

Untersuchungen betreffend Annexin IX bei *Manduca sexta* und anderen Lepidopteren: Vorkommen und mögliche Funktionen.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie
angefertigt am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Manuel T. Klang

Dekan: Prof. Dr. P.R. Schreiner
Erstgutachterin: Prof. Dr. T. Trenczek
Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Dorresteijn

Giessen, 30.06.2008

Verwendete Abkürzungen:

aa	(<i>amino acids</i>) Aminosäuren
AC-Saline	<i>M. sexta</i> -Antikoagulanz-Saline
AK	Antikörper
Antikörper #78	Monoklonaler Antikörper #78
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	Stunde(n)
Lx dy x.	Larvenstadium y. Tag x
min	Minute(n)
Milli-Q-H ₂ O	über Ionenaustauscher und Milli-QPF Plus Reagent Grade Water Purification System aufbereitetes Wasser
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS+	<i>M. sexta</i> -Vollsaline
MS-	<i>M. sexta</i> -Calcium-Magnesium-freie Saline
N	nicht definiertes Nukleotid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRPs	<i>pattern recognition proteins</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNAi	RNA-Interferenz
s	Sekunde(n)
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
x g	Erdbeschleunigung

Inhalt:

1.	Einleitung	1
1.1.	Die humorale Komponente der Immunreaktion bei Insekten	2
1.2.	Die zelluläre Komponente der Immunreaktion bei Insekten	2
1.3.	Auswirkungen der Parasitierung von <i>Cotesia congregata</i>	4
1.4.	Annexine	6
1.4.1.	Aufbau	6
1.4.2.	Eigenschaften von Annexinen	7
1.4.3.	Annexine bei Insekten	8
1.5.	Alternatives Exon-Spleißen	9
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	10
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Versuchstiere und Zellkulturen	11
2.1.1.	<i>Manduca sexta</i>	11
2.1.2.	<i>Acherontia atropos</i>	12
2.1.3.	<i>Bombyx mori</i>	13
2.1.4.	<i>Hyalophora cecropia</i>	14
2.1.5.	<i>Actias artemis</i>	15
2.1.6.	<i>Galleria mellonella</i>	16
2.1.7.	<i>Cotesia congregata</i>	16
2.1.8.	Hybridoma-Kulturen	17
2.1.8.1.	Auftauen der Hybridoma –Zellkulturen	17
2.1.8.2.	Ernten der Antikörper und Pflege der Kulturen	18
2.1.8.3.	Einfrieren der Hybridoma-Zellkulturen	18
2.1.9.	GV1 Kulturen	18
2.2.	Angewandte Methoden	19
2.2.1.	Monolayer allgemein	19
2.2.1.1.	Vorbereitung: Monolayer Typ I	19
2.2.1.2.	Vorbereitung: Monolayer Typ II	19
2.2.1.3.	Gemeinsame Behandlung der Monolayer beider Typen	19
2.2.1.3.1.	Tritonbehandlung	20
2.2.1.3.2.	DAPI-Färbung	20

2.2.1.3.3. Aktinfilament-Markierung mit Phalloidin	20
2.2.2. spezielle Monolayer	21
2.2.2.1. Kurzzeitintervall-Monolayer	21
2.2.2.2. Langzeitintervall- Monolayer	21
2.2.2.3. Direktfixierung der Hämocyten bei Gewinnung der Hämolymphe	22
2.2.2.4. GV-1-Monolayer	22
2.2.3. Vorbereitung der Organe für die konfokale Laserscanmikroskopie	23
2.2.4. Vorbereitung der Proben für Durchflusszytometrie	24
2.2.4.1. Vorbereitung der Proben	24
2.2.5. Aufkonzentrierung des Antikörperüberstandes	25
2.2.6. Aufreinigung des Antikörpers #78	26
2.2.7. Herstellung der Lysate	27
2.2.8. Westernblot	28
2.2.9. RT-PCR	30
2.2.9.1. Entnahme und Vorbereitung der Organe für die RNA-Extraktion	30
2.2.9.2. Gewinnung der Hämocyten für die RNA-Extraktion	30
2.2.9.3. Gewinnung der Hämocyten parasitisierter Tiere	31
2.2.9.4. Gewinnung der Eier für die RNA-Extraktion	31
2.2.9.5. Homogenisierung der Organe und Extraktion der RNA	31
2.2.9.6. Primerdesingn	32
2.2.9.7. Verwendete Primer	33
2.2.9.8. Erwartete Bandengrößen	33
2.2.9.9. Durchführung der RT-PCR	34
2.2.9.10. Vorbereitung der DNA für die Sequenzierung	
2.2.10. Angewendete computergestützte Programme zur Vorhersage von Splicing-Sites ,Translation und BLAST	35 35
2.3. Verwendete Lösungen	37
3. Ergebnisse	43
3.1. Hämocyten diverser Lepidopteren im Monolayer	43
3.1.1. <i>Manduca sexta</i>	43
3.1.2. <i>Acherontia atropos</i>	43
3.1.3. <i>Bombyx mori</i>	45
3.1.4. <i>Hyalophora cecropia</i>	45

3.1.5.	<i>Actias artemis</i>	47
3.1.5.	<i>Galleria mellonella</i>	47
3.2.	Monolayer im Kurzzeitintervall	49
3.2.1.	Monolayer (Typ I) <i>Manduca sexta</i> ein bis zehn Minuten	49
3.2.2.	Monolayer (Typ II) <i>Manduca sexta</i> ein bis zehn Minuten	53
3.2.3.	Monolayer (Typ II) <i>Acherontia atropos</i> ein bis zehn Minuten	57
3.3.	Direktfixierung der Hämocyten während des Blutens	60
3.4.	Hämocyten im Langzeitmonolayer	61
3.4.1.	Hämocyten im Langzeitmonolayer Typ I	61
3.4.2.	Hämocyten im Langzeitmonolayer Typ II	62
3.5	Immunhistochemie unter Verwendung von Triton X-100	63
3.6.	Auswirkungen der Parasitisierung durch <i>Cotesia congregata</i> im Monolayer	64
3.7.	GV1 im Zellkulturobjekträger	69
3.8.	Konfokale Laserscanmikroskopie	71
3.8.1.	KLSM der Organe	71
3.8.2.	KLSM von Hämocyten	78
3.9.	FACS-Analyse von <i>Manduca sexta</i> Hämocyten	80
3.10.	Ergebnisse des Western-Blot	81
3.10.1.	Western-Blot diverser Organlysate von <i>Manduca sexta</i>	81
3.11.	RT-PCR	82
3.11.1.	RT-PCR mit aus diversen Organen und Eiern von <i>Manduca sexta</i> sowie Hämocyten von <i>Acherontia atropos</i> extrahierter RNA	82
3.11.2.	RT-PCR parasitisierter Larven	84
3.12.	Sequenzierungen und anschließender BLAST	85
3.12.1.	Sequenzierung und anschließender BLAST des 500 bp cDNA-Fragments von <i>Manduca sexta</i>	85
3.12.2.	Sequenzierung und anschließender BLAST des 300 bp cDNA-Fragments von <i>Manduca sexta</i>	87
3.12.3.	Sequenzierung und anschließender BLAST des 150 bp cDNA-Fragments von <i>Manduca sexta</i>	89
3.12.4.	Sequenzierung und anschließender BLAST des 150 bp cDNA-Fragments von <i>Acherontia atropos</i>	91

3.12.5.	Direkter Vergleich einer aus den Sequenzierungen der ca. 150 bp großen Bande erhaltenen Sequenz mit der partiellen mRNA für <i>Manduca sexta</i> Annexin IX-A	93
3.13.	Splice Site Vorhersage in gi 58864723 (<i>Manduca sexta</i> partielle mRNA für Annexin IX-A)	94
3.14.	Anwendung des neuen Intron-Endes auf die Nukleotidsequenz von Annexin IX-C	95
3.15.	Anwendung des neuen Intron-Endes auf die Nukleotidsequenz von Annexin IX-A und B	97
4.	Diskussion	101
4.1.	Monolayer der untersuchten Lepidopteren	102
4.2.	Monolayer von <i>Manduca sexta</i> und <i>Acherontia atropos</i>	103
4.3.	Optische Schnitte	107
4.4.	Vergleich der bisherigen Schlüsse mit vorhergehenden Arbeiten an Annexin IX bei <i>Manduca sexta</i>	110
4.5.	Diskussion der Ergebnisse der RT-PCR	111
4.6.	Vermutungen zur Funktion von Annexin IX in <i>Manduca sexta</i>	113
4.7.	Ausblicke	114
5.	Zusammenfassung	115
6.	Literaturverzeichnis	117

Danksagung

Erklärung

1. Einleitung:

Die Klasse der Insekten ist eine der erfolgreichsten und verbreitetsten Tiergruppen der Erde. Insekten stellen den Hauptanteil der bekannten Arten und haben nach dem heutigen Wissensstand mit Ausnahme der Meerestiefen nahezu alle anderen Lebensräume besiedelt. Allgegenwärtig in Ökosystemen zeigen sie sich für den Menschen als Nützlinge durch etwa Blütenbestäubung oder bei der Schädlingsbekämpfung oder auch als Schädlinge, die z.B. die Ernte vernichten oder Krankheiten übertragen. Der Erfolg dieser Gruppe liegt nicht nur in der teilweise schnellen Generationsfolge und effektiver Reproduktion, auch sind Insekten in der Lage, sich gegen Feinde, sei es aus dem Makro- oder aus dem Mikrokosmos, erfolgreich zu verteidigen.

Der augenfälligste Schutz basiert bei den meisten Insekten auf der chitinisierten Kutikula, die nicht nur als Schutz gegen mechanische Verletzungen und als Außenskelett fungiert, sondern auch als Barriere gegen eindringende Pathogene dient. Dennoch kann der Insektenkörper nicht hermetisch abgeriegelt sein, so dass Pathogene z.B. über Poren, über Mund und After, die Tracheen oder über Verletzungen, auch Einstiche parasitoider Angreifer, in den Körper eindringen können.

Doch auch wenn Pathogene die äußeren Barrieren überwunden haben, ist der Wirtsorganismus ihnen nicht schutzlos ausgeliefert. Ein gut entwickeltes Abwehrsystem, das sich aus einer humoralen und einer zellulären Komponente (GILLESPIE *et al.* 1997, VILMOS & KURUCZ 1998) zusammensetzt, vermag den Organismus gegen viele Pathogene zu verteidigen.

Anders als bei Vertebraten, die neben einem angeborenem Part des Immunsystem noch eine hocheffektive adaptive, u.a. auf hochspezifischen Antikörpern basierende, Komponente besitzen, wurde bei Insekten bisher einzig ein angeborenes Immunsystem festgestellt, dessen „Exekutive“ auf Phagozytose, Einkapselung oder antimikrobiellen Hämolymphekomponenten aufbaut.

1.1. Die humorale Komponente der Immunreaktion bei Insekten:

Immunproteine und –peptide wie z.B. Lysozym zeigen eine antibakterielle und teilweise antifungale Wirkung (HOFFMANN 1995, BOMAN 1996, HULTMARK 1996, LAMBERTY *et al.* 1999). Ihre Synthese kann von der Art des eindringenden Pathogens sowie dessen Dosis abhängig sein und Unterschiede bei den unterschiedlichen Insektenarten zeigen (DUNN 1986 GILLESPIE *et al.* 1997). Die Syntheseorte für Immunproteine sind u. a. Fettkörper (TRENCZEK & FAYE 1988), aber auch in Hämocyten, Epidermis und Nervengewebe. (TRENCZEK 1998) Immunproteine können, wie z.B. im Falle von Lysozym, die Zellwand vor allem Gram-positiver Bakterien lysieren (SCHLEGEL 1992) oder als *pattern recognition protein* (PRP) wie Hämolin (RASMUNSON & BOMAN 1979, ANDERSSON & STEINER 1987, TRENCZEK & FAYE 1988) an Bakterien binden und wie HAIP (hemocyte aggregation inhibitor protein) (KANOST *et al.* 1994) die Aggregation von Hämocyten verhindern (LADENDORFF & KANOST 1991). Neben Immunproteinen zählen die Phenoloxidasekaskade (CERENIUS & SÖDERHÄLL 2004) und Koagulationsfaktoren sowie Modulatoren, Inhibitoren und Aktivatoren zur humoralen Immunantwort (GILLESPIE *et al.* 1997).

1.2. Die zelluläre Komponente der Immunreaktion bei Insekten:

Die zelluläre Komponente der Immunreaktion wird über die Hämocyten realisiert. Man unterscheidet bei *Manduca sexta* fünf Typen (HOROHOV & DUNN 1982, WILLOT *et al.* 1994): Plasmacyten, Granuläre Zellen, Sphärule Zellen, Oenocytoide und Prohämocyten, wobei Prohämocyten als noch nicht differenzierte Vorläuferzellen der anderen Typen gelten.

Hämocyten gehen, je nach Größe des Pathogens, durch Phagozytose, Knötchenbildung oder Einkapselung gegen als fremd erkannte Eindringlinge vor. Weiterhin übernehmen sie wichtige Funktionen beim Wundverschluss, der Koagulation sowie dem Aufbau der extrazellulären Matrix und sezernieren humorale Faktoren (GILLESPIE *et al.* 1997).

Eine deutlich sichtbare frühe Reaktion bei einer Verwundung oder Infektion insbesondere von Plasmacyten und Granulären Zellen ist das sog. Spreiten, erkennbar an der Verformung des Zellkörpers zur Ausbildung von Pseudopodien. Dies kann zu einer Vernetzung der Zellen untereinander bis hin zur Aggregatsbildung führen (GILLESPIE *et al.* 1997).

Einzelne kleine Partikel werden durch Phagocytose vor allem von Granulären Zellen und Plasmacyten aus dem System entfernt (RATCLIFFE & ROWLEY 1979, WAGO & ICHIKAWA 1979) und intrazellulär abgebaut. Dabei kann die Qualität des Effektors eine Rolle spielen, d. h. welcher Zelltyp sich hauptsächlich an der Reaktion beteiligt (ANDERL 2001, GRIGAT 2003).

Kleine Fremdkörper oder Ansammlungen von Keimen werden durch Knötchenbildung, also Koagulation von Hämocyten und Hämolymphekomponenten, vom Organismus abgeschirmt (LACKIE 1988, RATCLIFFE & ROWLEY 1979, THEOPOLD *et al.* 2004)). Hierbei können z.B. bei *Manduca sexta* Scolexine (KYRIAKIDES *et al.* 1995, FINNERTY *et al.* 1999) und Hämagglutinin (MINNICK *et al.* 1986) beteiligt sein.

Zu große Fremdkörper, die nicht durch Phagocytose und Knötchenbildung zu eliminieren sind, werden von mehreren Lagen Hämocyten, vor allem Plasmacyten und Granulären Zellen eingekapselt und anschließend mit einer Schicht extrazellulären Materials umhüllt (PECH & STRAND 1996, PECH UND STRAND 2000, GILLESPIE *et al.* 1997, WIEGAND *et al.* 2000). Der versiegelte Fremdkörper verbleibt im Organismus. Analog lassen sich Verhaltensweisen bei Staaten-bildenden Insekten in der Perspektive des Staates als Superorganismus beobachten. So werden eingedrungene, unerwünschte Fremdkörper, die sich nicht entfernen lassen, von Honigbienen (*Apis mellifera*) mit einer isolierenden Schicht Propolis umgeben (NEUMANN *et al.* 2001).

Trotz der Einteilung in humorale und zelluläre Immunantwort lassen sich die beiden Komponenten nicht ohne weiteres getrennt von einander betrachten, da die Hämocyten als Teil der Hämolymphe auf das sie umgebende Medium und z.B. auf Hormone reagieren und selbst Substanzen in die Hämolymphe sezernieren (GILLESPIE *et al.* 1997). Weiterhin spielen auch bestimmte, in der Hämolymphe vorkommende Ionen, wie Calcium- oder Zinkionen eine Rolle bei Adhäsionsvorgängen und der Zell-Zell-Interaktion (WILLOTT *et al.* 2002, Willott & Tran 2002).

1.3. Auswirkungen der Parasitierung von *Cotesia congregata*:

Manduca sexta ist nicht nur Angriffsziel einzelliger Organismen und Viren, auch Insekten stellen das Immunsystem des Tabakswärmers auf die Probe.

Anstatt wie viele andere Wespen ihre Brut mit gelähmter Beute zu bevorraten oder regelmäßig zu versorgen, schlugen Parasitoide wie z.B. die in dieser Arbeit verwendete *Cotesia congregata* einen anderen Weg ein, um eine stets frische Nahrungsquelle für ihre Brut zu erschließen: Die Platzierung der Eier und damit der Larven direkt in einen lebenden, sich selbst versorgenden Wirtsorganismus stellt sicher, dass die Nachkommenschaft bestmöglichst versorgt ist.

Dies bringt *Cotesia congregata*, ebenso wie andere Parasitoide, allerdings auch mit dem Immunsystem des Wirtes in Konfrontation. Einkapselungsvorgänge einer voll funktionsfähigen Abwehr würden eine Entwicklung der Larven verhindern, andererseits muss das Immunsystem soweit intakt bleiben, dass der Wirt lebensfähig bleibt.

Um die Entwicklung ihrer Nachkommen zu gewährleisten, injizieren die weiblichen Tiere bei der Eiablage, neben einem Proteincocktail aus Cervix- und Ovariensekret, Polydnaviren, die in das Genom der Wespen integriert sind (SAVARY *et al.* 1999, BELLE *et al.* 2002). Faktoren dieser Sekrete führen dazu, dass Hämocyten ihre Fähigkeit zur Anheftung verlieren und über einen Apoptose-ähnlichen Prozess aus der Hämolymphe eliminiert werden (BECKAGE *et al.* 1994, ALLEYNE & BECKAGE 1997, AMAYA *et al.* 2005). Bei von *Campoletis chloridaeae* parasitisierten *Helicoverpa armigera* erholen sich die Hämocyten in einem späteren Stadium der Entwicklung und sind wieder in der Lage, Sephadex-Kügelchen einzukapseln (YIN *et al.* 2003), während Hämocyten parasitierter *Manduca sexta* die Fähigkeit, Fremdkörper einzukapseln, scheinbar dauerhaft einbüßen (AMAYA *et al.* 2005).

Die Veränderungen der Hämocyten parasitierter *Manduca sexta* lassen sich bis in die Proteinausstattung zurückverfolgen, da auch in der Zusammensetzung Veränderungen festgestellt wurden und einige Proteine im Vergleich zu gesunden Larven nicht mehr festgestellt wurden (WIESLER 2003).

Die Auswirkungen der Parasitierung auf die Physiologie des Wirtsorganismus beziehen sich allerdings nicht nur auf die Hämocyten, sondern auch auf die Entwicklung der Schmetterlingslarve. Es findet bei *Manduca sexta* eine dramatische Erhöhung des Juvenilhormonspiegels bei gleichzeitigem Absinken der Juvenil Hormon-Esterase-Konzentration statt, während Ecdysteroid und Ecdyson-20-monooxygenase in ihrer Konzentration sinken, die Larve wird nach der Häutung ins terminale Larvenstadium in ihrer

Entwicklung arretiert und kann nicht mehr in die Metamorphose eintreten (BECKAGE & RIDDIFORD 1982, BECKAGE & TEMPLETON 1986, GELMAN *et al.* 1998).

Innerhalb von 24 bis 36 h nach Häutung des Wirtes ins terminale Larvenstadium findet die erste Häutung der *Cotesia*-Larven statt, und nach weiteren vier bis acht Tagen schließt sich die zweite Larvalhäutung der Parasitoiden an. Für die Verpuppung durchbrechen die Wespenlarven die Haut ihres Wirtes und spinnen sich noch an der Raupe ihren Kokon. Meist überleben die Wirte diese Prozedur, sind aber nicht mehr in der Lage, sich weiter zu entwickeln und gehen spätestens nach einigen Tagen ohne weitere Nahrungsaufnahme zu Grunde (BECKAGE & TEMPLETON 1986).

1.4. Annexine:

Die in fast allen Organismengruppen gefundenen Annexine gelten allgemein als lösliche, hydrophile Proteine, die an negativ geladene Phospholipide calciumabhängig reversibel binden und ein konserviertes Strukturelement von etwa 70 Aminosäureresten besitzen, das als *annexin repeat* bezeichnet wird und in seiner Sekundärstruktur 5 α -Helices ausbildet (GERKE & MOSS 2002). Da aus den anfangs überschaubaren entdeckten Annexinen bald eine durch bloße Nummerierung unübersichtliche Zahl wurde, wurde die Einteilung in Familiengruppen vorgeschlagen: Die mit A bezeichneten Annexine wurden in Vertebraten gefunden, die B-Gruppe umfasst Annexine der Invertebraten, C markiert die der Pilze, während D die pflanzlichen und E die Annexine der Protisten kennzeichnet (MORGAN *et al.* 1999, BANCES *et al.* 2000, MOSS & MORGAN 2004)

Die Nummerierung der Annexine in den einzelnen Familiengruppen hingegen ist zum Teil willkürlich gewählt, kann sich aber auch, im Falle der Vertebraten-Gruppe, an ihren humanen Gegenstücken orientieren (GERKE & MOSS 2002).

Da sich die neue Nomenklatur der Annexine allerdings noch nicht vollständig durchgesetzt hat, orientiert sich die Benennung in der vorliegenden Arbeit an LESCH 2005, so dass Annexine im Zusammenhang nach der Originalliteratur bezeichnet werden.

1.4.1. Aufbau:

Ein Zugehörigkeitskriterium der Annexine ist, neben der Fähigkeit, calciumabhängig an Membranen zu binden, das Vorhandensein so genannter *annexin repeats*. Die meisten Annexine, mit Ausnahme von Annexin VI mit acht *repeats*, besitzen vier dieser Domänen.

Weiterhin lässt sich das Protein in einen N-terminalen Teil, den *head*, und einen C-terminalen Part, den sog. *core* unterteilen. Der *core* beinhaltet die Calcium- und Membranbindungsfähigkeit, während der *head* Kopplungsfähigkeiten zu z.B. cytoplasmischen Proteinen besitzt (WENG *et al.* 1993, GERKE & MOSS 2002).

Je nach Länge des Kopfteils werden Annexine in zwei Untergruppen unterteilt, eine dritte Gruppe wird von Annexin VI mit seinen acht *annexin repeats* repräsentiert (SMITH & MOSS 1994)

Während vor allem die Annexine der A-Familie, also der Vertebraten und des Menschen, einen konservierten *core* und einen je nach Annexin variablen *head* besitzen, ist die

Variabilität des N-terminalen *heads* der Annexine der D-Familie (in Pflanzen vorkommend) weniger ausgeprägt (DELMER & POTIKHA 1997).

1.4.2. Eigenschaften von Annexinen:

Wenn auch die grundlegenden Eigenschaften der Annexine wie der Aufbau und die Ca^{2+} -abhängige Bindefähigkeit für alle bisher bekannten Mitglieder der Annexinfamilie zutreffen und als Kriterium der Zugehörigkeit gelten, sind die Funktionen sehr weit gestreut und selbst für einzelne Annexine vielfältig (MOLLENHAUER 1997) oder widersprüchlich bis ungeklärt.

Annexine (A1, A2, A4, A6, A7) können an der Aggregation von Membranvesikeln beteiligt sein (RAYNAL & POLLARD 1994), wobei für Annexin A1, ebenso wie für Annexin II (RETY *et al.* 1999), eine Interaktion mit Proteinen der S100-Familie festgestellt wurde (MAILLIARD *et al.* 1996). Annexin I (A1) scheint außerdem an inflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein (MOLLENHAUER 1997, PERRETTI 1998). Annexin II (A2) wurde im Zusammenhang mit dem Kalziumstoffwechsel und exozytotischen Prozessen entdeckt (MOLLENHAUER 1997). Ebenfalls an derartigen Vorgängen scheinen die Annexine A1, A3, A6, A7, A11 und A13 sowie B7 beteiligt zu sein (GERKE & MOSS 2002).

Humanes Annexin I wird vom Cytosol an die Zellaussenseite translokiert und scheint dort zur Opsonierung apoptotischer Zellen zu dienen (ARUR *et al.* 2003), während Annexin 2 ein Substrat für verschiedene Proteinkinasen stellt und an der Regulation von Endo- und Exocytose sowie Thrombolyse beteiligt sein kann (OZEKI *et al.* 2002).

Für Annexin I, II, V, VI und VII wurde eine Ionenkanal-Aktivität beschrieben (POLLARD & ROJAS 1988, ROJAS *et al.* 1990, POLLARD *et al.* 1992, BERENDES *et al.* 1993, BURGER *et al.* 1994, LIEMANN *et al.* 1996, LIEMANN & HUBER 1997).

Neuere Ergebnisse weisen Annexine wie z.B. Annexin B11 von *Anopheles gambiae* als Bindungsziele von Parasiten aus, hier Ookineten von *Plasmodium berghei* (KOTSYFAKIS *et al.* 2005).

1.4.3. Annexine bei Insekten:

Im Gegensatz zu den Annexinen der Vertebraten führen Annexine von Insekten vom Wissensstand her gesehen ein Schattendasein. Nur wenige Arten, darunter vor allem Dipteren, wurden bisher auf Annexine und deren Funktionen und Interaktionen bei Insekten erforscht, so z.B. Annexin B11 von *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* (KOTSYFAKIS *et al.* 2005). Bei Lepidopteren wurden vor allem bei *Bombyx mori* und neuerdings bei *Manduca sexta* (LESCH 2005) Annexine gefunden. Im Falle von *Bombyx mori* sind dies Annexin IX (XIA *et al.* 2001) und B13 (MATSUNAGA & FUJIWARA 2002), bei *Manduca sexta* Annexin IX. Über die Funktion von Annexin IX können bisher nur Vermutungen angegeben werden, seine mRNA wurde allerdings für *Bombyx mori* in allen bisher getesteten larvalen Organen (Hämolymphe [Hämocyten], Haut, Mitteldarm, Trachee, Malpighi'sche Gefäße, Spinndrüse, Fettkörper, Hoden und Ovarien) sowie Eiern, Puppen und Adulten nachgewiesen (XIA *et al.* 2001).

Ebenfalls für Annexin IX wurden bei *Bombyx mori* und *Manduca sexta* drei Isoformen (A, B und C) festgestellt, die hohe Übereinstimmungen zeigen und durch alternatives Spleißen entstehen (XIA *et al.* 2001, LESCH 2005). Hier wird durch Spleißen im den C-terminalen *core*-Bereich codierenden Teil der Prä-mRNA für eine Variabilität des die Calcium-Bindedomänen und für die Phospholipid-Bindung verantwortlichen Parts des Annexins gesorgt, während der N-terminale *head* dieses Annexins davon nicht betroffen ist.

1.5. Alternatives Exon-Spleißen:

Alternatives Exon-Spleißen bietet dem Organismus die Möglichkeit, die Variabilität des Proteinrepertoires bei gleich bleibender Genzahl zu erhöhen und ein Gen vielfältig zu nutzen (GRAVELEY 2001). Beim Spleißen werden Teilsequenzen der Prä-mRNA, so genannte Introns, an diversen Sequenzen erkannt und im Zellkern herausgeschnitten, während andere Sequenzen, so genannte Exons, erhalten bleiben und das spätere Protein codieren. Alternatives Spleißen nutzt die Möglichkeit, unterschiedliche Start- und Endsequenzen zu kombinieren und so jeweils verschiedene Teile der RNA heraus zu schneiden (zusammengefasst in u.a. NORTON 1994 und BLACK 2003).

Beim Menschen wird vermutet, dass mindestens dreiviertel aller menschlichen Multi-Exon-Gene alternativ gespleißt werden (JOHNSON *et al.* 2003).

Weiterhin wird vermutet, dass alternatives Spleißen ein zentrales Element der Genregulation höherer Eukaryoten ist (BLACK 2003). Die Kontrolle dieser Vorgänge kann durch regulierende Proteine erfolgen und von snRNA unterstützt werden (NORTON 1994, BLACK 2003), so sich dass dem Organismus vielfältige Möglichkeiten bieten, Exons eines Gens zu einander zu variieren.

1.6. Zielsetzung der Arbeit:

Hauptziel der Arbeit war es, Einblicke in die Funktion von *Manduca sexta* Annexin IX zu gewinnen. Hierfür standen spezifische monoclonale Antikörper zur Verfügung (WILLOT *et al.* 1994, LESCH 2005), die einen immunhistologischen Nachweis des Zielproteins ermöglichten. Neben immunhistologischen Methoden stand die Frage nach der Expression von Annexin IX in *Manduca sexta* im Zentrum des Interesses, was durch RT-PCR mit aus isolierten Organen gewonnener RNA realisiert werden sollte.

Weiterhin sollte mit diesen Antikörpern, deren Antigen in einem der konservierten Bereiche des Proteins vermutet wird (LESCH 2005), bei weiteren Lepidopteren nach möglichen Vorkommen von Annexin IX gesucht werden. Hierfür wurden zuerst *Manduca sexta* bzw. *Bombyx mori* nahe stehende Arten eingesetzt und die Suche später auf eine systematisch weiter entfernte Lepidoptere ausgeweitet.

2. Material und Methoden:

2.1. Versuchstiere und Zellkulturen:

2.1.1. *Manduca sexta*:

(Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura; Ditrysia; Obtectomera; Sphingoidea; Sphingidae; Sphinginae)

Die Hälterung der Larven (Abb. 2.1) aus der hauseigenen Zucht erfolgte vom Ei bis zur Puppe unter einem Tag-Nachtrhythmus von 16 h zu 8 h, bei 22 °C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 75 % auf einer künstlichen Diät (YAMAMOTO 1969). Die Larven wurden zu mehreren in Plastischalen aufgezogen und alle drei bis vier Tage in neue Schalen mit frischem Futter gesetzt. Der Größe der Larven entsprechend wurde die Anzahl pro Schale schrittweise reduziert, bis schließlich mit Erreichen des letzten Larvenstadiums eine Einzelhaltung notwendig war. Erreichten die Tiere das Wanderstadium, erkennbar am deutlich sichtbaren Rückengefäß, und begannen verstärkt Speichel abzusondern, erhielten sie eine mit Zellstofftüchern ausgelegte Schale ohne Futter, worin sie bis zur Verpuppung verblieben. Nach Aushärten der Puppenhülle wurden die Puppen in eine gesonderte Box verbracht und kurz vor dem Schlupf der Imagines (Abb. 2.2) in einen mit einer Tabakpflanze (meist *Nicotiana tabacum*) zur Eiablage und Zuckerwasser als Nahrungsquelle ausgestatteten Flugkäfig bei 24 °C bis 26 °C mit 16 h zu 8 h Tag-Nachtrhythmus gelegt.

Alle drei Tage, es sei denn, eine Versuchsanordnung sah einen anderen Rhythmus vor, wurden die Eier abgesammelt und in Aufzuchtsschalen mit Futter in den Zuchtschrank verbracht.



▲ **Abb.2.1:** *Manduca sexta* L5 d3-4; erkennbar ist ein Farbunterschied einer auf Kunstfutter gezogenen Larven (oben) zu einer auf *Nicotiana tabacum* herangewachsenen (unten). Als Größenmaßstab dient eine Ein-Euro-Münze.

► **Abb.2.2:** *Manduca sexta* adult auf *Nicotiana tabacum*.

2.1.2. *Acherontia atropos*:

(Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura; Ditrysia; Obtectomera; Sphingoidea; Sphingidae; Sphinginae)

Die Tiere wurden als Eier bzw. als Larven des ersten Stadiums über die private Insektenbörse www.actias.de bezogen. Die Aufzucht der Larven (Abb. 2.3) erfolgte in kleinen Gruppen an *Ligustrum spec.* oder einzeln in Aufzuchtsschalen an Manduca-Kunstfutter bei Zimmertemperatur bzw. im Manduca-Brutschrank. Für die Verpuppung wurden die Larven im Wanderstadium einzeln in eine Aufzuchtsschale mit leicht feuchtem Moos gegeben und dort bis zur Aushärtung der Puppe belassen. Der Schlupf und die Hälterung der Adulti (Abb. 2.4:) erfolgte in Flugkäfigen, wie sie für *Manduca sexta* genutzt wurden.



