

Molekulare Charakterisierung von c-Typ- und i-Typ-Lysozymen des  
Asiatischen Marienkäfers *Harmonia axyridis*



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Annika Beckert**

aus Bad Homburg

Gießen, im Juni 2015

1. Gutachter:

**Professor Dr. Andreas Vilcinskas**

Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie

Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und

Umweltmanagement

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter:

**Professor Dr. Thomas Wilke**

Spezielle Zoologie und Biodiversitätsforschung

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

„Das Geheimnis aller Erfinder ist, nichts für unmöglich anzusehen.“

*Justus von Liebig (1803 – 1873)*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Summary.....	1
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Der invasive Marienkäfer: <i>Harmonia axyridis</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Immunabwehr.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Immunabwehr von Insekten.....	5
1.2.2 Immunabwehr von <i>H. axyridis</i> .....	7
<b>1.3 Lysozyme.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 c-Typ-Lysozyme.....	10
1.3.2 i-Typ-Lysozyme .....	12
<b>2 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Der Asiatische Marienkäfer <i>H. axyridis</i> .....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Zucht und Haltung .....	18
3.1.2 Immunstimulation der Käfer.....	18
3.1.3 Entnahme von Hämolymphe .....	18
3.1.4 Organpräparation .....	19
<b>3.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	19
3.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	20
3.2.3 Transformation in <i>E. coli</i> .....	20
3.2.4 Kultivierung von <i>P. pastoris</i> .....	20
3.2.5 Transformation durch Elektroporation von <i>P. pastoris</i> .....	21
<b>3.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Gensynthese der Lysozymkonstrukte .....	22
3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	22
3.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	22
3.3.4 DNA-Gelelektrophorese.....	22

---

3.3.5	Linearisierung und Reinigung von Plasmiden .....	23
3.3.6	Isolierung von RNA aus <i>H. axyridis</i> .....	23
3.3.7	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	23
3.3.8	RNA-Gelelektrophorese.....	23
3.3.9	cDNA-Synthese .....	24
3.3.10	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) .....	24
<b>3.4</b>	<b>Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>25</b>
3.4.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	25
3.4.2	Nachweis von Einschlusskörpern ( <i>inclusion bodies</i> ) .....	26
3.4.3	Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> .....	26
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
3.4.5	Färbungen (Coomassie, Flamingo).....	27
3.4.6	Western-Blot-Analyse (verschiedene Methoden) .....	28
3.4.7	Protein-Sequenzierung (Edman-Abbau) und Massenanalyse (MALDI-tof).....	29
<b>3.5</b>	<b>Proteinreinigung mittels Chromatographie.....</b>	<b>29</b>
3.5.1	Affinitätschromatographie .....	29
3.5.2	Ionenaustausch-Chromatographie .....	30
3.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	31
3.5.4	Aufkonzentration von Proteinlösungen durch Ultrafiltration.....	32
<b>3.6</b>	<b>Immunhistochemische Charakterisierung.....</b>	<b>32</b>
3.6.1	Antikörperproduktion .....	32
3.6.2	Herstellung von Gewebeschnitten .....	32
3.6.3	Immunhistologische Nachweismethoden .....	32
<b>3.7</b>	<b>Biochemische Charakterisierung.....</b>	<b>34</b>
3.7.1	Enzymassay mit Isopeptidasesubstrat .....	34
3.7.2	Gewinnung von Blutegelsekret.....	34
3.7.3	AktivX TAMRA-FP Serine Hydrolase Sonde.....	34
3.7.4	Charakterisierung der Lyse-Aktivität .....	35
3.7.5	Chitin-Bindeaktivität .....	36
<b>3.8</b>	<b>Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivität .....</b>	<b>36</b>
3.8.1	Agardiffusionstest.....	36
3.8.2	Wachstumsinhibitionstest .....	37

---

3.8.3	Kombinationstest.....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung und rekombinante Darstellung von potentiell katalytisch aktiven i-Typ und c-Typ-Lysozymen des Asiatischen Marienkäfers <i>H. axyridis</i> .....</b>	<b>39</b>
4.1.1	Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung aktiver i-Typ-Lysozyme .....	39
4.1.2	Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung aktiver c-Typ-Lysozyme.....	42
4.1.3	Rekombinante Darstellung von Lysozymen in <i>E. coli</i> .....	44
4.1.4	Rekombinante Darstellung von i-Typ- und c-Typ-Lysozymen in <i>P. pastoris</i> .....	46
<b>4.2</b>	<b>Biochemische Charakterisierung des i-Lys2, c-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 .....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Untersuchung der Muramidase-Aktivität .....	55
4.2.2	pH-Abhängigkeit der Muramidase-Aktivität .....	56
4.2.3	Calciumabhängigkeit der Muramidase-Aktivität .....	57
4.2.4	Chitin-Bindefähigkeit .....	58
4.2.5	Charakterisierung der Isopeptidase-Aktivität des i-Lys2 und Einfluss des rekombinanten Proteins auf die Blutgerinnung .....	59
<b>4.3</b>	<b>Expressionsanalyse des i-Lys2 auf RNA- und Proteinebene .....</b>	<b>61</b>
4.3.1	Vergleich der Effektivität und Spezifität der verwendeten Antiseren .....	61
4.3.2	Lokalisation des i-Lys2 Proteins in Gewebepreparaten .....	62
4.3.3	Untersuchung der gewebespezifischen Expression des i-Lys2 auf RNA-Ebene .....	64
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung der Lysozyme im Rahmen einer Immunantwort von <i>H. axyridis</i> und antimikrobielles Spektrum der rekombinanten Lysozyme .....</b>	<b>64</b>
4.4.1	Untersuchung der Muramidase-Aktivität in Hämolymphe und Darmisolaten nach Immunstimulation.....	65
4.4.2	Untersuchung der immuninduzierten Expression von i-Typ und c-Typ-Lysozymen .....	66
4.4.3	Antimikrobielles Spektrum der i-Typ- und c-Typ-Lysozyme .....	67
4.4.4	Antimikrobielle Effekte von c-Lys3 und c-Lys4 in Kombination mit den Hämolymphe-Komponenten Harmonin und Coleoptericin .....	68
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der c-Typ-Lysozymen von <i>H. axyridis</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung der i-Typ-Lysozyme von <i>H. axyridis</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>5.3</b>	<b>Antimikrobielles Spektrum der Lysozyme von <i>H. axyridis</i> .....</b>	<b>77</b>

---

<b>5.4</b>	<b>Multiple Funktionalität der c-Typ-Lysozyme von <i>H. axyridis</i></b> .....	<b>80</b>
5.4.1	Lysozyme in der Hämolymphe.....	80
5.4.2	Lysozyme im Verdauungstrakt.....	83
5.4.3	Lysozyme unterstützten das zweilagige Immunsystem.....	84
<b>5.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>87</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>		<b>88</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>		<b>97</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>		<b>101</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>		<b>103</b>
<b>A.</b>	<b>Anhang: Material .....</b>	<b>104</b>
A.1.	Chemikalien und Reagenzien .....	104
A.2.	Verbrauchsmaterialien .....	106
A.3.	Geräte .....	107
A.4.	Antikörper.....	108
A.5.	Weitere Enzyme und Proteine .....	108
A.6.	Standards und Kits.....	109
A.7.	Bakterienstämme und Hefestämme .....	109
A.8.	Plasmide/Vektoren .....	109
A.9.	Oligonukleotide.....	110
A.10.	Kulturmedien.....	110
A.11.	Puffer Lösungen und Medien .....	111
A.12.	Proteinsequenzen der <i>H. axyridis</i> Lysozyme.....	112
<b>Lebenslauf.....</b>		<b>113</b>
<b>Danksagung.....</b>		<b>115</b>
<b>Erklärung.....</b>		<b>116</b>

## Summary

The invasive ladybird beetle *Harmonia axyridis* was introduced as a biological control agent into agricultural systems and spread uncontrolled into new areas. One reason for its successful invasion is his two-layered immune system. The first layer features the constitutive production of the low-molecular-mass antimicrobial compound harmonine and the second layer is the inducible production of a broad range of antimicrobial peptides (AMPs). This protects him effectively against pervasive pathogens. Belonging to the AMP genes five c-type lysozymes and four i-type lysozymes were identified in *H. axyridis*. Prototypical i-type lysozymes from Annelida and Mollusca are chimeric bifunctional enzymes with both muramidase and isopeptidase activity in contrast to the other lysozyme types which display only muramidase activity. Insect c-type lysozymes are known to exhibit muramidase activity, whereas i-type lysozymes from insects have not been analyzed on protein level thus far. This study focused on three out of four c-type lysozymes, namely c-lys2, c-lys3 and c-lys4, and on one i-type lysozyme, namely i-lys2, which possess or lack the conserved amino acids residues responsible for muramidase or isopeptidase activity of the enzymes. The c-type lysozymes as well as the i-type lysozyme were modified with a c-terminal his<sub>6</sub>-tag and heterologously expressed by the yeast *P. pastoris*.

For the c-type lysozymes two were supposed to have a muramidase activity, c-lys3 and c-lys4, while two missing the important amino acid residues Glu and Ala. C-lys2 lacking the conserved Glu and Ala residues displayed no muramidase activity at all. C-lys3 and c-lys4 differ substantially in their theoretical isoelectric points (pI = 5.46 and pI = 8.18), however both pH optima of the purified enzymes were in the slightly acidic pH range. Further we could demonstrate that activity of both lysozymes were Ca<sup>2+</sup> dependent in line with the presence of a conserved Asp-rich domain in their sequence. This sequence is known to play a role in calcium binding but has not been shown for lysozymes so far. The recombinant i-type lysozyme was inactive in both muramidase and isopeptidase assays. Immunofluorescence and expression analysis revealed that the i-type lysozyme is produced in the fat body of *H. axyridis*. These data suggest that i-type lysozymes in insects have acquired novel not-yet-identified functions in the course of evolution.

Immune stimulation of the beetles induced an 8-fold up-regulation of c-lys4 gene expression in the gut, whereas the c-lys3 and i-lys2 genes were expressed at comparable levels in both naïve and immune stimulated beetles. No antimicrobial activity could be shown either for c-lys3, c-lys4 nor for i-lys2, but in a *Bacillus subtilis* growth inhibition assay the antimicrobial activity of harmonine and two

highly-inducible *H. axyridis* AMPs (coleopterins) was potentiated in the presence of c-lys4, resulting in 4-fold (harmonine) and up to a 16-fold (AMP) lower minimum inhibitory concentrations.

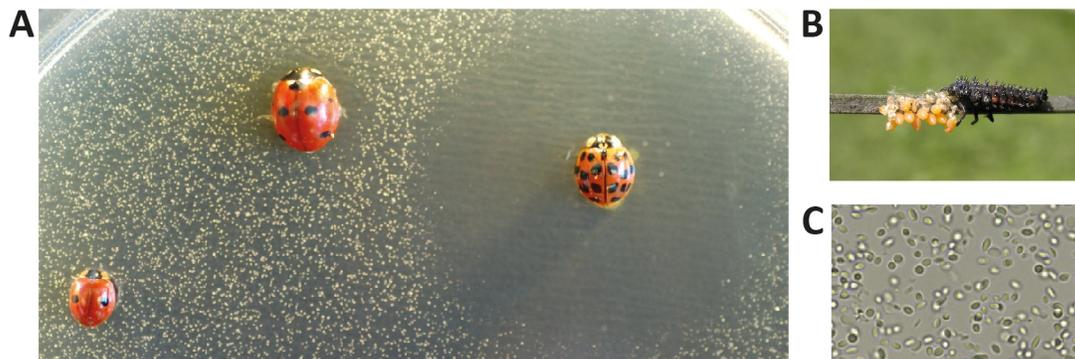
Our results suggest that at least one catalytically active lysozyme is part of the highly efficient immune system of *H. axyridis* and is considered to represent an adaptation enhancing the evolutionary success of this species.

## 1 Einleitung

### 1.1 Der invasive Marienkäfer: *Harmonia axyridis*

Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* (PALLAS, 1773) ist durch seine weltweiten Einwanderungserfolge in den letzten Jahren als Model-Organismus der Invasionsbiologie hervorgetreten (Roy & Wajnberg, 2008). Der ursprünglich in Ostasien beheimatete Marienkäfer wurde als höchst wirksamer Prädator von Blatt- und Schildläusen erstmals 1916 zur biologischen Schädlingsbekämpfung in Nordamerika eingeführt. Jahrzehntlang erfolgte sein kontrollierter Einsatz zur Blattlausbekämpfung auf dem europäischen und nordamerikanischen Kontinent, bevor seine unkontrollierte flächendeckende Expansion begann (Brown et al., 2011; Koch, 2003b; Lucas et al., 2007; Tedders & Schaefer, 1994). Heutzutage hat *H. axyridis* sich über die eingeführten Gebiete hinaus bis nach Südamerika und Afrika ausgebreitet und zählt z.B. auch seit kurzem zu den häufigsten Marienkäferarten Deutschlands (Lucas et al., 2007). Einhergehend mit seiner erfolgreichen Ausbreitung ist der Rückgang der heimischen Marienkäferarten *Adalia bipunctata* und *Coccinella septempunctata* (Koch & Galvan, 2008; Van Lenteren et al., 2003). Eine häufig diskutierte Ursache für den Rückgang ist nicht nur der direkte Konkurrenzkampf von heimischen Marienkäferarten und *H. axyridis* um die Ressource Blattlaus, sondern vor allem das Töten und Fressen von potentiellen Konkurrenten bezeichnet als *Intraguild Predation* (IGP) (Arim & Marquet, 2004). IGP kommt in vielen Taxa wie Säugetieren, Fischen und Invertebraten vor und beeinflusst in aphidophagen Systemen nachweislich Populationsstruktur und Dynamik (Alhmedi et al., 2010; Polis & Holt, 1992; Polis et al., 1989). Ein Grund für IGP bei *H. axyridis* ist der synchronisierte Lebens- und Entwicklungszyklus von heimischen Marienkäferarten und Blattläusen, bei denen Eiablage und Larvenentwicklung der Marienkäfer simultan zum Blattlauspopulationspeak abläuft. Der zu einem späteren Zeitpunkt stattfindende Entwicklungszyklus von *H. axyridis* fällt dagegen in eine Blattlaus arme Phase (Jansen & Hautier, 2008). Deshalb ist der polyphage Käfer bei der Nahrungssuche auf Kannibalismus und somit das Jagen von Larven und Eiern anderer Blattlausräuber angewiesen. Nicht nur seine Größe und Aggressivität machen ihn zu einem erfolgreichen *Intraguild Predator*, sondern auch sein inhärenter Schutz vor IGP, wie kürzlich veröffentlichte Daten zeigen (Gardiner et al., 2011; Raak-van den Berg et al., 2012; Ware & Majerus, 2008). *H. axyridis* trägt zahlreiche Sporen von obligaten Mikrosporidien in sich, die eine letale Wirkung auf die heimische Art *C. septempunctata* besitzen. Vilcinskas et al. (2013b) vermuten, dass die IGP von *C. septempunctata* eine Infektion und den endgültigen Tod der heimischen Art verursacht, wenn diese an Mikrosporidien-infizierten *H. axyridis* Eiern oder Larven fressen. *H. axyridis* schadet dagegen das Fressen an mit Mikrosporidien-infizierten Tieren nicht.

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft, die *H. axyridis* ermöglicht, Konkurrenten zu verdrängen und neue Habitate zu besiedeln, liegt in seiner im Vergleich zu den heimischen Arten stark ausgeprägten Immunabwehr. Diese bietet nicht nur Schutz vor Mikrosporidien sondern auch vor zahlreichen Bakterien und Pilzen (Roy & Wajnberg, 2008; Vilcinskas et al., 2014). *H. axyridis* besitzt eine um tausendfach höhere antimikrobielle Aktivität der Hämolymphe als *C. septempunctata*, wie Vilcinskas et al. (2013b) zeigen konnten. Sie sind die ersten Käfer, bei denen eine konstitutive antifungale Aktivität der Hämolymphe nachgewiesen wurde und werden seltener als *C. septempunctata* und *A. bipunctata* von dem entomopathogenen Pilz *Beauveria bassiana* befallen (Roy et al., 2008). Die aufgeführten Adaptionsmechanismen steigern die Fitness von *H. axyridis* und tragen wesentlich zu ihrem Invasionserfolg bei, der die Biodiversität durch Konkurrenzdruck und IGP ins Schwanken bringt.



**Abbildung 1: Immunabwehr und IGP von *H. axyridis*.** Vergleich der antimikrobiellen Hämolympheaktivität von *A. bipunctata* (links), *C. septempunctata* (mitte) und *H. axyridis* (rechts) gegen *M. luteus* (A). *H. axyridis* und IGP an Eiern von *C. septempunctata* (B). Lichtmikroskopische Abbildungen von Mikrosporidien in der *H. axyridis* Hämolymphe (C).

Invasive Arten verursachen nicht selten ökologische und auch ökonomische Effekte. Ein hervorzuhebendes Beispiel für die Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch Neozoen ist die Wasserversorgungssysteme besiedelnde Zebrauschel in Nordamerika, deren Beseitigungskosten mehrere Millionen Dollar betragen (Vitousek et al., 1997). Ob unabsichtlich durch den weltweiten Güterverkehr eingeschleppt oder gezielt zur Schädlingsbekämpfung ausgesetzt, führt der Einfluss invasiver Arten zu Konsequenzen. Indem sie nicht nur Funktion und Biodiversität der Ökosysteme beeinflussen, sondern auch das Wohl der Menschen bedrohen und sich auf Land- und Forstwirtschaft negativ auswirken, gewinnt das Verständnis um den Erfolg invasiver Arten stetig an Bedeutung (Pejchar & Mooney, 2009). Deshalb ist ein wichtiger Schritt die Untersuchung der Invasionsmechanismen anhand von Model-Organismen, um Prognosen über zukünftige Invasionen

stellen zu können, die Handhabung und den Umgang mit Invasionssituationen zu verbessern und die daraus resultierenden Konsequenzen zu vermindern (Alhmedi et al., 2010; Roy & Wajnberg, 2008).

## 1.2 Immunabwehr

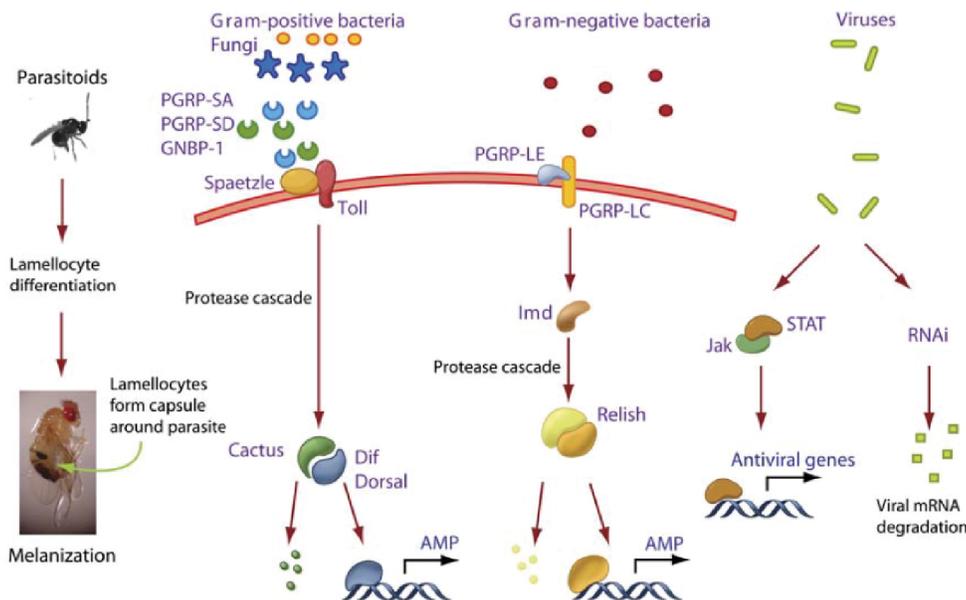
### 1.2.1 Immunabwehr von Insekten

Die Klasse der Insekten zählt zu den erfolgreichsten im Tierreich, da sie sich im Zuge der Evolution an extreme Lebensbedingungen und außergewöhnliche Lebensräume adaptiert haben. Während einige Insektenarten verwesende Kadaver und offene Wunden besiedeln oder sauerstoffarme Jauchegruben bewohnen, werden sie mit einem breiten Spektrum an Bakterien und Pilzen konfrontiert (Altincicek & Vilcinskas, 2007; Altincicek & Vilcinskas, 2009; Cherix et al., 2012). Diese Arten sind bedingt durch ihr Leben in Mikroorganismen reichen Habitaten kontinuierlich einem hohen Infektionsrisiko ausgesetzt, das effiziente Schutzmechanismen erfordert. Ein Großteil der Insekten verfügt daher über ein sehr effektives, wenn auch nicht spezifisches Immunsystem zum Schutz vor pathogenen Organismen (Vilcinskas & Götz, 1999).

Neben einem chitinhaltigen Exoskelett als widerstandsfähige physikalische Barriere unterteilt sich die angeborene Immunabwehr der Insekten in zelluläre und humorale Komponenten (Uvell & Engström, 2007). Nach einer Pathogeninfektion wird die zelluläre Abwehr durch in der Hämolymphe frei zirkulierende Hämozyten, den „Blutzellen“ der Insekten, eingeleitet (Meister & Lagueux, 2003). Diese erkennen über spezifische Rezeptoren konservierte Pathogenstrukturen und veranlassen die Phagozytose der eingedrungenen Erreger. Liegt eine große Ansammlung an zu bekämpfenden Bakterien oder Pilzen vor, können die Hämozyten die Pathogene nicht hinreichend phagozytieren. Es folgt das Verklumpen der Erreger mit zahlreichen Hämolympheproteinen, Hämolymphe sezernierten Proteinen und Hämozyten selbst. Diese als Knötchen bezeichneten Strukturen werden im weiteren Verlauf melanisiert und abgebaut (Gillespie et al., 1997). Bei größeren Erregern wie beispielsweise Nematoden oder Schlupfwespeniern erfolgt eine Einkapselung durch mehrschichtige Hämozyten-Aggregationen und die Erreger werden im Rahmen einer respiratorischen Entladung der Zellen durch toxische Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abgetötet (Gillespie et al., 1997; Hoffmann, 1995).

Zu den Effektoren der humoralen Immunantwort zählen, abgesehen von den bereits erwähnten NO und ROS, Zytokine, Benzoquinone, kleine Moleküle, komplement-ähnliche Peptide und Peptide oder kleine Proteine mit antimikrobieller Wirkung (AMPs) (Altincicek et al., 2008). Diese AMPs bieten eine

schnelle und effektive Abwehr gegenüber invasiven Mikroorganismen und sind neben den zellulär vermittelten Mechanismen die wichtigsten Komponenten der Insektenimmunität. Sie bestehen typischerweise aus 12-50 Aminosäuren und unterscheiden sich sowohl in ihren Aktivitätsspektren als auch in ihren Wirkmechanismen (Wiesner & Vilcinskas, 2010). Der aus mehreren Schichten bestehende, im Thorax- und Abdomensegment lokalisierte Fettkörper ist in holometabolen Insekten Hauptsyntheseort von AMPs und das Äquivalent zur menschlichen Leber. Von dort aus werden die AMPs in die Hämolymphe sekretiert und über das gesamte Tier verteilt, um Eindringlinge wie Viren, Pilze und Bakterien abzutöten. Zusätzlich zum Fettkörper können auch Hämocyten und verschiedene Epithelzellen AMPs synthetisieren (Dimopoulos, 2003; Hao et al., 2003). Bei den meisten AMPs wird die Expression etwa 30 min nach einer vorausgegangenen Infektion induziert und kann zu AMP Konzentrationen von bis zu 0,5 mM in der Hämolymphe führen, ohne sich toxisch auf den Wirtsorganismus auszuwirken (Bulet & Stocklin, 2005; Hetru et al., 2003). Neben den induzierbaren AMPs werden auch einige AMPs konstitutiv exprimiert (Lehrer & Ganz, 1999).



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung vier verschiedener Immunantwortmechanismen in Insekten am Beispiel von *Drosophila melanogaster*.** Schlupfwespenlarven werden durch Einkapselung und Melanisierung bekämpft (links). Grampositive Bakterien und Pilze lösen den Toll-Signaltransduktionsweg aus (Mitte links). Gramnegative Bakterien leiten den Imd-Signaltransduktionsweg ein (Mitte rechts) und Viren induzieren antivirale Gene über den Jak-STAT Signaltransduktionsweg (rechts) (Bangham et al., 2006).

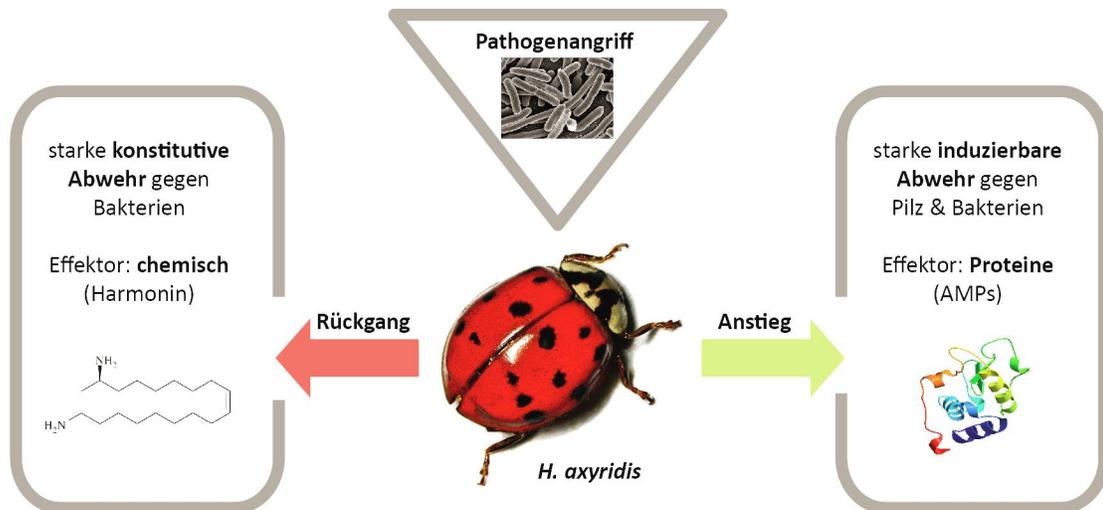
Die Einleitung der zellulären und humoralen Abwehrmechanismen erfolgt über die Bindung von Erkennungsrezeptoren an mit Eindringlingen assoziierten Molekülen (wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und Glykane). Die zu den Erkennungsrezeptoren zählenden Peptidoglykan-

erkennenden Proteine (*peptidoglycan recognition proteins*, PGRPs) spielen bei der Erkennung grampositiver Bakterien eine wichtige Rolle und initiieren die Toll-Signaltransduktionskaskade während durch gramnegative Bakterien der Imd-Signaltransduktionsweg ausgelöst wird (Müller et al., 2008). Beide Signaltransduktionskaskaden induzieren die Expression von AMPs (Bangham et al., 2006).

### 1.2.2 Immunabwehr von *H. axyridis*

Der Invasionserfolg und die diskutierte Verdrängung heimischer Arten durch *H. axyridis* ist unter anderem ihrer ausgeprägten Immunabwehr zuzuschreiben, die einen herausragenden Schutz gegen Pathogene und IGP bietet. An der oben aufgeführten antimikrobiellen Aktivität der *Harmonia*-Hämolymphe ist der Sekundärmetabolit Harmonin beteiligt, der in großen Mengen in der Hämolymphe vorliegt (Schmidtberg et al., 2013; Vilcinskas et al., 2013b). Dagegen ist Harmonin nicht in der Hämolymphe von *A. bipunctata* und nur in geringen Konzentrationen in Hämolymphe von *C. septempunctata* nachweisbar (Röhrich et al., 2012). Das breite antimikrobielle Spektrum dieses alkaloiden Stoffes zeigte sich in seiner Eigenschaft sogar das Wachstum von Humanpathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose, und *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria, inhibieren zu können (Röhrich et al., 2012). Da Harmonin keine antifungale Aktivität gegen beispielsweise den entomopathogenen Pilz *B. bassiana* zeigte, obwohl *H. axyridis* eine hohe Resistenz gegen Pilz und auch Nematoden aufweist, war davon auszugehen, dass weitere Komponenten des Immunsystems diese Aufgabe bei *H. axyridis* übernehmen müssen (Koch, 2003a; Roy & Wajnberg, 2008; Shapiro-Ilan & Cottrell, 2005). Deshalb erfolgte die Untersuchung des Spektrums der induzierbaren AMPs durch den Vergleich von unbehandelten *H. axyridis*-Tieren und Tieren, in denen eine Immunstimulation durch Injektion von Bakterien oder Pilze hervorgerufen wurde (Vilcinskas et al., 2013a). Dabei wurden anhand der Sequenzierung des Transkriptoms von *H. axyridis* mehr als 50 AMPs identifiziert, die durch eine Immunstimulation mit grampositiven und gramnegativen Bakterien induziert wurden. Dies stellt die bisher größte gefundene Anzahl an AMPs in einem multizellulären Organismus dar und ist eine mögliche Erklärung für die starke Immunantwort. Mit Genen für 10 Attacine, 15 Coleoptericine, 4 Coleoptericin-ähnliche Peptide, 19 Defensine und 4 Thaumatine wurde ein breites Spektrum an AMPs nachgewiesen (Vilcinskas et al., 2013a). Zusätzlich existieren 9 für Lysozyme kodierende Sequenzen, wovon 4 der Subklasse der c-*(chicken)*-Typ-Lysozyme und 5 der i-*(invertebrate)*-Typ-Lysozyme zuzuordnen sind. Nach Immunstimulation durch Injektion von Bakterien in *H. axyridis* wurde nicht nur die Hochregulation zahlreicher AMPs beobachtet, sondern auch die Abnahme der Harmoninkonzentration. Daraus wurde in zwei kürzlich veröffentlichten Studien geschlossen, dass *H. axyridis* ein zweilagiges Immunsystem besitzt, welches aus der konstitutiv

synthetisierten nieder-molekularen antimikrobiellen Substanz Harmonin und induzierbaren antimikrobiellen Peptiden besteht (Röhrich et al., 2012; Schmidtberg et al., 2013). Der Wechsel von konstitutiver chemischer Verteidigung auf induzierbare angeborene Immunantwort unterstützt die These, dass der Käfer sich so auch vor Pathogenen schützen kann, die die starken konstitutiven Verteidigungsmechanismen überleben oder Resistenzen ausgebildet haben. Die Fitness relevanten Kosten einer simultanen Harmonin und AMP Produktion werden durch den Wechsel reduziert und unterstützen *H. axyridis* bei der Adaption an neue habitatspezifische Pathogene.

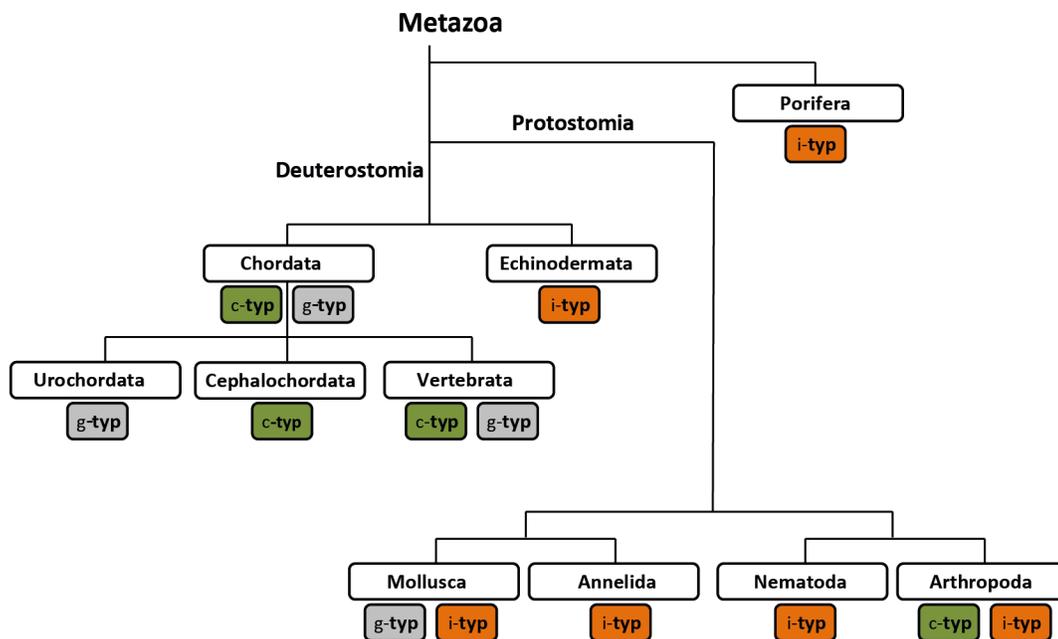


**Abbildung 3: Das zweilagige Immunabwehrsystem von *H. axyridis*.** Das angeborene Immunsystem von *H. axyridis* basiert auf einer konstitutiven Expression des chemischen, antibakteriellen Abwehrmoleküls Harmonin und einer durch Pathogene induzierbaren Abwehr, die aus zahlreichen unterschiedlichen AMPs mit Aktivität gegen Pilze und Bakterien besteht (modifiziert nach Vilcinskas et al. (2013a)).

### 1.3 Lysozyme

Eine wichtige Klasse der antimikrobiellen Peptide sind die zu den hydrolytische Enzymen zählenden Lysozyme. Diese werden durch ihre Fähigkeit charakterisiert  $\beta$ -(1,4)-glykosidische Bindungen in der Zellwand von Bakterien zu spalten (Callewaert & Michiels, 2010). Die zufällige Entdeckung dieser Fähigkeit gelang dem an einer Erkältung erkrankten Bakteriologen Alexander Fleming vor über 90 Jahren, als ihm Nasenflüssigkeit auf eine mit Bakterien bewachsene Agarplatte tropfte. Dabei zeigte sich, dass eine im nasalen Mucus enthaltene Substanz grampositive Bakterien der Art *Micrococcus luteus* auflösen konnte, die aufgrund ihrer lysierenden Eigenschaft von Alexander Fleming „Lysozym“ benannt wurde (Fleming, 1922). Innerhalb der nächsten 80 Jahre entwickelte sich das Lysozym zu einem Model-System der Proteinbiochemie und spielt bis heute in Enzymologie, Kristallographie und

Molekularbiologie eine bedeutsame Rolle. Im Tierreich existieren zum jetzigen Zeitpunkt mindestens vier bekannte Lysozym-Typen: die c-Typ-Lysozyme („chicken“ oder „conventional“-Typ), die g-Typ-Lysozyme („goose“-Typ), i-Typ-Lysozyme („invertebrate“-Typ) und die kürzlich entdeckten ch-Typ-Lysozyme („chalaropsis“-Typ) (Callewaert & Michiels, 2010; Van Herreweghe & Michiels, 2012). Nicht nur zwischen den einzelnen Lysozym-Typen sondern auch innerhalb der einzelnen Typen bestehen Sequenz-, Expressions- und auch Funktionsunterschiede, sodass vermutlich Genduplikation, Genverlust und Sequenzdivergenz zu einer funktionalen Diversität der Lysozyme führten (Irwin, 2014; Schulenburg & Bochnisch, 2008). Aus diesem Grund ist das Auftreten von mehreren Lysozymen eines Typs innerhalb eines Organismus nicht verwunderlich. In der Fruchtfliege *Drosophila* wurden beispielweise 13 c-Typ-Lysozyme gefunden, von denen sich mindesten 8 in der Stadien- und Gewebespezifischen Expression unterschieden (Hultmark, 1996). Auch in dem zu den Arthropoden zählenden Asiatischen Marienkäfer *H. axyridis* liegen Gensequenzen von vier c-Typ-Lysozymen und fünf i-Typ Lysozymen vor.



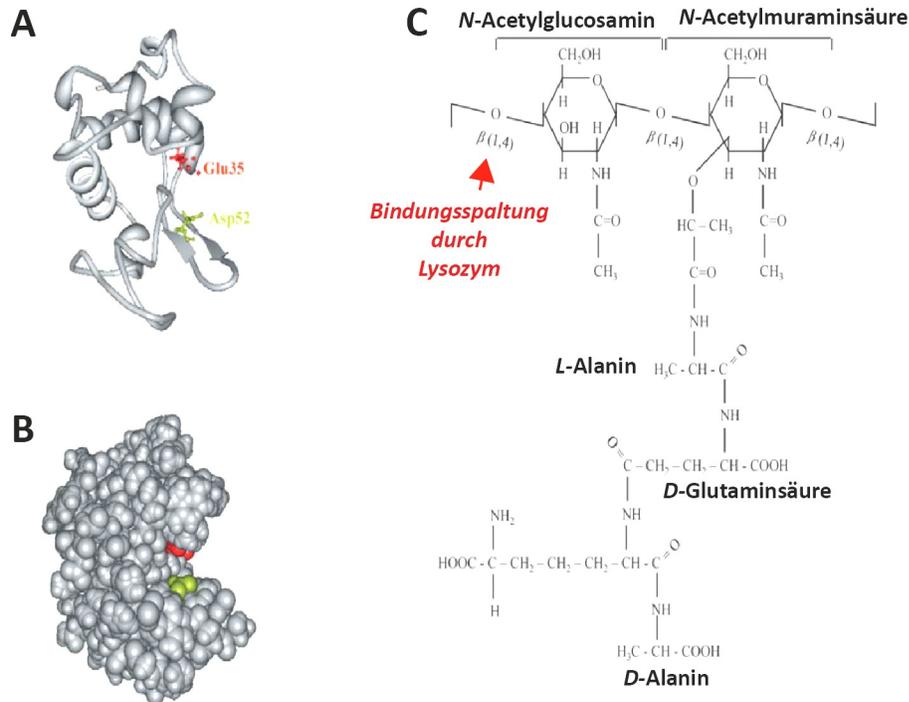
**Abbildung 4: Verbreitung der verschiedenen Lysozym-Typen im Tierreich.** Dargestellt ist eine vereinfachte Kladogrammstruktur in der nur Zweige abgebildet wurden, bei denen Lysozyme anhand von DNA-Sequenzanalyse oder durch Funktionsstudien in Spezies nachgewiesen wurden (Callewaert & Michiels, 2010).

### 1.3.1 c-Typ-Lysozyme

Der Lysozym Archetypus ist das den c-Typ-Lysozymen zugeordnete *hen egg white lysozyme* (HEWL), welches aus Hühnerweiß isoliert werden kann (Laschtschenko, 1909). Seine typische Enzymeigenschaft ist die Hydrolyse der  $\beta$ -(1,4)-glykosidischen Verbindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosaminresten (NAG) in der Peptidoglykanschicht von Bakterien (Abbildung 5C). Die auch als Mureinhülle bezeichnete bei grampositiven Bakterien mehrschichtige Peptidoglykanschicht schützt den Bakterienprotoplast gegen den osmotischen Zellinnendruck. Die Lyse der Mureinschicht durch beispielsweise Lysozyme führt daher zum Platzen des Protoplasten und anschließenden Lyse des Bakteriums. Der einschichtigen Mureinhülle von gramnegativen Bakterien ist dagegen eine lipopolysaccharidhaltige äußere Membran aufgelagert, die sie für Lysozyme schwerer zugänglich macht (Yu et al., 2002a). Unter spezifischen Bedingungen, wie Porenbildung durch AMPs oder bestimmten pH-Werten können Lysozyme auch gramnegative Bakterien lysieren und zählen aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften im Tierreich zu einer sehr wichtigen, hoch konservierten Enzymgruppe der angeborenen Immunabwehr (Wiesner & Vilcinskas, 2010). Alle vollständig vorhandenen Genomsequenzen von Säugetieren enthalten mindestens ein Gen für c-Typ-Lysozyme und auch in anderen Vertebraten wie Vögeln, Fischen, Reptilien und Amphibien liegen c-Typ-Lysozymgene vor. In verschiedenen Klassen der Arthropoden wie Lepidopteren (Schmetterlinge), Dipteren (Zweiflügler) und Coleopteren (Käfer) sowie in Arachniden (Spinnentieren) und Crustaceen (Krebstieren) sind c-Typ-Lysozyme vorhanden, und in allen bisher vollständig sequenzierten Insektengenomen konnte zumindest ein Gen gefunden werden, das homolog zu c-Typ Lysozymen ist (Callewaert & Michiels, 2010).

