

Insekten-Immunität

Biochemie, Genetik und evolutionäre Entwicklungsgeschichte von Immunsystemen bei Insekten, insbesondere *Drosophila melanogaster* – eine Übersicht

BENJAMIN IBLER, Kümmerbruck

Viele Insekten haben Probleme mit **Insektenpathogenen** aus den Gruppen der Bakterien, Pilze, Protozoen, Nematoden und Parasitoiden. Die Organismen dringen **peroral** oder **perkutan** in den Wirtsorganismus ein. Daher ist es sinnvoll ein **Schutz- und Abwehrsystem** zu entwickeln, um gegen die **pathogenen Organismen ankämpfen** zu können. Viele der nachfolgend genannten Erkenntnisse beruhen auf *Drosophila*, die Grundzüge der Insekten-Immunologie sind aber sicher auf das Gros der Kerbtiere übertragbar.

Mechanische, unspezifische und nicht induzierte Abwehrmaßnahmen

Die **erste Verteidigungslinie** der Insekten ist eine strukturelle und umfasst das **Außen- (Exo-)Skelet**, die **peritrophischen Membranen** von Vorder- und Enddarm, die deren Epithelien schützen, und die Tracheen. Der niedrige pH, die Verdauungsenzyme und die unspezifisch antibakteriellen Enzyme (z.B. Lysozym) im Mitteldarmbereich tun ihr übriges.

Gliederung des Immunsystems

Drosophila besitzt **humorale** als auch **zelluläre Mechanismen**, um sich gegen Mikroorganismen zu wehren. **Verletzungsbedingte Sekretion** von einer Reihe von **antimikrobiellen** (sieben bei *Drosophila*) Peptiden und Isoformen durch das **Leberäquivalent Fettkörper** ist bekannt. Die **Abwehrmechanismen** sind nicht komplett unspezifisch, sondern zu einem gewissen Grad spezifisch und unterscheiden zwischen den **Klassen der** eindringenden Organismen, insbesondere **Mikroorganismen**, bedingt durch die Aktivierung verschiedener molekularer Wege, und wirken entweder schnell oder langsam.

Fragestellungen

- (1) Wie erkennen Insekten Pathogene
- (2) Wie aktivieren Pathogene die angeborene Immunantwort
- (3) Wie zerstört die ausgelöste Immunantwort die Eindringlinge

Das sind Fragestellungen sind, die im Folgenden kurz angeschnitten werden sollen.

Vorweggenommene Befunde

Drosophila differenziert zwischen den eindringenden Pathogenen. Der entomophage Pilz *Beauveria bassiana* aktiviert selektiv vor allem **Drosomycin**, das

gramnegative Bakterium *Erwinina c. carotovora* aktiviert **Diptericin**. Das Immunsystem reagiert also angepasst.

Erkennung des „Nicht-Selbst“ und spezifische, humorale Antwort

Insekten besitzen **kein** auf **somatischer Rekombination, Genfragmenten oder klonaler Expansion** von **Lymphozyten basierendes Erkennungssystem** für **körperfremdes Gewebe**.

Die **Erkennung pathogener Organismen** beruht auf **konservierten Oberflächenstrukturen** und **Wirtsproteinen**. Als **Epitope** kommen **Lipopolysaccharide** und **Peptidoglykane (Murein)** der Mikroorganismen in Frage. Das Genom der Frucht- oder Tauflye besitzt viele Gene, die für **homologe Proteine** codieren, denen man **Rezeptorfunktionen** zuschreiben könnte. Von Bedeutung ist vor allem ein **nicht-klonal verbreitetes Muster**; das **Konzept** kann auch auf **apoptotische Zellen** ausgeweitet werden.

Man kann die ausgeschütteten Peptide zum einen nach der Funktion einteilen, zum anderen grob nach der Struktur. **Drosomycin** und **Defensin** (strukturell ähnlich zu **Skorpionsgiften**) sind **cyclische Polypeptide**. Letztere Verbindungen zeigen eine hohe Konservativität, Drosomycin ähnelt antifungalen Peptiden bei Pflanzen.

