

O ODPORNOŚCI BEZ PRZECIWCIAŁ...*

IMMUNITY WITHOUT ANTIBODIES...

Małgorzata CYTRYŃSKA

Zakład Immunologii Bezkręgowców, Instytut Biologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Streszczenie: Odporność organizmu można zdefiniować jako zdolność do zachowania własnej integralności (homeostazy) dzięki umiejętności odróżniania tego co własne od tego co obce (ang. *self/non-self*). U kręgowców wyróżnia się dwa typy odporności: wrodzoną oraz nabytą. Zgodnie z powszechnie przyjętymi poglądami, organizmy bezkręgowce, jako filogenetycznie starsze, dysponują tylko mechanizmami odporności wrodzonej. Jednakże, wyniki badań ostatnich lat wyraźnie wskazują na możliwość specyficznego rozpoznania określonych patogenów oraz funkcjonowanie pamięci immunologicznej u owadów, skorupiaków i przedstawicieli mięczaków. Istotną rolę przypisuje się zróżnicowanym izoformom receptorów zawierających domeny Ig o dużej zmienności sekwencji, np. Dscam u owadów i FREPs u ślimaków, które mogą brać udział w rozpoznawaniu struktur charakterystycznych dla różnych drobnoustrojów, a także umożliwiać selekcję wrażliwych na dane drobnoustroje komórek zaangażowanych w proces fagocytozy. Niektórzy autorzy sugerują funkcjonowanie u bezkręgowców alternatywnego rodzaju odporności nabytej, opartej na mechanizmach odmiennych niż opisane dotąd u kręgowców. Niniejsza praca przedstawia najnowsze poglądy dotyczące procesów odpornościowych bezkręgowców, ze szczególnym uwzględnieniem owadów.

Słowa kluczowe: odporność wrodzona, peptydy odpornościowe, *Drosophila melanogaster*, Toll, imd, Dscam.

Summary: Immunity can be defined as the ability of each living organism to maintain its own integrity (homeostasis) through recognizing non-self and discriminating it from self. In vertebrates innate and adaptive immunity mechanisms are involved in fighting against pathogens. According to general opinions, filogenetically older invertebrates respond to infection activating only innate immunity reactions. However, a growing line of evidence indicates that the immune system in insects, crustaceans and molluscs can specifically recognize and remember infection with certain pathogens. Involvement of multiple isoforms of pattern recognition receptors containing variable Ig domains, eg. insect Dscam and snail FREPs is implicated in specific recognition of different pathogens and in selection of immune competent phagocytes. There are suggestions that invertebrates possess an alternative type of adaptive immunity functioning through mechanisms which differ from the ones known in vertebrates. The review describes new discoveries in invertebrate immunity, with special focus on insects.

Key words: innate immunity, defense peptides, *Drosophila melanogaster*, Toll, imd, Dscam.

*Praca powstała w trakcie realizacji projektu finansowanego przez MNiSW nr N 303 362235.

1. ODPORNOŚĆ OWADÓW – WPROWADZENIE

Odporność organizmu można zdefiniować jako zdolność do zachowania własnej integralności (homeostazy) dzięki umiejętności odróżniania tego co własne od tego co obce (ang. *self/non-self*). U zwierząt wyróżnia się dwa typy odporności: wrodzoną oraz nabytą. Zgodnie z powszechnie przyjętymi poglądami, organizmy bezkręgowce, jako filogenetycznie starsze, dysponują tylko mechanizmami odporności wrodzonej, natomiast ewolucyjnie młodsze kręgowce dodatkowo wykształciły mechanizmy odporności nabytej. Warto tu zaznaczyć, że biorąc pod uwagę liczbę gatunków zwierząt znanych na Ziemi, bezkręgowce, opierające swoją odporność na mechanizmach wrodzonych, stanowią około 96,6%, z czego 70% przypada na przedstawicieli tylko jednej gromady – owadów.

Działanie układu odpornościowego owadów związane jest z aktywacją zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej. W odpowiedzi komórkowej uczestniczą komórki hemolimfy (odpowiednik krwi ssaków), hemocyty, zaangażowane w proces fagocytozy oraz tworzenie otoczek wokół ciał obcych. Wielowarstwowe otoczki mogą powstawać wokół agregatów komórek drobnoustrojów (nodulacja), a także wokół pasożytów, np. nicieni (właściwa inkapsulacja komórkowa). Odpowiedź humoralna obejmuje, między innymi, proces krzepnięcia hemolimfy, aktywację kaskad enzymów proteolitycznych prowadzących do melanizacji, jak również indukcję syntezy peptydów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (ryc. 1). Peptydy te, określane również mianem peptydów odpornościowych (ang. *antimicrobial peptides*, *defense peptides*), stanowią zasadnicze cząsteczki efektorowe odpowiedzi humoralnej owadów, bezpośrednio zaangażowane w zwalczanie zakażenia [9, 42, 44, 53, 76].



RYCINA 1. Procesy odporności wrodzonej uruchamiane u owadów w wyniku zakażenia (linią przerywaną zaznaczono zależność między odpowiedzią komórkową i humoralną)
FIGURE 1. Innate immunity mechanisms activated in insects in response to infection (the dotted line demonstrates the relationship between cellular and humoral immune response)

Funkcjonowanie mechanizmów nabytych u kręgowców związane jest z aktywnością limfocytów, przeciwciał oraz zjawiskiem pamięci immunologicznej. U organizmów bezkręgowych, jak dotąd nie opisano komórek o charakterze limfocytów, jak również przeciwciał. Jednakże wyniki badań ostatnich lat wyraźnie sugerują możliwość specyficznego rozpoznania określonych patogenów oraz funkcjonowanie pamięci immunologicznej u owadów, skorupiaków i przedstawicieli mięczaków.

Niniejsza praca przedstawia najnowsze poglądy dotyczące procesów odpornościowych bezkręgowców, ze szczególnym uwzględnieniem owadów, jako gromady mającej ogromne znaczenie gospodarcze.

2. PEPTYDY ODPORNOŚCIOWE OWADÓW

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe to zazwyczaj małe (5–10 kDa), kationowe cząsteczki o właściwościach amfipatycznych. Charakter zasadowy w warunkach fizjologicznych zapewnia im duża zawartość reszt argininy i lizyny. Dzięki tym cechom peptydy oddziałują z ujemnie naładowaną błoną komórkową bakterii prowadząc do utworzenia w niej kanałów i depolaryzacji, a nawet fragmentacji, czego efektem jest śmierć komórki drobnoustroju. Szereg peptydów odpornościowych wnika do komórek bakteryjnych powodując zaburzenia procesów replikacji, transkrypcji, syntezy i prawidłowego fałdowania białek, na skutek oddziaływania z kwasami nukleinowymi, składnikami aparatu translacyjnego oraz białkami opiekuńczymi [6, 8, 58, 68, 88].

