

NEV-Dissertatieprijs 2015

De extraembryonale serosa beschermt insecteneieren tegen uitdroging en infectie

Chris G.C. Jacobs

TREFWOORDEN

Cuticula, diversiteit, evolutionaire innovatie, RNA-interferentie, zelfverdediging

Entomologische Berichten 77 (2): 48-52

Insecten zijn enorm divers en komen overal ter wereld voor. Hoewel veel factoren een belangrijke rol hebben gespeeld in het succes van insecten, wordt één essentiële factor vaak overzien, namelijk de mogelijkheid van insecteneieren om in enorm diverse habitatten te overleven. Ondanks het belang van de door de moeder geproduceerde eierschaal, is het ei zelf niet geheel weerloos. Een extraembryonaal membraan, de serosa, wordt in bijna alle insecten eieren vroeg in de ontwikkeling gemaakt. Deze omsluit zowel het eiwit als het embryo en is hiermee een goede kandidaat om het embryo te beschermen tegen gevaren van buitenaf. In de kastanje bruine meelkever (*Tribolium castaneum*) kan de ontwikkeling van de serosa voorkomen worden door één specifiek gen (*Tc-zen1*) uit te schakelen met RNA-interferentie. Deze eieren kunnen onder normale omstandigheden goed zonder serosa overleven. Door eieren met en zonder serosa bloot te stellen aan uitdagende omstandigheden zoals droge lucht en infectie, kon ik laten zien dat de serosa beschermd tegen zowel uitdroging als infectie. Het bestuderen van de eieren van een andere kever, de doodgraver *Nicrophorus vespilloides*, liet zien dat niet alle eieren goed beschermd zijn. Omdat de eieren van deze kever snel moeten ontwikkelen wijzen deze bevindingen op een wisselwerking tussen snelle ontwikkeling en een goede bescherming. Mijn onderzoek laat dus zien dat insecteneieren zelf waarschijnlijk een grote rol hebben gespeeld in het succes van insecten.

Inleiding

De meest soortenrijke groep op aarde zijn de insecten. Zo'n driekwart van de ongeveer anderhalf miljoen beschreven soorten zijn insecten. Er zijn veel ideeën over waarom insecten zo ontzettend succesvol zijn. Zo kunnen ze bijvoorbeeld gemakkelijk op nieuwe plekken komen doordat ze kunnen vliegen, maar ook co-evolutie met planten zou een grote rol hebben gespeeld (Grimaldi & Engel 2005). Er zijn nog veel meer aspecten van insecten die in meer of mindere mate hebben bijgedragen aan de enorme soortenrijkdom. De rol van eieren in het succes van insecten heeft echter weinig aandacht gekregen (Zeh *et al.* 1989). Dit komt waarschijnlijk omdat het insectenei doorgaans gezien wordt als weerloos. Zonder de mogelijkheid om zichzelf te beschermen zijn ze afhankelijk van de verscheidene mechanismes van de moeder om het ei te beschermen. Dit kan door de productie van een stevige eierschaal door de moeder, door de uitscheiding van beschermende stoffen op het ei door de moeder en ook door de actieve bescherming van de eieren door de ouders (Boos *et al.* 2014, Dubuffet *et al.* 2015, Freitak *et al.* 2014, Moreau *et al.* 2012, Roth *et al.* 2010, Trauer & Hilker 2013, Zanchi *et al.* 2012). Veel wetenschappers hebben zich verdiept in deze manieren van bescherming. Met mijn promotieonderzoek laat ik zien dat, hoewel sommige insecteneieren behoorlijk weerloos

zijn, andere insecteneieren zijn lang niet zo weerloos als werd gedacht.

