

Molekulare Analyse von Parasitoid-Wirt-Interaktionen: Neue Erkenntnisse zu Funktion und Herkunft von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) der Schlupfwespe *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae)

Annette Reineke

Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena

Abstract: Molecular analysis of parasitoid-host-interactions: New insights into the function and evolution of virus-like particles (VLPs) in the endoparasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae)

A detailed knowledge of the physiological and molecular mechanisms of parasitoid-host-interactions is regarded as an important prerequisite for the selection of host-adopted parasitoids and thus for successful and effective biological control programmes using insect natural enemies. Larvae of hymenopteran endoparasitoids must survive and develop inside their host's body, facing a functional host defence system, against which they have adopted a variety of strategies in the course of evolution. Maternal factors introduced by the female wasps during egg deposition play an important role in interfering with cellular and humoral components of the host's immune defence. Some of these components actively suppress host immune components and some are believed to confer protection for the developing endoparasitoid by rather passive means. The *Venturia canescens*/*Ephestia kuehniella* parasitoid-host-system is unique among other systems in that the cellular defence capacity of the host remains virtually intact after parasitization. Immune protection of the egg and the emerging larva is achieved by surface properties comprising e.g. virus-like particles (VLPs) produced by the female wasp. The functional role and structural features of these particles are discussed in the context of recent findings on their evolutionary origin.

Key Words: parasitoid-host-interactions, *Venturia canescens*, virus-like particles

Dr. A. Reineke, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Abt. Entomologie, Hans-Knöll-Str. 8, D-07745 Jena, E-mail: areineke@ice.mpg.de

Die Kenntnis der molekularen und physiologischen Mechanismen von Parasitoid-Wirt-Interaktionen ist eine wichtige Voraussetzung für die Auswahl geeigneter, an den Zielorganismus angepasster Parasitoiden-Stämme und damit für den erfolgreichen Einsatz von Nutzarthropoden in biologischen Pflanzenschutzprogrammen. Insbesondere bei endoparasitischer Entwicklung sind die Larven dieser Insekten unterschiedlichen Abwehrreaktionen von Seiten ihres Wirtes ausgesetzt, gegen die sie im Prozess einer Koevolution spezifische Anpassungen entwickelt haben.

Die an vorratsschädigenden Lepidopteren als Solitärparasitoid auftretende Schlupfwespe *Venturia canescens* (GRAV.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) injiziert als passiven Schutzmechanismus gegen die Immunabwehr des Wirtes zusammen mit dem Ei ein Sekret aus den Calyxdrüsen der weiblichen Ovarien in den Wirt. Dieses Sekret enthält so genannte Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs), die an der Eioberfläche anhaften und eine Einkapselung des Eis durch Hämozyten des Wirtes verhindern. Der Terminus „Virus-ähnlich“ bezeichnet dabei solche Partikel, die keine eigenen Nukleinsäuren enthalten – dies steht im Gegensatz zu den bei anderen parasitoiden Wespen auftretenden Virus-Partikeln, deren DNA aus mehreren zirkulären DNA-Molekülen besteht und die der Virus-Familie der „Polydnviridae“ zugeordnet werden (FLEMING 1992). Bei *V. canescens* umfassen die VLPs (VcVLPs) vier Proteine mit einer Größe von 35, 40, 52 und 60 kDa, sowie einige schwächer ausgeprägte Proteine im Molekulargewichtsbereich von 80 – 100 kDa (Abb. 1). Drei der *V. canescens* Gene, die für das 40, 52 und ein 94 kDa großes VLP Protein kodieren, wurden bislang kloniert und molekular analysiert (THEOPOLD et al. 1994; REINEKE et al. 2002; ASGARI et al. 2002).