Biorąc pod uwagę sekwencję aminokwasów oraz strukturę cząsteczki, kationowe peptydy odpornościowe zaliczane są zazwyczaj do trzech grup: (1) peptydy liniowe, pozbawione reszt cysteiny, np. cecropiny, (2) peptydy o strukturze stabilizowanej przez mostki disiarczkowe, np. owadzie defensyny, drosomycyna, (3) peptydy o dużej zawartości jednego z aminokwasów, takich jak prolina i/lub glicyna, np. drosocyna [8, 58, 62].

Spośród około 900 poznanych dotąd eukariotycznych peptydów odpornościowych, ponad 200 opisano u owadów [8, 87]. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe owadów syntetyzowane są w odpowiedzi na rozpoznanie zakażenia, głównie w komórkach ciała tłuszczowego (funkcjonalny odpowiednik wątroby ssaków) i hemocytach, skąd wydzielane są do hemolimfy wypełniającej jamę ciała (hemocel). Ich obecność w hemolimfie umożliwia uogólnioną (systemową) odpowiedź organizmu na infekcję, natomiast peptydy syntetyzowane w komórkach nabłonkowych uczestniczą w reakcjach miejscowych obejmujących wrota zakażenia [13, 52, 57, 82].

Uważa się, że dany gatunek owadów dysponuje charakterystycznym dla niego zestawem peptydów odpornościowych różniących się właściwościami biochemicznymi i mechanizmem działania w stosunku do mikroorganizmów, co umożliwia skuteczne zwalczanie szerokiego spektrum drobnoustrojów (bakterie Gram⁺ i Gram[–], grzyby, pierwotniaki). Od 1981 roku, kiedy opisano pierwsze owadzie peptydy przeciwdrobnoustrojowe jedwabnika olbrzymiego *Hyalophora cecropia*, peptydy takie scharakteryzowano u przedstawicieli różnych rzędów owadów: Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Odonata i Trichoptera [28]. Na przykład, z hemolimfy barciaka większego *Galleria mellonella* (Lepidoptera) oczyszczono 12 peptydów o zróżnicowanych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [7, 12].

Poznanie genomu muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (Diptera), dostępność szeregu jej mutantów oraz łatwość przeprowadzania manipulacji genetycznych spowodowały, że stała się ona modelem doświadczalnym najczęściej

TABELA 1. Indukowalne peptydy odpornościowe *Drosophila melanogaster* [29, 78]TABLE 1. Inducible defense peptides of *Drosophila melanogaster* [29, 78]

Rodzina peptydów	Liczba genów	Stężenie w hemolimfie [μ M]	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa
Attacyny	4	nie określono	bakterie Gram-ujemne
Cekropiny	4	50	bakterie Gram-ujemne, bakterie Gram-dodatnie, grzyby
Defensyna	1	1	bakterie Gram-dodatnie
Dipterycyny	2	0,5	bakterie Gram-ujemne
Drosocyna	1	40	bakterie Gram-ujemne
Drosomycyny	7	100	grzyby
Miecznikowina	1	40	bakterie Gram-dodatnie, grzyby

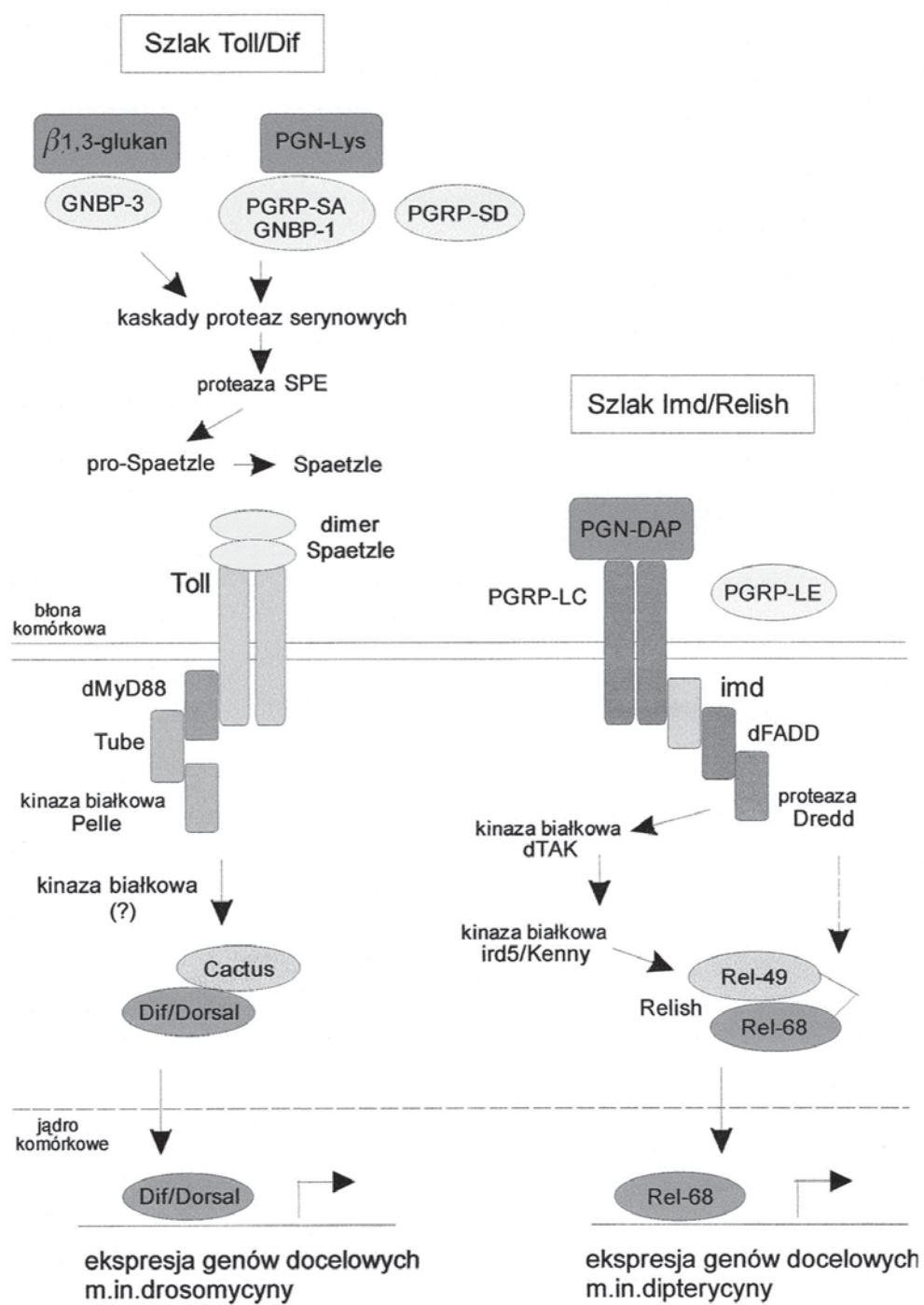
wykorzystywanym w badaniach mechanizmów odpornościowych owadów. W genomie *D. melanogaster* znaleziono 20 genów dla indukowanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Produkty tych genów zaliczane są do siedmiu rodzin: attacyny, cekropiny, defensyna, dipterycyny, drosocyna, drosomycyny, miecznikowina (tab. 1) [18, 29, 31, 33, 37, 78].