De serosa

Bijna alle insecteneieren ontwikkelen een cellaag rondom het ei, genaamd de serosa (figuur 1). Deze laag wordt door het ei zelf gemaakt en niet door de moeder en bevindt zich onder de eierschaal die gemaakt is door de moeder. In veel soorten insecten wordt meer dan de helft van de allereerste cellen in het ei gebruikt om de serosa te maken (Roth 2004). Dat zoveel van deze eerste cellen gebruikt worden om de serosa te maken in plaats van voor de ontwikkeling van het embryo zelf, geeft aan dat deze laag een belangrijke rol moet vervullen. In sommige soorten is het bekend dat de serosa een harde chitine laag (waar het exoskelet van insecten van gemaakt wordt) uitscheidt. Hierdoor werd al langer gedacht dat de serosa een beschermende functie vervult, het is echter nog niet eerder gelukt om dit experimenteel te testen. In de kastanjebruine rijstmeelkever, *Tribolium castaneum* (Herbst) (figuur 2a), is het mogelijk om de ontwikkeling van de serosa te voorkomen door een gen (*Tc-zen1*) uit te schakelen. Dit geeft de mogelijkheid om te testen of de serosa daadwerkelijk een beschermende functie heeft.

NEV-Dissertatieprijs 2015

Tijdens de 27e Nederlandse Entomologendag (Ede, 18 december 2015) is de achtste NEV-Dissertatieprijs uitgereikt aan Dr. Chris Jacobs, voor zijn proefschrift 'Surviving embryogenesis: the extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation and infection', op 4 december 2014 verdedigd aan de Universiteit Leiden. De prijs bestaat uit een geldbedrag plus een oorkonde en wordt jaarlijks toegekend voor het beste proefschrift op het gebied van de entomologie, verdedigd aan een Nederlandse universiteit in het voorgaande academische jaar (1 september – 31 augustus). In het juryrapport wordt met name de sterke combinatie van experimenten en technieken die zijn toegepast in dit zeer vernieuwend onderzoek geprezen. Het richt zich op de 'key innovation' die maakt dat insecten evolutionair zo succesvol zijn. Het is een serie van originele evo-devo studies naar het functioneren en de ontwikkeling van insecteneieren. Wat door alle commissieleden werd genoemd (en geroemd) is de bijzonder heldere, krachtige en aansprekende

schrijfstijl. Zo was de samenvatting prikkelend en de Nederlandse lekensamenvatting bijzonder toegankelijk en goed geschreven.

During the 27th Annual Dutch Entomologists Meeting (Ede, 18 December 2015), the eighth Netherlands Entomological Society (NEV) Dissertation Award was presented to Dr. Chris Jacobs, for his thesis 'Surviving embryogenesis: the extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation and infection', defended on December 4, 2014 at Leiden University. This prize comprises a sum of money and a certificate of appreciation, and is awarded for the best doctoral thesis in the field of entomology, defended at a Dutch university in the preceding academic year (1 September – 31 August). The committee especially praises the impressive combination of experiments and techniques that were applied in highly innovative research. The research focuses on a key innovation in insects that contributes to their evolutionary success: a series of original evo-devo studies into



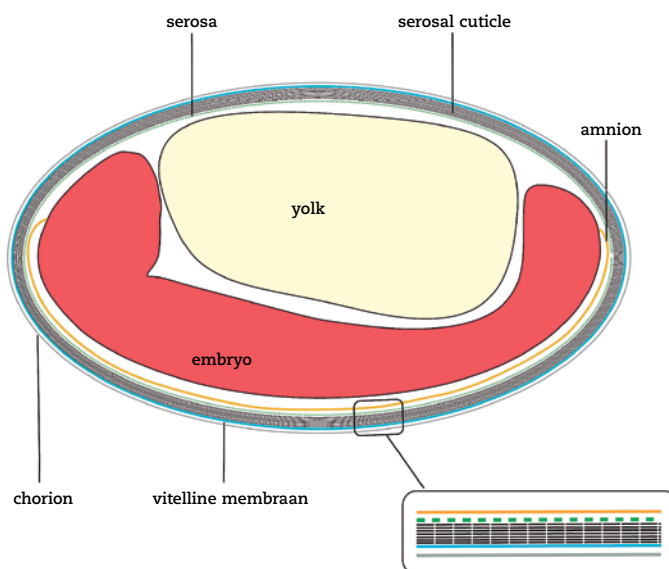
the functioning and the development of insect eggs. The committee highly appreciated the clear, convincing and attractive writing style.

