEINERH H., HULTMARK D., 2000. *A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13772-13777.
- WOJDA I., 2010. *Szok termiczny a podatność organizmów na zakażenie i stress osmotyczny*. Post. Biochem. 56, 83-94.
- WOJDA I., 2017a. *Immunity of the greater wax moth Galleria mellonella*. Insect Sci. 24, 342-357.
- WOJDA I., 2017b. *Temperature stress and insect immunity*. J. Therm. Biol. 68, 96-103.
- WOJDA I., JAKUBOWICZ T., 2007. *Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in Galleria mellonella larvae*. J. Insect Physiol. 53, 1134-1144.
- WOJDA I., TASZŁOW P., 2013. *Heat shock affects host-pathogen interaction in Galleria mellonella infected with Bacillus thuringiensis*. J. Insect Physiol. 59, 894-905.
- WOJDA I., KOWALSKI P., JAKUBOWICZ T., 2004. *JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae Galleria mellonella*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 56, 143-154.
- WOJDA I., KOWALSKI P., JAKUBOWICZ T., 2009. *Humoral immune response of Galleria mellonella larvae after infection by Beauveria bassiana under optimal and heat-shock conditions*. J. Insect Physiol. 55, 525-531.
- WU G., ZHAO Z., LIU C., QIU L., 2014. *Priming Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against Photobacterium luminescens TT01 and the role of innate immunity in the process*. J. Econ. Entomol. 107, 559-569.
- WU G., YI Y., LV Y., LI M., WANG J., QIU L., 2015a. *The lipopolysaccharide (LPS) of Photobacterium luminescens TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in Galleria mellonella larvae*. J. Invert. Pathol. 127, 63-72.
- WU G., YI Y., SUN J., LI M., QIU L., 2015b. *No evidence for priming response in Galleria mellonella larvae exposed to toxin protein PirA₂B₂ from Photobacterium luminescens TT01: An association with the inhibition of the host cellular immunity*. Vaccine 33, 6307-6313.

KOSMOS Vol. 66, 4, 541-551, 2017

IWONA WOJDA, LIDIJA VERTYPOROKH

Department of Immunobiology, Institute of Biology and Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, E-mail: wojda@hektor.umcs.lublin.pl

INSECT IMMUNE SYSTEM IN DEFENSE OF ORGANISM INTEGRITY

Summary

Insects populate all ecological land niches. Their evolutionary successes have been achieved thanks to well-functioning defense mechanisms. The immune system of this group of animals is based only on innate immunity mechanisms. It consists of humoral and cellular reactions that complement each other in the fight against infection. The paper briefly summarizes the state of the art of insect immune system and highlights its role in maintaining homeostasis of the organism. In addition, the modulation of immune response by changes in ambient temperature is described taking an example of a greater wax moth *Galleria mellonella*. Additionally, the current information concerning priming of insect immune system is presented with special emphasis on the greater wax moth.

Key words: *Galleria mellonella*, immune priming, insect immunity, temperature stress