2.1. Regulacja syntezy peptydów odpornościowych u *D. melanogaster*

Synteza peptydów odpornościowych w ciele tłuszczowym *D. melanogaster* znajduje się zasadniczo pod kontrolą dwóch szlaków sygnałowych, Toll/Dif i Imd/Relish [2, 17, 43, 49, 78, 83]. Oba szlaki schematycznie przedstawiono na rycinie 2. Badania z zastosowaniem szeregu mutantów *D. melanogaster* wykazały, że szlak Toll/Dif uruchamiany jest przede wszystkim w odpowiedzi na zakażenie bakteriami Gram+, podczas gdy szlak Imd/Relish aktywują bakterie Gram– [47]. Później ustalono, że

RYCINA 2. Szlaki transmisji sygnałów prowadzące do indukcji ekspresji genów dla peptydów odpornościowych w komórkach ciała tłuszczowego u *Drosophila melanogaster*. W wyniku rozpoznania PGN-Lys oraz β -1,3-glukanu przy udziale odpowiednich receptorów dochodzi do uruchomienia kaskad proteaz serynowych w hemolimfie owada i przekształcenia białka pro-Spaetzle w cytokinę Spaetzle. Dimery Spaetzle oddziałują z zewnątrzkomórkowym regionem błonowego receptora Toll, co prowadzi do powstania kompleksu receptorowo-adaptorowego wewnątrz komórki, a następnie do aktywacji czynnika transkrypcyjnego Dif/Dorsal. Częsteczki PGN-Dap oddziałują bezpośrednio z receptorami błonowymi PGRP-LC, co powoduje utworzenie kompleksu receptorowo-adaptorowego przy udziale białka imd. To prowadzi do aktywacji odpowiednich kinaz białkowych oraz enzymów proteolitycznych w komórce i uwolnienia domeny Rel-68 czynnika transkrypcyjnego Relish. Obecność czynników NF- κ B w jądrze komórkowym umożliwia indukcję ekspresji odpowiednich genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną (wg [2, 17, 44, 78, 83], zmienione)

FIGURE 2. Toll/Dif and Imd/Relish signal transduction pathways activated in *D. melanogaster* fat body in response to infection. Recognition of PGN-Lys and β -1,3-glucan by proper receptors leads to activation of serine protease cascades in insect hemolymph and transformation of pro-Spaetzle into cytokine Spaetzle. Dimers of Spaetzle interact with the extracellular region of receptor Toll leading to formation of a receptor-adaptor complex inside a cell and to activation of transcription factor Dif/Dorsal. Interaction of PGN-Dap with transmembrane receptor PGRP-LC leads to formation of a receptor-adaptor complex containing imd protein. Activation of protein kinases and proteases culminates with proteolytic cleavage of Relish and releasing of Rel-68 domain with transcription factor activity. NF- κ B factors in the cell nucleus induce expression of genes involved in immune response (adapted from [2, 17, 44, 78, 83])



RYCINA 2. opis obok

składnikiem ściany komórkowej bakterii, odpowiedzialnym za aktywację obu szlaków sygnałowych jest peptydoglikan (PGN), rozpoznawany przy udziale specyficznych receptorów PRRs (ang. *pattern recognition receptors*) wiążących struktury powierzchniowe drobnoustrojów PAMPs (ang. *pathogen associated molecular patterns*) [48, 65, 72]. Warto tutaj zaznaczyć, że w przeciwieństwie do *D. melanogaster*, wysoce oczyszczony lipopolisacharyd oraz syntetyczny lipid A indukowały ekspresję genów m.in. dla cekropiny B1 i attacyny w ciele tłuszczowym *Bombyx mori* (*Lepidoptera*). Autorzy sugerują udział zarówno PGN, jak i LPS w indukcji ekspresji genów dla peptydów odpornościowych u tych owadów [74].

Szlak Toll/Dif u *D. melanogaster* jest aktywowany przede wszystkim przez PGN zawierający w części peptydowej reszty lizyny (PGN-Lys), charakterystyczny dla ścian komórkowych większości bakterii Gram+. Natomiast szlak Imd/Relish uruchamiany jest przez PGN, w którym reszty lizyny zastąpione są resztami kwasu mezo-diaminopimelinowego (PGN-Dap), obecny u bakterii Gram- oraz niektórych Gram+, m.in. z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* [15, 71]. Wydaje się, że w odpowiedzi na infekcje grzybami zaangażowane mogą być oba wymienione szlaki. Składnikami ścian komórkowych grzybów, które prowadzą do indukcji odpowiedniego szlaku sygnałowego, są cząsteczki β -(1,3)-glukanu [20].

W wyniku uruchomienia powyższych dróg sygnałowych dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych Dif/Dorsal – Dif (ang. *Dorsal-related immunity factor*) i Relish, należących do rodziny Rel/NF- κ B (ang. *Reticuloendotheliosis/nuclear factor κ B*), które biorą udział w regulacji ekspresji szeregu genów uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej, kodujących m.in. peptydy odpornościowe [26, 54]. Dzięki badaniom prowadzonym na mutantach *D. melanogaster* wiadomo, że ekspresja przeciwgrzybowego peptydu drosomycyny znajduje się głównie pod kontrolą szlaku Toll/Dif, a dipterycyny, aktywnej przeciw bakteriom Gram-, pod kontrolą szlaku Imd/Relish. Pozwala to na analizę udziału obu szlaków sygnałowych w odpowiedzi na zakażenia wywołane przez różne drobnoustroje. W regulacji ekspresji niektórych peptydów odpornościowych *D. melanogaster*, np. defensyny i miecznikowiny, zaangażowane są obie drogi przekazywania sygnałów [47, 51, 66].

