

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY
Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné
zoologie



**Studium imunitního systému bource morušového (*B. mori*, L.)
a jeho ovlivnění některými stresovými faktory**

Autoreferát k dizertační práci

Mgr. Pavel Hyršl

Brno 2004

Úvod:

Hmyz patří mezi ekologicky nejúspěšnější skupiny organismů žijících na naší planetě. Antigennímu tlaku prostředí, především různým mikroorganismům, hmyz čelí reakcemi své přirozené (vrozené) imunity. Absenci komplikovaných imunitních reakcí hmyz nahrazuje na jedné straně specifickými adaptacemi a na druhé straně také dobře fungujícím imunitním systémem. Adaptivní imunita, jakou známe u obratlovců, u hmyzu (snad až na výjimky) neexistuje, protože pro ni nemá nezbytné genetické, morfologické a funkční předpoklady.

Cíle práce:

Cílem této práce bylo přispět k poznání hmyzího imunitního systému studiem imunitních odpovědí jednak v neovlivněném organismu a jednak po působení některých stresových faktorů.

Studium fagocytózy v rámci buněčné imunity bylo zaměřeno na detekci reaktivních kyslíkových metabolitů v hemolymfě bource morušového (*Bombyx mori*). Cílem bylo zjistit, jestli dochází k oxidačnímu vzplanutí hemocytů a ke vzniku těchto metabolitů podobně jako u savčích fagocytů.

Dalším cílem bylo zjistit vliv entomopatogenních hlístovek a jejich symbiotických bakterií na proteosyntézu *B. mori*. Prvním krokem byla kultivace entomopatogenních hlístovek na náhradním hostiteli a dalším krokem izolace a determinace jejich symbiotických bakterií.

Školitelé: Doc. RNDr. Milan Marek, CSc.
Prof. RNDr. Vladimír Šimek, CSc.

Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

Hlavní výsledky:

V úvodní části práce se věnuji přehledu proteinů hmyzí hemolymfy a stručnému popisu imunitního systému hmyzu. Připojená publikace informuje o vlivu podchlazení na larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*, Lepidoptera). Podchlazení na 0°C indukuje syntézu proteinů „de novo“ a snižuje spotřebu kyslíku na minimum. Po přemístění do 30°C se spotřeba kyslíku zvýší na původní hodnoty během 40 minut. Osmotický tlak hemolymfy vykazuje také velké rozdíly jako odpověď na podchlazení organismu.

Tvorba reaktivních kyslíkových metabolitů (RKM) byla u některých bezobratlých popsána jako důležitý mikrobicidní obranný mechanismus podobně jako u savčích fagocytů. Cílem bylo zjistit, jestli hemocyty larev bource morušového (*B. mori*, Lepidoptera) produkují RKM jako prostředek oxidativního zabíjení invadujících patogenů. Produkce RKM byla měřena jako chemiluminiscence nestimulované nebo stimulované (zymozan, phorbol myristát acetát, vápníkový ionophor, rýžový škrob, bakterie *Xenorhabdus nematophila*) hemolymfy v prostředí luminolu nebo lucigeninu. Nebyla detekována žádná produkce RKM. Aby se eliminoval antioxidační potenciál plasmy hemolymfy (velmi vysoký, jak prokazuje chemiluminiscenční měření), byly v následujících experimentech použity izolované hemocyty. Nebyla prokázána spontánní ani aktivovaná produkce RKM. Stejně výsledky byly dosaženy spektrofotometrickými (NBT, cytochrom c) a fluorometrickými (barvení dihydrorhodaminem a hydroethidinem) metodami. Žádná použitá metoda tedy neprokázala tvorbu RKM hemocyty *B. mori* jako součást jejich imunitních reakcí.

Při experimentech s hemocyty *B. mori* byl používán lucigenin jako luminofor. Pro optimalizaci podmínek měření byla testována jeho vlastní chemiluminiscence

v závislosti na vlivu experimentálních podmínek. Vliv teploty a záření byl testován u roztoků 10^{-2} – 10^{-5} M lucigeninu rozpuštěného v různých rozpouštědlech. Ozáření UV zářením (280, 297, 313, 365 nebo 400 nm) indukovalo zvýšenou chemiluminiscenci lucigeninu rozpuštěného v borátovém pufru (zejména u koncentrací 10^{-2} a 10^{-3} M). Všechny vlnové délky měly podobný efekt. Při použití destilované vody nebo dimethyl sulfoxidu jako rozpouštědel nebyla zaznamenána žádná chemiluminiscence. Při použití různých rozpouštědel nebyly výsledky závislé na pH. Chemiluminiscence 10^{-2} M a 10^{-3} M roztoku lucigeninu rozpuštěného v borátovém pufru vzrůstá v závislosti na teplotě (25, 30, 37 nebo 40°C) během 16 hodin měření. Teploty vyšší než 25°C a intenzivní světelné záření mohou významně ovlivnit výsledky experimentů, kde se používá lucigenin jako luminofor.