C-Typ-Lysozyme besitzen eine N-terminale Signalsequenz zur Sekretion in den Extrazellularraum und sind durchschnittlich 11-15 kDa groß. Ihr isoelektrischer Punkt (pI) ist variabel, doch bei den meisten Vertretern der c-Typ-Lysozyme liegt er im basischen Bereich. Die erste Kristallstruktur von HEWL, mittels Röntgenbeugung, wurde 1965 von Philipps analysiert (Blake et al., 1967; Phillips, 1967). Sie zeigte, dass intramolekulare Disulfidbrücken wichtig für die Struktur, Stabilität und enzymatische Aktivität der Lysozyme sind. Nicht nur HEWL sondern auch die bisher bekannten c-Typ-Lysozyme besitzen eine ähnliche Anzahl an konservierten Cysteinen (Cys), die an der Disulfidbrückenbildung beteiligt sind. HEWL wird aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und  $\alpha$ -Helices-Domäne gebildet, in deren Mitte sich eine tiefe Spalte mit dem aktiven Zentrum befindet (Abbildung 5). Im aktiven Zentrum sind zwei Aminosäuren essentiell für die katalytische als Muramidase-Aktivität bezeichnete Hydrolyseaktivität: Glutaminsäure an Position 35 (Glu35) und Asparaginsäure an Position 52 (Asp52)

(Abbildung 5A&B). Beide Aminosäurereste sind über die c-Typ-Lysozyme stark konserviert, und Austausch oder Deletion von nur einer der beiden Aminosäuren führt zum Verlust der Muramidase-Aktivität (Irwin, 2004; Jain et al., 2001; Malcolm et al., 1989).



**Abbildung 5: c-Typ-Lysozymstruktur und Enzymmechanismus (Callewaert & Michiels, 2010)**

In einigen Organismen existieren Lysozyme ohne Muramidase-Aktivität, die an den unterschiedlichsten biologischen Prozessen beteiligt sind. Zum Beispiel ist das nicht-bakteriolytische c-Typ-Lysozym-ähnliche Protein SLLP1 in der akrosomalen Matrix des humanen Spermienkopfes lokalisiert und spielt möglicherweise bei der Spermium-Eizellenbindung eine bedeutsame Rolle (Mandal et al., 2003). Alpha-Laktalbumin, welches phylogenetisch den c-Typ-Lysozymen zugeordnet wird, reguliert die Laktosesynthese (Irwin et al., 2011). Aus partial ungefalteten alpha-Laktalbuminen oder equinen Milchlysozymen gebildete Komplexe können zusammen mit Ölsäure durch ihre zytotoxischen Aktivitäten an der Vorbeugung einer Krebsentstehung beteiligt sein (Ho et al., 2013; Nielsen et al., 2010). Weiterhin konnten für c-Typ-Lysozyme antibakterielle Aktivitäten auch ohne das Vorhandensein einer Muramidase-Aktivität aufgrund von internalen Peptiden gezeigt werden, die durch AMP-ähnliche Mechanismen die Zellwand von Bakterien instabilisieren können (Ibrahim et al., 2001; Masschalck & Michiels, 2003)

Neben ihrer Funktion in der Immunabwehr haben sich Lysozyme im Vorderdarm von Wiederkäuern, Blatt fressenden Schlank- und Stummelaffen und Schopfhühnern, als Verdauungsenzyme mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften entwickelt. Dort ermöglichen sie durch die Lyse von Symbionten die Verwertung von durch Symbionten assimilierte Nährstoffe (Kornegay et al., 1994; Stewart et al., 1987). Funktional ähnliche c-Typ-Lysozyme in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Hausfliege *Musca domestica* helfen bei der Verdauung von mit verwesenden Material aufgenommenen Bakterien (Cancado et al., 2008; Daffre et al., 1994; Lemos & Terra, 1991; Regel et al., 1998).

C-Typ-Lysozyme wurden aus der Insektenhämolymphe verschiedenster Arten wie *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli* und *Hyalophora cecropia* isoliert und zeigten antibakterielle Aktivitäten gegen grampositive Bakterien (Mohrig & Messner, 1968; Powning & Davidson, 1976). Für einige Insektenlysozyme konnten auch wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber gramnegative Bakterien nachgewiesen werden (Yu et al., 2002b), und ein aus der *G. mellonella* Hämolymphe gereinigtes c-Typ-Lysozym inhibierte *in vitro* das Wachstum der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und wies damit eine ähnliche antimykotische Wirksamkeit wie HEWL und humanem Lysozym (hLYZ) auf (Vilcinskas & Matha, 1997). Im Allgemeinen ist die Insektenlysozymexpression durch eine Immunstimulation mit pathogenen Organismen induzierbar, aber auch konstitutiv exprimierte Lysozyme liegen in einigen Arten vor (Araújo et al., 2006; Dong et al., 2009). Es wird diskutiert, dass die letztgenannten an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind, indem sie durch die Lyse der Bakterienzellwand resultierend in der Freisetzung von Peptidoglykanfragmenten die AMP-Expression induzieren oder die zur Melanisierung führende Phenoloxidasekaskade aktivieren können (Dunn et al., 1994; Kim et al., 2008). Durch die Expression des oben erwähnten AMP-Cocktails wird ein Zusammenspiel der AMPs beispielsweise in Kombination mit Lysozymen zur Steigerung der Abwehr gegen Mikroorganismen vermutet (Boman, 1998). Zdybicka-Barabas et al. (2013) konnten zeigen, dass die Aktivität der Muramidase von *G. mellonella* durch die Anwesenheit des AMPs Apolipophorin III verstärkt werden konnte. In Insekten nehmen die c-Typ-Lysozyme durch ihre duale Rolle als Modulatoren der Immunabwehr und Verdauungsenzyme einen hohen Stellenwert ein, deren Beteiligung an verschiedensten Prozessen im Organismus noch nicht abschließend geklärt werden konnte (Ursic Bedoya et al., 2005).

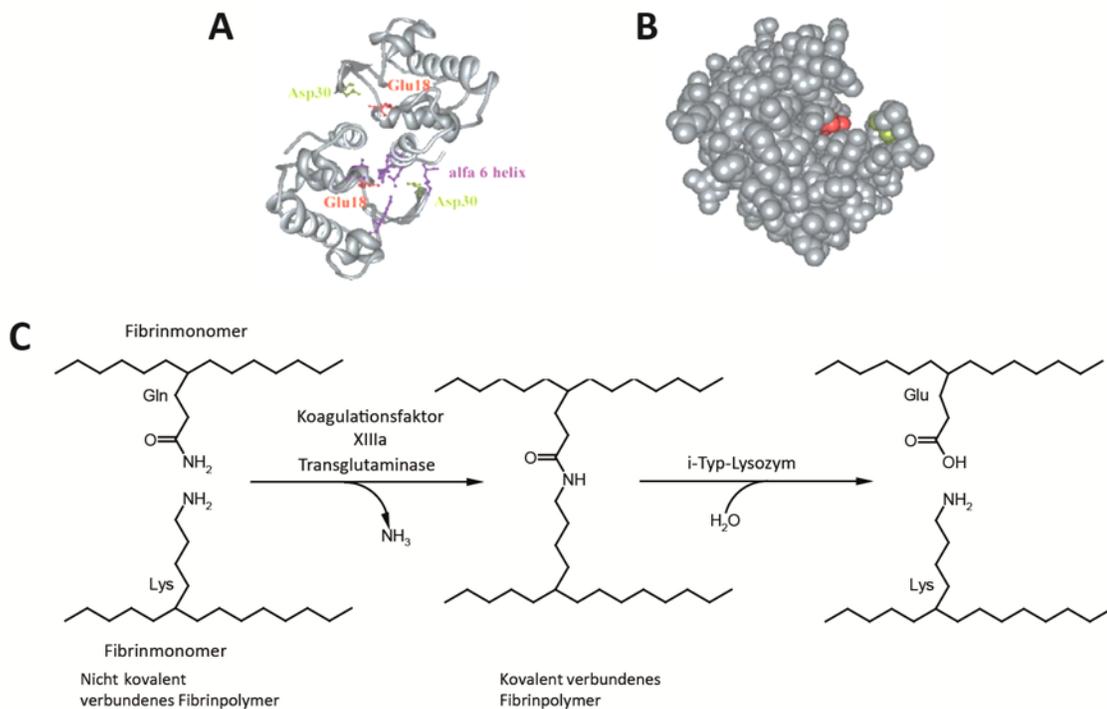
### 1.3.2 i-Typ-Lysozyme

Mit dem heutigen Wissenstand ist das Vorkommen der i-Typ-Lysozyme auf die Invertebraten begrenzt, während Homologe der c-Typ- und g-Typ-Lysozyme sowohl in Vertebraten als auch

Invertebraten identifiziert werden konnten (Bathige et al., 2013). Der Prototyp eines Invertebratenlysozyms wurde erstmals aus dem Seestern *Asterias rubens* (Echinodermata) vor über 30 Jahren isoliert (Jollès & Jollès, 1975), aber erst 20 Jahre später ist die vollständige Aminosäuresequenz eines i-Typ-Lysozyms aus der zu den Venusmuscheln gehörenden Art *Tapes japonica* entschlüsselt worden (Ito et al., 1999). In den folgenden Jahren wurden zahlreiche i-Typ-Lysozymvarianten aus den Phyla Annelida (Josková et al., 2009), Nematoda (Mallo et al., 2002), Arthropoda (Paskewitz et al., 2008), Echinodermata (Cong et al., 2009) und Molluska (Matsumoto et al., 2007) untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass i-Typ-Lysozyme zusätzlich zu der aus c-Typ-Lysozymen bekannten Muramidase-Aktivität eine weitere enzymatische Aktivität aufweisen können, welche zum Beispiel die Spaltung von Isopeptidbindungen zwischen Glutaminsäure und Lysin in Fibrinpolymeren katalysieren können (Abbildung 6C). Diese Enzymaktivität wurde erstmals in Sekreten des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* beschrieben und wird als Destabilase bezeichnet. Im Blutegel inhibiert die Isopeptidase-Aktivität die Blutgerinnung und ermöglicht somit eine komplikationslose Aufnahme der Blutmahlzeit (Baskova & Nikonov, 1991; Zavalova et al., 1996). Mittlerweile wurden auch Isopeptidbindungen in der Peptidoglykanschicht von Bakterienzellwänden identifiziert, die möglicherweise ein weiteres Ziel der Isopeptidase darstellen, um den Abbau von eingedrungenen Pathogenen unterstützen zu können (Bathige et al., 2013). Die Bifunktionalität der i-Typ-Lysozyme wurde nicht nur für *H. medicinalis* und *T. japonica* beschrieben, sondern auch für die Lysozyme der Seeschnecke *Haliotis discus discus* und des Regenwurms *Eisenia andrei* gezeigt (Bathige et al., 2013; Josková et al., 2009).

Die Tertiärstruktur des *T. japonica* i-Typ-Lysozyms weist eine große Ähnlichkeit zur Gesamtstruktur des HEWL auf (Callewaert & Michiels, 2010). Alle bisher bekannten i-Typ-Lysozym-Sequenzen besitzen allerdings im Vergleich zu HEWL eine höhere Anzahl an Cysteinen, die ebenfalls intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden und zur beobachteten Stabilität der i-Typ-Lysozyme beitragen (Goto et al., 2007; Ito et al., 1999). Das i-Typ-Lysozym von *T. japonica* wird gebildet von sechs  $\alpha$ -Helices, einem  $\beta$ -Faltblatt und einer großen Tasche, die an der Substratbindung beteiligt ist (Goto et al., 2007). Dort sind, wie auch in HEWL, konservierte Aminosäurereste lokalisiert, die eine wichtige Rolle bei der Substratbindung und Enzymaktivität spielen. Anhand der Kristallstrukturanalyse des *T. japonica* i-Typ-Lysozyms wurde im Komplex mit NAG die Glutaminsäure an Position 18 (Glu18) als Pondon zu dem konservierten Aminosäurerest Glu35 in c-Typ-Lysozymen identifiziert (Goto et al., 2007, Abbildung 6A&B). Weiterhin übernimmt die Asparaginsäure an Position 30 (Asp30) die Funktion des in c-Typ-Lysozymen vorhandenen Asp52 (Paskewitz et al., 2008). Katalytische Aminosäurereste, die möglicherweise für die Isopeptidase-

Aktivität von Bedeutung sein könnten, sind das Serin an Position 62 (Ser62) und Histidin an Position 92 (His92). Zavalova et al. (1996) stützten diese Annahme durch den Beweis, dass die Isopeptidase-Aktivität der Destabilase durch einen Serinprotease-Inhibitor (Phenylmethylsulfonylfluorid; PSM) inhibiert werden konnte. Indirekte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den aufgeführten Aminosäureresten und der Isopeptidase-Aktivität ergeben sich durch den Nachweis der Aktivitäten von i-Typ-Lysozymen, bei denen beide konservierten Aminosäurereste vorhanden waren. So konnte sowohl für das *T. japonica* als auch für *E. andrei* Lysozym und auch für ein Lysozym aus dem Flusskrebs *Procambarus clarkii* (Pc-ily2) eine Isopeptidase-Aktivität gezeigt werden. In einem zweiten i-Typ-Lysozym von *P. clarkii* (Pc-ily1) und in einem aus der Miesmuschel *Mytilus edulis* isolierten Protein lag anstelle von Ser62 ein Alanin vor und beiden Proteinen fehlte die Aktivität (Bachali et al., 2002; Josková et al., 2009; Takeshita et al., 2003; Zhang et al., 2010).



**Abbildung 6: I-Typ Lysozym Mechanismus und Aufbau** (Callewaert & Michiels, 2010)

Das Vorliegen einer Muramidase-Aktivität tritt unabhängig von einer Isopeptidase-Aktivität auf. Beispielweise besaß das i-Typ-Lysozym der amerikanischen Auster *Crassostrea virginica* nur eine Muramidase-Aktivität während Pc-ily2 nur Isopeptidbindungen hydrolysieren konnte (Xue et al., 2007; Zhang et al., 2010). Unabhängig vom Vorhandensein der enzymatischen Aktivitäten können i-Typ-Lysozyme wachstumshemmende Effekte gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie einige Pilzen aufweisen (Cong et al., 2009; Nielsen et al., 2010). Somit übernehmen auch Muramidase-

lose i-Typ-Lysozyme in Invertebraten eine wichtige Funktion in der Immunabwehr. Anhand von Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass alle bisher bekannten i-Typ-Lysozym-Sequenzen aus Insekten keine der für eine Muramidase-Aktivität relevanten katalytischen Aminosäurereste besitzen und auch das Vorkommen einer Isopeptidase-Aktivität ist unsicher. Welche Auswirkungen dieser Befund auf die enzymatischen und antimikrobiellen Eigenschaften der Insekten i-Typ-Lysozyme hat ist ungeklärt, da Insekten i-Typ-Lysozyme bis dato nur auf DNA und RNA Ebene charakterisiert wurden (Paskewitz et al., 2008).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Seit *H. axyridis* sich weit über die Grenzen seiner ursprünglichen Einsatzgebiete als Blattlausbekämpfer ausgebreitet hat, werden die dem Invasionserfolg zu Grunde liegenden Eigenschaften und Mechanismen dieser Art diskutiert. Der primäre Erfolgsfaktor ist sein ausgeprägtes zweilagiges Immunsystem, welches mittels konstitutiv synthetisiertem Harmonin oder nach Immunstimulation unter Bildung eines breiten Repertoires antimikrobieller Substanzen einen effektiven Schutz vor pathogenen Organismen bietet (Röhrich et al., 2012; Schmidtberg et al., 2013). Diesen Immunmodulatoren werden auch die Lysozyme in Insekten zugeordnet, von denen vier c-Typ-Lysozyme und fünf i-Typ-Lysozyme von *H. axyridis* exprimiert werden können. Das Vorkommen von mehreren Sub-Typ-Lysozymgenen innerhalb eines Organismus legt die Vermutung einer Diversifikation der *H. axyridis* Lysozyme durch Expressions- und Funktionsunterschiede nahe und ist für c-Typ-Lysozyme in Insekten bekannt (Irwin, 2014; Schulenburg & Boehnisch, 2008). Während einige Insekten-c-Typ-Lysozyme an der humoralen Immunabwehr beteiligt sind, wirken andere an Verdauungsprozessen mit (Ursic Bedoya et al., 2005). Diese Unterteilung der Insektenlysozyme erfolgte primär anhand von prognostizierten isoelektrischen Punkten und Expressionsanalysen, bei denen im Darm exprimierte Lysozyme den Verdauungsenzymen und nach Infektion hochregulierte Lysozyme den Abwehrenzymen zugeordnet wurden. In wie weit eine Klassifizierung anhand von Expressionsmustern sinnvoll erscheint und welchen weiteren Prädiktoren, die eine eindeutige Funktionszuordnung anhand von postulierten biochemischen Eigenschaften oder Sequenzmotiven ermöglichen, hilfreich sein können, ist offen. Darüber hinaus ist die Frage nach der Auswirkung des Vorhandenseins eines Muramidase-Sequenzmotives auf wachstumshemmende Eigenschaft gegenüber Mikroorganismen für Insekten-c-Typ-Lysozyme noch nicht abschließend geklärt und umfangreiche Daten, die sowohl Untersuchungen im Organismus als auch die biochemische Charakterisierung rekombinant dargestellter Lysozyme mit einbeziehen, sind für Insekten-c-Typ-Lysozyme rar.

Während i-Typ-Lysozyme in Invertebraten wie Mollusken, Anneliden und Krustaceen zahlreich untersucht wurden, ist über die i-Typ-Lysozyme der Insekten kaum etwas bekannt. Ihre Existenz ist anhand von Sequenzanalysen in den verschiedensten Insekten-Spezies nachgewiesen worden und Daten über die Expression in Insekten existieren, doch Informationen über die biochemischen und enzymatischen Eigenschaften fehlen. Es wurden zum jetzigen Zeitpunkt weder aus Insekten i-Typ-Lysozyme isoliert noch heterolog exprimiert, um sie auf ihre Eigenschaften zu untersuchen.

Aufbauend auf den beschriebenen Beobachtungen über Insektenlysozyme war das Ziel der vorliegenden Arbeit eine umfangreiche Charakterisierung ausgewählter c-Typ- und i-Typ-Lysozyme des Asiatischen Marienkäfers, stellvertretend für die Lysozyme der Insekten. Anhand von heterolog exprimierten Lysozymen sollten deren biochemische Eigenschaften untersucht und mit dem Vorkommen im Organismus verglichen werden, um das Verständnis der Diversifikation in Insekten voranzutreiben. Darüber hinaus sollte die Frage nach dem Mitwirken der Lysozyme am zweilagigen Immunsystem beleuchtet werden, dem der Invasionserfolg des Marienkäfers zugeschrieben wird.

Basierend auf dieser Zielstellung sollten folgende Unterpunkte im Detail erarbeitet werden:

### Untersuchung der c-Typ-Lysozyme

- a) Heterologe Expression von ausgewählten c-Typ-Lysozymen zur vergleichenden Charakterisierung der biochemischen und enzymatischen Eigenschaften mit Hinblick auf eine funktionale Diversifikation
- b) Identifizierung von für c-Typ-Lysozyme charakteristische Muramidase-Aktivitäten im Organismus

### Untersuchung der i-Typ-Lysozyme

- a) Erstmalige heterologe Expression eines Insekten-i-Typ-Lysozyms für die Charakterisierung der biochemischen und enzymatischen Eigenschaften
- b) Expressions- und Lokalisationsanalyse dieses i-Typ-Lysozyms im Organismus

### Untersuchung der Unterstützung des zweilagigen Immunsystems von *H. axyridis*

- a) Expressionsanalyse der Lysozyme nach Stimulation der Immunantwort
- b) Antimikrobielles Spektrum der c-Typ- und i-Typ-Lysozyme
- c) Kombinatorische Effekte der Lysozyme mit weiteren Immunmodulatoren

## 3 Methoden

### 3.1 Der Asiatische Marienkäfer *H. axyridis*

#### 3.1.1 Zucht und Haltung

Adulte Tiere des Asiatischen Marienkäfers *Harmonia axyridis* wurden im Frühjahr und Herbst 2011-2013 in Gießen und Umgebung (Hessen) gesammelt und zur Auffrischung und Fortsetzung der *Harmonia*-Zucht verwendet. Zwischen 20 bis 40 Individuen wurden nach Entwicklungsstadium getrennt in Käfigen bei konstanten 26 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. In jedem Käfig standen mit Blattläusen (*Acyrtosiphon pisum*) besiedelte Bohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris*) als Nahrungsquelle zur Verfügung.

#### 3.1.2 Immunstimulation der Käfer

Zur Untersuchung der Immunreaktion von *Harmonia axyridis* auf Bakterieninfektionen wurden adulte Käfer mit *Micrococcus luteus* (DSM 20030) und *Escherichia coli* (D31) immunstimuliert (Dunn & Drake, 1983). Dazu wurden die Bakterienkulturen mit antikoagulierender Saline (Tabelle 17) auf  $4,75 \times 10^8$  cfu verdünnt und 10 µl der Bakteriensuspension wurden mit dem Mikroinjektor Nanoliter 2000 Sy-Micro4 Controller (World Precision Instruments) in das Abdomen injiziert. Die Kontrolltiere erhielten keine Injektion. Nach 12 h oder 24 h wurde den Tieren für weiterführende Versuche Hämolymphe und Organe entnommen.

#### 3.1.3 Entnahme von Hämolymphe

Für die Entnahme von Hämolymphe wurden die Käfer mit Klebeband dorsal auf einer Platte fixiert und ein Hinterbein oberhalb der Metacoxa abgetrennt. Die dadurch austretende Hämolymphe wurde mittels Pipette aufgenommen und sofort in ein auf Eis stehendes Eppendorfreaktionsgefäß mit antikoagulierender Saline inklusive Spatelspitze Phenylthioharnstoff (PTU) überführt. Das Mischverhältnis von Hämolymphe zu PTU-Saline betrug ca. 1:2 und wurde benötigt, um die starke Koagulation der Insektenhämolymphe zu verhindern. Die anschließende Lagerung der Proben erfolgte bei – 20 °C.

### 3.1.4 Organpräparation

Nach der Hämolymphentnahme erfolgte die Präparation der Organe, indem die Käfer vorderhalb des Pronotums dekapitiert und die Elytren an der Basis abgetrennt wurden. Die toten Tiere wurden in eine mit PBS (Roth) gefüllte Präparierschale überführt und vom Abdomen her dorsal bis hin zum Pronotum geöffnet. Sowohl einzelne Organe als auch Gewebestücke wurden mit einer Präzisionspinzette (Typ 5, Dumont®) entnommen, mehrmals in PBS gewaschen und anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 100 µl PBS überführt. Die Organe wurden bei – 80 °C gelagert oder direkt für immunhistochemische Färbungen verwendet. Für die RNA-Isolation benötigte Organe wurden anstatt in PBS in RNAlater (Qiagen) präpariert. Um bei der anschließenden RNA-Isolation eine Überladung der Säulenmatrix zu vermeiden, wurde eine unterschiedliche Anzahl an Organen in den Eppendorfreaktionsgefäßen zusammengeführt: Darm (n = 5), Ovarien (n = 5), Testis (n = 5), Fettkörper (n = 10) und Kopf (n = 10). Insgesamt wurden drei biologische Replikate der Proben erstellt.

## 3.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

### 3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte sowohl auf Agar-Platten als auch in Flüssigkulturen, für die LB- oder TB-Medium (Roth) verwendet wurden. Nach Transformationen und bei Expressionen wurde den Medien zur Selektion auf eine Plasmid-kodierte Antibiotika-Resistenz das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide besaßen alle eine Ampicillin-Resistenz, so dass ausschließlich Ampicillin in einer Konzentration von 150 mg/l eingesetzt wurde. Die Bakterienkulturen wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und die Flüssigkulturen zusätzlich bei 160 rpm geschüttelt.

Zur permanenten Lagerung wurden von den transformierten *E. coli*-Stämmen Gefrierkulturen angelegt. Dafür wurde 1 ml Kultur in ein Kryoröhrchen (Roth) gegeben und 2 min inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Röhrchen bei – 80 °C eingelagert. Durch das Ausstreichen eines Kryoringes mittels steriler Pipettenspitze auf eine LB-Platte konnten die transformierten Bakterien rekultiviert werden.

### 3.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen wurden entweder kommerziell erworben (One Shot TOP10 Zellen; Invitrogen) oder nach der TSS-Methode (Chung et al. 1989) hergestellt. Hierfür wurden 500 µl einer XL1-Blue Übernachtskulturen am Folgetag in 50 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) überimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und in regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte bei 600 nm photometrisch bestimmt. Sobald die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase eine  $OD_{600nm}$  von 0,3-0,4 erreicht hatte, wurden die Zellen in ein gekühltes Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5000 x g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 5 ml eiskaltem TSS resuspendiert und jeweils 50 µl in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

### 3.2.3 Transformation in *E. coli*

Sowohl kommerziell erworbene chemisch kompetente One Shot TOP10 Zellen (Invitrogen) also auch nach der TSS-Methode hergestellte XL1-Blue Zellen wurden zur Transformation verwendet. Für einen Transformationsansatz wurde ein Aliquot mit 50 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem zu transformierenden Plasmid (1 µl; 10-200 ng) 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein „Hitzeschock“ für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad. Der Ansatz wurde erneut für 1 min auf Eis gekühlt bevor 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h bei 37 °C und 220 rpm wurden 100 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.4 Kultivierung von *P. pastoris*

Für die Kultivierung, Transformation und anschließende Expression von Proteinen in Hefen wurde in dieser Arbeit das PichiaPink™ Expression System (Invitrogen) verwendet, bei dem der Selektionsmechanismus auf einer *ADE2* Mutation statt Antibiotikaresistenz basiert. Alle Kulturvolumen betragen maximal 20 % des Gefäßvolumens, um eine ausreichende Luftzufuhr zu gewährleisten. Transformierte Hefekulturen wurden bei – 80 °C in Kryoröhrchen (Roth) gelagert.

Zu Beginn der Versuche wurden die PichiaPink™ Stämme 1-4 (Invitrogen) aus Glycerol-Gefrierkulturen auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden Vorkulturen mit 10 ml YPD-Medium durch Animpfen mit einer Kolonie angesetzt und bei 30 °C für 2 Tage und 260 rpm geschüttelt. Die 100 ml Hauptkultur wurde so mit der Vorkultur

angepflegt, dass die OD<sub>600</sub> anfangs 0,2 betrug. Nach 1-2 Tagen Inkubation bei 30 °C und 260 rpm wurden die Kulturen (OD<sub>600</sub> = 1,3-1,5) für die anschließende Transformation vorbereitet.

### 3.2.5 Transformation durch Elektroporation von *P. pastoris*

Zur Transformation der *P. pastoris*-Kulturen (siehe 3.2.4) wurden diese in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1,500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 4-mal wiederholt und das Pellet anschließend in 10 ml eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt erfolgte die Resuspension in 300 µl eiskaltem 1 M Sorbitol. Von der so erhaltenen Zellsuspension wurden jeweils 80 µl in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und auf Eis gestellt. Ein Aliquot wurde mit 10 µg linearisiertem Vektor (siehe 3.3.5), der zuvor in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert wurde, vermischt und in eine eiskalte 0,2 cm Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) überführt. Das Gemisch wurde 5 min auf Eis inkubiert bevor es bei folgenden Bedingungen elektroporiert wurde:

**Tabelle 1: Bedingungen der Hefe-Elektroporation**

Ladespannung	1500 V
Kapazität	40 µF
Widerstand	282 Ω
Feldstärke	ca 7500 V/cm
Pulsdauer	10 ms

Direkt nach der Entladung des Elektroporators wurde 1 ml eiskaltes YPDS-Medium dem Ansatz hinzugefügt, durch mehrmaliges Pipettieren gemischt und 4-6 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in ein Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei 1,500 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen, das Pellet in dem restlichen Überstand resuspendiert und auf einer *Pichia*-Adenin-Dropout (PAD)-Platte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte für 5-10 Tage bei 30 °C, bis weiße und pinke Kolonien wuchsen, die für die Expression verwendet werden konnten.

### 3.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

#### 3.3.1 Gensynthese der Lysozymkonstrukte

Die Gensynthesen der Codon-optimierten Lysozymkonstrukte sowohl in die Bakterienplasmide (pASK-IBA33plus und pASK-IBA37plus) als auch in das Hefepiasmid (pPink $\alpha$ -HC) wurden als Auftragsarbeit von der Firma Eurofins Genomics durchgeführt.

#### 3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Jeweils 50 ml einer Übernachtskultur transformierter TOP10 *E. coli*s wurde durch Zentrifugation bei 5000 x g für 20 min pelletiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels des Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurden in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

#### 3.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm in Einweg-UV-Küvetten bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde bestimmt, indem das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm gemessen wurde. Dieses Verhältnis ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) sollte größer 1,6 sein, wenn der Anteil an Proteinen in der Probe gering ist (Sambrook & Russell, 2001).

#### 3.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Die Größenfraktionierung von Plasmiden und DNA-Amplifikaten erfolgte in horizontal laufenden 1-2 %-igen Agarosegelen (1-2 % Agarose [w/v] in TAE-Puffer). Die aufzutragenden Proben wurden mit 5-fachem Beladungspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Ein DNA-Größenstandard wurde bei jeder Gelelektrophorese zur Größenbestimmung in eine Tasche aufgetragen. Bei einer angelegten Spannung von ca. 120 mV/cm liefen die Proben für etwa 60 Minuten. Für die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden die Gele für 20 min in GelGreen™ Nucleic Acid Stain (Biotium) bei RT gefärbt und mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Filtereinstellung SYBR Green dokumentiert.

### 3.3.5 Linearisierung und Reinigung von Plasmiden

Die für die Hefe-Transformation benötigten Plasmide wurden vor der Elektroporation durch Restriktion mit *SpeI* (Fermentas) in der TRP2 Region linearisiert. Pro Ansatz wurden 10 µg Plasmid mit 10 U Enzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die linearisierten Plasmide wurden anschließend mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol für 2 h bei -20 °C präzipitiert. Zur vollständigen Präzipitation wurden die Proben bei 4 °C und 18.000 x g zentrifugiert und die Plasmidpellets zweimal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 10 µl sterilem deionisiertem Wasser resuspendiert. Die linearisierten Plasmide wurden direkt im Anschluss für die Transformation verwendet.

### 3.3.6 Isolierung von RNA aus *H. axyridis*

Während des Arbeitens mit RNA wurde darauf geachtet RNase-Kontamination zu vermeiden. Dazu wurden alle hitzebeständigen Gebrauchsmaterialien bei 120 °C autoklaviert und die Arbeitsflächen sowie Handschuhe und Pipetten mit RNase Away behandelt. Wassergefäße wurden mindestens 10-fach mit ddH<sub>2</sub>O ausgespült und wiederholt mit ddH<sub>2</sub>O gefüllt autoklaviert.

Die RNA-Isolation aus naiven und immun-stimulierten Tieren und Organen mit anschließendem DNase-Verdau erfolgte mittels NucleoSpin RNA Kit (Macherey Nagel) nach Angaben des Herstellers. Ein Käfer (ca. 30 mg) oder die in 3.1.4 präparierten Organe wurden für die RNA-Isolation verwendet. Die RNA der Käfer wurde in 60 µl und RNA der Organe in 40 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.3.7 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die finale RNA-Konzentration, Reinheit und Qualität wurde photometrisch mit einer Take3 Mikrovolumenplatte (BioTek) und ebenfalls mittels Gelelektrophorese bestimmt (siehe 3.3.8). Es wurden nur Proben mit einem Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{320} > 1.8$  und einer scharfen 18S rRNA Gelbande für die cDNA-Synthese verwendet.

### 3.3.8 RNA-Gelelektrophorese

Da die Konzentrationsbestimmung keine spezifischen Angaben über die RNA-Qualität und deren Degradationszustand liefert, wurde die Integrität der RNA durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Etwa 1 µg RNA wurde mit 5 x RNA-Ladepuffer (8 M Urea, 0.5 mM EDTA, 0.1 % (w/v)

Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol) versetzt ohne die Proben zu erhitzen, auf 10 µl Volumen mit Wasser aufgefüllt und in eine Geltasche aufgetragen. Das Gel setzte sich aus 2% Agarose, 1 x TAE-Puffer + 1 % GelGreen™ Nucleic Acid Stain, (Biotium) zusammen. Ein RNA-Größenstandard (0,5-10 Kb, Invitrogen) diente der Orientierung und Größenzuordnung. Wichtig für die Qualität der RNA-Gele war die Verwendung von frisch angesetzttem TAE-Puffer und Gelen, um die RNA-Degradation während des Laufes zu reduzieren.

### 3.3.9 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus der zuvor extrahierten RNA erfolgte mittels des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Für jede Reaktion wurden 2 µg gesamt RNA und die im Kit enthaltenen oligo(dT)<sub>18</sub> Primer verwendet. Die erhaltene cDNA wurde anschließend auf eine Konzentration, die 400 pg/µl Gesamt-RNA entspricht, verdünnt und bei – 80 °C gelagert.

### 3.3.10 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Real Time-PCR ermöglicht die Quantifizierung amplifizierter DNA durch die Nutzung von dsDNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie SybrGreen (Applied Biosystems). Die Fluoreszenzintensität am Ende eines jeden Amplifikationszyklus korreliert mit der Menge an amplifizierter Ziel-DNA. Alle Messungen wurden am StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Genspezifische Primer wurden mittels Oligo Explorer 1.1.2 Software (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Oligo-Explorer.shtml>) entworfen. Hierfür wurden folgende Parameter gesetzt: Primerlänge 19-23 Basen, Ampliconlänge 50-210 bp und Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ca. 60 °C. Anhand von Standardkurven mit anschließenden Schmelzkurven wurden alle Primer zur Evaluierung der Effizienz im StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) getestet. Dafür wurden cDNA Konzentrationen von 50 ng bis zu 3.2 pg in 5-fachen Verdünnungsschritten verwendet. Die Amplifizierungsbedingungen entsprachen den Standardeinstellungen des Herstellers (Denaturierung 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C 15 s und 60 °C 60 s, abschließend die Schmelzkurvenanalyse mit einem schrittweisen Temperaturanstieg von 60 °C auf 95 °C in 0,5 °C Schritten). Die Effizienz der Reaktionen wurde anhand der StepOne Software v2.3 ermittelt und nur Primer mit einer Effizienz zwischen 90-110 %,

$R^2 \geq 0.99$  und einem scharfen Schmelzkurvenpeak wurden für die Untersuchung der Genexpression verwendet.

Das 10  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen setzte sich aus 5  $\mu\text{l}$  Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{l}$  (400 pg) cDNA und 300 nM der jeweiligen Primerpaare zusammen. Alle Reaktionen wurden in drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Basislinienkorrektur wurde automatisch von der StepOnePlus Software erstellt und die Quantifizierungszyklen (Ct) wurde bei einer Intensität von 0,5 bestimmt. Alle zu untersuchenden cDNA Proben und deren korrespondierende RNA ohne Reverse Transkription (no-RT Kontrolle) wurden mit RPS3 Primern getestet, um die Menge der nach dem DNase-Verdau noch vorhandenen genomischen DNA abzuschätzen. Es wurde nur cDNA verwendet bei der  $\Delta\text{Cq} \geq 10$  im Vergleich zu der no-RT Kontrolle war.

Die relative Quantifizierung der DNA erfolgte über die Berechnung der Expressionsunterschiede (Ratio) mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode (Pfaffl, 2001). Dazu werden in einem ersten Schritt die Ct-Werte („cycle of threshold“) für jede Reaktion durch die Steponeplus-Software bestimmt und innerhalb einer unbehandelten Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$ ). In einem zweiten Schritt wird die gleiche Normierung bei einer experimentell behandelten Probe durchgeführt. ( $\Delta\text{Ct}_{\text{behandelt}} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$ ). Im dritten Schritt folgt die  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Berechnung indem von  $\Delta\text{Ct}_{\text{behandelt}}$  der  $\Delta\text{Ct}_{\text{unbehandelt}}$  Wert subtrahiert wird. ( $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$ ) Anhand dieser Formel ergibt sich der relative Expressionsunterschied zwischen einer Kontrollgruppe und einer behandelten Gruppe mit der Normalisierung der Proben zu einem konstant exprimierten Referenzgen. Da dieses Berechnungsschema eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraussetzt, ergibt sich die arithmetische Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [5]. Als Referenz wurden die Gene des ribosomalen Proteins S3 (RPS3) und des Elongationsfaktors 1 $\alpha$  (EF1A) verwendet (Vilcinskas et al., 2013a).

### 3.4 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

#### 3.4.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression von rekombinanten Proteinen im präparativen Maßstab wurde eine Übernachtskultur von 40 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Bakterienkultur in 360 ml

LB-Medium, inklusiv Antibiotikum, überführt und bei einer  $OD_{600} = 1$  die Proteinexpression durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin in einer Endkonzentration von 200 ng/ml induziert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 160 rpm für 3-4 h. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 10 min, 4 °C) geerntet und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.4.2 Nachweis von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)**

Um zu prüfen, ob bei der Überexpression von Proteinen in Bakterienkulturen Einschlusskörper (*inclusion bodies*) gebildet wurden, wurden die Zellpellets in Aufschlusspuffer (IMAC-A) resuspendiert und auf Eis mit Ultraschall behandelt (3 min bei 75 W, 3 Wiederholungen). Zur Trennung der festen von den löslichen Bestandteilen wurde die Zelllösung bei 4 °C und 18000 x g für 10 min zentrifugiert und die getrennten Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

### **3.4.3 Proteinexpression in *P. pastoris***

Der erste Schritt der Proteinexpression bestand in der Auswahl geeigneter Hefeklone. Dabei unterschieden sich die weißen Kolonien von den Pinken in der Integrationsanzahl der Gen-Konstrukte. Da weiße Kolonien mit großer Wahrscheinlichkeit eine höhere Anzahl an integrierten Konstrukten besitzen, wurden ausschließlich weiße Kolonien für die Proteinexpression verwendet. Die unterschiedliche Expressionsleistung von 5-10 weißen Klonen wurde bei verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht und anschließend ein geeigneter Klon für die Großexpression ausgewählt.

### **Expression im Testmaßstab**

Für die Vorauswahl der Klone wurden 10 ml gepuffertes Glycerol-Komplex-Medium (BMGY) in einem 125 ml Schikanekolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  2-6 bei 30 °C und 260 rpm schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 1500 g zentrifugiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch einen Medienwechsel (Tabelle 18), sodass die Pellets anschließend in 1 ml ungepuffertem Methanol-Medium (MM), gepuffertem Methanol-Medium (BMM), ungepuffertem komplexen Methanol-Medium (MMY) oder komplexen Methanol-Medium (BMMY) resuspendiert wurden. Die Kulturen wurden für insgesamt 4 Tage bei 30 °C und 260 rpm inkubiert, und alle 24 h wurde Methanol auf eine Endkonzentration von 0,5 % hinzugegeben. Täglich wurden 100 µl der Kultur entnommen und der

Überstand geerntet (1500 g, 10 min), um die Proteinausbeute zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression per SDS-PAGE oder Western-Blot zu bestimmen.