2.1.1. Szlak Toll/Dif u *D. melanogaster*

Rozpoznanie PGN-Lys przez odpowiednie receptory, PGRP-SA, PGRP-SD (ang. *peptidoglycan recognition protein, short*) i GGBP-1 (ang. *Gram-negative binding protein 1*), jak również składników ścian komórkowych grzybów przez GGBP-3, prowadzi do uruchomienia kaskad proteaz serynowych w hemolimfie zainfekowanego owada [20, 35, 83]. Ostatnim enzymem w obu kaskadach jest proteaza serynowa SPE (ang. *Spaetzle processing enzyme*), która przekształca obecną w hemolimfie cytokinę pro-Spaetzle do formy będącej ligandem receptora Toll [34, 55]. Transbłonowy receptor Toll, znajdujący się na powierzchni komórek ciała tłuszczowego, pod wpływem przyłączenia aktywnej formy Spaetzle ulega dimeryzacji, co prowadzi do rekrutacji białka adaptorowego dMyD88 (ang. *myeloid differentiation primary-response protein 88*) do wewnątrzkomórkowej domeny TIR (ang. *Toll/*

Interleukin-1 receptor) receptora, inicjując w ten sposób szereg reakcji wewnątrz komórki [30, 85]. Ostatnim ogniwem kaskady reakcji wewnątrzkomórkowych jest uwolnienie czynnika transkrypcyjnego Dif/Dorsal z kompleksu z inhibitorowym białkiem Cactus (odpowiednik I κ B ssaków). Sygnałem do dysocjacji kompleksu jest fosforylacja Cactus przez niezidentyfikowaną do tej pory kinazę białkową.

Warto zaznaczyć, że droga przekazywania sygnałów prowadząca do aktywacji czynników transkrypcyjnych Rel/NF- κ B w wyniku uruchomienia transbłonowego receptora Toll jest zachowana ewolucyjnie i stanowi istotny element odporności wrodzonej tak u owadów, jak i ssaków. Reakcje szlaku Toll/Dif u *D. melanogaster* przebiegają analogicznie do szlaku uruchamianego w wyniku aktywacji receptora TLR4 (ang. *Toll-like receptor 4*) ssaków przez bakteryjny lipopolisacharyd. Istotną różnicą jest to, że receptory TLRs ssaków bezpośrednio uczestniczą w rozpoznawaniu PAMPs, natomiast ligandem receptora Toll u *D. melanogaster* jest cytokina Spaetzle [3, 4, 32].

2.1.2. Szlak Imd/Relish u *D. melanogaster*

Szlak Imd/Relish uruchamiany jest w wyniku rozpoznania PGN-DAP przez specyficzne receptory PGRP-LC (ang. *peptidoglycan recognition protein, long*) obecne na powierzchni komórek ciała tłuszczowego. W procesie aktywacji zaangażowane są również białka receptorowe PGRP-LE [21, 71, 72, 86]. Dimeryzacja receptorów PGRP-LC prowadzi do przyłączenia białka Imd (ang. *immune deficiency*), będącego homologiem białka RIP ssaków (ang. *TNF-receptor interacting protein 1*) do wewnątrzkomórkowej domeny DD (ang. *death domain*) receptora. Sygnał odbierany jest następnie przez homologiczną do kaspazy 8 ssaków proteazę DREDD (ang. *Death-related ced3/Nedd2-like protein*) oraz kinazę białkową dTAK1 (ang. *TGF β -activated protein kinase 1*). W aktywację czynnika transkrypcyjnego Relish zaangażowana jest kolejna kinaza białkowa IKK (ang. *I κ B kinase*). Prekursorowa forma Relish jest fosforylowana przez podjednostkę ird5 powyższej kinazy i staje się substratem dla proteazy typu kaspazy, prawdopodobnie kaspazy DREDD, chociaż bezpośredniego jej działania na cząsteczki Relish dotąd nie udowodniono [83].

Należy zaznaczyć, że mutacje w genach kodujących białka wchodzące w skład omawianego szlaku, takich jak: *imd*, *FADD* lub *TAK*, prowadzą do szczególnej wrażliwości owadów na infekcje bakteriami Gram $^-$, ze względu na brak indukcji ekspresji genów odpowiednich peptydów odpornościowych. Natomiast jednoczesna mutacja w genach *Toll* i *imd* (*imd $^-$ /Toll $^-$*) powoduje brak ekspresji peptydów odpornościowych i wrażliwość owadów na zakażenia zarówno bakteriami Gram $^+$ i Gram $^-$, jak i grzybami [45, 46, 56, 77, 79, 81].

Szlak Imd/Relish *D. melanogaster* jest porównywany do szlaku uruchamianego w wyniku aktywacji TNFR1 ssaków (ang. *tumor necrosis factor receptor 1*) [83].

3. SPECYFICZNOŚĆ REAKCJI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO OWADÓW

Dzięki pracom prowadzonym na modelu *D. melanogaster* wcześniej przyjęte poglądy dotyczące braku specyficzności reakcji układu odpornościowego owadów uległy weryfikacji. Już w 1997 roku udokumentowano, że geny kodujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe u *D. melanogaster* podlegają zróżnicowanej ekspresji w zależności od klasy infekującego mikroorganizmu. Naturalne zakażenie grzybami entomopatogennymi *Beauveria bassiana* indukowało syntezę tylko peptydów przeciwgrzybowych drosomycyny i miecznikowiny [47]. Stwierdzono również zróżnicowaną aktywację czynników transkrypcyjnych Dif oraz Relish podczas zakażenia *D. melanogaster* grzybami i bakteriami Gram+ [27]. Badania przeprowadzone z użyciem techniki 2D-DIGE (ang. *two-dimensional difference gel electrophoresis*) wykazały ponadto zdecydowane różnice w profilu białek hemolimfy *D. melanogaster* po infekcji larw bakteriami *M. luteus* i drożdżami *Saccharomyces cerevisiae* [80].