Dobrym příkladem přirozeného stresového faktoru pro hmyzí imunitní systém je invaze entomopatogenních hlístovek, kdy se parazit dostává do hostitele přirozenou cestou. Cílem bylo studovat vliv entomopatogenních hlístovek na proteosyntézu larev *B. mori*. Situace byla ovšem komplikována tím, že hlístovky uvolňují ze střeva symbiotické bakterie, jejichž působení bylo nutné oddělit od působení samotných hlístovek. Prvním krokem v následujících experimentech byla kultivace hlístovek a poté izolace a determinace symbiotických bakterií.

Symbiotické terestrické bakterie byly izolovány z entomopatogenních hlístovek *Heterorhabditis bacteriophora* H221 (Pouzďřany) a *Steinernema feltiae* (Prosenice). Protože se jednalo o unikátní izoláty, byly uloženy do České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně pod identifikačními čísly CCM 7002, 7003 a 7004, jako první izoláty rodu *Photorhabdus* a *Xenorhabdus* z České republiky v CCM. Izolát CCM 7002 z *H. bacteriophora* vykazoval jasnou bioluminiscenci, která je typická pro rod *Photorhabdus*, jediný rod terestrických bioluminiscenčních bakterií. Proto byl tento izolát srovnáván s typovými kulturami platných druhů a poddruhů rodu

Photorhabdus (*P. luminescens* ssp. *luminescens*, *P. luminescens* ssp. *laumondii*, *P. luminescens* ssp. *akhurstii*, *P. asymbiotica* a *P. temperata*). Izoláty z *S. feltiae* CCM 7003 a 7004 byly srovnávány s typovými kulturami platných druhů a poddruhů rodu *Xenorhabdus* (*X. beddingii*, *X. bovienii*, *X. nematophila*, *X. poinarii* a *X. japonica*).

Všechny testované kmeny rodu *Photorhabdus* vykazovaly bioluminiscenci, která byla měřena na luminometru (BioOrbit 1251) při 25 a 37°C po dobu 2 hod. Luminiscenční signál byl nejvyšší při optimální růstové teplotě 25°C, zatímco se zvyšováním teploty na 37°C luminiscence klesala nebo byla konstantní. Každý z testovaných kmenů měl charakteristickou hodnotu bioluminiscence. Nejvyšší bioluminiscenční hodnota byla naměřena u druhu *P. temperata*.

Srovnání proteinového spektra testovaných bakteriálních kultur bylo provedeno polyakrylamidovou gradientovou gelovou elektroforézou (SDS – PAGE). Podařilo se prokázat více než 40 proteinových frakcí v rozmezí 6,5 – 200 kDa se signifikantními rozdíly mezi jednotlivými druhy a poddruhy rodů *Photorhabdus* a *Xenorhabdus*.

Pro studium fenotypových vlastností byly použity komerční identifikační sety (API 20 E, API 20 NE, ENTEROtest 24) spolu s dodatkovými růstovými konvenčními testy (ve spolupráci s CCM).

Izolát CCM 7002 vykazoval poměrně nízkou biochemickou aktivitu, což je v souladu s popisem rodu *Photorhabdus*. Fenotypové charakteristiky ukazují na podobnost kmene CCM 7002 s druhem *P. luminescens* ssp. *laumondii*, i když měření bioluminiscence a srovnání proteinových spekter testovaných kmenů toto zcela nepotvrdilo. Na jednoznačnou determinaci izolátu se stále pracuje.

Izoláty CCM 7003 a 7004 lze determinovat na základě fenotypových charakteristik a proteinových spekter jako *X. bovienii*.

Závěr:

Výsledky mé dizertační práce rozšiřují dosavadní vědomosti o imunitním systému *B. mori* a přinášejí nové informace nejen do imunologie, ale i do dalších vědních oborů jako jsou mikrobiologie, parazitologie nebo biochemie.

Introduction:

Insects belong to the ecologically most successful organisms living on the Earth. An adaptation to the antigen pressure of the environment (mainly to micro-organisms) lies in reactions of insect innate immunity. However, adaptive immunity in the form we know it in vertebrates does not exist in insects (perhaps with some exceptions), because there are no genetical, morphological or functional presumptions.

