

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin
e-mail: marek.chmielewski@ar.lublin.pl

EWA OSIPOWSKA, MAREK CHMIELEWSKI, KRZYSZTOF BUCZEK

Mechanizmy rozpoznawania immunologicznego u owadów

Insect immunorecognition mechanisms

Streszczenie. Uniwersalną adaptacją organizmów wielokomórkowych jest rozpoznanie i zwalczanie zakażeń. U owadów sposób rozróżnienia immunologicznego własnych struktur organizmu (self) od obcych (non-self) jest słabo poznany, zaś rola receptorów Toll i Imd w tym procesie jest nadal dyskutowana. Receptory Toll i Imd należą do rodziny transbłonowych białek, które odgrywają zasadniczą rolę w obronie owadów przed zakażeniem. Rozpoznanie motywów strukturalnych patogenów przez receptory rozpoznania patogenów (PRR) jest uniwersalną strategią rozpoznania immunologicznego. Obecność tego mechanizmu u ssaków, owadów i roślin świadczy o jego pojawieniu się we wczesnych etapach ewolucji. Rozpoznanie stanowi pierwszy etap aktywacji komórkowych i humoralnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe: rozpoznanie immunologiczne, owady, Toll receptor, Imd receptor

WSTĘP

Różnorodność nisz ekologicznych zasiedlanych przez owady stwarza potencjalne zagrożenie dla ich zdrowia ze strony czynników środowiska, w tym różnych gatunków drobnoustrojów, pasożytów i drapieżców. Pomimo tej różnorodności zagrożeń, owady należą do jednej z najstarszych filogenetycznie, a obecnie najliczniejszej grupy zwierząt [Wigglesworth 1968]. W tak złożonym układzie różnorodnych składowych środowiska przyrodniczego organizmy żywe zachowują stan stabilny dopóty, dopóki poszczególne części tego układu harmonijnie współdziałają ze sobą, lub gdy w odpowiedzi na niekorzystne działanie czynników środowiska zewnętrznego lub wewnętrznego czynności organizmu zmieniają się w ten sposób, że jest zachowana jego integracja funkcjonalna. To przystosowanie niekiedy do ekstremalnych warunków i utrzymanie homeostazy,

a dzięki temu przeżycie owada jest możliwe na skutek harmonijnego współdziałania układu nerwowego, układu wydzielania wewnętrznego i układu odpornościowego [Dunn 1986, Gliński i Kostro 2001].

Możliwość przeżycia miały tylko te gatunki owadów, które we wszystkich stadiach rozwoju osobniczego wykształciły struktury i efektywne mechanizmy umożliwiające przywrócenie zaburzonej homeostazy ustroju. Wśród nich istotną rolę odgrywa odporność przeciwwakacyjna, która broni organizm przed kolonizacją przez drobnoustroje i pasożyty.

Przez pojęcie odporność rozumie się najczęściej wrodzoną lub nabytą niewrażliwość lub zmniejszoną podatność organizmu na czynniki szkodliwe, głównie drobnoustroje, uwarunkowaną genetycznie dzięki istnieniu i współdziałaniu mechanizmów obronnych natury komórkowej i humoralnej. W patologii owadów, podobnie jak i w patologii człowieka, odporność (immunity) oznacza najczęściej niewrażliwość na pewne choroby, zwłaszcza na choroby wywołane przez drobnoustroje. Odczyny obronne owadów są efektem ciągów zdarzeń, w których biorą udział wyspecjalizowane typy hemocytów oraz polipeptydy i białka hemolimfy [Gliński i Jarosz 1995].

W odporności przeciwwakacyjnej, stanowiącej główną składową odporności organizmu, decydujące znaczenie mają mechanizmy obronne, zarówno wrodzone, jak i nabyte, likwidujące patogeny lub powodujące ich izolację w zakażonym organizmie. Odporność wrodzona (fizjologiczna) występuje u wszystkich osobników danego gatunku, jest skierowana przeciwko różnorodnym czynnikiem zakaźnym i uwarunkowana obecnością identycznych lub bardzo zbliżonych mechanizmów. O jej stanie decydują bariery anatomiczne i fizjologiczne ciała owada, komórkowe odczyny obronne i występujące konstytucyjnie (stale) białka hemolimfy, np. lizozym, lektyny. Odporność indukowana (nabyta) cechuje się zmniejszoną podatnością lub całkowitą niewrażliwością organizmu owada na działanie patogenu. Pojawia się ona w następstwie zakażenia jamy ciała owada lub działania niektórych czynników abiotycznych. Jest efektem obecności w hemolimfie owada indukowanych polipeptydów i białek o działaniu przeciwbakteryjnym, określanych często jako białka odpornościowe (immune proteins) [Bulet i in. 1999, Ottaviani 2005]. Rolę induktorów odporności spełniają substancje i czynniki stresogenne, które naruszają homeostazę owada, zwłaszcza zakażenia bakteryjne i inwazje pasożytnicze [Gliński i Jarosz 2001]. Najczęściej są to bakterie saprofityczne występujące pospolicie w niszy ekologicznej owada, rzadziej bakterie entomopatogenne.