### **Expression im präparativen Maßstab**

Für die präparative Expression wurden geeignete Klone und Bedingungen ausgewählt, bei denen in der Testexpression eine hohe Ausbeute an rekombinanten Proteinen erzielt wurde. In einem 1 l Schikanekolben wurden 50 ml BMGY-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 48 h bei 30 °C und 260 rpm inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 1500 g zentrifugiert. Zur Kultivierung und Expression wurden die Pellets in 200 ml BMMY-Medium resuspendiert und Tage bei 30 °C und 260 rpm inkubiert, während alle 24 h Methanol auf eine Endkonzentration von 0,5% zugegeben wurde. Die Kulturen wurden anschließend zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand bis zur Proteinaufreinigung bei – 20 °C gelagert.

#### **3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrer Größe erfolgte durch präparative SDS-Gelelektrophorese mit 4 – 20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gelen (Bio-Rad). Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend 5 min bei 11000 g zentrifugiert, bevor 20 µl der Probe pro Tasche auf das Gel aufgetragen wurde. Ein Standard mit Proteinen bekannter Größen (Fermentas) wurde zum Abschätzung der Proteingrößen bei jedem Gel mitgeführt. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanten 300 V und bis zu 1000 mA in einer Mini-Protean-Zelle (BIO-RAD) durchgeführt und nach Auslaufen der Bromphenolblau-Vorlaufbande beendet. Anschließend erfolgte das Färben der auf den SDS-Gelen aufgetrennten Proteine mit verschiedenen Ansätzen, oder es wurde ein Western-Blot zum spezifischen Nachweis von Proteinen durchgeführt.

#### **3.4.5 Färbungen (Coomassie, Flamingo)**

Zur unspezifischen Färbung von Proteingelen wurde abhängig von der aufgetragenen Proteinkonzentration ein Absorptionsfarbstoff oder ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Als Absorptionsfarbstoff diente Coomassie-Brillant-Blau, dessen Triphenylmethanfarbstoff mit basischen Aminosäuren (Arg, Tyr, Lys, His) reagiert, weshalb es sich zum Anfärben von Proteinen eignet. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele über Nacht mit Roti®Blue quick gefärbt und

anschließend photographisch mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Filtereinstellung Coomassie Blue dokumentiert.

Für die Visualisierung geringer Proteinmengen (bis zu 0,25 ng) wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität ein Fluoreszenzfarbstoff (Flamingo™ Fluorescent Gel Stain) verwendet, der durch die Bindung an denaturierten Proteinen zu fluoreszieren beginnt. Die Färbung erfolgt in drei Schritten nach Angaben des Herstellers und die Dokumentation mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Filtereinstellung Flamingo.

### **3.4.6 Western-Blot-Analyse (verschiedene Methoden)**

Die spezifische Identifizierung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Antikörperbindung. Die Proteine wurden elektrophoretisch im Semi-Dry-Verfahren (Trans-Blot-Turbo, Bio-Rad) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dafür wurde die PVDF-Membran (Millipore) zuvor für 10 min in Methanol äquilibriert und anschließend für 30 s in SDS-Transferpuffer inkubiert. Die Äquilibration von Gel und Filterpapieren (Extra Thick Filter Paper, Bio-Rad) fand für 15 min im SDS-Transferpuffer statt. Auf die Anode wurden ein getränktes Filterpapier, die Membran, das Gel und anschließend das zweite Filterpapier blasenfrei aufgelegt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Proteintransfer für 30 min bei 3 mA/cm<sup>2</sup>.

#### **Proteindetektion mittels anti-His<sub>6</sub>-Antikörper**

Der Nachweis von rekombinanten His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen erfolgte mit einem gegen das His<sub>6</sub>-Oligopeptid gerichteten anti-Penta-Histidin-Antikörper (Qiagen). Nach erfolgreichen Blotten wurde die Membran zweimal für 10 min in TBS-Puffer bei RT gewaschen, bevor sie über Nacht mit einer 1 % Casein-Protein enthaltenden Blockierungslösung (Qiagen) inkubiert wurde, um unspezifische Antikörperbindungen durch Absättigung zu minimieren. Die geblockte Membran wurde gewaschen (1 x TBS/T, 10 min), für 1 h bei RT mit der Antikörperlösung (Anti His HRP, 1:1000 in 0,5 % Blockierungslösung) inkubiert und anschließend noch zweimal gewaschen (2 x TBS/T, 10 min). Durch die Katalyse der Oxidation von Luminol konnte der Peroxidase markierte Antikörper mit Hilfe des Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers detektiert werden. Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Filtereinstellung Chemie Hi Sensitivity.

### **Proteindetektion mittels anti-Lys-Antikörper**

Für den spezifischen Nachweis von Lysozymen wurden gegen die rekombinanten Proteine i-Lys2 und c-Lys3 gerichtete Antikörper verwendet (siehe 3.6.1). In diesem Fall erfolgte der Nachweis durch eine indirekte Antikörpermarkierung, indem ein antigenspezifischer, unmarkierter Primärantikörper von einem zweiten, speziesspezifischen, Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 10) detektiert wurde. Zu Beginn wurde nach zweimaligen Waschen (TBS/T, 10 min) die Membran für 1 h in 1 % Blockierungslösung (Roche) geblockt und anschließend über Nacht mit dem Antiserum (anti-i-Lys2 oder anti-c-Lys3, 1:1000 in 0,5 % Blockierungslösung) inkubiert. Die Membran wurde gewaschen (4 x TBS/T, 5 min) und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:5000 in 0,5 % Blockierungslösung) folgte für 1 h. Nach einem erneuten Waschschrift (4 x TBS/T, 5 min) erfolgte die Detektion mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Geräteeinstellung Chemie Hi Sensitivity.

#### **3.4.7 Protein-Sequenzierung (Edman-Abbau) und Massenanalyse (MALDI-tof)**

Sowohl die N-terminale Sequenzierung als auch die Bestimmung der molekularen Masse der gereinigten Proteine erfolgte als Auftragsarbeit im Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität. Für die MALDI-tof Analyse wurden mindesten 10 µg Proteinprobe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Färbung mit kolloidalem Coomassie (Roth) ausgeschnitten. Für den Edman-Abbau wurden ebenfalls mindestens 10 µg Proteinprobe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Färbung der Membran erfolgte ebenfalls mittels kolloidalem Coomassie, um die dadurch sichtbar gewordene Proteinbande ausschneiden zu können. Die ausgeschnittenen Proteinproben wurden zur weiteren Analyse an das Biochemische Institut übergeben.

### **3.5 Proteinreinigung mittels Chromatographie**

#### **3.5.1 Affinitätschromatographie**

Im ersten Aufreinigungsschritt wurden die His<sub>6</sub>-fusionierten rekombinanten Proteine aus dem Hefeüberstand mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) über eine Kobaltchelate-Matrix gereinigt. Hierfür wurden das YMC HPLC System SE-07 und eine mit 7,5 cm<sup>3</sup> Talon Superflow gepackte Glassäule (Eco<sup>Plus</sup> SR TAC25) verwendet. Waschen des Säulenmaterials

erfolgte bei einer Flussrate von 10 ml/min mit mindestens 15 Säulenvolumina IMAC-Puffer A (100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl; pH 7,5) und IMAC-Puffer B (100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, 200 mM Imidazol; pH 7,5) bevor die Säule mit IMAC-Puffer A äquilibriert wurde.

Zur Probenvorbereitung wurde der Hefeüberstand bei 30 °C im Wasserbad aufgetaut, der pH-Wert mit Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt und auftretende Präzipitate durch Zentrifugation (10.000 g, 30 min, 4 °C) entfernt. Der klare Überstand wurde mit einer Flußrate von 10 ml/min auf die zuvor mit IMAC-Puffer A äquilibrierte Säule geladen. Die Säule wurde mit IMAC-Puffer A gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm eine konstante Basislinie zeigte. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit IMAC-Puffer B wobei die einzelnen Elutionsfraktionen manuell basierend auf dem Absorptionsverlauf bei 280 nm gesammelt wurden.

### 3.5.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen sowohl ohne His<sub>6</sub>-Tag als auch von affinitätsgereinigten His<sub>6</sub>-fusionierten Proteinen erfolgte anhand ihrer Nettoladung im gewählten pH Bereich mittels Ionenaustausch-Chromatographie. Abhängig von der Ladung der Aminosäureseitenketten wurde ein Anionenaustauscher (positiv geladene Gruppe) oder Kationenaustauscher (negativ geladene Gruppe) verwendet.

Im Falle der mittels Affinitätschromatographie gereinigten His<sub>6</sub>-Tag modifizierten Proteine wurde ein Dionex HPLC-System bestehend aus einer ICS-3000 Niederdruck-Gradientenpumpe, einer AXP-Pumpe für die Probenladung, einem UltiMate 3000 Diodenarray-Detektor und einem Fluoreszenzdetektor verwendet. Nicht mit dem His<sub>6</sub>-Tag modifizierte Proteine wurden zuerst im oben erwähnten YMC-System mittels Ionenaustauscher vorgereinigt, bevor das Dionex-System im zweiten Reinigungsschritt eingesetzt wurde. Der Einsatz der Systeme und Säulen war abhängig vom jeweiligen Ausgangsvolumen der Proteinlösungen, sodass bei großen Probenmengen (200 ml – 5 000 ml) das YMC-System und bei geringen Probenmengen (10 ml – 30 ml) das Dionex HPLC-System Verwendung fand.

#### Anionenaustauscherchromatographie

Die Anionenaustauscherchromatographie der vorgereinigten Proteine erfolgte mittels eines stark basischen quartären Trimethyl-Ammonium Materials. Entweder mit einer porösen (YMC-BioPro QA; Porengröße 100 nm) oder nicht porösen (YMC-BioPro QA-F) Ionenaustauschermatrix mit Hilfe des Dionex HPLC-Systems bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die das Zielprotein enthaltenen

Elutionsfraktionen des ersten Chromatographieschrittes wurden im Verhältnis 1:20 mit entgastem SAX-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) verdünnt und auf die mit SAX-Puffer äquilibrierte Säule geladen. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend mit SAX-Puffer inklusive 1 M NaCl unter einem linearen Gradienten (0-50 %) von 20 Säulenvolumina eluiert. Die Absorption bei 280 nm wurde beobachtet und der Proteinpeak manuell gesammelt. Die Hauptfraktionen wurden vereint und bei – 20 °C gelagert.

### **Kationenaustauschchromatographie**

Das mittels IMAC aufgereinigte c-Lys4 wurde aufgrund seines isoelektrischen Punktes (pI 8,18) unter Verwendung einer starken Kationenaustauschermatrix (YMC-BioPro SP.; YMC), bestehend aus Sulfopropyl-Funktionen, mit Hilfe des Dionex HPLC-Systems weiter gereinigt. Hiermit sollten Verunreinigungen von anderen ans Talonmaterial bindenden Proteinen abgetrennt werden.

Die das Zielprotein enthaltenen Elutionsfraktionen des ersten Chromatographieschrittes wurden im Verhältnis 1:20 mit entgastem Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,0) verdünnt und auf die mit Natriumphosphatpuffer äquilibrierte Säule geladen. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend mit Natriumphosphat-Puffer inklusive 1 M NaCl unter einem linearen Gradienten (0-50 %) von 20 Säulenvolumina eluiert. Die Absorption bei 280 nm wurde beobachtet und der Proteinpeak manuell gesammelt. Die Hauptfraktionen wurden vereint und bei – 20 °C gelagert.

### **3.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Der Proteingehalt von Elutionsfraktionen wurde sowohl photometrisch als auch durch den Abgleich mit bekannten Lysozymkonzentrationen auf dem Polyacrylamid-Gel bestimmt. Bei beiden Verfahren wurden Hühnereiweißlysozym (HEWL; Sigma) Proteinproben mit bekannter Konzentration angesetzt und Verdünnungsreihen erstellt, um diese als Standardreihen zu verwenden. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Absorption von 280 nm unter Berücksichtigung der individuellen Extinktionskoeffizienten der Lysozyme (<http://web.expasy.org/protparam/>). Bei der Konzentrationsabschätzung mittels SDS-PAGE wurden 5 HEWL Proben mit bekannten Konzentrationen neben die zu bestimmenden Proben unbekannter Konzentration aufgetragen und durch Vergleich der Bandenstärke wurde die Konzentration geschätzt.

### 3.5.4 Aufkonzentration von Proteinlösungen durch Ultrafiltration

Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration aufkonzentriert und umgepuffert. Aufgrund der Größe der rekombinanten Lysozyme wurden Zentrifugationseinheiten mit einer Retentionsgröße  $> 3$  kDa (Amicon Ultra-4, Millipore) verwendet. Die Aufkonzentrierung und Zentrifugation erfolgte bei RT und maximaler Geschwindigkeit zwischen 7 und 15 min nach Angaben des Herstellers.

## 3.6 Immunhistochemische Charakterisierung

### 3.6.1 Antikörperproduktion

Die Generierung polyklonaler Antikörper gegen i-Lys2 und c-Lys3 erfolgte nach dem 3-Monats Standardprotokoll der Firma Eurogentec. Zur Herstellung von Antiseren wurden die Meerschweine insgesamt 4-mal mit den Antigenen in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  (i-Lys2) oder 30  $\mu\text{g}$  (c-Lys3) immunisiert.

### 3.6.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Ausschließlich adulte nicht immun-stimulierte Käfer wurden zur Anfertigung von Gewebeschnitten verwendet. Die Tiere wurden bei 4 °C für mindestens 20 min gehalten bevor sie dekapitiert und ihnen die Elytren entfernt wurden, um das Eindringen des Einbettungsmediums zu erleichtern. Die Käfer wurden in die aus Aluminiumfolie vorgeformten Behältern mit TissueTec® (SAKURA) überführt, mit flüssigem Stickstoff 1 min tiefgefroren und bei  $-20$  °C gelagert.

Frontale und sagittale Gefrierschnitte von Käfern wurden mit einer Dicke von 10  $\mu\text{m}$  im Gefriermikrotom (Leica) bei  $-25$  °C angefertigt. Dazu wurde das eingebettete Gewebe auf einer Stahlscheibe mit einem Tropfen TissueTec in der gewünschten Schneiderichtung fixiert. Die Gewebeschnitte wurden auf nummerierte Objektträger (Menzel-Gläser) transferiert und bei RT für 1 h getrocknet. Es folgte ein 10 min Fixierungsschritt in Aceton bevor die Präparate bis zur weiteren Verwendung in verschlossenen Kunststoffboxen bei  $-20$  °C eingefroren wurden.

### 3.6.3 Immunhistologische Nachweismethoden

Die indirekte immunhistochemische Fluoreszenzfärbung erfolgte unter Verwendung der von Eurogentec hergestellten gegen die Lysozyme i-Lys2 und c-Lys3 gerichteten Antiseren.

### **Immunhistochemie an Gewebeschnitten**

Die aufgetauten und erneut für 10 min in Aceton fixierten Gewebeschnitte wurden durch das 3-malige Waschen mit PBS + 0,5 % Triton-X permeabilisiert und für 1 h in 100 % normalen Ziegen Serum (NGS) geblockt. Die Inkubation der Präparate mit dem Antiserum (1:1000 in PBS/10 % NGS) erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer. Zur Detektion gebundener Antikörper wurden, nach einem erneuten Waschschrift (3 x 10 min PBS/0,5 % Triton-X), die Schnitte mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper anti-Meerschweinchen (1:200 in PBS/10 % NGS) für 45 min inkubiert. Nach diesem Schritt fand das weitere Vorgehen unter Lichtausschluss statt. Durch dreimal 10-minütiges Waschen mit PBS wurden ungebundene Antikörper entfernt bevor die Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 10 µg/ml in PBS) für 10 min durchgeführt wurde. Die kurz angetrockneten Schnitte wurden mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt und bei – 20 °C gelagert.

### **Immunhistochemie an Ganzkörperpräparaten (*whole mount staining*)**

Die Methode der Ganzkörperfärbung wurde zur Untersuchung von zusammenhängenden Gewebestrukturen und Organen verwendet, ohne zuvor Gewebeschnitte anzufertigen. Die in Kapitel 3.1.4 auf Eis präparierten Organe wurden einzeln in die mit PBS gefüllten Vertiefungen einer 48-well-Platte überführt und die Fixierung der Gewebe erfolgte für 45 min in 500 µl einer 4 %-igen Formaldehydlösung in PBS. Nach einem Waschschrift (3 x 30 min in PBS) fand für 1 h die Permeabilisierung in PBS/0,5 % Triton-X statt, bevor die Gewebe für 1 h mit der Blockierungslösung (Roti ImmunoBlock, ROTH) inkubiert wurden. Die Gewebe wurden über Nacht bei 4 °C zusammen mit dem Antiserum (1:400 in Blockierungslösung) geschüttelt. Als Kontrolle diente entweder die Blockierungslösung allein oder das Präimmenserum des jeweiligen Antigens. Nach 3 x 30 minütigen Waschschriften folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:500 in Blockierungslösung) für 2 h unter Lichtausschluss. Nach erneutem Waschen (3 x 30 min in PBS) wurden die Gewebe zuerst für 10 min mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 10 µg/ml in PBS) und anschließend mit 10 min Phalloidin (P1951, Sigma, 50 µg/ml in PBS) gefärbt. Zwischen beiden Inkubationen folgten 3 x 5 min Waschschriften mit PBS. Die Organe wurden auf Objektträger mit Vertiefungen transferiert, mit einem Objektglas bedeckt und sofort mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DM5000 B) dokumentiert. Die Auswertung der Immunfärbungen erfolgte sowohl für die Gewebeschnitte als auch für die Ganzkörperpräparate mit dem Leica DM500 B. Für die Vergleichbarkeit der Dokumentation wurden die gleichen Einstellungen bei Intensität, Filtern und Farbeinstellungen verwendet. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mittels Adobe Photoshop.

## 3.7 Biochemische Charakterisierung

### 3.7.1 Enzymassay mit Isopeptidasesubstrat

Der Nachweis einer Isopeptidaseaktivität kann mit für das Enzym spezifischen chromogenen Substraten erfolgen. Bei Abspaltung des kovalent am Substrat gebundenen Chromogens verschiebt sich das Absorptionsmaximum und ermöglicht eine photometrische Messung des freien Chromophors bei 380 nm. Als Isopeptidasesubstrat wurde L- $\gamma$ -Glytanyl-p-Nitroanilid (Sigma) verwendet, und L-Glutaminsäure-1-(4-Nitroanilid) (Sigma) diente als Negativkontrolle. Von beiden Substraten wurden 10 mM Lösungen in DMSO angesetzt die anschließend 1:100 in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 5 mM Calciumchlorid bei pH 7,5 verdünnt wurden. Etwa 0,1 mg/ml Lysozymlösung oder als Positivkontrolle verwendetes Blutegelsekret wurden dem Ansatz hinzugegeben und schüttelnd über Nacht bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung bei 380 nm erfolgte stündlich im Eon Microplate Spectrophotometer (BioTek).

### 3.7.2 Gewinnung von Blutegelsekret

Blutegelsekret wurde in verschiedenen Aktivitätstest zur Identifizierung der Lysozymaktivität als Positivkontrolle verwendet (Patent WO1991008233 A1). Für die Gewinnung von Blutegelsekret wurden Blutegel (*Hirudo medicinalis*) von der Biebertaler Blutegelzucht GmbH zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden zehn Tiere bei 4°C im Kühlraum mit wenig Wasser in einem Plastikgefäß mit Luftlöchern gehalten und zu Beginn der Sekretgewinnung für 2 h mit 150 mM NaCl, 10 mM Arginin und 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei Raumtemperatur stimuliert. Nach zwei Tagen Inkubation der Tiere bei 4°C im Kühlraum wurden die Blutegel für eine Stunde in 150 mM NaCl, 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) und 1 % Pilocarpin inkubiert. Durch Pilocarpin sekretieren die Blutegel große Mengen Schleim, der durch eine enzymatische Aktivität, mittlerweile bekannt als Destabilase, das Farbsubstrat L- $\gamma$ -Glytanyl-p-Nitroanilid umsetzen kann. Die Schleimabsonderung wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt, nachdem die Gesamtproteinkonzentration photometrisch bestimmt wurde.

### 3.7.3 AktivX TAMRA-FP Serine Hydrolase Sonde

Zum Nachweis einer Serinhydrolase-Aktivität kam eine Fluorophosphonat-Sonden (Thermo Scientific) zum Einsatz. Fluorophosphonat-Sonden sind selektive Suizidsubstrate, die kovalent im aktiven Zentrum von Serinhydrolasen binden. Die Sonden bestehen neben der reaktiven Gruppe,

dem Fluorophosphonat, aus einem Fluoreszenzmarker, in diesem Fall Tetramethylrhodamin (TAMRA), der zur Visualisierung des Zielproteins dient.

**Tabelle 2: Reaktionsansatz zur Detektion von Serinhydrolasen**

	µl
Probe	5
PBS-Puffer	45
Sonde	1
Gesamtvolumen	51

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Proben mit 50 µl Lämmli-Probenpuffer versetzt, zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgt mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Filtereinstellung Cy3.

#### 3.7.4 Charakterisierung der Lyse-Aktivität

Die Lysozymaktivität wurde anhand der Fähigkeit *M. luteus* zu lysieren nach Mohrig und Messner (1968) ermittelt. Durch den Einsatz unterschiedlicher Puffer mit verändertem Calcium-Anteil konnte die Aktivität der Lysozyme unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden. Als erstes erfolgte die Evaluierung der Temperaturoptima bei RT, 30 °C und 37 °C in Tris-Puffer (pH 7,5). Für die pH-abhängige Lyseaktivität wurden Lysehofplatten mit 15 verschiedenen pH-Werten von 3,5 bis 10,5 in 0,5-er Schritten verwendet. Zuerst wurde aus gefriergetrockneten *M. luteus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich) eine Ausgangslösung von 50 mg/ml in Wasser hergestellt. Für die Lysehofplatten wurden 350 mg Agar (Roth) in 30 ml des jeweiligen Puffers (Tabelle 3) inklusive 1 mM CaCl<sub>2</sub> zum Lösen erhitzt und anschließend in einem Wasserbad auf 48 °C abgekühlt, bevor 3 ml der *M. luteus* Ausgangslösung hinzugegeben wurden. Anschließend wurden 7 ml der *M. luteus*-Lösung in eine Petrischale pipettiert und je nach Bedarf mit einem desinfizierten Metallstab 6-12 Löcher von 3 mm Durchmesser in den Agar gestanzt. Von der auf Lyseaktivität zu untersuchenden Proteinlösung wurden 3 µl in die Löcher appliziert. Nach einer Inkubation von 15 h bei 37 °C wurden die Platten und somit die Größe der Lysehöfe mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Geräteeinstellungen Photographs dokumentiert. Die Flächenauswertung der Lysehöfe erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungs-programmes ImageJ v1.48. Für die Untersuchung der CaCl<sub>2</sub>-abhängigen Lyseaktivität der Lysozyme wurde den oben beschriebenen Lysehofplatten statt 1 mM CaCl<sub>2</sub> entweder

kein  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM EDTA oder 5 mM EGTA hinzugegeben und für 15 h bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 3: Verwendete Puffer zur Bestimmung der pH-abhängigen Lyseaktivität**

pH 3,5	} 50 mM Natriumacetat	pH 6,0	} 50 mM Natriumphosphat	pH 8,5	} 50 mM Natriumborat
pH 4,0		pH 6,5		pH 9,0	
pH 4,5		pH 7,0		pH 9,5	
pH 5,0		pH 7,5		pH 10,0	
pH 5,5		pH 8,0		pH 10,5	

### 3.7.5 Chitin-Bindeaktivität

Für die Untersuchung der Chitin-Bindefähigkeit der *H. axyridis* c-Typ-Lysozyme wurden Chitin-Beads (BioLabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Lysozyme, c-Lys4 oder HEWL (Kontrolle), wurden entweder in PBS oder Natriumphosphatpuffer (pH 6) bei RT oder 4 °C mit den Chitin-Beads inkubiert. Im Anschluss wurde sowohl der Überstand als auch die mit den Beads assoziierte Fraktion über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

## 3.8 Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivität

Zur Untersuchung der wachstumshemmenden Eigenschaften der rekombinanten Lysozyme auf Bakterien und Pilzen (siehe Tabelle 4) wurden verschiedene Testverfahren und Kulturbedingungen angewendet.

### 3.8.1 Agardiffusionstest

Mittels Agardiffusionstest wurde der Einfluss rekombinanter Lysozyme auf das Wachstum der Testorganismen *Micrococcus luteus* DSM 20030, *Escherichia coli* D3, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* DSM 2569 und *Staphylococcus epidermidis* DSM 3269 in Festkulturen untersucht. Eine Vorkultur von 4 ml des entsprechenden Mediums wurde mit dem Testorganismus angeimpft und über Nacht bei 30° bzw. 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Kulturen wurden 1:3 in Medium verdünnt und bei Erreichen der  $\text{OD}_{600}=0,5$  zum Herstellen der Platten verwendet. Es folgte eine 1:1000 Verdünnung der Bakterien ( $\text{OD}_{600}=0,0005$ ) im entsprechenden Festmedium. Davon wurden 7 ml in eine Petrischale pipettiert und nach dem Trocknen der Platten 3 mm große Löcher ausgestanzt, so dass 3  $\mu\text{l}$  der Lysozymlösung oder Kontrollproben appliziert werden konnte. Die Testplatten wurden

über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert und die Wachstumszonen der Bakterien mittels VersaDoc, Quantity One Software (4.6.9) und Geräteeinstellung Photographs dokumentiert.

### 3.8.2 Wachstumsinhibitionstest

Dieses Testverfahren wurde angewandt um die wachstumsbeeinflussenden Eigenschaften der Lysozyme auf Bakterien- und Hefezellen in Flüssigkulturen zu untersuchen. Die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Mikroorganismen wurden mit den verschiedenen Lysozymen in 384-multiwell-Platten inkubiert und die Wachstumsunterschiede bestimmt. Dazu wurden alle in der Tabelle 4 aufgelisteten Testorganismen (außer *Botrytis cinereas*) in dem entsprechenden Medium (Tabelle 16) als Übernachtskultur angezogen und am darauffolgenden Tag in frischem Medium für 4 h inkubiert. Die Vorkulturen wurden auf eine  $OD_{600}=0,001$  im entsprechenden Medium verdünnt und jeweils 10 µl in das Loch einer Mikrotiterplatte pipettiert. Weitere 10 µl des in Medium verdünnten Lysozyme wurden hinzugegeben und die Inkubation der Platte folgte im Eon Microplate Spectrophotometer (BioTek) für 16 h bei 37°C. Die  $OD_{600}$  wurde in 20 min Intervallen gemessen und der Lysozymeffekt anhand des Mikroorganismenwachstums bestimmt. Die wachstumsinhibierenden Eigenschaften von Lysozymen auf *Botrytis cinerea* wurden wie von Yudina et al. (2012) untersucht. Dazu wurde *Botrytis cinerea* in YPD-Medium für 3 Tage bei RT angezchtet. Es wurden 100 µl Pilzhyphen enthaltendes Medium mit c-Lys3, c-Lys4 oder HEWL über Nacht inkubiert und anschließend zur Erkennung der Strukturen mit Bromphenolblau gefärbt. Die Proben wurden auf einen Objektträger transferiert und die Betrachtung der Pilzzellwände erfolgte im Leica DM5000 B Mikroskop.

### 3.8.3 Kombinationstest

Zur Untersuchung des kombinierten Effekts von rekombinanten Lysozymen mit bekannten antimikrobiellen Substanzen (Harmonin, Coleoptericin BR021 und Coleoptericin BR023) auf das Wachstum von grampositiven (*M. luteus* DSM 20030) und gramnegativen (*E. coli* D31) Bakterien, wurde der in 1.8.2 beschriebene Wachstumsinhibitionstest erweitert. Dem oben beschriebenen Inkubationsansatz wurde entweder Harmonin, Coleoptericin BR021 oder BR023 in verschiedenen Konzentrationen (von 200 µM bis 3,1 µM) bei gleichbleibender Lysozymkonzentration hinzugegeben und die Platten im Eon Microplate Spectrophotometer (BioTek) für 16 h bei 37°C inkubiert. Die minimale Inhibitionskonzentration (MIC), bei der kein Wachstum der Bakterien zu verzeichnen war, wurde sowohl für Harmonin, Coleoptericin BR021 und Coleoptericin BR023 alleine als auch für dessen Kombination mit Lysozymen bestimmt.

Tabelle 4: Kulturbedingungen

Organismus	Medium	Temperatur
<i>Escherichia coli</i> D31	LB-Medium	37 °C
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030		
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 2569		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 3269	TSB-Medium	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071		
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10		
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 1517	Mueller-Hinton-Medium 2	37 °C
<i>Listeria monocytogenes</i> DSM 20600		
<i>Listeria marthii</i> DSM 23813		
<i>Listeria fleischmannii</i> DSM 24998		
<i>Listeria grayi</i> DSM 20601		
<i>Listeria innocua</i> DSM 20649	Herz-Hirn-Infusion-Medium	37 °C
<i>Listeria welshimeri</i> DSM 20650		
<i>Listeria seeligeri</i> DSM 20751		
<i>Listeria rocourtiae</i> DMS 22097		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPD-Medium	30 °C
<i>Botrytis cinereas</i>	YPD-Medium	30 °C

## 4 Ergebnisse

Der invasive Marienkäfer *H. axyridis* besitzt ein breites Repertoire an antimikrobiellen Substanzen, die sein Immunsystem stärken und ihn zu einem erfolgreichen Einwanderer werden lassen (Vilcinskas et al., 2013a). Zu den als antimikrobiellen Peptiden (AMPs) bezeichneten Substanzen zählen neben den Attacinen, Coleopterocinen und Defensinen auch Lysozyme. Insgesamt neun für Lysozyme kodierende Gensequenzen wurden anhand einer Transkriptomanalyse in *H. axyridis* identifiziert, deren Rolle in Insekten bis heute größtenteils ungeklärt ist (Vilcinskas et al., 2013a). Somit bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Charakterisierung von Insektenlysozymen des Asiatischen Marienkäfers mit Fokussierung auf ein i-Typ- und zwei c-Typ-Lysozyme. Für die Charakterisierung wurden zunächst die Proteine im Hefeexpressionssystem rekombinant dargestellt und im weiteren Verlauf neben den enzymatischen Eigenschaften auch Lokalisation und Expression untersucht. Anschließend sollten die Fragen geklärt werden, ob die Lysozyme an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind und ob mögliche Interaktionen mit weiteren von *H. axyridis* in die Hämolymphe sekretierten antimikrobiellen Substanzen Einzelaktivitäten verstärken können.

### 4.1 Identifizierung und rekombinante Darstellung von potentiell katalytisch aktiven i-Typ und c-Typ-Lysozymen des Asiatischen Marienkäfers *H. axyridis*

Die anhand der *H. axyridis* Transkriptomanalyse identifizierten für Lysozyme kodierenden Sequenzabschnitte sollten mit in der *National Center for Biotechnology* (NCBI) Datenbank hinterlegten und publizierten Sequenzen verglichen und auf das Vorhandensein von potentiellen katalytischen Motiven untersucht werden (Vilcinskas et al., 2013a). Die Auswahl der Lysozymvergleichsequenzen erfolgte nach drei Hauptkriterien: nachgewiesene Enzymaktivität oder Vorhandensein einer Kristallstruktur und/oder Repräsentationsfähigkeit für die Klasse der Insekten.

#### 4.1.1 Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung potentiell katalytisch aktiver i-Typ-Lysozyme

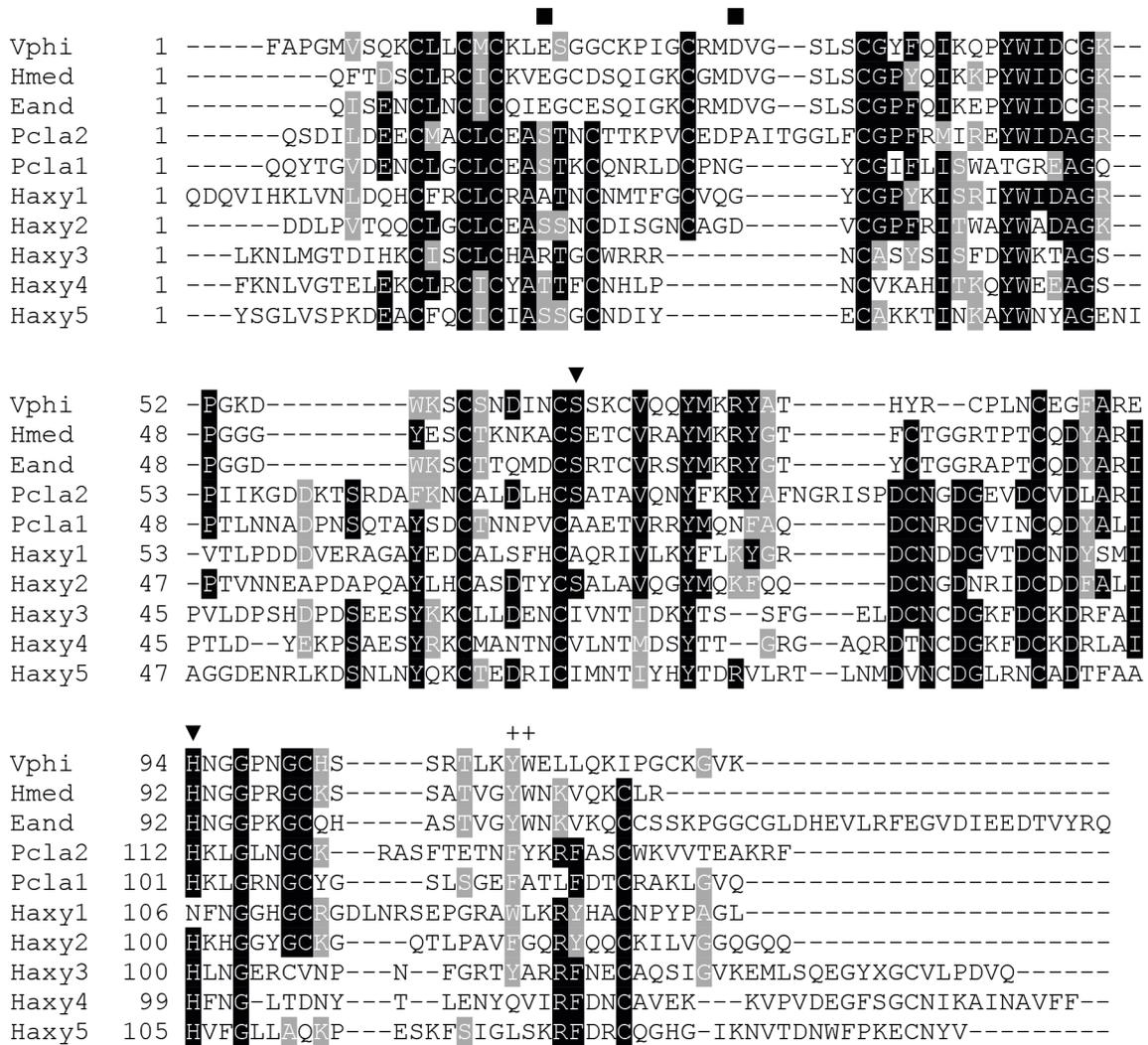
Nach der Entdeckung der i-Typ-Lysozyme in der Muschel *Tapes japonica* 1979, wurden in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche i-Typ-Lysozyme in den unterschiedlichsten Organismen der Invertebraten identifiziert (McHenery et al., 1979). Heutzutage werden zwei bekannte enzymatische Aktivitäten, die Muramidase-Aktivität und die Isopeptidase-Aktivität, den i-Typ-Lysozymen zugeschrieben, die unabhängig voneinander vorliegen können. Einige i-Typ-Lysozyme weisen keine der bekannten Enzymaktivitäten auf. Die ursprünglich den c-Typ-Lysozymen zugeschriebene

Muramidase-Aktivität besteht aus der Fähigkeit  $\beta$ -(1,4)-glykosidische Verbindungen in der Peptidoglykanschicht hydrolysieren und somit Bakterienzellwände aufspalten zu können. Diese katalytische Aktivität wird in i-Typ-Lysozymen durch die Carbonsäuren der Aminosäureseitenketten von Glu18 und Asp30 vermittelt. Die Inversion oder Deletion von Glu und/oder Asp resultiert im Verlust der Muramidase-Aktivität (Goto et al., 2007). Die zweite enzymatische Aktivität wurde erstmals für das i-Typ-Lysozym des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) beschrieben (Baskova & Nikonov, 1991; Zavalova et al., 1996). Welche Aminosäuren im aktiven Zentrum essentiell für die Isopeptidase-Aktivität sind, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Dennoch korreliert in den meisten bisher in der Literatur beschriebenen Lysozymen das Vorhandensein der Aminosäuren Serin und Histidin mit einer nachweisbaren Enzymaktivität (Abbildung 7).

**Tabelle 5: Eigenschaften der *H. axyridis* i-Typ-Lysozyme**

<b>i-Typ-Lysozym</b>	<b>Aminosäuren (reifes Protein)</b>	<b>Signalsequenz</b>	<b>MW (kDa) (reifes Protein)</b>	<b>Prognostizierter pI (reifes Protein)</b>	<b>Anzahl Cysteine (reifes Protein)</b>
<b>i-Lys1</b>	140	22	15,9	7,05	12
<b>i-Lys2</b>	133	19	14,3	4,67	12
<b>i-Lys3</b>	146	19	16,6	6,46	13
<b>i-Lys4</b>	145	17	16,4	6,33	11
<b>i-Lys5</b>	149	20	16,9	6,94	11

Die nachfolgende Sequenzanalyse hatte zum Ziel, die fünf in *H. axyridis* identifizierten und als i-Lys1, i-Lys2, i-Lys3, i-Lys4 und i-Lys5 benannten Lysozymsequenzen näher zu charakterisieren und mit bekannten i-Typ-Lysozymen zu vergleichen. Anhand dieser Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf mögliche Enzymaktivitäten, unter anderem aufgrund des Vorhandenseins wichtiger katalytischer Aminosäurereste, gezogen werden. Die Länge der Aminosäuresequenzen, die vorhergesagten Signalpeptide (Hiller et al., 2004), die kalkulierten molekularen Massen und isoelektrischen Punkte (<http://web.expasy.org/protparam>) sowie die Anzahl der Cysteine variierten zwischen den einzelnen i-Typ-Lysozymen (Tabelle 5). Hervorstechend war der niedrige pI des i-Lys2 von 4,7, während die anderen Lysozyme einen prognostizierten pI im neutralen Bereich zwischen 6,5 -7 aufwiesen. Kein einziger isoelektrischer Punkt lag im basischen Bereich. Der für i-Typ-Lysozyme typische hohe Anteil an Cysteinen zeigt sich auch hier (ca. 8,5%) und variiert innerhalb der i-Typ-Lysozymsequenzen von *H. axyridis* nur gering.



**Abbildung 7: Multipler Sequenzvergleich der fünf i-Typ-Lysozyme (i-Lys1 – i-Lys5) mit experimentell nachgewiesenen Muramidase- oder Isopeptidase-Aktivität besitzenden i-Typ-Lysozymen von der Venusmuschel *Venerupis philippinarum* (Vphi), dem medizinischem Blutegel *Hirudo medicinalis* (Hmed) und dem Regenwurm *Eisenia andrei* (Eand). Die zwei i-Typ-Lysozyme des amerikanischen Sumpfkrebse *Procambarus clarkii* Pclysi1(Pcla1, zeigte keine der möglichen Aktivitäten) und Pclysi2 (Pcla2, zeigte nur eine Isopeptidase-Aktivität) wurden in den Vergleich mit einbezogen. Die Positionen der für die Muramidase-Aktivität benötigten Glutamat (E) und Aspartat (D) Reste sind mit einem Quadrat markiert (■). Die Positionen des Serin (S) und Histidin (H) Aminosäurerestes, welche möglicherweise für die Isopeptidase-Aktivität benötigt werden, sind durch ein Dreieck markiert (▼). Der Sequenzvergleich beschränkt sich auf die wesentlichen Sequenzabschnitte.**

Bei dem Sequenzalignment wurden die fünf i-Typ-Lysozyme mit weitere Invertebraten-Lysozymen verglichen, die auf mRNA- oder Proteinebene in der Literatur beschrieben worden sind. Alle Sequenzen wurden ohne prognostiziertes Signalpeptid (reife Proteine) betrachtet und das multiple Sequenzalignment wurde mit ClustalW ([www.genome.jp/tools/clustalw/](http://www.genome.jp/tools/clustalw/)) erstellt (Abbildung 7). Dabei zeigte sich, dass die für die Muramidase-Aktivität benötigten konservierten Aminosäurereste von Glutamat und Aspartat in keiner der *H. axyridis* Lysozymsequenzen vorlagen. Die möglicherweise

an der Isopeptidase-Aktivität beteiligten Aminosäurereste von Serin und Histidin sind nur in der Primärstruktur von i-Lys2 konserviert.