Wyróżnić można kilka poziomów, na których zachodzi „dywersyfikacja” sygnału o zakażeniu, co prowadzi m.in. do ukierunkowanej ekspresji określonej grupy genów. Pierwszym etapem jest rozpoznanie zakażenia przy udziale odpowiednich cząsteczek receptorowych należących do PRR. Zróżnicowany zestaw białek PRR zaangażowany jest w rozpoznanie poszczególnych struktur PAMPs drobnoustrojów, co już na początku ukierunkowuje odpowiedź układu odpornościowego na odpowiednie tory, aktywując różne szlaki przekazywania sygnałów w zależności od typu zakażenia. Ponadto, tworzenie homodimerów lub heterodimerów przez czynniki transkrypcyjne z rodziny Rel/NF- κ B może prowadzić do ekspresji odmiennego zestawu genów [59, 75]. W badaniach z zastosowaniem stabilnie transfekowanych komórek S2 *D. melanogaster* (ang. *Schneider-line 2*) wykazano, że poziom ekspresji genów poszczególnych peptydów odpornościowych zależy od kombinacji białek Dif, Dorsal i Relish w obrębie dimerów. Ekspresję genu drosomycyny aktywował przede wszystkim heterodimer Dif/Relish, podczas gdy gen dla defensyny był najsilniej aktywowany przez heterodimery Dorsal/Relish. Natomiast ekspresja genu attacyny była indukowana przez homodimery Relish/Relish oraz heterodimery Dif/Relish i Dorsal/Relish [23]. Zróżnicowany poziom ekspresji poszczególnych genów w obecności różnych dimerów białek Rel związany jest m.in. z odmiennym ich powinowactwem do miejsc κ B w obrębie promotorów genów. W badaniach z użyciem komórek linii mbn-2 *D. melanogaster* wywodzącej się z hemocytów (ang. *malignant blood neoplasm; hemocyte-like cell line; tumorous blood cells*) stwierdzono, że białka Dif i Dorsal różnią się powinowactwem do miejsc κ B w promotorach genów dipterycyny i cekropiny A, prawdopodobnie na skutek odmiennych sekwencji nukleotydów w obrębie tych motywów oraz innej charakterystyki wiązania DNA [22].

Otrzymanie linii komórek *D. melanogaster* S2, które zachowują zdolność do fagocytozy i wyrażają na swej powierzchni wiele białek receptorowych, pozwoliło na rozszerzenie badań nad mechanizmami odpowiedzi komórkowej owadów. Z badań

tych wynika bezsprzecznie, że komórki hemolimfy *D. melanogaster* (i prawdopodobnie innych gatunków owadów) syntetyzują zestaw różnorodnych receptorów zdolnych do specyficznego oddziaływania ze składnikami komórek drobnoustrojów. Obecnie wiadomo, że procesy fagocytozy bakterii *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Listeria monocytogenes* oraz drożdży *Candida albicans* przez hemocyty uzależnione są od obecności konkretnych receptorów [1, 19, 38, 61, 73].

Wymownym przykładem olbrzymich możliwości specyficznego oddziaływania jest receptor Dscam (ang. *Down syndrome cell adhesion molecule*), którego prawidłowe funkcjonowanie w układzie nerwowym owadów, a także człowieka, zapewnia formowanie właściwych połączeń między komórkami nerwowymi [10, 24, 25, 69, 70]. W ostatnich latach wykazano, że u *D. melanogaster* receptor ten, zawierający w części zewnątrzkomórkowej 10 domen immunoglobulinowych i 6 domen fibronektynowych typu III, zaangażowany jest również w reakcjach odpowiedzi immunologicznej (ryc. 3). Obliczono, że w wyniku procesów alternatywnego splicingu, dotyczących egzonów 4, 6, 9 i 17 kodujących, odpowiednio, fragmenty domen Ig2, Ig3, całą domenę Ig7 oraz fragment transbłonowy, komórki *D. melanogaster* mogą zostać potencjalnie wyposażone w 38 016 izoform (ang. *splice variants*) receptora Dscam. Prawdopodobnie 18 000 izoform Dscam, wykazujących różnice w budowie części zewnątrzkomórkowej cząsteczki, ulega ekspresji w hemocytach. Każda z nich mogłaby oddziaływać specyficznym z określonymi drobnoustrojami, co potencjalnie prowadziłoby do ukierunkowania reakcji odpornościowej. Ekspresję Dscam wykazano również w komórkach ciała tłuszczowego *D. melanogaster*, a obecność cząsteczek receptora stwierdzono też w hemolimfie [11, 84]. Receptor Dscam został również opisany u komara *Anopheles gambiae* (AgDscam). W wyniku alternatywnego splicingu może powstać ponad 31 000 izoform AgDscam, zawierających różne kombinacje domen adhezyjnych pozwalające na specyficzne oddziaływanie z drobnoustrojami. Na podstawie badań



RYCINA 3. Schemat budowy cząsteczki receptora Dscam *Drosophila melanogaster*, wyróżniono domeny immunoglobulinowe Ig2, Ig3, Ig7, charakteryzujące się dużą zmiennością (wg [11, 84], zmienione)
 FIGURE 3. Domain structure of *D. melanogaster* receptor Dscam, variable immunoglobulin domains Ig2, Ig3, Ig7 are presented as black rhombs (adapted from [11, 84])

z zastosowaniem linii komórek *A. gambiae* Sua5B (ang. *hemocyte-like immune competent cell line*) oraz dorosłych owadów stwierdzono, że zakażenie różnymi drobnoustrojami prowadzi do zróżnicowanej ekspresji poszczególnych form białka AgDscam, w wyniku czego w odpowiedzi na infekcję pojawia się odmienny zestaw izoform receptora. Pobudzenie komórek Sua5B bakteriami Gram– *E. coli* lub *Pseudomonas veronii* powodowało syntezę izoform AgDscam o większym powinowactwie do tych drobnoustrojów, w porównaniu z izoformami syntetyzowanymi w odpowiedzi na bakterie Gram+ *Staphylococcus aureus* [14]. Przytoczone dane wskazują, że brak odporności nabytej (w rozumieniu odporności kręgowców) nie wyklucza możliwości specyficznego reagowania organizmu na infekcje wywołane przez różne drobnoustroje. Układ odpornościowy owadów, wykorzystując inne, poznawane dopiero mechanizmy, pozwala na stosunkowo specyficzną odpowiedź zależnie od rozpoznanych patogenów.

Ostatnio wykazano, że w wyniku alternatywnego splicingu zachodzącego w komórkach mózgowych oraz hemocytach skorupiaków *Daphnia magna* i *D. pulex* może powstawać 13 000 transkryptów Dscam. Wyniki te sugerują, że u skorupiaków, podobnie jak u owadów, zróżnicowane izoformy receptora Dscam funkcjonują zarówno w układzie nerwowym, jak i odpornościowym [5].