Bescherming tegen uitdroging

Eén van de gevaren voor insecteneieren is uitdroging. Anders dan eieren van de kreeftachtigen (Crustacea), die meestal in water worden gelegd, worden insecteneieren vaak op droge plekken gelegd. Met behulp van electronenmicroscopie kon ik laten zien dat de serosa in de meelkever ook een chitinelaa uitscheidt (figuur 3). De eieren van deze meelkever kunnen zowel in extreem droge als erg natte omgevingen overleven. Echter wanneer we de ontwikkeling van de serosa voorkomen, overleven eieren een stuk minder goed in zowel droge als vochtige omgevingen (rode lijn, figuur 4). In vochtige omgevingen zwellen de eieren zonder serosa op en overleven daarom niet. Om er zeker van te zijn dat het de chitinelaa is die bescherming tegen uitdroging biedt, heb ik ook het eiwit dat chitine maakt (chitinesynthese) uitgeschakeld. Wanneer de serosa er wel is, maar de chitinelaa niet, overleven eieren droge omstandigheden ook niet, maar wel goed in vochtige omstandigheden (paarse lijn, figuur 4). Ik heb ook laten zien dat de structuur van deze chitinelaa belangrijk is voor de overleving van eieren in droge omgevingen. Wanneer deze structuur verloren is, overleven eieren slechter als het droog is. Deze gegevens laten zien dat de serosa inderdaad bescherming biedt tegen uitdroging (Jacobs et al. 2015, 2013). Deze beschermende functie was waarschijnlijk erg belangrijk voor insecten toen ze op het land gingen leven.

Bescherming tegen infectie

Uitdroging is niet het enige gevaar voor insecteneieren. Bacteriën zijn overal aanwezig en insecteneieren zitten vol met voedingsstoffen. Volwassen insecten en larven hebben



1. Het insectenei. De eieren van insecten hebben twee maternale lagen, het chorion (eierschaal) en het vitelline membraan. Het embryo maakt zelf nog twee extraembryonale lagen, de serosa (groen) en het amnion (oranje). De serosa scheidt een cuticula uit welke beschermt tegen uitdroging.

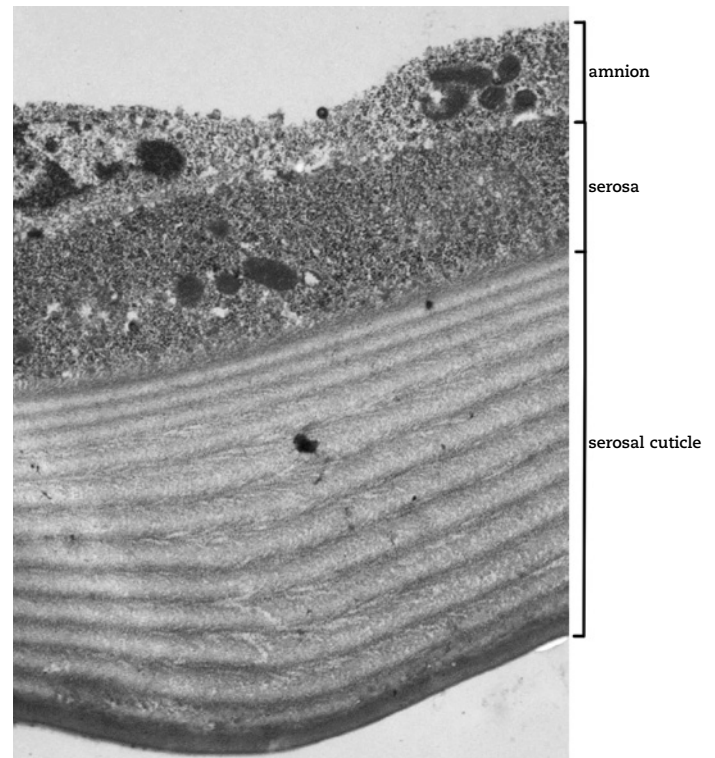
1. The insect egg. Insect eggs have two maternal layers, the chorion (eggshell) and the vitelline membrane. The embryo itself makes another two extraembryonic layers, the serosa (green) and the amnion (orange). The serosa secretes a cuticle which protects against dehydration.