Drosomycin und **Metchnikowin** werden vornehmlich gegen Pilze eingesetzt, letzteres auch bei grampositiven Bakterien.

Besonders drei verschiedene Klassen **linearer antimikrobieller Polypeptide** sind erwähnenswert.

Die **leucin-reiche Proteine** werden **Toll-like-Receptors (TLR)** genannt und kommen auch bei den Säugetieren vor. Das Toll-Protein, das einen Rezeptor darstellt, ist bei Insekten vor allem während der Embryogenese aktiv und wirkt hier strukturbestimmend. Das System scheint direkt an der Erkennung von Lipopolysacchariden teilzunehmen, wobei zahlreiche weitere Faktoren benötigt werden. **Cecropine** sind hauptsächlich **kationische Proteine** von 4 kDa mit amphipathischen α -Helices. Sie wirken als Detergentien und können auch Kanäle in der Bakterienmembran bilden. Die dritten sind die glycinreichen Peptide.

Humorale Signaltransduktionskaskaden

Wie aktiviert die Erkennung von Eindringlingen die Abwehrmaßnahmen des Wirtes?

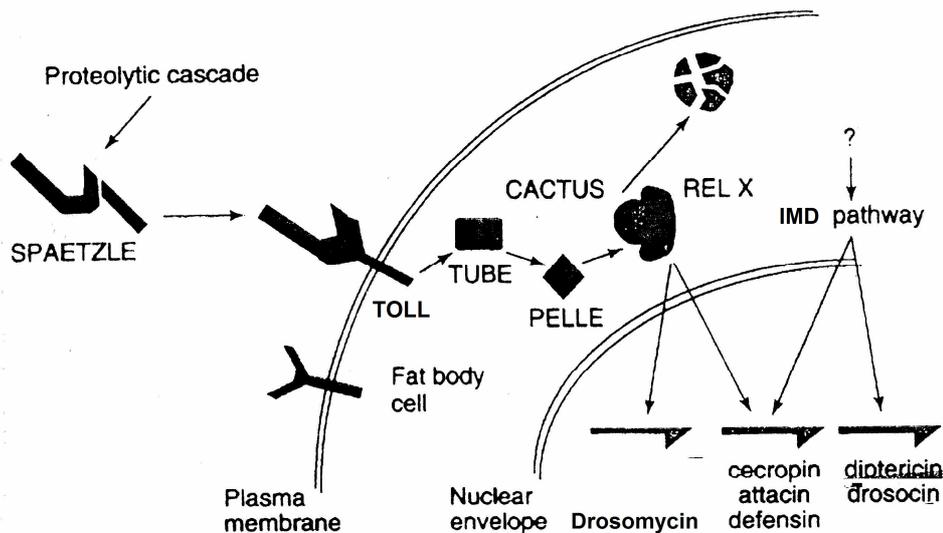


Abbildung 1: Die beiden hauptsächlich proteolytischen Kaskaden in vereinfachter Darstellung bei der spezifischen, humoralen Immunantwort. Bemerkenswert ist die Verwendung molekularer Wege, die auch bei der embryonalen Musterbildung eine Rolle spielen. Nach HOFFMAN (1997), verändert.

Erwähnung soll hier vor allem eine **NF- κ B-artige Signaltransduktionskaskade** finden, deren drei (Haupt-)Komponenten bei den Insekten die Proteine Dorsal, Dorsal-related immunity factor (DIF) und Relish sind. SPAETZLE wird gespalten aufgrund eines Signals von der Koagulationskaskade und bindet an den Toll-Rezeptor. Dorsal und DIF werden vom Toll Rezeptor aktiviert über TUBE, PELLE, RELISH; Drosomycin, Cecropin, Attacin und Defensin werden exprimiert.

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor bei Säugetieren und ist dem DORSAL außerordentlich ähnlich. Drosomycin und Metchnikowin werden vom Rel Protein aktiviert.

