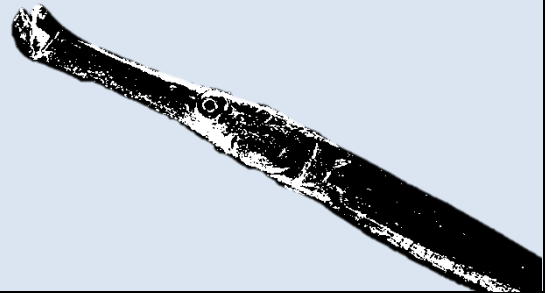


# **BIPARENTAL IMMUNE PRIMING IN THE BROAD-NOSED PIPEFISH (SYNGNATHUS TYPHLE)**

Vorgelegt von:

**Anne Beemelmanns**

Kiel, 2016



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

- Dr. rer. nat. -

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel







Erste Gutachterin: Dr. Olivia Roth

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hinrich Schulenburg

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2016

Zum Druck genehmigt: 08.04.2016

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan



**Für meine Familie**





# Table of Content

|   |   |
|---|---|
| Summary.....  | 11  |
| Zusammenfassung .....   | 13  |
| Introduction .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 1. Parasite mediated selection on immunity .....                                | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 1.1. Immune system of vertebrates.....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 1.2. Evolution of the immune system .....                                       | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 1.3. Immune system of fish (Teleostei) .....                                    | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2. Parental effects.....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2.1. Trans-generational immune priming .....                                    | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2.2. Biparental immune priming .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2.3. Costs of immune priming .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2.4. Epigenetic inheritance .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2.4.1. DNA methylation.....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2.4.2. Histone modifications.....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 3. The broad-nosed pipefish ( <i>Syngnathus typhle</i> ) as model organism .... | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Thesis outline .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Chapter I .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Chapter II .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Chapter III .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Chapter IV .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Synthesis .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 1. Biparental immune priming over generations .....                             | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 2. Paternal versus maternal immune priming effects. ....                        | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 3. How is immune priming mediated over generations? .....                       | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Future perspectives .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Author contributions .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Eidesstattliche Erklärung.....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| List of publications.....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Danksagung.....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Bibliography .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Appendices .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Appendix Chapter I .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Appendix Chapter II .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Appendix Chapter III .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| Appendix Chapter IV .....   | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |





## Summary

All living organisms are permanently exposed to harmful parasites and pathogens. The immune system and with it sophisticated strategies arose to face challenging pathogens such as bacteria and viruses. One outstanding strategy is the transfer of immunity from mothers to offspring known as “trans-generational immune priming” (TGIP). Through the transfer of acquired immunological protection mothers can boost the immune defense of their offspring and facilitate resistance against bacteria present in the maternal environment. Commonly, TGIP is limited to females and was considered to be a maternal trait. Yet, in the sex-role reversed pipefish *Syngnathus typhle* fathers are closely connected to the embryos during male pregnancy over a placenta-like structure. This intimate physical connection between fathers and offspring may mechanistically facilitate additional paternal immune priming and provides an exclusive chance to study biparental investment into offspring immunity. In my thesis, I explored multi-generational biparental immune priming in the sex-role reversed pipefish *S. typhle* and discussed its evolutionary and ecological consequences as well as the mechanistic basis.

In the first two chapters, I investigated parental influences on offspring immunity upon an immune challenge with two different heat-killed bacteria types (*Vibrio* spp. and *Tenacibaculum maritimum*). Therefore, I challenged two consecutive age classes of the F1-generation (one-week-old and four-month-old juveniles) with bacteria types experienced by their parents and assessed gene expression of 29 immune genes and immune cell activity. My results indicate different magnitudes of maternal and paternal immune priming. Indeed, fathers had a major impact on offspring immunity resulting in a long-lasting paternal immune priming effect in four-month-old juveniles, which came with immunological specificity. Maternal immune priming effects were only effective in one-week-old juveniles and diminished upon maturation. Yet, no additive biparental immune priming in combination with the exposure of two different bacteria types was detectable, indicating underlying complex trade-off effects. In the second chapter, I investigated potential beneficial immune priming effects in favor for specific pathogens. Whereas in one-week-old juveniles both parental bacteria challenges induced a differently altered immune gene expression profile, in four-month-old offspring protection was only maintained against prevalent *Vibrio* bacteria. Thus optimal protection against prevailing pathogen types was accomplished by the parents.