4. PAMIĘĆ IMMUNOLOGICZNA U OWADÓW

Już na początku lat osiemdziesiątych wyniki badań prowadzonych na dorosłych osobnikach karaczanów *Periplaneta americana* wskazywały na funkcjonowanie pamięci immunologicznej u tych owadów. Stwierdzono, że wcześniejsze wstrzyknięcie toksoidów uzyskanych z jadu pszczoł *Apis mellifera* oraz jadu węża *Agkistrodon piscivorus* chroniło przed śmiertelną dawką tylko analogicznych toksyn. Najwyższą przeżywalność karaczanów odnotowano, gdy odstęp pomiędzy podaniem toksoidu i toksyny wynosił 14 dni. Zarówno specyficzność reakcji jak i kinetyka odpowiedzi przypominały cechy odpowiedzi immunologicznej kręgowców. Ustalono, że czynnik (czynniki) odpowiedzialny za obserwowane reakcje występuje w formie wolnej w hemolimfie i nie jest związany z hemocytami [36, 64]. Dalsze badania na *P. americana* z zastosowaniem szczepionek zawierających zabite bakterie wykazały, że ich podanie wywołuje reakcję dwufazową. Pierwsza faza obejmowała trwającą 72 godziny odpowiedź niespecyficzną, gdyż użycie szczepionek z różnymi zabitymi bakteriami (*Micrococcus luteus*, *Streptococcus lactis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) w jednakowym stopniu chroniło przed późniejszym podaniem żywych *Pseudomonas aeruginosa*. Drugą fazę, trwającą do 14 dni, cechowała specyficzność, ponieważ przed rozwojem zakażenia żywymi bakteriami *P. aeruginosa* chroniło owady tylko uprzednie podanie zabitych *P. aeruginosa*. Wywnioskowano, że odpowiedź immunologiczna dorosłych karaczanów wykazuje cechy odpowiedzi obserwowanej u owadów holometabolicznych (faza pierwsza) oraz odporności nabytej (faza druga). Przypuszczano wtedy, że długość życia

karaczanów (trzy lata i dłużej) wymusza tego rodzaju charakterystykę odpowiedzi immunologicznej [16].

Wyniki badań ostatnich lat uzyskane na modelu *D. melanogaster* rzucają nowe światło na powyższe obserwacje [60]. Stwierdzono, że uprzednie podanie dorosłym osobnikom *D. melanogaster* subletalnej dawki żywych *Streptococcus pneumoniae* chroniło przed podaną tydzień później letalną dawką tych bakterii. Efekt ten był specyficzny dla *S. pneumoniae*, utrzymywał się przez całe życie osobników i związany był z szybszym zabijaniem żywych bakterii przez układ odpornościowy muszek. Wykazano, że zasadniczą rolę w tej reakcji pełnią fagocyty oraz szlak Toll/Dif. Wcześniejsze zetknięcie się układu odpornościowego ze *S. pneumoniae* prawdopodobnie pozwala fagocytom bardziej wydajnie rozpoznawać oraz przeprowadzać fagocytózę komórek patogenu w przypadku ponownego zakażenia. Efekt ten może być związany z selekcją, podczas pierwszego zetknięcia się z patogenem, odpowiednich receptorów Dscam na powierzchni fagocytów *D. melanogaster*.

Podobnie, badania przeprowadzone na trzmielach *Bombus terrestris* zakażanych *Pseudomonas fluorescens* oraz *Paenibacillus larvae* i *P. alvei* wykazały, że wcześniejsze podanie bakterii chroni przed kolejnym zakażeniem, ale tylko w układzie homologicznym, nawet w przypadku bakterii należących do tego samego rodzaju [67]. Utrzymywanie się „ochronnego działania” aż 22 dni od zetknięcia się z patogenem sugeruje, że efekt ten nie jest zależny od aktywności peptydów odpornościowych, których obecność w hemolimfie utrzymuje się do kilku dni po zakażeniu. Może to wskazywać na istotny udział hemocytów oraz receptorów Dscam w obserwowanych reakcjach, podobnie jak to ma miejsce u *D. melanogaster*.

Warto tu zaznaczyć, że dane uzyskane z badań na innych przedstawicielach bezkręgowców, np. skorupiaków *Macrocyclus albidus* [41] oraz *D. magna* [50] również wskazują na specyficzność odpowiedzi i funkcjonowanie pamięci immunologicznej u tych organizmów. W hemocytach *D. magna* i *D. pulex* wykazano możliwość powstawania zróżnicowanych transkryptów Dscam, podobnie jak u owadów [5]. Natomiast u ślimaków *Biomphalaria glabrata* stwierdzono obecność receptorowych białek FREPs (ang. *fibrinogen-related proteins*), które zawierają domenę podobną do fibrynogenu oraz 1 lub 2 domeny immunoglobulinowe o dużej zmienności sekwencji [89, 90, 91]. Zmienność ta może pozwalać na oddziaływanie z różnymi patogenami i odpowiednio ukierunkowywać odpowiedź immunologiczną. Cechy te upodabniają receptory FREPs, a także Dscam, do receptorów zaangażowanych w odporności nabytej u kręgowców.

5. PODSUMOWANIE

Układ odpornościowy bezkręgowców, o czym świadczą podane wyżej przykłady, jest zdolny do specyficznej odpowiedzi w stosunku do wcześniej napotkanego patogenu, co możliwe jest dzięki pamięci immunologicznej. Jest to uwarunkowane między innymi występowaniem zestawu zróżnicowanych receptorów (Dscam,

FREPs), które mogą brać udział w rozpoznawaniu struktur charakterystycznych dla różnych drobnoustrojów, a także mogą umożliwiać selekcję wrażliwych na dane drobnoustroje komórek zaangażowanych w proces fagocytozy. W odróżnieniu od przeciwciał kręgowców, za których olbrzymią różnorodność odpowiada proces rearanżacji genów na poziomie DNA, zmienność receptorów Dscam osiągana jest dzięki procesowi alternatywnego składania prekursorowych RNA. Dlatego też, niektórzy autorzy sugerują funkcjonowanie u owadów, a także u innych bezkręgowców, alternatywnego rodzaju odporności nabytej, opartej na mechanizmach odmiennych niż opisane dotąd u kręgowców [39, 40, 63].

PODZIĘKOWANIA

Autorka dziękuje Pani prof. dr hab. Teresie Jakubowicz za uwagi dotyczące niniejszej pracy.