Abb. 2.3: *Acherontia atropos*, fünftes und letztes Larvenstadium, Farbvarianten:
Oben: Aufzucht mit Kunstfutter
Untere Reihe: Aufzucht an Liguster, gelbe und braune Form.
2 Kästchen entsprechen 1 cm.



Abb.2.4: *Acherontia atropos*, adultes Weibchen an *Hoya carnosa*.

2.1.3. *Bombyx mori*:

(Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura; Ditrysia; Obtectomera; Bombycoidea; Bombyciformes; Bombycidae)

Die Eier von *Bombyx mori* wurden über Dr. Silvia Cappelozza, Istituto Sperimentale per la Bachicoltura, Padova, bezogen und zu mehreren auf künstlicher Diät aus gleicher Quelle in 500 ml Schalen weiter gezogen. Die Hälterung der Larven (Abb. 2.5) erfolgte im selben Zuchtschrank wie *Manduca sexta*.

Bei der Haltung war darauf zu achten, dass evtl. kranke Tiere sofort ausgesondert wurden, da sonst leicht ganze Schalen infiziert wurden und damit verloren waren. Weiterhin konnten die Tiere nur auf Laub von *Morus spec.* oder aber der verwendeten künstlichen Diät gezogen werden, alle anderen Nahrungsquellen wurden verweigert. Hierbei sei erwähnt, das *Morus spec.* durchaus nicht häufig vorkommt, so dass auf Kunstfutter zurückgegriffen werden musste. Dieses wurde aus Pulverform frisch angesetzt (100 g auf 260 ml Wasser, 12 min in der Mikrowelle kochen) und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Nachdem der etwa wachteleigroße Kokon (Abb. 2.5) gesponnen war, konnte dieser nach einigen Tagen geöffnet werden, um das Geschlecht der Puppe zu bestimmen. Zum Schlupf wurden die Kokons in mit Zellstofftüchern ausgelegten 0,5 l Dosen verbracht, in denen auch die Adulten (Abb. 2.6) gehältert wurden. Nahrung war nicht mehr notwendig, da die Tiere nur reduzierte Mundwerkzeuge besitzen und kein Futter aufnehmen können.



Abb.2.5: *Bombyx mori*, verpuppungsreife Larve mit ca. 6 cm Länge (links) und geöffneter Kokon mit Blick auf die Puppe (rechts). Auffällig ist, dass die Puppe im Vergleich wesentlich kleiner als die Larve erscheint, was auf den Masseverlust durch den Kokonbau zurückzuführen ist.



Abb.2.6: *Bombyx mori*, Adulti in Paarung. Das Weibchen (rechts) erscheint durch die für die Eiablage eingelagerten Reserven massiger als das Männchen (links).

2.1.4. *Hyalophora cecropia*:

(Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura; Ditrysia; Obtectomera; Bombycoidea; Saturniiformes; Saturniidae; Saturniinae; Attacini)

Auch die Eier dieser Art wurden über www.actias.de bezogen. Die Aufzucht der Larven (Abb 2.7) erfolgte bei Zimmertemperatur an *Prunus spec.* und *Malus spec.*.



Abb.2.7: *Hyalophora cecropia*, Larve in Häutung vom vorletzten ins letzte Larvenstadium

2.1.5. *Actias artemis*:

(Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura; Ditrysia; Obtectomera; Bombycoidea; Saturniiformes; Saturniidae; Saturniinae; Saturniini)

Diese Tiere wurden ebenfalls als Eier über www.actias.de bezogen. Die Aufzucht erfolgte bei Zimmertemperatur in kleinen Gruppen an *Carpinus betulus*. Die normalerweise grünen Larven (Abb. 2.8) verfärbten sich mit Eintritt ins Wanderstadium braun und verließen die Zweige der Futterpflanze, um sich am Behälterboden in einem Kokon zu verpuppen. In diesem Stadium wurden die Tiere entnommen und für den Kokonbau in Aufzuchtsschalen verbracht. Nach der Verpuppung (Gegenlichtkontrolle) konnte der Kokon vorsichtig zur Geschlechtbestimmung eröffnet werden. Männliche Puppen und Adulti (Abb. 2.9) haben im Vergleich zum Weibchen größere Antennenanlagen und sind daher gut zu erkennen.



Abb.2.8: *Actias artemis*, letztes Larvenstadium an *Carpinus betulus*, zum Größenvergleich auf Millimeterpapier



Abb.2.9: *Actias artemis*, adultes Männchen; die verbreiterten Antennenkämme sind gut zu erkennen.

2.1.6. *Galleria mellonella*:

(Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura; Ditrysia; Obtectomera; Pyraloidea; Pyralidae; Galleriinae)

Die Larven von *Galleria mellonella* wurden über die Zooabteilung von Karstadt Giessen bezogen. Da die Tiere auf diese Weise über das Geschäft bereits mit Nahrung versorgt waren, war nur noch für eine ausbruchssichere Aufbewahrung zu sorgen, indem der Behälter mit den Larven fest verschlossen auf ein Podest in einer ca. 1 – 2 cm mit Wasser gefüllten Plastikwanne verbracht wurde. Dem Wasser konnte noch handelsübliches Spülmittel zugesetzt werden, um die Oberflächenspannung so weit herabzusetzen, dass die Wasserfläche für entkommene Larven ein unüberwindliches Hindernis bot. Derartige Vorkehrungen waren notwendig, um Fraßschäden an Dichtungen und elektrischen Geräten zu verhindern.

2.1.7. *Cotesia congregata*:

(Hymenoptera; Apocrita; Ichneumonoidea; Braconidae; Microgastrinae)

Der Zuchtansatz dieser Braconiden stammte aus dem Labor von Dr. N. Beckage (USA).

Die Haltung der adulten Tiere erfolgte in Plexiglasbehältern mit rückseitiger Gazeabspannung und einer mit einem Gewebeschlauch gesicherten Öffnung an der Frontseite, der bei Zimmertemperatur aufgestellt war. Um ein Austrocknen der recht empfindlichen Tiere zu vermeiden, war es erforderlich, den mit Zellstoff ausgelegten Behälterboden regelmäßig zu befeuchten. Als Nahrung diente handelsüblicher und mit Wasser verdünnter Bienenhonig.

Manduca sexta Larven wurden in den ersten Tagen des vierten Larvenstadiums mit einer Plastikstange durch die Frontöffnung in den Käfig gehalten und unter Beobachtung den Wespen zum Stich präsentiert. Zu beachten war, dass nur ein Wespenweibchen seine Eier injizierte, da multiples Belegen den vorzeitigen Tod der Raupe nach sich ziehen konnte.

Während der Entwicklung der Parasitoide in den Wirten wurden diese wie die unparasitierten Raupen gehältert.

Durchbrachen die Wespenlarven die Haut ihres Wirtes und hatten ihren Kokon gesponnen, wurden diese mit einer Federstahlpinzette abgesammelt und in den Behälter mit den adulten Wespen überführt.

2.1.8. Hybridoma-Kulturen:

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte, die an offenen Zellkulturen durchgeführt wurden, erfolgten an der Sterilbank.

2.1.8.1. Auftauen der Hybridoma –Zellkulturen:

Das Auftauen der bei -80 °C in Kryo-Röhrchen gelagerten Zellen musste rasch erfolgen, um eine Eiskristallbildung und damit eine Verletzung der Zellen zu minimieren. Da jede Zeitverzögerung ein Gelingen erschweren konnte, wurden alle notwendigen Medien zuvor auf 37 °C gebracht und die Zellen zuerst in der Hand und anschließend im vorgewärmten Wasserbad aufgetaut. Nach Desinfektion der Röhrchen mit 70% EtOH unter der Sterilbank wurde die Zellsuspension in 5 ml RPMI-Waschmedium überführt und zellschonend bei $200\times g$ 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in Waschmedium resuspendiert und zentrifugiert. Es folgte eine zweimalige Wiederholung des Vorgangs, an deren Ende jeglicher Überstand entfernt und verworfen und das Zellpellet in 2 ml RPMI-Inkubationsmedium resuspendiert wurde. Für die weitere Inkubation der Zellen teilte man die Suspension zu je $500\text{ }\mu\text{l}$ auf Vier-Loch-Zellkulturschalen auf, in der pro Loch $500\text{ }\mu\text{l}$ RPMI-Inkubationslösung vorgelegt waren, so dass sich pro Loch 1 ml verdünnte Suspension befand. Nach einigen Stunden Inkubation im Brutschrank konnten Zelldichte und -qualität im Inversmikroskop überprüft und vorsichtig ca. 80% des Mediums gewechselt werden. An den folgenden Tagen musste regelmäßig die Qualität der Zellen überprüft und das Medium teilerneuert werden, bis sich der Zustand der Zellen stabilisiert hatte und Zellteilungen beobachten werden konnten. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte konnten die meisten Zellen in Zellkultur-Flaschen überführt werden, wobei ein Rest in der Vier-Loch-Schale als „Backup“ verblieb. Im Folgenden wurde der FBS-Gehalt der Nährmediums schrittweise von 10% auf 5% reduziert und der Zustand der Zellen laufend kontrolliert. Von gut wachsenden Kulturen konnten durch Abschlagen der Zellen nach Zugabe frischen Mediums „Ableger“ erstellt und so die Antikörperproduktion beschleunigt werden. Die Mutterkultur erhielt in diesem Falle erneut Medium.

2.1.8.2. Ernten der Antikörper und Pflege der Kulturen:

Vor Entnahme des Kultur-Überstandes mit den Antikörpern musste der Zustand der Zellen mikroskopisch kontrolliert werden, da nur der Überstand von gut wachsenden gesunden Kulturen genutzt wurde. Der Wechsel des Mediums erfolgte zweimal die Woche, wobei der Überstand aufgefangen und abzentrifugiert (300x g, 10 min) wurde. Das nun zellfreie, die Antikörper enthaltende Medium konnte nach Zugabe von 0,05% Natriumazid (Endkonzentration) bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.1.8.3. Einfrieren der Hybridoma-Zellkulturen:

Für eine längere, weniger pflegeintensive Lagerung konnten die Zellen eingefroren werden. Hierfür wurden sie von einer sich in der Wachstumsphase befindenden Kultur durch Anschlagen der Flasche vom Grund gelöst und mit dem Medium zur Zentrifugation (10 min bei 200x g und 4 °C) in sterile 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach anschließender 30-minütiger Abkühlung auf Eis konnte der Überstand entfernt und das Pellet in 1,5 ml vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen werden. Diese Suspension wurde auf Kryoröhrchen verteilt, die erneut 30 min auf Eis lagerten, bevor sie in einer vorgekühlten und mit Isopropanol gefüllten Gefrierbox in den -80 °C-Schrank verbracht wurden. Nach ungefähr einer Woche konnten die Röhrchen der Box entnommen und auf gekennzeichnete Fächer im -80 °C-Schrank verteilt werden.

2.1.9. GV1 Kulturen:

Als Subclon der Zelllinie MRRL-CH1 (LYNN & OBERLANDER 1981) standen mit den GV1-Kulturen aus *Manduca sexta*-Embryonen gewonnene Zellen zur Verfügung.

Die Hälterung dieser Kulturen erfolgte bei 25 °C unter wöchentlichem Wechsel des GV1-Mediums.

2.2. Analytische Methoden:

2.2.1. Monolayer allgemein:

2.2.1.1. Vorbereitung: Monolayer Typ I:

Gesäuberte Larven des letzten Stadiums wurden nach Betäubung auf Eis durch einen raschen Schnitt in ein Bauchfüßchen in eisgekühlte AC-Saline geblutet und in Folge dreimal mit AC-Saline gewaschen. Jedem Waschschrift folgte eine Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 15 min. Nach dem letzten Waschschrift wurde die AC-Saline vorsichtig aber möglichst vollständig entfernt, das Zellpellet in eiskaltem Grace aufgenommen und die Suspension zu zehn bzw. 15 µl/Loch auf Zwölf- bzw. Zehnloch-Objektträger aufgetragen.

2.2.1.2. Vorbereitung: Monolayer Typ II:

Hier unterschied sich die Vorgehensweise insofern von Typ I, dass die Zellen aus der gewonnenen Hämolymphe nicht in AC-Saline gewaschen, sondern direkt in einem mit PTU vorbereiteten 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen wurde und sofort 1:10 mit eiskaltem Grace-Medium verdünnt und aufgetragen wurde.

2.2.1.3. Gemeinsame Behandlung der Monolayer beider Typen:

Die Proben inkubierten anschließend, wenn nicht extra aufgeführt, mindestens 30 min bis höchsten 1 h in einer feuchten Kammer, bis eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 min erfolgte. Anschließend wurde zweimal mit TBS gewaschen und die Proben mit 3% BSA/TBS für 30 min blockiert. Diesem Vorgang schloss sich direkt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (#78) über Nacht an. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die statt einer Antikörperbehandlung über Nacht in der Blockierung belassen wurde.

Am folgenden Tag folgten vier Waschschriffe mit TBS mit je 10 bis 15 min Inkubationszeit, und anschließend 1 h Inkubation mit Fluorochrom-markierten zweitem Antikörper (SIGMA FITC@Mouse) 1:200 in 0,5 bis 1% BSA/TBS. Nach weiteren vier Waschschriffen mit TBS wurden die Monolayer mit DABCO-Lösung eingedeckt und die Objektträger mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. (Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass der

Nagellack nicht fluoreszierte, so dass schwarze Farbe im Verlauf der Arbeit den Vorzug erhielt.)

2.2.1.3.1. Tritonbehandlung:

Um die Zellmembran durchlässig zu machen, konnte vor der Blockierung eine fünfminütige Inkubation mit 0,5% Triton-X-100 in 3% BSA/TBS eingefügt werden. Anschließend wurden die Proben mit TBS so oft gewaschen, bis die aufgetragenen TBS-Tropfen wieder Oberflächenspannung zeigten. Anschließend wurde die Blockierung (2.2.1.3.) durchgeführt.

2.2.1.3.2. DAPI-Färbung:

Vor dem letzten TBS-Waschschritt konnte eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) zwischengeschaltet werden. Die vorhandene 10^{-3} M Stammlösung wurde 1:1000 mit 0,5% BSA/TBS verdünnt und pro OT-Feld 15 μ l aufgetropft. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT unter Lichtabschluss wurde der letzte TBS-Waschschritt angeschlossen und die Objekte mit DABCO eingedeckt.

2.2.1.3.3. Aktinfilament-Markierung mit Phalloidin:

Die vorhandene Stamm-Lösung (300 mM) TRITC-konjugiertes Phalloidin (SIGMA) wurde 1:500 mit BSA/TBS verdünnt und zu je 15 μ l pro Objektträgerloch aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur konnte das Objekt nach vier TBS-Waschritten mit DABCO-Lösung eingedeckt werden.

Für Doppelfärbungen konnte der Phalloidin-Lösung zusätzlich ein geeignet markierter (hier FITC) @Mouse-IgG-Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe 2.2.1.3.) zugegeben werden, wenn die Zielobjektträger vorher entsprechend mit Antikörper #78 inkubierten. Die weitere Behandlung erfolgte den obigen Protokollen entsprechend.

Der Phalloidin-enthaltende Abfall wurde getrennt gesammelt, auf angemessene Schutzkleidung war zu achten.

2.2.2. Spezielle Monolayer:

2.2.2.1. Kurzzeitintervall-Monolayer:

Manduca sexta L5d2-3 bzw. *Acherontia atropos* L5d2-3 wurden auf Eis betäubt und in ein mit PTU vorbereitetes, eisgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß geblutet. 100 µl der Hämolymphe wurden sofort mit 900 µl eisgekühltem Grace durch sanftes Pipettieren gemischt und je 15µl der Suspension pro Loch möglichst ohne Zeitverzögerung auf Zehnloch-Objektträger aufgebracht. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen zu vermeiden. In einminütigem Abstand wurde pro Loch 15 µl 4% Paraformaldehyd in MS⁻ als Fixans aufgetragen, was gleichzeitig den Spreitungs- und Anheftungsprozess unterbrach und den momentanen Zustand der Zellen erhielt. Für die jeweilige Inkubationszeit blieb die Kammer geöffnet, um die Dampfkonzentration der Fixans gering zu halten.

Die fixierenden Proben inkubierten für mindesten zehn bis höchstens 20 Minuten und wurden anschließend wie unter 2.2.1.3. weiterbehandelt.

2.2.2.2. Langzeitintervall- Monolayer:

Für Langzeitintervall-Monolayer wurden *Manduca sexta* L5d2-3 ebenfalls auf Eis betäubt und die Hämolymphe wie unter 2.2.2.1. gewonnen und verdünnt. Auch hier wurden die Proben zu je 15 µl/Loch auf Zehnloch-Objektträger aufgetragen, allerdings erhielt hier jede Zeitstufe einen eigenen Objektträger. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer. Im Abstand von je 20 Minuten wurden die jeweiligen Objektträger in eine zweite feuchte Kammer überführt, die Proben mit 4% Paraformaldehyd in MS⁻ zehn Minuten lang fixiert und anschließend wie unter 2.2.1.3. weiterbehandelt. Die Überführung in eine zweite feuchte Kammer wurde gewählt, um zu vermeiden, dass die am längsten inkubierenden Proben über einen größeren Zeitraum den Fixansdämpfen ausgesetzt wären.

2.2.2.3. Direktfixierung der Hämocyten bei Gewinnung der Hämolymphe:

Nach Anschnitt des Kranzfüßchens einer kurz auf Eis gekühlten *Manduca sexta* L5d2-3 wurde die Hämolymphe direkt in eiskalter 4% PFA/MS⁻ aufgefangen und sofort durch Schwenken möglichst gleichmäßig verteilt und 15 min bei 4 °C und 200 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bestmöglichst in TBS resuspendiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit anschließender Zentrifugation wurden die Proben mit 3% BSA/TBS für 30 min blockiert und folgend mit konzentriertem Antikörper #78 (ausgenommen Negativkontrolle) über Nacht im Kühlschrank 1:2 (Antikörperkonzentrat:Zellsuspension) inkubiert. Am Folgetag wurde erneut ein Waschschriff durchgeführt und anschliessend mit FITC@Mouse (1:200 Verdünnung, 200 µl Lösung/Probe) 1 h bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach einem letzten Waschschriff wurde das verbliebene Pellet (hohe Verluste durch Koagulation aufgrund der direkten Fixierung) in DABCO-Lösung aufgenommen und auf einen Objektträger aufgebracht und eingedeckt.

2.2.2.4. GV-1-Monolayer:

GV-1-Zellen wurden nach dem Mediumwechsel durch sanftes Abschlagen aus der Kulturflasche gewonnen und in Zellkulturobjektträger überführt. Die Zellen inkubierten 3 Tage bei 25 °C und wurden im Anschluss 10 min mit 4% Paraformaldehyd in MS- fixiert. Die weitere Behandlung der Monolayer entsprach der unter 2.2.1.3. angeführten Vorgehensweise.

2.2.3. Vorbereitung der Organe für die konfokale Laserscanmikroskopie:

Manduca sexta L5 d2-3 wurden zuerst auf Eis betäubt und anschließend unter eiskaltem TBS seitlich eröffnet, um das dorsal gelegene Herz der Larve nicht zu beschädigen. Nach der Entnahme und Aufteilung der Organe erfolgte durch Schwenken ein sanftes Waschen in TBS und eine anschließende Fixierung der Organe in 4 % Paraformaldehyd-Lösung für 1 h bei 4 °C in einer Vierloch-Zellkulturschale. Die fixierten Organe wurden dreimal in TBS gewaschen, indem mit einer Pasteurpipette die Flüssigkeit vorsichtig abgezogen wurde, und zur vollständigen Entfernung der Fixans über Nacht in TBS im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag schloss sich ein erneuter Waschriff mit TBS an, in dessen Anschluss die Organe 1 h in 0,5 % Triton X-100 in 3 % BSA/TBS bei 4 °C gelagert wurden. Die Organteile, die nicht für eine Tritonbehandlung bestimmt waren, lagerten währenddessen in TBS. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Organe dreimal in TBS gewaschen und anschließend 1 h bei 4 °C in 3 % BSA/TBS blockiert. Nach Entfernung der Blockierungslösung konnte der primäre Antikörper (#78 als Hybridomakultur-Überstand) die Organe gut bedeckend aufgetragen und die Organe über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Die als Kontrollen bestimmten Organteile verblieben währenddessen in 3 % BSA/TBS.

Am dritten Tag folgten vier TBS-Waschriffte, an deren Ende der sekundäre Antikörper (FITC Goat@Mouse, SIGMA, 1:200 in 1 % BSA/TBS) die Organe gut bedeckend aufgetragen wurde. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nachfolgend schlossen sich erneut vier TBS-Waschriffte an, nach deren Abschluss die Organe mit DABCO-Lösung in Einschliffobjektträgern eingedeckt, mit Nagellack versiegelt und bis zur mikroskopischen Betrachtung im Kühlschrank gelagert wurden.

2.2.4. Vorbereitung der Proben für Durchflusszytometrie:

Die Durchführung der Analytischen Durchflusszytometrie ermöglichte die Studien von in Suspension befindlichen Zellen (RENAULT *et al.* 2001), indem die Zellen nach entsprechender Vorbehandlung und Markierung durch einen Laserstrahl geführt wurden, wobei eine Messung der Fluoreszenz erfolgte. Die erhaltenen Daten konnten nach dem FCS (Flow Cytometry Standard) gespeichert mit einem entsprechenden Programm, hier Cell Quest Pro™ (Fa Becton, Dickinson & Co.) bearbeitet und ausgegeben werden. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Silvia Geuenich durchgeführt.

2.2.4.1. Vorbereitung der Proben:

Manduca sexta L5d2-3 wurden durch Anschnitt eines hinteren Kranzfüßchens in eiskalte AC-Saline mit 0,1% NaAzid geblutet und die Zellen bei 300 x g bei 4°C für 10 min pelletiert. Nach Dekantierung des Überstandes und Resuspendierung in weiterer AC-Saline (0,1% NaAzid) folgte eine weitere Zentrifugation, an deren Anschluss das jeweilige Zellpellet in Waschlösung (1% BSA/TBS, 0,1% NaAzid, 20 mM EDTA) (GEUENICH 2005, abgewandelt) aufgenommen wurde. Nach Bestimmung der Zellzahl konnte ein Titer von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Suspension zu je 200 µl in 15 ml Reaktionsgefäße aliquotiert werden. Es folgte eine Inkubation mit Antikörper (# 78, 200 µl Hybridoma-Überstand pro Probe, neg. Kontrolle entspr. Menge Waschlösung) über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Der Inkubation schloss sich ein Waschschriff in je insges. 15 ml Waschlösung bei 4 °C bei 300 x g für 15 min in der Zentrifuge an. Der Überstand wurde weitestgehend ab- und das Pellet erneut in 200 µl Waschlösung aufgenommen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei Zimmertemperatur im Dunkeln mit sekundärem Antikörper (FITC@Mouse) (100 µl Lösung pro 200 µl Zellsuspension), der in einer 1:200 Verdünnung genutzt wurde.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein weiterer Waschschriff durchgeführt, um ungebundene Antikörper zu entfernen, an dessen Anschluss die Proben in 200 µl Waschlösung resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt wurden. Bis zur Messung, bei der ein Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ (BECTON DICKINSON) genutzt wurde, lagerten die Proben unter Lichtabschluss auf Eis.

2.2.5. Aufkonzentrierung des Antikörperüberstandes:

Um die Menge des zu fällenden Überstandes ohne Proteinverlust zu reduzieren, wurde vorab eine Druckfiltration in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) mit einer 30000 MW Filtermembran (YM30, Amicon) durchgeführt. Hierbei wurden 2 l Hybridoma-Überstand, die zuvor auf Monolayer der Typen I und II positiv getestet waren, auf 200 ml eingengt. Sowohl Retentat als auch Filtrat wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Das Retentat wurde 1:1 mit langsam eingetropfter 100% Ammoniumsulfatlösung unter langsamem Rühren auf Eis vermischt und über Nacht im Kühlraum abgedeckt bei geringer Geschwindigkeit gerührt.

Am Folgetag konnten die gefällten Proteine durch Zentrifugation (30 min bei 10000x g und 4 °C) abgetrennt und pelletiert werden. Dieses Proteinpellet wurde in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 aufgenommen und drei Tage im Kühlraum bei zweimal täglichem Pufferwechsel in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 dialysiert.

Anschließend wurde die Proteinlösung abzentrifugiert (15 min bei 10000x g und 4 °C), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6. Aufreinigung des Antikörpers #78:

Nach Reduzierung des Volumens mit anschließender Ammoniumsulfatfällung und Dialyse in 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 konnte das Dialysat mit Hilfe einer Protein-G-Säule (Hitrap Protein G, Pharma Biotech) von überschüssigen Proteinen befreit werden, da Protein G, abhängig vom pH-Wert, eine hohe Affinität zu Antikörpern (IgG) zeigt (BJÖRCK & KRONVALL 1984). Das Dialysat wurde zu je 1 ml auf die gereinigte Säule gegeben, die daraufhin 30 min auf Eis gelagert wurde, um eine gute Bindung zu gewährleisten. Nach mehrmaligem Waschen mit 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 bis alle ungebundenen Proteine entfernt waren, konnte durch einen pH-Shift mit 0,1 M Glycin-HCl pH 3,5 die Affinität der Säule so verändert werden, dass der nächste Waschschrift mit Na-Phosphatpuffer die gebundenen Proteine aus der Säule entfernte. Nach weiteren Waschsritten war die Säule wieder einsatzbereit für die nächste Beladung.

Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit einer Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD 1976, HEGEMER 2003, WIESLER 2003) durchgeführt und die Reinheit jeweils durch eine 12% SDS PAGE bei 50 V mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

Nach der Messung wurden die einzelnen Proben zusammengeführt und anschließend in 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 drei Tage lang bei täglichem Wechsel der Dialyseflüssigkeit dialysiert.

2.2.7. Herstellung der Lysate:

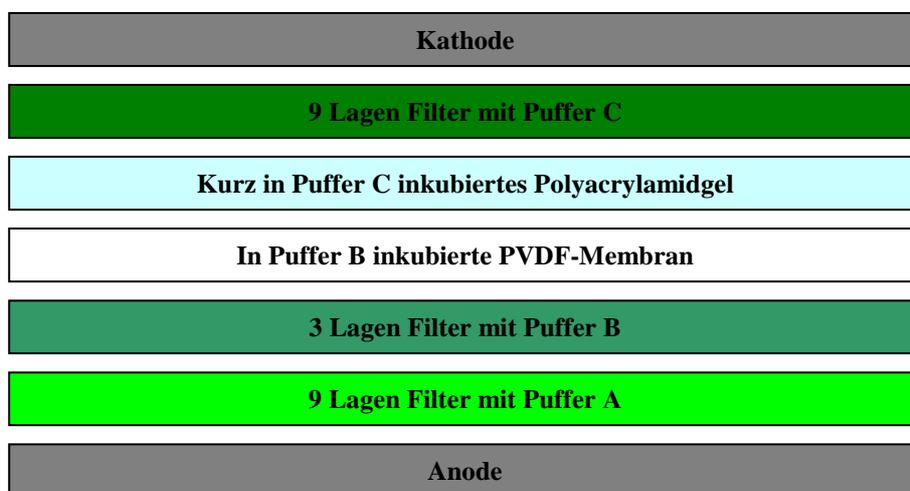
Für die Entnahme der Organe wurde die jeweilige *Manduca sexta* L5d2-3 auf Eis betäubt und unter eiskalter AC-Saline eröffnet. Nach der Probengewinnung wurden diese sofort eisgekühlt und anschließend bei -20 °C eingefroren. Hämocyten wurden wie unter 2.2.1.1. gewonnen, allerdings wurden diese nicht in Grace aufgenommen, sondern als mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer Improved) gezählt und anschließend abzentrifugiert. Die Zellen wurden so in einem „Crashmix“ (TBS, ProteaseInhibitor-Cocktail (Sigma, doppelte angegebene Konzentration), 8 mM EDTA) aufgenommen, dass eine Zellkonzentration von 3×10^7 erreicht wurde.

Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, eingefroren und nach Auftauen auf Eis mit einem Pistill mechanisch zerstört. Die gesammelten und gefrorenen Organproben wurden ebenfalls je nach entnommener Menge mit 200 bis 300 µl „Crashmix“ versetzt und mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben viermal einem Zyklus unterworfen, der eine viermalige, je 15 sekundige Sonifizierung mit folgendem Einfrieren und erneutem Auftauen beinhaltete. Im Abschluss wurden die Proben abzentrifugiert und der Überstand bis zur Verwendung tiefgekühlt gelagert. Die für einen Western-Blot vorgesehenen Proben wurden vor der Verwendung einer Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) unterzogen und so verdünnt, dass in jeder Probe die Proteinkonzentration entsprechend der Hämocytenprobe vorlag.

2.2.8. Westernblot:

Um in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mit einem Antikörper markieren zu können, wurden sie auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)- Membran transferiert (Millipore Immobilon P über Roth, Vorbereitung der Membranen nach Herstellerangaben; Transfer-Blot-Kammern von Chemie und Werkstoff Technik, Idstein).

Der Vorgang geschah nach dem Semidry-Verfahren (nach KYHSE-ANDERSEN 1984) nach folgendem Schema:



Die Größe der Membranen und Filter (Gel Blotting-Papier GB002, Schleicher & Schuell) wurde an das Gel angepaßt, geblottet wurde mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h.

Im Anschluß an diesen Vorgang wurde die den Marker führende Spur abgetrennt und einer Amidoschwarzfärbung (modifiziert nach KUNO & KIHARA 1967) unterzogen, während die restliche Membran in 5% Milch-TBS (Milch als handelsübliches, fettfreies

Magermilchpulver) 1 h blockiert wurde. Im Anschluss konnte der primäre Antikörper (#78) die Membran gut bedeckend aufgebracht und die Membran unter Schwenken bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert werden.

Am Folgetag schloss sich ein viermaliger, 15 minütiger Waschschrift mit Tween/BSA/TBS (0,05% Tween, 0,1% BSA) an, nach dessen Beendigung der sekundäre, an alkalische Phosphatase (ALP) gekoppelte Antikörper (Dianova, 1:10000) in 1% BSA/TBS die Membran bedeckend aufgebracht werden konnte. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut viermal gewaschen und anschließend 15 min in ALP-Entwicklungspuffer inkubiert, bevor die Enzymreaktion nach BLAKE *et al.* (1984) mit

5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) mit folgenden Änderungen (LESCH 2005) durchgeführt wurde:

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden in Dimethylsulfoxid und nicht in Dimethylformamid angesetzt und die Enzymreaktion wurde nach Sicht durch Waschen der PVDF-Membran mit MilliQ-Wasser oder Aqua deion. gestoppt.

2.2.9. RT-PCR:

Da der verwendete Antikörper alle drei Isoformen von *Manduca sexta* Annexin IX erkannte (LESCH 2005), war eine Untersuchung auf mRNA-Ebene (bzw. daraus hergestellter cDNA) notwendig, um eine mögliche Isoformverteilung auf Organebene zu untersuchen.

2.2.9.1. Entnahme und Vorbereitung der Organe für die RNA-Extraktion:

Manduca sexta L5d2-3 wurden auf Eis betäubt und unter eiskalter AC-Saline seitlich eröffnet. Nach Präparation der Organteile wurden diese durch sanftes Schwenken in AC-Saline von unerwünschten Hämocyten befreit, sofort in je 300 µl RNAlater (Ambion) verbracht und anschließend bei -20 °C gelagert.

Kurz vor der weiteren Verarbeitung wurden die Organteile aufgetaut und gewogen. Für die anschließend verwendeten Kits (Quiashredder™ und RNeasy® Mini Kit (50)) wurden höchstens je Probe 30 mg des jeweiligen Organs eingesetzt.

2.2.9.2. Gewinnung der Hämocyten für die RNA-Extraktion:

Manduca sexta bzw. *Acherontia atropos* L5d2-3 wurden auf Eis betäubt, in eiskalte AC-Saline geblutet und die Hämolymphe durch sanftes Schwenken mit der Saline vermenget. Anschließend wurde bei 300x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei weitere Waschschrte in eiskalter AC-Saline mit anschließender Zentrifugation. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in genau 1 ml AC-Saline aufgenommen und die Zelltiter in einer Neubauer-Improved-Zählkammer bestimmt. Es musste sichergestellt werden, dass die Anzahl der Zellen das im Kit gesetzte Maximum nicht überschritt. Nötigenfalls konnte die Zellsuspension aliquotiert werden.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde des Zellpellet in 300 µl RNAlater aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Direkt vor der Extraktion wurden die frisch aufgetauten Zellen bei 500x g herunter zentrifugiert und das RNAlater vollständig vom Pellet entfernt.