Das Vorhandensein der potentiell katalytisch aktiven Aminosäurereste von Serin und Histidin in i-Lys2 und der niedrige isoelektrische Punkt des Lysozyms waren ausschlaggebend für die Entscheidung, primär dieses i-Typ-Lysozym rekombinant darzustellen und im weiteren Verlauf dieser Arbeit zu charakterisieren.

#### 4.1.2 Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung potentiell katalytisch aktiver c-Typ-Lysozyme

Wie oben erwähnt besteht die enzymatische Aktivität der c-Typ-Lysozyme in der Hydrolyse von Bakterienzellwänden. Die für die Muramidase-Aktivität relevanten konservierten Aminosäurereste werden aufgrund ihrer Lokalisation in der c-Typen-Lysozymsequenz als Glu35 und Asp52 bezeichnet. Auch hier führt die Inversion oder Deletion von einer der beiden wichtigen katalytischen Aminosäurereste zum Aktivitätsverlust der Muramidase (Irwin, 2004; Jain et al., 2001; Malcolm et al., 1989).

Die Eigenschaften der vier c-Typ-Lysozyme c-Lys1, c-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 aus *H. axyridis* (Tabelle 6) zeigen ein homogenes Bild in Größe sowie Anzahl der Cysteine, die möglicherweise, wie für HEWL gezeigt, vier Disulphidbrücken ausbilden (Blake et al., 1967; Phillips, 1967). Ein offensichtlicher Unterschied liegt in den isoelektrischen Punkten der *H. axyridis* c-Typ-Lysozyme. Während für c-Lys1, c-Lys2 und c-Lys4 ein basischer isoelektrischer Punkt vorhergesagt wird, besitzt c-Lys3 prognostizierten isoelektrischen Punkt im sauren Bereich.

**Tabelle 6: Eigenschaften der *H. axyridis* c-Typ-Lysozyme (pI = isoelektrischer Punkt)**

c-Typ-Lysozym	Aminosäuren (reifes Protein)	Signalsequenz	MW (Da) (reifes Protein)	Prognostizierter pI (reifes Protein)	Anzahl Cysteine (reifes Protein)
<b>c-Lys1</b>	118	19	13212	8,95	8
<b>c-Lys2</b>	118	24	13624	9,13	8
<b>c-Lys3</b>	123	20	13751	5,46	8
<b>c-Lys4</b>	123	20	14011	8,18	8

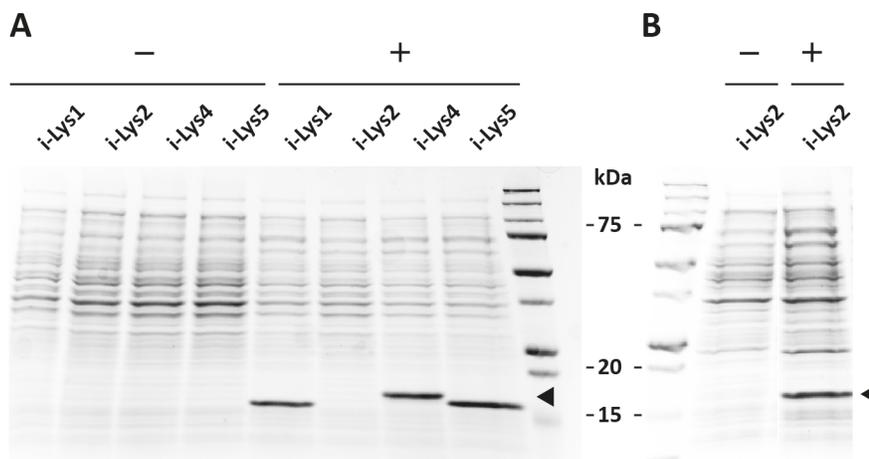
Das Sequenzalignment der c-Typ-Lysozym kodierenden *H. axyridis* Sequenzen mit ausgewählten Arthropoden-Lysozymen sowie humanem Lysozym und HEWL wurde wie oben beschrieben mit



rekombinante Darstellung und Charakterisierung des c-Lys3 und c-Lys4. Das c-Lys2 wurde als Vertreter für c-Typ-Lysozyme ohne prognostizierte Muramidase-Aktivität ebenfalls heterolog exprimiert und charakterisiert.

#### 4.1.3 Rekombinante Darstellung von Lysozymen in *E. coli*

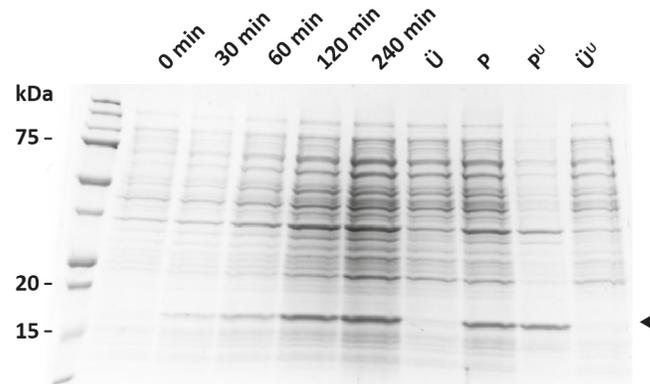
Für die Charakterisierung der Lysozyme von *H. axyridis* wurden diese in einem ersten Schritt rekombinant hergestellt. Als erstes Expressionssystem wurde das gramnegative Bakterium *E. coli* verwendet, welches den Vorteil einer hohen Ausbeute an rekombinantem Protein in kurzer Zeit bietet. Die kodierenden DNA-Sequenzen von den i-Typ-Lysozymen i-Lys1, i-Lys2, i-Lys4 und i-Lys5 wurden im für *E. coli* optimierten Codon-Gebrauch durch Eurofins MWG Operon synthetisch hergestellt und in den pASK-IBA33plus Vektor eingefügt, sodass die Sequenzen mit einem C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag fusioniert wurden. Durch die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli* TOP10-Zellen wurden die rekombinanten i-Typ-Lysozyme i-Lys1, i-Lys4 und i-Lys5 in per SDS-PAGE und Coomassiefärbung detektierbaren Mengen gebildet. Eine Expression des i-Lys2 war auf diese Weise nicht nachweisbar (Abbildung 9A).



**Abbildung 9: SDS-PAGE Analyse der in *E. coli* heterolog exprimierten i-Typ-Lysozym Expression.** Vergleich zwischen *E. coli* TOP10 Kulturen ohne und mit Induktion durch IPTG (A). Expression des i-Lys2 in BL21 *E. coli* mit und ohne IPTG Induktion (B).

Weitere Expressionsversuche erfolgten mit einem zweiten i-Lys2 Konstrukt, dessen Codon-Gebrauch neu angepasst wurde. Zusätzlich wurden Expressionsversuche mit zwei weiteren *E. coli*-Expressionsstämmen (BL21, Origami™) in LB- und TB-Medium sowie zu verschiedenen Induktionszeitpunkten und Temperaturbedingungen durchgeführt. Unter Verwendung des neu angepassten Gens konnte in BL21-Zellen i-Lys2 im Gesamtzellextrakt durch SDS-PAGE mit

Coomassiefärbung nachgewiesen werden. Dabei war für eine nachweisbare Expression eine frühe Induktion bei OD<sub>600</sub> 0,5 und die Verwendung von LB-Medium ausschlaggebend (Abbildung 9B). Da das Protein nach Ultraschallbehandlung der Zellen in der unlöslichen Zellfraktion erhalten wurde, ist von der Bildung von *inclusion bodies* auszugehen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: SDS-PAGE Analyse der löslichen (Ü = Überstand) und unlöslichen (P = Pellet) *E. coli* BL21 Zellbestandteile im zeitlichen Verlauf der i-Lys2 Expression nach Induktion mit IPTG.** Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (U).

Weitere Versuche in *E. coli* zur Darstellung des i-Lys2 mit der neu angepassten Sequenz ohne His<sub>6</sub>-Tag (native Sequenz) führten zu keinen detektierbaren Proteinmengen. Von der Durchführung von Rückfaltungsprotokollen des als *inclusion bodies* vorliegenden i-Lys2 wurde aufgrund der geringen Mengen an erhaltenem Protein abgesehen. Versuche zur weiteren Aufarbeitung von i-Lys1, i-Lys4 und i-Lys5, die wahrscheinlich ebenfalls als *inclusion bodies* gebildet werden, wurden nicht durchgeführt, da aufgrund der bioinformatischen Analysen unklar war, ob diese Proteine eine katalytische Aktivität besitzen.

Die Sequenzen der c-Typ-Lysozyme sollten nicht äquivalent zu den i-Typ-Lysozymen mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, sondern mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag fusioniert, rekombinant dargestellt werden. Diese unterschiedliche Positionierung des His<sub>6</sub>-Tags wurde gewählt, weil bei den i-Typ-Lysozymen die C-Termini, bei den c-Typ-Lysozymen jedoch die N-Termini den geringsten Konservierungsgrad aufwiesen. Die kodierenden DNA-Sequenzen wurden für die c-Typ-Lysozyme c-Lys1, c-Lys3 und c-Lys4 im für *E. coli* optimierten Codon-Gebrauch durch Eurofins MWG Operon synthetisch hergestellt und in den pASK-IBA37plus Expressionsvektor eingefügt. Die Transformation von *E. coli* mit den für die c-Typ-Lysozyme kodierenden Expressionskonstrukten erwies sich als nicht möglich.

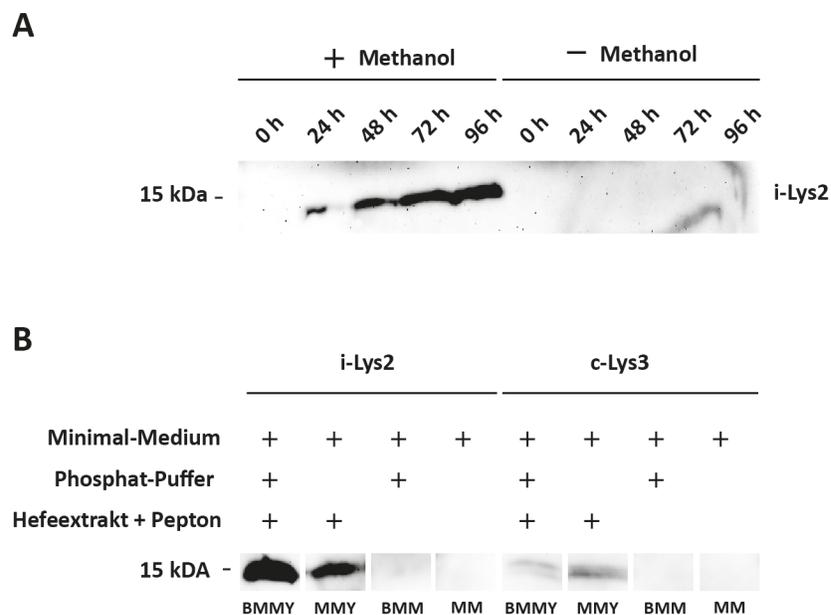
#### 4.1.4 Rekombinante Darstellung von i-Typ- und c-Typ-Lysozymen in *P. pastoris*

Da es nicht gelang *E. coli* mit dem für die c-Typ-Lysozyme kodierenden Expressionskonstrukten zu transformieren und das i-Lys2 ohne Bildung von *inclusion bodies* funktional zu exprimieren, erfolgte die rekombinante Darstellung der Lysozyme im weiteren Verlauf im eukaryotischen Expressionssystem. Die einfach handhabbare methylo-trophe Hefe *P. pastoris* bot, trotz längerer Expressionszeit und geringerer Ausbeute als *E. coli*, den Vorteil, dass sie rekombinante Proteine korrekt falten und posttranslational modifizieren kann. Für die heterologe Expression wurde das PichiaPink™ Expression System verwendet, welches sowohl vier verschiedene *P. pastoris*-Stämme als auch den pPink $\alpha$ -HC-Vektor und die für die Expression benötigten Medien enthielt. Durch die Verwendung des pPink $\alpha$ -HC-Vektors konnten rekombinante Proteine erhalten werden, die N-terminal mit dem  $\alpha$ -Faktor von *S. cerevisiae* fusioniert waren. Dadurch erfolgt ein Export der rekombinanten Proteine in den Extrazellularraum, einhergehend mit den entsprechenden posttranslationalen Modifikationen. Die aus der bioinformatischen Analyse hervorgehende Annahme, dass das i-Lys2 als einziges i-Typ-Lysozym eine katalytische Aktivität besitzen könnte, führte dazu, dass nur das synthetische Gen von i-Lys2 im für *P. pastoris* optimierten Codon-Gebrauch von Eurofins MWG Operon in den Vektor ligiert wurde. Weiterhin wurden drei Vektorkonstrukte mit den für die c-Typ-Lysozyme c-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 kodierenden DNA-Sequenzen erstellt. Um eine selektivere und sensitivere Detektion und Aufreinigung der rekombinanten Proteine zu ermöglichen, wurden die in das Expressionsplasmid ligierten Sequenzen zuvor mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag modifiziert. Auf die Verwendung eines N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags wurde bei den c-Typ-Lysozymen verzichtet, da eine Beeinträchtigung der Abspaltung des  $\alpha$ -Faktors möglich erschien. Die erfolgreiche Transformation durch Elektroporation von *P. pastoris* mit den in der TRP2-Region linearisierten Vektoren zeigte sich im Wachstum von weißen und pinken Kolonien, bei denen die Expressionskassette in das Hefegenom integriert worden war.

##### 4.1.4.1 Evaluierung der Expressionsbedingungen

Für das Testen der Expressionsbedingungen wurden vier verschiedene *P. pastoris*-Stämme, der zeitliche Einfluss auf die Proteinexpression und unterschiedliche Medienzusammensetzungen untersucht. Die Induktion der Expression erfolgte durch den Wechsel der Zellen in Methanol-haltiges Medium, sobald sich die Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Es wurden täglich 0,5 % Methanol der Expressionskultur hinzugegeben, um die Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle aufrecht zu erhalten. Ein höherer Anteil an Methanol führte zu einer reduzierten Viabilität der Zellen und somit zu einer verringerten Ausbeute an heterologem Protein (Daten nicht

gezeigt). Die für die Expression verwendeten *P. pastoris*-Stämme unterschieden sich in der Deletion von Proteasegenen, um dem Abbau der rekombinant gebildeten Proteine durch Hefeigene Proteasen entgegen zu wirken. Mit den vier verschiedenen Stämmen wurden jedoch keine unterschiedlichen Proteinausbeuten beobachtet, so dass im weiteren Versuchsverlauf der Stamm 1 als Expressionsstamm verwendet wurde. Zur Optimierung der Ausbeuten wurden die Proteinmengen des i-Lys2 in Überständen von in BMMY-Medium kultivierten Hefen nach ein, zwei, drei, vier und sechs Inkubationstagen verglichen. Die maximale Proteinmenge wurde am Tag vier erhalten. Das Ergebnis von Tag sechs unterschied sich nicht wesentlich (Abbildung 11A). Weiterhin wurden insgesamt vier verschiedene Kulturmedien zur Optimierung der Ausbeute getestet: ungepuffertes Methanol-Medium (MM), gepuffertes Methanol-Medium (BMM), ungepuffertes komplexes Methanol-Medium (MMY) oder komplexes, gepuffertes Methanol-Medium (BMMY). Auffallend war das Absinken des pH-Wertes bei dem ungepufferten Medien (MM; MMY) von pH 6,5 zu Beginn der Expression auf pH 3 nach 4 Tagen, während der pH-Wert bei den gepufferten Medien (BMMY; BMM) bis zum Ende der Expression konstant bei 6 blieb. Die größten Mengen an i-Lys2 wurden unter Verwendung von BMMY-Medium beobachtet, die größten Mengen an c-Lys3 bei Verwendung von MMY-Medium (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: Western-Blot Analyse der zeit- und medienabhängigen Expression von i-Lys2 und c-Lys3 in *P. pastoris* mit gegen den His<sub>6</sub>-Tag gerichteten Antikörper.** Nachweis der zeitabhängigen Konzentration des rekombinanten i-Lys2 im Hefeüberstand mit und ohne Expressionsinduktion durch Methanol (**A**). Nachweis der medienabhängigen Konzentration der rekombinanten Proteine i-Lys2 und c-Lys3 im Hefeüberstand 96 h nach Expressionsinduktion mit Methanol (**B**).

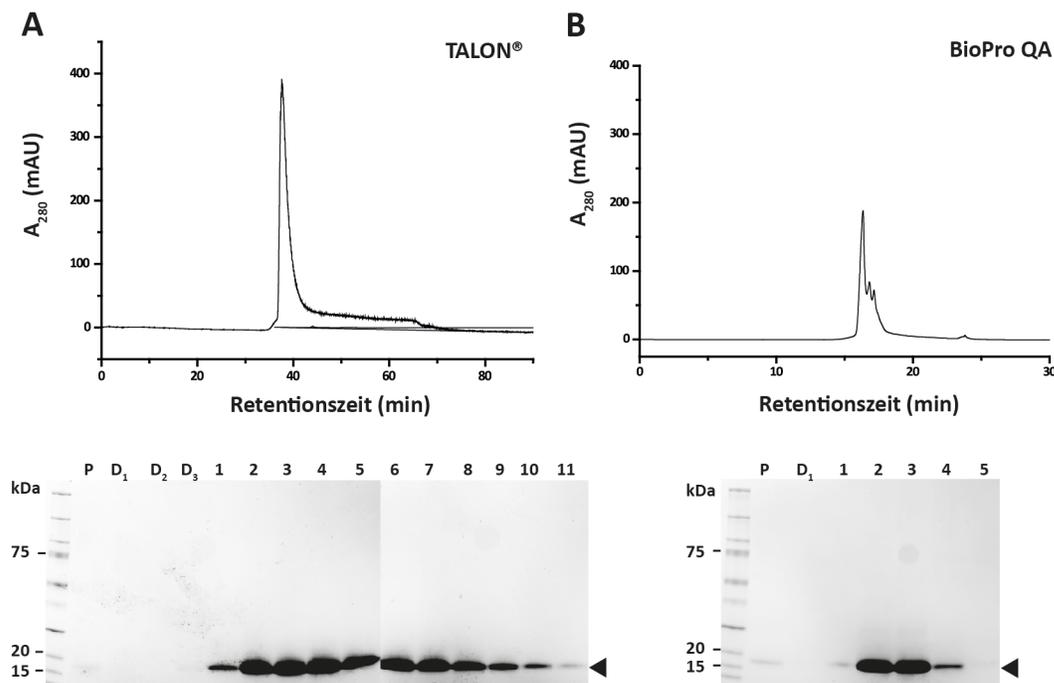
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter der Verwendung von Komplexmedium am meisten Protein rekombinant hergestellt wurde, wobei kein eindeutiger Vorteil für ein gepuffertes Medium zu erkennen war. Aufgrund des geringen Ausbeuteunterschiedes zwischen BMMY- und MMY- Medium wurde in den weiteren Expressionen BMMY-Medium verwendet, um einen konstant bleibenden pH-Wert innerhalb der Expressionskultur zu gewährleisten. Die aus dieser Versuchsreihe eruierten Expressionsbedingungen, wie die Verwendung von Stamm 1 als Expressionsstamm und die Dauer der Expression von 4 Tagen in BMMY-Medium bei pH 6 wurden für alle weiteren Hefe-Expressionen (c-Lys2 und c-Lys4) und „*up-scale*“ Experimente standardmäßig angewandt. Unter diesen Bedingungen wurden 5-10 erfolgreich transformierte Klone getestet und der Klon mit der höchsten Proteinausbeute in die anschließende Großproduktion eingesetzt.

#### **4.1.4.2 Aufreinigung des i-Lys2 mit und ohne C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag**

Nach erfolgreicher Expression, die standardmäßig durch Western-Blot-Analyse überprüft wurde, erfolgte die präparative Aufreinigung des i-Lys2 aus dem Hefeüberstand in zwei Schritten. Als erster Schritt wurde eine Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) durchgeführt, die aufgrund des His<sub>6</sub>-Tags des rekombinanten Proteins einen hohen Reinigungsgrad ermöglichte. Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte aufgrund des niedrigen isoelektrischen Punktes und der daraus resultierenden negativen Ladung des Proteins bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8,5 durch Anionenaustausch-Chromatographie.

Für eine Aufreinigung dienten 1-2 Liter Hefeüberstand als Ausgangsmaterial. Bei der Probenvorbereitung wurden mittels Zentrifugation unlösliche Zellbestandteile vom Überstand getrennt und anschließend der pH-Wert des Überstandes von pH 6,0 auf 7,5 eingestellt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde durch erneutes Zentrifugieren und zusätzliches Filtrieren entfernt. Im ersten Reinigungsschritt (IMAC) wurde Talon, welches Kobalt als Chelatkomplex gebunden hat, als Säulenmaterial verwendet. Die Elution der Hexa-Histidin-markierten Zielproteine erfolgt bei 20 mM Imidazol. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und mit Hilfe von Western-Blot-Analysen oder Färbung mit Coomassie auf das Vorhandensein des Zielproteins untersucht (Abbildung 12A). Als Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung dienten Fraktionen mit einer deutlich sichtbaren Proteinbande. Die Hauptbande befand sich ca. auf der Höhe der 15 kDa Markierung und entsprach somit der theoretischen molekularen Masse des i-Lys2 inklusive His<sub>6</sub>-Tag von ungefähr 14 kDa. Für die weitere Reinigung über eine Anionenaustauscher-Säule (Bio-Pro QA) wurde vor dem Beladen die Imidazol-Konzentration der Proteinlösung durch Verdünnen mit salzfreiem und entgastem ddH<sub>2</sub>O

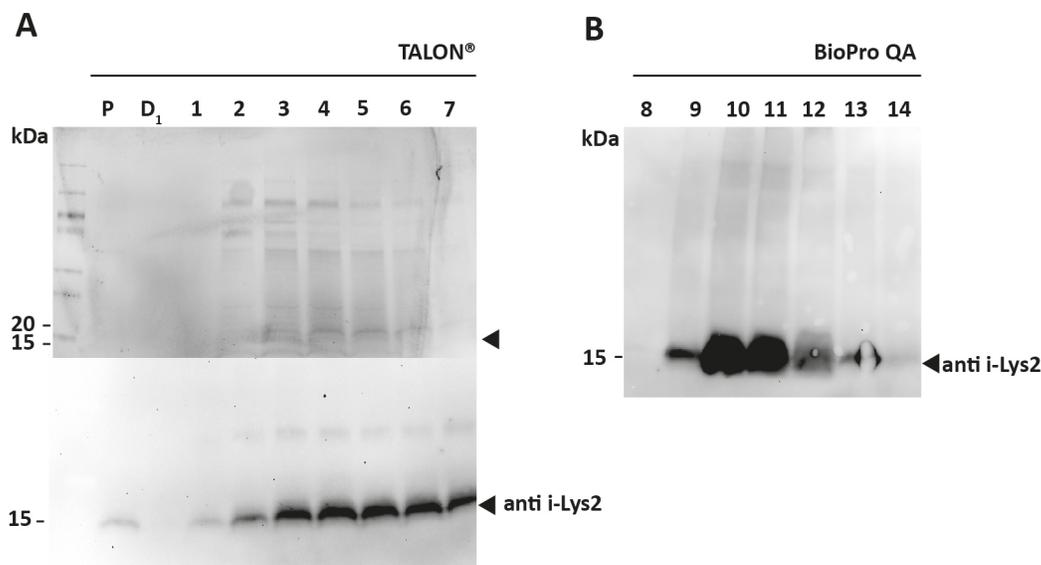
auf 30 mM verringert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradient von 0 bis 1 M NaCl. Dabei eluierten die an die positiv geladene stationäre Phase gebundenen Proteine bei 200 mM NaCl von der Säule. Mit diesem zweiten Schritt wurde neben einer weiteren Reinigung eine Konzentrierung der Probe sowie eine Umpufferung in einen Imidazol-freien Puffer erreicht (Abbildung 12B). Die Hauptfraktion wurde über einen Cut-Off-Filter auf 10 mM Tris-HCL (pH 7,5) umpuffert und aufkonzentriert. Insgesamt wurden aus etwa 10 l Hefekultur 8,5 mg zweifach gereinigtes i-Lys2 erhalten, dessen Konzentration sowohl photometrisch als auch durch den Vergleich der Bandenstärke mit bekannten Konzentrationen des HEWL bestimmt wurde. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten i-Lys2 wurde mittels MALDI-TOF-Analyse und Edman-Abbau im Biochemischen Institut verifiziert. Die verifizierte Endprobe wurde sowohl für die biochemische Charakterisierung verwendet als auch zur Produktion von gegen das i-Lys2 gerichtete Antiseren eingesetzt.



**Abbildung 12: Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinanten i-Lys2 und korrespondierende SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen.** Im ersten Schritt wurde das i-Lys2 durch Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC) gereinigt (A). Im zweiten Schritt erfolgte die Aufreinigung durch Anionenaustausch-Chromatographie (B) (P = Probe; D = Durchlauf; 1-11 und 1-5 das Zielprotein enthaltende Fraktionen).

Da eine Beeinträchtigung der Proteinaktivität durch Modifikationen der Aminosäuresequenz nicht auszuschließen ist, sollte das i-Lys2 erneut ohne His<sub>6</sub>-Tag (i-Lys2oCHis) rekombinant hergestellt werden. Deshalb wurde, nachdem die Aufreinigungsbedingungen für i-Lys2 eruiert worden waren und das gegen das i-Lys2 gerichtete Antiserum zur Verfügung stand, ein weiteres Vektorkonstrukt von

Eurofins verwendet. Dieses enthielt die für das i-Lys2 kodierende native Sequenz ohne c-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Das i-Lys2oCHis wurde äquivalent zu i-Lys2 rekombinant exprimiert und anschließend über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Die Proteine eluierten bei 200 mM NaCl. Mit Hilfe des gegen das i-Lys2 gerichteten Antiserums konnte in einzelnen Fraktionen das i-Lys2oCHis nachgewiesen werden (Abbildung 13A). Allerdings war die Proteinmenge so gering, dass sie außerhalb des mit der Coomassiefärbung detektierbaren Bereiches lag. Die Fraktionen im ersten Reinigungsschritt enthielten nicht nur wenig Zielprotein, sondern auch im Vergleich zu IMAC-Hauptfraktionen zahlreiche Hefeproteine des Überstandes, weshalb ein weiterer Aufreinigungsschritt nachgeschaltet wurde. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden 1:20 in entgastem ddH<sub>2</sub>O verdünnt und auf die Säule geladen. Das Zielprotein eluierte bei 200 mM NaCl und es wurden konzentriertere, weniger Hefeproteine enthaltende Fraktionen generiert (Abbildung 13B). Diese Proteinfraction wurde anschließend zusammen mit dem His<sub>6</sub>-Tag fusionierten i-Lys2 zur Charakterisierung in die Aktivitätstests eingesetzt.



**Abbildung 13: SDS-PAGE und Western-Blot Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten i-Lys2 ohne C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag.** Im ersten Schritt wurde das i-Lys2 ohne C-His<sub>6</sub>-Tag durch Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt und die Fraktionen sowohl im SDS-PAGE aufgetrennt als auch mit einem gegen das i-Lys2 gerichteten Antiserum im Western-Blot nachgewiesen (anti-Lys2) (A). Die Fraktionen der zweiten Anionenaustausch-Chromatographie wurden durch ein gegen das i-Lys2 gerichtetes Antiserum im Western-Blot detektiert (B) (P = Probe; D = Durchlauf; 1-14 das Zielprotein enthaltende Fraktionen).

#### 4.1.4.3 Aufreinigung des c-Lys2 mit c-terminalem His<sub>6</sub>-Tag

Aus der zuvor durchgeführten Sequenzanalyse (siehe 4.1.2) ging hervor, dass dem c-Lys2 die für die Muramidase-Aktivität relevante katalytische Aminosäure Aspartat fehlt. Um die Hypothese, dass der

Austausch dieser Aminosäure mit der fehlenden Muramidase-Aktivität einhergeht, auch für Insektenlysozyme zu prüfen, wurde das c-Lys2 im *P. pastoris* Expressionssystem unter den zuvor evaluierten Bedingungen mit c-terminalen His<sub>6</sub>-Tag heterolog exprimiert. Die IMAC erfolgte mit 1,5 Litern aufbereitetem Hefeüberstand wie in 4.1.4.2 beschrieben und das c-Lys2 eluierte nach dem Laden bei 20 mM Imidazol von der Säule. Die Analyse der Proteinfractionen erfolgte mittels Auftrennung im SDS-Gel und anschließender Coomassie-Färbung (Abbildung 14). Dabei konnte nur eine leicht sichtbare Proteinbande mit einer molekularen Masse von etwa 14 kDa in den Hauptfraktionen detektiert werden. Trotz vergleichbarer Expressionsbedingungen wurden hier weitaus geringere Ausbeuten als für i-Lys2 erzielt. Es ist anzunehmen, dass das c-Lys2 in einer sehr geringen Menge exprimiert wurde und somit wenig rekombinante Proteine im Überstand präsent waren. Eine Western-Blot-Analyse des Überstandes konnte kein mit dem His<sub>6</sub>-Tag fusioniertes Protein nachweisen und unterstützte somit die zuvor getroffene Annahme.



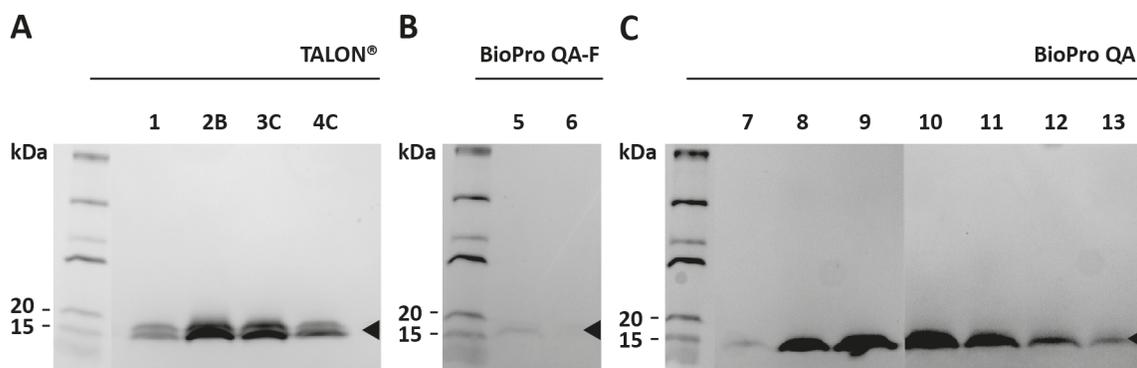
**Abbildung 14:** SDS-PAGE Analyse der IMAC-Fractionen des rekombinanten c-Lys2 und aufkonzentrierte Endprobe des c-Lys2 (5\*). (P = Probe; D = Durchlauf; 1-5 das Zielprotein enthaltende Fraktionen)

Die als Hauptfraktionen identifizierten Proben wurden über einen Cut-Off-Filter in 10 mM Tris-HCL (pH 7,5) umgepuffert und um das 100-fache aufkonzentriert. Die so erhaltene Endprobe (Abbildung 14; 5\*) wurde zur Untersuchung der Muramidase-Aktivität in 4.2.1 eingesetzt.

#### 4.1.4.4 Aufreinigung des c-Lys3 mit c-terminalem His<sub>6</sub>-Tag und modifiziertem $\alpha$ -Signalsequenzmotiv

Die präparative Aufreinigung des c-Lys3, das im Besitz der für die Muramidase-Aktivität relevanten katalytisch aktiven Aminosäurereste ist, erfolgte in zwei Schritten: im ersten Schritt mittels IMAC über das C-terminale His<sub>6</sub>-Tag und im zweiten Schritt dem pI im sauren Bereich entsprechend über Anionenaustausch-Chromatographie bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8,5. Die Probenpräparation und Durchführung der IMAC verlief analog zu der von i-Lys2 (siehe 4.1.4.2). Die Analyse der bei 20

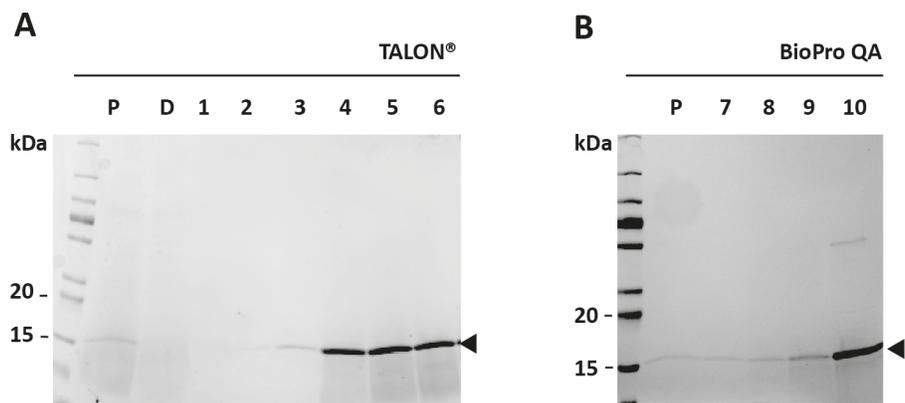
mM Imidazol eluierten Hauptfraktionen durch Auftrennung im SDS-Gel und Coomassie-Färbung zeigte, dass das c-Lys3 bei 15 kDa als Proteindoppelbande vorlag (Abbildung 15A). Die N-terminale Sequenzierung beider Banden ergab, dass die für die Sekretion benötigte  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz nur bei der unteren Bande an der vorgesehenen Schnittstelle abgespalten wurde. Die N-terminale Sequenz der oberen Bande begann mit elf zusätzlichen zur  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz gehörenden Aminosäuren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Protein hier nicht korrekt prozessiert worden war. Eine MALDI-TOF-Analyse beider Banden kommt zu dem gleichen Befund. Im weiteren Versuchsverlauf sollte die Proteindoppelbande durch einen weiteren Chromatographieschritt separiert werden. Dazu wurde eine Säule mit nicht porösen Partikeln (Bio-ProQA-F) verwendet.



**Abbildung 15: SDS-PAGE Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten c-Lys3.** IMAC-Fractionen des c-Lys3 (A). Anionenaustausch-Chromatographie Fractionen, die über eine Säule mit nicht porösen Partikeln aufgereinigt wurden (B). Anionenaustausch-Chromatographie Fractionen, die über eine Säule mit porösen Partikeln aufgereinigt wurden (C). (P = Probe; D = Durchlauf; 1-13 das Zielprotein enthaltende Fractionen)

Die Fraction 2B (Abbildung 15, A) der IMAC wurde 1:20 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und auf die äquilibrierte Säule geladen. Das c-Lys3 eluierte bei 200 mM NaCl und die Analyse der mit dem Chromatogrammpeak korrelierenden Fractionen zeigte im SDS-Gel eine schwache Proteindoppelbande der zu erwartenden Masse (Abbildung 15B). Aufgrund der geringen Proteinmenge und der weiterhin präsenten Doppelbande wurde die Aufreinigung mit einer porösen Säule (Bio-ProQA) und den Fractionen 3C und 4C (Abbildung 15A) wiederholt. Diese resultierte in einer starken Aufkonzentrierung des c-Lys3, ohne dass die Auftrennung der Doppelbanden durch den Salzgradienten gelang (Abbildung 15C). Die so generierten Hauptfraktionen wurden für die Immunisierung von Meerschweinchen zur Gewinnung von gegen das c-Lys3 gerichteten Antisera verwendet. Es wurde angenommen, dass die Protein-Doppelbanden wenig Effekt auf die Immunogenität der Antikörper haben würden, allerdings sollten für die anschließenden Aktivitätstests eine Einzelbande vorliegen, um die Aktivität dieser zuschreiben zu können.

Eine weitere Möglichkeit nur das korrekt prozessierte Protein zu erhalten, liegt in der Optimierung der Aminosäuresequenz an der Spaltstelle. Das Abspalten der  $\alpha$ -Signalsequenz erfolgt in Hefen durch die Protease KEX2, welche eine spezifische Aminosäureabfolge erkennt. Anschließend erkennt und spaltet die Protease STE13 am aus Glutamin (E) und Alanin (A) bestehenden Motiv EAEA. Liegen diese nicht vor, besteht die Möglichkeit, dass die  $\alpha$ -Signalsequenz an einer anderen als der vorgesehenen Stelle abgespalten wird und wie in diesem Fall zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus des Zielproteins vorgelagert werden. Deshalb wurde der Expressionsvektor so modifiziert, dass zwischen der  $\alpha$ -Signalsequenz und der Sequenz des Zielproteins die Aminosäuren EA eingefügt wurden. Dieses Vorgehen wurde schon mehrfach erfolgreich bei der rekombinanten Darstellung von Proteinen in *P. pastoris* angewandt (Ghosalkar et al., 2008; Salunkhe et al., 2010). Der *P. pastoris* Stamm 1 wurde mit dem modifizierten Vektorkonstrukt transformiert und anschließend das Protein heterolog exprimiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben und der erste Aufreinigungsschritt über IMAC zeigte in den Elutionsfraktionen eine einzelne Bande auf der zu erwartenden Höhe in der Coomassie gefärbten SDS-PAGE (Abbildung 16A).



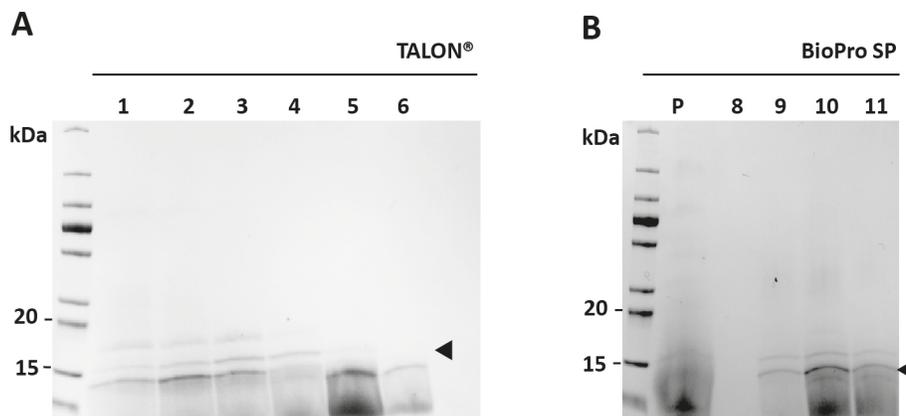
**Abbildung 16: SDS-PAGE Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten c-Lys3 mit modifizierter EA-Sequenz.** IMAC-Fractionen des c-Lys3 (A). Anionenaustausch-Chromatographie Fraktionen (B). (P = Probe; D = Durchlauf; 1-10 das Zielprotein enthaltende Fraktionen)

Die Hauptfraktionen wurden in einem weiteren Schritt wie oben beschrieben mit einer Anionenaustauscher-Säule aufgereinigt. Dadurch erfolgte eine weitere Reinigung und Konzentrierung der Probe sowie eine Umpufferung in einen Imidazol-freien Puffer (Abbildung 16B). Die Hauptfraktion wurde über einen Cut-Off-Filter auf steriles 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) umgepuffert und aufkonzentriert. Die Konzentration der Hauptproben wurde sowohl photometrisch als auch durch den Vergleich der Bandenstärke mit bekannten Konzentrationen des HEWL bestimmt. Diesmal ergab der Edman-Abbau eine korrekt prozessierte N-terminale Sequenz. Dieses Ergebnis wurde auch durch die MALDI-TOF-Analyse bestätigt. Die Endprobe wurde sowohl für die

biochemische Charakterisierung verwendet als auch zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität des c-Lys3 eingesetzt.