Czynnikiem decydującym, koniecznym do uruchomienia odczynów odporności wrodzonej i nabytej jest rozpoznanie (recognition of foreignness) substancji jako obcej (non-self) dla organizmu owada [Mushegian i Medzhitov 2001, Khush i in. 2002, Ottaviani 2005]. W następstwie rozpoznania immunologicznego zostają szybko uruchomione hemocytarne odczyny obronne, takie jak fagocytoza, otoczkowanie (inkapsulacja) i tworzenie guzków (nodulacja) oraz humoralne odczyny obronne związane głównie z hipersyntezą lizozymu hemolimfy. U owadów holometabolicznych, w tym u pszczoły miodnej, w kilka godzin po zakażeniu jamy ciała ma miejsce *de novo* synteza polipeptydów i białek o działaniu skierowanym głównie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Należą do nich apidycyny, abycyna i hymenoptecyna [Casteels i in. 1989, 1990, 1993, 1994, Casteels-Josson 1993].

Mechanizmy odporności w jamie ciała owada uruchamia rozpoznanie immunologiczne. Dotyczy ono zarówno substancji biotycznych, jakimi są mikroorganizmy i paso-

żyty, jak i niektórych substancji abiotycznych. Rozpoznanie self od non-self odgrywa rolę „czynnika spustowego”, który uruchamia w organizmie ciąg zdarzeń prowadzących do likwidacji lub usunięcia zarazków z organizmu.

MECHANIZMY ROZPOZNANIA IMMUNOLOGICZNEGO

W rozpoznaniu u owadów biorą zasadniczo udział dwa typy hemocytów, określane jako immunocyty (immunocytes) [Jones 1970]. Zalicza się do nich plazmatocyty (PL, plasmatocytes) i granulocyty (GR, granular cells). PL wykazują typowe zachowanie dla makrofagów kręgowców. Należy do niego adhezja do powierzchni szklanej z tworzeniem pseudopodiów umożliwiających ruch ameboidalny, fagocytoza, tworzenie otoczek (encapsulation) i guzków (nodule formation), reperacja ran. Mniejszą rolę w odczynach odpornościowych odgrywają GR. Organem hemopoetycznym, przynajmniej u *Drosophila melanogaster*, jest pięć par „gruczołów limfatycznych” usytuowanych w odcinku przednim grzbietowego naczynia krwionośnego [Nappi i Carton 1986]. U pszczoły tę rolę pełni skupienie hemocytów w okolicy serca i naczynia krwionośnego grzbietowego.

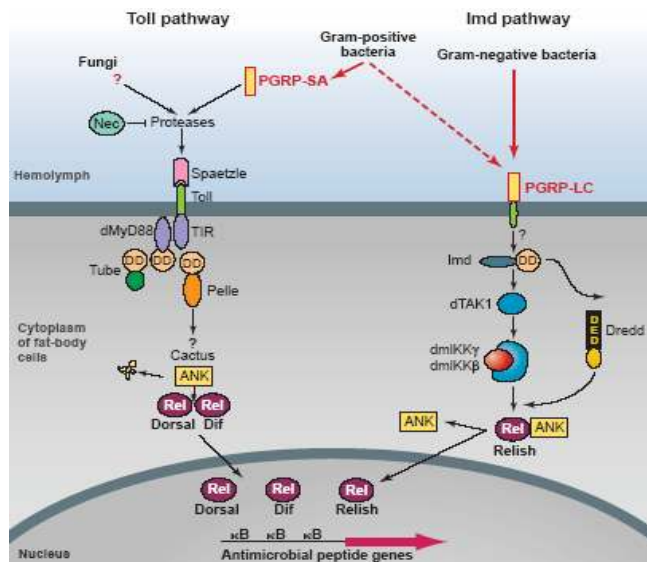
Według Janeway [1989] to, że system immunologiczny wyewoluował w kierunku rozpoznania i odpowiedzi na patogeny, wymaga rozpoznania nie tylko swoistych dla danego drobnoustroju determinant antygenowych, ale też pewnych ogólnych charakterystycznych cech molekularnych tych drobnoustrojów, określanymi jako motywy strukturalne patogenów (PAMP, pathogen associated molecular pattern) [Ottaviani 2005]. Motywami strukturalnymi patogenów są składniki osłon bakteryjnych (lipopolisacharyd, kwasy lipotejchajowe), składniki ściany bakterii (peptydoglikany) lub grzybów (zymosan), flagelina wici bakteryjnych, lipoproteidy, N-formylowane peptydy, dwunicieniowy RNA (genom wirusów), niemetylowane sekwencje CpG (genom bakteryjny). Dla układu immunologicznego najważniejsze jest więc dokonanie rozróżnienia między zakaźnymi antygenami obcymi, na które odpowiedź immunologiczna jest niezbędna a niezakaźnymi antygenami własnymi.