2.2.9.3. Gewinnung der Hämocyten parasitierter Tiere:

Manduca sexta Larven (L4d2) wurden wie unter 2.1.7. angegeben von *Cotesia congregata* parasitiert und bis zum Tag 8 der Parasitierung (WIESLER 2003) normal gehältert. Eine weitere Larve konnte nach Ausbrechen und Verpuppen der Parasitoide als Versuchstier einbezogen werden.

Die Hämocyten der von *Cotesia* gestochenen Larven wurden wie unter 2.2.6.2. gewonnen. Zusätzlich wurde auf ein Vorhandensein von Teratocyten als Indiz für eine erfolgreiche Parasitierung überprüft (WIESLER 2003). Diesbezüglich negative Proben wurden verworfen. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei Hämocyten unparasitierter Tiere.

2.2.9.4. Gewinnung der Eier für die RNA-Extraktion:

Eine frische Tabakpflanze wurde in den Flugkäfig von *Manduca sexta* verbracht und nach einigen Stunden wieder entfernt. Die Eier wurden abgesammelt und getrennt von der Zucht in einem Hälterungsschälchen im Brutschrank inkubiert. Je fünf Eier wurden, beginnend am Legetag, im Abstand vom 24 h in einem beschrifteten Gefäß bei -20 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Auf diese Weise wurden genau datierte Proben von d0 bis d3 gezogen.

2.2.9.5. Homogenisierung der Organe und Extraktion der RNA:

Die Organteile bzw. das Zellpellet oder die Eier wurden unter Verwendung von Flüssigstickstoff mit einem Pistill zerkleinert und anschließend nach den Anweisungen des Handbuchs des RNeasy® Mini Kit (50) für eine Extraktion aus tierischem Gewebe weiterbehandelt. Die gewonnene RNA lagerte bis zur Verwendung bei -20 °C.

2.2.9.6. Primerdesingn:

Die Primer für die folgende RT-PCR wurden mit Hilfe des Freeware-Computerprogrammes FastPRC (Version 3.5.47) nach folgenden Überlegungen, denen die von Dr. Christine Lesch veröffentlichten Sequenzen (LESCH 2005) zu Grunde lagen, entwickelt:

Da die drei mRNA-Isoformen neben dem gemeinsamen Teil noch drei unterschiedlich lange Abschnitte besitzen, die jeweils durch alternatives Spleißen ein anderes Stop-Codon präsentieren (Abb.2.10), sollte es möglich sein, bei geschickter Lage der Primer die Isoformen anhand der Länge zu unterscheiden. Außerdem bestand durch das vorgeschaltete Intron die Möglichkeit, cDNA von amplifizierter, ungewollt eingetragener genomischer DNA ebenfalls über die Länge zu differenzieren. Daher musste der (ausgehend von Abb. 2.10) linke Primer so gewählt werden, dass er im gemeinsamen Teil vor dem Intron zu liegen kam, während der (ausgehend von Abb. 2.10) rechte in dem allen Isoformen gemeinsamen, aber nur für diese typischen C-Teil platziert wurde. Diese Angaben konnten über einen im FASTA-Format der Prä-mRNA-Sequenz von *Manduca sexta* Annexin IX eingefügten Eintrag den Berechnungen von Fast-PCR beigefügt werden, so dass Primer in genau diesen Bereichen (879-979 und 2481-2541 bp) errechnet wurden.

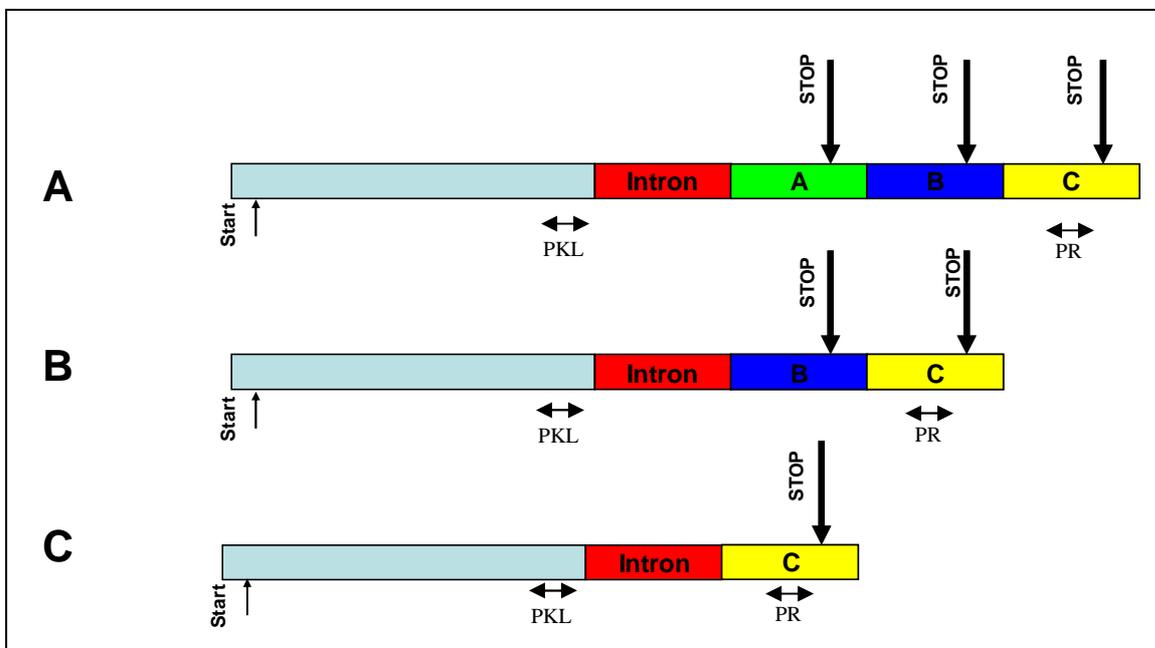


Abb 2.10: Aufbau der mRNA von *Manduca sexta* Annexin IX. Das den gemeinsamen Teil (hellblau) beendende Intron und die Lage der verwendeten Primer (PKL und PR) wurden zur Orientierung eingefügt. Es geht beim Splicingvorgang verloren. Eingezeichnet sind die ungefähre Lage des Start-Codons sowie die der jeweiligen Stop-Codons, von denen für jeweilige Isoform nur das in Leserichtung erste von Bedeutung ist. Auffällig sind die unterschiedlichen Längen der Isoformen, da z.B. an der A-Form noch die für B und C codierenden Teile anhängen. Diese werden allerdings bei der A-Form nicht translatiert, da die Translation beim ersten Stop-Codon endet.

2.2.9.7. Verwendete Primer:

Von den diversen Primerpaaren, die mit den Angaben von 2.2.9.6 errechnet und vorgeschlagen wurden, wurden folgende ausgewählt, die somit keine eigenen Überschneidungen aufweisen sollten:

Primer PKL (Primer Kurz Links), mit Lage kurz vor dem Intron

5'-tcatcagaatcgtggtcagc

Primer PR (Primer Rechts) mit Lage im hinteren c-Bereich.

5'-agtataatgcgtatgcgtccctacg

2.2.9.8. Erwartete Bandengrößen:

Mit den von Dr. Christine Lesch (2005) veröffentlichten Sequenzen als Grundlage ergaben sich folgende erwartete Fragmentgrößen (ohne Intron):

A: 1064 bp

B: 665 bp

C: 315 bp

2.2.9.9. Durchführung der RT-PCR:

Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kit von Quiagen® unter Verwendung eines Cyclone 25 (Peqlab) bzw. eines Personal Cycler (Biomtra) durchgeführt. Hierbei wurde nach Handbuch mit folgenden Abwandlungen gearbeitet:

-Die Primer wurden nicht, wie angegeben auf 10 pmol/µl verdünnt, sondern auf 20 pmol/µl, um das Volumen der Primerlösung „für alle Fälle“ halbieren zu können.

-Es wurde Ribonuclease Inhibitor (Fermentas) mit 10ul/Probe eingesetzt

-es wurden generell 10 µl Template eingesetzt, unabhängig von der RNA-Konzentration, da der Enzym-Mix über einen weiten Spielraum zu arbeiten vermag. So wurde zeitsparend sichergestellt, dass möglichst wenig extrahierte RNA verloren ging oder Kontaminationen ausgesetzt werden konnte.

-es wurde mit Q-Solution gearbeitet.

Für den Ansatz mit PKL und PR wurde folgendes Programm gewählt:

-2 min 50 °C (um sicher zu stellen, dass die benötigte Temperatur erreicht wurde)

-Einsatz der Proben in den Cycler

-30 min 50 (Reverse Transkription)

-15 min 95 °C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Polymerase)

-35 Zyklen: -1 min 94 °C (Denaturierung)

-1 min 51,6 °C (Annealing)

-1 min 72 °C (Extension)

-10 min 72 °C (Final Extension)

-4 °C bis Entnahme aus dem Cycler.

Die Proben wurden mit Hilfe eines Fotometers (Smart Spec 3000, Biorad) auf ihren DNA-Gehalt überprüft, eine entsprechende Menge 1:5 mit 5x Probenpuffer verdünnt und elektrophoretisch in 1% Agarose/TAE bei 80 V bis 100 V aufgetrennt. Der Vorgang wurde beobachtet und nach Sicht beendet. Die restlichen Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Gel wurde in Ethidiumbromid (5 µg/ml) für 30 min gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Die fotografische Aufnahme erfolgte mit einer Sofortbild-Kamera (Gelcam, Polaroid).

2.2.9.10. Vorbereitung der DNA für die Sequenzierung:

Das in Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell rasch vorgeschritten, anschließend bei Weißlicht in die Bandenblöckchen aufgeteilt und diese gewogen. Die weitere Behandlung erfolgte nach Handbuch der verwendeten Sample-Kits (Ultra Clean 15 DNA Purification Kit, Dianova und Easy Pure, Biozym). Die Elution geschah mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5. Die erhaltene DNA-Konzentration wurde fotometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Sequenzierungen kamen die vom Anbieter der Sequenzierungen (SEQLAB) geforderten Mengen DNA zum Einsatz. Hierfür wurde die notwendige Menge DNA-Probe mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 verdünnt. Verwendet wurden die Optionen HotShot (*Manduca sexta*) und Advantage Read (*Acherontia atropos*).

2.2.10. Angewendete computergestützte Programme zur Vorhersage von Splicing-Sites, Translation und BLAST:

Verwendet wurden die frei zugänglichen Programme der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (MARCHLER-BAUER *et al.* 2002, MARCHLER-BAUER *et al.* 2003, MARCHLER-BAUER & BRYANT 2004, MARCHLER-BAUER *et al.* 2005) und der Expasy-Tools (<http://www.expasy.org/tools/>) (WILKINS *et al.* 1997, GASTEIGER *et al.* 2005).

Weiterhin kam die Splicing-site Berechnung des Berkeley Drosophila Genome Projects (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (REESE & EECKMANN 1996, REESE *et al.* 1997) zur Anwendung.

2.3. Verwendete Lösungen:

Antikoagulanzt-Saline (AC-Saline)

(Mengenangaben bezogen auf 1 Liter MilliQ-H₂O)

NaCl	0,23 g
KCl	3,00 g
Saccharose	50,0 g
Polyvinylpyrolidone	1,00 g
EDTA Dinatriumsalz, Dihydrat	3,00 g
Citronensäure, Monohydrat	2,00 g
<i>tri</i> -Natriumcitrat, Dihydrat	7,94 g
PIPES	0,50 g

pH 6,0 mit NaOH / KOH 1:1 einstellen und steril filtrieren

Ca/Mg-freie Saline (MS⁻)

(Mengenangaben bezogen auf 1 Liter MilliQ-H₂O)

NaCl	0,23 g
KCl	3,00 g
Saccharose	50,0 g
Polyvinylpyrolidone	1,00 g
PIPES	0,50 g

pH 6,5 mit NaOH / KOH 1:1 einstellen, steril filtrieren und im Kühlschrank lagern

10 x TBS (*Tris-buffered saline*)

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	2,42 g
NaCl	29,2 g

auf pH 7,5 mit HCl einstellen und mit MilliQ-H₂O auf 100 ml auffüllen; zur Verwendung 1:10 mit MilliQ verdünnen.

X% BSA-TBS (zur Antikörperverdünnung und -inkubation)

BSA	X g
TBS	ad 100 ml

0,5% Triton-X-100 in 3% BSA-TBS

Triton X-100	0,50 ml
3 % BSA-TBS	100 ml

4% Paraformaldehyd-Fixierlösung als Fixans

Paraformaldehyd	4,00 g
Ca/Mg-freie Salinead	100 ml

Lösung unter Rühren auf 70 °C erwärmen (unter dem Abzug!), abkühlen lassen, filtrieren und im Kühlschrank lagern

DABCO-Lösung:

Glycerin	30,0 ml
TBS	10,0 ml
DABCO	1,00 g

RPMI 1640 Hybridoma-Medium

Pulver von GIBCO für 2 Liter Zellkulturmedium wurde in 1,8 Litern entionisierten Wassers gelöst.

Zu dieser Lösung wurden hinzu gegeben:

HEPES 1M (283,3 g/l)	20 ml
PEST 1000 µg/ml	20 ml
NaHCO ₃ 7,5%	20 ml
Mercaptoethanol 0,1 m (78 ml /10 ml)	1 ml

Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 6,9 – 7,0 wurde das Medium auf 1960 ml aufgefüllt und steril filtriert. Das in 490-ml-Aliquots aufgeteilte Medium wurde im Kühlraum bei 10 °C gelagert und vor der Verwendung mit 10 ml Natriumpyruvat (0,1 M; 1,1 g / 100 ml) pro Aliquot versetzt.

Einfriermedium für Hybridoma-Zellen

Wachstumsmedium	50%
FBS (Gibco, Karlsruhe)	40%
DMSO	10%

Inkubationsmedium für frisch aufgetaute Hybridoma-Zellen

RPMI-Medium mit 10% FBS und 10% BM-Condimed® H1 (BOEHRINGER MANNHEIM)

Inkubationsmedium für die Routine

RPMI-Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 5% FBS

Insektenzellmedium nach Grace (Serva)

Dieses Medium wird in Pulverform geliefert und muss entsprechend dem Beipackzettel in entionisiertem Wasser gelöst, anschließend steril filtriert und im Kühlschrank gelagert werden.

GV1-Medium für Insektenzellen

Ein Paket Pulver für einen Liter Grace-Insektenzellmedium wurde in 600 ml entionisiertem Wasser bei RT gelöst. Dazu wurden gegeben:

Alanin	200 mg
L-Leucin	75 mg
L-Methionin	50 mg
L-Tyrosin	50 mg

Die Aminosäuren wurden ebenfalls bei RT in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 20 ml Yeastolate und 20 ml Lactalbumin-Hydrolysat-Lösung wurde mit MilliQ-H₂O auf 800 ml aufgefüllt und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 6,2 eingestellt. Danach wurde das Volumen auf 900 ml erhöht und die Lösung steril filtriert.

Bei einer Temperatur von 4 °C ist die Aufbewahrung des Mediums für drei bis vier Monate möglich. Vor dem Gebrauch wurden 90 ml des Insektenzellkultur-Mediums mit 10 ml Hitzeinaktiviertem FBS ergänzt.

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brilliant Blue G 250	0,1 g
Ethanol (99,8%)	50 ml
o-Phosphorsäure (85%)	100 ml
Milli-Q-H ₂ O	ad 1000 ml

Das Reagenz wurde filtriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Acrylamidstammlösung

Acrylamid	30,0 g
Bis-Acrylamid	0,8 g
Milli-Q-H ₂ O	ad 100 ml

10%ige Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

Material und Methoden

Ammoniumperoxodisulfat	1,0 g
Milli-Q-H ₂ O	ad 10 ml

Trenngelpuffer (pH 8,8 / 0,75 M)

Tris (Base)	38,5 g
Tris (Säure)	9,3 g
SDS	1,0 g
Milli-Q-H ₂ O	500 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8 / 0,33 M)

Tris (Base)	19,7 g
SDS	1,0 g
Milli-Q-H ₂ O	500 ml

Probenpuffer (5x)

Sammelgelpuffer	8 ml
Glycerin	2 ml
Mercaptoethanol	2,5 ml
Bromphenolblau (2 %)	10 µl
SDS	1,0 g

Elektrodenpuffer (10x)

Tris (Base)	242,4 g
Glycin	576,0 g
SDS (Natriumdodecylsulfat)	40,0 g
MilliQ-H ₂ O	4000 ml

Zur Benutzung 1:10 (v / v) mit MilliQH₂O verdünnen

Lösungen für die Coomassie-Färbung**Fixier- und Färbelösung**

SERVA Blau R	0,88 g
Essigsäure (100 %)	46 ml
Ethanol (99,8 %)	227 ml
MilliQ-H ₂ O	227 ml

Entfärberlösung

Ethanol (99,8 %)	300 ml
Essigsäure (100 %)	100 ml
MilliQ-H ₂ O	600 ml

Blot-Transfer-Puffer A

Tris (Base)	36,34 g
MilliQ-H ₂ O	ad 1000 ml

Blot-Transfer-Puffer B

Tris (Base)	3,03 g
Milli-Q-H ₂ O ad	1000 ml

Blot-Transfer-Puffer C (Stets frisch ansetzen)

Tris (Base)	3,03 g
6-Amino-n-Hexansäure	5,25 g
Milli-Q-H ₂ O	ad 1000 ml

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz 10 B	0,1 g
Isopropanol (99 % v/v)	25 ml
Essigsäure (99 % v/v)	10 ml
Milli-Q-H ₂ O	ad 100 ml

Amidoschwarz-Entfärber

Isopropanol (99 % v/v)	25 ml
Essigsäure (99 % v/v)	10 ml
Milli-Q-H ₂ O	ad 100 ml

Blot-Blockierlösung

Magermilchpulver	5 g
TBS	100 ml

Blot-Waschlösung

Tween	500 µl
BSA	1 g
TBS	1000 ml

Alkalische Phosphatase (ALP)-Entwicklungspuffer

NaCl	5,84 g
Tris (Base)	12,11 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,02 g
Milli-Q-H ₂ O	ad 1000 ml

BCIP- und NBT-Lösung

BCIP oder NBT	0,5 g
DMSO (Dimethylsulfoxid)	10 ml

ALP-Reaktionslösung

BCIP (5-Brom-4-chloindoxyphosphat)	33 µl
NBT (Nitroblau-tetrazoliumchlorid)	66 µl
ALP-Entwicklungspuffer	ad 10 ml

3. Ergebnisse:

3.1. Hämocyten diverser Lepidopteren im Monolayer:

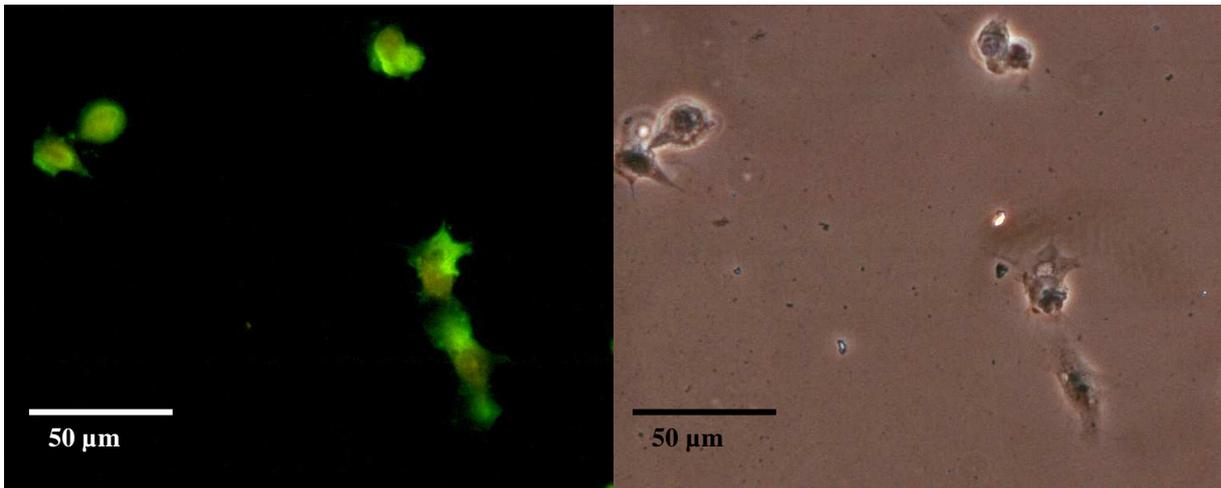
Eine Teilaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Vorhandensein eines Antigens zu Antikörper #78 in diversen Lepidopteren zu überprüfen. Hierfür wurden Hämocyten-Monolayer unterschiedlicher Lepidopteren-Arten immunhistochemisch behandelt.

3.1.1. *Manduca sexta*:

Hämocyten von *Manduca sexta* zeigten im Monolayer nach Durchführung der Immunhistochemie mit Antikörper #78 eine deutliche Fluoreszenzmarkierung (Abb. 3.1), die besonders bei Plasmacyten eine unregelmässige Verteilung zeigte (Abb. 3.2).

3.1.2. *Acherontia atropos*:

Inkubation der Hämocytenmonolayer mit Antikörper #78 und folgend mit FITC-konjugiertem IgG-Anti-Mouse-Antikörper bewirkte eine deutliche Markierung der Zellen (Abb. 3.3), die besonders bei Plasmacyten eine unregelmässige und fleckige Verteilung zeigte (Abb. 3.4).



▲ **Abb. 3.1a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyten im Monolayer Typ II, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung

▲ ► **Abb. 3.1b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.1.a

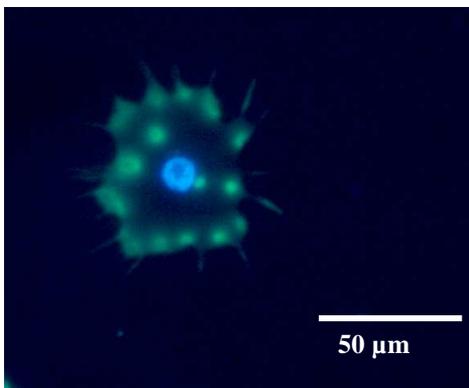
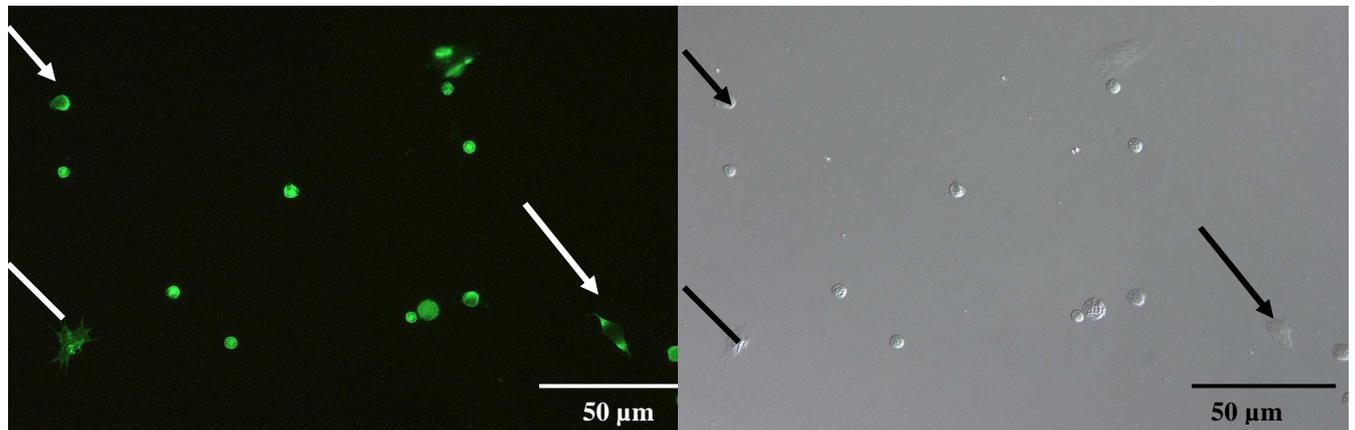


Abb. 3.2: *Manduca sexta*, L5d2-3, Plasmatocyt im Monolayer Typ II, Antikörper #78, DAPI-Färbung und FITC@Mouse bei UV-Anregung.



▲ **Abb. 3.3a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten als Monolayer Typ II, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung. Zellen mit eher zonierte Verteilung der Fluoreszenz (Pfeil), unregelmäßige Fleckenbildung (Linie)

▲ ► **Abb. 3.3b:** *Acherontia atropos*, Hämocyten als Monolayer Typ II, Phasenkontrast zu Abb. 3.3a.

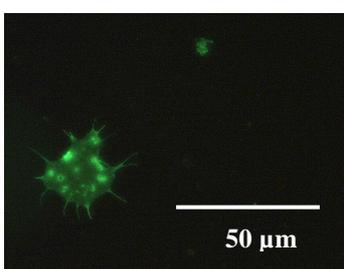


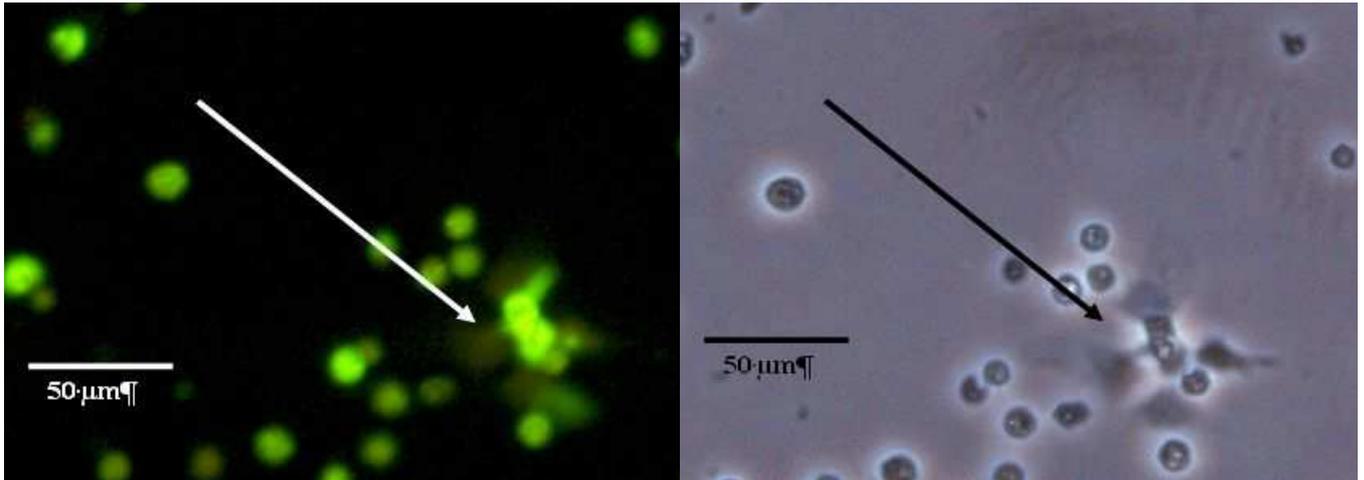
Abb. 3.4: *Acherontia atropos*, Plasmatocyt, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung. Plasmatocyt mit fleckartig verteilter Antikörpermarkierung.

3.1.3. *Bombyx mori*:

Die Markierung der Hämocyten des Seidenspinners auf Monolayern mit Antikörper #78 (und FITC-konjugiertem IGg-Anti-Mouse-Antikörper) fiel deutlich aus und zeigte vor allem bei den gespreiteten Plasmacyten ein fleckartig begrenztes Auftreten der Fluoreszenz.(Abb 3.5).

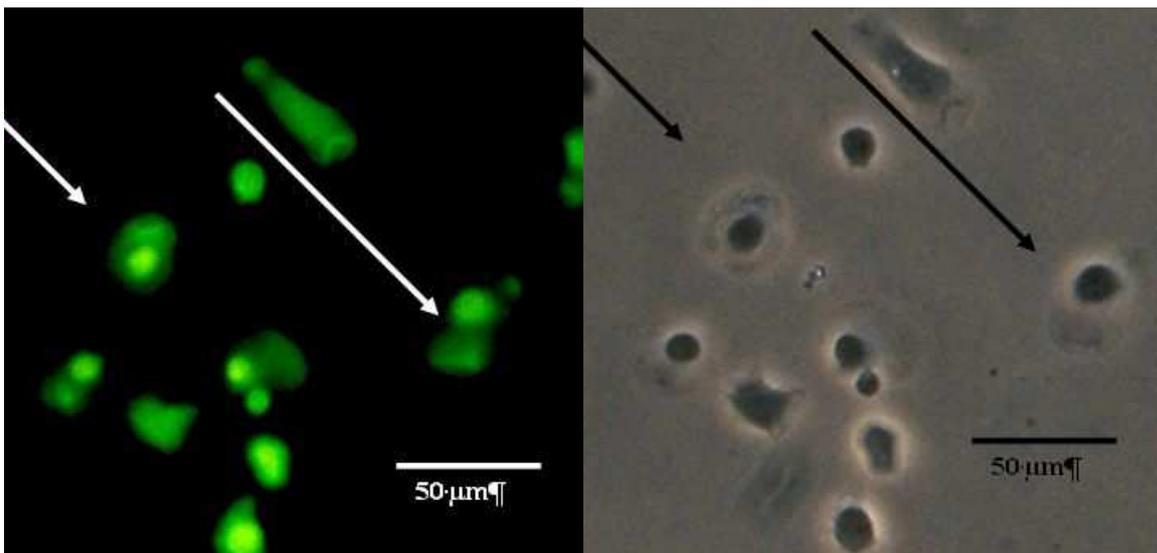
3.1.4. *Hyalophora cecropia*:

Als Monolayer nach Markierung mit Antikörper #78 (und FITC-konjugiertem IGg-Anti-Mouse-Antikörper) zeigten die meisten Hämocyten von *Hyalophora cecropia* eine relativ gleichmäßige Fluoreszenz; einige Plasmacyten allerdings wiesen eine mehr oder weniger starke Zonierung auf (Abb. 3.6).



▲ **Abb. 3.5a:** *Bombyx mori*, Hämocyten als Monolayer Typ I, 200x Vergrößerung, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung. Einige Plasmatocyten zeigen eine ungleichmäßige Verteilung (Pfeil).

▲ ► **Abb. 3.5b:** *Bombyx mori*, Hämocyten als Monolayer Typ I, Phasenkontrast zu Abb. 3.5a; Lage der in Abb.3.5a hervorgehobenen Plasmatocyte (Pfeil)



▲ **Abb. 3.6a:** *Hyalophora cecropia*, Hämocyten als Monolayer Typ I, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung, einige Plasmatocyten zeigen eine Zonierung stärker und schwächer markierter Bereiche (Pfeil).