Es gibt aber auch **Befunde** für eine **alternative Steuerung** in den Grenzgeweben; in den Tracheen wird Drosomycin von der IMD-Kaskade gesteuert.

Das Genprodukt zum IMD-Gen konnte noch nicht identifiziert werden, und sonst ist weiter auch nichts bekannt.

Antimikrobielle Gene werden wohl von einem Gleichgewicht aus Eingängen beider molekularen Wege gesteuert. Beide Wege sind sehr sensitiv in Bezug auf die Unterscheidung. Die **Toll-Kaskade** wird vornehmlich bei der **Infektion mit Pilzen** benötigt, der IMD-Weg vor allem bei der Infektion mit gramnegativen Bakterien. Die unterschiedliche Antwort auf grampositive und gramnegative Bakterien ist schwieriger zu interpretieren.

Vielleicht auch ein TNF (**Tumor-Nekrosis-Faktor**)-artiger Weg bei *Drosophila*. Identifikation von Proteinen mit schwacher Homologie (FADD, RIP, TRAF2). Welche Rolle dieser bei der Regulation der antimikrobiellen Genexpression spielen könnte, ist aber unklar.

Die Proteine sind nur der eine **Arm der humoralen Immunantwort**, des spezifischen; es gibt auch einen

unspezifischen: Insekten können auch anorganische Säuren, z.B. Salpetersäure produzieren, als Antwort auf einen Befall. Der Malariaerreger *Plasmodium* löst die Synthese von HNO_3 bei *Anopheles stephensi* aus. *Drosophila* besitzt ebenfalls ein Salpetersäuresynthasegen. Desweiteren sondert sie Eisenionen, ab, um den bakteriellen Befall einzuschränken.

Kontrollfunktionen und Verknüpfung. Der Toll-Pfad reguliert aber auch die zellulären Immunantworten. Eine Isoform des Rezeptors stimuliert auch **Haemocyten**, die benötigt werden, um die eingedrungenen Pathogene einzukapseln. Bei Säugetieren spielen auch die **MAP** (Mitogen activated protein)-Kinase und der **JAK-STAT** (signal transducer and activator of transcription) eine Rolle bei der Immunantwort. Inwiefern das auch bei *Drosophila* der Fall ist, das wartet weiter auf Klärung. JAK-STAT regt die Haemocyten zur Teilung an, nach KHUSCH & LEMAITRE (2000) ist er aber nicht essentiell für die Aktivierung antimikrobieller Peptide.

Koagulations- und Melanisierungskaskade – zwischen humoral und zellulär

Bei allen Arthropoden initiiert eine **Verletzung zwei proteolytische Kaskaden**, die zu einer **Blutgerinnung** und **Melanisierung** an der Wunde führen. Fremdes Material, das in den Körper (Haemocoel) gelangt ist, kann ebenfalls Blutgerinnung und Melanisierung auslösen. Proteaseinhibitoren verhindern die allzu große Ausbreitung. Über das konkrete System bei *Drosophila* ist wenig bekannt; die meisten Erkenntnisse stammen vom Pfeilschwanzkrebs (*Limulus spec.*). Bei ihm lösen **Lipopolysaccharide** oder **$\beta(1,3)$ -Glucane** die **Koagulationskaskade** aus, die drei Proteasezymogene beinhaltet. Zum ersten der Faktor C, ein 123 kDa Protein bestehend aus einigen

CCP-Domänen, einer an einen epidermalen Wachstumsfaktor erinnernden Domäne und einer lectinartigen Domäne. Zweites und drittes Mitglied der Kaskade sind der Faktor B und das „proclotting“-Enzym; beide enthalten jeweils drei **Disulfidbrückenbindungen**; ähnliche Proteine (SNAKE und EASTER) spielen bei *Drosophila* eine Rolle in der embryonalen Musterbildung. Molekulares Endziel bei *Limulus* ist Koagulen, das unlöslich wird und aggregiert (Koagulin), in dem Aminogruppen bei Anwesenheit von Ca^{2+} miteinander verbunden werden. Eine **unerwartete Ähnlichkeit** von Koagulen zu SPAETZLE, dem Ziel der oben genannten Proteine bei *Drosophila*, konnte festgestellt werden. Das *spaetzle* Gen-Produkt bewirkt die Produktion des antifungalen Peptides Drosomycin. In manchen Arbeiten wurde versucht eine Parallele zwischen beiden Systemen zu ziehen.