In chapter three, I investigated multi-generational biparental immune priming by continuing the main experiment until the second generation. Therefore, I crossed untreated individuals of the F1-generation and exposed one-week-old F2-juveniles with identical heat-killed bacteria types, which already their grandparents had experienced. I found evidence that both

grandparents affect the immune system of their grand-offspring. With this astonishing result I could show that TGIP in vertebrates can be sustained over two generations. This is challenging the conventional view that TGIP is only short-term and fading after maturation.

As individual investment into immunity is costly in terms of energy resources, induced immunity can lead to resource allocation trade-offs with other life history-traits. In accordance, I recorded reduced fecundity and delayed maturation time of adult F1-offspring and reduced body size of F2-juveniles in case of parental respectively grandparental bacteria exposure. These fitness detriments are pointing to a resource allocation trade-off between immune priming and fecundity indicating that costs might constrain the overall beneficial immune priming effects.

By including the expression of genes responsible for epigenetic regulation mechanism such as DNA methylation and histone acetylation, I provide evidence that long-term protection could be based on parental epigenetic marks. A significantly altered expression pattern of 15 epigenetic genes indicate that these factors might be crucial players in the regulation of immune gene expression and its non-genetic inheritance over two generations. Further, lectins, peptidoglycan recognition proteins, immunoglobulins, and histone acetyltransferases might be tightly connected in mediating the immune priming process over the paternal line.

The result of my thesis showed that the importance of TGIP as one form of non-genetic inheritance might be more wide-ranging and long-lasting than formerly recognized and may affect models of host-parasite coevolution. The involvement of epigenetic inheritance mechanisms indicate that TGIP mediated over the paternal line is not only restricted to the pipefish system with its male pregnancy but certainly could be more widespread in the animal kingdom than previously reported.

## Zusammenfassung

Alle lebenden Organismen sind permanent allgegenwärtigen infektiösen Parasiten und Pathogenen ausgesetzt. Ausgelöst durch ihre schädliche Wirkung auf die Fitness ihres Wirtes evolvierten sich mit dem Immunsystem verschiedene Abwehrmechanismen, um einen Schutz zu gewährleisten. Eine raffinierte Strategie ist die Übertragung von erworbener Immunität von Müttern auf die Nachkommen über die Plazenta oder Muttermilch, bekannt als „generationsübergreifende Immunprägung“. Mit der Weitergabe von erworbenem Immunschutz können somit Mütter die Immunabwehr ihrer Nachkommen in der frühen embryonalen Entwicklung gewährleisten. Zudem ermöglicht es den Nachkommen schneller eine Resistenz gegen die in der mütterlichen Umgebung vorhandenen Krankheitserreger aufzubauen. Daher wurde bisher davon ausgegangen, dass Immunprägung nur durch das weibliche Geschlecht verwirklicht wird. Doch in dem seltenen Fall der Grasnadel *Syngnathus typhle* ist die Rollenverteilung der Geschlechter vertauscht. Bei dieser besonderen Fischart brüten die Männchen während einer männlichen Schwangerschaft ihre Embryonen in einer Bruttasche und sind über eine plazenta-ähnliche Struktur so eng mit ihnen verbunden, dass mechanistisch eine väterliche Immunprägung möglich wäre. In meiner Doktorarbeit habe ich die Aspekte der biparentalen Immunprägung über zwei Generationen in der Grasnadel *S. typhle* erforscht und ihre evolutionären und ökologischen Folgen, sowie mechanistische Grundlage näher untersucht.