#### 4.1.4.5 Aufreinigung des c-Lys4 mit c-terminalem His<sub>6</sub>-Tag

Die präparative Aufreinigung des potentiell katalytisch aktiven c-Lys4 erfolgte in einem ersten Schritt durch IMAC. Aufgrund der inkorrekten Abspaltung der  $\alpha$ -Signalsequenz bei der heterologen Expression des c-Lys3, wurde die c-Lys4 Sequenz zu Beginn durch Addition der Aminosäuren Glutamin (E) und Alanin (A) N-terminal modifiziert. Die Probenvorbereitung und Durchführung der IMAC verlief wie für das i-Lys2 in 4.1.4.2 dargestellt. Die IMAC Hauptfraktionen eluierten bei 20 mM Imidazol und die Analyse der Fraktionen im SDS-Gel durch Coomassie-Färbung zeigte, dass nicht nur auf der erwarteten Laufhöhe des c-Lys4, sondern auch ober- und unterhalb mehrere Proteinbanden vorhanden waren (Abbildung 17A). Mehrere mögliche Ursachen können dieser Beobachtung zugrunde liegen. Zum einen könnte eine inkorrekte Abspaltung der Signalsequenz trotz optimierter Spaltstelle das Auftreten von Proteinen verschiedener Größe verursachen, zum anderen könnte auch die Degradation des rekombinanten Proteins durch Instabilität verantwortlich für die Größenvariation sein. Um die Ursache der Mehrfachbanden zu untersuchen, wurde einerseits ein weiterer Reinigungsschritt angehängt und andererseits wurden die zwei präsentesten Banden N-terminal durch Edman-Abbau ansequenziert. Aufgrund des prognostizierten basischen isoelektrischen Punktes des c-Lys4 wurde eine Kationenaustausch-Chromatographie bei einem pH-Wert von 6 durchgeführt.



**Abbildung 17: SDS-PAGE Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten c-Lys4 mit modifizierter EA-Sequenz.** IMAC-Fractionen des c-Lys4EA (A). Kationenaustausch-Chromatographie Fractionen (B). (P = Probe; D = Durchlauf; 1-10 das Zielprotein enthaltende Fraktionen)

Diese resultierte in dem Verlust einer großen Menge des Proteins und keiner Auftrennung der Banden (Abbildung 17B). Die Analyse beider Banden bei der N-terminalen Sequenzierung ergab, dass die für die Sekretion benötigte  $\alpha$ -Signalsequenz bei der Bande mit erwarteter Größe korrekt abgespalten wurde. Die untere mit einem kleineren Protein korrespondierende Bande wies eine Degradation am N-Terminus auf. Da eine Auftrennung der Proteine mit verkürzter N-terminaler Sequenz von den korrekt prozessierten Proteinen nicht möglich war, wurde die gesamte Proteinprobe für die weiteren Analysen und Charakterisierungen verwendet. Die Hauptfraktionen wurden über einen Cut-Off-Filter in sterilen 10 mM Tris-HCL (pH 7,5) umgepuffert und aufkonzentriert. Die Konzentration der Hauptproben wurde nicht photometrisch bestimmt, da durch die zusätzlich enthaltenen verkürzten Proteinsequenzen nicht auf die Menge der Hauptbande Rückschlüsse gezogen werden konnten. Deshalb wurde die Hauptbandenkonzentration nur durch den Vergleich der Bandenstärke mit bekannten Konzentrationen des HEWL abgeschätzt und die Proben sowohl für die biochemischen Analysen als auch zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität des c-Lys4 verwendet.

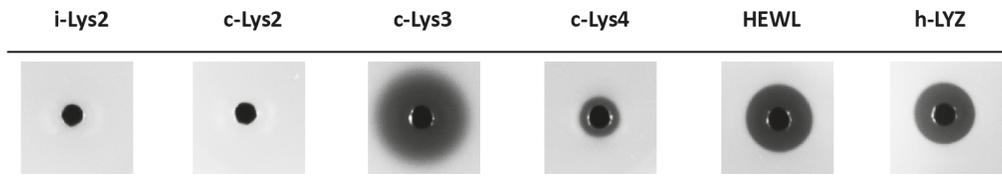
## 4.2 Biochemische Charakterisierung des i-Lys2, c-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4

Die rekombinant dargestellten und gereinigten Lysozyme wurden in den nachfolgenden Aktivitätstests auf ihre enzymatischen Eigenschaften untersucht. Ziel war es die aus dem Sequenzvergleich resultierenden Annahmen zur katalytischen Aktivität zu prüfen.

### 4.2.1 Untersuchung der Muramidase-Aktivität

Die Untersuchung der rekombinanten Lysozyme (i-Lys2, c-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4) auf eine Muramidase-Aktivität erfolgte mittels Lysehoftest (Mohrig & Messner, 1968). Für diesen wurde eine gefriergetrocknete *M. luteus*-Lösung enthaltende Agarplatte mit Natriumphosphatpuffer bei pH 6 erstellt, die Proben in ausgestanzte Löcher gegeben und nach 15 h bei 37 °C Inkubationszeit die Flächen der um die ausgestanzten Löcher entstandenen Lysehöfe ausgemessen, um das Vorhandensein einer Lyseaktivität zu zeigen. Als Positivkontrolle wurden Hühnereiweißlysozym (HEWL) und humanes Lysozym (hLYZ) mitgeführt. Die aus den Sequenzanalysen resultierenden Vermutungen deckten sich in allen Fällen mit den Ergebnissen der Lysehoftests (Abbildung 18). Sowohl c-Lys3 als auch c-Lys4, die beide für die Muramidase-Aktivität essentiellen Aminosäuren Glu35 und Asp42 besaßen, erzeugten einen deutlichen Lysehof. Dies bedeutet auch, dass im *P. pastoris* Expressionssystem aktive Lysozyme rekombinant hergestellt werden konnten. C-Lys2, dem das essentielle Asp42 fehlt, zeigte dagegen keine Aktivität. Auch für das i-Lys2 konnte das Fehlen der

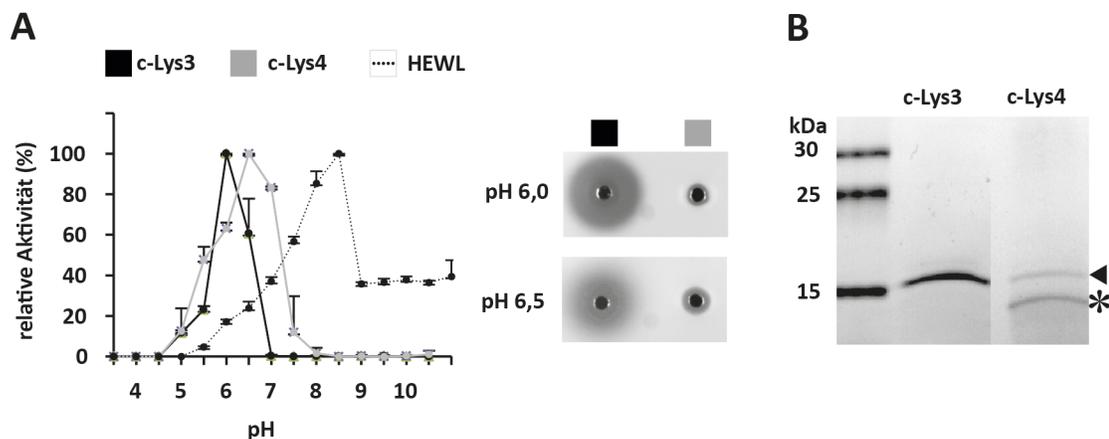
Aktivität bestätigt werden. Somit liegt der Schluss nahe, dass neben den enzymatisch aktiven c-Typ-Lysozymen noch weitere keine klassische Muramidase-Aktivität besitzenden Lysozyme wie z.B. c-Lys2 in *H. axyridis* vorliegen.



**Abbildung 18:** Lyseaktivität der heterolog exprimierten *H. axyridis* Lysozyme i-Lys2 (750 ng), c-Lys2 (750 ng), c-Lys3 (100 ng) und c-Lys4 (3 ng) im Vergleich mit HEWL (750 ng) und hLYZ (750 ng).

#### 4.2.2 pH-Abhängigkeit der Muramidase-Aktivität

Lysozyme können sich in ihren pH-Optima und Aktivitätsspektren unterscheiden, wodurch in einigen Fällen Rückschlüsse auf ihre Funktion und Aufgabe im Organismus gezogen werden können. Aus diesem Grund sollte im folgenden Abschnitt die pH-Abhängigkeit beider *H. axyridis* Lysozyme (c-Lys3 und c-Lys4, Abbildung 19B) gegenübergestellt werden. Vergleichend wurden HEWL und hLYZ als Kontrollen mitgeführt. Für die Untersuchung der pH-Optima wurden Lysehofplatten (siehe 0) mit pH-Werten von 3,5 bis 10,5 in 0,5er Schritten hergestellt, die Proben aufgetragen und für 15 h bei 37 °C inkubiert. Die relative Größe der einzelnen Lysehöfe ist als Aktivitätskurve dargestellt (Abbildung 19A).



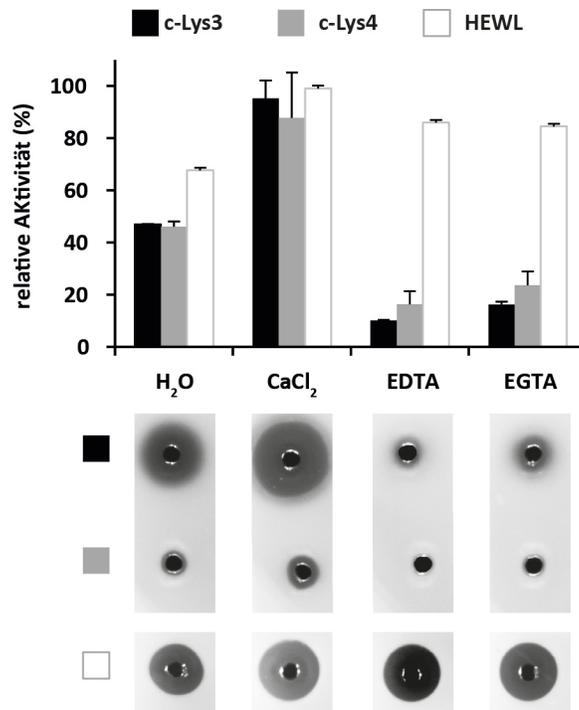
**Abbildung 19:** pH-abhängige Muramidase-Aktivität und SDS-PAGE von c-Lys3 und c-Lys4. Die Enzyme (100 ng c-Lys3, 3 ng c-Lys4 und 100 ng HEWL) wurden im *M. luteus* Lysehofstest bei pH-Werten zwischen 3,5 – 10,5 untersucht. Die Aktivitäten wurden in Triplikaten bestimmt und auf die maximale Aktivität normalisiert. Die zu den pH-Werten 6,0 und 6,5 korrespondierenden Lysehöfe von c-Lys3 und c-Lys4 sind rechts dargestellt (A). *H. axyridis* c-Lys3 und c-Lys4 wurden in *P. pastoris* hergestellt und durch SDS-PAGE analysiert. Der Pfeil zeigt die Banden mit vollständiger Lysozymsequenz. Die Bande mit der verkürzten Version des c-Lys4 ist durch einen Stern gekennzeichnet (B).

Die pH-Optima von c-Lys3 und c-Lys4 lagen bei 6,0 beziehungsweise 6,5. Während bei c-Lys3 oberhalb des pH-Optimums die Aktivität drastisch abnahm, zeigte c-Lys4 noch bei pH 8 einen erkennbaren Lysehof, sodass sich die Aktivität des c-Lys4 über ein breiteres pH-Spektrum erstreckte. Weiterhin unterschieden sich die beiden Lysozyme in der Morphologie der Lysehöfe. Die Lysehofränder von c-Lys3 hatten eine diffuse Morphologie während sich der c-Lys4 Lysehof klar abgrenzte. Auch HEWL und hLYZ zeigten klar abgegrenzte Lysehöfe und das pH-Optimum von beiden lag bei 8,0. Beide Kontrollen zeigten zwischen pH 5 – 10 eine Lyseaktivität. Somit besaßen sie sowohl ein breiteres Aktivitätsspektrum als auch ein pH-Optimum im basischen Bereich, wodurch sie sich deutlich von den *H. axyridis*-Lysozymen unterschieden.

#### 4.2.3 Calciumabhängigkeit der Muramidase-Aktivität

Die Sequenzanalyse von c-Lys3 und c-Lys4 hatte das Vorhandensein eines vermeintlichen Calciumbindemotivs ergeben, welches für Pferdelysozyme gezeigt wurde (Nitta et al., 1987). HEWL und hLYZ wiesen in ihrer Aminosäuresequenz kein typisches Calciumbindemotiv auf. Deshalb sollte in diesem Abschnitt die Calciumabhängigkeit der Muramidase-Aktivität von *H. axyridis* Lysozymen (c-Lys3 und c-Lys4) untersucht und HEWL gegenübergestellt werden.

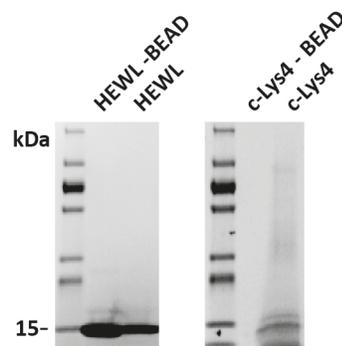
Dafür wurde der oben beschriebene Lysehofstest abgeändert, indem dem Puffer der Lysehofplatten entweder H<sub>2</sub>O, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA oder 5 mM EGTA hinzugefügt wurde. Das Vorhandensein von 5 mM CaCl<sub>2</sub> vergrößerte die Lysehöfe beider *H. axyridis* Enzyme, während die Muramidase-Aktivität bei der Zugabe des Komplexbildners EDTA fast vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 20). Die Zugabe von EGTA, welches ein Calcium-spezifischer Komplexbildner ist, vermindert ebenfalls die Lyseaktivität erheblich. Durch die Verwendung von EGTA konnte gezeigt werden, dass die Muramidase-Aktivität nicht nur von divalenten Kationen generell, sondern im Speziellen auch von Calcium beeinflusst wird. Die Lyseaktivität von HEWL und hLYZ wurde durch die Präsenz von Calcium leicht verstärkt, allerdings hatte die Zugabe eines Komplexbildners keinen Einfluss auf die Aktivität. In diesem Versuchsabschnitt wurde die Calciumabhängigkeit der *H. axyridis* Lysozymaktivität eindeutig bestätigt.



**Abbildung 20: CaCl<sub>2</sub>-abhängige Muramidase-Aktivität.** Die rekombinanten *H. axyridis* Lysozyme c-Lys3 (schwarz) und c-Lys4 (grau) und HEWL (weiß) wurden im *M. luteus* Lysehofest sowohl ohne Zugabe (H<sub>2</sub>O) als auch mit Zugabe von 5 mM Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), 5 mM EDTA oder 5 mM EGTA untersucht. Die Aktivitäten wurden in Triplikaten bestimmt und auf die maximale Aktivität normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die zu den verschiedenen Bedingungen korrespondierenden Lysehöfe sind unten abgebildet.

#### 4.2.4 Chitin-Bindefähigkeit

Die Chitin-Bindefähigkeit des *H. axyridis* c-Lys4 und HEWL wurden mittels Chitin-Beads verglichen. Weder die Inkubationstemperatur von 4 °C oder RT noch das Inkubationsmedium, PBS-Puffer oder Natriumphosphatpuffer pH 6, hatten Einfluss auf die Chitin-Bindefähigkeit des c-Lys4.



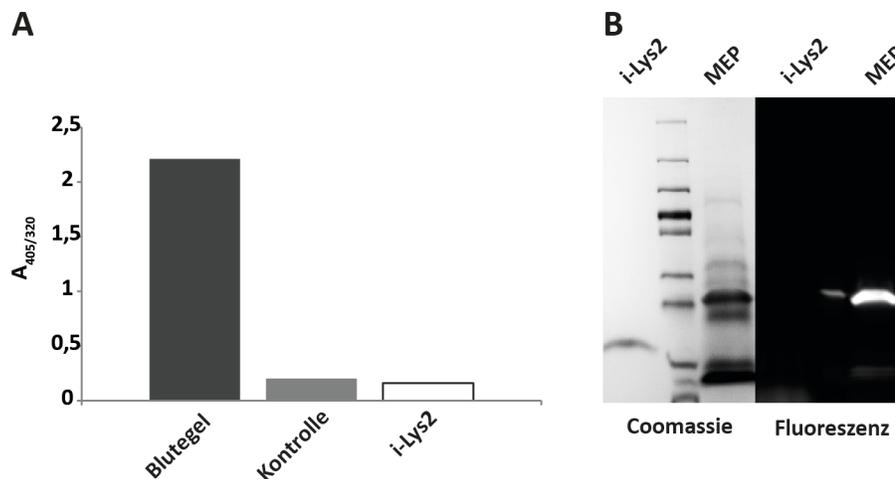
**Abbildung 21: Chitin-Bindefähigkeit des *H. axyridis* c-Lys4 im Vergleich mit HEWL.**

Während HEWL in der Beadfraktion nachzuweisen war und davon auszugehen ist, dass eine Chitin-Bindfähigkeit vorliegt, war c-Lys4 nur im Überstand vorhanden und zeigte somit keine Chitinaffinität (Abbildung 21).

#### **4.2.5 Charakterisierung der Isopeptidase-Aktivität des i-Lys2 und Einfluss des rekombinanten Proteins auf die Blutgerinnung**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das i-Lys2 rekombinant mit und ohne C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag in *P. pastoris* dargestellt und gereinigt werden konnte. Da die Sequenzanalyse zeigte, dass das i-Lys2 die für eine Isopeptidase-Aktivität relevanten Aminosäurereste besitzt, sollte das Vorhandensein einer Isopeptidase-Aktivität überprüft werden. Bis zu diesem Zeitraum sind Insektenlysozyme die einzigen bekannten i-Typ-Lysozyme, die keine solche Aktivität aufweisen..

In einem ersten Versuch sollte die Isopeptidase-Aktivität mit Hilfe eines chromogenen Substrates, L- $\gamma$ -Glutamyl-p-nitroanilid, untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde Blutegelsekret mitgeführt (Baskova & Nikonov, 1991; Zavalova et al., 1996). L-Glutaminsäure-1-(4-Nitroanilid) diente als Negativkontrolle, da diese Isopeptidbindung nachweislich nicht von i-Typ-Lysozymen gespalten werden kann. Die erfolgreiche Spaltung der Isopeptidbindung resultiert in einer Absorptionsänderung der Lösung und kann bei einer Wellenlänge von 380 nm gemessen werden. Mit diesem Assay konnte keine Spaltung der Isopeptidbindung durch i-Lys2 nachgewiesen werden, während das Blutegelsekret in der Lage war, das p-Nitrophenylsubstrat zu spalten (Abbildung 22A). Auch das i-Lys2 ohne C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag wurde in den Isopeptidaseassay eingesetzt, um die mögliche fehlende Aktivität des rekombinanten Proteins durch die C-terminale Modifikation auszuschließen. Auch i-Lys2 ohne His<sub>6</sub>-Tag zeigte keine Isopeptidase-Aktivität. Um zu testen, ob generell eine Isopeptidase-Aktivität in Sekreten von *H. axyridis* vorliegt, wurden sowohl Hämolymphe als auch der Inhalt des Verdauungstraktes in den Isopeptidaseassay eingesetzt. Auch hierbei konnte keine Aktivität gezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder das rekombinante i-Lys2 mit noch ohne c-terminalen His<sub>6</sub>-Tag noch Hämolymphe oder Proteine des Verdauungstraktes von *H. axyridis* das Isopeptidase Substrat L-  $\gamma$  -Glutamyl-p-nitroanilid spalten konnten.



**Abbildung 22: Isopeptidase-Aktivität und Serinproteasenachweis.** Die Isopeptidase-Aktivität von i-Lys2 und Blutegelsekret wurde anhand der Spaltung des chromogenen Substrates L- $\gamma$ -Glutamyl-p-nitroanilid detektiert (n=3) **(A)**. Nachweis einer aktiven Serinprotease in i-Lys2 enthaltenden Fraktionen und MEP (Kontrolle) durch Inkubation mit einer fluoreszierenden Serinhydrolase-Sonde (TAMRA) und Separation durch SDS-PAGE **(B)**.

Eine weitere Möglichkeit um Rückschlüsse auf die Aktivität des i-Lys2 ziehen zu können, war die Untersuchung auf eine Serinhydrolaseaktivität. Diese Peptidasen zeichnen sich durch das Vorliegen eines Serin-Aminosäurerestes im aktiven Zentrum aus. Der Nachweis erfolgte über ein fluoreszierendes Selbstmordsubstrat, welches kovalent und irreversibel an die Aminosäuren im aktiven Zentrum bindet. Als Positivkontrolle für diesen Versuch wurde ein Madenexkretionsprodukt (MEP) verwendet, welches Serinproteasen enthält (Kahl et al., 2015). Die Markierung aktiver Serinproteasen in MEP zeigte eine deutliche Aktivität der 25 kDa Bande, wogegen die Probe mit i-Lys2 keine Markierung vorwies (Abbildung 22B). Aus diesem Ergebnis wurde geschlussfolgert, dass das i-Lys2 keine Serinproteaseaktivität besitzt.

Der Einsatz von i-Lys2 in einen Blutgerinnungs-Test mit humanem Plasma konnte keine antikoagulierende Wirkung von i-Lys2 feststellen (Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Preissner (Institute of Biochemistry, Medical Faculty, JLU Gießen)).

I-Lys2 zeigte weder eine Isopeptidase-Aktivität noch Serinproteaseeigenschaften und wies auch keine antikoagulierende Wirkung auf. Da keine enzymatische Aktivität trotz des Vorhandenseins der Serin- und Histidinaminosäurereste nachgewiesen werden konnte, fokussierte sich der zweite Teil dieser Arbeit auf die Charakterisierung des Proteins im Organismus, um mögliche Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen zu können.

### 4.3 Expressionsanalyse des i-Lys2 auf RNA- und Proteinebene

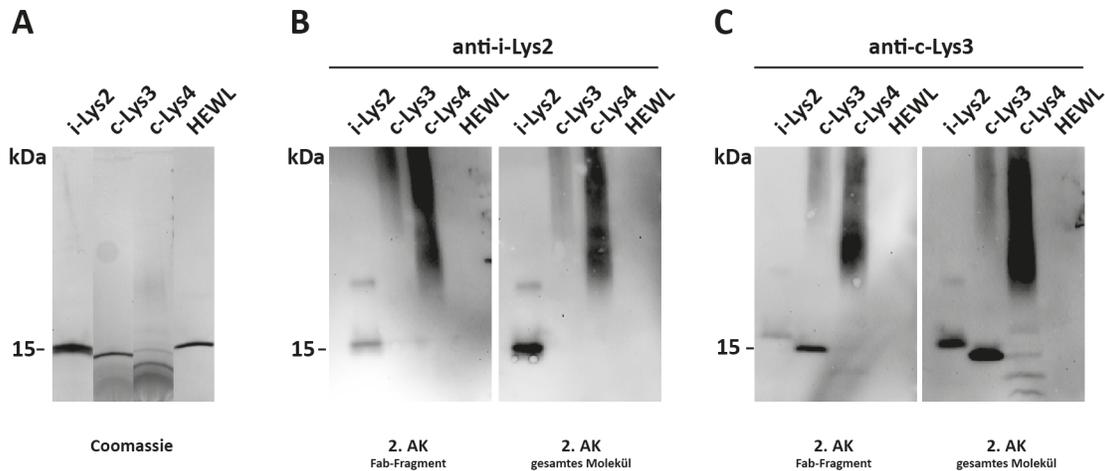
Da für das i-Lys2 keine katalytische Aktivität identifiziert werden konnte, sollte in diesem Versuchsabschnitt anhand der Lokalisation des Proteins und dessen Expressionsmuster das i-Lys2 im Organismus charakterisiert werden. Der Lokalisationsnachweis erfolgte über indirekte Immunfärbungen mit gegen das i-Lys2 gerichteten Antiseren in Gewebepreparaten von adulten naiven *H. axyridis*. Die Expressionsanalyse basierte auf mRNA-Isolaten von separaten Organpreparaten.

#### 4.3.1 Vergleich der Effektivität und Spezifität der verwendeten Antiseren

Von großer Bedeutung für die Verwendung von Antiseren war die Evaluierung ihrer Effektivität und Spezifität. Die gegen das i-Lys2 und c-Lys3 gerichteten Antiseren wurden für eine sekundäre Immunlokalisation in Gewebepreparaten eingesetzt. Da jeweils 4 Tierindividuen entweder mit i-Lys2 oder c-Lys3 immunisiert worden waren, wurde zuerst die Effektivität der verschiedenen Antiseren verglichen.

Das effektivste Antiserum wurde anhand einer Western-Blot-Analyse mit definierten Mengen an rekombinanten Proteinen ermittelt und ausschließlich das Effektivste in den darauffolgenden Versuchen eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Dieser Schritt war wichtig, da sich die einzelnen Antiseren in ihrer Immunogenität stark unterschieden. Es kamen ausschließlich Antiserumproben zum Einsatz, die bei der finalen Blutung (*final bleed*) der Tiere gewonnen wurden. Die Spezifität und mögliche Kreuzreaktivitäten der Antiseren wurden mit den rekombinanten Lysozymen und HEWL ermittelt. Dabei zeigte sich, dass das gegen das i-Lys2 gerichtete Antiserum auf der erwarteten Bandenhöhe von Lysozymen nur mit i-Lys2 reagierte und zusätzlich unspezifisch an Proteine in den Laufspuren von c-Lys3 und c-Lys4 band (Abbildung 23A).

Bei der Laufspur von dem zu den c-Typ-Lysozymen gehörenden HEWL zeigte es keine Reaktivität. Zusätzlich konnte anhand dieses Versuches gezeigt werden, dass auch der Sekundärantikörper eine wichtige Rolle in der Nachweisspezifität spielt. Beim Vergleichen eines Sekundärantikörpers bestehend aus einem ganzen Antikörpermolekül mit einem Sekundärantikörper bestehend aus den Fab<sub>2</sub>-Fragmenten, zeigte sich ein deutlicher Nachweisunterschied.



**Abbildung 23: Spezifität der gegen das i-Lys2 und c-Lys3 gerichteten Antiseren in Western-Blot-Analysen.** Western-Blot-Analyse der rekombinanten *H. axyridis* Lysozyme (i-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4) sowie HEWL mit den gegen das i-Lys2 (A) und c-Lys3 (B) gerichteten Antiseren. Als Sekundärantikörper wurde zum einen ein Fab<sub>2</sub>-Fragment (Dianova) und ein ganzes Molekül (Sigma) als HRP-Konjugat verwendet.

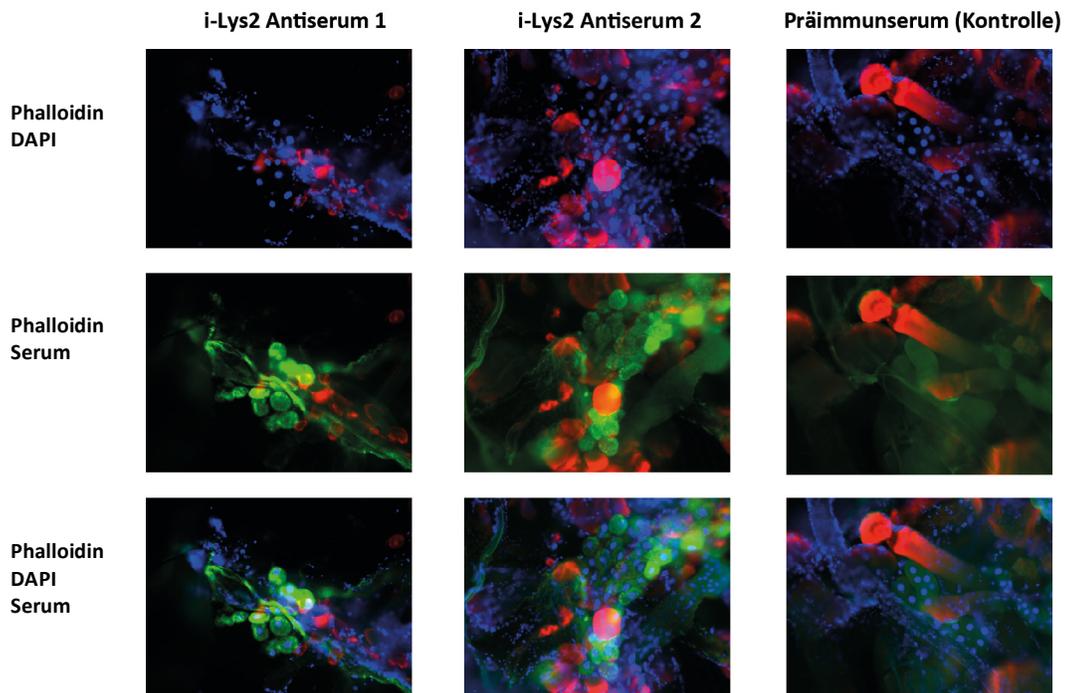
Der vollständige Antikörper besaß eine 10-fach höhere Nachweisgrenze und zeigte geringere unspezifischere Bindungen als das Fab<sub>2</sub>-Fragment alleine auf. Deshalb wurde für die weiteren Western-Blot-Analysen ausschließlich der aus dem gesamten Molekül bestehende Sekundärantikörper verwendet. Das gegen das c-Lys3 gerichtete Antiserum interagiert am stärksten mit c-Lys3 und c-Lys4 allerdings auch mit i-Lys2 in abgeschwächter Form, da von i-Lys2 eine größere Menge auf das Geld aufgetragen wurde (Abbildung 23B). Das Antiserum zeigte mit HEWL keine Kreuzreaktivität. Auch in diesem Versuch zeigte sich der deutliche Unterschied zwischen vollständigem Sekundärantikörpermolekül und dem aus Fab<sub>2</sub>-Fragment bestehenden Sekundärantikörper (Abbildung 23B).

Da das i-Lys2 eine geringe Kreuzreaktivität zu den c-Typ-Lysozymen von *H. axyridis* aufwies und somit eine geringe unspezifische Bindung an c-Typ-Lysozyme im Organismus zu erwarten war, eignet sich dieses Antiserum für die folgenden Lokalisationsstudien von i-Lys2 in Gewebeproben.

#### 4.3.2 Lokalisation des i-Lys2 Proteins in Gewebepreparaten

Für die Lokalisation des i-Lys2 durch *whole mount staining* dienten Gewebepreparate von naiven adulten *H. axyridis*. I-Lys2 sollte in folgenden Geweben nachgewiesen werden: Darm, Nervensystem, Gehirn, Muskulatur, Ovarien, Testis und Fettkörper. Während der immunhistochemischen Färbungen wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt, um Artefakte durch unspezifische Bindungen oder Eigenfluoreszenz der Gewebe von spezifischen Antikörperbindungen unterscheiden zu können. Eine Sekundärantikörperkontrolle ohne Primärantikörper zeigte keine unspezifische Bindung. Das

Antiserum ohne fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper zeigte allerdings eine starke Eigenfluoreszenz des Darms und der Cuticula.

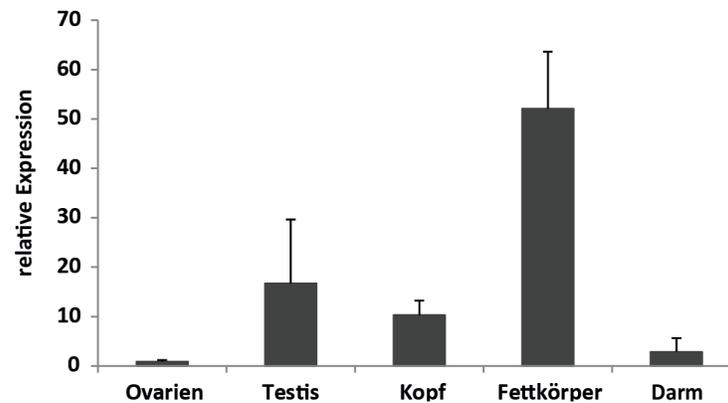


**Abbildung 24: Immunhistochemische Analyse zu Expression des i-Lys2 in Fettkörperpräparaten.** Gezeigt sind hier Gewebestrukturen des Abdominalsegmentes mit großen Anteilen an Fettkörperzellen. Die Expression des i-Lys2 (grün) korreliert hier mit aktiven Fettkörperzellen (Zellkernfärbung DAPI, blau), die sich durch große Zellkerne auszeichnen, aber nicht mit Muskulatur (Phalloidin, orange). Eine distinkte Färbung der Fettkörperzellen mit dem Präimmunserum ist nicht erkennbar.

Da eine unspezifische Bindung des Antiserums durch eigene Serumbestandteile nicht auszuschließen ist, war das zu dem Antiserum korrespondierende Präimmunserum, welches dem Tier vor Injektion des Antigens entnommen wurde, die wichtigste Kontrolle. Beim direkten Vergleich der mit Antiserum oder Präimmunserum gefärbten Organe konnte nur im aus dem Abdominalsegment isolierten Fettkörper eine distinkte Färbung unter Verwendung des Antiserums im Abgleich mit den unspezifischen Färbungen des Präimmunserums identifiziert werden (Abbildung 24). In keinem anderen Gewebe war solch ein eindeutiges Fluoreszenzsignal zu detektieren. Durch die Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) zeigte sich eine Kolokalisation des i-Lys2 mit Zellstrukturen, die im Phasenkontrastmikroskop als Fettkörperzellen identifiziert werden konnten. Eine Kolokalisation des i-Lys2 mit Muskelstrukturen, die mit dem F-Aktin interagierenden Phalloidin (orange) angefärbt wurden, lag nicht vor. Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass i-Lys2 in großen Mengen in Fettkörperzellen vorhanden ist.

### 4.3.3 Untersuchung der gewebespezifischen Expression des i-Lys2 auf RNA-Ebene

Neben der Lokalisation des i-Lys2 auf Proteinebene wurde auch die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurde RNA aus Ovarien, Testis, Kopf, Fettkörper und Darm isoliert und die Expression des i-Lys2 in diesen Geweben untersucht. Qualität und Reinheit der RNA wurden photometrisch und mittel Agarosegelelektrophorese kontrolliert.



**Abbildung 25: Gewebeabhängige i-Lys2 Expression.** Die Bestimmung erfolgte anhand von drei biologischen Replikaten, aus denen die Standardabweichung ermittelt wurde.

Die Relativierung der bei der qRT-PCR erhaltenen Werte erfolgte auf das Gewebe mit der geringsten i-Lys2 Expression. Dies stellten in diesem Experiment die Ovarien dar. I-Lys2 wurde im Kopf um das 12-fache und in den Testis um das 17-fache höher exprimiert als in den Ovarien. Im Fettkörper konnte eine über 50-fach höhere Expression beobachtet werden. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, welche ebenfalls eine Lokalisation im Fettkörper zeigte. Somit ist davon auszugehen, dass Expression und Lokalisation von i-Lys2 korrelieren und hauptsächlich im Fettkörper stattfinden.

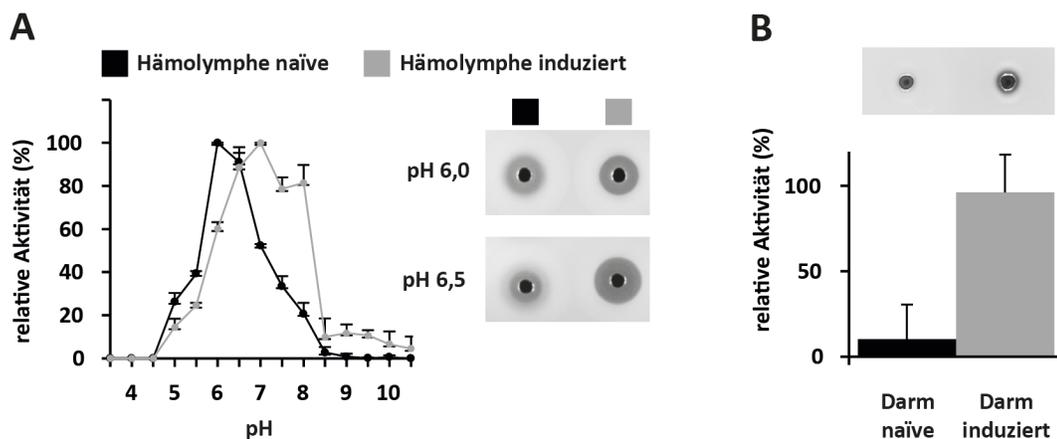
## 4.4 Untersuchung der Lysozyme im Rahmen einer Immunantwort von *H. axyridis* und antimikrobielles Spektrum der rekombinanten Lysozyme

Wie oben erwähnt spielen Lysozyme in vielen Organismen, so auch in Insekten, eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr sowohl gegen Pilze als auch grampositive und gramnegative Bakterien. In wie weit die Lysozyme von *H. axyridis* an der Immunabwehr beteiligt sind und welche antimikrobiellen Eigenschaften die rekombinanten Lysozyme aufweisen, sollte im letzten Versuchsabschnitt untersucht werden.

#### 4.4.1 Untersuchung der Muramidase-Aktivität in Hämolymphe und Darmisolaten nach Immunstimulation

Eine wichtige Funktion im Schutz vor eindringenden Mikroorganismen übernehmen sowohl Hämolymphe als auch der Darm bei der Immunantwort (Ursic Bedoya et al., 2005). Deshalb betrachtet der folgende Versuchsabschnitt nicht nur das Vorkommen einer Lyseaktivität und somit das Vorhandensein von Lysozymen sowohl in der Hämolymphe als auch in Darmisolaten, sondern auch in wie weit die vorhandenen Lyse-Aktivitäten durch eine vorherige Immunstimulation der Tiere beeinflusst werden. Für diesen Zweck wurden Hämolympheproben und Darmextrakte von naiven und immunstimulierten Adulti auf eine Muramidase-Aktivität mittels *M. luteus* Lysehoftest untersucht.

Eine Muramidase-Aktivität konnte für die Hämolymphe von sowohl naiven als auch immunstimulierten Tieren gezeigt werden. Die Messung des pH-Wertes in der Hämolymphe mit pH-Papier ergab einen Wert von 6,0. Die Messung des pH-Wertes von immunstimulierter Hämolymphe zeigte einen leicht höheren pH-Wert, der etwa bei 6,5 lag. Eine eindeutige Differenzierung der pH-Werte beider Hämolympheproben war mittels pH-Papier nicht möglich. Vergleicht man die pH-Abhängigkeit der Muramidase-Aktivitäten beider Proben, so zeigte sich ein heterogenes Bild. Während das pH-Optimum der Hämolymphe von naiven Tieren bei 6,0 lag, befand sich die optimale Lyseaktivität der Hämolymphe von immunstimulierten Tieren bei 7,0 (Abbildung 26A).