Prophenoloxidase ist das Schlüsselenzym bei der Melanisierung. Diese Vorstufe wird zunächst in einem Zwei-Schritt-Verfahren mithilfe von Serin-abhängigen Protease nach der Infektion funktionsfähig gemacht. Das Gen für die Phenoloxidase ist bereits vor 10 Jahren kloniert worden. Es entsteht eine schwarze Masse, die sich um die Wunde oder den Parasiten herumlagert.

Informationsübermittlung

Die Effektivität eines Immunsystems beruht zu einem großen Teil auf der Effektivität der Informationsübermittlung vom betroffenen Gewebe zum Gewebe, das die Immunantwort freisetzt, vornehmlich Fettkörper, aber auch Haemocyten. Bei Säugetieren übernehmen **Cytokine** diese Aufgabe. Cytokine sind innerhalb der Vertebraten nur wenig konserviert, d.h. sie weisen nur wenige Strukturhomologien auf. Gene für **cytokin-artige Proteine** wurden bei der Taufliege bislang noch nicht identifiziert.

Zellvermittelte Immunantwort - Einkapselung

Der Körperhohlraum der Frucht- oder Taufliege *Drosophila melanogaster* ist wie bei den übrigen Arthropoden mit Haemolymphe angefüllt, in der sich sowohl schwimmende wie auch festsitzende **Haemocyten** befinden, die von **haematopoetischen** Gewebe gebildet werden. Der vorherrschende Blutzelltyp der Larven ist abgerundet und mit einigen spitzen Einschlüssen versehen. Diese können sich zu **Makrophagen** ausdifferenzieren und **apoptotische Zellen, Zellpartikel und Bakterien** beseitigen. 5-10 % der Haematocyten besitzen kristalläre Einschlüsse, die Substrate und Enzyme für die Melanisierung des Blutäquivalents beinhalten. Im praepupalen Stadium erscheint eine große Anzahl von **Lamellocyten** in der Haemolymphe; diese weisen zwar keine phagocytotische Aktivität, können sich aufgrund ihrer adhäsiven Fähigkeit größere Fremdpartikel einkapseln. Diese Kapseln erscheinen dann dunkel aufgrund der Melanisierung durch die Aktivität des **Phenoloxidasystems**. Es können sich bei einigen *Drosophila*-Mutanten daraus melanotische Tumore bilden. **Haemocyten** haben zwar Anteil an der Produktion von antibakteriellen Peptiden, ihr Beitrag

dazu ist verglichen mit dem des Fettkörpers aber eher gering.

Zwei membranständige Rezeptoren in Form von Glykoproteinen konnten schon vor über 10 Jahren identifiziert werden; sie gehören der Familie von scavenger Rezeptoren (SR) an, einer Familien mit einem breiten Spektrum von Liganden. Der Rezeptor dSR-C stammt ursprünglich von einer haemocytenartigen Zelllinie. Bindet an ein breites Spektrum von polyanionischen Liganden, darunter ungeladenes **β -Glucan der Mikroorganismen**. dSRC wird in embryonischen Makrophagen, in larvalen Blutzellen und im Fettkörper exprimiert. **Der zweite Rezeptor**, CROQUEMORT (CRQ) wurde ursprünglich als Erkennungsschlüssel apoptotischer Zellen der **Makrophagen** entdeckt; **Makrophagen** mit diesem Rezeptor vernichten auch nur den kontrollierten Zelltod sterbendes Gewebe, keine Bakterien. Aufgrund seiner molekularen Struktur kann man CRQ der auch bei Säugetieren verbreiteten **CD36-Familie** zuordnen. Die Liganden, die CRQ in *Drosophila* bindet, sind bislang noch nicht identifiziert, doch wird der **Rezeptor aktiv bei Verletzung**, Eindringen von Fremdorganismen und im Gewebeumbau während Embryogenese und Metamorphose aktiv.