In den ersten beiden Kapiteln untersuchte ich die elterlichen Einflüsse auf die Immunität ihrer direkten Nachkommen hinsichtlich einer Impfung mit zwei verschiedenen hitze-getöteten Bakterien (*Vibrio* spp. und *Tenacibaculum maritimum*). Dazu behandelte ich die erste Filialgeneration (Jungtiere im Alter von eine Woche und vier Monaten) mit denselben Bakterien, denen auch ihre Eltern ausgesetzt wurden und evaluierte die Genexpression von 29 Immungenen und Immunzellaktivitäten. Meine Ergebnisse des ersten Kapitels zeigen ein unterschiedliches Ausmaß an mütterlicher und väterlicher Immunprägung in den Jungtieren. Hierbei hatten Väter einen sehr ausgeprägten und langanhaltenden Einfluss auf die Immunität ihrer Nachkommen. Väterliche Immunprägungseffekte konnten auch noch in vier-Monate alten Jungtieren festgestellt werden und diese wiesen sogar immunologische Spezifität gegen *Vibrio* Bakterien auf. Mütterliche Immunprägungseffekte waren nur in sehr jungen Tieren (eine Woche alt) nachweisbar, die sich im Laufe der Entwicklung verringerten. Dennoch konnte ich keine additiven biparentalen Immunprägungseffekte feststellen, was auf zugrundeliegende komplexe „trade-off“ Effekte zurückzuführen sein könnte. Im zweiten Kapitel analysierte ich detailliert parentale Immunprägungseffekte zu Gunsten von spezifischen Krankheitserregern. Hier zeigte sich, dass spezifisch gegen lokal vorkommende

*Vibrio* Bakterien ein langanhaltender Immunschutz von den Eltern übertragen wurde und somit ein optimaler Schutz gegen prävalente Bakterienarten gewährleistet wurde.

In meinem dritten Kapitel untersuchte ich die Möglichkeit von biparentaler Immunprägung über zwei Generationen. Dazu kreuzte ich unbehandelte F1-Nachkommen miteinander und injizierte F2-Jungtiere mit den identischen hitzegetötete Bakterien, die bereits ihre Großeltern erfahren hatten. Hier fand ich Hinweise darauf, dass beide Großeltern das Immunsystem ihrer Enkel beeinflussen. Die Erhaltung von elterlicher Immunprägung über zwei Generationen in Wirbeltieren könnte die herkömmliche Ansicht, dass dieses Phänomen nur von kurzer Dauer ist, und nach der Reife des Immunsystems verschwindet, in Frage stellen.

Da eine erhöhte Immunantwort für einen Organismus energetisch kostspielig ist, habe ich energetische Kosten bezüglich anderer Fitness relevanter Parameter analysiert. Entsprechend stellte ich eine verzögerte Reifezeit und Reproduktion von erwachsenen F1-Nachkommen fest und konnte zudem eine reduzierte Körpergröße der F2-Jungtiere im Falle einer elterlichen bzw. großelterlichen Bakterienbehandlung verzeichnen. Diese Fitnessnachteile, die auf eine Energieverteilungsbalance zwischen Immunprägung und Reproduktion zurückzuführen sind, zeigten, dass Immunprägung eine kostspielige Strategie darstellt. In meiner Arbeit erörtere ich mögliche Kosten und Nutzen.

Durch die Einbeziehung des Expressionsmusters von Genen, die für epigenetische Regulationsmechanismen verantwortlich sind, wie z.B. DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung fand ich Hinweise darauf, dass die Übertragung von langfristigem Schutz über mehrere Generationen auf epigenetische Mechanismen zurückzuführen sein könnte. Weiterhin ergaben meine Analysen, dass Lektine, Peptidoglycan-Erkennungsproteine, Immunglobuline und Histonacetyltransferasen bei der Vermittlung des väterlichen Immunprägungsprozesses in *S. typhle* wichtig sein könnten.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass die Bedeutung von generationsübergreifender Immunprägung, als eine Form von nicht-genetischer Vererbung, weitreichender sind und lang anhaltendere Folgen haben können, als ursprünglich angenommen wurde. Dies könnte sogar Modelle von Wirt-Parasit-Koevolution beeinflussen. Zudem legt die Involvierung von epigenetischen Effekten nahe, dass Immunprägung vermittelt über die väterliche Linie nicht nur auf die männliche Schwangerschaft der Seenadel beruhen muss, sondern durchaus weiter im Tierreich verbreitet sein könnte als bislang bekannt war.