6. LITERATURA

- [1] AGAISSE H, BURRACK LS, PHILIPS JA, RUBIN EJ, PERRIMON N, HIGGINS DE. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science* 2005; **309**: 1248–1251.
- [2] AGGARWAL K, SILVERMAN N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Reports* 2008, **41**: 267–277.
- [3] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptors signaling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 499–511.
- [4] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; **124**: 783–801.
- [5] BRITES D, MCTAGGART S, MORRIS K, ANDERSON J, THOMAS K, COLSON I, FABBRO T, LITTLE TJ, EBERT D, DU PASQUIER L. The Dscam homologue of the crustacean *Daphnia* is diversified by alternative splicing like in insects. *Mol Biol Evol* 2008; **25**: 1429–1439.
- [6] BROGDEN KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 238–250.
- [7] BROWN SE, HOWARD A, KASPRZAK AB, GORDON KH, EAST PD. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol* 2008; **38**: 201–212.
- [8] BULET P, STÖCKLIN R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett* 2005; **12**: 3–11.
- [9] CERENIUS L, SÖDERHÄLL K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004; **198**: 116–126.
- [10] CHEN BE, KONDO M, GARNIER A, WATSON FL, PÜETTMANN-HOLGADO R, LAMAR DR, SCHMUCKER D. The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell* 2006; **125**: 607–620.
- [11] CHERRY S, SILVERMAN N. Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nat Immunol* 2006; **7**: 911–917.
- [12] CYTRYŃSKA M, MAK P, ZDYBICKA-BARABASA, SUDER P, TERESA JAKUBOWICZ T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 2007; **28**: 533–546.
- [13] DAVIES S-A, DOW JAT. Modulation of epithelial innate immunity by autocrine production of nitric oxide. *Gen Comp Endocrinol* 2009; **162**: 113–121.
- [14] DONG Y, TAYLOR HE, DIMOPOULOS G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biology* 2006; **4**, e229: 1137–1146.
- [15] DZIARSKI R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol* 2004; **40**: 877–886.

- [16] FAULHABER LM, KARP RD. A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunology* 1992; **75**: 378–381.
- [17] FERRANDON D, IMLER J-L, HETRU C, HOFFMANN JA. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 862–874.
- [18] FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>; <http://www.flybase.org/>)
- [19] GARVER LS, WU J, WU LP. The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 660–665.
- [20] GOTTAR M, GOBERT V, MATSKEVICH AA, REICHHART JM, WANG C, BUTT TM, BELVIN M, HOFFMANN JA, FERRANDON D. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* 2006; **127**: 1425–1437.
- [21] GOTTAR M, GOBERT V, MICHEL T, BELVIN M, DUYK G, HOFFMANN JA, FERRANDON D, ROYET J. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2002; **416**: 640–644.
- [22] GROSS I, GEORGEL P, KAPPLER C, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. *Drosophila* immunity: a comparative analysis of the Rel proteins dorsal and Dif in the induction of the genes encoding dipterin and cecropin. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 1238–1245.
- [23] HAN ZS, IP YT. Interaction and specificity of Rel-related proteins in regulating *Drosophila* immunity gene expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21355–21361.
- [24] HATTORI D, DEMIR E, KIM HW, VIRAHG E, ZIPURSKY SL, DICKSON BJ. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. *Nature* 2007; **449**: 223–228.
- [25] HATTORI D, MILLARD SS, WOJTOWICZ WM, ZIPURSKY SL. Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuits formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; **24**: 597–620.
- [26] HAYDEN M, GHOSH S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004; **18**: 2195–2224.
- [27] HEDENGREN-OLCOTT M, OLCOTT MC, MOONEY DT, EKENGREN S, GELLER BL, TAYLOR BJ. Differential activation of the NF- κ B-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 2004; **279**: 21121–21127.
- [28] HETRU C, HOFFMANN D, BULET P. Antimicrobial peptides from insects. W: Brey PT, Hultmark D (red.) Molecular mechanisms of immune responses in insects. London: Chapman & Hall; 1998: 40–66.
- [29] HOFFMANN JA, REICHHART J-M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002; **3**: 121–126.
- [30] HU X, YAGI Y, TANJI T, ZHOU S, IP YT. Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9369–9374.
- [31] HULTMARK D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**: 12–19.
- [32] IMLER J-L, HOFFMANN JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 304–311.
- [33] IRVING P, TROXLER L, HETRU C. Is innate enough? The innate immune response in *Drosophila*. *CR Biol* 2004; **327**: 557–570.
- [34] JANG I-H, CHOSA N, KIM S-H, NAM H-J, LEMAITRE B, OCHIAI M, KAMBRIS Z, BRUN S, HASHIMOTO C, ASHIDA M, BREY PT, LEE W-J. A Spätzle-processing enzyme required for Toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Dev Cell* 2006; **10**: 45–55.
- [35] KAMBRIS Z, BRUN S, JANG I-H, NAM H-J, ROMEO Y, TAKAHASHI K, LEE W-J, UEDA R, LEMAITRE B. *Drosophila* immunity: A large-scale *in vivo* RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr Biol* 2006; **6**: 808–813.
- [36] KARP RD, RHEINS LA. Induction of specific humoral immunity to soluble proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*). II. Nature of the secondary response. *Dev Comp Immunol* 1980; **4**: 629–639.
- [37] KHUSH RS, LEMAITRE B. Genes that fight infection. What the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet* 2000; **16**: 442–449.
- [38] KOCKS C, CHO JH, NEHME N, ULVILA J, PEARSON AM, MEISTER M, STROM C, CONTO SL, HETRU C, STUART LM, STEHLE T, HOFFMANN JA, REICHHART J-M, FERRANDON D, RÄMET M, EZEKOWITZ RAB. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 2005; **123**: 335–346.
- [39] KURTZ J. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol* 2005; **26**: 186–192.
- [40] KURTZ J, ARMITAGE SAO. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol* 2006; **27**: 493–496.
- [41] KURTZ J, FRANZ K. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 2003; **425**: 37–38.