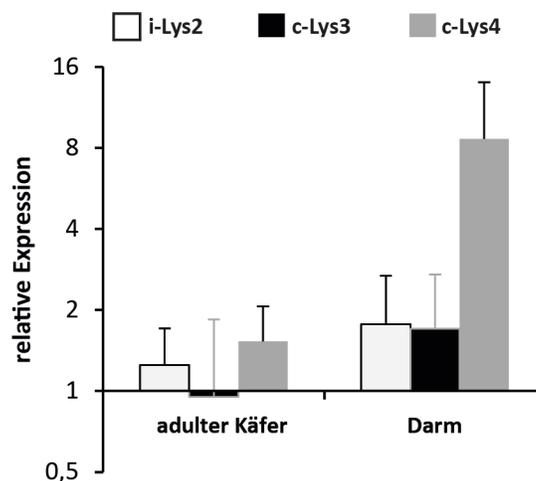
**Abbildung 26: pH-abhängige Muramidase-Aktivität der Hämolymphe von naiven und immunstimulierten Tieren.** Vereinigte Hämolympheproben von naiven und immunstimulierten Käfern wurden im *M. luteus* Lysehoftest mit pH-Werten zwischen 3,5 – 10,5 untersucht. Die Aktivitäten wurden in Triplikaten bestimmt und auf die maximale Aktivität relativiert. Die zu den pH-Werten 6,0 und 6,5 korrespondierenden Lysehöfe von Hämolympheproben von naiven und immunstimulierten Käfern sind rechts dargestellt (**A**). Darmextrakte von naiven und immunstimulierten Käfern wurden homogenisiert und im *M. luteus* Lysehoftest untersucht. Die relative Muramidase-Aktivität wurde für vier biologische Replikate bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (**B**).

Auch in der Morphologie der Lysehöfe unterschieden sich die Proben. Bei pH 6,0 und 6,5 zeichnete sich der Lysehof von Hämolymphe naïver Tiere durch einen diffusen Rand und der von Hämolymphe immunstimulierter Tiere durch einen glatten Rand aus.

Für den Vergleich der Lyseaktivität von isolierten Darmextrakten wurden aufgrund der zuvor bestimmten pH-Optima der *Harmonia*-Lysozyme Lyseplatten mit einem pH-Wert von 6,5 verwendet. Der Darm naïver Tiere, der ebenfalls einen pH-Wert um 6,0 aufwies, zeigte eine minimale Lyseaktivität wogegen der Darm immunstimulierter Käfer einen deutlichen Lysehof mit glatter Randmorphologie bildete (Abbildung 26B).

#### 4.4.2 Untersuchung der immuninduzierten Expression von i-Typ und c-Typ-Lysozymen

Nachdem mittels Lysehoftest eine Lysozym-Aktivität in der Hämolymphe und Darmextrakten gezeigt werden konnte, die durch Immunstimulation der Käfer beeinflussbar war, sollten diese Ergebnisse auf mRNA-Ebene genauer untersucht werden. Zur Überprüfung der Genexpression von i-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 im ganzen Tier oder in Darmextrakten erfolgte eine qRT-PCR mit Proben von naïven und immunstimulierten Tieren.



**Abbildung 27: Expressionsanalyse der *H. axyridis* Lysozyme i-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 nach Immunstimulation.** Die Expressionsänderung von i-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 mRNA wurde 12 h nach Immunstimulation mittels qRT-PCR bestimmt. Die RNA der ganzen Käfer und Darmextrakte wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Änderung des Expressionslevels abhängig vom jeweiligen Lysozym erfolgte. Auf die Expression des i-Lys2 sowohl im Ganzkäfer-Extrakt als auch im Darmextrakt hatte die vorausgegangene Immunstimulation keinen Einfluss. Bei der Untersuchung der Gesamt-RNA von

adulten Käfern wurde keine Änderung der Expression des c-Lys3 beobachtet, allerdings war die Expression des c-Lys4 leicht erhöht (Abbildung 27). Ein leichter Expressionsanstieg von c-Lys3 war in isoliertem Darm zu verzeichnen, während das Expressionslevel des c-Lys4 um das 8-fache anstieg (Abbildung 27). Vergleicht man dieses Ergebnis mit der gezeigten Muramidase-Aktivität im Darm nach Immunstimulation (4.4.1) so führen beide zur Schlussfolgerung, dass die Expression des c-Lys4 nach Immunstimulation ansteigt.

#### 4.4.3 Antimikrobielles Spektrum der i-Typ- und c-Typ-Lysozyme

Lysozyme sind bekannt dafür, dass sie grampositive Bakterien und Spezies-abhängig auch gramnegative Bakterien sowie einige Pilzarten lysieren und/oder deren Wachstum inhibieren können. Deshalb sollten im folgenden Abschnitt die antimikrobiellen Eigenschaften der *H. axyridis* Lysozyme i-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 untersucht werden.

	Grampositive							Gramnegative	Pilze	
	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	Listeria (8 Stämme)		<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<b>A</b>										
i-Lys2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	n.t.
c-Lys3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	n.t.
c-Lys4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>B</b>										
c-Lys3	+++	n.t.	n.t.	—	++	+	—	—	—	n.t.
c-Lys4	+++	n.t.	n.t.	—	++	+	—	—	—	n.t.

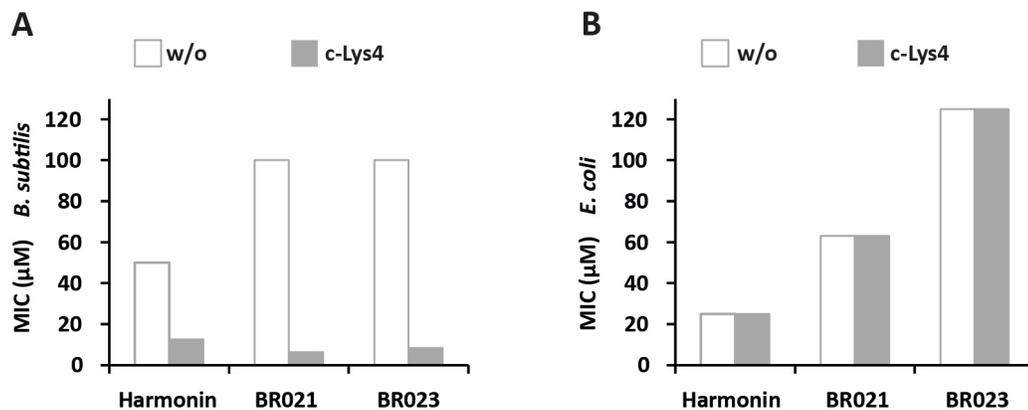
**Abbildung 28: Antimikrobielle Aktivität und spezifische Lyseaktivität der rekombinanten *H. axyridis* Lysozyme.** Untersuchung der wachstumshinibierenden Eigenschaften der rekombinanten Lysozyme in Wachstumshinibitionstest (A). Untersuchung der Muramidase-Aktivität im Lysehoftest (B) (n.t. = nicht getestet; + = leichte Aktivität; ++ = mittlere Aktivität; +++ = starke Aktivität; – = keine Aktivität).

Weder die c-Typ-Lysozyme c-Lys3 und c-Lys4 noch das i-Typ-Lysozym i-Lys2 zeigten wachstumshinibierende Eigenschaften gegenüber den untersuchten Mikroorganismen (Abbildung 28A). Allerdings waren c-Lys3 und c-Lys4 in der Lage die grampositiven Bakterien *M. luteus*, *B. subtilis* und auch *B. megaterium* zu lysieren, auch wenn sie nicht deren Wachstum hemmen konnten (Abbildung 28B).

Weiterhin wurden die wachstumshemmenden Eigenschaften von Käferextrakten, in denen eine Muramidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, untersucht. Dabei zeigten die Darmextrakte von *H. axyridis* keine wachstumshemmenden Eigenschaften gegen das gramnegative Bakterium *E. coli* wogegen die *H. axyridis* Hämolymphe dessen Wachstum stark inhibierte (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4.4 Antimikrobielle Effekte von c-Lys3 und c-Lys4 in Kombination mit den Hämolympf-Komponenten Harmonin und Coleoptericin

Weil die *H. axyridis* Lysozyme nicht die für Lysozyme bekannten wachstumshemmenden Eigenschaften zeigten, sie aber in der Lage waren, grampositive Bakterien zu lysieren, sollte im letzten Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden, ob die *H. axyridis* Lysozyme möglicherweise durch kombinierte Aktivität mit weiteren antimikrobiellen Substanzen die Immunabwehr der Insekten unterstützen können. Dazu wurden zwei bereits auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften untersuchten antimikrobiellen Substanzen aus der *H. axyridis* Hämolymphe hinzugezogenen. Die erste Substanz war das Ölsäure-Derivat Harmonin (17R,9Z)-1,17-diaminooctadec-9-ene), für welches eine starke wachstumshemmende Wirkung auf grampositive und gramnegative Bakterien gezeigt werden konnte (Röhrich et al., 2012). Weiterhin wurden zwei zur Klasse der Coleoptericine zählende AMPs (BR021 und BR023) im Kombinationsversuch eingesetzt, die das Wachstum von grampositiven Bakterien nur bei hohen Konzentrationen (*minimal inhibition concentration* (MIC) > 100 M) inhibierten (Vilcinskas et al., 2012 B).



**Abbildung 29: Antimikrobielle Aktivität von Harmonin und den Coleoptericinen BR021 und BR023 mit und ohne c-Lys4.** Die minimalen Inhibitionskonzentrationen (MIC) für Harmonin, BR021 und BR023 wurden im Kulturmedium ohne (w/o) und in der Anwesenheit von 0,1 µM c-Lys4 bestimmt. Die antimikrobiellen Komponenten wurden gegen *B. subtilis* (A) und *E. coli* (B) getestet. Die wachstumshemmenden Eigenschaften wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Unter Verwendung eines Mikroverdünnungsassays wurden die minimalen Inhibitionskonzentrationen (MIC) von Harmonin, BR021 und BR023 gegen *M. luteus* repräsentativ für grampositive Bakterien und *E. coli* für gramnegative Bakterien bestimmt. Harmonin alleine inhibierte das Wachstum von *B. subtilis* ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (Abbildung 29A). In Kombination mit c-Lys4 reduzierte sich die MIC von Harmonin auf 12,5  $\mu\text{M}$ , so dass die antibakterielle Aktivität um das Vierfache gesteigert wurde. Die beiden Coleoptericine besaßen jedes für sich alleine jeweils eine MIC von 100  $\mu\text{M}$ . In der Gegenwart von c-Lys4 sank die MIC von BR021 auf 6,3  $\mu\text{M}$  und die von BR023 auf 8,4  $\mu\text{M}$ . Somit stiegen die antimikrobiellen Aktivitäten in Kombination mit c-Lys4 um das 16-fache beziehungsweise um das 12-fache an. Die MIC von Harmonin, BR021 und BR023 lagen gegen *E. coli* bei 25, 63 und 125  $\mu\text{M}$ , die durch die Zugabe von c-Lys4 nicht verändert wurden (Abbildung 29B). Der Einfluss von c-Lys3 und i-Lys2 auf die MIC der Coleoptericine und des Harmonins wurden unter den gleichen Bedingungen getestet, zeigten aber weder gegen *M. luteus* noch *E. coli* eine Änderung der MIC.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der c-Typ-Lysozymen von *H. axyridis*

Seit vor über 90 Jahren die bakteriolytischen Fähigkeiten von Lysozymen entdeckt worden waren, zählen Lysozyme zu einer wichtigen, hoch konservierten Enzymgruppe der angeborenen Immunabwehr (Wiesner & Vilcinskas, 2010). Ihre Rolle als Abwehrmolekül wurde nicht nur für Vertebraten (Jollès & Jollès, 1975; Markart et al., 2004), sondern auch für Insekten zahlreich dokumentiert (Dunn et al., 1994; Hultmark, 1995; Powning & Davidson, 1976). Häufig besitzen Invertebraten und insbesondere Insekten nicht nur ein sondern mehrere Lysozymgene, die an unterschiedlichen biologischen Prozessen im Organismus beteiligt sind. Solche Multigenfamilien bestehen in *Anopheles gambiae* aus acht, in *D. melanogaster* aus zwölf und in *A. mellifera* aus drei c-Typ-Lysozymgenen (Daffre et al., 1994; Evans et al., 2006; Li et al., 2005). Anhand einer Transkriptomanalyse wurden im Asiatischen Marienkäfer vier für c-Typ-Lysozyme kodierende Gene identifiziert (Vilcinskas et al., 2013a). Andere Käfer weisen eine ähnliche Anzahl an c-Typ-Lysozym-Genen auf. So wurden im Immunsystem assoziierten Transkriptom des Pollenkäfers *Meligethes aeneus* durch *next generation sequencing* sechs und im Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* vier Lysozymgene den c-Typen zugeordnet (Vogel et al., 2014; Zou et al., 2007). Die molekulare Masse der c-Typ-Lysozyme variiert in Insekten zwischen 11 kDa bis 23 kDa (Fernandez-Sousa et al., 1977; Schneider, 1985). Mit molekularen Massen zwischen 13,2 und 14 kDa lagen die c-Typ-Lysozyme von *H. axyridis* im unteren Mittelfeld der Insektenlysozymgröße.

Bei näherer Betrachtung der *H. axyridis* c-Typ-Lysozymsequenzen und dem Vergleich dieser mit weiteren c-Typ-Lysozymen, konnten die vier Sequenzen von *H. axyridis* in zwei Gruppen untergliedert werden. Sowohl c-Lys1 als auch c-Lys2 fehlen die für eine Muramidase-Aktivität relevanten katalytischen Aminosäurereste, so dass von keinem der beiden eine bakteriolytische Aktivität zu erwarten war. In *Bombyx mori*, dem Seidenspinner, existieren ebenfalls zwei Lysozyme, denen die relevanten Aminosäurereste fehlen. Beide Lysozyme waren nicht in der Lage glykosidische Verbindung in der Bakterienzellwand zu hydrolysieren, zeigten aber eine hohe antibakterielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Gandhe et al., 2007). C-Lys2 wurde stellvertretend für die nicht katalytisch aktiven c-Typ-Lysozyme von *H. axyridis* rekombinant dargestellt und besaß, wie erwartet, im Lysehof-Test keine Muramidase-Aktivität. Da es weder möglich war das c-Lys2 noch die anderen c-Typ-Lysozyme von *H. axyridis* in *E. coli* zu exprimieren, könnte dies ein Hinweis auf eine antibakterielle Wirksamkeit ohne katalytische Aktivität sein. Ren et al. gelang die Expression und

Rückfaltung eines 13,8 kDa großen c-Typ-Lysozymes von *M. domestica* mit einem pI von 7,68 in *E. coli* (Ren et al., 2009). Dieses zeigte wachstumsinhibierende Aktivität gegen grampositive (*S. aureus*) und gramnegative (*E. coli*) Bakterien, was die Theorie der nicht Expressierbarkeit aufgrund von antibakterieller Aktivität ins Schwanken bringt. Alternativ zum *E. coli* Expressionssystem wurde ein weiteres Lysozym ebenfalls aus *M. domestica* erfolgreich und aktiv in der eukaryotischen Hefe *P. pastoris* mit dem  $\alpha$ -Faktor Sekretionssignal exprimiert, ohne dass eine anschließende Rückfaltung zur Aktivierung benötigt wurde. Diese Arbeit diente als Vorlage für den Wechsel auf das *P. pastoris* Expressionssystem (Cancado et al., 2008). Doch auch zahlreiche weitere Lysozyme inklusive HEWL (Mine, 1996), humanes Lysozym (Goda et al., 2000) und g-Typ-Lysozym aus *Chlamys farreri* (Zhao et al., 2007) wurden in *P. pastoris* exprimiert. Anfängliche Schwierigkeiten bei der Expression des c-Lys3 in *P. pastoris* bestanden in dem Erhalt von zwei Proteinbanden in den Aufreinigungsfractionen (Abbildung 15). Eine Edman-Sequenzierung zur Überprüfung der N-Termini beider Proteinbanden ergab, dass die obere Bande zusätzlich 11 Aminosäuren der N-terminalen  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz enthält. Vermutlich wurde die Spaltstelle nicht eindeutig durch die verantwortlichen Hefe-Proteine KEX2 und STE13 erkannt und somit zwei verschieden lange c-Lys3 prozessiert. Da zusätzliche Aminosäuren die Aktivität von Proteinen beeinflussen können, sollte c-Lys3 möglichst ohne N-terminale Aminosäureanhänge heterolog exprimiert werden. Ghosalkar et al. (2008) modifizierten die Spaltstelle zwischen  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz und Sequenz des Zielproteins mit Glutamin (E) und Alanin (A), und erleichterten dadurch die Erkennung durch KEX2 und STE13, was zu einer erhöhten Ausbeute des heterolog exprimierten Proteins führte. In dieser Arbeit wurde die Optimierung der Spaltstelle durch die Modifikation mit der Aminosäuresequenz EA übernommen, resultierte aber nicht wie bei Ghosalkar et al. (2008) in einer höheren Ausbeute des heterolog exprimierten Proteins, sondern in einem korrekt prozessierten c-Lys3, dessen Sequenz mittels Edman-Abbau bestätigt wurde. Da die Modifikation der Spaltstelle mit dem Einfügen von Glutamin und Alanin erfolgreich verlief, wurde sie anschließend für die rekombinante Darstellung des c-Lys4 übernommen. Überraschenderweise enthielten die Elutionsfraktionen des c-Lys4 mehrere Banden, die auf Höhe von 15 kDa oder unterhalb in der SDS-PAGE detektiert werden konnten und anhand der N-terminalen Sequenzierung entweder als c-Lys4 oder N-terminale Degradationsprodukte des c-Lys4 identifiziert wurden. Die Abtrennung der Degradationsprodukte von dem Zielprotein durch Kationenionenaustausch-Chromatographie war nicht möglich, weshalb die Proteinfractionen inklusive Degradationsprodukten für die anschließende Charakterisierung des c-Lys4 verwendet wurden. Eine starke Aufkonzentrierung der Proteinfractionen resultierte ebenfalls in einem Fortschreiten der

Degradation, sodass im weiteren Verlauf von c-Lys3 und c-Lys4 unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden.

Für die beiden rekombinant dargestellten c-Typ-Lysozyme c-Lys3 und c-Lys4, die sich in ihren pI-Werten unterschieden, konnte eine Muramidase-Aktivität durch einen Lysehof-Test gezeigt werden. In der Literatur wird angenommen, dass die pI-Werte die Umgebung in der das Molekül aktiv ist reflektieren und somit Lysozyme mit einem niedrigen pI-Wert den Verdauungslisozymen zugeschrieben werden können, wogegen Lysozyme mit einem neutral bis basischen pI-Wert eine Rolle bei der Immunabwehr spielen. Anhand des Beispiels von Lysozymen aus *Rhodnius prolixus* ist erkennbar, dass solch eine allgemeine Einteilung sich schwierig gestaltet. Die untersuchten Lysozyme RpLys-A (pI = 8,5; Expression im Verdauungstrakt) und RpLys-B (pI = 6,84; Expression im Fettkörper) wurden anhand ihrer theoretischen pI-Werte und Expressionsorte entgegen dieser Annahme in Verdauungsenzyme mit basischen pI und Immunproteine mit niedrigen pI untergliedert (Ursic Bedoya et al., 2005). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse widersprechen ebenfalls der oben angeführten Annahme, da die pI-Werte der *H. axyridis* Lysozyme nicht mit den pH-Optima korrelierten. Sowohl c-Lys3 (pI = 5,46) als auch Lys4 (pI = 8,18) besaßen ihr pH-Optimum im leicht sauren Bereich von 6,0 und 6,5. Hiermit zeigen diese Untersuchungen, dass nicht der theoretische pI-Wert, sondern vielmehr pH-Optimum zusammen mit pH-Milieu des Wirkungsortes eine entscheidende Rolle bei der funktionalen Eingliederung spielen. Auch ein Lysozym aus *D. melanogaster* besaß trotz des theoretischen pI-Wertes bei 7,2 sein pH-Optimum bei 5. Seine Lyseaktivität war auf pH-Werte zwischen 3 und 6 beschränkt (Regel et al., 1998). Ähnlich dazu verhielten sich auch die pH-abhängigen Lyseaktivitäten der *H. axyridis* Lysozyme. Während c-Lys4 zwischen pH 5 und 8 eine Lyseaktivität zeigte, war c-Lys3 nur bei pH 5 bis 7 aktiv. Die aus *M. domestica* rekombinant dargestellten Lysozyme MdL1 (pI = 7,7) und MdL2 (pI = 6,7) besaßen beide ein pH-Optimum bei 4,8 und zeigten zwischen pH 3 bis pH 7 eine Lyseaktivität (Cancado et al., 2008). Bei diesen wird von Cancado et al. vermutet, dass MdL1 an seinem pH-Optimum eine starke positive Ladung aufweist, wodurch elektrostatische Interaktionen in der Substratbindung eine Rolle spielen könnten. Da eine vergleichbare Situation bei c-Lys4 mit einem pI-Wert von 8,18 und pH-Optimum bei 6,5 vorliegt, ist davon auszugehen, dass die Substratbindung durch elektrostatische Interaktionen unterstützt wird. Die bisher auf ihr pH-abhängiges Aktivitätsspektrum untersuchten Insektenlysozyme zeigten eine deutlich eingeschränkere Lyseaktivität als HEWL, dessen Lyseaktivität zwischen pH 5,5 und 11,5 nachweisbar war.

In dieser Arbeit konnte zudem das in c-Lys3 und c-Lys4 bei einer vorausgegangenen Sequenzanalyse identifizierte Calcium-Bindemotiv bestätigt werden. Das Calcium-Bindemotiv ist charakteristisch für  $\alpha$ -Laktalbumine und kommt zudem in einer geringen Anzahl an Vertebraten wie Pferden, Hunden oder auch Tauben bei c-Typ-Lysozymen vor (Irwin et al., 2011). Anhand der Kristallstrukturanalyse vom Pferde-Lysozymen und humanen  $\alpha$ -Laktalbumin wird angenommen, dass die carboxylierten Seitenketten der drei Asparaginsäuren an Position 85, 90 und 91 an der Calcium-Bindung beteiligt sind (Stuart et al., 1986; Tsuge et al., 1991). Arthropoden-Lysozyme mit einem ähnlichen Calcium-Bindemotiv sind bei *O. moubata* (Grunclová et al., 2003), *A. gambiae* (Li et al., 2005) und *Anopheles dirus* (Lapcharoen et al., 2012) gefunden worden, aber bis dato liegt kein empirischer Nachweis für eine Calcium-abhängige Muramidase-Aktivität in Insekten vor. In dieser Arbeit konnte der erstmalige Beweis erbracht werden, dass die Muramidase-Aktivität von c-Lys3 und c-Lys4, Arthropoden-Lysozyme mit möglichem Calcium-binde-Motiv, durch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  verstärkt werden kann. Die Zugabe eines Komplexbildners, EDTA oder EGTA, hob die Muramidase-Aktivität fast vollständig auf und bestätigte somit die Calcium-abhängige Aktivität (Abbildung 20). Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der Aktivität durch Calciumzugabe ist eine Konformationsänderung des Proteins durch Bindung der Calcium-Ionen, wodurch die Substratbindung vereinfacht wird (Iyer & Qasba, 1999).

## 5.2 Charakterisierung der i-Typ-Lysozyme von *H. axyridis*

Die als i-Typ-Lysozyme bezeichnete Unterfamilie der Lysozyme grenzt sich von den erstmals 1922 beschriebenen c-Typ-Lysozymen durch ihre bifunktionale Enzymaktivität ab. Sie können neben der für die c-Typ-Lysozyme bekannten Muramidase-Aktivität auch eine Isopeptidase-Aktivität aufweisen, mit deren Hilfe Isopeptidbindungen in geronnenem Blut aber auch Bakterienzellwandverknüpfungen hydrolysiert werden können (Goto et al., 2007; Zavalova et al., 1996). Eine Vielzahl an i-Typ-Lysozymvarianten sind für verschiedene Phyla der Invertebraten wie Anneliden (Josková et al., 2009), Nematoden (Mallo et al., 2002), Arthropoden (Paskewitz et al., 2008), Mollusken (Matsumoto et al., 2006) und Echinodermaten (Cong et al., 2009) untersucht worden. Eine Datenbankrecherche ergab, dass in allen bisher sequenzierten Insektengenomen i-Typ-Lysozym-Homologe vorliegen (Callewaert & Michiels, 2010). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnten auch im Asiatischen Marienkäfer mittels Transkriptomanalyse neben den c-Typ-Lysozymgenen fünf für i-Typ-Lysozyme kodierende Gensequenzen identifiziert werden. Auch im Genom des Pollenkäfers *Meligethes aeneus* sind fünf i-Typ-Lysozym-Gene vorhanden (Vilcinskas et al., 2013a; Vogel et al., 2014). Eine umfangreiche

Sequenzanalyse der *H. axyridis* i-Typ-Lysozymgene ergab, dass keines der i-Typ-Lysozyme, wie für Insekten vermutet, die für eine Muramidase-Aktivität relevanten katalytischen Aminosäurereste Glutamin und Asparagin besaß. In der Gensequenz des i-Lys2s lagen die für eine Isopeptidase-Aktivität relevanten Aminosäurereste Histidin und Serin vor (siehe 1.3.2). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden vier der fünf in *H. axyridis* vorhandenen i-Typ-Lysozyme in *E. coli* Expressionssystem rekombinant dargestellt. Die heterologe Expression des i-Lys2 resultierte in der Bildung von *inclusion bodies*. Daraufhin wurde vermutet, dass auch die weiteren i-Typ-Lysozyme i-Lys1, i-Lys4 und i-Lys5 als unlösliche Einschlusskörper exprimiert wurden. Von einer Rückfaltung der Proteine wurde aufgrund der Komplexität der i-Typ-Lysozyme, die sechs Disulfidbrücken ausbilden, abgesehen (Goto et al., 2007). Allerdings existieren Daten sowohl zu einem fusioniertem Lysozym aus dem Seeohr *H. discus discus* als auch zu einem i-Typ-Lysozym aus dem Regenwurm *Eisenia andrei*, die erfolgreich in *E. coli* BL21 (D3) rekombinant dargestellt wurden und beide die erwartete Muramidase-Aktivität zeigten (Bathige et al., 2013; Josková et al., 2009). Dennoch sind prokaryotische Expressionssysteme bekannt dafür, Proteinen mit einer großen Anzahl an Disulfidbrücken fehlerhaft zu Falten oder in einer Fehlformation zu resultieren. Dadurch besteht das Risiko, das eine nicht vorhandene Aktivität des Lysozymes aufgrund einer Fehlfaltung ein falsch negatives Ergebnis liefert (Demain & Vaishnav, 2009). Da die erfolgreiche Expression von aktiven Lysozymen mehrfach für das Hefeexpressionssystem gezeigt wurde, erfolgte der Wechsel auf die methylotrophe Hefe *P. pastoris* als Expressionsorganismus. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die heterologe Expression des i-Lys2 gelegt, da das Vorliegen der relevanten Aminosäurereste Serin und Histidin im Zusammenhang mit einem niedrigen isoelektrischen Punkt besonders interessant erschien. Die Evaluierung der Expressionsbedingungen ergab eine Inkubation von 96 h in BMMY Medium, dessen pH-Wert konstant 6 betrug. Unter ähnlichen Expressionsbedingungen wurde das 14 kDa große i-Typ-Lysozym der Seegurke *Apostichopus japonicus* ebenfalls mit N-terminal modifizierter  $\alpha$ -Signalsequenz von *S. cerevisiae* und c-terminalen His<sub>6</sub>-Tag modifiziert in *P. pastoris* exprimiert. Ausschlaggebend für eine optimale Expression war ein pH-Wert von 5 und 120 h Expressionsdauer. Das aufgereinigte rekombinant i-Typ-Lysozym der Seegurke zeigte eine Muramidase-Aktivität im Lysehof-Test gegen *M. luteus* (Wang et al., 2011). Wie anhand der Sequenzanalysen vermutet und in der Literatur diskutiert, war der Nachweis einer Muramidase-Aktivität für i-Lys2 nicht möglich (Van Herreweghe & Michiels, 2012). Auch konnte trotz der relevanten Aminosäurereste Serin und Histidin keine Isopeptidase-Aktivität sowohl des rekombinanten Proteins als auch von Hämolymphe mittels Isopeptidase Substrat L- $\gamma$ -Glutamyl-p-nitroanilid nachgewiesen werden. Das als Positivkontrolle mitgeführte Blutegelsekret war dagegen in der Lage das Isopeptidase-Substrat zu spalten, wie es von

Zavalova et al. (2000) für die Destabilase beschrieben wurde. Das rekombinant dargestellte abLys1 aus dem Seeohr *H. discus discus* zeigte mit dem gleichen Substrat ebenfalls eine Destabilase-Aktivität bei einem pH-Optimum bei 7. Allerdings wurde weder eine Positivkontrolle noch eine Negativekontrolle für die Bestimmung der relativen Aktivität mitgeführt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Aufreinigungsfraction möglicherweise andere enthaltene Proteine verantwortlich für die Spaltung waren (Bathige et al., 2013). Da es gelang, die Isopeptidase-Aktivität der Destabilase mit PMSF, einem typischen Serinprotease-Inhibitor, zu inhibieren, wird ein Serinprotease-ähnlicher Mechanismus hinter der Isopeptidase-Aktivität vermutet (Fradkov et al., 1996; Zavalova et al., 1996). Um zu ergründen, in wie weit bei der biologischen Funktion von i-Lys2 ein Serinprotease-ähnlicher Mechanismus eine Rolle spielt, wurde i-Lys2 mit einem fluoreszenzmarkierten Suizidsubstrat, das an das aktive Zentrum einer Serin-Hydrolase bindet, inkubiert. An die im mitgeführten Madensekret enthaltenen Serin-Hydrolasen band das Suizidsubstrat kovalent und konnte mittels SDS-PAGE detektiert werden, während keine Interaktion mit i-Lys2 nachweisbar war (Kahl et al., 2015). Die Überlegungen, dass das i-Lys2 eine Serin-Hydrolase mit bis zu dem heutigen Zeitpunkt unbekannter Substrat-Aktivität besitzen könnte, wurde dadurch ebenfalls widerlegt. Auch für das rekombinante i-Lys2 ohne c-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, der möglicherweise die Aktivität des Proteins negativ beeinflusst, konnte keine Isopeptidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Welche Aufgaben übernehmen also die i-Typ-Lysozyme in Insekten, wenn ihnen die bekannten enzymatischen Aktivitäten fehlen? Mit Hilfe einer Lokalisations- und Expressionsanalyse sollte die Frage nach der biologischen Funktion im weiteren Verlauf näher betrachtet werden. Das zuvor rekombinant dargestellte und aufgereinigte i-Lys2 wurde zur Generierung von Antisera verwendet, deren Spezifität und Effektivität zuerst in Western-Blot Analysen ermittelt wurden (Abbildung 23). Im Western-Blot zeigte Antiserum-1 nur eine geringe Kreuzreaktivität zu den c-Typ-Lysozymen und ermöglichte für die anschließenden Immunhistochemischen Färbungen ideale Nachweisbedingungen. Häufig werden solche Kreuzreaktivitäten genutzt, um Proteine innerhalb einer Klasse zu charakterisieren, wodurch sie nur eine eingeschränkte Spezifität für die differenzierte Betrachtung der Unterfamilien liefern. Ein gegen das *G. mellonella* Lysozym gerichteter Antikörper zeigte Kreuzreaktivität mit zwei weiteren Insektenlysozymen aus *B. mori* und *C. convolvuli*, aber nicht mit HEWL (Yu et al., 2002a). Das gegen das i-Lys2 gerichtete Antiserum zeigte dagegen keine Kreuzreaktivität mit Ganzkörperextrakten aus *G. mellonella*.

Das gegen das i-Lys2 gerichtete Antiserum markierte in den Gewebefärbungen (*whole mount staining*) nicht nur distinkte Proteine sondern wies eine unspezifische Hintergrundfärbung auf, die unter

anderem durch die Serumbestandteile hervorgerufen werden könnte. Der Abgleich mit einem vor der Immunisierung des Tieres entnommenen Präimmunsersums ermöglichte die Unterscheidung zwischen Hintergrundfärbung durch Serumpartikel und distinkter Proteinlokalisierung. Eine distinkte Färbung war ausschließlich in Fettkörperzellen von *H. axyridis* Adulti detektierbar (Abbildung 24). Nicht nur um die Lokalisation des vermutlichen i-Lys2 im Fettkörper zu bestätigen, sondern auch, um die Expression in diesem für die Bildung von Immunmodulatoren verantwortlichen Gewebe nachzuweisen, wurde im Anschluss an dieses Ergebnis die gewebsspezifische Expression des i-Lys2 untersucht. I-Lys2 wurde 50-fach höher im Fettkörper als in den Ovarien exprimiert. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der Expressionsanalyse von zwei i-Typ-Lysozymen aus *A. gambiae*. Die beiden i-Typ-Lysozyme mit niedrigem theoretischen pI-Wert ( $pI = 4,8$ ) wurden primär im Fettkörper und auch in den Malpighischen Gefäßen exprimiert. Ein 4-facher Anstieg der Expression im Mitteldarm konnte durch eine vorausgegangene Blutmahlzeit induziert werden, während weder eine Wunde noch die Injektion von Bakterien die Expression der Lysozyme beeinflusste (Paskewitz et al., 2008). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurde i-Lys2 weder im Ganzkäfereextrakt noch Darmextrakt nach einer vorausgegangenen Immunstimulation hochexprimiert. Den beiden *A. gambiae* Lysozymen fehlen, wie dem i-Lys2 auch, die für eine Muramidase-Aktivität benötigten Aminosäurereste Glutamin und Asparagin und die Autoren vermuten, dass der Funktionsverlust der Muramidase in i-Typ-Lysozymen mit dem Vorhandensein der c-Typ-Lysozyme in Arthropoden einhergegangen sein könnte. Da Arthropoden als einzige Invertebraten zusätzlich beide Lysozym-Subtypen exprimieren können, ermöglichte diese Doppelbesetzung das Divergieren in verschiedene biologische Funktionsrichtungen, während Anneliden oder auch Nematoden ausschließlich auf i-Typ-Lysozyme bei der Bakteriolyse angewiesen sind (Paskewitz et al., 2008). Der Anstieg an Lys i-1 und Lys i-2 nach der Blutmahlzeit lässt die Autoren weiterhin spekulieren, dass die i-Typ-Lysozyme, ähnlich der Destabilase aus *H. medicinalis*, an der Verdauung von geronnenem Blut beteiligt sein könnten (Paskewitz et al., 2008; Zavalova et al., 2000). Die vorliegende Arbeit gibt zu bedenken, dass i-Typ-Lysozyme aus Insekten, mit oder ohne die für eine Isopeptidase-Aktivität relevanten Aminosäurereste, sehr wahrscheinlich keine Isopeptidase-Aktivität aufweisen. Ein weiteres in Insekten untersuchtes i-Typ-Lysozym aus der Rossameise *C. floridanus* zeigte ebenfalls keine Expressionsänderung nach Immunstimulation der Tiere (Ratzka et al., 2013). Da es im Mitteldarm der Tiere eine hohe Expression aufzeigte wurde vermutet, dass es an der Kontrolle der hohen Anzahl an Endosymbionten in *C. floridanus* beteiligt ist. Die Autoren diskutieren für dieses i-Typ-Lysozym eher eine Verdauungs- als Abwehrfunktion aufgrund des niedrigen isoelektrischen Punktes (Ratzka et al., 2013). Allerdings

sollten als Grundlage solcher Annahmen nicht theoretische pI-Werte sondern tatsächliche pH-Optima der Proteine herangezogen werden, wie oben ausführlich für die c-Typ-Lysozyme diskutiert wurde.

Die Abwehrfunktion der i-Typ-Lysozyme wird deutlich beim Betrachten ihrer antimikrobiellen Spektren. Einige von ihnen zeigen Aktivitäten gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie zahlreiche Vertreter der Pilze. Selbst durch nicht-enzymatische antimikrobielle Aktivitäten mit unaufgeklärtem Mechanismus können i-Typ-Lysozyme das Wachstum von grampositiven und gramnegativen Bakterien inhibieren (Cong et al., 2009; Zavalova et al., 2010). Das i-Lys2 aus *H. axyridis* hatte weder einen wachstumsinhibierenden Einfluss auf grampositive noch gramnegative Bakterien, was durch seine unveränderte Expression nach Immunstimulation nicht verwunderlich erscheint. Eine direkte Beteiligung des i-Lys2 an der Immunabwehr ist demnach unwahrscheinlich und die hohe Expression des Lysozyms im Fettkörper führt zu dem Schluss, dass es weitere Untersuchungen bedarf, um die Rolle der i-Typ-Lysozyme in Coleopteren und anderen Insekten abschließend zu klären.

### 5.3 Antimikrobielles Spektrum der Lysozyme von *H. axyridis*

Lysozyme als Teil der Immunabwehr zum Schutz vor Pathogenen können sowohl über enzymatische als auch nicht enzymatische Mechanismen das Wachstum von Mikroorganismen inhibieren und in einigen Fällen die Bakterienzellen sogar abtöten (Nash et al., 2006). Die c-Typ-Lysozyme der Insekten sind bekannt dafür eine größere mikrobiozide Wirkung gegen grampositive als gegen gramnegative Bakterien aufzuzeigen, wobei der Grad der anti-gramnegativen Aktivität interspezifisch variieren kann (Mai & Hu, 2009; Yu et al., 2002a). Er wird beeinflusst durch Osmolarität, Ionenstärke und Präsenz von synergistischen Co-Faktoren in der Umgebung (Skerrett, 2004). Die Lysozyme von *H. cecropia*, *H. virescens* und drei rekombinant dargestellte Lysozyme aus *L. sericata* waren beispielsweise nur gegen grampositive Bakterien aktiv, während für Lysozyme aus *B. mori* und *M. domestica* Aktivitäten sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien nachgewiesen werden konnten (Abraham et al., 1995; Ren et al., 2009; Valachova et al., 2014; Yu et al., 2002a). Generell zeigten verschiedene Lysozyme aus der Ordnung Lepidoptera wachstumsinhibierende Eigenschaften gegen grampositive und gramnegative Bakterien, deren äußere Membran bestehend aus Polysacchariden und Proteinen die darunter gelegene Peptidoglykanschicht für Lysozyme schwer zugänglich macht (Wang et al., 2011; Yu et al., 2002a). Gegensätzlich zu den bisher bekannten und oben aufgeführten wachstumshemmenden Eigenschaften der Insektenlysozyme, konnten für die rekombinanten *H. axyridis* Lysozyme c-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 inhibierende Effekte gegen das Wachstum weder von grampositiven noch

gramnegativen Bakterien gezeigt werden (Abbildung 28). Wie oben bereits erwähnt, war auch das heterolog exprimierte i-Typ-Lysozyme i-Lys2 nicht aktiv gegen die getesteten Organismen. Da für c-Lys3 und c-Lys4 eine Muramidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wird davon ausgegangen, dass mindestens diese beiden rekombinanten Lysozyme in einer aktiven Konformation vorlagen und die nicht vorhandene wachstumsinhibierende Eigenschaften nicht auf inkorrekt gefaltete Proteine zurückzuführen waren.