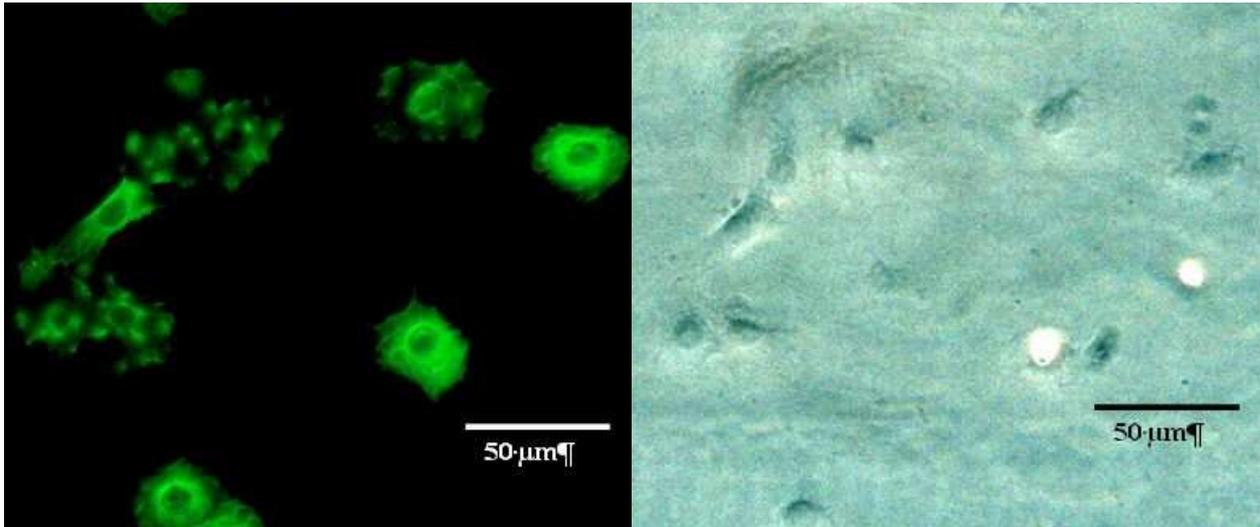
▲ ► **Abb. 3.6b:** *Hyalophora cecropia*, Hämocyten als Monolayer. Phasenkontrast.zu Abb.3.6a)

3.1.5. *Actias artemis*:

Die Hämocyten von *Actias artemis* zeigten nach Markierung mit Antikörper #78 (und anschließender Inkubation mit FITC-konjugiertem IGg-Anti-Mouse-Antikörper) unter UV-Einwirkung eine deutliche Fluoreszenz. Neben großflächiger Markierung zeigte sich auch bei einigen Plasmacyten eine auf kleinere Bereiche konzentrierte und fleckartig erscheinende Fluoreszenz (Abb. 3.7).

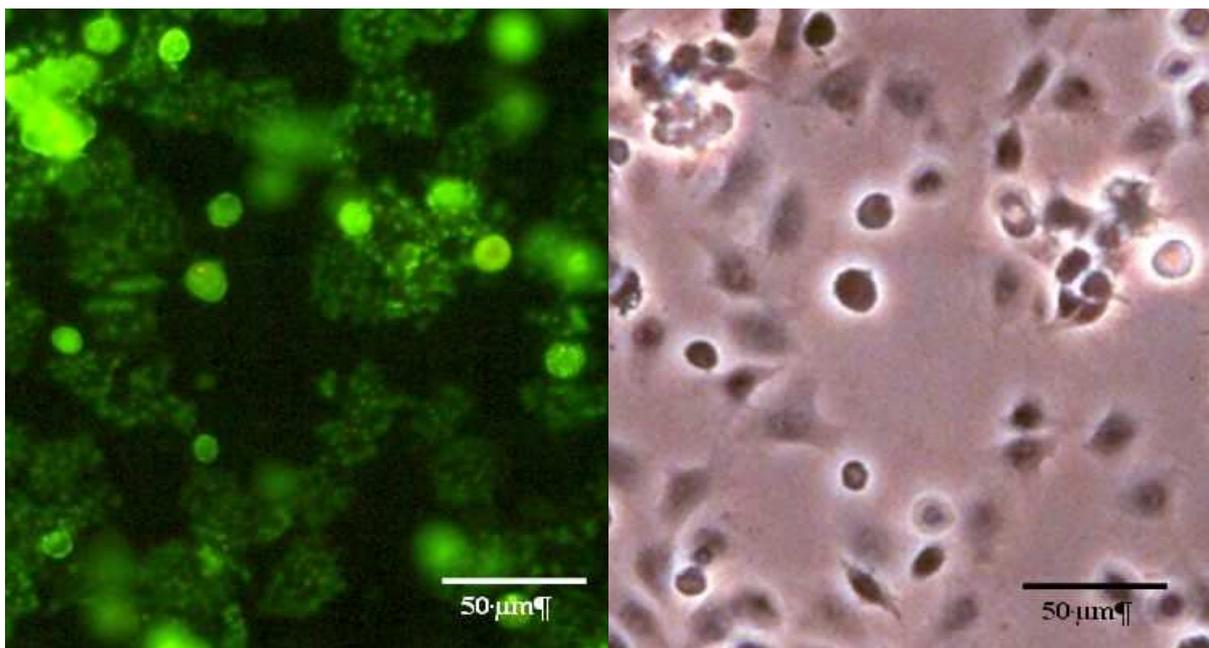
3.1.5. *Galleria mellonella*:

Hämocyten von *Galleria mellonella* zeigten im Monolayer nach Durchführung der Antikörpermarkierung mit Antikörper #78 eine deutliche Fluoreszenz, wobei vor allem die deutlich gespreiteten Plasmacyten im Gegensatz zu den übrigen Zelltypen mit eher flächiger Markierung eine punkartige Verteilung der Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 3.8).



▲ **Abb. 3.7a:** *Actias artemis*, Hämocyten als Monolayer Typ I, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung. Einige Plasmatozyten zeigen eine deutlich fleckartige Verteilung der Antikörpermarkierung, während andere eher flächig markiert sind.

▲ ► **Abb. 3.7b:** *Actias artemis*, Hämocyten als Monolayer Typ I, Phasenkontrast zu Abb. 3.7a



▲ **Abb. 3.8a:** *Galleria mellonella*, Hämocyten als Monolayer Typ I, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung. gespreitete Plasmatozyten zeigen punktförmige Verteilung der Fluoreszenzmarkierung.

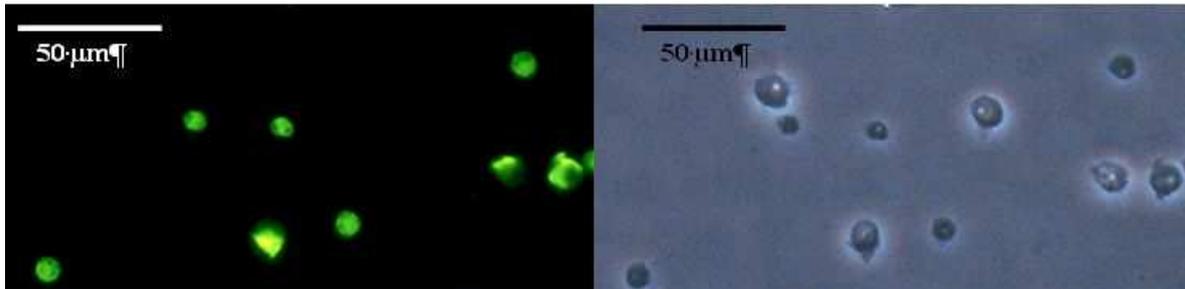
▲ ► **Abb. 3.8b:** *Galleria mellonella*, Hämocyten als Monolayer Typ I, Phasenkontrast zu Abb. 3.8a

3.2. Monolayer im Kurzzeitintervall:

Um nähere Einblicke in die Funktion von Annexin IX zu erhalten, wurden erneut Hämocytenmonolayer eingesetzt, um eine mögliche Veränderung der durch Antikörper #78 ermöglichten Markierung über die Zeit zu untersuchen.

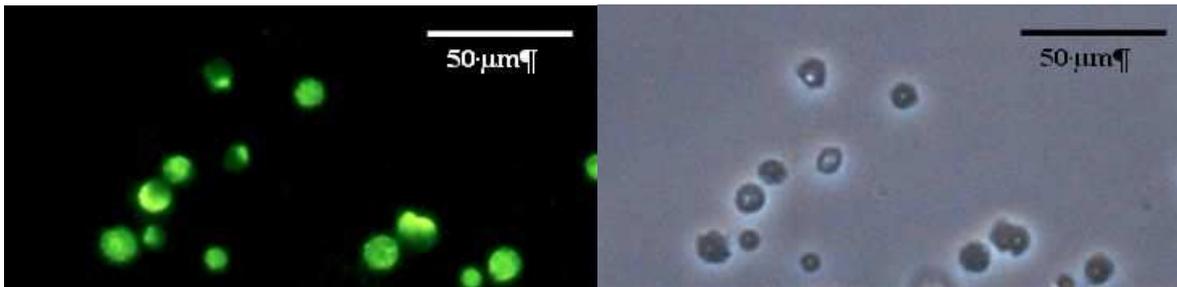
3.2.1. Monolayer (Typ I) *Manduca sexta* ein bis zehn Minuten:

Bereits nach einer Minute Inkubationsdauer vor der Fixierung wurde sichtbar, dass sich die in AC-Saline gewaschenen Hämocyten von *Manduca sexta* auf dem Objektträger festgesetzt hatten. Die zu diesem Zeitpunkt noch relativ runden Zellen zeigten bei einigen Proben dieser Zeitstufe bereits Ansätze des Spreitens. Die Markierung mit Antikörper #78 ergab bei den meisten der runden Zellen relativ gleichmäßig die Zelloberfläche bedeckende fluoreszierende Flächen, während einige Zellen fleckartige Zonen stärkerer Fluoreszenz aufwiesen. (Abb. 3.9 bis 3.18). Bei fortschreitender Inkubationsdauer vor der Fixierung traten diese abgegrenzten Markierungen deutlicher hervor, während zeitgleich vor allem bei den Plasmatocten eine immer stärkere Ausbildung von Pseudopodien zu beobachten war (Abb 3.9 bis Abb.3.18). Erkennbar wurde auch, dass sich bei einigen Zellen diese Markierung bis in die Pseudopodien erstreckte (Abb 3.14). Es traten einseitig liegende, bandartige Markierungen neben solchen auf, die die Zelle hufeisenförmig auf drei Seiten einschlossen und jenen, die sich als deutlich begrenzte Bänder gegenüber lagen. Auf diese Weise veränderte sich das Gesamtbild der Zellpopulation von einer relativ homogenen Erscheinung mit hauptsächlich runden und gleichmäßig fluoreszierenden Zellen (Abb. 3.9) zu einer heterogenen Population, deren Zellen sowohl gleichmäßig bzw. halbseitig fluoreszierende Individuen als auch solche mit deutlich abgegrenzten Markierungen aufwiesen (Abb. 3.18). Hierbei ist zu beachten, dass die runden, gleichmäßig markierten Zellen in allen Zeitschritten von ein bis zehn Minuten auftraten, während sich die bandartigen Markierungsmuster sich erst im Laufe der Zeit auftraten.



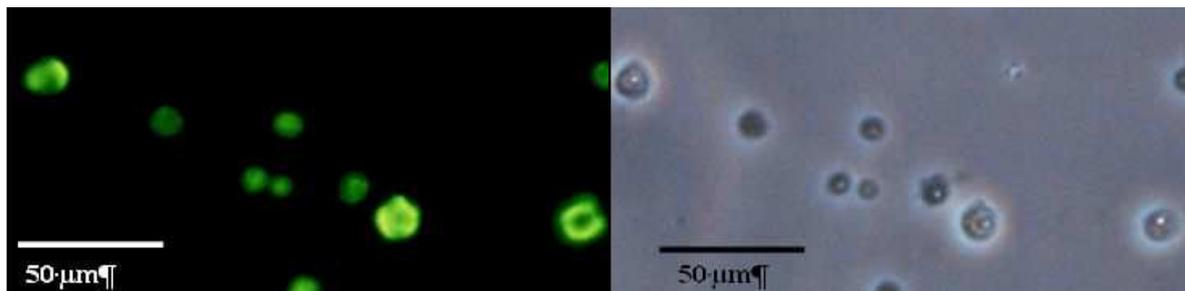
▲ **Abb. 3.9a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 1 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.9b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.9a.



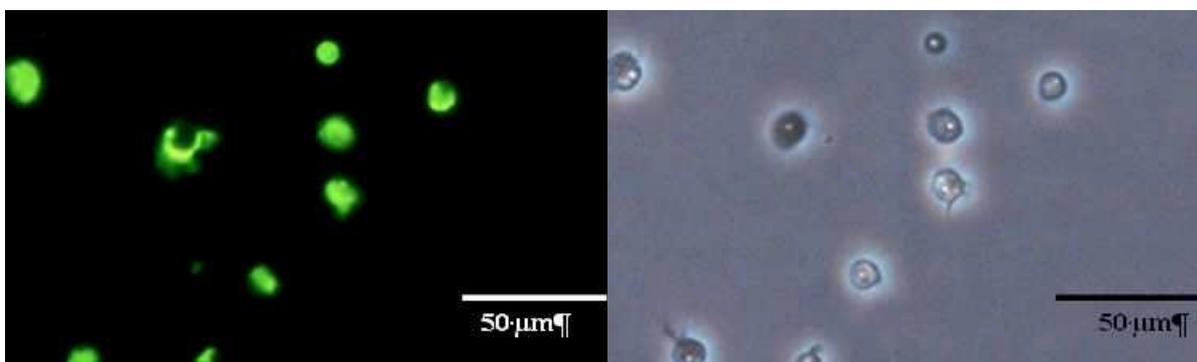
▲ **Abb. 3.10a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 2 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.10b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.10a.



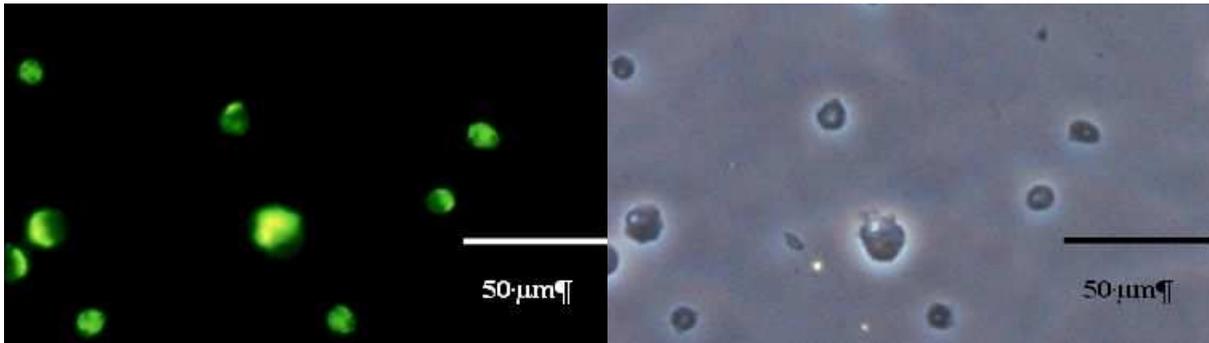
▲ **Abb. 3.11a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 3 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.11b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.11a.



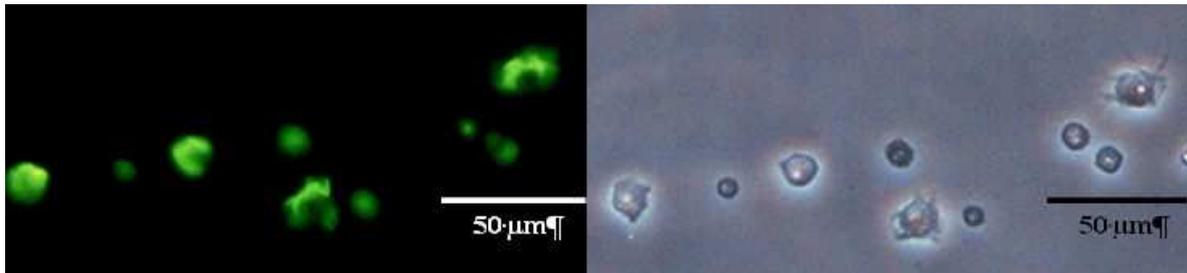
▲ **Abb. 3.12a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 4 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.12b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.12a.



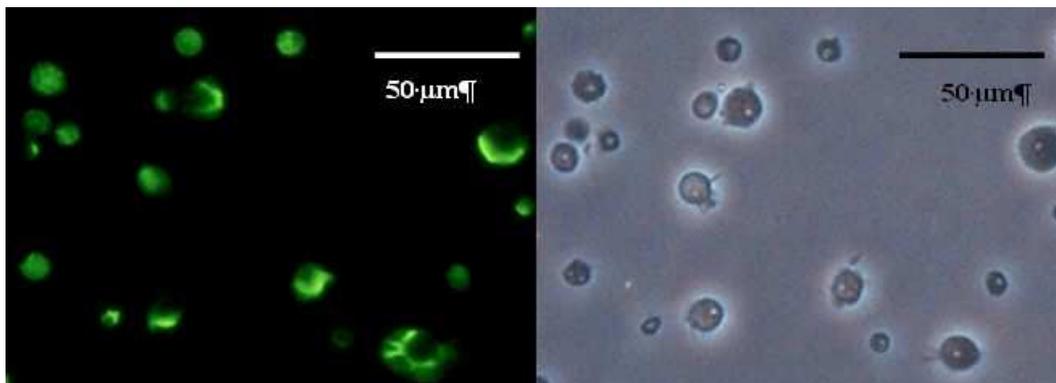
▲ **Abb. 3.13a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 5 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.13b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.13a.



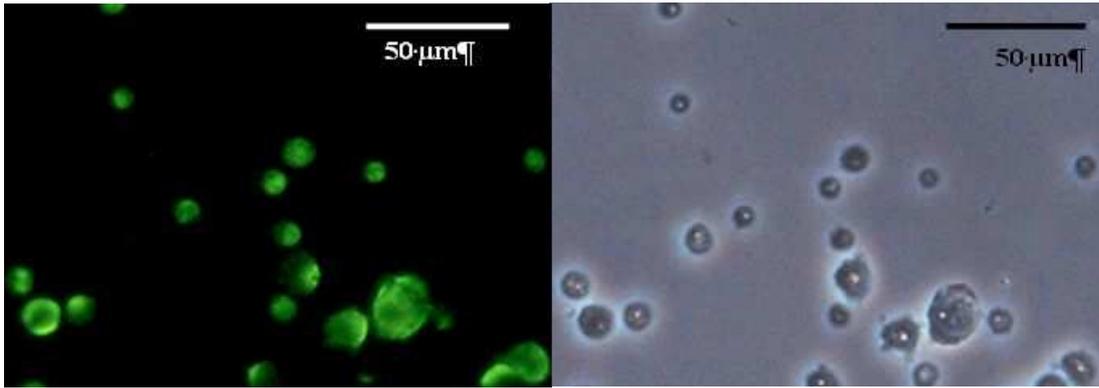
▲ **Abb. 3.14a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 6 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.14b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.14a.



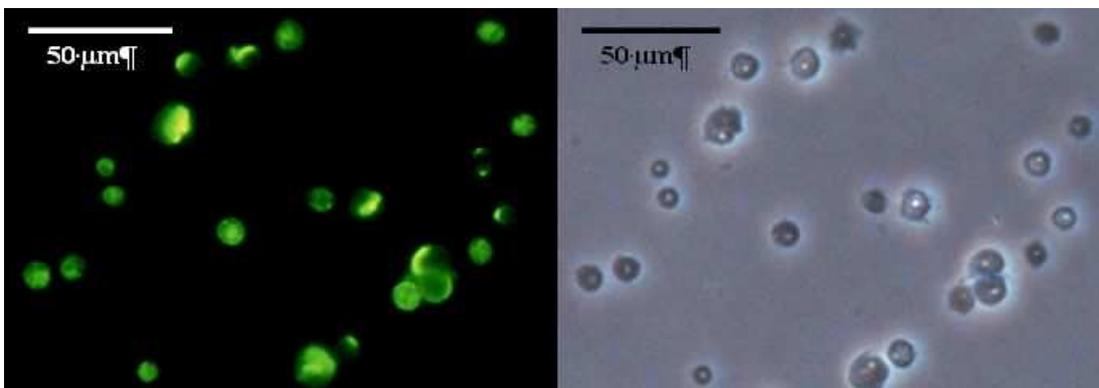
▲ **Abb. 3.15a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 7 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.15b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.15a.



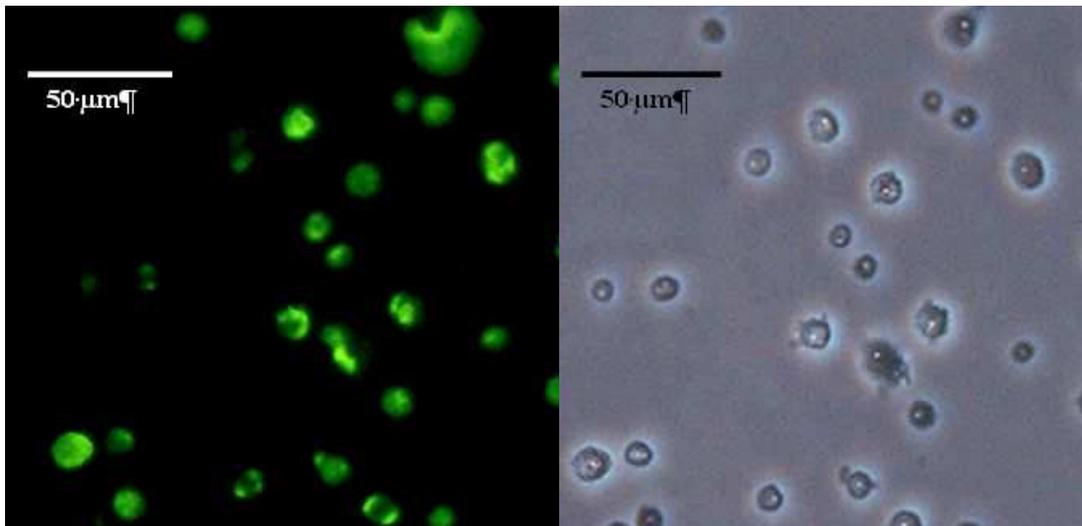
▲ **Abb. 3.16a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 8 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.16b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.16a.



▲ **Abb. 3.17a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 9 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.17b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.17a.

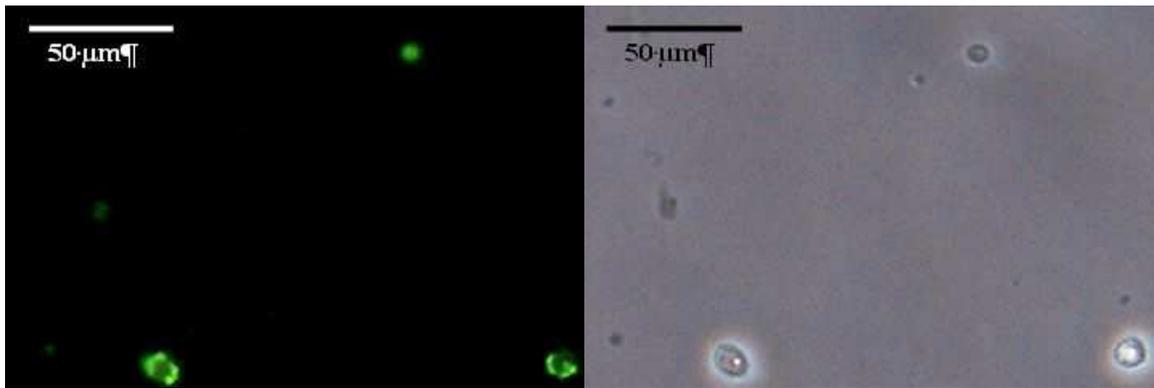


▲ **Abb. 3.18a:** *Manduca sexta* L5 d2-3 Hämocyten in Monolayer Typ I mit 10 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse bei UV-Anregung:

▲ ► **Abb. 3.18b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.18a.

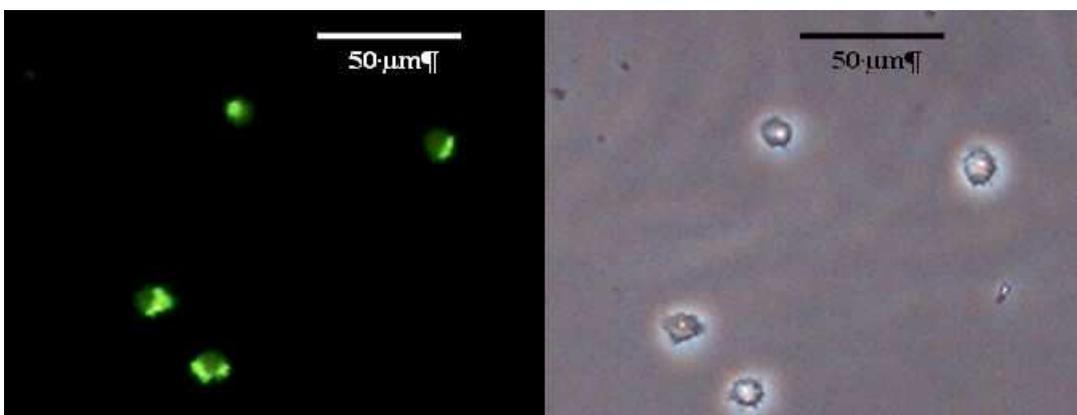
3.2.2. Monolayer (Typ II) *Manduca sexta* ein bis zehn Minuten:

Bereits innerhalb der ersten Minuten nach Aufbringen auf den Objektträger war bei einigen der ohne AC-Saline gewonnenen Zellen eine deutliche Spreitung zu erkennen. Die Zellen dieser Zeitstufe wiesen eine ungleichmäßige, band- oder fleckförmige Fluoreszenzmarkierung mit Antikörper #78 auf, die nicht den gesamten Zellkörper bedeckte (Abb. 3.19). Im Laufe der Zeitstufen nahmen diese Markierungen weiter zu, so dass sich in den späteren Abschnitten hufeisenförmige, den Zellkörper auf drei Seiten umschließende Fluoreszenzen zeigten (Abb. 3.19 bis Abb. 3.28). Weiterhin erstreckten sich diese markierten Bereiche bei vielen Zellen der späteren Abschnitte bis in die Pseudopodien. Dies führte bei einigen Hämocyten zu einer Markierung, bei der ein fluoreszierender Pseudopodienbereich einen schwach markierten Zentralbereich so umgab, dass der Vergleich mit einem Spiegelei eine prägnante Beschreibung des Zellhabitus stellte (Abb. 3.21 bis 3.28). Insgesamt betrachtet, zeigt die große Mehrheit der Zellpopulationen eine ungleichmäßig markierte Zelloberfläche und Pseudopodienbildung. Nur wenige Zellen wiesen eine gleichmäßig markierte Zelloberfläche auf.



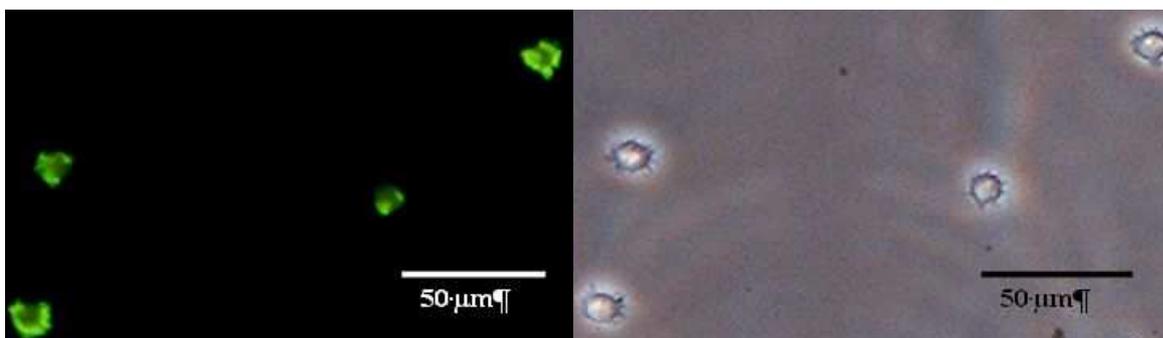
▲ **Abb. 3.19a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (1 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb 3.19b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.19a



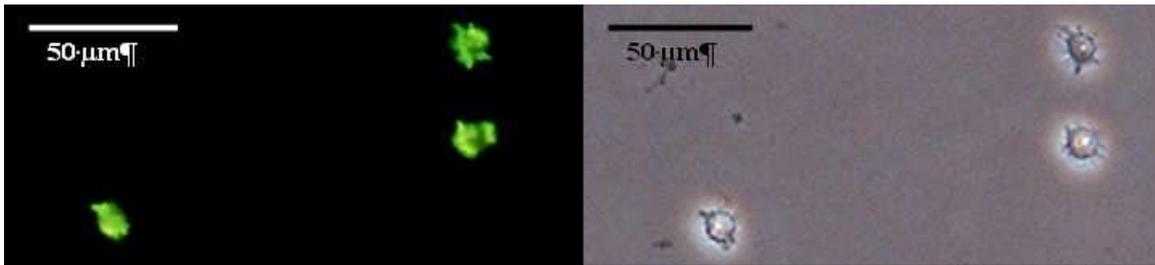
▲ **Abb. 3.20a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (2 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb 3.20b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.20a



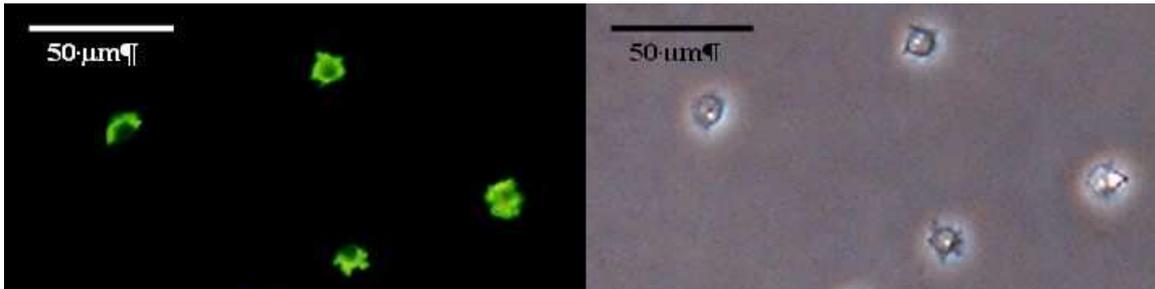
▲ **Abb. 3.21a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (3 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb 3.21b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.21a



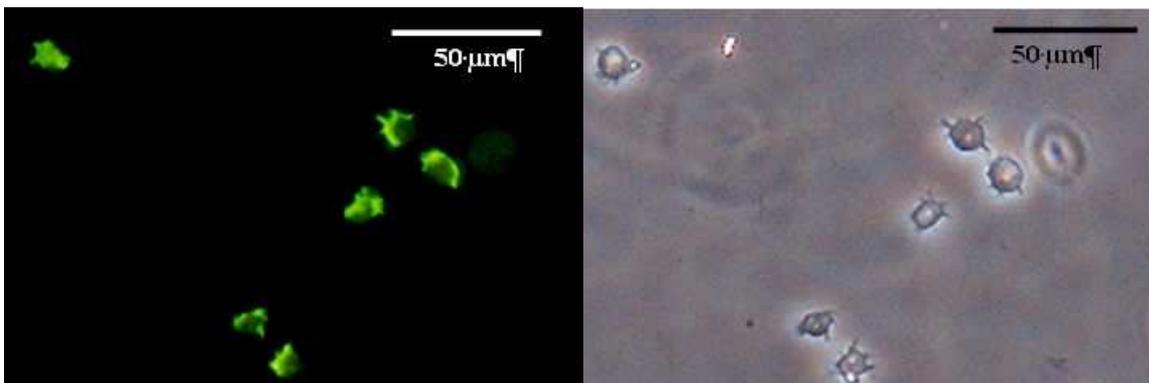
▲ **Abb. 3.22a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (4 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.22b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.22a



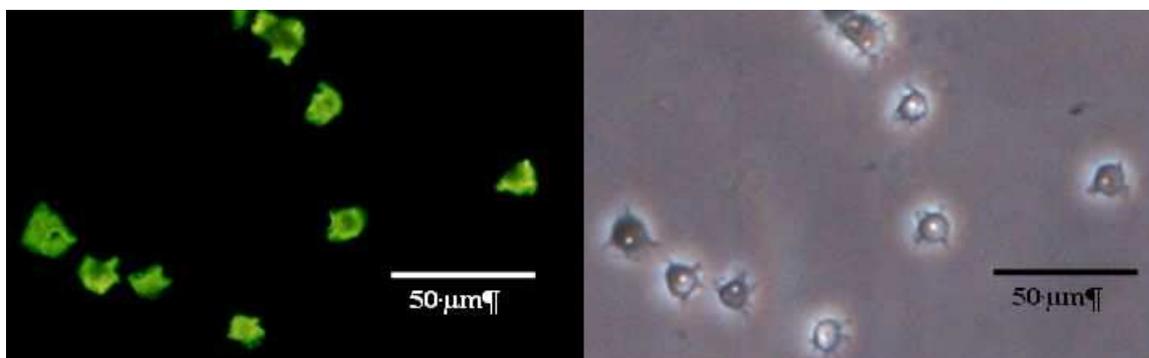
▲ **Abb. 3.23a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (5 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.23b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.23a