Wenn nun Pathogene erkannt wurden, gehen diese bei der zellulären **Einkapselung** an Sauerstoffmangel sowie an toxischen Verbindungen (Peroxidasen, hydrolytische Enzyme) zugrunde, die bei der **Melanisierung** entstehen.

In der Haemolymphe . . .

Eingedrungene Mikroorganismen können von Proteinen erkannt werden, die in der Haemolymphe circulieren, das ist jetzt also wieder ein **humoraler Aspekt**.

Aus der Motte *Hyalophora cecropia* wurde **Haemolin** beschrieben, das an Bakterien binden kann und diese Eindringlinge opsonisiert, so dass letztere zur Vernichtung durch die Makrophagen freigegeben werden. Haemolin mit einer molekularen Masse von 48 kD kann man in die Familie der Immunglobuline zählen. Durch die Bindung an der Oberfläche der Bakterien wird eine Phagocytose erst ermöglicht. Beide spielen eine Rolle bei der Opsonierung von Pathogenen.

Lectine wurden von verschiedenen Hexapoden-Arten beschrieben und funktionieren als **Agglutinine**, zuckerbindende Glykoproteine, und sind permanent in der Haemolymphe vorhanden. Einige Proteine sind für die Pathogenerkennung bei Vertebraten und verschiedenen anderen Invertebraten verantwortlich. Der Titer von **Galactin**, einem **Fruchtfliegen-Lectin**, geht nach der Infektion nach oben. Neben diesem Lectin und ungefähr 35 weiteren, anderen Lectinen, für die das Genom codiert, gibt es sicherlich noch zahlreiche weitere Proteine, z.B. ein **Peptidoglykan-Erkennungsprotein (PGRP)** bei *Trichoplusia ni*, das gramnegative Bakterien bindet und vom Fettkörper freigesetzt wird. Auch *Drosophila* besitzt nach der Codierung durch das Genom 10 dem PGRP homologe Proteine.

Diskussionsbedarf besteht noch über die von **Endosymbionten** produzierten **Antibiotika** und deren **Einfluss auf andere Bakterien**.

Genom

Die Gene, die für die Immunantwort verantwortlich sind, sind über das gesamte, aus **vier Chromosomen** bestehende Genom von *Drosophila* verteilt. Bemerkenswert ist zum ersten die **Clusterbildung** von Genen, die der gleichen Familie angehören; das trifft ebenfalls für Gene zu, die für **Rezeptoren** und die antimikrobiellen Peptiden codieren. Zum zweiten sei die zufällige räumliche Nähe von DNA-Abschnitten auf dem Chromosom zu nennen, die für ähnliche Funktionen codieren. Schnelle Evolution verschiedener Peptide durch Fehler, wie z.B. **inaequale Crossing-over**-Ereignisse, kann vermutet werden.

Erworbene Immunität

Die **frühere Annahme**, Insekten besäßen aufgrund der vergleichsweise eher kurzen Lebensspanne **keine erworbene Immunität** hat sich als **nicht richtig** herausgestellt. Mehrfach wurden Insekten **hitzetötete Bakterien** injiziert (**Kakerlaken** mit *Pseudomonas aeruginosa*) und später mit einer LD100-Dosis des gleichen Bakteriums behandelt. Vorher immunisierte lebten deutlich (signifikant) länger als vorher unbehandelte. Ein Mechanismus ist aber nicht bekannt.