- [42] LAVINE MD, STRAND MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 2002; **32**: 1295–1309.
- [43] LAZZARRO BP. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11**: 284–289.
- [44] LECLERC V, REICHHART J-M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* 2004; **198**: 59–71.
- [45] LEMAITRE B, KROMER-METZGER E, MICHAUT L, NICOLAS E, MEISTER M, GEORGEL P, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9465–9469.
- [46] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [47] LEMAITRE B, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14614–14619.
- [48] LEULIER F, PARQUET C, PILI-FLOURY S, RYU J-H, CAROFF M, LEE W-J, MENGIN-LECREULX D, LEMAITRE B. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* 2003; **4**: 478–484.
- [49] LEVITIN A, WHITEWAY M. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. *Cell Microbiol* 2008; **10**: 1021–1026.
- [50] LITTLE TJ, O'CONNOR B, COLEGRAVE N, WATT K, READ AF. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr Biol* 2003; **13**: 489–492.
- [51] MANFRUELLI P, REICHHART J-M, STEWARD R, HOFFMANN JA., LEMAITRE B. A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. *EMBO J* 1999; **18**: 3380–3391.
- [52] McGETTIGAN J, McLENNAN RKJ, BRODERICK KE, KEAN L, ALLAN AK, CABRERO P, REGULSKI MR, POLLOCK VP, GOULD GW, DAVIES S-A, DOW JAT. Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem Mol Biol* 2005; **35**: 741–754.
- [53] MEISTER M, HETRU C, HOFFMANN JA. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; **248**: 17–36.
- [54] MINAKHINA S, STEWARD R. Nuclear factor-kappa B pathways in *Drosophila*. *Oncogene* 2006; **25**: 6749–6757.
- [55] MULINARI S, HÄCKER U, CASTILLEJO-LÓPEZ C. Expression and regulation of Spätzle-processing enzyme in *Drosophila*. *FEBS Lett* 2006; **580**: 5406–5410.
- [56] NAITZA S, ROSSÉ C, KAPPLER C, GEORGEL P, BELVIN M, GUBB D, CAMONIS J, HOFFMANN JA, REICHHART J-M. The *Drosophila* immune defense against Gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity* 2002; **17**: 575–581.
- [57] NEHME NT, LIÉGEOIS S, KELE B, GIAMMARINARO P, PRADEL E, HOFFMANN JA, EWBANK JJ, FERRANDON D. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* 2007; **3**, e173: 1694–1709.
- [58] OTVOS LJR. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 1138–1150.
- [59] PAL S, WU J, WU LP. Microarray analyses reveal distinct roles for Rel proteins in the *Drosophila* immune response. *Dev Comp Immunol* 2008; **32**: 50–60.
- [60] PHAM LN, DIONNE MS, SHIRASU-HIZAM, SCHNEIDER DS. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog* 2007; **3**, e26: 0001–0008.
- [61] PHILIPS JA, RUBIN EJ, PERRIMON N. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* 2005; **309**: 1251–1253.
- [62] POWERS J-PS, HANCOCK REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003; **24**: 1681–1691.
- [63] PLYTYCZ B. Convergent evolution of acquired immunity. *Centr Eur J Immunol* 2008; **33**: 83–86.
- [64] RHEINS LA, KARP RD, BUTZ A. Induction of specific humoral immunity to soluble proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*). I. Nature of the primary response. *Dev Comp Immunol* 1980; **4**: 447–458.
- [65] ROYET J, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**: 11–17.

- [66] RUTSCHMANN S, JUNG AC, HETRU C, REICHHART J-M, HOFFMANN JA, FERRANDON D. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* 2000; **12**: 569–580.
- [67] SADD BM, SCHMID-HEMPEL P. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol* 2006; **16**: 1206–1210.
- [68] SATO H, FEIX JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 1245–1256.
- [69] SCHMUCKER D, CHEN B. Dscam and DSCAM: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes Dev* 2009; **23**: 147–156.
- [70] SHAPIRO L, LOVE J, COLMAN DR. Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci* 2007; **30**: 451–474.
- [71] STEINER H. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol Rev* 2004; **198**: 83–96.
- [72] STENBAK CR, RYU J-H, LEULIER F, PILI-FLOURY S, PARQUET C, HERVE M, CHAPUT C, BONECA IG, LEE W-J, LEMAITRE B, MENGIN-LECREULX D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J Immunol* 2004; **173**: 7339–7348.
- [73] STROSCHER-STEVENSON SL, FOLEY E, O'FARREL PH, JOHNSON AD. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biology* 2006; **4**, e4: 87–99.
- [74] TANAKA H, SAGISAKA A, FUJITA K, KANEKO Y, IMANISHI S, YAMAKAWA M. Lipopolysaccharide elicits expression of immune-related genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* 2009; **18**: 71–75.
- [75] TANJI T, HU X, WEBER ANR, IP YT. Toll and IMD pathways synergistically activate an immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 4578–4588.
- [76] THEOPOLD U, LI D, FABBRI M, SCHERFER C, SCHMIDT O. The coagulation of insect hemolymph. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 363–372.
- [77] TZOU P, REICHHART J-M, LEMAITRE B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 2152–2157.
- [78] UVELL H, ENGSTRÖM Y. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet* 2007; **23**: 342–349.
- [79] VIDAL S, KHUSH RS, LEULIER F, TZOU P, NAKAMURA M, LEMAITRE B. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of Rel/NF- κ B-dependent innate immune responses. *Genes Dev* 2001; **15**: 1900–1912.
- [80] VIERSTRAETE E, VERLEYEN P, SAS F, VAN DEN BERGH G, DE LOOF A, ARCKENS L, SCHOOF L. The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **317**: 1052–1060.
- [81] VODOVAR N, VINALS M, LIEHL P, BASSET A, DEGROUARD J, SPELLMAN P, BOCCARD F, LEMAITRE B. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11414–11419.
- [82] WAGNER C, ISERMANN K, FEHRENBACH H, ROEDER T. Molecular architecture of the fruit fly's airway epithelial immune response. *BMC Genomics* 2008; **9**: 446–457.
- [83] WANG L, LIGOXYGAKIS P. Pathogen recognition and signaling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology* 2006; **211**: 251–261.
- [84] WATSON FL, PÜTTMANN-HOLGADO R, THOMAS F, LAMAR DL, HUGHES M, KONDO M, REBEL VI, SCHMUCKER D. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 2005; **309**: 1874–1878.
- [85] WEBER AN, TAUSZIG-DELAMASURE S, HOFFMANN JA, LELIEVRE E, GASCAN H, RAY KP, MORSE MA, IMLER JL, GAY NJ. Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* 2003; **4**: 794–800.
- [86] WERNER T, BORGE-RENNBERG K, MELLROTH P, STEINER H, HULTMARK D. Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem* 2003; **278**: 26319–26322.
- [87] www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm
- [88] YEAMAN MR, YOUNT NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003; **55**: 27–55.

- [89] ZHANG S-M, LOKER ES. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Gene* 2004; **341**: 255–266.
- [90] ZHANG S-M, LOKER ES. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. *Dev Comp Immunol* 2003; **27**: 175–187.
- [91] ZHANG S-M, ZENG Y, LOKER ES. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. *Innate Immun* 2008; **14**: 175–189.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 06.04.2009 r.

Przyjęto: 16.05.2009 r.

Dr hab. Małgorzata Cytryńska

Zakład Immunologii Bezkręgowców, Instytut Biologii,

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

e-mail: cytryna@poczta.umcs.lublin.pl