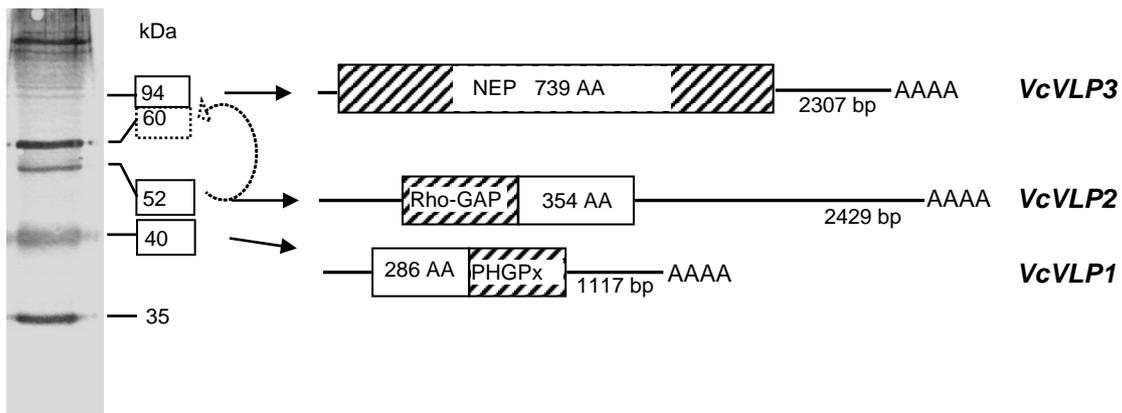


Abb. 1: Western-Blot-Analyse mit Proteinextrakten aus den Ovarien von *V. canescens* und Antikörpern gegen VcVLP-Proteine. Drei der für VcVLP kodierenden Gene wurden bislang kloniert, wobei das 52 und das 60 kDa große Protein miteinander verwandt sind (gestrichelte Linien). Die Größen der Gene (in bp), die aus ihnen abgeleiteten Aminosäuresequenzen (AA) sowie die Positionen von Domänen mit Homologien zu bekannten Proteinen (gestrichelte Boxen) sind schematisch angegeben.

VcVLP1

Das erste VcVLP Protein, das vollständig kloniert und sequenziert wurde, kodiert für ein 40 kDa großes Protein (THEOPOLD et al. 1994; HELLERS et al. 1996). Sequenzanalysen zeigten, dass das Protein eine hydrophobe N-terminale Domäne besitzt sowie eine C-terminale Domäne, deren Aminosäuresequenz signifikante Ähnlichkeiten zu Vertebraten Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidasen (PHGPx) aufweist (Abb. 1). In weiteren Untersuchungen konnte allerdings keine enzymatische Aktivität der PHGPx-Domäne von VcVLP1 nachgewiesen werden (LI et al. 2003). Dennoch ist denkbar, dass VcVLP1 z.B. mit modifizierten Phospholipiden auf der Oberfläche der Parasitoiden-Eier interagiert, eine Eigenschaft, die für andere PHGPx Enzyme nachgewiesen werden konnte. Modifizierte Phospholipide sind als Induktoren von Immunreaktionen bekannt, somit käme VcVLP1 eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der gegen das Parasitoiden-Ei gerichteten Wirts-Immunabwehr zu.

VcVLP2

Die Klonierung und molekulare Analyse des 52 kDa großen VcVLP-Proteins (VcVLP2) zeigte, dass dieses Protein mit dem 60 kDa großen VcVLP Protein verwandt ist (REINEKE et al. 2002) und bestätigte damit vorausgegangene Annahmen hinsichtlich einer Ähnlichkeit beider Proteine (FEDDERSEN et al. 1986). Desweiteren wies die Aminosäuresequenz von VcVLP2 eine Rho-GAP (für **Ras** homologe **GTPase** aktivierende Proteine) Domäne auf. Rho-GAPs sind an wichtigen Signaltransduktionsprozessen in der Zelle beteiligt, wie z.B. an der Regulation der Aktivität von cytoplasmatischen Filamenten oder bei der Bildung von Vesikeln. Eine Aufnahme der VLPs in die Hämocyten des Wirtes stellt jedoch eine unabdingbare Voraussetzung für die Interaktion von VcVLP2 mit cytoplasmatischen GTPasen dar - hierfür gibt es bislang keine experimentellen Beweise.

VcVLP3

Die Aminosäuresequenz des 94 kDa großen Proteins (VcVLP3) zeigte signifikante Homologien zu Metalloproteasen (Nepriylisin, ASGARI et al. 2002), von denen bekannt ist, dass sie als Aktivatoren des Insekten-Immunsystems fungieren können (GRIESCH et al. 2000). Eine ähnliche Rolle ist auch für VcVLP3 im parasitierten Wirt denkbar, zumal Hämocyten von Wirtsraupen nach einer Parasitierung durch *V. canescens* eher aktiviert, als in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (ASGARI et al. 2002). Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen Parasitoid-Wirt-Systemen: Viele parasitoiden Hymenopteren injizieren bei der Eiablage bestimmte Stoffe in ihren Wirt, die eine Schwächung der Wirts-Hämocyten bewirken, was in einem verminderten Spreiten bis hin zur Apoptose der Zellen deutlich wird (LAVINE & STRAND 2002). Da die