Evolutions-ökologische Betrachtungen

Mit der Frage der Kosten-Nutzen-Analyse beschäftigt sich die Evolutionsökologie. Kosten sind es, die das Immunsystem limitieren.

Anbei noch ein paar Stichpunkte nach SCHMID-HEMPEL (2005):

-Ressourcen limitieren das Immunsystem. Die Produktion der antimikrobiellen Peptide hängt von den Reserven des Fettkörpers ab.

-Spezifität der Wechselwirkung mit den Eindringlingen; es gibt Möglichkeiten, das Immunsystem zu umgehen. Die Erkennung limitiert die Antwort.

-sehr resistente Insekten entwickeln sich langsamer und haben langsamere Fortpflanzungsrate. Immunabwehr- und Entwicklung verwenden zum Teil die Signaltransduktionswege.

- Autoimmunkrankheiten (melanotische Tumoren sind bei der Taufliege bekannt) und die Lokalisierung des Infektes spielen eine Rolle.

-Beziehung zwischen Immunkonstitution und sekundären Geschlechtsmerkmalen, z.B. Länge des Zirpens bei männlichen Grillen und Anzahl der Haemocyten.

-Seneszenz-Einflüsse, Inzuchteinflüsse, Eigenschädigungen durch Immunabwehr, etc.

Anwendungen

Insekten haben potentes Abwehrsystem, das ein breites Spektrum abdeckt mit den antimikrobiellen Peptiden. Antibiotika für die menschliche Therapie könnte eine mögliche Anwendung sein. Unterschiede kann man zwischen dem Insekten und dem Vertebratensystem

aufzeigen, um die ursprüngliche Form zu ergründen. Zu guter Letzt ergeben sich vielleicht daraus Möglichkeiten zur Bekämpfung anderer Dipteren, die dem Menschen das Leben schwer machen (*Aedes*, *Anopheles*, *Simulium*).

Schluss

Vieles ist unklar und nur Bruchstücke sind bekannt. Die Erforschung des Immunsystems bei Insekten beruht zu einem großen Teil auf punktuellen Einzelbeobachtungen bei verschiedenen Arten; noch gelingt es nicht zufrieden stellend, diese in einen übergeordneten Kontext zu stellen. Alles sind nur Hypothesen. In den Naturwissenschaften sollte man nichts für bare Münze nehmen, nur weil es einer schreibt. Alles zu hinterfragen, davon leben die Naturwissenschaften, insbesondere die Biologie. Vielleicht ist es ja ganz anders.

Literatur

ALBERTS, B. A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2004) Molekularbiologie der Zelle. Weinheim. 4. deutsche Auflage [Wiley-VCH]

CAMPBELL, N. A. & J. B. REECE (2002) Biologie. 5. Auflage. Heidelberg. Berlin.

DETTNER, K. & W. PETERS (2003) Lehrbuch der Entomologie. 2. Auflage Heidelberg. Berlin.

HANCOCK, R. E. W. & D. S. CHAPPLE (1999) Peptide Antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 1999, p.1317-1323. American Society for Microbiology.

HOFFMAN, J. A. (1997) *Drosophila* immunity. Trends in Cell Biology (Vol. 7), August 1997, pp.309-315.

KHUSCH, R. S. & B. LEMAITRE (2000) Genes that fight infection. What the *Drosophila* genome says about animal immunity. TIG October 2000, volume 16, No.10. S.442-449

LEMAITRE, B. J. M. REICHHART & J. A. HOFFMANN (1997) *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes by various classes of microorganisms. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Immunology, vol 94, pp.14614-14619.

PENZLIN, H. (2005) Lehrbuch der Tierphysiologie. Heidelberg. München. Berlin. [Elsevier-Spektrum]

SCHMID-HEMPEL, P. (2005) Evolutionary Ecology of Insect Immune Defenses. Ann. Rev. Entomol. 50, 529-551.

Anschrift des Verfassers: Benjamin Ibler, Adalbert-Stifter-Weg 1, D-92245 Küssersbrunn; email: ben.ibler@web.de