2. De insectensoorten die in dit proefschrift bestudeerd zijn: (a) *Tribolium castaneum*, (b) *Drosophila melanogaster* and (c) *Nicrophorus vespilloides*. Foto's: Chris Jacobs

2. The insect species studied in this thesis: (a) *Tribolium castaneum*, (b) *Drosophila melanogaster* and (c) *Nicrophorus vespilloides*.

een uitgebreid afweersysteem om zichzelf te beschermen tegen infecties (Ferrandon *et al.* 2007, Lemaitre & Hoffmann 2007). Een heel scala van antimicrobiële stoffes voorkomt dat insecten ten onder gaan aan infecties. Van insecteneieren was echter niet bekend of ze zichzelf konden beschermen of dat ze voor bescherming afhankelijk zijn van de moeder. Sommige insecteneieren worden bedekt met antimicrobiële stoffes door de moeder (Boos *et al.* 2014), maar dit geldt niet voor alle soorten. Door eieren te prikken met een naald met bacteriën heb ik laten zien dat de eieren van de meelkever zeker in staat zijn om op een



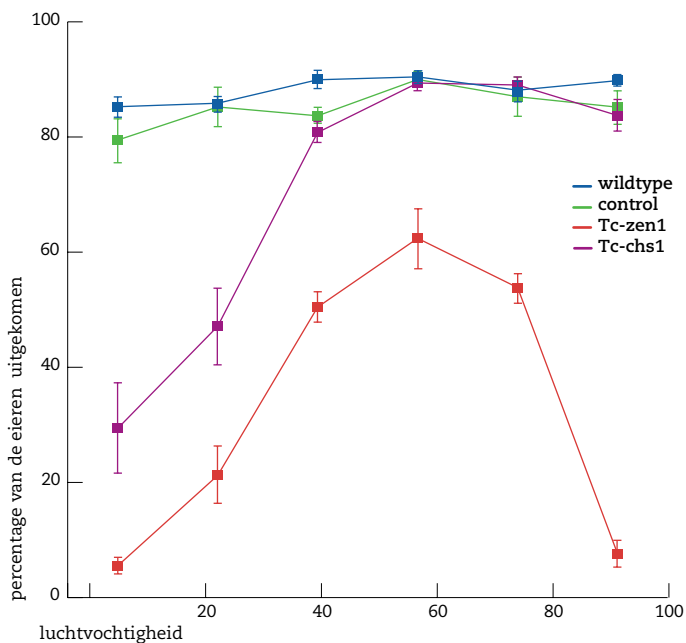
3. Electronenmicroscopische opname van de extraembryonale membranen van *Tribolium castaneum* (dwarsdoorsnede). De bovenste laag zijn cellen van het amnion, dan zien we een enkele cel van de serosa en vervolgens een dikke cuticula die uitgescheiden is door de serosa. Foto: Gerda Lamers

3. Electron microscopy image of the extraembryonic membranes in *Tribolium castaneum* (cross section). At the top, we see cells of the amnion, below that cells of the serosa and at the bottom a thick cuticle which is secreted by the serosa.

infectie te reageren. De genen die coderen voor antimicrobiële stoffes verhogen de activiteit tot wel duizendmaal het niveau zonder infectie. De eieren van de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* Meigen (figuur 2b) ontwikkelen geen serosa. Wanneer ik deze eieren infecteerde met bacteriën reageerden de genen voor antimicrobiële stoffes niet (Jacobs & Van Der Zee 2013). Door de ontwikkeling van de serosa in de meelkever te voorkomen ontdekte ik dat deze immunoreactie in het ei volledig afhankelijk is van de serosa (figuur 5). Genen die in gewone eieren wel reageren op een infectie worden niet geactiveerd in eieren zonder serosa. Door middel van RNA-sequencing kon ik laten zien dat dit opging voor alle immuungenen. Verder kon ik ook laten zien dat deze genen specifiek in de serosa tot expressie kwamen en dat bacteriën sneller groeien in eieren zonder serosa (figuur 6) (Jacobs *et al.* 2014a). Al met al laat ik met dit onderzoek zien dat de eieren van de meelkever dankzij de serosa alles behalve weerloos zijn tegen infectie.