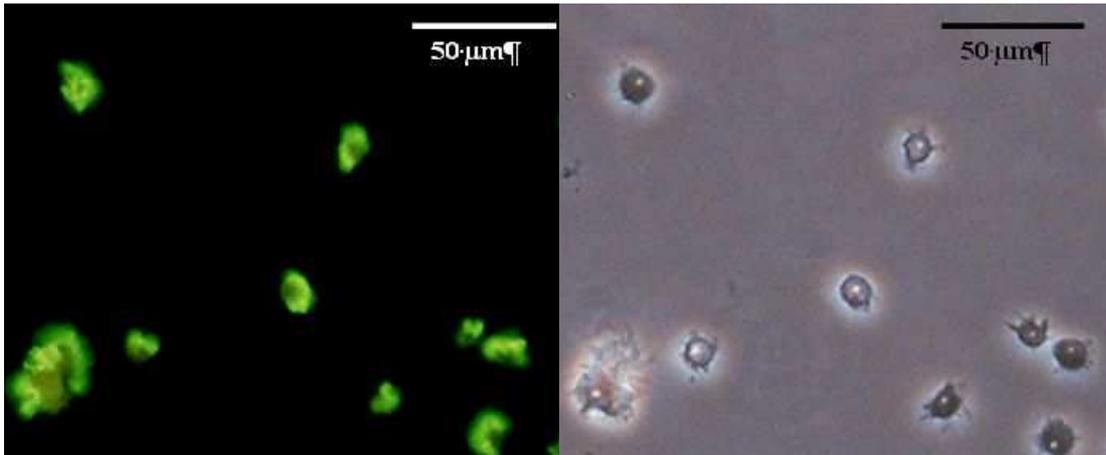
▲ **Abb. 3.24a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (6 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.24b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.24a



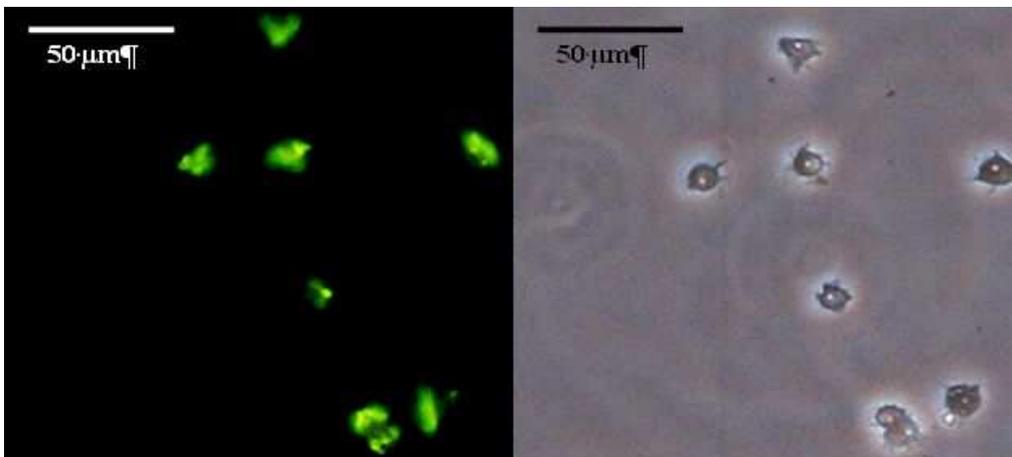
▲ **Abb. 3.25a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (7 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.25b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.25a



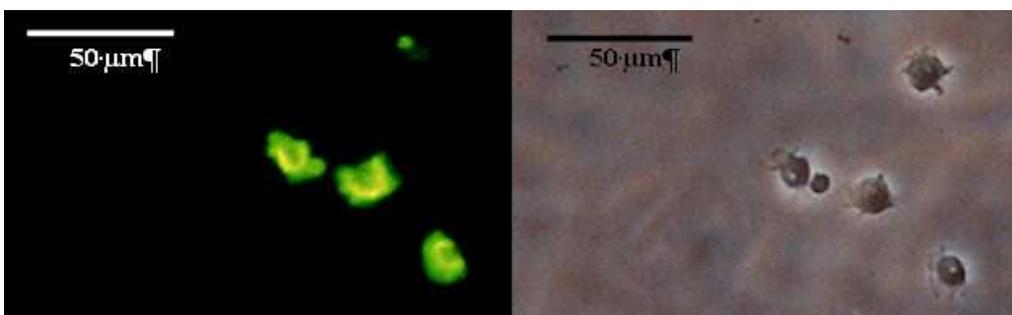
▲ **Abb. 3.26a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (8 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.26b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.26a



▲ **Abb. 3.27a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (9 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.27b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.27a

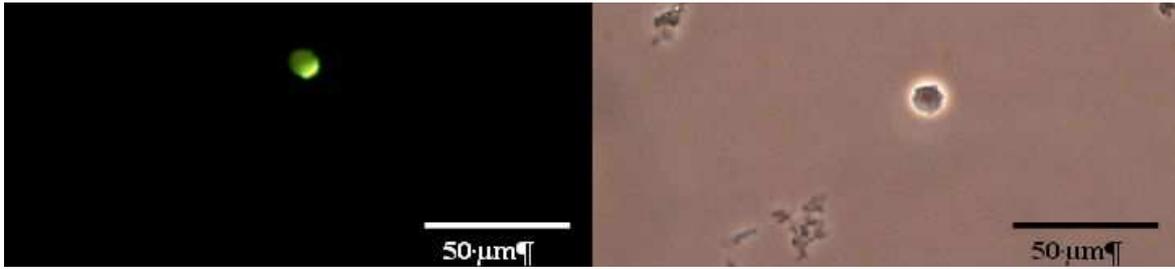


▲ **Abb. 3.28a:** *Manduca sexta*, Hämocyten im Monolayer Typ II (10 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.28b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.28a

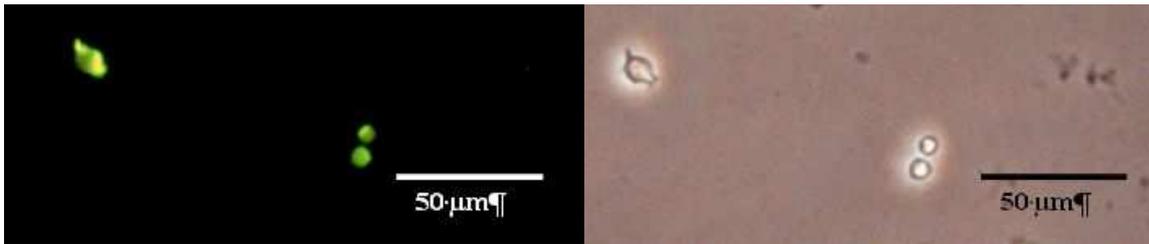
3.2.3. Monolayer (Typ II) *Acherontia atropos* ein bis zehn Minuten:

Die Fixierung und damit verbundene Arretierung der absitzenden Hämocyten von *Acherontia atropos* auf den jeweiligen Monolayern zeigte, dass sich erste Zellen bereits innerhalb einer Minute anhefteten und zu spreiten begannen (Abb. 3.29). Die Antikörpermarkierung mit Antikörper #78 ergab bereits bei diesen ersten Zellen deutlich fluoreszierende Bereiche, die sich vor allem bei den Plasmacyten nicht über die gesamte Membran erstreckten, sondern sich auf meist ein bis zwei bandartige oder flächige, zur Zellmitte hin scharf abgegrenzte Bereiche am Zellrand beschränkten, die teilweise in die beginnenden Pseudopodien hineinzogen (Abb. 3.30). Diese Bereiche zeigten sich polar auf eine Zellseite begrenzt (Abb. 3.29, 3.33), oder ein größerer Bereich lag einem oder seltener zwei kleineren gegenüber (Abb. 3.30, 3.31). Vereinzelt waren hufeisenförmige, den Zellkörper zu dreiviertel umschließende Bänder zu beobachten (Abb. 3.31, 3.33). Viele Zellen zeigten besonders an dem an diese Markierungen angrenzenden Zellrand beginnende oder bereits ausgebildete Pseudopodien. Andere Hämocyten zeigten eine schwächere, aber durchgängige Markierung der gesamten Oberfläche, die zum Rand hin stärker zu werden schien (Abb. 3.31, 3.32). Insgesamt schien die Markierung im zeitlichen Verlauf grösser zu werden (Abb. 3.29 bis 3.34).



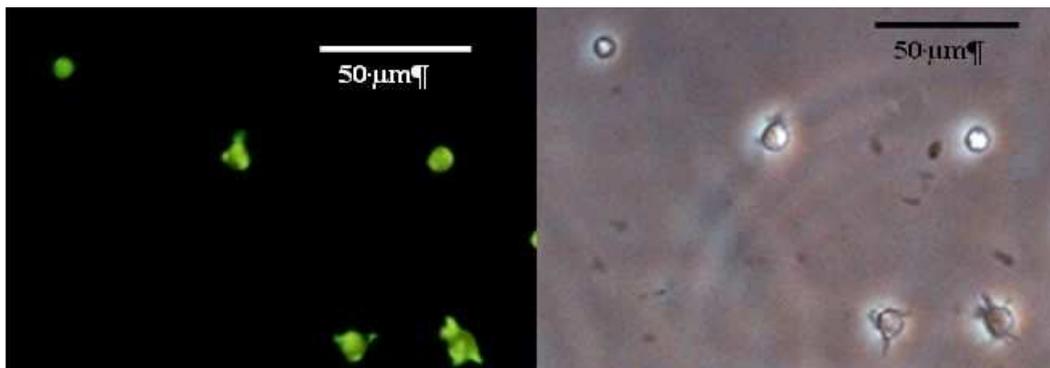
▲ **Abb. 3.29a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten im Monolayer Typ II (1 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung. Einzelner Hämocyt

▲ ► **Abb. 3.29b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.29a.



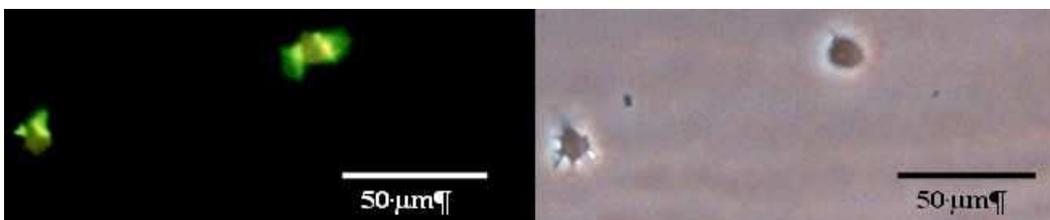
▲ **Abb. 3.30a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten im Monolayer Typ II (2 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.30b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.30a.



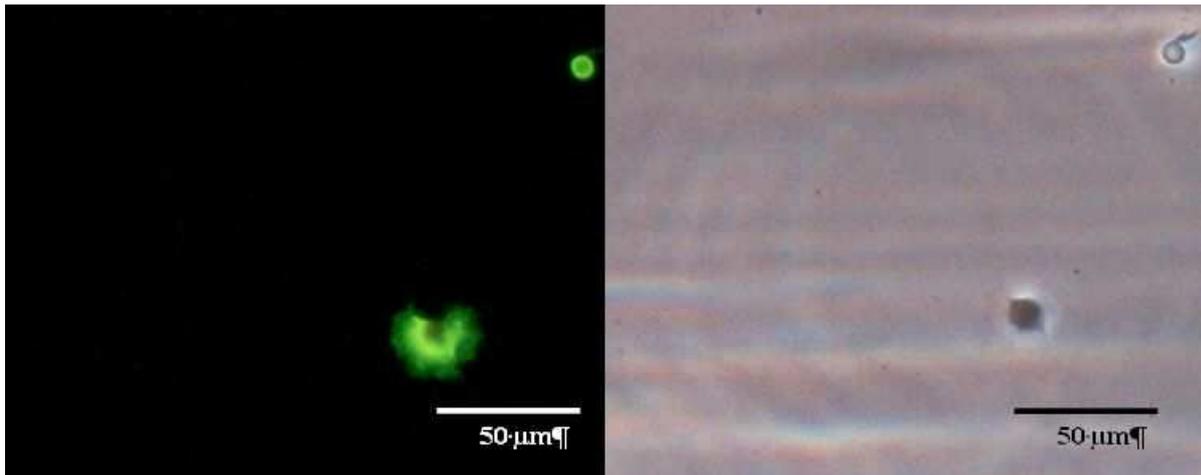
▲ **Abb. 3.31a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten im Monolayer Typ II (5 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.31b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.31a.



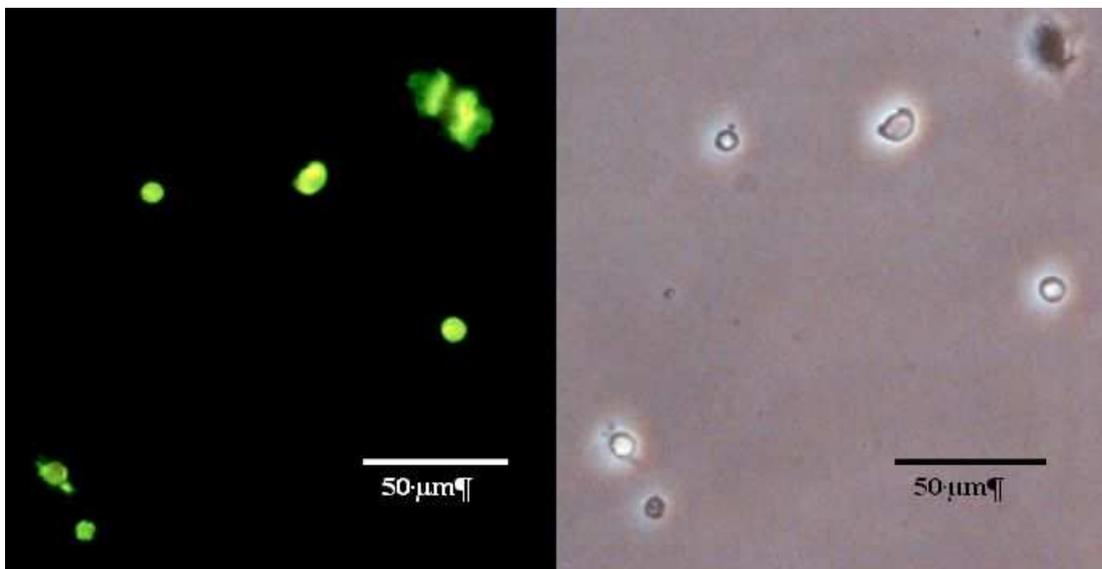
▲ **Abb. 3.32a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten im Monolayer Typ II (7 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.32b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.32a.



▲ **Abb. 3.33a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten im Monolayer Typ II (8 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.33b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.33a.



▲ **Abb. 3.34a:** *Acherontia atropos*, Hämocyten im Monolayer Typ II (10 min Inkubation vor Fixierung), Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper. UV-Anregung.

▲ ► **Abb. 3.34b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.34a.

3.3. Direktfixierung der Hämocyten während des Blutens:

Um eine Beobachtung möglichst nativer Hämocyten zu ermöglichen, wurde eine Direktfixierung während des Blutens durchgeführt. Auf diese Weise sollten die Hämocyten keine Zeit erhalten, auf den Eingriff und die veränderten Milieubedingungen zu reagieren.

Die während des Blutens fixierten Hämocyten von *Manduca sexta* zeigten nach Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse keine bis eine schwache Fluoreszenzmarkierung. Die Zellkörper erschienen rund und zeigten keine Pseudopodien (Abb. 3.35)



▲ **Abb. 3.35a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyt nach Direktfixierung bei Blutung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse. 2 min Belichtungszeit.

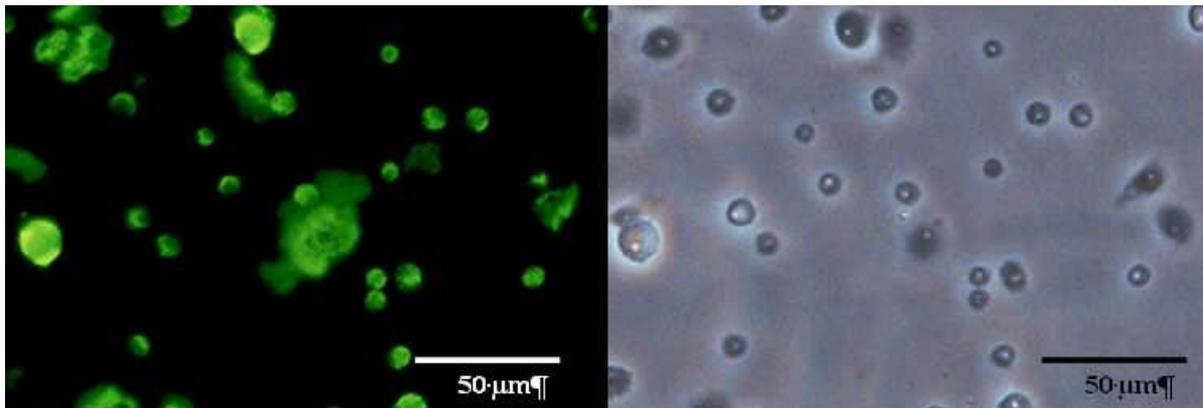
▲ ► **Abb. 3.35b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.35a.

3.4. Hämocyten im Langzeitmonolayer:

Um längerfristige Veränderungen der Hämocyten und damit verbunden der durch Antikörper #78 ermöglichten Markierung festzustellen, wurden Monolayer genutzt, deren Fixierung in einem grösseren Zeitabstand vorgenommen wurde.

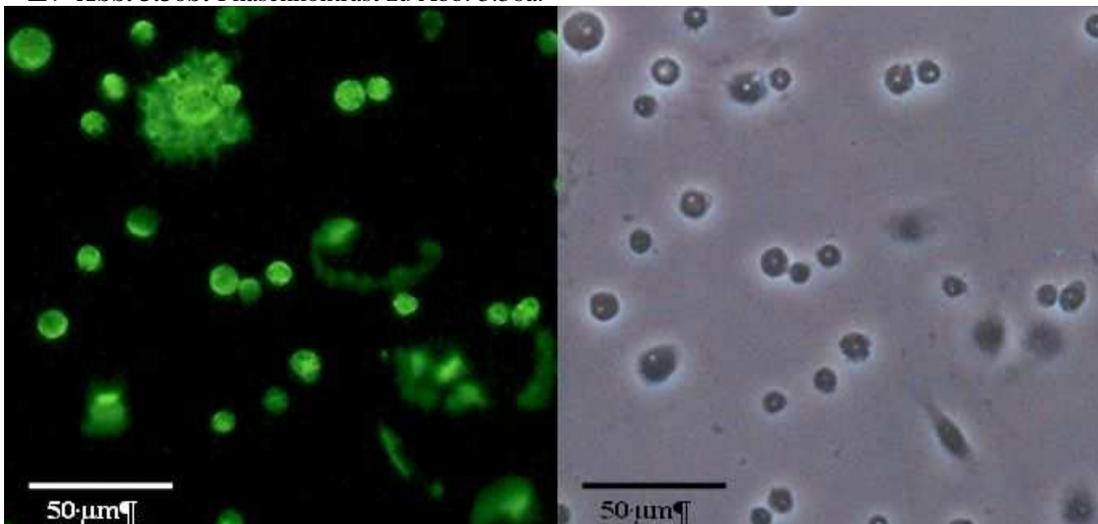
3.4.1. Hämocyten im Langzeitmonolayer Typ I:

Hämocyten im Monolayer des Typ I mit Antikörper #78 und FITC@Mouse zeigten vor allem bei den Plasmacyten eine großflächige Fluoreszenzmarkierung, die teilweise halbmond- oder beinahe kreisförmige Muster erbrachte (Abb. 3.36, 3.37). Granuläre Zellen wiesen eine gleichmäßige bis abgegrenzte Markierung in diversen Zwischenstufen auf. Die Unterschiede zwischen den Zeitstufen 30 min (Abb. 3.36) und 50 min (Abb. 3.37) waren gering, evtl. waren die Plasmacyten nach 50-minütiger Inkubation vor der Fixierung etwas großflächiger markiert



▲ **Abb. 3.36a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyten im Monolayer Typ I, 30 min Inkubation vor Fixierung, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse

▲ ► **Abb. 3.36b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.36a.

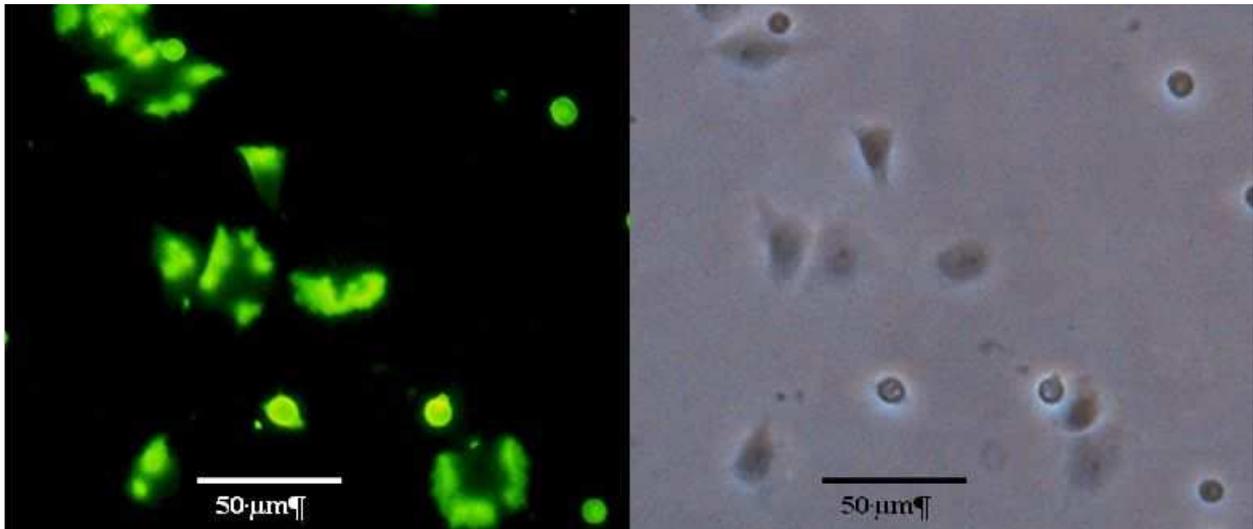


▲ **Abb. 3.37a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyten im Monolayer Typ I, 50 min Inkubation vor Fixierung, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse

▲ ► **Abb. 3.37b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.37a.

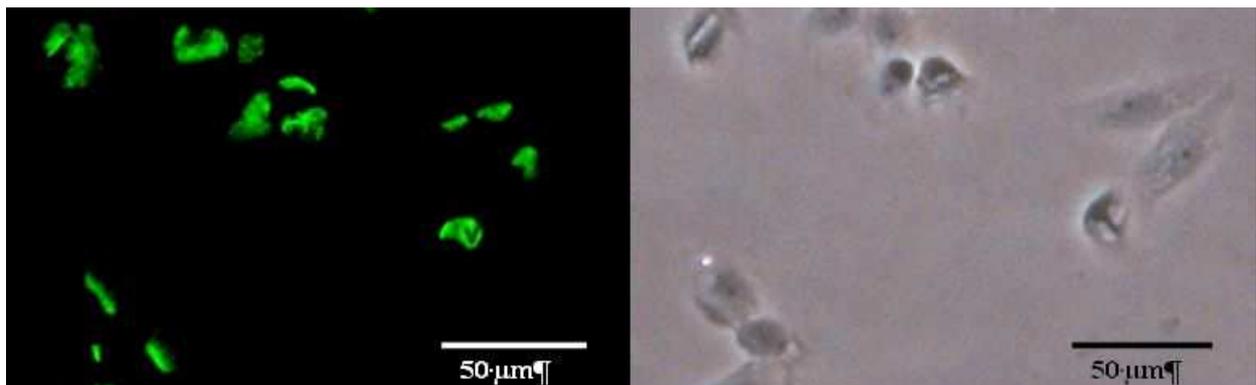
3.4.2. Hämocyten im Langzeitmonolayer Typ II:

Hämocyten im Langzeitmonolayer Typ II zeigten; vor allem bei Plasmacyten, nach Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse eine deutlich begrenzte Fluoreszenzmarkierung, die bis in die Pseudopodien ausstrahlt. (Abb.3.38 und 3.39). Granuläre Zellen wiesen eine gleichmäßig flächige Markierung auf, die teilweise den Zellkörper zur Gänze betraf, bei einigen Zellen aber auch nur eine Hälfte des Zellkörpers bedeckte. Die Plasmacyten der späteren Zeitstufe (Abb. 3.39) schienen großflächiger markiert als die der früheren.



▲ **Abb. 3.38a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyten im Monolayer Typ II, 30 min Inkubation vor Fixierung, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse

▲ ► **Abb. 3.38b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.38a



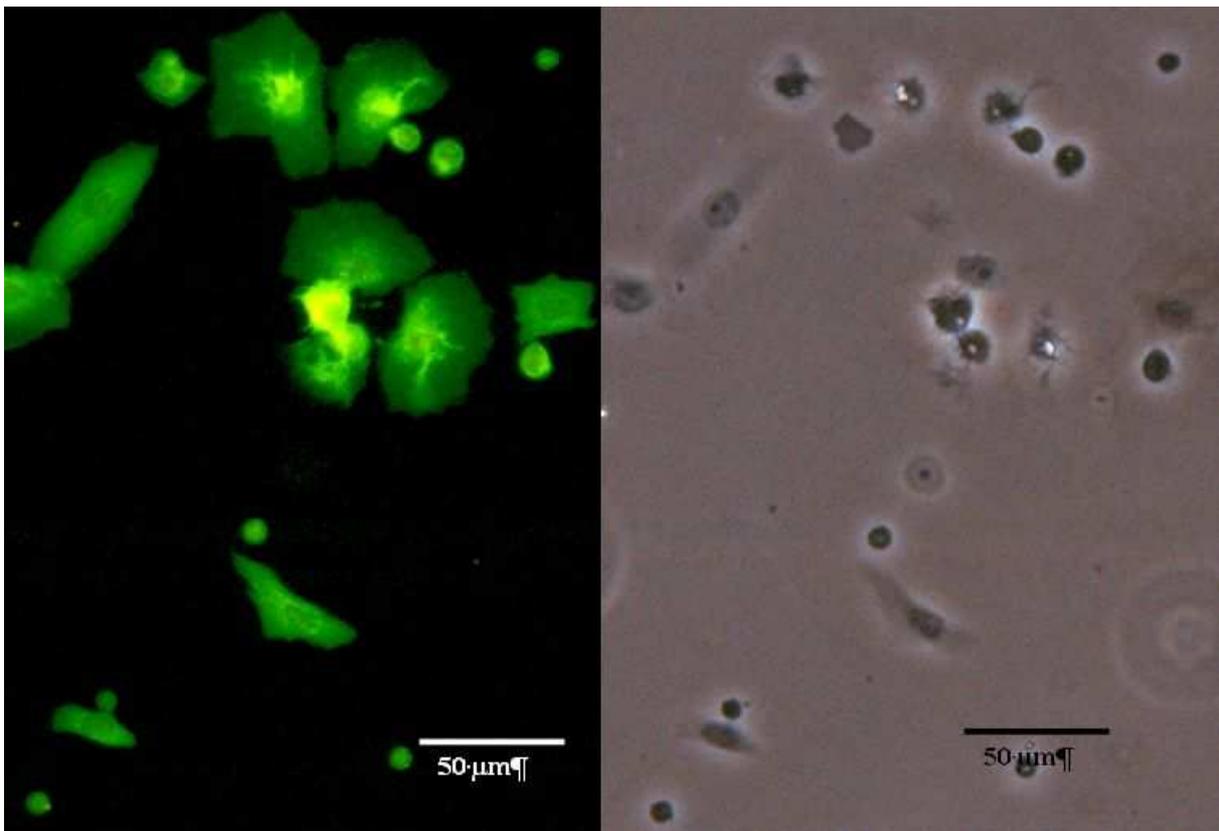
▲ **Abb. 3.39a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyten im Monolayer Typ II, 50 min Inkubation vor Fixierung, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse

▲ ► **Abb. 3.39b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.39a.

3.5 Immunhistochemie unter Verwendung von Triton X-100:

Um das Annexine ggf. auch im Cytoplasma nachweisen zu können, wurde die Zellmembran unter Verwendung von Triton X-100 aufgebrochen und den verwendeten Antikörpern somit ermöglicht, die sonst bei unversehrter Membran nicht erreichbaren Antigene zu binden.

Nach Öffnung der Membran durch Triton X-100 sowie Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-konjugiertem Anti-Maus-IgG-Antikörper zeigte sich eine gleichmäßige bis leicht sandige Markierung, die jeweils die gesamte Zellfläche aller Hämocyten bedeckte. Bei einigen Plasmacyten war eine im mittleren Bereich der Zelle gelegene im Vergleich zur übrigen Markierung stärkere Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.40).



▲ **Abb. 3.40a:** *Manduca sexta* L5d2-3, Hämocyten in Monolayer Typ I, 40 min Inkubationszeit vor der Fixierung, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse nach Tritonbehandlung

▲ ► **Abb. 3.40b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.40a.

3.6. Auswirkungen der Parasitisierung durch *Cotesia congregata* im Monolayer:

Um der Fragestellung einer Auswirkung der Parasitisierung von *Cotesia congregata* auf die bisher beobachteten Markierungen über Antikörper #78 nachzugehen, wurden Hämocytenmonolayer parasitierter Larven von *Manduca sexta* einer immunhistochemischen Analyse unterzogen. Weiterhin wurde, um auch eventuell durch die Antikörperfärbung nicht erfasste Zellen erkennbar zu machen, eine Trypanblau-Färbung angewandt. Ausserdem wurde bei einigen Monolayern die Zellmembran durch Triton-X 100 eröffnet, um den Antikörpern das Eindringen ins Zellinnere zu ermöglichen.

Hämocyten von durch *Cotesia congregata* parasitierten Larven von *Manduca sexta* zeigten nach Immunhistochemie mit Antikörper #78 im Monolayer eine deutlich geringere FITC-spezifische Fluoreszenz als die unparasitierten Larven (Abb. 3.41 bis 3.43). Während die Plasmacyten der in Bezug auf *Cotesia* gesunden Tiere bis auf sehr wenige Ausnahmen ein deutliches, flächiges Fluoreszenzmuster zeigten (Abb. 3.45), waren die Plasmacyten befallener Tiere in Bezug auf Antikörper #78 im direkten Vergleich geringer bis unmarkiert, allerdings wiesen einige granuläre Zellen eine deutliche, wenn auch geringe Markierung auf (Abb. 3.41). Mit Triton X-100 behandelte Hämocyten zeigten eine gleichmäßige, die Zelle bedeckende Markierung (Abb. 3.44).

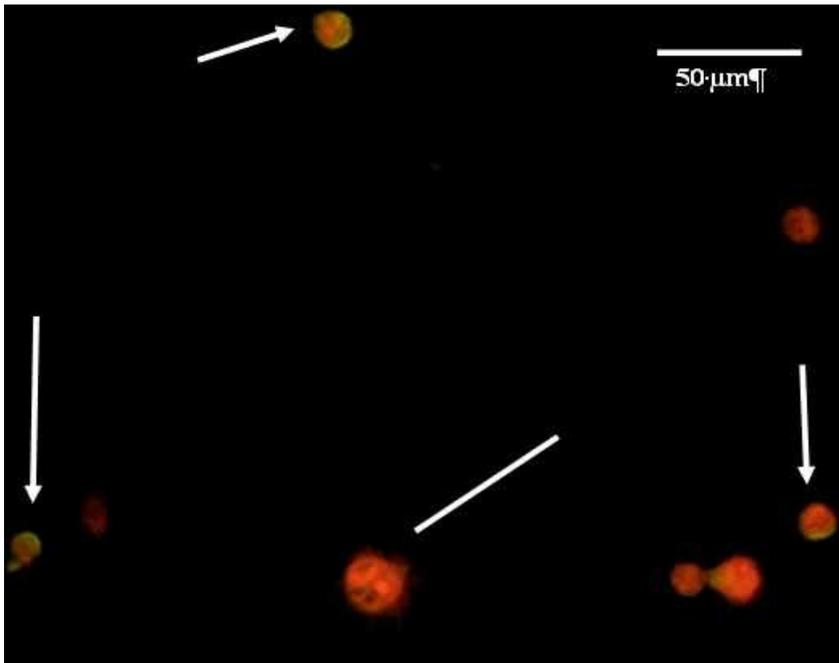


Abb. 3.41a: *Manduca sexta* L5d2 bis 3, acht Tage parasitisiert mit *Cotesia congregata*: Hämocyten im Monolayer, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper (grüne Fluoreszenz) sowie Trypanblau-Färbung . UV-Anregung mit zehn Sekunden Belichtungszeit. Einige granuläre Zellen zeigen eine schwache, am Zellrand gelegene Fluoreszenzmarkierung (Pfeil), die bei Plasmatoocyten (Linie) nicht zu sehen ist.