Das antimikrobielle Spektrum der Insektenlysozyme beschränkt sich nicht nur auf die wachstumsinhibierenden Eigenschaften gegenüber Bakterien, sondern auch gegenüber verschiedenen Pilzen konnten wachstumshemmende Effekte nachgewiesen werden. Ein aus der *G. mellonella* Hämolymphe isoliertes c-Typ-Lysozym war *in vitro* in der Lage das Wachstum der Hefe *S. cerevisiae* zu inhibieren und wies damit eine ähnliche antimykotische Aktivität wie HEWL und hLYZ auf (Vilcinskas & Matha, 1997). Da *H. axyridis* weniger als die heimischen Arten *C. septempunctata* und *A. bipunctata* von dem entomopathogenen Pilz *B. bassiana* befallen wird, wurden auch die rekombinanten c-Typ-Lysozyme von *H. axyridis* auf antimykotische Eigenschaften untersucht (Roy et al., 2008; Shapiro-Ilan & Cottrell, 2005). Eine antimykotische Aktivität gegen *S. cerevisiae*, wie für HEWL, hLYZ und dem Lysozym von *G. mellonella* zuvor erwähnt, konnte weder für c-Lys3 noch für c-Lys4 gezeigt werden. Da *H. axyridis* in den letzten drei Jahren die häufigste Marienkäferart in deutschen Wein- und Obstanlagen war, wurde auch die antimykotische Aktivität beider rekombinanter Lysozyme gegen die häufig auf Weintrauben anzutreffende Grauschimmelfäule *Botrytis cinerea* untersucht. Während Yudina et al. eine lysierende Aktivität der Destabilase aus *H. medicinalis* gegen *B. cinerea* nachweisen konnten, zeigten weder c-Lys3 noch c-Lys4 gegen den Weintrauben befallenden Pilz eine Lyse-Aktivität (Yudina et al., 2012). Die bekannte Fähigkeit von Lysozymen das Chitin der Pilze zu binden wird genutzt, um Lysozyme über eine Affinitätsreinigung unter Verwendung von Chitinpartikeln zu separieren (Ruckenstein & Zeng, 1997). Bei der Untersuchung der Chitin-Bindeeigenschaft beider rekombinanter Lysozyme, lag im Vergleich zu HEWL nur eine schwache Affinität Chitin zu binden vor (Abbildung 21). Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die *H. axyridis* Lysozyme vergleichend zu anderen Insektenlysozymen oder c-Typ-Lysozymen generell, keine antimykotische Aktivität gegenüber *S. cerevisiae* und *B. cinerea* besaßen und nur eine schwache Chitin-Bindeeigenschaft aufwiesen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die beiden c-Typ-Lysozymvertreter vielmehr c-Lys3 und c-Lys4 eine wichtige Funktion außerhalb der antimykotischen Immunabwehr einnehmen.

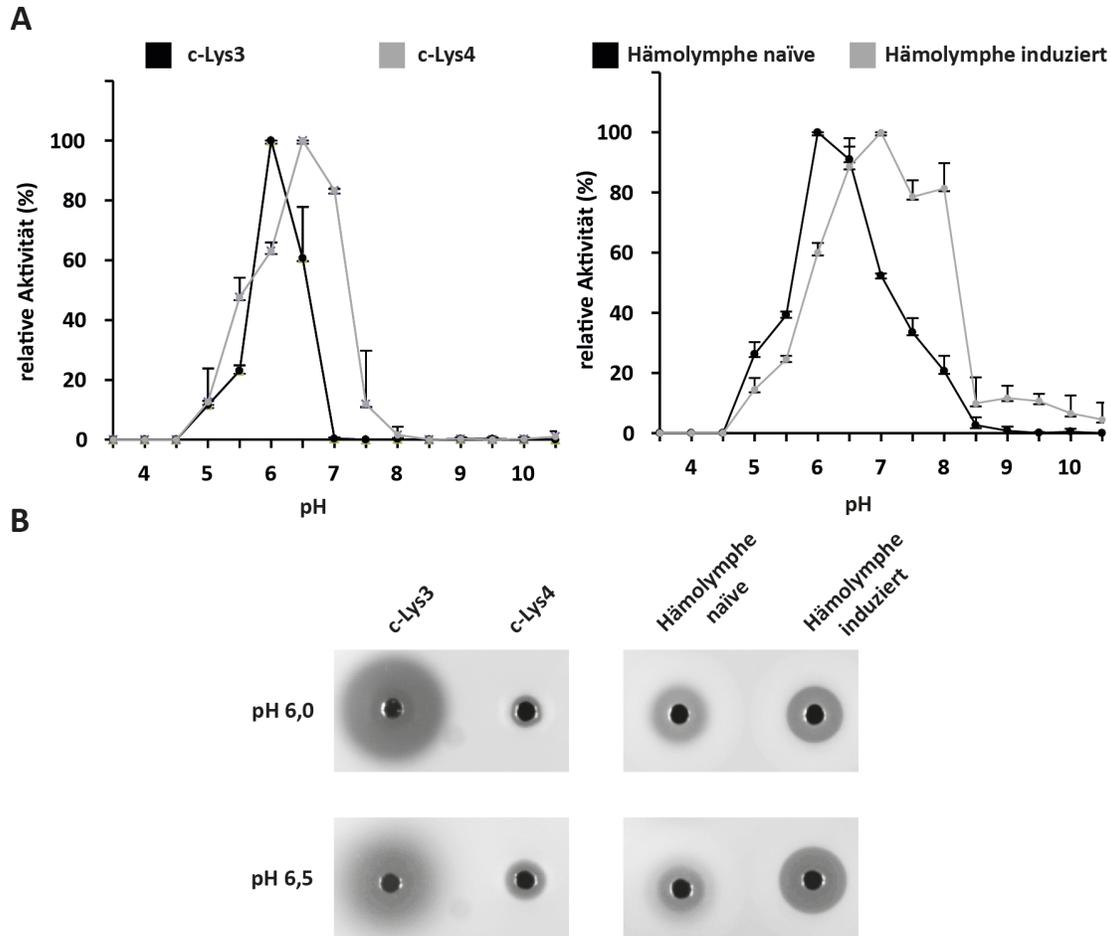
Unabhängig von nicht nachweisbaren wachstumsinhibierenden Eigenschaften der *H. axyridis* Lysozyme, wurde die Fähigkeit ihrer Muramidase untersucht, verschiedene Bakterienstämme lysieren zu können. Modifikationen der Bakterienzellwände führen innerhalb der grampositiven Bakterien zu unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber Lysozymen. Während *M. luteus* Lysozym-sensitiv ist, sind Staphylokokken und Streptokokken Lysozymen gegenüber resistent. Verantwortlich hierfür sind die Art der Verknüpfung von Acetylaminozuckern im Aufbau der Zellwand, aber auch der Anteil an Ester-Gruppen spielt eine Rolle bei der Sensitivität (Salton & Pavlik, 1960). Die *H. axyridis* Lysozyme c-Lys3 und c-Lys4 waren gegen *B. subtilis* und *B. megaterium* weniger aktiv als gegen kommerziell erworbene lyophilisierte und selbstgezüchtete *M. luteus*, allerdings zeigten sie keine Lyse-Aktivität gegen weitere grampositive Bakterien wie *S. aureus*, *S. epidermidis* und acht Listerien-Spezies (Abbildung 28). Sie waren nicht in der Lage die gramnegativen Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* zu lysieren. Ein c-Typ-Lysozym aus *A. gambiae* zeigte ebenfalls nur Lyse-Aktivität gegen *M. luteus* und *B. subtilis* trotz zahlreicher anderer getesteter grampositiver und gramnegativer Bakterien. Sogar gegen ein *M. luteus*-Isolat aus *A. gambiae* selbst zeigte es keine Aktivität, da dieser Bakterienstamm sich möglicherweise an die vorhandenen *A. gambiae* Lysozyme durch Zellewandmodifikationen adaptierte hatte (Kajla et al., 2010). Auch die Untersuchungen der antimikrobiellen Aktivität des rekombinanten *H. discus discus* i-Typ-Lysozymes beschränkte sich auf Lysehof-Tests mit in Phosphatpuffer resuspendierten Bakterienpellets (Bathige et al., 2013). Von Kajla et al. (2010) und Bathige et al. (2013) wird die Lyse-Aktivität der Enzyme mit einer antibakteriellen Aktivität gleichgesetzt, was aus Sicht der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse differenziert betrachtet werden sollte. Sowohl die Lysozyme aus *H. axyridis* als auch die Lysozyme von *A. gambiae* und *H. discus discus* konnten unter suboptimalen Wachstumsbedingungen für Bakterien diese lysieren, hatten aber keinen Einfluss auf sich im Wachstum befindende Bakterien durch Inhibition oder Abtöten der Mikroorganismen. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit von Lysozymen Bakterien zu lysieren nicht zwingend mit der Fähigkeit der Wachstumsinhibition einhergehen muss und somit die *H. axyridis* Lysozyme alleine wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Lyse von spezifisch ausgewählten Bakterien nicht aber bei der Wachstumsinhibition der Mikroorganismen einnehmen.

## 5.4 Multiple Funktionalität der c-Typ-Lysozyme von *H. axyridis*

### 5.4.1 Lysozyme in der Hämolymphe

Lysozyme-ähnliche Aktivitäten wurden schon 1968 in der Hämolymphe von Honigbienen nachgewiesen und der erste aus Insektenhämolymphe isolierte antimikrobielle Faktor wurde ebenfalls den Lysozymen zugeordnet (Mohrig & Messner, 1968; Powning & Davidson, 1976). Die blutähnliche Hämolymphe ist in Insekten nicht nur verantwortlich für den Austausch und Transport von Nährstoffen und Metaboliten zwischen Organen und Geweben, sondern auch für die chemische Kommunikation von antimikrobiellen Peptiden und Proteinen zum Schutz vor Pathogenen (Vierstraete et al., 2004). Die aus der Literatur bekannte Muramidase-Aktivität der *H. axyridis* Hämolymphe (Gross et al., 2010) wurde durch eine vorausgegangene Immunstimulation einhergehend mit einer künstlich hervorgerufenen Immunantwort der Käfer beeinflusst (Abbildung 26). Das pH-Optimum der Muramidase-Aktivität verschob sich nach einer Immunstimulation der Tiere von pH 6,0 auf pH 7,0 und die Morphologie der Lysehof-Ränder wechselte von einem diffusen zu einem glatt-abgegrenzten Lysehof-Rand. Interessanter Weise unterschieden sich auch die rekombinanten c-Typ-Lysozyme c-Lys3 und c-Lys4 in der Morphologie ihrer Lysehöfe und der pH-Optima. Dieser Befund führte zur Annahme, dass c-Lys3 eine größere Rolle in naiven Tieren spielen könnte, während c-Lys4 nach Immunstimulation hoch exprimiert wird. Zur Verdeutlichung dieser Beobachtung wurden sowohl die pH-abhängigen Aktivitätsspektren der beiden rekombinanten c-Typ-Lysozyme mit den Aktivitätsspektren der Hämolympheproben als auch die Lysehof-Morphologien verglichen (Abbildung 30).

Ein möglicher Grund für den diskutierten Aktivitätswechsel von c-Lys3 und c-Lys4 könnte eine pH-Wert Änderung der Hämolymphe darstellen. Während der mit pH-Papier gemessene Wert der naiven Hämolymphe bei 6,0 lag, würde ein Anstieg des pH-Wertes der immunstimulierten Hämolymphe auf pH 6,5 die Aktivität von c-Lys4 steigern. Die begrenzte Messgenauigkeit des pH-Papiers machte es nicht möglich, diese These zu überprüfen. Die geringen Mengen an zur Verfügung stehender Hämolymphe und die nicht vorhandenen technischen Möglichkeiten erlaubten keine alternative Messmethode zur präzisen Hämolymphe-pH-Wert-Bestimmung. Der für die *H. axyridis* Hämolymphe bestimmte pH-Wert korrespondiert mit den in der Literatur publizierten durchschnittlichen pH-Werten für Insekten, die zwischen 6,5 und 7,5 liegen (Harrison, 2001).



**Abbildung 30: Vergleich der pH-abhängigen Aktivitätsspektren von rekombinanten Lysozymen und Hämolympfproben. PH-abhängige Muramidase-Abhängigkeit (A) und Vergleich der Lysehof-Morphologien von c-Lys3 und c-Lys4 sowie Hämolymphe von naïven und immunstimulierten Käfern (B).**

Eine Regulationsänderung auf Expressionsebene von c-Lys3 und c-Lys4 wäre eine weitere Erklärung für den Anstieg des Aktivität-pH-Optimums und die Morphologie-Änderung des Lysehof-Randes der *H. axyridis* Hämolymphe nach Immunstimulation. In der auf qRT-PCR basierenden Expressionsanalyse zeigte sich ein etwa 2-facher Anstieg der c-Lys4 Expression im Ganzkäferextrakt während die Expression von c-Lys3 unverändert blieb. Auch ein aus der Hämolymphe des Eulenfalters *H. virescens* gereinigtes Lysozym ( $pI \approx 9,5$ ), das antibakterielle Aktivität gegen *M. luteus*, *B. megaterium* und *B. subtilis* aber nicht gegen *E. coli* aufwies, wurde nach Immunstimulation um das 9-fache hochexprimiert (Lockey & Ourth, 1996). Die Vergleichbarkeit der Lysozym-Konzentrationen in der Hämolymphe mit dem mRNA Expressionslevel ist jedoch begrenzt, da nicht zwangsweise die gesamte Menge an mRNA translatiert und anschließend das Lysozym in die Hämolymphe sezerniert wird. Beispielsweise wurde von Nayduch & Joyner eine Inkongruenz zwischen Lysozym mRNA-Level

und Protein-Level in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *M. domestica* festgestellt (Nayduch & Joyner, 2013).

Von Gross et al. (2009) wurde unabhängig von dieser Arbeit eine Muramidase-ähnliche Aktivität in naiver und immunstimulierter Hämolymphe sowohl von *H. axyridis* Larven als auch adulten Käfern beobachtet. Die Autoren fanden in dieser Studie heraus, dass die Hämolymphe der Larven eine stärkere Muramidase-Aktivität als die Hämolymphe der Adulti zeigte, obwohl ihre Hämolymphe eine schwächere antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien aufwies. Diese Beobachtung spiegelt unsere Ergebnisse wieder, indem eine Korrelation von Muramidase-Aktivität nicht zwingend mit einer antibakteriellen Aktivität einhergehen muss, sondern Lysozyme in der Hämolymphe möglicherweise mit Hilfe ihrer Muramidase weitere wichtige Aufgaben übernehmen. Beispielsweise sind Hämolympflysozyme an der Freisetzung von Peptidoglykanfragmenten eingedrungener Bakterien beteiligt, die durch Phagozytose, AMPs oder auch durch Lysozyme selbst abgetötet wurden. Die als Signalmoleküle fungierenden freigesetzten Peptidoglykanfragmente binden an Rezeptoren und induzieren eine Signaltransduktionskaskade, die in der Aktivierung weiterer Immungene resultiert (Dunn et al., 1994). Nicht nur im Fall einer Infektion mit grampositiven sondern auch gramnegativen Bakterien, die normalerweise resistent gegenüber Lysozymen sind, werden Peptidoglykanfragmente aus der gramnegativen Bakterienzellwand zur Signaltransduktion freigesetzt (Kanost et al., 1988; Morishima et al., 1992). Gandhe et al. (2007) konnten sogar zeigen, dass bei einem Lysozym aus *B. mori* trotz fehlender Muramidase-Aktivität eine Peptidoglykanbindung möglich war und die Autoren beschreiben damit eines der Aufgabengebiete von Muramidase-losen Lysozymen, zu denen c-Lys1 und c-Lys2 aus *H. axyridis* zählen (Gandhe et al., 2007). Weiterhin wird die Beobachtung der Peptidoglykanbindung und Signaltransduktion dahingehend interessant, dass c-Lys3 und c-Lys4 bei den untersuchten Mikroorganismen keine antimikrobielle Wachstumsinhibition zeigten und nur eine Lyse spezifischer grampositiver Bakterien nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise sind diese beiden Käferlysozyme also nicht als direkte Effektoren an der Immunabwehr beteiligt, sondern induzieren die Produktion von weiteren Immunmodulatoren durch die Bindung von Peptidoglykan mit anschließender Aktivierung eines Signaltransduktionsweges. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass besonders c-Lys3 konstitutiv in der Hämolymphe nachweisbar war und damit eine schnelle Einleitung der AMP-Produktion bei einem Pathogenbefall ermöglichen würde.

Eine weitere Funktion in Insekten wurde für Käferlysozyme aus *T. molitor* beschrieben. Die Autoren um Park et al. konnten die Beteiligung von Lysozymen an der Regulation der Melanisierung durch die Generierung von Peptidoglykanfragmenten zeigen, die anschließend an die

Peptidoglykanerkennungsrezeptoren banden und die Melanisierung initiierten (Park et al., 2007). In *Anopheles* hatte der Knockdown von Anopheles c-Typ-Lysozym 1 jedoch keinen Einfluss auf eine schnelle Melanisierung (Kajla et al., 2010). Eine Beteiligung der c-Typ-Lysozyme von *H. axyridis* an der Melanisierung wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet, stellt aber eine interessante Fragestellung für weiterführende Untersuchung zur Identifikation der ganzheitlichen Rolle von c-Typ-Lysozymen in Insekten dar.

#### 5.4.2 Lysozyme im Verdauungstrakt

Die humorale Immunabwehr von Insekten spielt nicht nur eine große Rolle in den Verteidigungsmechanismen der Hämolymphe, sondern auch im Verdauungstrakt (Ren et al., 2009). Dieser ist bedingt durch die Aufnahme von Nahrung und mit der Nahrung assoziierten Symbionten und Pathogenen als weiterer Eintrittsort für Mikroorganismen von großer Bedeutung. In Insekten sind Vor- und Enddarm des Verdauungstraktes durch eine chitinhaltige Kutikula vor Eindringlingen abgesichert, während der ungeschützte Mitteldarm auf eine effektive Immunabwehr bestehend aus AMPs angewiesen ist. Kritisch bei der Verteidigungsstrategie im Darm mit antimikrobiellen Substanzen ist die Unterscheidung zwischen Wirt-assoziiierter Darmflora und eingedrungenen Pathogenen, um nicht die eigenen verdauungsrelevanten Symbionten zu zerstören (Dillon & Dillon, 2004). Die aufgenommenen Pathogene werden im Insektdarm nicht nur abgetötet sondern anschließend auch zusammen mit der übrigen Nahrung verdaut. In *D. melanogaster* wurde eine große Anzahl an Lysozymen im Gastrointestinaltrakt gefunden, die an der Verdauung beteiligt sind: Auch in weiteren Familien der Ordnung Diptera scheinen Lysozyme nicht nur an der Immunabwehr sondern auch an Verdauungsprozessen mitzuwirken (Hultmark, 1995; Lemos & Terra, 1991; Valachova et al., 2014). Im Mitteldarmextrakt von *M. domestica* wurde eine um das 30-fach höhere Muramidase-Aktivität im Vergleich zur Hämolymphe der Tiere nachgewiesen (Lemos & Terra, 1991). Von Valachova et al. (2014) wurden drei c-Typ-Lysozyme im Verdauungstrakt von *L. sericata* untersucht, die in Kompartimenten des Mitteldarms exprimiert wurden, in denen die Eradikation von grampositiven Bakterien stattfand. In dieser Mitteldarmregion können durch eine Kombination aus niedrigem pH-Wert, Lysozymen und Cathepsin-D-ähnlichem Protein Bakterien abgetötet werden (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Lemos & Terra, 1991).

In *H. axyridis* zeigte sich erst nach einer vorausgegangenen Immunstimulation eine Muramidase-Aktivität der Darmextrakte im Lysehof-Test (Abbildung 26B). Diese auf Protein-Ebene induzierbare gesteigerte Aktivität war vermutlich dem c-Lys4 zuzuschreiben, da die Lysehof-Ränder eine glatte Morphologie aufzeigten und die mRNA-Menge des c-Lys4 nach Immunstimulation um das 8-fache

im Darm anstieg (Abbildung 27). Die c-Lys3 Expression änderte sich durch die Immunstimulation nicht. Der Anstieg der c-Lys4 Expression verdeutlicht, dass generell Lysozyme im Darm von Insekten exprimiert werden können, obwohl als typischer Hauptsyntheseort von AMPs der Insekten-Fettkörper diskutiert wird. Hultmark et al. (1995) beobachtete in *M. domestica*, dass weder im Fettkörper noch in den Hämozyten mRNA von Lysozymen nachgewiesen werden konnte, allerdings ein konstitutives Lysozym-Level in der Hämolymphe vorlag. Die gleichen in der Hämolymphe identifizierten Lysozyme waren ebenfalls im Darm nachweisbar. Hultmark et al. schlussfolgerten aus diesem Ergebnis, dass das Mitteldarmgewebe Lysozyme exprimieren und in zwei Richtungen, einerseits in das Darmlumen und andererseits in die Hämolymphe, exportieren kann (Hultmark, 1995). Die These, dass die gleichen Lysozyme sowohl in der Hämolymphe als auch im Darm vorliegen, konnte durch unsere Untersuchungen bekräftigt werden.

In der Mücke *A. aegypti* resultierte die Injektion von Bakterien nicht nur im Expressionsanstieg von Lysozymen in Fettkörper und Hämozyten sondern vor allem in der Hochregulation der Expression im Darm der Tiere (Ursic Bedoya et al., 2005). Auch für ein c-Typ-Lysozym aus *M. domestica* wurde ein leichter Konzentrationsanstieg im Darm auf eine vorausgegangene Immunstimulation mit *E. coli* oder *S. aureus* verzeichnet, wogegen Hungerstress über 24 h Stunden und damit einhergehend Mangel an zu verdauender Nahrung keine Expressionsänderung des Lysozymes auslöste (Ren et al., 2009). Dagegen stieg in der Raubwanze *Triatoma brasiliensis*, dem Vektor des Erregers der Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi*, nach einer vorausgegangenen Blutmahlzeit die Expression sowohl eines Defensins als auch eines Lysozyms im Darm, deren gewebespezifisches Expressionsmuster eine starke Ähnlichkeit aufwies (Araújo et al., 2006). Ungeklärt dabei bleibt, ob der Expressionsanstieg der Immunabwehr gegen aufgenommene Pathogene dient oder die Lysozyme zur Verdauung der aufgenommenen Blutbestandteile benötigt werden. Da Marienkäfer eine aphidophage Ernährung präferieren, werden sie durch das Vorhandensein von einer großen Zahl an Blattlaussymbionten bei der Nahrungsaufnahme mit diesen konfrontiert. In wie weit das im Darm induzierbare c-Lys4 eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme ohne Immunstimulation spielt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und legt Bedarf an weiteren Untersuchungen offen, mit dem Ziel die Beteiligung der c-Typ-Lysozyme im Darm an der Verdauung und/oder Immunabwehr abschließend zu enträtseln.

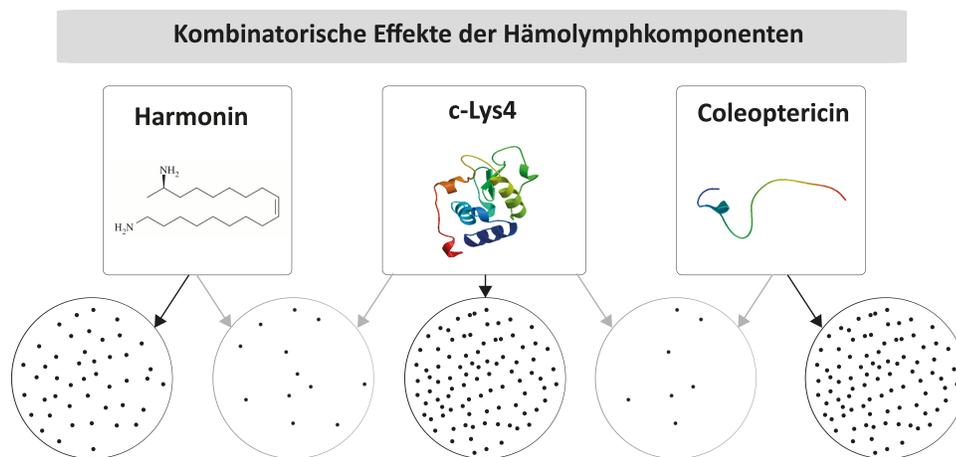
#### 5.4.3 Lysozyme unterstützten das zweilagige Immunsystem

*H. axyridis* ist durch das Fehlen eines adaptiven Immunsystems auf eine effektive angeborene Immunantwort angewiesen, die von einem chitinhaltigen Exoskelett sowie zellulären und humoralen Komponenten gebildet wird (Uvell & Engström, 2007). Dabei ist der Höhepunkt der humoralen

Antwort das schnelle Freisetzen eines AMP-Cocktails in die Hämolymphe wenige Stunden nach einer Infektion. In *H. axyridis* setzt sich der Cocktail aus mehr als acht AMPs zusammen, zu denen unter anderem Defensine, Coleopterine und Attacine zählen. Diese unterstützen im zweilagigen Immunsystem von *H. axyridis* nach einer Immunstimulation die Funktion des Sekundärmetabolits Harmonin, welcher nach einer Infektion runterreguliert wird, um limitierte Ressourcen für die Produktion von Immunmodulatoren während einer Abwehrreaktion einzusparen (Schmidtberg et al., 2013; Vilcinskas et al., 2013b). Obwohl weder für c-Lys3 noch c-Lys4 wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten, sprach zumindest die Hochregulation des c-Lys4 nach einer Immunstimulation für eine Beteiligung am zweilagigen Immunsystem von *H. axyridis*. Diese Vermutung konnte durch den Nachweis einer Interaktion von c-Lys4 mit den Immunmodulatoren Harmonin und den zwei am meisten hochregulierten Coleopterinen in Form von einer Verstärkung ihrer antibakteriellen Wirkung durch c-Lys4 gezeigt werden (Abbildung 31). Das c-Lys4 reduzierte die minimale Inhibitionskonzentration von Harmonin um das 4-fache und von den zwei Coleopterinen um das 16-fache in einem *B. subtilis*-Wachstumsinhibitionstest. Für die Coleopterine war bisher nur eine moderate anti-grampositive Aktivität beschrieben worden, die durch die Kombination mit c-Lys4 verstärkt werden konnte (Röhrich et al., 2012; Vilcinskas et al., 2013a). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnte auch das Forscherteam Zdybicka-Barabas et al. (2013) den Anstieg der Muramidase-Aktivität eines Lysozymes aus *G. mellonella* in der Anwesenheit des AMPS Apolipophorin III zeigen. Zudem wurde durch die Zugabe von Apolipophorin III die Permeabilisierungsaktivität des Lysozyms gegenüber *E. coli* verstärkt, ohne dass die Bildung eines intermolekularen Komplexes nachweisbar war (Zdybicka-Barabas et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Auswirkung der Interaktion von c-Lys4 zusammen mit Harmonin oder den Coleopterinen auf das Wachstum von *E. coli* beobachtet werden. Das gleiche Team um Zdybicka-Barabas hatte schon zuvor eine synergistische Aktivität des oben erwähnten *G. mellonella* Lysozyms zusammen mit einem anionischen Peptid sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien gezeigt und konnte ebenfalls auch das Zusammenspiel dieser beiden Immunmodulatoren gegen den Pilz *Candida albicans* nachweisen (Sowa-Jasiński et al., 2014; Zdybicka-Barabas et al., 2012). Kombinatorische Effekte zwischen antimikrobiellen Peptiden wurden auch für die nekrotisches Gewebe besiedelnde Wundmade *L. sericata* beschrieben, die ebenfalls mit über 40 für AMPs kodierenden Genen ein breites antimikrobielles Repertoire aufweist (Pöppel et al., 2015).

Die unterschiedliche Auswirkung der Interaktion von c-Lys4 mit Harmonin und den zwei Coleopterinen auf das Bakterienwachstum könnte sich durch das zweilagige Immunsystem selbst

erklären. Der Lysozymeffekt mit den Coleopterincinen war wesentlich stärker als mit Harmonin und ein möglicher Grund dafür könnte die gleichzeitig vermehrte Expression von c-Lys4 zusammen mit den Coleopterincinen und weiteren AMPs nach einer Immunstimulation sein (Vilcinskas et al., 2013a). Dagegen lagen c-Lys4 und Harmonin durch die Runterregulierung des Sekundärmetabolits nach Immunstimulation nicht in größeren Mengen zusammen im Organismus vor (Schmidtberg et al., 2013; Vilcinskas et al., 2013b). Bei dieser Beobachtung und weiteren Betrachtung spielt auch eine Rolle, wie stark die Harmonin-Konzentration nach Immunstimulation sinkt. Schmidtberg et al. (2013) zeigten einen Konzentrationsabfall des Harmonins von 6,5 g/mg Körpergewicht auf 3,5 g/mg, was unter Berücksichtigung der 4-fachen Verstärkung des Harmonin-Effekts durch c-Lys4 keine starke Reduktion der Abwehreigenschaften des Harmonins hervorrufen würde. Vielmehr ist die Hochregulation des c-Lys4 für den Marienkäfer kostengünstig, da er durch die Produktion dieses antimikrobiellen Proteins weniger von Harmonin und Coleoptericin synthetisieren muss um dennoch eine effektive Immunabwehr zu erhalten. Ob c-Lys4 die antimikrobielle Wirksamkeit weiterer AMPs von *H. axyridis* verstärken kann, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.



**Abbildung 31: Kombinierte antibakterielle Aktivität von Hämolymphekomponenten gegen *B. subtilis***

Die in diesem Abschnitt erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Betrachtung der antimikrobiellen Aktivitäten von Einzelsubstanzen einen groben Einblick über deren Wirksamkeit und antimikrobielle Eigenschaften geben, allerdings das antimikrobielle Spektrum und die Effektivität erst unter physiologischen Bedingungen real beurteilt werden können. Die hier aufgezeigte Untersuchung von kombinierten Aktivitäten hilft dabei die Relevanz des von *H. axyridis* nach einer Infektion gebildeten AMP-Cocktails zu verstehen und rückt damit das effektive Immunsystem von *H. axyridis* weiter in den Mittelpunkt, verantwortlich für den Ausbreitungserfolg des invasiven Marienkäfers zu sein.

## 5.5 Ausblick

Die duale Rolle der Insektenlysozyme, welche einerseits als Abwehrmoleküle in Hämolymphe und Darm eingedrungene Mikroorganismen abtöten und mit den freigesetzten Peptidoglykanfragmenten die AMP-Produktion induzieren und andererseits an Verdauungsprozessen beteiligt sind, scheint übertragbar auf die *H. axyridis* Lysozyme zu sein. Auch wenn für sie alleine keine antimikrobiellen Aktivitäten gegen zahlreiche Pathogene gezeigt werden konnten, so war ihre verstärkende Wirkung auf die Effektivität der antimikrobiellen Substanzen Harmonin und Coleoptericin umso imposanter. Das Zusammenspiel der *H. axyridis* Lysozyme mit weiteren Immunmodulatoren führt zu einer Optimierung der Insektenimmunität, die ein besseres Verständnis über den Erfolg von invasiven Arten bedingt durch ihr ausgeprägtes Immunsystem liefert. Invasive Arten, die sich nach der Ansiedlung erfolgreich in fremden Habitaten ausbreiten, können einen negativen ökologischen und ökonomischen Einfluss haben. Der Grund, weshalb einige Arten zu erfolgreichen Einwanderer werden, wogegen andere, eng verwandte Arten, erfolglos bleiben ist meist unklar (Schmidtberg et al., 2013; Vilcinskis et al., 2013b). Die ausgeprägte Immunität von *H. axyridis* gegen wichtige Antagonisten wie Bakterien und Pilze ist ein wesentlicher Faktor zur Vergrößerung seiner Fitness, die neben weiteren Faktoren ein Aspekt der Konkurrenzfähigkeit von *H. axyridis* zu sein scheint und den weltweite Ausbreitungserfolg ermöglicht (Gross et al., 2010; Roy & Wajnberg, 2008).

Transferiert man das in dieser Arbeit erlangte Wissen über das Zusammenspiel von Lysozymen zusammen mit weiteren antimikrobiellen Substanzen in den Alltag, so könnte dieses ein neues Einsatzgebiet für Lysozyme im medizinischen Bereich bedeuten. Mit dem aufkommenden Problem der Antibiotikaresistenzen von Humanpathogenen gewinnen alternative Behandlungsmethoden täglich an Bedeutung. Samaranyake et al. (2009) konnten synergistische Effekte von Lysozymen zusammen mit Nystatin und Amphotericin bei der Bekämpfung eines *C. albicans*-Biofilms zeigen und diskutierten den Einsatz dieser Kombination als sichere Alternative für eine zukünftige Behandlung gegen widerspenstige Candidosen (Samaranyake et al., 2009). Wie dieses Beispiel zeigt, könnte eine Kombinationstherapie bestehend aus antimikrobiellen Substanzen zusammen mit Lysozymen nicht nur die Wirksamkeit in Relation zur Dosis optimieren sondern auch durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen der Substanzen die Resistenzbildung minimieren und damit einhergehend innovative Therapialternativen gegen resistente Mikroorganismen liefern.

---

**Literaturverzeichnis**

- Abraham E, Nagaraju J, Salunke D, Gupta H & Datta R (1995) Purification and partial characterization of an induced antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of invertebrate pathology* 65: 17-24.
- Alhmedi A, Haubruge E & Francis F (2010) Intraguild interactions and aphid predators: biological efficiency of *Harmonia axyridis* and *Episyrphus balteatus*. *Journal of Applied Entomology* 134: 34-44.
- Altincicek B, Knorr E & Vilcinskas A (2008) Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental & Comparative Immunology* 32: 585-595.
- Altincicek B & Vilcinskas A (2007) Analysis of the immune-inducible transcriptome from microbial stress resistant, rat-tailed maggots of the drone fly *Eristalis tenax*. *BMC Genomics* 8: 326.
- Altincicek B & Vilcinskas A (2009) Septic injury inducible genes in medicinal maggots of the green blow fly *Lucilia sericata*. *Insect molecular biology* 18: 119-125.
- Araújo C, Waniek P, Stock P, Mayer C, Jansen A & Schaub G (2006) Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect biochemistry and molecular biology* 36: 547-560.
- Arim M & Marquet PA (2004) Intraguild predation: a widespread interaction related to species biology. *Ecology Letters* 7: 557-564.
- Bachali S, Jager M, Hassanin A, Schoentgen F, Jolles P, Fiala-Medioni A & Deutsch JS (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol* 54: 652-664.
- Bangham J, Jiggins F & Lemaitre B (2006) Insect immunity: the post-genomic era. *Immunity* 25: 1-5.
- Baskova L & Nikonov G (1991) Destabilase, the novel [varepsilon]-([gamma]-Glu)-Lys isopeptidase with thrombolytic activity. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2: 167-172.
- Bathige S, Umasuthan N, Kasthuri SR, Whang I, Lim B-S, Nam B-H & Lee J (2013) A bifunctional invertebrate-type lysozyme from the disk abalone, *Haliotis discus discus*: genome organization, transcriptional profiling and biological activities of recombinant protein. *Developmental & Comparative Immunology* 41: 282-294.
- Blake C, Johnson LN, Mair G, North A, Phillips D & Sarma V (1967) Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*: 378-388.
- Boman HG (1998) Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scandinavian journal of immunology* 48: 15-25.
- Brown PM, Thomas CE, Lombaert E, Jeffries DL, Estoup A & Handley L-JL (2011) The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl* 56: 623-641.
- Bulet P & Stocklin R (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* 12: 3-11.
- Callewaert L & Michiels CW (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences* 35: 127-160.
- Cancado F, Chimoy Effio P, Terra W & Marana S (2008) Cloning, purification and comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica* larvae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41: 969-977.

- Cherix D, Wyss C & Pape T (2012) Occurrences of flesh flies (Diptera: *Sarcophagidae*) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators. *Forensic science international* 220: 158-163.
- Cong L, Yang X, Wang X, Tada M, Lu M, Liu H & Zhu B (2009) Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *Journal of bioscience and bioengineering* 107: 583-588.
- Daffre S, Kylsten P, Samakovlis C & Hultmark D (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular and General Genetics MGG* 242: 152-162.
- Demain AL & Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27: 297-306.
- Dillon R & Dillon V (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology* 49: 71-92.
- Dimopoulos G (2003) Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. *Cell Microbiol* 5: 3-14.
- Dong Y, Manfredini F & Dimopoulos G (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* 5: e1000423.
- Dunn PE, Bohnert TJ & Russell V (1994) Regulation of Antibacterial Protein Synthesis Following Infection and During Metamorphosis of *Manduca sexta*. *Ann N Y Acad Sci* 712: 117-130.
- Dunn PE & Drake DR (1983) Fate of bacteria injected into naive and immunized larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Journal of invertebrate pathology* 41: 77-85.
- Espinoza-Fuentes F & Terra WR (1987) Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect biochemistry* 17: 809-817.
- Evans J, Aronstein K, Chen Y, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson G, Zou Z & Hultmark D (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* 15: 645-656.
- Fernandez-Sousa JM, GAVILANES JG, MUNICIO AM, PEREZ-ARANDA A & RODRIGUEZ R (1977) Lysozyme from the insect *Ceratitidis capitata* eggs. *European Journal of Biochemistry* 72: 25-33.
- Fleming A (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*: 306-317.
- Fradkov A, Berezhnoy S, Barsova E, Zavalova L, Lukyanov S, Baskova I & Sverdlov ED (1996) Enzyme from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) that specifically splits endo- $\epsilon$  ( $\gamma$ -Glu)-Lys isopeptide bonds: cDNA cloning and protein primary structure. *FEBS letters* 390: 145-148.
- Gandhe AS, Janardhan G & Nagaraju J (2007) Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect biochemistry and molecular biology* 37: 655-666.
- Gardiner MM, O'Neal ME & Landis DA (2011) Intraguild predation and native lady beetle decline. *PLoS One* 6: e23576.
- Ghosalkar A, Sahai V & Srivastava A (2008) Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant *Pichia pastoris* using three different secretion signals. *Protein expression and purification* 60: 103-109.
- Gillespie JP, Kanost MR & Trenczek T (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* 42: 611-643.

- Goda S, Takano K, Yamagata Y, Katakura Y & Yutani K (2000) Effect of extra N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein engineering* 13: 299-307.
- Goto T, Abe Y, Kakuta Y, Takeshita K, Imoto T & Ueda T (2007) Crystal Structure of *Tapes japonica* Lysozyme with Substrate Analogue structural basis of the catalytic mechanism and manifestation of its chitinase activity accompanied by quaternary structural change. *Journal of Biological Chemistry* 282: 27459-27467.
- Gross J, Eben A, Müller I & Wensing A (2010) A well protected intruder: the effective antimicrobial defense of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal of chemical ecology* 36: 1180-1188.
- Grunclová L, Fouquier H, Hypša V & Kopáček P (2003) Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Developmental & Comparative Immunology* 27: 651-660.
- Hao Z, Kasumba I & Aksoy S (2003) Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: *Glossinidae*). *Insect biochemistry and molecular biology* 33: 1155-1164.
- Harrison JF (2001) Insect acid-base physiology. *Annu Rev Entomol* 46: 221-250.
- Hetru C, Troxler L & Hoffmann JA (2003) *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *Journal of Infectious Diseases* 187: S327-S334.
- Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R & Jahn D (2004) PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic acids research* 32: W375-W379.
- Ho JC, Storm P, Rydström A, Bowen B, Alsin F, Sullivan L, Ambite I, Mok KH, Northen T & Svanborg C (2013) Lipids as tumoricidal components of human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells (hamlet) unique and shared effects on signaling and death. *Journal of Biological Chemistry* 288: 17460-17471.
- Hoffmann JA (1995) Innate immunity of insects. *Current opinion in immunology* 7: 4-10.
- Hultmark D (1995) Insect lysozymes. *EXS* 75: 87-102.
- Hultmark D (1996) Insect lysozymes. *EXS* 75: 87.
- Ibrahim HR, Matsuzaki T & Aoki T (2001) Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS letters* 506: 27-32.
- Irwin DM (2004) Evolution of cow nonstomach lysozyme genes. *Genome* 47: 1082-1090.
- Irwin DM (2014) Evolution of the vertebrate goose-type lysozyme gene family. *BMC evolutionary biology* 14: 188.
- Irwin DM, Biegel JM & Stewart C-B (2011) Evolution of the mammalian lysozyme gene family. *BMC evolutionary biology* 11: 166.
- Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, Fukuda S, Sugimura K & Imoto T (1999) Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *European Journal of Biochemistry* 259: 456-461.
- Jain D, Nair DT, Swaminathan GJ, Abraham E, Nagaraju J & Salunke DM (2001) Structure of the induced antibacterial protein from tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Implications to molecular evolution. *Journal of Biological Chemistry* 276: 41377-41382.
- Jansen JP & Hautier L (2008) Ladybird population dynamics in potato: comparison of native species with an invasive species, *Harmonia axyridis*: From Biological Control to Invasion: the Ladybird *Harmonia axyridis* as a Model Species (ed. Springer, pp. 223-233.
- Jollès J & Jollès P (1975) The lysozyme from *Asterias rubens*. *European Journal of Biochemistry* 54: 19-23.
- Josková R, Šilerová M, Procházková P & Bilej M (2009) Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Developmental & Comparative Immunology* 33: 932-938.