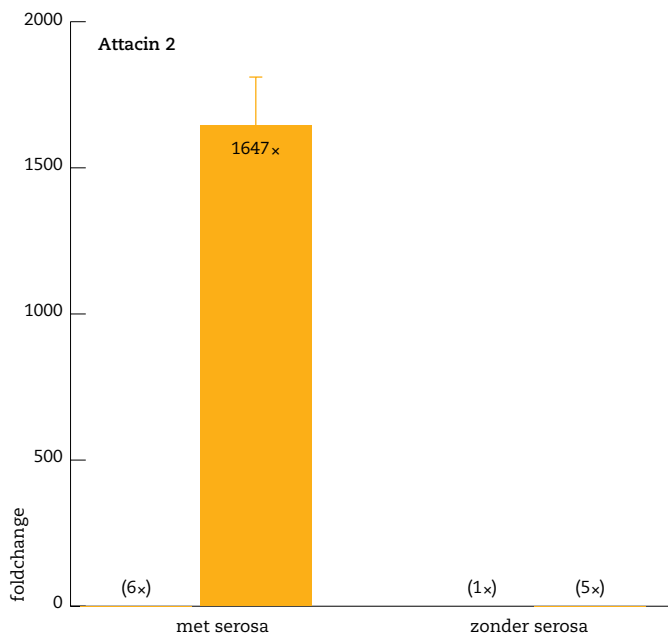
Eieren van de doodgraver zijn wel weerloos

De meelkever is slechts een van de vele soorten insecten. Daarom heb ik ook onderzoek gedaan naar de eieren van een andere keversoort, de doodgraver *Nicrophorus vespilloides* Herbst (figuur 2c). Deze kevers brengen hun larven groot op een lijkje van een muis of ander klein dier (Scott 1998). Anders dan veel andere insectensoorten vertonen deze kevers broedzorg. Ze begraven het lijkje, houden het schoon en verzorgen de larven. De moeder legt haar eieren in de aarde rondom het lijkje. Eieren in de buurt van een lijkje staan bloot aan veel bacteriën, dus was



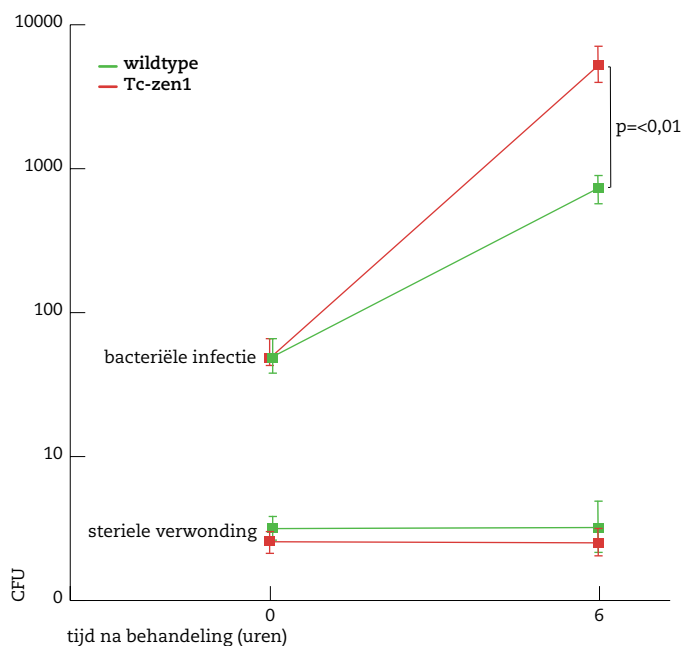
4. Het percentage van de eieren van *Tribolium castaneum* dat uitkomt ten opzichte van de luchtvochtigheid op 35 graden Celsius.