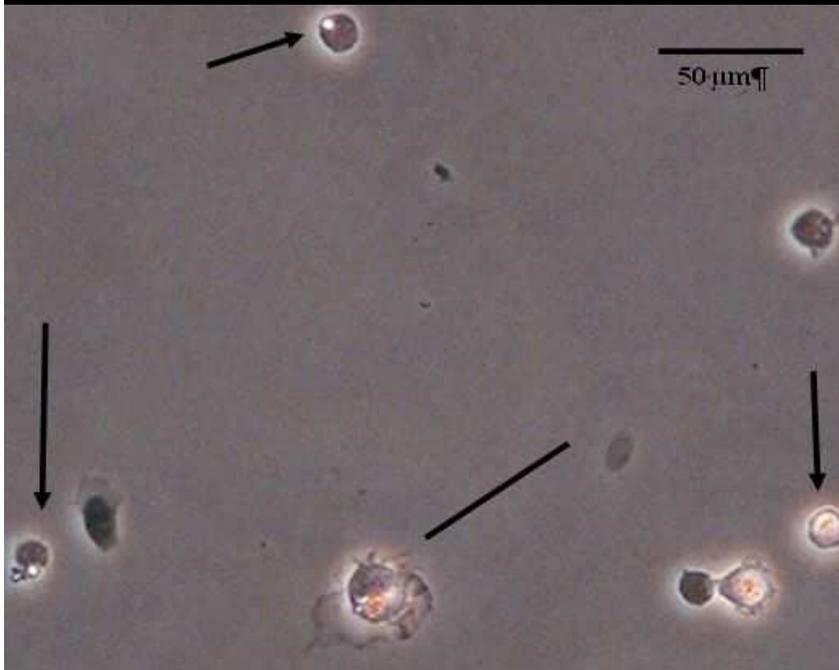
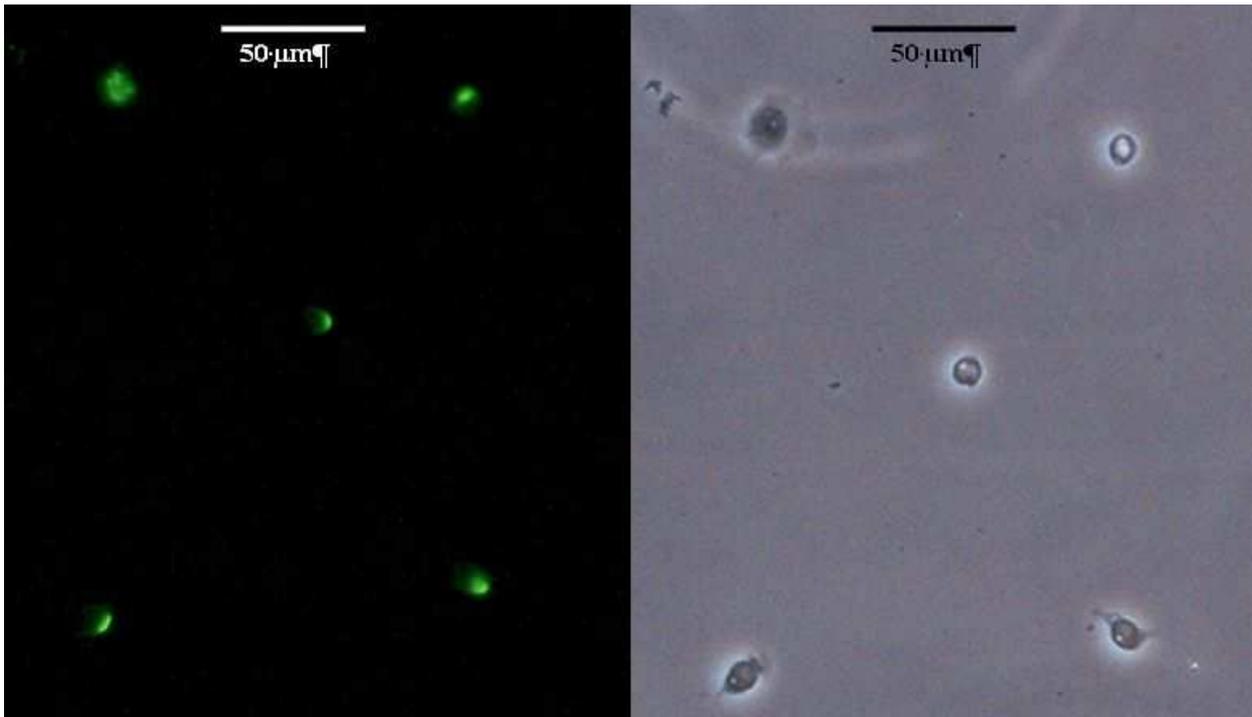
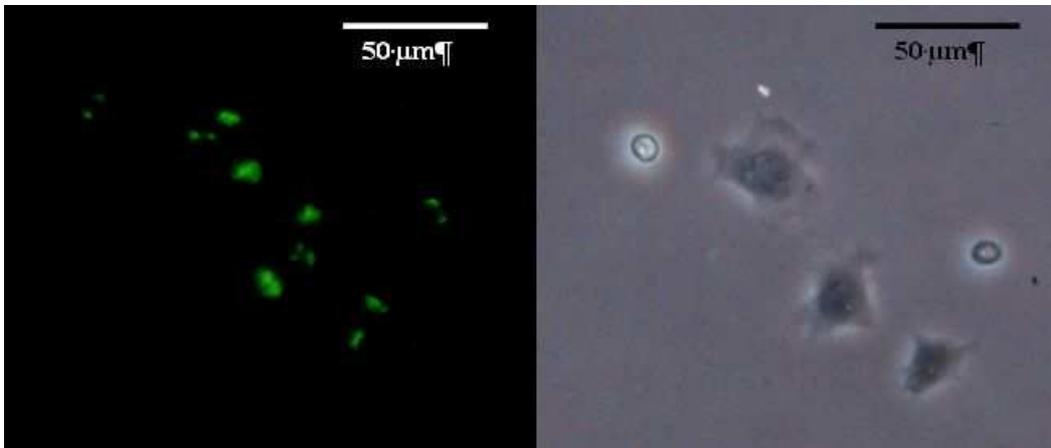


Abb. 3.41b: Phasenkontrast zu Abb. 3.41a



▲ **Abb. 3.42a:** *Manduca sexta* L5d2 bis 3, acht Tage parasitiert mit *Cotesia congregata*: Hämocyten im Monolayer Typ II, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper, UV-Anregung mit zehn Sekunden Belichtungszeit, unmarkierte Plasmatoocyten

▲ ► **Abb. 3.42b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.42a



▲ **Abb. 3.43a:** *Manduca sexta* L5d2 bis 3, acht Tage parasitiert mit *Cotesia congregata*: Hämocyten im Monolayer Typ II, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper, UV-Anregung mit zehn Sekunden Belichtungszeit. Kleinflächig markierte Plasmatoocyten

▲ ► **Abb. 3.43b :** Phasenkontrast zu Abb. 3.43a.

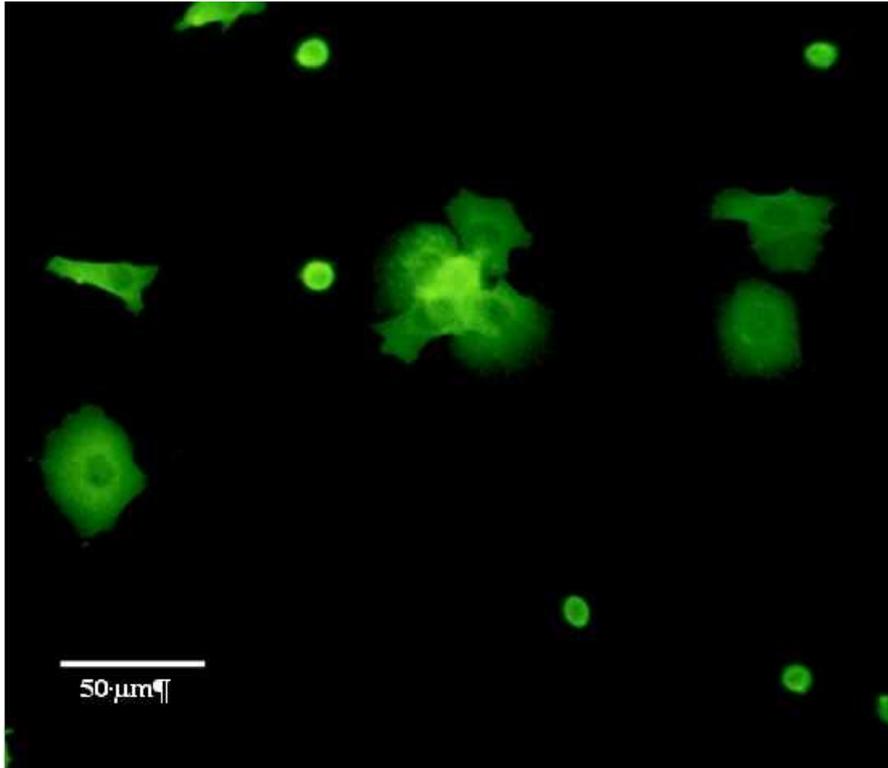


Abb. 3.44a: *Manduca sexta* L5d2 bis 3, acht Tage parasitiert mit *Cotesia congregata*: Hämocyten im Monolayer Typ II, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper nach Triton-Behandlung, UV-Anregung mit zehn Sekunden Belichtungszeit.

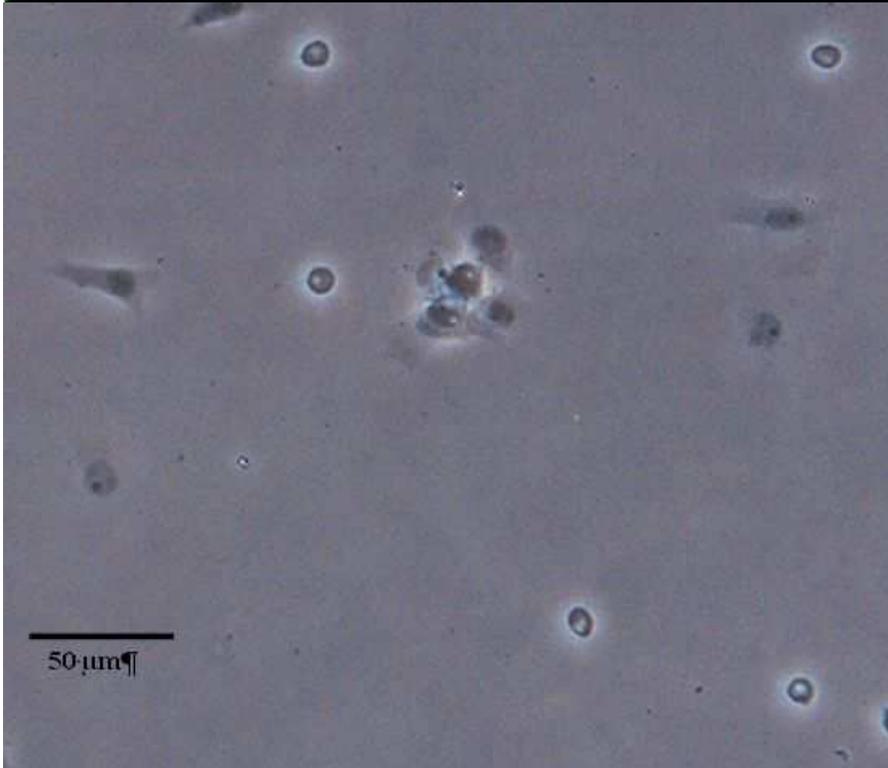


Abb. 3.44b: Phasenkontrast zu Abb. 3.44a

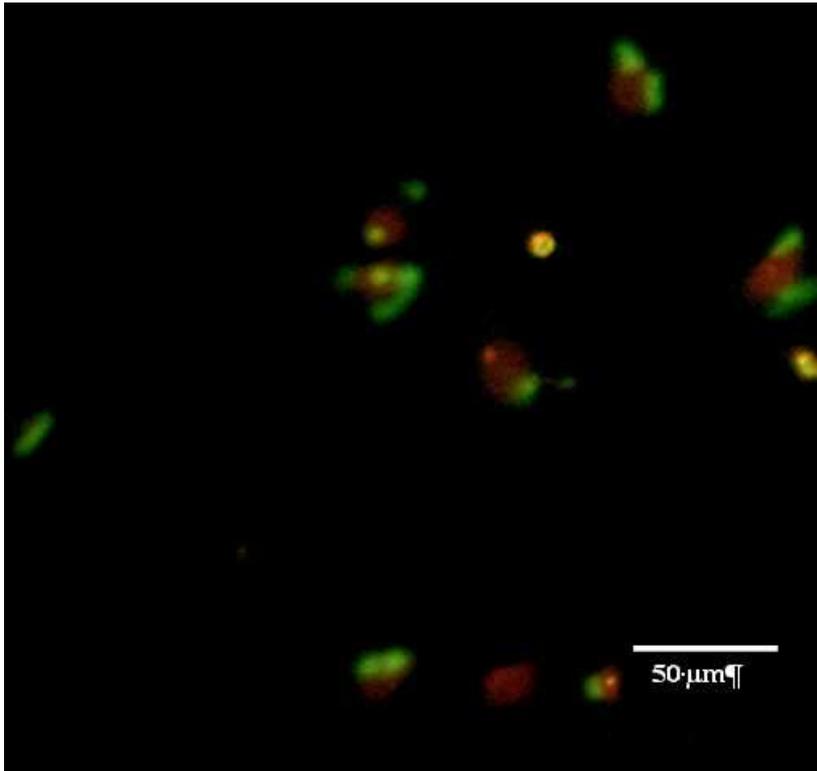


Abb. 3.45a: *Manduca sexta* L5d2 bis 3: Hämocyten im Monolayer, Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-labelled @Mouse Antikörper (grüne Fluoreszenz) sowie Trypanblau-Färbung . UV-Anregung mit zehn Sekunden Belichtungszeit. Vorallem die Plasmatozyten zeigen eine deutliche, flächig begrenzte Markierung durch den Antikörper.

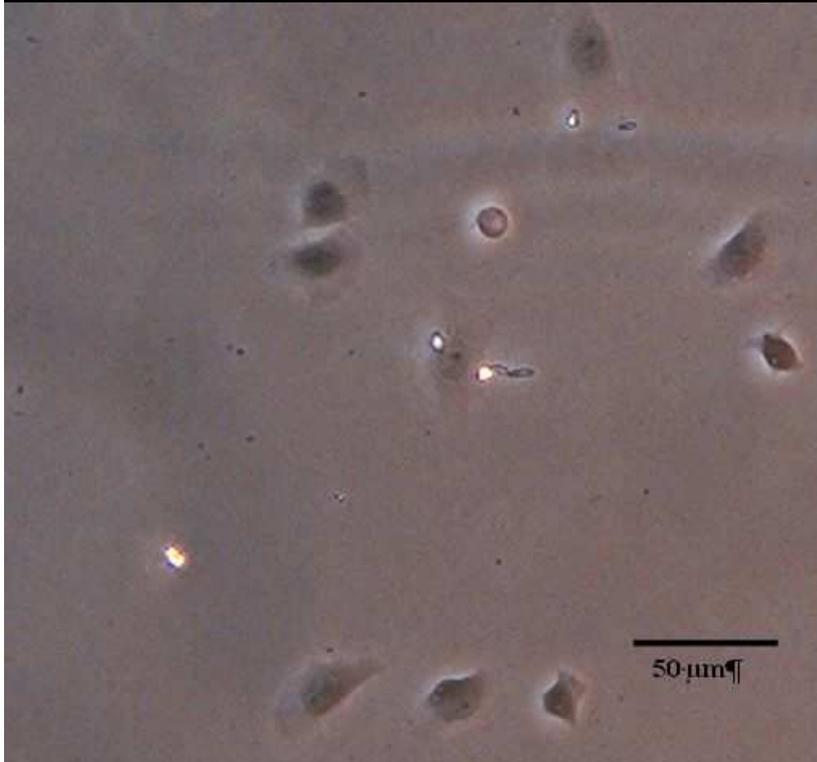
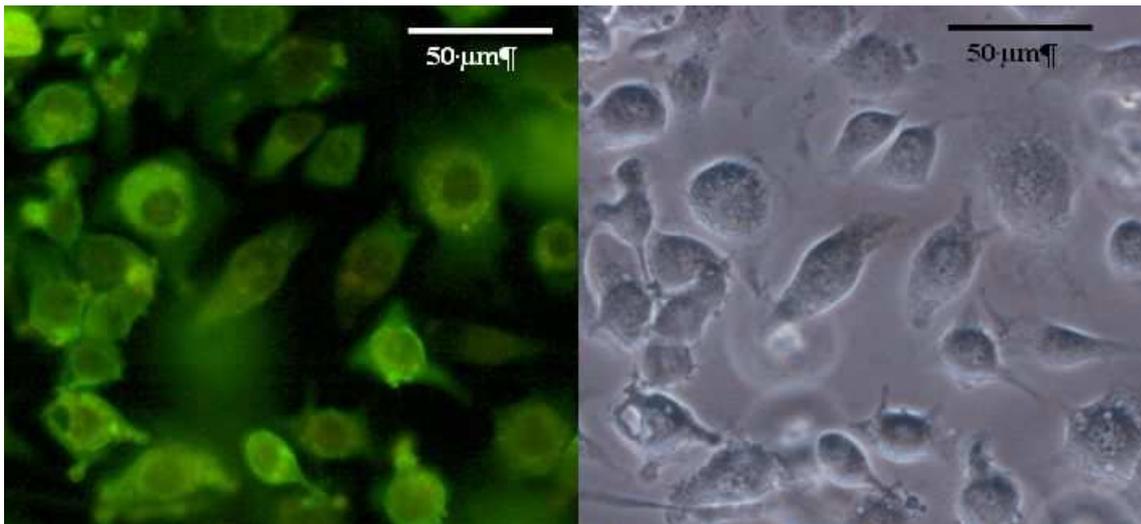


Abb. 3.45b: Phasenkontrast zu Abb. 3.49Aa

3.7. GV1 im Zellkulturobjekträger:

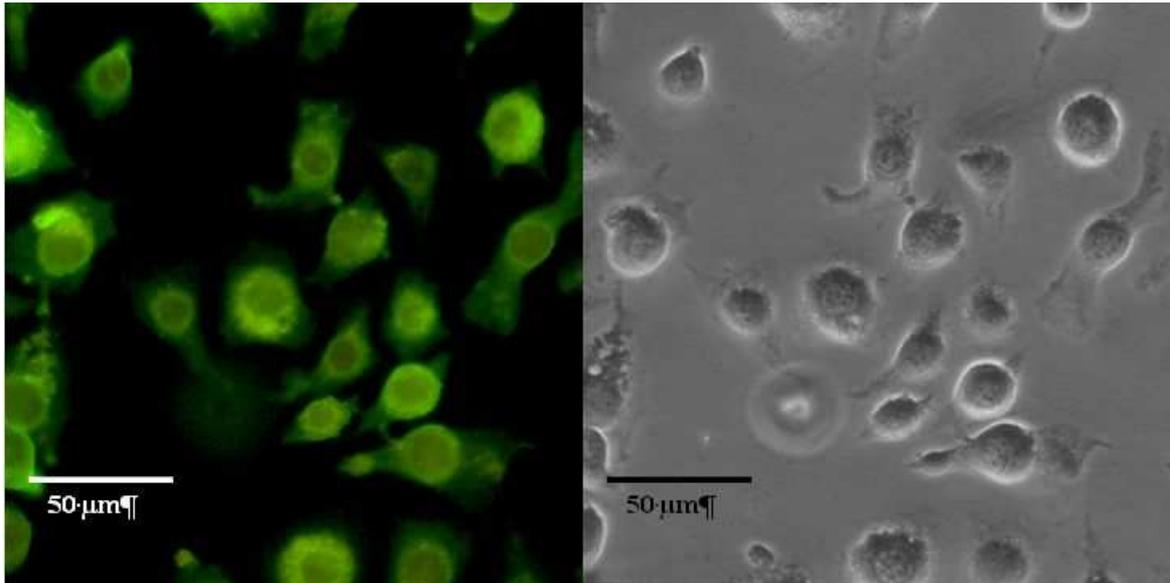
Um das Vorkommen von Annexin IX in der Kultur embryonaler Zellen von *Manduca sexta* zu überprüfen, wurde eine immunhistochemische Färbung auf Zellkulturen der GV1-Linie durchgeführt und die über Antikörper #78 ermöglichte Markierung analysiert.

Die Zellen der GV1-Linie zeigten eine heterogene, schwache bis deutliche Fluoreszenzmarkierung nach Durchführung der Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-konjugiertem Anti-Mouse-Antikörper (Abb.3.46 und Abb.3.47). Einige Zellen wiesen eine den zentralen Zellkörper erfassende Fluoreszenz auf, die sich nicht in die Pseudopodien ausdehnte, andere Zellen zeigten nur eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz (Abb. 3.46). Bei einer weiteren Subpopulation war der markierte Bereich ringförmig auf einen schmalen Bereich um den Zellkern konzentriert, während der restliche Zellkörper, vor allem die Pseudopodien, nur schwach fluoreszierte.(Abb. 3.47).



▲ **Abb. 3.46a:** GV1 (Embryonale Zelllinie *Manduca sexta*) nach dreitägiger Kultur im Zellkulturobjekträger mit anschließender Immunhistochemie (Antikörper #78 und FITC@Mouse)

▲ ► **Abb. 3.46b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.46a.



▲ **Abb. 3.47a:** GV1 (Embryonale Zelllinie *Manduca sexta*) nach dreitägiger Kultur im Zellkulturobjekträger mit anschließender Immunhistochemie (Antikörper #78 und FITC@Mouse)

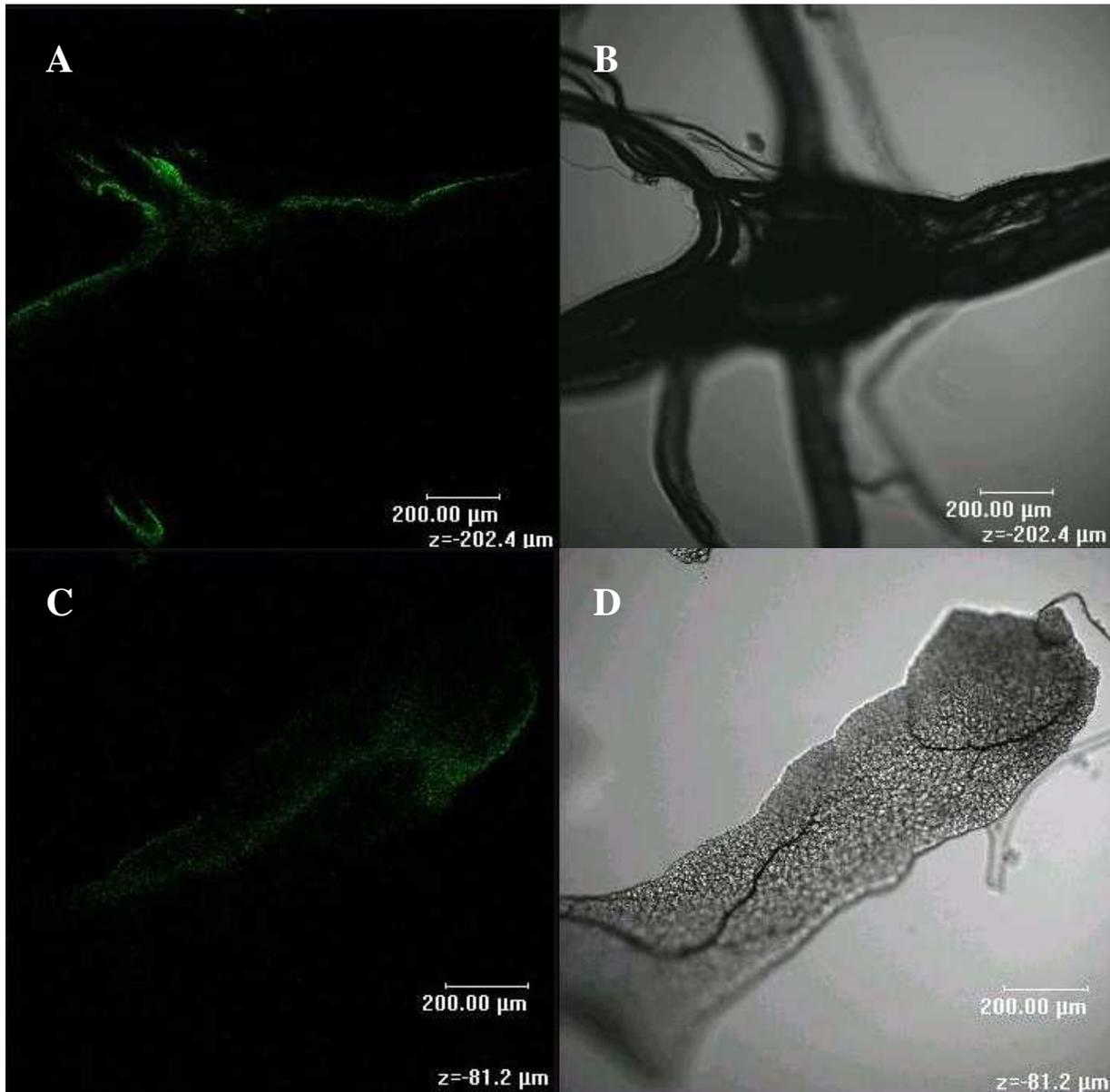
▲ ► **Abb. 3.47b:** Phasenkontrast zu Abb. 3.47a.

3.8. Konfokale Laserscanmikroskopie:

Konfokale Laserscanmikroskopie ermöglicht es, optische Schnitte und anschließend dreidimensionale Rekonstruktionen auf mikroskopischer Ebene vorzunehmen. Die Präparate wurden mit Antikörper #78 behandelt, um u. a. das Vorkommen des Antigens in unterschiedlichen Organen zu untersuchen.

3.8.1. KLSM der Organe:

Die Markierung durch Antikörper #78 war bei allen getesteten Organen mehr oder weniger stark ausgeprägt (Abb. 3.48A bis 3.51C) und trat besonders deutlich bei den Ganglien (Abb. 3.48A) hervor. Sehr schwach zeigte sich die Markierung von Darm und Epidermis (Abb. 3.50C und 3.51A). Die fluoreszierenden Bereiche schienen bei den meisten Organen einer Abgrenzung gleich auf den Außenbereich beschränkt, waren aber bei Speicheldrüse und Malpighi'schen Gefäßen (Abb. 3.49A und 3.50A) nach innen nicht so scharf abgegrenzt wie bei den anderen Organen, bei der Speicheldrüse schien die Markierung die gesamten Zellen des Organs, wenn auch nur schwach, zu erfassen. An die Epidermis angeheftete Hämocyten waren gut als stärker fluoreszente Zellen erkennbar, ebenso wie eine den Darm innervierende Trachee (Abb. 3.53). Insgesamt schien die Markierung relativ lückenlos, bei der Muskulatur zeigte eine rillenförmige, bei dem Lobus des Fettkörpers eine wabenartige Struktur (Abb. 3.52 und 3.53).



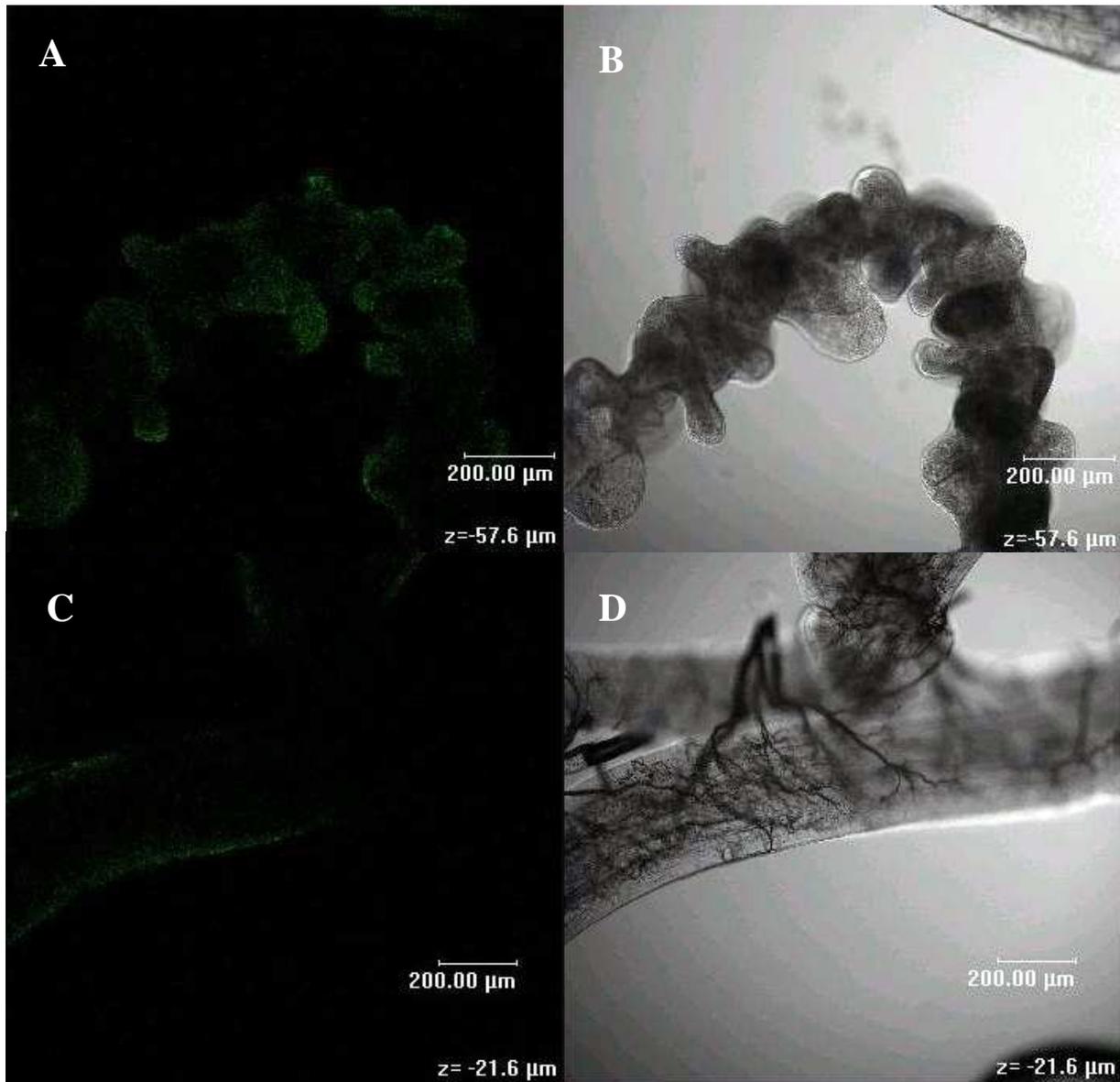
▲ **Abb. 3.48**

A: *Manduca sexta*, ventrales Ganglion, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

B: Durchlichtbild zu Abb. 3.48 A.

C *Manduca sexta*, Fettkörper, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

D Durchlicht zu Abb. 3.48C.

**Abb. 3.49**

A: *Manduca sexta*, Malpighi, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

B: Durchlicht zu Abb. 3.49A

C: *Manduca sexta*, Muskulatur, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

D: Durchlicht zu Abb. 3.49C.