Wirts-Hämozyten entscheidend an der Immunabwehr des parasitierten Tieres beteiligt sind, ist dieser Eingriff in die Hämozyten-Funktion ein wichtiger Schritt hinsichtlich einer Inaktivierung des Wirts-Immunsystems. Unter der Voraussetzung, dass das Ei bzw. die Larve des Parasitoiden auf andere Weise ausreichend gegen Immunreaktionen des Wirtes geschützt ist, kann ein weiterhin funktionsfähiges Wirts-Immunsystem allerdings auch durchaus von Vorteil für den sich entwickelnden Parasitoiden sein, da es sich weiterhin gegen andere Krankheitserreger wehren kann.

Herkunft der VLPs – viraler oder nicht-viraler Ursprung?

VLPs und Polydnaviren (PDVs) sind in das Genom zahlreicher Schlupfwespenarten integriert, wobei von keinem der Systeme bekannt ist, dass die Virus-Partikel in der Lage sind, sich im parasitierten Wirt zu replizieren (WHITFIELD & ASGARI 2003). Ihre Übertragung auf die nächste Parasitoiden-Generation erfolgt ausschließlich über die Chromosomen der Wespe. Hinsichtlich der Evolution dieser Virus-Partikel stellt sich daher die Frage, ob es sich hierbei ursprünglich um eigenständige Pathogene der Wirtsraupen oder der Schlupfwespen handelte, die ihr Genom irgendwann mit dem der Wespen verbunden haben, oder ob nicht vielmehr ein nicht-viraler Ursprung dieser Partikel in Betracht kommt. In diesem Fall würde es sich um Schlupfwespen-Gene handeln, die virusartig verpackt in die Raupenzellen injiziert werden und erst dort ihre entsprechende, für die Entwicklung des Parasitoiden nötige Schutzwirkung entfalten.

Zwar sind die VLPs von *V. canescens* in ihrer Morphogenese, Freisetzung und Morphologie bestimmten Ichnoviren ähnlich, die Homologien der bislang ermittelten Sequenzen der VcVLPs betreffen allerdings nur Insekten- oder Vertebratenproteine, nicht aber Virusproteine. Damit kann davon ausgegangen werden, dass keines der bisher bekannten VcVLPs tatsächlich viraler Herkunft ist.

Danksagung

Die molekularen Untersuchungen der VcVLPs fanden in Zusammenarbeit mit Prof. OTTO SCHMIDT, University of Adelaide und Dr. SASSAN ASGARI, University of Queensland (beide Australien) statt. Der DFG sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Literatur

- ASGARI, S., REINEKE, A., BECK, M. & SCHMIDT, O. (2002): Isolation and characterization of a neprilysin-like protein from *Venturia canescens* virus-like particles. – *Insect Mol. Biol.* 11: 477-485.
- FEDDERSEN, I., SANDER, K. & SCHMIDT, O. (1986): Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. – *Experientia* 42: 1278-1281.
- FLEMING, J.A.G.W. (1992): Polydnaviruses: Mutualists and pathogens. – *Annu. Rev. Entomol.* 37: 401-425.
- GRIESCH, J., WEDDE, M. & VILCINSKAS, A. (2000): Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. – *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30: 461-472.
- HELLERS, M., BECK, M., THEOPOLD, U., KAMEI, M. & SCHMIDT, O. (1996): Multiple alleles encoding a virus-like particle protein in the ichneumonid endoparasitoid *Venturia canescens*. – *Insect Mol. Biol.* 5: 239-249.
- LAVINE, M.D. & STRAND, M.R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. – *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 1295-1309.
- LI, D., BLASEVICH, F., THEOPOLD, U. & SCHMIDT, O. (2003): Possible function of two insect phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidases. – *J. Insect Physiol.* 49: 1-9.
- REINEKE, A., ASGARI, S., MA, G., BECK, M. & SCHMIDT, O. (2002): Sequence analysis and expression of a virus-like particle protein, VLP2, from the parasitic wasp *Venturia canescens*. – *Insect Mol. Biol.* 11: 233-239.
- THEOPOLD, U., KRAUSE, E. & SCHMIDT, O. (1994): Cloning of a VLP-protein coding gene from a parasitoid wasp *Venturia canescens*. – *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26: 137-145.
- WHITFIELD, J.B. & ASGARI, S. (2003): Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. – *J. Insect Physiol.* 49: 397-405.