Aims of the study:

The aim of this study was to contribute to the knowledge of insect immune system by the study of immune reactions of control and stressed organisms. Firstly it was to investigate whether hemocytes of *Bombyx mori* (Lepidoptera) larvae can produce ROM as a tool for the oxidative killing of invading pathogens and secondly to study the influence of entomopathogenic nematodes on proteosynthesis of *B. mori* larvae.

Main results:

In the introduction part of my Ph.D. thesis I deal with an overview of the insect hemolymph proteins and insect immunity. An enclosed publication extends a list of stress factors (an influence of cooling among them), affecting larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). A prolonged exposure of larvae to a sub-physiological temperature (0°C) induced an increased amount of proteins in the hemolymph. In addition, the oxygen consumption at this temperature exerted an immediate decrease. In a reverse situation (transfer to 30°C), the larvae regained the original

levels of the oxygen consumption in approximately 40 minutes. The osmotic pressure of hemolymph also exhibited dramatic changes in response to exposure to low temperature.

A generation of reactive oxygen metabolites (ROM) by hemocytes has been previously considered an important microbicidal defence mechanism of some invertebrates similar to those in vertebrate phagocytes. The aim of my study was to investigate whether hemocytes of *B. mori* larvae can produce ROM as a tool for the oxidative killing of invading pathogens. The production of ROM measured as a luminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence (CL) of unstimulated or stimulated (zymosan particles, phorbol myristate acetate, calcium ionophore, rice starch or *Xenorhabdus nematophila*) hemolymph was not detectable. To eliminate the influence of the antioxidative potential of hemolymph plasma (extremely high when measured by the chemiluminescence method), isolated hemocytes were also tested. However, spontaneous as well as the activated generation of ROM by isolated hemocytes remained at the background level. No ROM production by isolated hemocytes was observed through spectrophotometric (NBT test, cytochrome c assay) and fluorometric (using dihydrorhodamine and hydroethidine probes) analyses. To conclude, none of the several experimental approaches used in this study indicated the production of ROM by hemocytes of *B. mori* larvae as a part of their immune response.

During measurement of CL in hemocytes of *B. mori* lucigenin was used as luminophor. To optimise the measurement, the effect of experimental conditions such as light radiation and temperature on chemiluminescence of 10^{-2} – 10^{-5} M lucigenin dissolved in various types of solvents was tested. Irradiation by UV light (280, 297, 313, 365 or 400 nm) induced a significant increase in CL of lucigenin dissolved in borate buffer (especially 10^{-2} - 10^{-3} M). All wavelengths used had a

similar effect. UV irradiation did not induce changes in CL activity of lucigenin dissolved in dH₂O or in DMSO. Different results for various solvents were not dependent on pH. CL activity of 10⁻² M and 10⁻³ M lucigenin dissolved in borate buffer increased depending on the solution temperature (25, 30, 37 or 40°C) already at the beginning of the analysis, with a further increase during 16 h incubation period. It can be summarised that temperatures higher than 25°C and intensive light irradiation are among those factors which significantly affect the result of analysis when lucigenin is used as a luminophor.

A good example of the natural stress factor for insect immune system is the invasion of entomopathogenic nematodes, where the parasite comes into the host organism by the natural way. We aimed to study the influence of entomopathogenic nematodes on proteosynthesis of *B. mori* larvae. However, the situation was complicated by the presence of symbiotic bacteria into the gut of entomopathogenic nematodes, so the separation of the influence of bacteria and nematodes was necessary. The first step in conducting experiments was the cultivation of nematodes followed by the isolation and identification of symbiotic bacteria.

Symbiotic bacteria were isolated from entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* H221 (Pouzďřany) and *Steinernema feltiae* (Prosenice). Because these isolates were unique, they were stored into the Czech Collection of Microorganisms (CCM) in Brno, identification numbers CCM 7002, 7003 and 7004, as first isolates of *Photorhabdus* or *Xenorhabdus* from Czech Republic in the CCM. Isolate CCM 7002 from *H. bacteriophora* shows clear luminescence, which is known as a characteristic of genus *Photorhabdus*, the only known terrestrial luminescent bacteria. Thus, our isolate was compared with type cultures of *Photorhabdus* species and subspecies (*P. luminescens* ssp. *luminescens*, *P. luminescens* ssp. *laumondii*, *P. luminescens* ssp. *akhurstii*, *P. asymbiotica* and *P.*

temperata). Isolates 7003 and 7004 from *S. feltiae* were compared with type cultures of *Xenorhabdus* species (*X. beddingii*, *X. bovienii*, *X. nematophila*, *X. poinarii* a *X. japonica*).