- Kajla MK, Andreeva O, Gilbreath TM & Paskewitz SM (2010) Characterization of expression, activity and role in antibacterial immunity of *Anopheles gambiae* lysozyme c-1. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 155: 201-209.
- Kanost MR, Dai W & Dunn PE (1988) Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 8: 147-164.
- Kim C-H, Kim S-J, Kan H, Kwon H-M, Roh K-B, Jiang R, Yang Y, Park J-W, Lee H-H & Ha N-C (2008) A three-step proteolytic cascade mediates the activation of the peptidoglycan-induced toll pathway in an insect. *Journal of Biological Chemistry* 283: 7599-7607.
- Koch R (2003a) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science* 3.
- Koch RL (2003b) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J Insect Sci* 3: 32.
- Koch RL & Galvan TL (2008) Bad side of a good beetle: the North American experience with *Harmonia axyridis*. From Biological Control to Invasion: the Ladybird *Harmonia axyridis* as a Model Species (ed. Springer, pp. 23-35.
- Kornegay JR, Schilling JW & Wilson AC (1994) Molecular adaptation of a leaf-eating bird: stomach lysozyme of the hoatzin. *Mol Biol Evol* 11: 921-928.
- Lapcharoen P, Komalamisra N, Rongsriyam Y, Wangsuphachart V, Dekumyoy P, Prachumsri J, Kajla MK & Paskewitz SM (2012) Investigations on the role of a lysozyme from the malaria vector *Anopheles dirus* during malaria parasite development. *Developmental & Comparative Immunology* 36: 104-111.
- Laschtschenko P (1909) Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß. *Medical Microbiology and Immunology* 64: 419-427.
- Lehrer RI & Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current opinion in immunology* 11: 23-27.
- Lemos FJ & Terra WR (1991) Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 100: 265-268.
- Li B, Calvo E, Marinotti O, James AA & Paskewitz SM (2005) Characterization of the c-type lysozyme gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene* 360: 131-139.
- Lockey TD & Ourth DD (1996) Purification and characterization of lysozyme from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 502-508.
- Lucas É, Vincent C, Labrie G, Chouinard G, Fournier F, Pelletier F, Bostanian NJ, Coderre D, Mignault M-P & Lafontaine P (2007) The multicolored Asian ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Quebec agroecosystems ten years after its arrival. *European Journal of Entomology* 104: 737-743.
- Mai W-j & Hu C-q (2009) Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. *Molecular biology reports* 36: 1587-1595.
- Malcolm BA, Rosenberg S, Corey MJ, Allen JS, De Baetselier A & Kirsch JF (1989) Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 133-137.
- Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, Kohara Y & Ewbank JJ (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Current Biology* 12: 1209-1214.
- Mandal A, Klotz KL, Shetty J, Jayes FL, Wolkowicz MJ, Bolling LC, Coonrod SA, Black MB, Diekman AB & Haystead TA (2003) SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biology of reproduction* 68: 1525-1537.

- Markart P, Faust N, Graf T, NA C, Weaver T & Akinbi H (2004) Comparison of the microbicidal and muramidase activities of mouse lysozyme M and P. *Biochem. J* 380: 385-392.
- Masschalck B & Michiels CW (2003) Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical reviews in microbiology* 29: 191-214.
- Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Akiyama I, Hirose H & Takahashi Y (2007) Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *Gen Comp Endocrinol* 151: 195-201.
- Matsumoto T, Nakamura AM & Takahashi KG (2006) Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 145: 325-330.
- McHenry JG, Birkbeck TH & Allen JA (1979) The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 63: 25-28.
- Meister M & Lagueux M (2003) *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 5: 573-580.
- Mine Y (1996) Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins. *Food Research International* 29: 155-161.
- Mohrig W & Messner B (1968) Immunreaktionen bei Insekten. II. Lysozym als antimikrobielles Agent im Darmtrakt von Insekten. *Biologisches Zentralblatt*.
- Morishima I, Yamada K & Ueno T (1992) Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology* 22: 363-367.
- Müller U, Vogel P, Alber G & Schaub G (2008) The innate immune system of mammals and insects.
- Nash JA, Ballard TNS, Weaver TE & Akinbi HT (2006) The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. *The Journal of Immunology* 177: 519-526.
- Nayduch D & Joyner C (2013) Expression of lysozyme in the life history of the house fly (*Musca domestica* L.). *Journal of medical entomology* 50: 847-852.
- Nielsen SB, Wilhelm K, Vad B, Schleucher J, Morozova-Roche LA & Otzen D (2010) The interaction of equine lysozyme: oleic acid complexes with lipid membranes suggests a cargo off-loading mechanism. *J Mol Biol* 398: 351-361.
- Nitta K, Tsuge H, Sugai S & Shimazaki K (1987) The calcium-binding property of equine lysozyme. *FEBS letters* 223: 405-408.
- Park J-W, Kim C-H, Kim J-H, Je B-R, Roh K-B, Kim S-J, Lee H-H, Ryu J-H, Lim J-H & Oh B-H (2007) Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 6602-6607.
- Paskewitz S, Li B & Kajla M (2008) Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect molecular biology* 17: 217-225.
- Pejchar L & Mooney HA (2009) Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 497-504.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45-e45.
- Phillips DC (1967) The hen egg-white lysozyme molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57: 483-495.
- Polis GA & Holt RD (1992) Intraguild predation: the dynamics of complex trophic interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 7: 151-154.

- Polis GA, Myers CA & Holt RD (1989) The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. *Annual review of ecology and systematics*: 297-330.
- Pöppel A-K, Vogel H, Wiesner J & Vilcinskas A (2015) Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy: AAC*. 05180-05114.
- Powling R & Davidson W (1976) Studies on insect bacteriolytic enzymes—II Some physical and enzymatic properties of lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 55: 221-228.
- Raak-van den Berg C, Hemerik L, de Jong PW & van Lenteren JC (2012) Mode of overwintering of invasive *Harmonia axyridis* in the Netherlands. *BioControl* 57: 71-84.
- Ratzka C, Gross R & Feldhaar H (2013) Gene expression analysis of the endosymbiont-bearing midgut tissue during ontogeny of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Journal of insect physiology* 59: 611-623.
- Regel R, Matioli SR & Terra WR (1998) Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect biochemistry and molecular biology* 28: 309-319.
- Ren Q, Zhao X & Wang J (2009) Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*). *Journal of Genetics and Genomics* 36: 7-16.
- Röhrich CR, Ngwa CJ, Wiesner J, Schmidtberg H, Degenkolb T, Kollwe C, Fischer R, Pradel G & Vilcinskas A (2012) Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial activity. *Biology letters* 8: 308-311.
- Roy H & Wajnberg E (2008) From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. Springer.
- Roy HE, Brown PM, Rothery P, Ware RL & Majerus ME (2008) Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *BioControl* 53: 265-276.
- Ruckenstein E & Zeng X (1997) Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. *Biotechnol Bioeng* 56: 610-617.
- Salton M & Pavlik J (1960) Studies of the bacterial cell wall VI. Wall composition and sensitivity to lysozyme. *Biochimica et biophysica acta* 39: 398-407.
- Salunkhe S, Soorapaneni S, Prasad KS, Raiker VA & Padmanabhan S (2010) Strategies to maximize expression of rightly processed human interferon  $\alpha 2b$  in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 71: 139-146.
- Samaranayake Y, Cheung B, Parahitiyawa N, Seneviratne C, Yau J, Yeung K & Samaranayake L (2009) Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. *Archives of oral biology* 54: 115-126.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schmidtberg H, Röhrich C, Vogel H & Vilcinskas A (2013) A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biology letters* 9: 20130006.
- Schneider PM (1985) Purification and properties of three lysozymes from hemolymph of the cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Insect biochemistry* 15: 463-470.
- Schulenburg H & Boehnisch C (2008) Diversification and adaptive sequence evolution of *Caenorhabditis* lysozymes (Nematoda: *Rhabditidae*). *BMC evolutionary biology* 8: 114.

- Shapiro-Ilan DI & Cottrell TE (2005) Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of invertebrate pathology* 89: 150-156.
- Skerrett SJ (2004) Lysozyme in pulmonary host defense: new tricks for an old dog. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169: 435-436.
- Sowa-Jasińska A, Zdybicka-Barabas A, Stępiec S, Wydrych J, Mak P, Jakubowicz T & Cytryńska M (2014) Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides* 53: 194-201.
- Stewart C-B, Schilling JW & Wilson AC (1987) Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters.
- Stuart D, Acharya K, Walker N, Smith S, Lewis M & Phillips D (1986)  $\alpha$ -Lactalbumin possesses a novel calcium binding loop.
- Takeshita K, Hashimoto Y, Ueda T & Imoto T (2003) A small chimerically bifunctional monomeric protein: *Tapes japonica* lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60: 1944-1951.
- Tedders W & Schaefer P (1994) Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the southeastern United States. *Entomological News* 105: 228-243.
- Tsuge H, Koseki K, Miyano M, Shimazaki K, Chuman T, Matsumoto T, Noma M, Nitta K & Sugai S (1991) A structural study of calcium-binding equine lysozyme by two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1078: 77-84.
- Ursic Bedoya R, Mitzey A, Obratsova M & Lowenberger C (2005) Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology* 14: 89-94.
- Uvell H & Engström Y (2007) A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *TRENDS in Genetics* 23: 342-349.
- Valachova I, Takac P & Majtan J (2014) Midgut lysozymes of *Lucilia sericata*—new antimicrobials involved in maggot debridement therapy. *Insect molecular biology* 23: 779-787.
- Van Herreweghe JM & Michiels CW (2012) Invertebrate lysozymes: diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function. *Journal of biosciences* 37: 327-348.
- Van Lenteren J, Babendreier D, Bigler F, Burgio G, Hokkanen H, Kuske S, Loomans A, Menzler-Hokkanen I, Van Rijn P & Thomas M (2003) Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl* 48: 3-38.
- Vierstraete E, Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Van den Bergh G, Arckens L, De Loof A & Schoofs L (2004) A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 470-475.
- Vilcinskas A & Götz P (1999) Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in parasitology* 43: 267-313.
- Vilcinskas A & Matha V (1997) Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal defence reactions in *Galleria mellonella*. *Animal Biology* 6: 19-30.
- Vilcinskas A, Mukherjee K & Vogel H (2013a) Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122113.
- Vilcinskas A, Schmidtberg H, Estoup A, Tayeh A, Facon B & Vogel H (2014) Evolutionary ecology of microsporidia associated with the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Insect science*.
- Vilcinskas A, Stoecker K, Schmidtberg H, Röhrich CR & Vogel H (2013b) Invasive harlequin ladybird carries biological weapons against native competitors. *Science* 340: 862-863.

- Vitousek PM, Loope LL, Rejmanek M & Westbrooks R (1997) Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology* 21: 1-16.
- Vogel H, Badapanda C, Knorr E & Vilcinskis A (2014) RNA-sequencing analysis reveals abundant developmental stage-specific and immunity-related genes in the pollen beetle *Meligethes aeneus*. *Insect molecular biology* 23: 98-112.
- Wang T, Xu Y, Liu W, Sun Y & Jin L (2011) Expression of *Apostichopus japonicus* lysozyme in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 77: 20-25.
- Ware RL & Majerus ME (2008) Intraguild predation of immature stages of British and Japanese coccinellids by the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53: 169-188.
- Wiesner J & Vilcinskis A (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1: 440-464.
- Xue Q-G, Itoh N, Schey K, Li Y-L, Cooper R & La Peyre J (2007) A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cellular and molecular life sciences* 64: 82-95.
- Yu KH, Kim KN, Lee JH, Lee HS, Kim SH, Cho KY, Nam MH & Lee IH (2002a) Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Developmental & Comparative Immunology* 26: 707-713.
- Yu X-Q, Zhu Y-F, Ma C, Fabrick J & Kanost M (2002b) Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect biochemistry and molecular biology* 32: 1287-1293.
- Yudina T, Guo D, Piskunkova N, Pavlova I, Zavalova L & Baskova I (2012) Antifungal and antibacterial functions of medicinal leech recombinant destabilase-lysozyme and its heated-up derivative. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 6: 203-209.
- Zavalova L, Baskova I, Lukyanov S, Sass A, Snezhkov E, Akopov S, Artamonova I, Archipova V, Nesmeyanov V & Kozlov D (2000) Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1478: 69-77.
- Zavalova L, Lazarev V, Levitsky S, Yudina T & Baskova I (2010) Destabilase-lysozyme of medicinal leech. Multifunctionality of recombinant protein. *Biochemistry (Moscow)* 75: 1173-1181.
- Zavalova L, Lukyanov S, Baskova I, Snezhkov E, Akopov S, Berezhnoy S, Bogdanova E, Barsova E & Sverdlov E (1996) Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo- $\epsilon$  ( $\gamma$ -Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots. *Molecular and General Genetics MGG* 253: 20-25.
- Zdybicka-Barabas A, Stępiec S, Mak P, Piersiak T, Skrzypiec K & Cytryńska M (2012) The effect of *Galleria mellonella* apolipoprotein III on yeasts and filamentous fungi. *Journal of insect physiology* 58: 164-177.
- Zdybicka-Barabas A, Stępiec S, Mak P, Skrzypiec K, Mendyk E & Cytryńska M (2013) Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828: 1449-1456.
- Zhang H-W, Sun C, Sun S-S, Zhao X-F & Wang J-X (2010) Functional analysis of two invertebrate-type lysozymes from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & shellfish immunology* 29: 1066-1072.
- Zhao J, Song L, Li C, Zou H, Ni D, Wang W & Xu W (2007) Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Molecular immunology* 44: 1198-1208.

Zou Z, Evans JD, Lu Z, Zhao P, Williams M, Sumathipala N, Hetru C, Hultmark D & Jiang H (2007) Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biol* 8: R177.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ala (A)</b>	Alanin
<b>AMP</b>	antimikrobielles Peptid ( <i>antimicrobial peptide</i> )
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>His<sub>6</sub>-Tag</b>	Hexa-Histidin
<b>Asp (N)</b>	Asparaginsäure
<b>BCA</b>	Bicinchinoninsäure
<b>BLAST®</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BMGY</b>	gepuffertes komplexes Glycerol-Medium
<b>BMM</b>	gepuffertes Methanol-Medium
<b>BMMY</b>	gepuffertes komplexes Methanol-Medium
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>ca.</b>	Circa
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>Ct</b>	cycle of threshold
<b>c-Typ</b>	<i>chicken</i> -Typ-Lysozym
<b>Cys (C)</b>	Cystein
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindol
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	bidestilliertes Wasser
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EF</b>	Elongationsfaktors
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

<b>et al.</b>	<i>et alteri</i> (und andere)
<b>g</b>	Gramm oder Erdbeschleunigung
<b>Glu (E)</b>	Glutamin
<b>h</b>	Stunde
<b>HEWL</b>	Hühnereiweißlysozym
<b>His (H)</b>	Histidin
<b>hLYZ</b>	humanes Lysozym
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IGP</b>	<i>Intraguild Predation</i>
<b>IMAC</b>	Ionen-Metall-Affinitäts-Chromatographie
<b>i-Typ</b>	<i>invertebrate</i> -Typ-Lysozym
<b>k</b>	Kilo
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Liter
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>m</b>	Milli
<b>M</b>	Molar (Mol pro Liter)
<b>MALDI</b>	Massenanalyse
<b>MIC</b>	minimal Inhibitionskonzentration ( <i>minimal inhibition concentration</i> )
<b>min</b>	Minute
<b>MM</b>	ungepuffertes Methanol-Medium
<b>MMY</b>	komplexes Methanol-Medium
<b>mRNA</b>	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MW</b>	Molekulargewicht ( <i>Molecular weight</i> )
<b>n</b>	Nano oder Anzahl

<b>n.t.</b>	Nicht untersucht
<b>NAG</b>	N-Acetylglucosamin
<b>NAM</b>	Acetylmuraminsäure
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PGRP</b>	Peptidoglykan-Erkennungsprotein ( <i>peptidoglycan recognition proteins</i> )
<b>pI</b>	isoelektrischer Punkt
<b>PSM</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PTU</b>	Phenylthioharnstoff
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Echtzeit-PCR ( <i>quantitative real-time-PCR</i> )
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>Revolutions per minute</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>sec</b>	Sekunde
<b>Ser (S)</b>	Serin
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA
<b>TAMRA</b>	Tetramethylrhodamin (spezifische Fluorophosphonat-Sonde)
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
<b>TBS-T</b>	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween ( <i>Tris buffered saline with tween</i> )

---

<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>μ</b>	Mikro

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunabwehr und IGP von <i>H. axyridis</i> .....	4
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung vier verschiedener Immunantwortmechanismen in Insekten am Beispiel von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
Abbildung 3: Das zweilagige Immunabwehrsystem von <i>H. axyridis</i> .....	8
Abbildung 4: Verbreitung der verschiedenen Lysozym-Typen im Tierreich .....	9
Abbildung 5: c-Typ-Lysozymstruktur und Enzymmechanismus (Callewaert & Michiels, 2010) .....	11
Abbildung 6: I-Typ Lysozym Mechanismus und Aufbau (Callewaert & Michiels, 2010) .....	14
Abbildung 7: Multipler Sequenzvergleich der fünf i-Typ-Lysozyme (i-Lys1 – i-Lys5) .....	41
Abbildung 8: Multipler Sequenzvergleich der vier c-Typ-Lysozyme (c-Lys1 – c-Lys4) .....	43
Abbildung 9: SDS-PAGE Analyse der in <i>E. coli</i> heterolog exprimierten i-Typ-Lysozym Expression .....	44
Abbildung 10: SDS-PAGE Analyse i-Lys2 Expression nach Induktion mit IPTG. ....	45
Abbildung 11: Western-Blot Analyse der zeit- und medienabhängigen Expression von i-Lys2 und c-Lys3 .....	47
Abbildung 12: Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinanten i-Lys2 und korrespondierende SDS-PAGE .....	49
Abbildung 13: SDS-PAGE und Western-Blot Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten i-Lys2 ohne C-terminalen His <sub>6</sub> -Tag .....	50
Abbildung 14: SDS-PAGE Analyse der IMAC-Fractionen des rekombinanten c-Lys2 .....	51
Abbildung 15: SDS-PAGE Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten c-Lys3. ....	52
Abbildung 16: SDS-PAGE Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten c-Lys3 mit modifizierter EA-Sequenz. ....	53
Abbildung 17: SDS-PAGE Analysen der Aufreinigungsfractionen des rekombinanten c-Lys4 mit modifizierter EA-Sequenz. ....	54
Abbildung 18: Lyseaktivität der heterolog exprimierten <i>H. axyridis</i> Lysozyme i-Lys2 (750 ng), c-Lys2 (750 ng), c-Lys3 (100 ng) und c-Lys4 (3 ng) im Vergleich mit HEWL (750 ng) und hLYZ (750 ng) .....	56
Abbildung 19: pH-abhängige Muramidase-Aktivität und SDS-PAGE von c-Lys3 und c-Lys4 .....	56
Abbildung 20: CaCl <sub>2</sub> -abhängige Muramidase-Aktivität .....	58
Abbildung 21: Chitin-Bindfähigkeit des <i>H. axyridis</i> c-Lys4 im Vergleich mit HEWL. ....	58
Abbildung 22: Isopeptidase-Aktivität und Serinproteasenachweis .....	60
Abbildung 23: Spezifität der gegen das i-Lys2 und c-Lys3 gerichteten Antiseren in Western-Blot-Analysen .....	62
Abbildung 24: Immunhistochemische Analyse zu Expression des i-Lys2 in Fettkörperpräparaten .....	63
Abbildung 25: Gewebeabhängige i-Lys2 Expression .....	64
Abbildung 26: pH-abhängige Muramidase-Aktivität der Hämolymphe von naiven und immunstimulierten Tieren. ....	65

Abbildung 27: Expressionsanalyse der *H. axyridis* Lysozyme i-Lys2, c-Lys3 und c-Lys4 nach Immunstimulation . 66

Abbildung 28: Antimikrobielle Aktivität und spezifische Lyseaktivität der rekombinanten *H. axyridis* Lysozyme. 67

Abbildung 29: Antimikrobielle Aktivität von Harmonin und den Coleoptericinen BR021 und BR023 mit und ohne c-Lys4. .... 68

Abbildung 30: Vergleich der pH-abhängigen Aktivitätsspektren von rekombinanten Lysozymen und Hämolympfproben..... 81

Abbildung 31: Kombinierte antibakterielle Aktivität von Hämolympfkomponenten gegen *B. subtilis* ..... 86

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedingungen der Hefe-Elektroporation .....	21
Tabelle 2: Reaktionsansatz zur Detektion von Serinhydrolasen .....	35
Tabelle 3: Verwendete Puffer zur Bestimmung der pH-abhängigen Lyseaktivität .....	36
Tabelle 4: Kulturbedingungen.....	38
Tabelle 5: Eigenschaften der <i>H. axyridis</i> i-Typ-Lysozyme .....	40
Tabelle 6: Eigenschaften der <i>H. axyridis</i> c-Typ-Lysozyme (pI = isoelektrischer Punkt).....	42
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	104
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	106
Tabelle 9: Verwendete Geräte.....	107
Tabelle 10: Verwendete Antikörper .....	108
Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Proteine .....	108
Tabelle 12: Verwendete Protein-, DND- und RNA-Standards und Kits.....	109
Tabelle 13: Verwendete Bakterien- und Hefestämme .....	109
Tabelle 14: Verwendete Plasmide und Vektoren .....	109
Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide für RT-PCR .....	110
Tabelle 16: Verwendete Kulturmedien zur Anzucht von Bakterien und Hefen.....	110
Tabelle 17: Anti-koagulierende Saline .....	111
Tabelle 18: Hefeanzuchtmedien .....	111
Tabelle 19: vollständige Proteinsequenzen der <i>H. axyridis</i> Lysozyme inklusive Signalpeptid.....	112

## A. Anhang: Material

### A.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanzen	Firma/Vertreiber	Katalognummer
<b>1,4-Piperazin-diethansulfonsäure (PIPES)</b>	Roth	9156.1
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Bio-Rad	161-0710
<b>4, 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)</b>	Sigma-Aldrich	32670
<b>Aceton</b>	Roth	5025.5
<b>ActiveX® TAMRA-FP Serine Hydrolase Probe</b>	Thermo Scientific	88318
<b>Agar-Agar, Kobe I</b>	Roth	5210.3
<b>Agarose NEEO Ultra-Qualität</b>	Roth	2267.5
<b>Ampicillin Natriumsalz</b>	Roth	K029.2
<b>Anhydrotetrazyklin</b>	Sigma-Aldrich	94664
<b>Borsäure</b>	Roth	P010.1
<b>Bromphenolblau Natriumsalz</b>	Roth	A512.1
<b>Calciumchlorid</b>	Roth	CN93.2
<b>D-Biotin</b>	Sigma-Aldrich	B4639
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Roth	5179.1
<b>Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat</b>	Roth	4984.2
<b>D-Sorbitol</b>	Sigma-Aldrich	S3889
<b>Eindeckmedium: immunoselect antifading medium</b>	Dianova	SCR-38447
<b>Essigsäure</b>	Roth	3738.4
<b>Ethanol 100 % rein</b>	Roth	9065.2
<b>Ethanol 70 % vergällt</b>	Roth	T913.3
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Roth	8043.1
<b>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)</b>	Roth	3054.1

<b>Flamingo™ Fluorescent Gel Stain</b>	Bio-Rad	161-0492
<b>GelGreen™ Nucleic Acid Stain</b>	Biotium	41005
<b>Glycerin</b>	Roth	3783.2
<b>Glycin</b>	Roth	3908.3
<b>Hefeextrakt</b>	Roth	2363.3
<b>Imidazol</b>	Sigma-Aldrich	3899.3
<b>ImmunoSelect® Antifading Mounting Medium</b>	Dianova	SCR-38447
<b>Isopropanol</b>	Roth	7343.1
<b>Kaliumchlorid</b>	Roth	HN02.1
<b>Lämmli Probenpuffer</b>	Bio-Rad	161-0737
<b>L-Glutaminsäure-1-(4-Nitroanilid)</b>	Sigma-Aldrich	49622
<b>L-Glutaminsäure-γ-(p-Nitroanilid)</b>	Sigma-Aldrich	G6133
<b>Methanol</b>	Roth	7342.1
<b>Natriumacetat</b>	Sigma-Aldrich	S5636
<b>Natriumchlorid</b>	Roth	9265.2
<b>Natriumdihydrogenphosphatdihydrat</b>	Roth	T879.2
<b>Natronlauge</b>	Roth	KK71.1
<b>Paraformaldehyd</b>	Roth	0335.1
<b>Peptone aus Fleisch</b>	Roth	2366.3
<b>Phalloidin Alexa Fluor®546</b>	life technologies	A22283
<b>Phenolthioharnstoff (PTU)</b>	Sigma-Aldrich	P7629
<b>Pilocarpine HCL</b>	Sigma-Aldrich	P6503
<b>Polyvinylpyrolidone</b>	Roth	4606.1
<b>RNAlater</b>	Qiagen	76104
<b>Rothi®Blue quick</b>	Roth	4829.2
<b>Salzsäure</b>	Roth	X897.1
<b>Sodiumdodecylsulfat ultra rein (SDS)</b>	Roth	2326.1
<b>TissueTec®</b>	Sakura	4583

Tri-Natriumcitrat, Dihydrat	Roth	3580.4
Tris	Roth	AE15.3
Triton X-100	Roth	3051.3
TSG-Puffer 10 x	Bio-Rad	161-0772
Tween®20	Roth	9127.1
Western Blocking Reagent	Roche	11921673001
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (YNB)	Sigma	Y0626
Zitronensäure	Roth	X863.1

## A.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma/Vertreiber	Katalognummer
Adhäsionsobjektträger SuperFrost®Plus, Menzel Gläser	Roth	H867.1
Amicon Ultra Ultrafiltrations-Röhrchen (3 kDa)	Millipore	UFC5003BK
Corning®384 Multiwell Plates	GBO	CLS8509
Corning®96 well Plates	GBO	655185
Federstahlpinzette	Roth	AL99.1
Handschuhe TouchNTuff®	Ansell	92-600
Kryoröhrchen Bakterien Roti®Store cryo	Roth	P730.2
Kryoröhrchen Hefen Roti®Store Hefe cryo	Roth	X983.1
Objektträger Diagnostika 3 Kammern	Roth	L196.1
Objektträger Diagnostika 8 Kammern	Roth	L197.1
Parafilm® M	Roth	H666.1
Präzisionspinzette	Dumont	TE73.1
4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gelen	Bio-Rad	456-1086
Talon Superflow	Clontech	635507
Glassäule EcoPlus SR TAC25, KronLab	YMC-Europe	TAC25/250
PVDF	Millipore	P2938
Universal-Indikatorstäbchen pH-Fix	Roth	KH69.1

### A.3. Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Firma/Vertreiber
Autoklav	Tuttnauer 5075ELV	Tuttnauer
DNA-Gelelektrophorese	MBT-Elektrophoresekammern	Micro-Bio-Tec Brand
Eismaschine	Scotsman AF-80	Scotsman
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad
Elektrophorese-Netzgerät	Consort EV202	Micro-Bio-Tec Brand
Elektroporator	Gene Pulser Xcell	Bio-Rad
Feinwaage	XA105 Dual Range	Mettler-Toledo
Flüssigstickstofftank	Cyrostor 120	Statebourne
Gel-Dokumentationsgerät	Molecular Imager VersaDoc™ MP	Bio-Rad
HPLC- System	Dionex Ultimate 3000	Dionex
Inkubationsschüttler	Multitron	Infors HT
Inkubator (37°C)	Heraeus Oven	Thermo Scientific
Kühl-und Gefrierschränke	Kirsch Super/Froster	Kirsch
Lesegerät für Mikrotiter Platten	Eon Microplate Spectrophotometer	BioTek
Magnetrührer	Labioco L-81 hotplate stirrer	Labinco
Mikroskop (Fluoreszenz)	Leica DM-5500B	Leica
Mikrowelle	R-93ST	Sharp
Pipettierhilfe	Pipet-X	Mettler-Toledo
Real-Time PCR System	StepOnePlus	Applied Biosystems
Reinstwasser-Aufbereitungssystem	TKA GenPure	Thermo Scientific
Photometer	Specord 210	Analytik Jena
Sterilbank	Esco Infinity	Biomedis
Tiefkühltruhe	GFL 6385	GFL Laborgeräte
Thermo-Block	TS-100	bioSan
Ultraschalbad	Bandelin Sonopuls 2200	Bandelin

<b>Ultrazentrifuge</b>	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
<b>Vakuum-Absaugpumpe</b>	Wasserstrahlpumpe 7366.1	Roth
<b>Vortex</b>	VWR VV3	VWR
<b>Waage</b>	XA1502S Präzisionswaage	Mettler-Toledo
<b>Wasserbad</b>	MPC-208B	Huber
<b>Western-Blot Gerät</b>	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
<b>YMC HPLC System</b>	YMC HPLC System SE-07	YMC Europe
<b>Zentrifuge Eppendorfreaktionsgefäß</b>	Mikro 220R	Hettich
<b>Zentrifuge Falcon und Platten</b>	Rotina 420R	Hettich

#### A.4. Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>
Penta-His HRP konjugiert	Maus	Qiagen
Anti-i-Lys2	Meerschweinchen	Eurogentec
Anti-c-Lys3	Meerschweinchen	Eurogentec
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>
Ziege-anti-Meerschweinchen IgG (Fab) <sub>2</sub>	HRP	Dianova
Ziege-anti-Meerschweinchen IgG (Fab) <sub>2</sub>	Alexa Fluor®488	Dianova
Ziege-anti-Meerschweinchen IgG (gesamtes Molekül)	HRP	Sigma

#### A.5. Weitere Enzyme und Proteine

Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Proteine

<b>Enzym/Protein</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalognummer</b>
<i>BcuI</i> ( <i>SpeI</i> )	Fermentas	ER1252
Hühnereiweiß-Lysozym (HEWL)	Sigma-Aldrich	L6876
Humanes Lysozym (hLYZ)	Sigma Aldrich	L1667
Normal Goat Serum (NGS)	Dianova	005-000-121
<i>Pfu</i> Polymerase	Thermo Scientific	EP0572

<i>Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific	EP0401
---------------------------	-------------------	--------

## A.6. Standards und Kits

Tabelle 12: Verwendete Protein-, DND- und RNA-Standards und Kits

Kit	Firma/Vertreiber	Katalognummer
Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	Qiagen	12943
Topo® TA Cloning® Kit	life technologies	K4575-J10
DNA Ladder	life technologies	SM0373
Lumi-LightPlus Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	Roche	12015218001
PichiaPink™ Secreted Protein Expression Kit	Invitrogen	A11151
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio Rad	161-0374
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	4368577
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel	740955.10

## A.7. Bakterienstämme und Hefestämme

Tabelle 13: Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Firma/Vertreiber
One Shot® TOP10	Invitrogen / C4040-10
Origami™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells	Novagen / 71408
One Shot® BL21	Invitrogen / C6000-03
PichiaPink™ Expression Strains	Invitrogen / A11154

## A.8. Plasmide/Vektoren

Tabelle 14: Verwendete Plasmide und Vektoren

Vektor	Firma/Katalognummer
pASK-IBA-33plus	IBA, BioTAGnology / 2-1433-000
pASK-IBA-37plus	IBA, BioTAGnology / 2-1437-000
pPink $\alpha$ -HC	Invitrogen / A11153

## A.9. Oligonukleotide

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide für RT-PCR

Name	Sequenz (5' → 3'Richtung)
Haxy_c-lys3_for	AACAGCAACTCCTGGTAAAGG
Haxy_c-lys3_rev	ATCGTCGTTGATGTCATCGTTC
Haxy_c-lys4_for	AATCTGGGAGTGCCAAGAAACC
Haxy_c-lys4_rev	TGAATCTCCAGCATTCTGTGTTG
Haxy_i-lys2_for	TGATGACCTTCCAGTGACACAAC
Haxy_i-lys2_rev	ACAGACATCTCCAGCACAATTCC
RPS3_for	GGCTACCAGAACCGAACAGAG
RPS3_rev	GTGCTATGGCGCATAATCCT
EF1A_for	CGTTGGTGCAACAAGATGG
EF1A_rev	CAGAGATTGGCACAAAAGCA

## A.10. Kulturmedien

Tabelle 16: Verwendete Kulturmedien zur Anzucht von Bakterien und Hefen

Medium	Firma/Vertreiber	Katalognummer
LB-Medium	Roth	6673.1
TB-Medium	Sigma-Aldrich (Fluka)	63237
YPD-Medium	Invitrogen (life technology)	Q300-01
YPDS-Medium	Invitrogen (life technology)	A11156
PAD-Platten	Invitrogen (life technology)	A11156
Mueller Hinton Broth 2	Sigma-Aldrich	90922
TSB-Medium	Sigma-Aldrich	22092

## A.11. Puffer Lösungen und Medien

Tabelle 17: Anti-koagulierende Saline

Anti-koagulierende Saline	
69	mM KCl
27	mM NaCl
2	mM NaHCO <sub>3</sub>
100	mM D(+)-Glukose
30	mM Kaliumcitrat
26	mM Citronensäure
10	mM Na <sub>2</sub> -EDTA
	pH 4,6

Tabelle 18: Hefeanzuchtmedien

Zusammensetzung		BMGY	BMMY	MMY	BMM	MM
Yeast Nitrogen Base	0,34 %	+	+	+	+	+
Ammoniumsulfat	1,00 %	+	+	+	+	+
Pepton	2,00 %	+	+	+		
Hefeextrakt	1,00 %	+	+	+		
Kohlenstoffquelle: Glycerin	1,00 %	+				
Kohlenstoffquelle: Methanol	0,50 %		+	+	+	+
Phosphatpuffer (pH 6,0)	100 mM	+	+		+	

## A.12. Proteinsequenzen der *H. axyridis* Lysozyme

Tabelle 19: Proteinsequenzen der *H. axyridis* Lysozyme

Proteinsequenzen
<i>H. axyridis</i> c-Lys1 (GenBank KP125329)
MSGLEDESISITRVAPKKSFFDISAIGTIMKIVVLGLFVVVFCANVEGKVYTKGLTNELITLNFPRTFIGNWVCLIESESGKNTSRITNR ANGKQGVGLFQIKSKDWCTFGKKGTCNVKCEDMLDENIKDDGVCAEKVKNFEGFLAWDGGWKRSCCKGRNLPLPPC
<i>H. axyridis</i> c-Lys2 (GenBank KP125330)
MSKSAVAALTLVLGIFLNQCVVTGKRYTRCGLTNLLNDLGFERSYIGHWVCLIESESGKNTSKVSTRANNRLGLGLFQILSRDWCT FRKRGGMCNVHCEDMLDEYLIDDANCAKKIMQELGFKAWNGWKRGCCKNRNLPMLPC
<i>H. axyridis</i> c-Lys3 (GenBank KP125331)
MKLTLKYFLLLVLWNGVEAKIFGRCEFAKLRLSGIPGNQLATWTCIANFESHFDTKAVNSQTGDYGILQISEIYWCSNSNTPGK GCHATCSQFLNDDINDDVACARHVFDETQRWSGNGFTAWTTYDRYCKGNVDSFIANC
<i>H. axyridis</i> c-Lys4 (GenBank KP125332)
MRSALFGFTLCVCLFGSEARIYGRCEFARALANLGVPRNQIPTWTCIAQKESNFDTAARNWSSGDHGILQISQIYWCTEGGGPG KGCNTECWRFRDADIVNDVRCQAQKVYNEHTRLSGDGFNAWTTYKYCRGDMSQWIQGCF
<i>H. axyridis</i> i-Lys1 (n.a.)
QDQVIHKLVLNDQHCFRCLCRAATNCNMTFGCVQGYCGPYKISRIYWIDAGRVTLPDDDVERAGAYEDCALSFHCAQRIVLKYF LKYGRDCNDDGVTDENDYSMINFNGGHGCRGDLNRSEPGRAWLKRYHACNPYPAGL
<i>H. axyridis</i> i-Lys2 (n.a.)
DDLPTVQQCLGCLCEASSNCDISGNACAGDVCGPFRITWAYWADAGKPTVNNEAPDAPQAYLHCASDITYCSALAVQGYMQKF QQDCNGDNRIDCDDFALIHKHGGYGCKGQTLPAVFGQRYQQCKILVGGGQQQ
<i>H. axyridis</i> i-Lys3 (n.a.)
LKNLMGTDIHKCISCLCHARTGCWRRRNCASYSISFDYWKTAGSPVLDPSHDPDSEESYKCLLDENCIVNTIDKYTSSFGELDCN CDGKFDCKDRFAIHLNGERCVPNPNFGRTYARRFNECAQSIGVKEMLSQEGYXGCVLPDVQ
<i>H. axyridis</i> i-Lys4 (n.a.)
FKNLVGTELEKCLRCICYATTFCNHLPCVKAHITKQYWEEAGSPTLDYKPSAESYRCKMANTNCVLTNTMDSYTTGRGAQRDT NCDGKFDCKDLRAIHFNGLTDNYTLENYQVIRFDNCAVEKKVPVDEGFSGCNKAINAVFF
<i>H. axyridis</i> i-Lys5 (n.a.)
YSGLVSPKDEACFQCICIASGNCNDIYECAKKTINKAYWNYAGENIAGGDENRLKDSNLNYQKCTEDRICIMNTIYHYTDRVLRITLN MDVNCGLRNCADTFAAHVFGLLAQKPEKFSIGLSKRFDRQCQGHGKINVTDNWFPKECNYV

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Andreas Vilcinskas für die Vergabe des interessanten Projektes, die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten und die stetige Bereitschaft für fachliche Diskussionen und zielführenden Anregungen bezüglich des Promotionsprojektes bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Thomas Wilke für die Übernahme der Gutachterschaft am Fachbereich 08 der Justus-Liebig-Universität und dem damit verbundenen Aufwand.

Ein besonderer Dank gilt dem hessischen Ministerium für Wissenschaft und Kunst, ohne deren Promotionsstipendium im Rahmen des Forschungsförderungsprogramms LOEWE – Schwerpunkt „Insektenbiotechnologie“ die Durchführung des Projektes in dieser Art nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich mich gerne bei Dr. Jochen Wiesner für die umfangreiche Betreuung des Projektes, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen bezüglich des Themas sowie die kompetente methodische und fachliche Unterstützung bedanken. Bei Dr. Henrike Schmidtberg bedanke ich mich herzlich für die geduldige Einführung in die Arbeit mit *H. axyridis*, die fachkundige und zeitraubende Betreuung der Tiere und ihre Hilfsbereitschaft, alle aufkommenden Fragen ausführlich und versiert zu beantworten.

Ich danke meinen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen aus der Projektgruppe „Insektenbiotechnologie & Bioressourcen“ für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit, ein produktives Arbeitsklima und die fachlichen Anregungen. Andre, Anke, Anne, Rebecca und Lea danke ich für die gemeinsame unvergessliche Zeit nicht nur innerhalb sondern auch außerhalb der Laborräume und darüber hinaus Andre für seine allzeit zur Verfügungen stehenden offenen Ohren, seine aufmunternden Worte sowie für die zahlreichen Stunden des kritischen Betrachtens meiner Arbeit.

Abschließend möchte ich ein großes „Dankeschön“ an meine Familie und Freunde aussprechen: Für ihren Rückhalt, die tatkräftige moralische Unterstützung, das Glauben an meine Fähigkeiten und die mir in allen Lebenssituationen entgegengebrachte Engelsgeduld!

## Erklärung

Ich erkläre:

Ich, Annika Beckert (geb. 25.09.1985 in Bad Soden am Taunus), habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Gießen, den 01. Juni 2015