Patogeny są rozpoznawane w jamie ciała na drodze interakcji PAMP z białkami organizmu owada, określanymi jako PRR (pattern recognition receptors) lub PRP (pattern recognition proteins), często nazywanymi receptorami rozpoznania PAMP [Khush i in. 2002, Royet 2004]. Przykładem PRR są Toll receptory zapoczątkowujące szlak rozpoznania Toll i receptory zapoczątkowujące szlak rozpoznania Imd. Szlak Toll jest aktywowany głównie przez składniki grzybów i bakterii Gram-dodatnich, zaś szlak Imd głównie przez bakterie Gram-ujemne.

Toll receptory poznano po raz pierwszy przy okazji badania polaryzacji brzuszno-grzbietowej larw *Drosophila melanogaster*. Terminem Toll określono zmutowany gen, który koduje jeden z receptorów uczestniczących w rozwoju embrionalnym *Drosophila melanogaster*. Później okazało się, że Toll receptory uczestniczą w reakcjach obronnych owadów.

Motywy strukturalne ścian komórki bakterii w postaci peptydoglikanu rozpoznają białka PGRP (peptidoglycan recognition proteins) o charakterystycznej domenie zbudowanej z reszt 160 aminokwasów, dzięki której degradują peptydoglikany. U *Drosophila melanogaster* 13 genów koduje PGRP, których ekspresja zachodzi w ciele tłuszczowym i hemocytach. PGRP-SA jest krążącym w hemolimfie białkiem dla receptora

Toll w odpowiedzi na Gram-dodatnie bakterie, zaś PGRP-LC jest konieczny do aktywacji szlaku transmisji sygnałów dla receptora Imd w odpowiedzi na bakterie Gram-ujemne (rys. 1). Tak więc w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie są zaangażowane co najmniej dwie kaskady przenoszenia sygnałów – Toll i Imd (Immuno-deficient).



Rys. 1. Schemat rozpoznania immunologicznego u owadów [Khush i in. 2003]

Fig. 1. Scheme of insect immune recognition

Transmembranowy receptor Toll, obecny na powierzchni komórek ciała tłuszczowego jest zaktywowany przez rozłożone na drodze proteolizy Spaetzle białko podobne do cytokin (cytokine-like protein), występujące w hemolimfie. Wskutek interakcji Spaetzle z Toll zostaje uruchomiona kaskada, której efektem jest translokacja do jądra komórkowego białka sygnałowego DIF, należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych NF-κB. Czynniki NF-κB należą do heterogennej rodziny homo- i heterodimerów różnych białek Rel (Relish). Są one regulatorami transkrypcji odpowiedzi odpornościowej i białek ostrej fazy u ssaków. Pokrewne czynniki występują u owadów i biorą udział w odczynach immunologicznych, w tym w indukcji ekspresji genów lizozymu owadów. NF-κB transaktywatory Dorsal and Dif indukują ekspresję genów kodujących u owadów polipeptydy i białka odpornościowe, np. lizozym [Ottaviani 2005].