4. The percentage of eggs of *Tribolium castaneum* that hatch in relation to relative humidity at 35 degrees Celsius. For both wildtype and control eggs, no clear relation between humidity and hatching rate exists, approximately 80-90% of the eggs hatch (blue and green line). When there is no serosa (Tc-zen1, red line), eggs do not survive well under both dry and humid conditions. When we only prevent the development of the serosal cuticle (Tc-chs1, purple line), we see that only dry conditions negatively affect hatching rates.



5. De expressie van een antimicrobieel eiwit (Attacin2) in steriel verwonde eieren van *Tribolium castaneum* (linkerbalk, zwart) en in eieren die met bacteriën geïnfecteerd zijn (rechterbalk, wit) voor zowel eieren met als zonder serosa.

5. The expression of an antimicrobial peptide (Attacin2) in sterilely injured eggs of *Tribolium castaneum* (left bar, black) and in eggs infected with bacteria (right bar, white) for both eggs with and without serosa. In eggs with serosa this antimicrobial peptide is induced 1647x compared to uninfected eggs, while in eggs without serosa this antimicrobial peptide is hardly induced.



6. Bacteriegroei in eieren van *Tribolium castaneum*. Voor zowel eieren met serosa (wildtype, groene lijn) als zonder serosa (Tc-zen1, rode lijn) zorgt een steriele verwonding niet voor een toename in het aantal bacteriën 6 uur na behandeling. Echter, wanneer we ze infecteren met bacteriën, groeit het aantal van ongeveer 50 bacteriën direct na infectie tot ongeveer 750 bacteriën na 6 uur in de wildtype eieren. Bacteriën groeien veel sneller in eieren zonder serosa, na 6 uur zijn dat er ongeveer 7500.

6. Bacterial growth in *Tribolium castaneum* eggs. For both eggs with (wildtype, green line) and without serosa (Tc-zen1, red line), sterile injury does not lead to an increase of the number of bacteria 6 hours after treatment. However, when infected with bacteria, the number increases from approximately 50 bacteria immediately after infection to approximately 750 bacteria after 6 hours in wildtype eggs. Bacteria grow much faster in eggs without serosa, after 6 hours the number of bacteria has increased to approximately 7500.

de verwachting dat deze eieren een goede immuunreactie nodig hadden. De waarheid was echter heel anders. Ik vond dat eieren in de buurt van een rottend lijkje inderdaad minder goed overleefden en dat dit kwam door de aanwezigheid van bacteriën (Jacobs *et al.* 2014b). Echter, de eieren vertonen geen immuunreactie na infectie met bacteriën. Toch ontwikkelen deze eieren wel een serosa. Dit verrassende resultaat is te verklaren door de manier van leven van dit insect. Wanneer moeder een lijkje vindt, gaat ze dit begraven en eieren leggen. Het lijkje blijft echter niet lang daar liggen. De eieren moeten uitkomen en de larven moeten zich vol eten in het lijkje voordat het verdwenen is. De eieren van deze soort ontwikkelen dan ook bijzonder snel; in slechts 2,5 dag. Zodra larfjes uit de eieren komen, kunnen ze zichzelf wél beschermen tegen infectie. Ik geloof dan ook dat deze eieren geen energie investeren om zichzelf als ei te beschermen, maar deze energie gebruiken om zo snel mogelijk te ontwikkelen zodat de larfjes naar de voedselbron kunnen. Een kort eistadium geeft waarschijnlijk een minder grote kans op infectie. Er valt nog veel te leren over de relatie tussen snel ontwikkelen en een goed beschermd ei.

Conclusie

Lang werd gedacht dat insecteneieren weerloos waren. Met mijn promotieonderzoek laat ik zien dat dat niet altijd opgaat. Eieren van de meelkever kunnen zichzelf met behulp van de serosa heel goed beschermen tegen zowel uitdroging als infectie. Niet alle eieren zijn echter zo goed in zelfverdediging, sommige (zoals die van de fruitvlieg en de doodgraver) investeren in een snelle ontwikkeling, ten koste van zelfverdediging. Toekomstig onderzoek zal uitwijzen hoe algemeen een goed beschermd ei is in de insectenwereld.