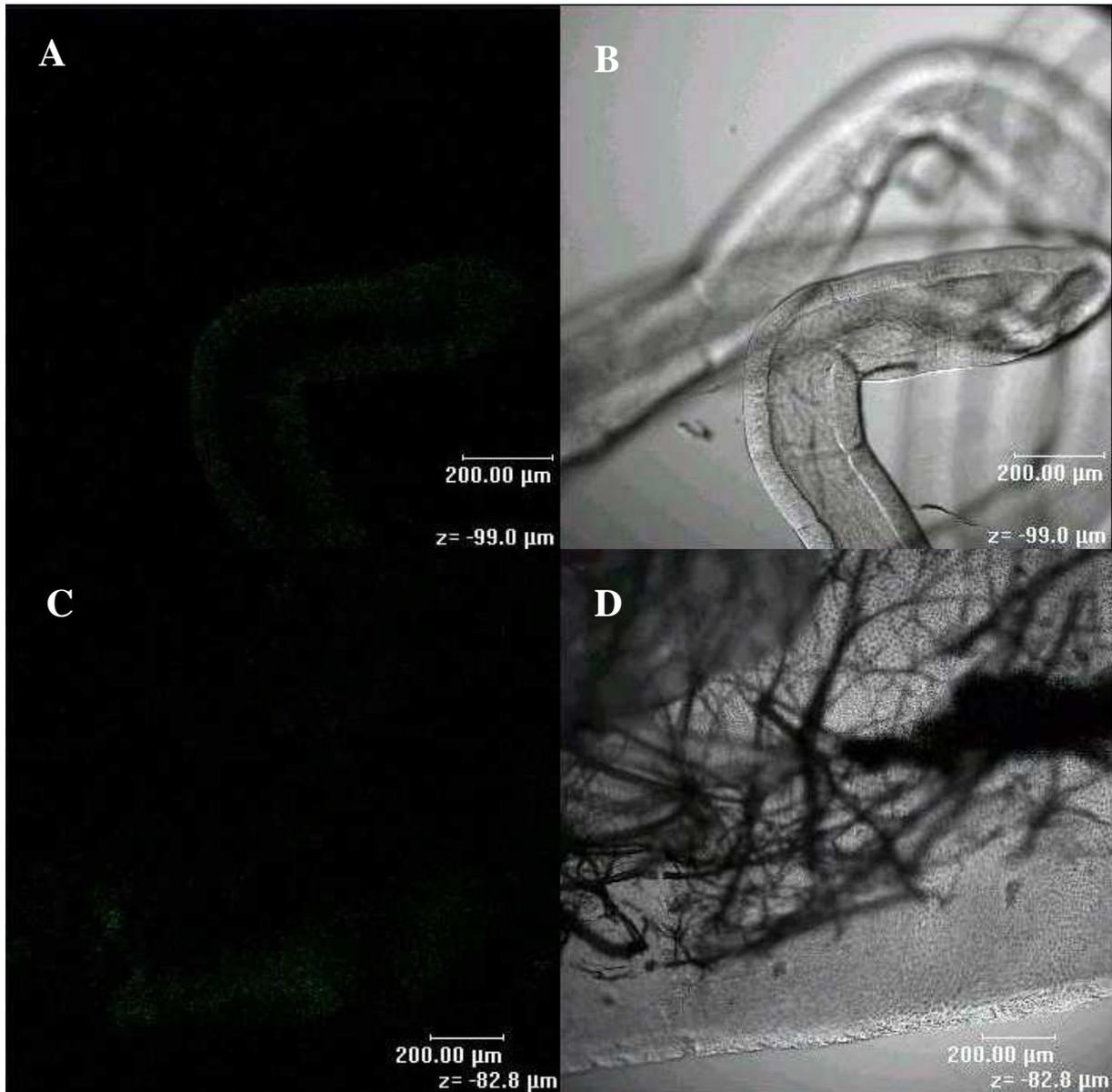


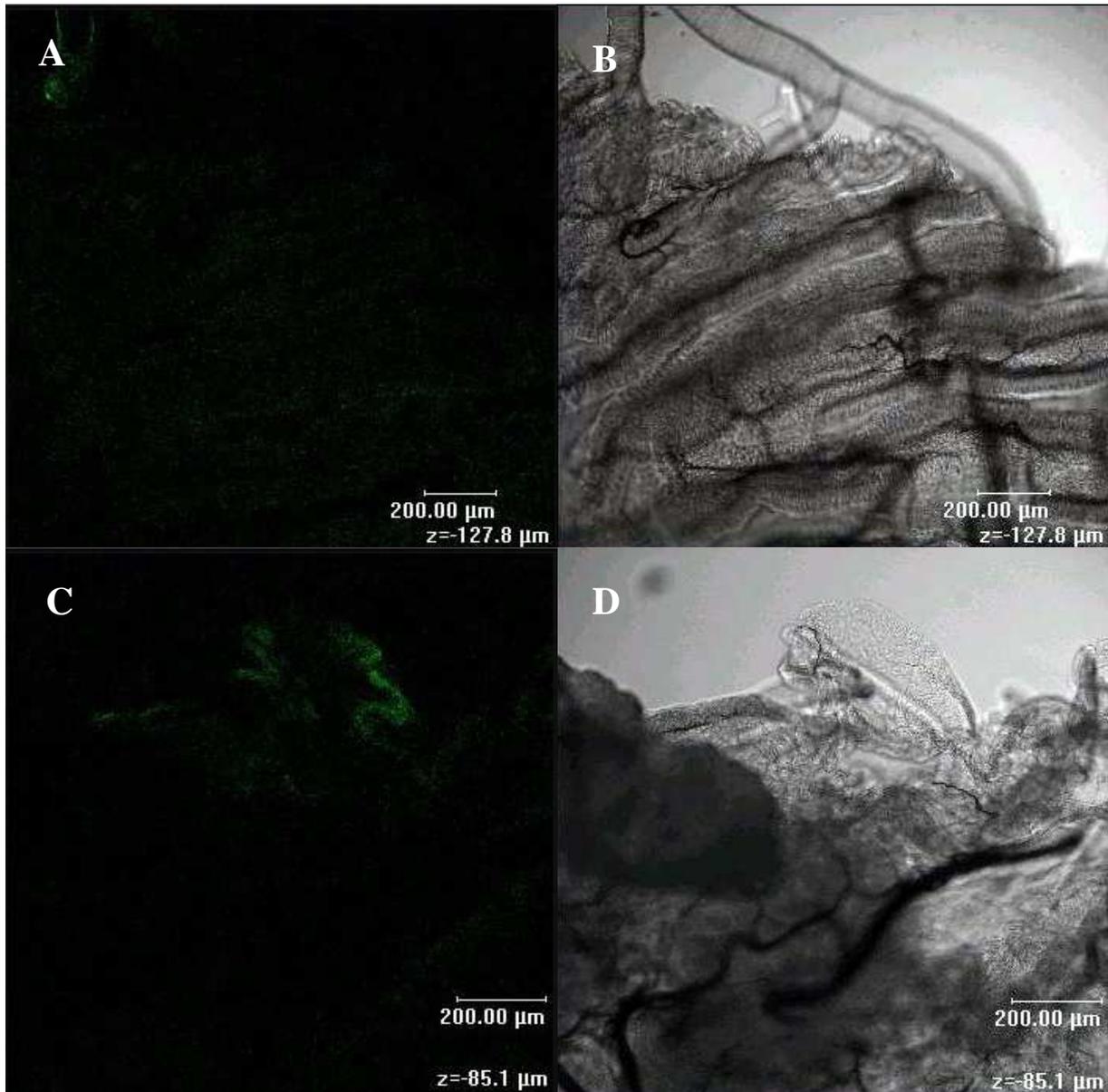
Abb. 3.50

A: *Manduca sexta*, Speicheldrüse, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

B: Durchlicht zu Abb. 3.50A

C: *Manduca sexta*, Epidermis, von innen betrachtet, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

D: Durchlicht zu Abb 3.50C



▲ **Abb. 3.51**

A: *Manduca sexta*, Darm, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

B: Durchlicht zu Abb. 3.51A

C: *Manduca sexta*, Herz, 1 h Tritonbehandlung, AK #78 + FITC@Mouse, KLSM-optischer Schnitt bei UV-Anregung

D: Durchlicht zu Abb. 3.51C

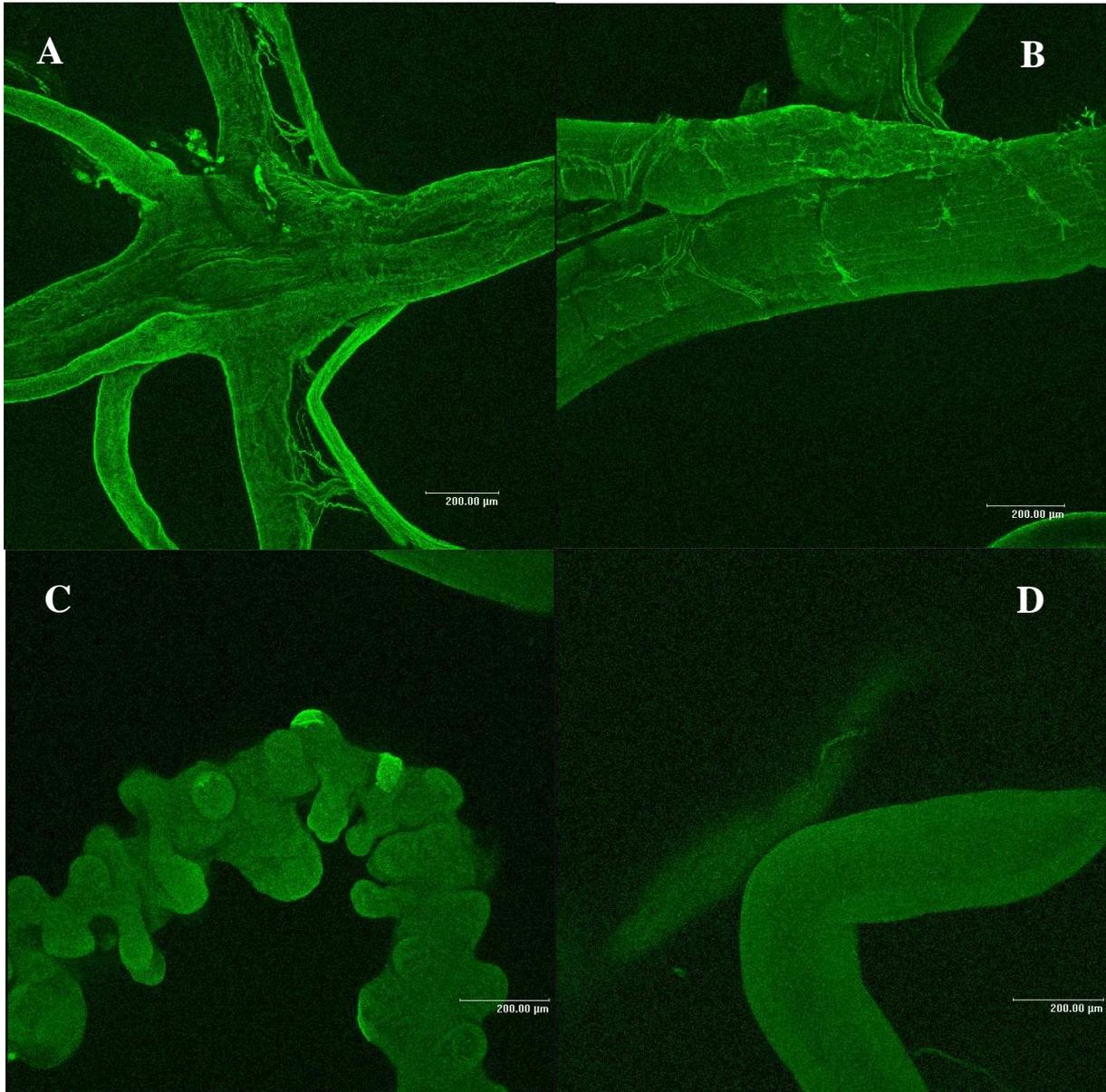


Abb. 3.52: 3D-Rekonstruktion der optischen Schnitte der Organe von *Manduca sexta* L5d2-3 nach Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-konjugiertem Anti-Mouse-Antikörper:

- A: Abdominalganglion
- B: Längsmuskulatur
- C: Malpighi'sche Gefäße
- D: Spinndrüse

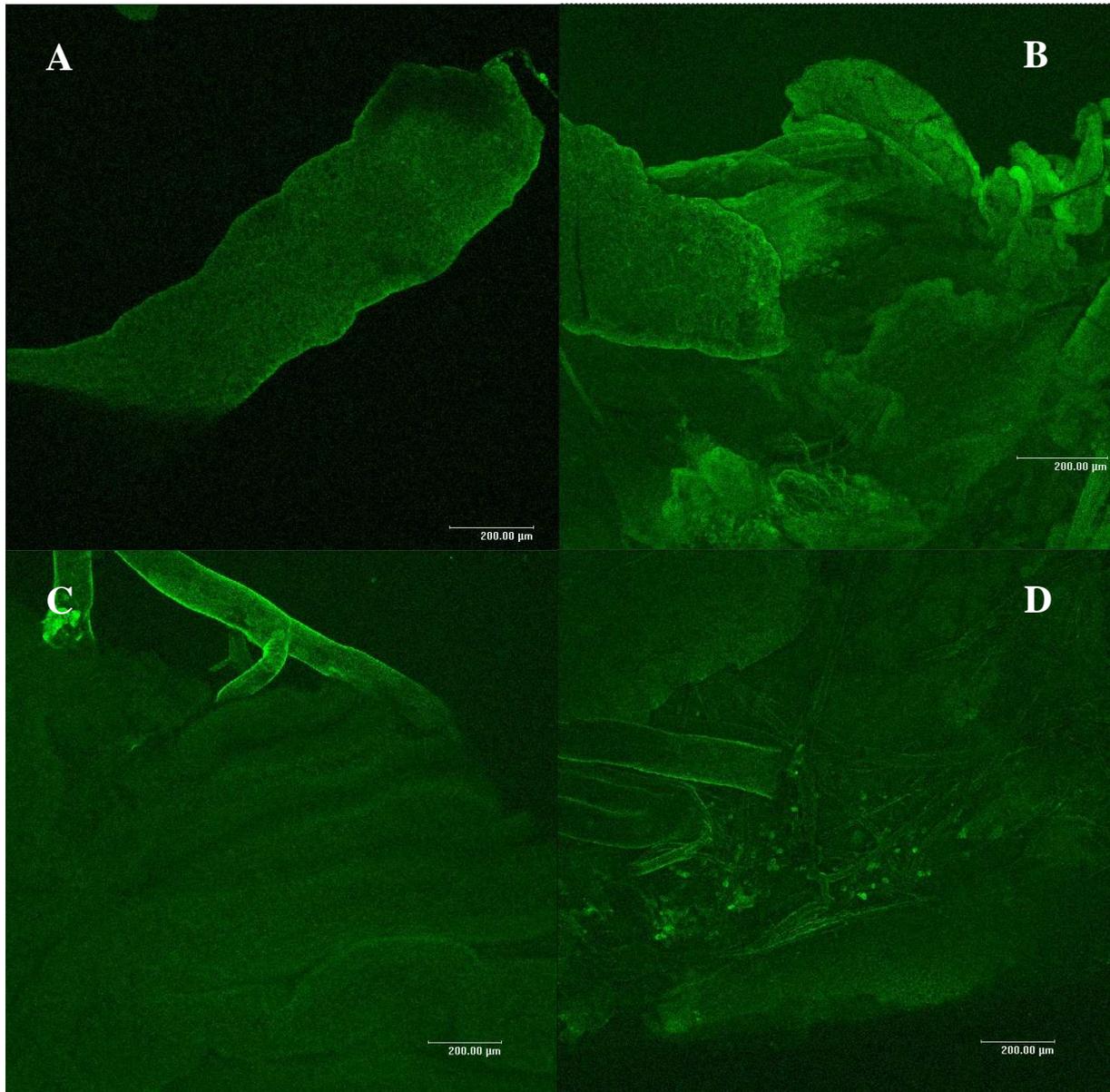


Abb. 3.53: 3D-Rekonstruktion der optischen Schnitte der Organe von *Manduca sexta* L5d2-3 nach Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC-konjugiertem Anti-Mouse-Antikörper:

A: Fettkörper

B: Rückenherz, teilweise ist auch Fettkörper sichtbar

C: Darm mit einmündender Trachee

D: Epidermis von der Innenseite mit einigen angeheftete Hämocyten

3.8.2. KLSM von Hämocyten:

Um die Annexinverteilung innerhalb eines spreitenden Hämocyten auch in Bezug auf das Cytoskelett zu beobachten, wurde dieses über TRITC-konjugiertes Phalloidin markiert.

Neben gut erkennbaren Aktinfilamenten (Abb. 3.58) zeigte sich eine scheinbar auf die Zellmembran begrenzte Fluoreszenzmarkierung mit Antikörper #78. Vor allem eine Zone auf der Zelloberseite, die in einem Bereich zu liegen kam, in dem die Zelle weniger Pseudopodien ausgebildet hatte, zeigte eine starke Markierung durch Antikörper #78 (vergl. Abb. 3.55 und 3.58). Dreidimensional betrachtet (Abb. 3.59) ergab sich ein Bild, das an eine Sandwich-Struktur erinnerte, bei der die grün markierten Bereiche (Antikörper #78, also Nachweis für Annexin IX) als Außenschicht nicht vollständig die roten Strukturen (Phalloidin, Aktinnachweis) überdeckte.

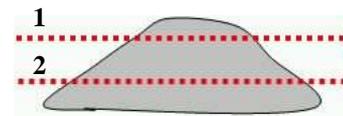
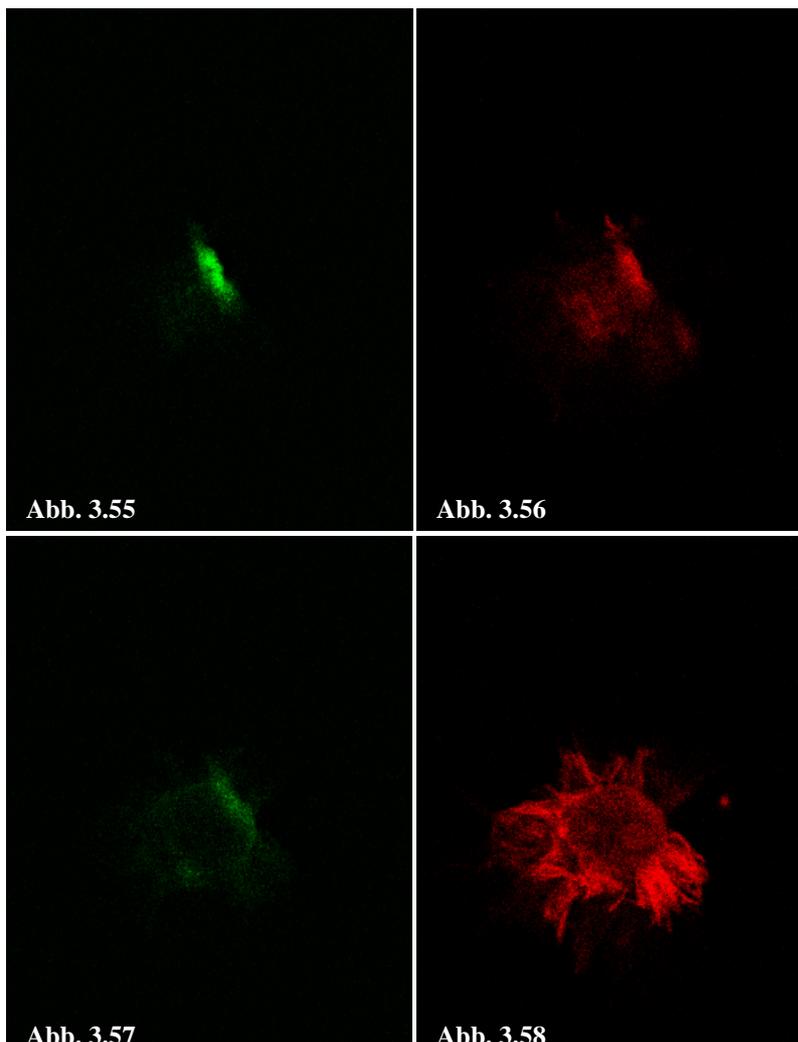


Abb. 3.54-3.58:

Manduca sexta L5 d2-3
Plasmotocyt im Monolayer
Typ II, 10 min Inkubation vor
der Fixierung.
Immunhistochemie mit
Antikörper #78 und
FITC@Mouse sowie TRITC-
konjugiertem Phalloidin

▲ Abb. 3.54:

Lage der optischen Schnitte

Abb. 3.55:

Optischer Schnitt in Höhe 1,
Aufnahme der Grünfluoreszenz
(FITC)

Abb. 3.56:

Optischer Schnitt in Höhe 1,
Aufnahme der Rotfluoreszenz
(TRITC)

Abb. 3.57:

Optischer Schnitt in Höhe 2,
Aufnahme der Grünfluoreszenz
(FITC)

Abb. 3.58:

Optischer Schnitt in Höhe 2,
Aufnahme der Rotfluoreszenz
(TRITC)

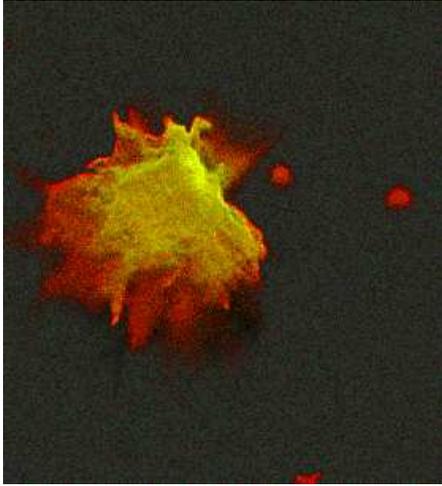


Abb. 3.59: *Manduca sexta* L5 d2-3 Plasmacyt im Monolayer Typ II, 10 min Inkubation vor der Fixierung. Immunhistochemie mit Antikörper #78 und FITC@Mouse sowie TRITC-konjugiertem Phalloidin
Dreidimensionale Rekonstruktion zu den Abb. 3.54 bis 3.58)

3.9. FACS-Analyse von *Manduca sexta* Hämocyten:

Mit Hilfe des FACS wurden freischwimmende, nicht auf einer Oberfläche anhaftende Hämocyten auf Fluoreszenzmarkierung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass mit Antikörper #78 behandelte Hämocytenproben (Abb. 3.60) im Vergleich zu jenen, die mit Antikörper #75 behandelt wurden (Abb. 3.61), eine wesentlich geringere Anzahl fluoreszenzmarkierter Zellen enthielten.

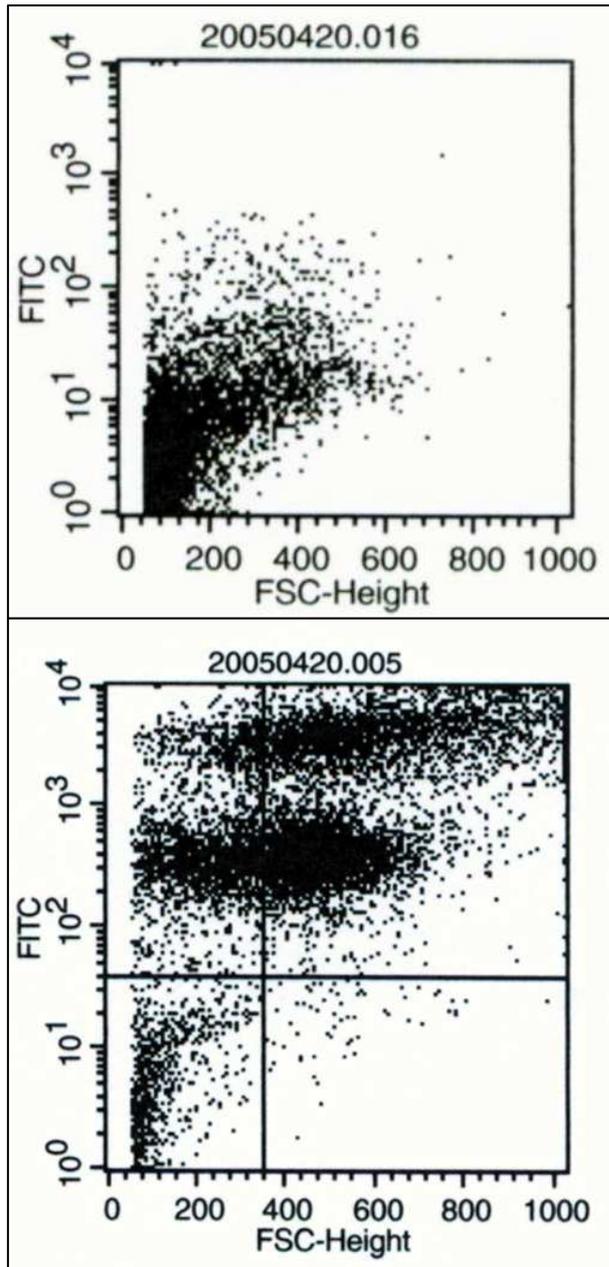


Abb. 3.60: *Manduca sexta* L5d2-3, Tier 1; FACS-Messung mit #78 behandelter Hämocyten; Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zellgröße. Im relevanten (oberen) Bereich sind nur vereinzelte Signale erkennbar.

Abb. 3.61: *Manduca sexta* L5d2-3, Kontrolle; FACS-Messung mit Antikörper #75 behandelter Hämocyten; Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zellgröße. Im relevanten Bereich sind zahlreiche Signale vorhanden.

3.10. Ergebnisse des Western-Blots:

Nach der optischen Überprüfung des Vorkommens des Zielproteins zu Antikörper #78, bei der es nicht möglich ist, Angaben über das Molekulargewicht zu erhalten, wurden Western-Blots durchgeführt, die diese Lücke schliessen sollten.

3.10.1. Western-Blot diverser Organlysate von *Manduca sexta*:

Der Western-Blot diverser Organlysate (Fettkörper, Darm, Malpighi'sche Gefäße, Nerv, Spinndrüse und Trachee) sowie Zelllysate aus Hämocyten von *Manduca sexta* L5 d2-3 zeigte, mit Ausnahme der Malpighi'schen Gefäße, eine Bande auf je etwa 36 kD. Die deutlichsten Banden brachten das Lysat aus Malpighi'schen Gefäßen und Nerven (Ganglienkette des Bauchmarks). Keine klare Bande ergab sich für den Darm. Hier entstand eine undifferenzierte Wolke, die etwa ab 36 kD begann (Abb. 3.62).

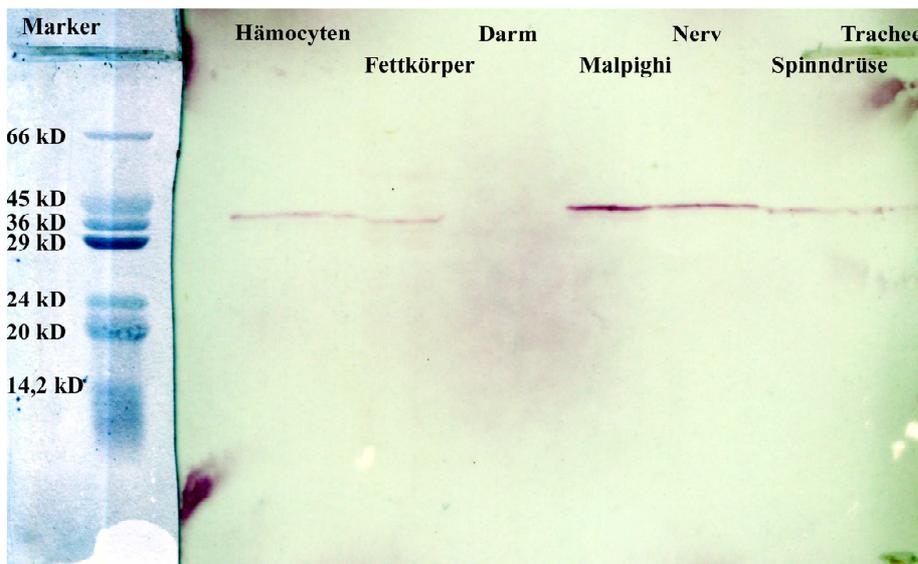


Abb. 3.62: Nachweis von Annexin IX in diversen Organlysaten (Fettkörper, Darm, Malpighi'sche Gefäße, Nerv, Spinndrüse und Trachee) sowie Hämocyten (HC) von *Manduca sexta* L5d2-3 mit Antikörper #78 und ALP-konjugiertem @Mouse-Antikörper mit BCIP/NBT-Entwicklung auf einem Western Blot.

3.11. RT-PCR:

Um das Vorkommen und eine eventuelle Verteilung der vermuteten Isoformen von Annexin IX innerhalb der Gewebe zu überprüfen, erwies sich der bisher verwendete Antikörper #78 als nicht nützlich, da er an alle drei vermuteten Isoformen zu binden vermag. Diese Isoformen unterscheiden sich allerdings in der Länge ihrer jeweiligen mRNA, so dass der Vorgang der RT-PCR genutzt wurde, um hier eine Identifizierung zu ermöglichen.

3.11.1. RT-PCR mit aus diversen Organen und Eiern von *Manduca sexta* sowie Hämocyten von *Acherontia atropos* extrahierter RNA:

Als Ergebnis der RT-PCR der aus den einzelnen Organen extrahierten RNA mit den Primern PKL und PR (siehe 2.11.6) resultieren bei den meisten Organen (und Hämocyten), mit Ausnahme des Darms, drei mehr oder weniger gut erkennbare Banden von etwa 150, 300 und 500 bp Länge. Aus der dem Mitteldarm extrahierten RNA ergab sich eine schwache Bande bei etwa 150 bp. RNA aus Muskulatur und Spinndrüse erbrachten bei 150 bp starke Banden, während die Banden bei 300 und 500 bp undeutlich erscheinen (Abb. 3.63 und 3.64).

Die für die RT-PCR genutzte RNA aus den Eiern (d0 bis d3) ergab drei cDNA-Fragmente der Größen 150, 300 und 500 bp, wobei diese als Banden bei den Proben Eier d0 und Eier d1 am deutlichsten zu erkennen waren (Abb. 3.64). Aus *Acherontia atropos* Hämocyten extrahierte RNA erbrachte eine Bande bei 150 bp sowie einen die Längen von 300 bis 500 bp umspannenden Bereich (Abb. 3.64).



Abb. 3.63: Darstellung der RT-PCR-Produkte aus verschiedenen Organen von *Manduca sexta* mit spezifischen Primern für AnxB9:

Die aus der für die RT-PCR eingesetzten RNA resultierende cDNA von fast allen getesteten Organen (Nerv, Hämocyten, Trachee, Muskel, Herz, Spinndrüse, Malpighi'sche Gefäße) erbringt drei mehr oder weniger deutliche Banden in Höhe von etwa 150, 300 und 500 bp (vergl. Abb 3.64.). Die aus extrahierter RNA des Mitteldarms resultierende cDNA zeigt eine schwache Bande in der Höhe von etwa 150 bp.

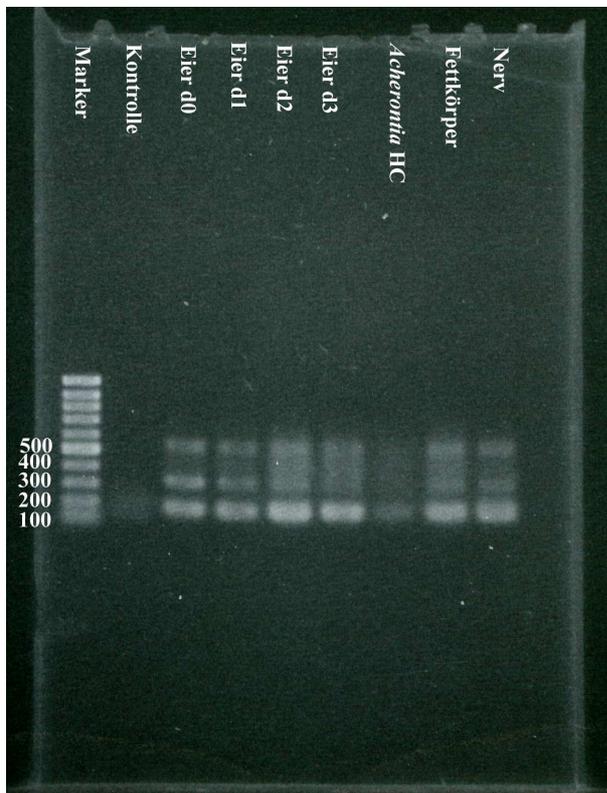


Abb. 3.64: Darstellung der RT-PCR-Produkte aus verschiedenen Organen von *Manduca sexta* mit spezifischen Primern für AnxB9:

Bei allen Proben von *Manduca sexta* (Eier d0 bis d3, Fettkörper, Nerv) treten drei Banden in Längen von etwa 150, 300 und 500 bp auf. Aus *Acherontia atropos* Hämocyten gewonnenen Probe eine deutliche Bande im Bereich um 150 bp sowie einen undeutlichen Bereich zwischen 300 und 500 bp.