U *Drosophila melanogaster*, a prawdopodobnie też i u pszczoły miodnej, szlak sygnalizacyjny Imd uruchamia kaskadę niezbędną do obrony przed bakteriami Gram-ujemnymi. Efektem jest indukcja ekspresji genów kontrolujących syntezę dipterycyn, attacyn, drozocyny, cekropin, defenzyn, apidycyn. Translokacja z cytoplazmy do jądra białka Relish, należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych NF-κB odgrywa kluczową rolę w immunostymulacji na drodze Imd. Istnienie dwóch szlaków sygnalizacyj-

nych w odpowiedzi immunologicznej owadów na zakażenie świadczy o komplementarności funkcji obronnych owadów przed infekcją [De Gregorio i in. 2002, Ottaviani 2005, Williams i in. 2005] (rys. 1).

Elementy podobne do κB znaleziono jako wspólne cechy genów, które są aktywowane w zakażonych owadach oraz w genach cekropin i dipterycyn [Hultmark 2003, Zheng i in. 2005]. Okazały się one niezbędne do aktywacji transkrypcji. DIF zostaje przetransportowany do komórek ciała tłuszczowego i po przedostaniu się do jądra komórkowego rozpoznaje sekwencję paromotorową GGGRAYYYYY (G – guanina, R – puryna, A – alanina, Y – pirymidyna), rozpoczynając transkrypcję genu lizozymu i prawdopodobnie też cekropin. Natomiast szlak sygnałowy Imd (IMD-Relish), który jest niezbędny do obrony owada przed bakteriami Gram-ujemnymi, kontroluje indukcję ekspresji takich przeciwbakteryjnych peptydów, jak attacyny, cekropiny, defensyny i prawdopodobnie apidycyny. Translokacja z cytoplazmy do jądra komórki białka Relish, należącego do czynników transkrypcji NF- κB , jest kluczem w przypadku immunostymulacji na drodze IMD-Relish.

W rozpoznaniu uczestniczy też układ oksydazy polifenolowej [Söderhäll 1982] i lektyny [Rowley i Ratcliffe 1980]. Układ oksydazy polifenolowej pobudza hemocyty do syntezy lepkich białek (sticky proteins) [Ashida i Dohke 1980], które zwiększają zdolności adhezyjne bakterii do ziarnistych hemocytów (GR) i plazmatocytów (PL). Również melaniny, pojawiające się w efekcie uruchomienia szlaków przemian biochemicznych tyrozyny przez układ oksydazy polifenolowej w warunkach tlenowych, spełniają rolę markerów swoistości dla komórkowych i humoralnych odczynów obronnych owada.

IMMUNOMODULACJA I IMMUNOSUPRESJA

Immunomodulatory zmieniają reaktywność układu immunologicznego bądź w kierunku nasilenia odporności, bądź jej osłabienia. Działaniem immunostymulującym cechują się niektóre substancje pochodzenia naturalnego (chitozan, wyciąg z jeżówki purpurowej) i substancje chemiczne (klotrimazol, lewamizol) [Gliński i Chmielewski 1996a, b, Buczek 1998, Gliński i in. 2001, 2002, Gliński 2001].

Supresyjny wpływ na odporność owadów wywiera skażenie środowiska metalami ciężkimi, insektycydami, pestycydami, a także immunosupresory farmakologiczne [Gliński i in. 2003].

Działanie stymulujące i modulujące odporność może mieć związek z ich wpływem na indukcję ekspresji genów odpornościowych, będących pod kontrolą szlaku sygnalizacyjnego Toll i szlaku Imd, najprawdopodobniej na etapie transkrypcji. Efektem tego działania było zwiększenie syntezy lizozymu i apidycyn oraz ich uwalniania do hemolimfy. W związku z tym, głównym miejscem działania chitozanu i wyciągu z jeżówki jest ciało tłuszczowe (fat body) jako centralny narząd syntezy polipeptydów i białek odpornościowych owadów.

Dotychczas u owadów nie poznano receptorów błon komórkowych, receptorów jądrowych i enzymów działania docelowego immunostymulatorów (drug targets immunostimulation). U człowieka zidentyfikowano dotychczas około 30 tego typu receptorów. Są one niezbędne do uruchomienia syntezy białek i zwiększenia aktywności immunocytów pod wpływem związków aktywujących procesy odpornościowe.