Literatuur

- Boos S, Meunier J, Pichon S & Kolliker M 2014. Maternal care provides antifungal protection to eggs in the European earwig. *Behavioural Ecology* 25: 754-761.
- Dubuffet A, Zanchi C, Boutet G, Moreau J, Teixeira M & Moret Y 2015. Trans-generational immune priming protects the eggs only against Gram-positive bacteria in the mealworm beetle. *PLOS Pathogens* 11, e1005178.
- Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C & Hoffmann J 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 7: 62-74.
- Freitag D, Schmidberg H, Dickel F, Lochnit G, Vogel H & Vilcinskas A 2014. The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. *Virulence* 5: 547-54.
- Grimaldi DA & Engel MS 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Jacobs CGC & Van Der Zee M 2013. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Developmental and Comparative Immunology* 41: 263-269.
- Jacobs CGC, Rezendes GL, Lamers GEM & Van der Zee M 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* 280: 20131082.
- Jacobs CGC, Spaink HP & Van der Zee M 2014a. The extraembryonic serosa is a frontier epithelium providing the insect egg with a full-range innate immune response. *Elife* 3: 1-21.
- Jacobs CGC, Wang Y, Vogel H, Vilcinskas A, Van der Zee M & Rozen DE 2014b. Egg survival is reduced by grave-soil microbes in the carrion beetle, *Nicrophorus vespilloides*. *BMC Evolutionary Biology* 14: 208.
- Jacobs CGC, Braak N, Lamers GEM & Van der Zee M 2015. Elucidation of the serosal cuticle machinery in the beetle *Tribolium* by RNA sequencing and functional analysis of Knickkopf1, Retroactive and Laccase2. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 60: 7-12.
- Lemaitre B & Hoffmann J 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25: 697-743.
- Moreau J, Martinaud G, Troussard JP, Zanchi C & Moret Y 2012. Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. *Oikos* 121: 1828-1832.
- Roth O, Joop G, Eggert H, Hilbert J, Daniel J, Schmid-Hempel P & Kurtz J 2010. Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology* 79: 403-413.
- Roth S 2004. Gastrulation in other insects. In: *Gastrulation: from cells to embryos* (Stern CD ed): 105-121. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scott MP 1998. The ecology and behavior of burying beetles. *Annual Review of Entomology* 43: 595-618.
- Trauer U & Hilker M 2013. Parental legacy in insects: variation of transgenerational immune priming during offspring development. *PLoS One* 8, e63392.
- Zanchi C, Troussard J-P, Moreau J & Moret Y 2012. Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* 279: 3223-3230.
- Zeh DW, Zeh JA & Smith RL 1989. Ovipositors, amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. *Quarterly Review of Biology* 64: 147-168.

Geaccepteerd: 16 januari 2017

Summary

The extraembryonic serosa protects insect eggs against dehydration and infection

Insects are incredibly diverse and occur in almost every habitat on earth. Many factors were important for insect success, such as the ability to fly and their co-evolution with plants. One essential factor that is often overlooked is the ability of insect eggs to survive in these diverse habitats. Although the maternally produced eggshell is often important for survival, the egg itself is not as defenceless as once thought. An extraembryonic membrane, the serosa, develops early during development in almost all insect eggs. This serosa envelops both the yolk and the embryo and is therefore a good candidate to provide endogenous protection to the egg against outside forces. In the red flour beetle (*Tribolium castaneum*), the development of the serosa can be prevented by knocking down a single gene (*Tc-zen1*) with RNA interference. These eggs can survive well under normal circumstances. Using this technique, I studied the function of the serosa by exposing eggs with and without serosa to challenging conditions such as dry air and infection. This showed that the serosa protects against dehydration by secreting a cuticle and against infection by the production of antimicrobial peptides. By studying a burying beetle (*Nicrophorus vespilloides*), I discovered that their eggs are not well protected. These eggs need to develop very quickly, indicating a trade-off between developmental speed and egg protection. My research on endogenous egg protection shows that insect eggs themselves have likely played a crucial role in the enormous success of insects.

Chris G.C. Jacobs

Max Planck Institute for Chemical Ecology

Hans-Knöll strasse 8

07745 Jena

Duitsland

cjacobs@ice.mpg.de