All *Photorhabdus* strains were shown to exhibit luminescence. Luminescence was measured on luminometer (BioOrbit 1251) at 25 and 37°C for two hours. Luminescent signal was observed to rise at 25°C and either decreased or was constant at a temperature of 37°C. Each strain tested had a typical luminescent signal. The highest values were always shown by *P. temperata*.

To compare the protein spectrum of the bacterial species, bacterial proteins were analysed by polyacrylamide gradient gel electrophoresis (SDS-PAGE). We found more than 40 protein fractions in the range of 6.5 – 200 kDa. We demonstrated significant differences between the species and subspecies of genus *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*.

Phenotypic characteristics were based on identification kits (API 20 E, API 20 NE, ENTERotest 24) supplemented with additional conventional tests (in co-operation with CCM, Brno).

According to the results obtained by the described tests, identification of the CCM 7002 to the species level remains dubious due to low biochemical activity. Mostly related species to CCM 7002 on the basis of phenotyping is *P. luminescens* species. The isolates CCM 7003 and 7004 are related to *X. bovienii* CCM 7080^T. As present, the identification process continues.

Conclusions:

The results of my Ph.D. thesis enlarge our present knowledge about the immune system of the silkworm (*B. mori*) and bring the new informations not only for immunology, but also for microbiology, parasitology or biochemistry.

SEZNAM PUBLIKACÍ PRO PŘEDKLÁDANOU DIZERTAČNÍ PRÁCI:

1/ Články v odborných časopisech:

HYRŠL Pavel, LOJEK Antonín, ČÍŽ Milan, KUBALA Lukáš

Chemiluminescence of lucigenin is dependent on experimental conditions.

- přijato k publikaci v časopise *Luminescence*

HYRŠL Pavel, ČÍŽ Milan, KUBALA Lukáš, LOJEK Antonín

Silkworm (*Bombyx mori*) hemocytes do not produce reactive oxygen metabolites as a part of defence mechanisms.

- odesláno do *Folia Microbiologica*

HYRŠL Pavel, ČÍŽ Milan, LOJEK Antonín

Comparison of the bioluminescence of *Photobacterium* species and subspecies type strains.

- odesláno do *Folia Microbiologica*

ŠAUMAN Ivo, HYRŠL Pavel, MAREK Milan

Cooling shock induction of protein synthesis by larvae of *Galleria mellonella* (L.) (Insecta: Lepidoptera). *Biological Bulletin of Poznań*. 2001, vol. 38, no. 2, s. 151-162.

HYRŠL Pavel, MAREK Milan

Influence of proleg ligature on the protein level in haemolymph of *Bombyx mori* (L.) larvae. *Biological Bulletin of Poznań*. 1999, vol. 36, no. 2, s. 103-110.

2/ Postery:

HYRŠL Pavel, ČÍŽ Milan, Sedláček Ivo, Páčová Zdenka, Lojek Antonín

Bioluminescence, electroforetic and biochemical characteristics of a new Czech isolate of the genus *Photobacterium*. In: Sborník abstraktů Tomáškovy dny 2003. Brno: Mikrobiologický ústav LF MU a FN u svaté Anny v Brně, 2003. 1 s.

HYRŠL Pavel, ŠIMEK Vladimír

The protein spectrum changes of two silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids during the development. In: Študentská vedecká konferencia, Zborník abstraktov prác diplomantov a doktorandov. : Slovenská akadémia ved, 2003. s. 25-25.

HYRŠL Pavel, ŠIMEK Vladimír

Changes of protein spectrum of hemolymph of wax moth (*Galleria mellonella* L.) during development. In: Zoologické dny Brno 2003. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, 2003. ISBN 80-239-0073-0, s. 82-3.

HYRŠL Pavel, LOJEK Antonín, ČÍŽ Milan, KUBALA Lukáš

The microbicidal effect of the silkworm (*Bombyx mori*) hemocytes is not dependent on oxygen reactive metabolites. In: Zborník XVIII. Biochemický zjazd. Bratislava: VEDA, 2002. s. 204-204.

3/ Přednášky:

HYRŠL Pavel, ČÍŽ Milan, KUBALA Lukáš, LOJEK Antonín

Silkworm (*Bombyx mori*) hemocytes do not produce reactive oxygen metabolites as a part of defence mechanisms. 1st European workshop on the analysis of phagocyte functions. In: Final program and book of abstracts, Brno, 2003, s. 16.