PIŚMIENNICTWO

- Ashida i Dohke. 1980. Activation of prophenyloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10, 37.
- Buczek K. 1998. Badania nad przydatnością Klotrimazolu jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. Rozprawa dokt. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L., Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329.
- Casteels P. R., Ampe C., Jacob F., Vaeck M., Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8, 2387.
- Casteels P. R., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187, 381.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, and antibacterial peptide that is infection inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 268, 7044.
- Casteels P., Romagnolo J., Castle M., Casteels-Josson K., Erdjument-Bromage H., Tempst P. 1994. Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. Prospects of manipulating the antibacterial spectrum, and combating acquired resistance. *J. Biol. Chem.* 269, 26107.
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. 1993. Apidaecin, multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* 12, 1569.
- De Gregoirio E., Spellman P.T., Tzou P., Rubin G.M., Lemaitre B. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune responses in *Drosophila*. *EMBO J.* 21, 2568
- Dunn P.E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31, 321.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996a. Imidazole derivatives in control of the honey bee brood mycoses. *Pszczelnicze Zesz. Nauk.* 40, 165.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996b. Immunomodulujące działanie pochodnych imidazolowych na organizm *Apis mellifera* L. *Mat. XXXIII Nauk. Konf. Pszczelarskiej, Puławy 12–13 marca*, s. 26–27.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda M. 2001. Immunostymulacja i immunosupresja a występowanie i przebieg grzybicy otorbielakowej czerwca pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. *Mat. XXXVIII Nauk. Konf. Pszczelarskiej, Puławy*, s. 29–30.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda-Mazurek M. 2002. Wykorzystanie profilu immunologicznego do oceny efektów immunomodulacyjnych leków stosowanych w leczeniu chorób pszczół. *Mat. XXXIX Nauk. Konf. Pszczelarskiej, Puławy, 12–13 marca*, s. 52–53.
- Gliński Z., Buczek K., Luft-Deptuła D., Stark J.A. 2003. Immunotoxic action of heavy metals polluting the environment on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Final Programme and Book of Abstracts. XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Conference, Ljubljana, Slovenia, August 24–29*, p. 232–233.
- Gliński Z., Jarosz J. 1995. *Immunobiologia pszczoły miodnej*. Wyd. AR, Lublin.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.* 26, 43.
- Hultmark D. 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 12.
- Janeway, C.A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54, p. 1–13.
- Jones J.C. 1970. Hemocytopoiesis in insects [in:] *Regulation of Hematopoiesis*. A.S. Gordon (red.) Vol. 1. Appleton-Century Crafts, New York, p. 7–14.
- Khush R.S., Leurier F., Lemaitre B. 2003. Pathogen surveillance – the flies have it. *Science*, 296, 273.

- Mushegian A., Medzhitov R. 2001. Evolutionary perspective on innate immune recognition J. Cell Biol. 155, 705.
- Nappi A.J., Carton Y. 1986. Cellular immune responses and their genetical aspects in *Drosophila* [in:] Brehélin M (red.). Immunity in invertebrates. Springer Verlag, Berlin, 171–187.
- Ottaviani E. 2005. Insect immunorecognition. Invertebr. Survival J. 2, 142.
- Rowley A.F., Ratcliffe N.A. 1980. Insect erythrocyte agglutinins. *In vitro* opsonization experiments with *Clitumnus extradentatus* and *Periplaneta americana* haemocytes. Immunology 40, 483.
- Royet J. 2004. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. Molec. Immunol. 41, 1063.
- Söderhäll K. 1982. Prophenyloxidase activating system and melanization – a recognition mechanism of arthropods? A Review. Dev. Comp. Immunol. 6, 601.
- Wigglesworth V.B. 1968. The life of insects. The New American Library, New York.
- Williams M.J., Ando I, Hultmark D. 2005. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. Genes to Cells 10, 813.
- Zheng I., Zhang I., Lin H., McIntosh M.T., Malacrida A.R. 2005. Toll-like receptors in invertebrate innate immunity. ISJ 2, 105.

Summary. Immunologic recognition and defense against microbial infections are universal adaptations of multicellular organisms. In insects, the mode of determination of self from non-self is poorly understood, and the existence and role of Toll and Imd receptors is much debated. The Toll receptors (TLR) and Imd receptors comprise a family of transmembrane proteins that play an essential role in host defense in flies. Recognition of the pathogen associated molecular patterns by pattern recognition receptors (PRP) is a universal strategy of innate immune recognition. This mechanism of recognition is found in mammals, insects, and plants, suggesting that it evolved at very early stages of evolution. The recognition of forerignness is the first step to activate cellular and cell-free immune mechanisms.

Key words: immune recognition, insects, Toll, Imd receptor