3.11.2. RT-PCR parasitierter Larven:

Die für die RT-PCR genutzte RNA aus Hämocyten von durch *Cotesia congregata* parasitierten *Manduca sexta*-Larven (P1 bis P3) erbrachte unter Verwendung der Primer PKL und PR (siehe 2.11.6.) drei Banden in den Größen 150, 300 und 500 bp, die den Banden der als Positivkontrolle genutzten RNA aus den Hämocyten unparasitierter Tiere entsprachen (Abb. 3.65).

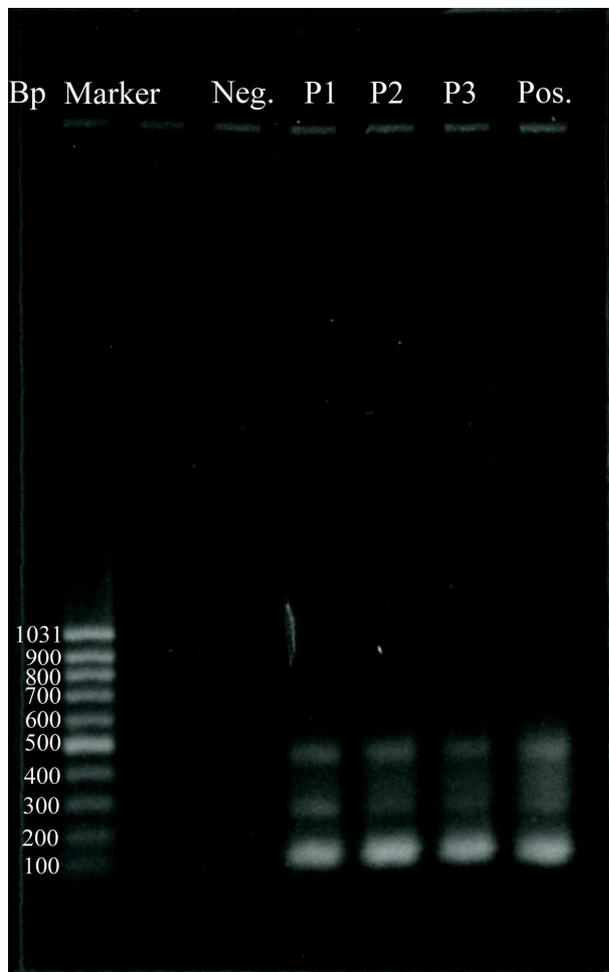


Abb. 3.65: Darstellung der RT-PCR-Produkte mit spezifischen Primern für AnxB9:

Die verwendete Hämocyten-RNA der drei parasitierten Tiere (P1 bis P3) bringt ebenso wie die Positivkontrolle (Pos.; RNA aus Hämocyten nicht parasitierter Tiere) drei Banden von ca 150 bp, 300 bp und 500 bp Länge. (Neg. =Negativkontrolle)

3.12. Sequenzierungen und anschließender BLAST:

Um die Identität der durch die durchgeführte RT-PCR erhaltenen cDNA Fragmente zu verifizieren, wurden sie sequenziert und einem Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank unterzogen.

3.12.1. Sequenzierung und anschließender BLAST des 500 bp cDNA-Fragments von *Manduca sexta*:

Die Sequenzierungen des ca. 500 bp großen , aus der RT-PCR gewonnenen cDNA-Fragments von *Manduca sexta* erbrachte Sequenzen (Abb. 3.66 und 3.67), die bei einem BLAST mit der NCBI-Datenbank Übereinstimmungen mit *Manduca sexta* Annexin IX-Isoformen A, B, und C zeigten. Weiterhin traten mit einer geringeren Trefferquote Übereinstimmungen mit Annexin IX von *Bombyx mori* in seinen Isoformen auf (Tab. 3.1 und 3.2).

```

ACCTN  GGACG  CTNCG  CGNNT  TNNAG  TCTCC  TTGAA  TNNNC  GNNAC
CCCTN  GTAGA  GNTGG  NTCGC  CGTTG  ANCTG  CANGN  TGGAC  TNCAT
TGANG  TGTTN  NGNNC  CCNNA  NTGCN  NAGGC  TNACN  NNNAG  TTTGA
TCTAG  CACNN  NGAGT  GGANT  AGTTA  CNTTC  CTGCA  ANNCA  CCGGT
NAGGT  CATCN  GCTAN  CCAGC  TCTCC  AGGGG  CTTGC  CGGAT  TTGTC
AAGGA  ATGCC  TGTTT  GATGT  CCCCC  AGGNC  NATCT  CGGAG  CGGNT
GACCA  CGATT  CTGAT  NANAT  NNN

```

Abb. 3.66: Erhaltene Teilsequenz des ca. 500 bp großen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PKL

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gij58864719 emb AJ863121,1	<i>Manduca sexta</i> mRNA for putative annexin IX-C	163	4,00E-37
gij58864723 emb AJ863123,1	<i>Manduca sexta</i> partial mRNA for putative Annexin IX-A	153	3,00E-34
gij58864721 emb AJ863122,1	<i>Manduca sexta</i> mRNA for putative annexin IX-B	153	3,00E-34
gij7262488 dbj AB030496,1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-A, complete cds	81,8	1,00E-12
gij7262492 dbj AB030498,1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-C, complete cds	79,8	4,00E-12
gij10801569 dbj AB041637,1	<i>Bombyx mori</i> EN16b mRNA for annexin, complete cds	77,8	2,00E-11
gij10801567 dbj AB041636,1	<i>Bombyx mori</i> EN16 mRNA for annexin, complete cds	77,8	2,00E-11
gij7262494 dbj AB031208,1	<i>Bombyx mori</i> gene for annexin IX-C, annexin IX-B, annexin IX-A	77,8	2,00E-11
gij7262490 dbj AB030497,1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-B, complete cds	77,8	2,00E-11
gij1628081 emb Z81107,1 CER07H5	<i>Caenorhabditis elegans</i> Cosmid R07H5, complete sequence	40,1	3,50
gij4902764 emb AL049550,5 HSDJ90L14	Human DNA sequence from clone RP1-90L14 on chromosome 6	40,1	3,50

Tab.3.1: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 500 bp grossen cDNA-Fragments (Abb.X)

GNNGA	GNGGG	TGGGG	GGGGA	NCCCT	TTNCN	NTANC	AGTAA	CGCGT
GTTTG	AAGTC	GCCCT	TCGTA	TCGTC	ACTGC	ATNCC	ATTAT	TCGNN
GNNCN	TGCCG	TNNNT	NATAC	AGNNT	GTGNA	TGCTT	TAGAT	CNTAC
NCCGT	AGGAC	AATCN	TCGNC	AGCGT	GCTGA	CTCAC	NGANA	CNGAT
GAACA	GNCTT	GTCTG	TAAGC	NCGAT	GCCAG	GAGCA	GACNA	ACCCG
TCAAG	NCGCG	ACANC	GGAGT	GTTGG	CGGNT	GTCNN	GGCNN	AGCCN
TGACC	CANNC	NCGNA	NCGAN	AACNG	ANAGA	ATAAT	NANAT	GAAGN
ACNAA	GNGNC	CTCAG	NGATA	CCCCT	AGAAC	CCNGN	TTTAN	NGTCN
TGANC	CTNAA	GNATN	CTTAG	TNTGA	AAANN	NGAAC	ANNAN	TACGA
AANAG	NANCT	AGANA	ANNCT	NCNGG	NANCA	GNCTT	ATCNA	NAATA
NAANN	CATNA	NAAAT	TCTGA	NCATG	NTGGN	CNGAN	CCGTT	TTATA
ANNGC	GTNAT	ANNCG	NGTNN	CGACT	GNCAN	NAAGN	CGNTA	NNANT
ANTAN	NCANA	NANGG	TGTNT	AGGAT	TATGA	NTNNN	CCAAT	AATNN
NNNTA	NTTTA	NGNGA	GNTTA	NGTNN	AGGTT	TNNCG	GGANC	NNTAA
GANCN	NTAAN	TGGGA	GGANT	TNGAN	AGTGC	ATANC	TCTGA	CTNNN
TNANN	ATANG	CNANT	ATTNG	NATGC	TNNAN	GTANA	NTNAN	TGACN
NGCGN	NTAGN	ANANT	AAGAN	NGNAG	GTNNG	CATGG	TGTNA	GNTNT
ANNTT	NNTCG	GAGNT	GNNGA	TNNNN	NNTNG	NNTAN	NNNGA	GGNGG
GAATN	NAGAN	NANGN	CTANG	NNNTN	NNTTT	GGGAG	ATACG	NNNGG
ATGTC	TATGC	NTGNA	NNANN	ATNNT	GTNAN	TTCTN	NNTTA	NGNNA
CGCNN	GACAG	AAAAT	AGNTN	ANNAC	TCNGT	NNAAT	GNN	

Abb. 3.67: Erhaltene Teilsequenz des ca. 500 bp großen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PR

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gj 58864723 emb AJ863123,1	Manduca sexta partial mRNA for putative Annexin IX-A	73,8	9,00E-10
gj 58864721 emb AJ863122,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-B	73,8	9,00E-10
gj 58864719 emb AJ863121,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-C	73,8	9,00E-10

Tab.3.2: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 500 bp großen cDNA-Fragments (Abb.3.67)

3.12.2. Sequenzierung und anschließender BLAST des 300 bp cDNA-Fragments von *Manduca sexta*:

Die Sequenzierungen des ca. 300 bp großen cDNA-Fragments von *Manduca sexta* erbrachte Sequenzen (Abb.3.68 bis 3.70), die höchsten Übereinstimmungen mit *Manduca sexta* Annexin IX-Isoformen A, B, und C zeigten (Tab. 3.3 bis 3.5), gefolgt von *Bombyx mori* Annexin (IX) (Tab.3.4).

NNNGA	NCGNT	AAGCG	ANCTT	TCAGG	TCTCC	CTTNG	ANATN	TNCCT
GCAGA	CCNTG	NTTGA	NACTN	NTCNC	CGTAT	NCGCA	GCAAC	GGTGG
CNATN	CTNAA	CNANA	TNTTC	NTATN	NNNNT	GNNNG	CTCTT	GANGN
NNTGN	TNGNN	NNANC	ANNNN	GNGNN	GANNN	NTNCG	TTCNN	GANNN
CACCG	GTCNN	GNCAN	CNGCT	ANCCA	GCTCT	CCANG	GGNTT	GCCGG
ANTNN	NCAAG	GNNTG	CCTGN	TTGAT	GTCCC	CGANG	NCCAT	CTCGN
AGCGG	NTGAA	CCACA	NTNCT	TATNA	NAANN	N		

Abb. 3.68: Erhaltene Teilsequenz des ca. 300 bp grossen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PKL

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
gj 58864723 emb AJ863123,1	Manduca sexta partial mRNA for putative Annexin IX-A	60	4,00E-06
gj 58864721 emb AJ863122,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-B	60	4,00E-06
gj 58864719 emb AJ863121,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-C	60	4,00E-06

Tab.3.3: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 300 bp großen cDNA-Fragments (Abb.3.68)

CCTNN	NNNNN	NCGCT	CNAAA	NCGAC	CTCGG	GGTAC	ATCAA	ACAGG
CATTC	CTTGA	CAAAT	ACNGC	AAGCC	CCTGG	ANAGC	TGGCA	TCGCT
GACGA	CCTGA	CTGGN	GACTT	CCGGA	ATNTG	ACTAG	TGCAC	ANTCT
TGTGN	TACAT	CCCTG	CTANC	CCNAT	ACGAG	CNACT	TGCTT	NTNTA
TNAAC	NTTAT	GNCNA	AAGCT	GACAN	GCNCN	TCNNG	ACCCC	TCAA
CNGGT	CCTNC	NGATN	TGTNA	ATGGG	CTCAN	CCCNA	ACACC	NTNNC
NCNTA	ACNNT	ACCCC	GGTGT	NTTNA	TNCTN	AGAAN	NACTN	AAATN
GNCCT	CCATT	TACTA	CNCNT	TNTGT	TTNNC	TNCCT	CTTCT	GNCTN
NNNTT	GGTTN	ANTNN	NTTCN	CATTG	ATACT	NTTTN	NGNNN	ANTCG
TTNGG	GCTNN	ATGAA	GATTN	ANGNT	ATNAN	CCCTC	CNCTG	NGNNN
GCNTN	NTATT	NNAGN	AGNNG	NTTCC	TCTNN	NNANG	CNCAT	TNANN
AANGA	NNNNA	GANNC	GGNAN	TNTNA	GGCNG	CCNCG	CTNNT	TNNCC
CNATA	ANGAG	NGANN	AANNN	NGTNN	TNGCN	GNAAN	CTCNN	TANCT
NTNTA	CCCTT	NNNNC	CAANT	NTTTA	ATGGG	NGAAG	NCAAC	NGCNC
NTTTT	NTNTN	TNTAA	ACGAT	AGNNT	ATTAA	TGNAN	GNNGN	TTTTT
CGTGT	GTAAA	ANGNC	CTTNN	CATCG	AGNNN	TAGAN	GNNAG	NCCNC
NTNTN	GANNA	CCNNA	NTANT	NNGAN	GACAN	NAGGT	NNACN	NACNG
TTCNT	NTTAT	TAGCA	TNTGG	NNCAN	TNANG	NNAAC	CTTTN	GNNGA
GNGTN	NTGTG	TGCAA	NTNAN	TCATT	ACNCA	TATNC	TTNNN	NGGNN
NGANN	NGCTA	CNGAN	TATNT	NNTNT	NACNT	NNNTN	CCTAN	CATAT
CANNA	ATNNT	CGTNN	CATTG	TAGAA	TTGTA	TANNN	TNT	

Abb. 3.69: Erhaltene Teilsequenz des ca. 300 bp großen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PKL

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gi 58864719 emb AJ863121,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-C	125	3,00E-25
gi 58864721 emb AJ863122,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-B	97,6	6,00E-17
gi 58864723 emb AJ863123,1	Manduca sexta partial mRNA for putative Annexin IX-A	95,6	2,00E-16
gi 7262492 dbj AB030498,1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-C, complete cds	50,1	0,012
gi 10801569 dbj AB041637,1	Bombyx mori EN16b mRNA for annexin, complete cds	48,1	0,049
gi 10801567 dbj AB041636,1	Bombyx mori EN16 mRNA for annexin, complete cds	48,1	0,049
gi 7262490 dbj AB030497,1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-B, complete cds	48,1	0,049
gi 56787647 gb AC153509,3	Mus musculus 10 BAC RP23-60H16	42,1	3
gi 25013348 gb AC079680,34	Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 10 clone rp23-282p18	42,1	3
gi 7262488 dbj AB030496,1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-A, complete cds	42,1	3

Tab.3.4: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 300 bp grossen cDNA-Fragments (Abb.3.69)

GGNAA	NTNTG	GNGGG	AANCC	NCAAN	NCATT	NTGTA	GCGCG	TGTTT
NTAAG	TCGAN	CCTTC	NNATC	GTCCT	GCAAG	ACCAT	GTATT	CGTAC
TTTGT	AGCGT	TCCNC	AACAA	CNTGC	GTAAN	TCTTC	AACCA	ANTNT
TCATA	TANAA	GNANC	GTGCT	CNNCA	TGNCN	TNANT	NNCTN	NCTTT
CCACA	NTNGN	GAGGC	TANGG	ACACA	CNCTC	NNAGG	GGCNC	NCCCG
TNCNN	TCACN	CAATA	NATAG	NGGAT	CNANC	CCGAT	NGCNG	GGNNC
NNAAA	NNNAA	AAANN	TGNAN	CCNAT	TCCNC	TATTN	NNAGA	GAAAA
NAAAA	AAANN	CANNT	NNTTG	NNANN	ACANA	NACAC	CNNGG	ATGGG
GNAGC	NAAAN	CCCNT	TTAAN	ANNCC	NGCTA	TATTN	TGGNC	GTNTT
TTNGN	NGANN	CNNNN	NNAGT	TGTTG	TGTNN	CANAN	GANGG	AGTNA
ATGCN	NTNTA	NNNAA	NGAAN	TCAGA	AGNNG	ATAAT	AAAGT	GTANT
TNCNN	GNNNN	NANAA	ANTCA	NGANA	NGNNN	NCTTN	GNNNN	ANAAC
CGCNG	TNNGN	NTNAA	GANAN	ANTCT	GATGA	CANTN	NTNAN	CCCNG
CNNTA	TAGNC	NAATN	ANANN	GGCNT	NTTGT	CGTGN	GTNGA	NANCA
NAANN	TNGGN	NAAGG	GCGGT	CAANN	NAGAC	CAGTC	NCNTN	NNTGG
GGGNT	NNGNN	TGNNN	NNNTN	TTNTC	NTGNN	TTTTN	AANTA	GTGTG
GTNGG	CNCNC	TAGGT	GNAGT	NNNNG	TNNNA	NTGTT	TCGTN	NTNNT
CNNNG	AGTAT	AANAT	GTTNN	GNGTA	TCCTG	GCCGG	GTTAT	NTATA
GTNTN	ATGNN	ATTTA	NGNAG	TCTNT	ATCTA	TTCCT	CNTCT	NATGT
ANTTT	TGCNT	TGAGN	TANGN	CTGNN	TTNGN	CNNTG	TTANG	TNGNN
ACATT	NGGNA	ATTAA	GTTNG	GTGNN	NNNAG	ACCCA	TCC	

Abb. 3.70: Erhaltene Teilsequenz des ca. 300 bp grossen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PR

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gi 58864723 emb AJ863123,1	Manduca sexta partial mRNA for putative Annexin IX-A	48,1	0,049
gi 58864721 emb AJ863122,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-B	48,1	0,049
gi 58864719 emb AJ863121,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-C	48,1	0,049

Tab.3.5: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 300 bp grossen cDNA-Fragments (Abb.3.70)

3.12.3. Sequenzierung und anschließender BLAST des 150 bp cDNA-Fragments von *Manduca sexta*:

Die aus dem ca. 150 bp großen cDNA-Fragment von *Manduca sexta* über SEQLAB ermittelten Sequenzen (Abb. 3.71 und 3.72) ließen sich über einen Datenbankvergleich mit NCBI mehreren Einträgen zuordnen (Tab. 3.7 und 3.8). An der Spitze dieser Einträge befand sich mit jeweils den höchsten Trefferquoten *Manduca sexta* Annexin IX in seinen Isoformen, gefolgt von *Bombyx mori* Annexin IX.

NTTTG	AAANN	TTTNC	CGCTC	TAGNC	GANCT	CGTGG	GTNAT	CAAAC
AGGCA	TTCCT	TGACA	AATAC	GGCAA	GCCCC	TGGAG	AGCTG	GATCG
CCTGC	ACGAT	ACGAA	GGGGC	GACTT	CAAAC	ACGTC	GATGT	NNCTG
ACCCT	AGNTG	TCGTN	ANNGG	TCGTC	CTTCN	CCTTT	ATACT	ATTGG
TNNNN	CACTT	CNCGG	NTTTT	GTTNA	TAAAT	TNTNN	ANGGN	GGGGN
NGNNC	NNTAN	ACCTC	NCAAC	NCNTN	CCTNN	TNCCT	GCGNC	CAANT
CCCNN	ACNGT	NNTNC	ANNNN	NNCNT	TTCNN	NNNGN	NCNCN	NTNGT
ACCAT	TANNG	TCGTC	TANAG	TCNCA	NNTGA	GGGTG	NGNNC	TNNGC
GCCTT	TNCTT	GNNNN	NGNAN	TNCTT	NNGNT	TNCTT	NNCGT	TCNNG
NTCGN	ANTGC	AANNA	NTGTA	NGTNT	GNTNC	NNNTA	NTTAN	GANNC
AGTCT	TNGAN	TATTA	TCNAG	AAATC	TATGT	NNNTC	TTCTT	GNNCN
TNNNC	GNNCN	NTCCA	CTNTN	TATAN	TNTNN	ACNNC	ANANT	CTNAN
NTANA	NTACG	NANNT	CGTAN	GGCGT	NGGNA	GCGCN	NNACN	NCNTN
NTCTG	TANTN	CGNNN	GCGAT	GANNG	TANGN	NNTGC	TCNAT	GTNNN
NCAAT	TTACN	AACTG	NAGCT	TGGTT	NGGAN	GNACN	NAGCG	CANNT
CTCNN	NCNAC	NATAN	TGNCA	CNNTG	GNTCT	NGNCN	NTGTA	GTNCT
NNTTT	TANNG	TNNGC	NTTTG	TNTAT	ATCNN	ANTAG	NTGAT	NTATA
NCGGC	NCNNN	AGCNC	NCNNG	NANTA	TCTAC	GACTN	ANNCT	CGANT
TAGNA	ATGTG	GGNAA	CNNCA	NNANN	TTACN	ACTGN	CTTCN	NNCTT
NCATC	NTNGC	NNTGN	CNCNN	TGNAT	TGANN	NNNNT	NTCNA	NNNNC
ANTCC	NTTAG	NTCNC	ACANT	NNTTG	TCTCG	NCTAT	NTT	

Abb. 3.71: Erhaltene Teilsequenz des ca. 150 bp grossen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PKL

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gi 58864723 emb AJ863123,1	<i>Manduca sexta</i> partial mRNA for putative Annexin IX-A	105	2,00E-19
gi 58864721 emb AJ863122,1	<i>Manduca sexta</i> mRNA for putative annexin IX-B	105	2,00E-19
gi 58864719 emb AJ863121,1	<i>Manduca sexta</i> mRNA for putative annexin IX-C	105	2,00E-19
gi 10801569 dbj AB041637,1	<i>Bombyx mori</i> EN16b mRNA for annexin, complete cds	58	5,00E-05
gi 10801567 dbj AB041636,1	<i>Bombyx mori</i> EN16 mRNA for annexin, complete cds	58	5,00E-05
gi 7262494 dbj AB031208,1	<i>Bombyx mori</i> gene for annexin IX-C, annexin IX-B, annexin IX-A	58	5,00E-05
gi 7262492 dbj AB030498,1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-C, complete cds	58	5,00E-05
gi 7262490 dbj AB030497,1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-B, complete cds	58	5,00E-05
gi 7262488 dbj AB030496,1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-A, complete cds	58	e-05
gi 56787647 gb AC153509,3	<i>Mus musculus</i> 10 BAC RP23-60H16	42,1	3
gi 25013348 gb AC079680,34	<i>Mus musculus</i> strain C57BL/6J chromosome 10 clone rp23-282p18	42,1	3

Tab.3.7: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 150 bp grossen cDNA-Fragments (Abb.3.71)

CTTAA	CANAN	NNTNT	ATACA	TATCA	GTAAC	GCGTG	TTTGA	AGTCG
CCCTT	CGTAT	CGTCA	GCGAT	CCAGC	TCTCC	AGGGG	CTTGC	CGTAT
TTGTC	AAGGA	ATGCC	TGTTT	TGATG	TCCCC	GTAGG	TCGAT	CTCGG
AGCGG	TTGNA	CCTCG	ATTCT	NNATG	AATGN	NAAAT	TANTG	NNCCN
TCNGN	TCNTT	NANCT	TTTGT	GNTGN	NGNGG	NNNTN	ATCNN	NNATA
ANAAA	NAANT	NCNNC	NNGNT	CCNTN	NNNTT	GNGNT	TATNT	NANNN
NNNNT	TNTAA	ANGAT	NNNGC	NGNTA	GNNGN	NGCNN	GNGAG	AAGNN
CCGTT	NNATT	ACNGN	NCCCN	TTTNN	NNNNT	CNCGC	TATTT	NCTNN
NTNNC	ACTCT	CTNGT	NCTNG	NTTNA	TNNAN	AGTTN	AGATA	NTNNA
TTAGN	ANNAN	NAANN	NTNTN	AAANA	AGNAA	TTTAC	TTANA	TATTT
ANNCN	CANTT	CNTAG	NTTAN	CNTTN	TAANN	AGCAN	CANGT	AGANN
TACNA	TNNCT	NTCGA	NANGN	ANANN	ANATA	NCAAA	NTACA	ANNAT
NNTCT	GNCAG	TTNTG	GTNNN	CCNNN	NAANG	AGNNC	GAGNN	NNAAG
AAANN	NTNTG	TAANA	CAATN	CTACA	NAAAN	TAAAN	AANAT	AANNN
NNNTT	TNGAN	AACTT	TGTNC	ATTAA	TATNN	NAGGT	NNTCG	AGCNN
CCNNN	AATAG	ANAGA	NNCNT	NNGTN	ATNNN	TTAAT	AAGAC	NANAN
NTNAT	AGTNA	ATNCA	TNNCN	ATTAA	NATTT	GATAA	AGANC	NNANA
GGATC	GATAG	NAATN	NTTGN	NNNAG	NTNNN	ATNTA	TGATT	AACAT
TTNAA	TNNAN	NNNNN	NNCCG	TNGNC	CNCAA	NAGNC	AGNNN	TTCAG
NCAAG	AGNNG	NATTA	GACAN	NNGNN	GNACA	AAAAT	NACGN	ANNAC
TGCAT	GTACN	TTGGT	ATCAT	TNNTT	NNTNN	CNTNA	TNT	

Abb. 3.72: Erhaltene Teilsequenz des ca. 150 bp grossen cDNA-Fragments von *Manduca sexta*. Genutzter Primer: PR

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(Bits)	Value
gi 58864721 emb AJ863122,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-B		133	1,00E-27
gi 58864719 emb AJ863121,1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-C		133	1,00E-27
gi 58864723 emb AJ863123,1	Manduca sexta partial mRNA for putative Annexin IX-A		131	4,00E-27
gi 10801569 dbj AB041637,1	Bombyx mori EN16b mRNA for annexin, complete cds		91,7	4,00E-15
gi 10801567 dbj AB041636,1	Bombyx mori EN16 mRNA for annexin, complete cds		91,7	4,00E-15
gi 7262490 dbj AB030497,1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-B, complete cds		91,7	4,00E-15
gi 7262492 dbj AB030498,1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-C, complete cds		85,7	2,00E-13
gi 7262488 dbj AB030496,1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-A, complete cds		85,7	2,00E-13
gi 7262494 dbj AB031208,1	Bombyx mori gene for annexin IX-C, annexin IX-B, annexin IX-A		83,8	9,00E-13

Tab.3.8: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 150 bp grossen cDNA-Fragments (Abb.3.72)

3.12.4. Sequenzierung und anschließender BLAST des 150 bp cDNA-Fragments von *Acherontia atropos*:

Die aus dem ca. 150 bp großen cDNA-Fragment von *Acherontia atropos* über SEQLAB ermittelten Sequenzen (Abb.3.73 und 3.74) ließen sich über einen Datenbankvergleich mit NCBI mehreren Einträgen zuordnen (Tab. 3.9 und 3.10). An der Spitze dieser Einträge befand sich mit jeweils den höchsten Trefferquoten *Manduca sexta* Annexin IX in seinen Isoformen.

```
TCTGA GATCG ATCTC GGAGA CATCA AACAG GCATT CCTTG ATAAA
TACNT NAAGC CTCTG GAGAG CTGGA TNNTC GACNN NCTAA NNGAG
NCTNN NNN
```

Abb. 3.73: Erhaltene Teilsequenz des ca. 150 bp grossen cDNA-Fragments von *Acherontia atropos*.
Genutzter Primer: PKL

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
gij58864723 emb AJ863123.1	<i>Manduca sexta</i> partial mRNA for putative Annexin IX-A	83.8	7,00E-14
gij58864721 emb AJ863122.1	<i>Manduca sexta</i> mRNA for putative annexin IX-B	83.8	7,00E-14
gij58864719 emb AJ863121.1	<i>Manduca sexta</i> mRNA for putative annexin IX-C	83.8	7,00E-14
gij9717070 emb AL354872.9	Human DNA sequence from clone RP11-42015 on chromosome 1	40.1	1,0
gij4902764 emb AL049550.5	Human DNA sequence from clone RP1-90L14 on chromosome 6	40.1	1,0
gij27644198 emb BX070917.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27637400 emb BX064119.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27637399 emb BX064118.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27636301 emb BX063020.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27636300 emb BX063019.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27630940 emb BX057659.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27630939 emb BX057658.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27619409 emb BX046128.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27619408 emb BX046127.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27613725 emb BX040444.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27613724 emb BX040443.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27613269 emb BX039988.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27613268 emb BX039987.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27610547 emb BX037266.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27599816 emb BX026535.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27599815 emb BX026534.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27571834 emb BX022614.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27561764 emb BX012544.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij27556260 emb BX007040.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Anopheles gambiae</i> total adult females	38.2	4,0
gij67971605 dbj AB179094.1	<i>Macaca fascicularis</i> testis cDNA clone	38.2	4,0
gij57948270 ref XM_559575.1	<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST ENSANGP00000025824 (ENSANGG00000012811)	38.2	4,0
gij58380156 ref XM_310347.2	<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST ENSANGP00000015300 (ENSANGG00000012811)	38.2	4,0
gij58380154 ref XM_310346.2	<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST ENSANGP00000022779 (ENSANGG00000012811)	38.2	4,0
gij57948221 ref XM_559572.1	<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST ENSANGP00000027336 (ENSANGG00000012811)	38.2	4,0
gij58375267 ref XM_306951.2	<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST ENSANGP00000024933 (ENSANGG00000020736)	38.2	4,0
gij29823246 emb AL731767.18	Mouse DNA sequence from clone RP23-338L13 on chromosome 2	38.2	4,0
gij10801569 dbj AB041637.1	<i>Bombyx mori</i> EN16b mRNA for annexin, complete cds	38.2	4,0
gij10801567 dbj AB041636.1	<i>Bombyx mori</i> EN16 mRNA for annexin, complete cds	38.2	4,0
gij7262494 dbj AB031208.1	<i>Bombyx mori</i> gene for annexin IX-C, annexin IX-B, annexin IX-A	38.2	4,0
gij7262492 dbj AB030498.1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-C, complete cds	38.2	4,0
gij7262490 dbj AB030497.1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-B, complete cds	38.2	4,0
gij7262488 dbj AB030496.1	<i>Bombyx mori</i> mRNA for Annexin IX-A, complete cds	38.2	4,0

Tab.3.9: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 150 bp grossen cDNA-Fragments von *Acherontia atropos* (Abb. 3.73)

CACTA TACAG TATCT CTATT AACGC GTGTT TGAGT CTCCC TTCGA
 TCGTC AGCTA TCCAG CTCTC CAGAG GCTTG CCGTA TTTAT CAAGG
 AATGC CTGTT TGATG TCTCC AGATC GATCT CACGG TGACA TTGAT
 A

Abb. 3.74: Erhaltene Teilsequenz des ca. 150 bp grossen cDNA-Fragments von *Acherontia atropos*.
 Genutzter Primer: PR

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gij58864721 emb AJ863122.1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-B	93.7	1,00E-16
gij58864719 emb AJ863121.1	Manduca sexta mRNA for putative annexin IX-C	93.7	1,00E-16
gij58864723 emb AJ863123.1	Manduca sexta partial mRNA for putative Annexin IX-A	91.7	5,00E-16
gij10801569 dbj AB041637.1	Bombyx mori EN16b mRNA for annexin, complete cds	60.0	2,00E-06
gij10801567 dbj AB041636.1	Bombyx mori EN16 mRNA for annexin, complete cds	60.0	2,00E-06
gij7262490 dbj AB030497.1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-B, complete cds	60.0	2,00E-06
gij7262492 dbj AB030498.1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-C, complete cds	54.0	1,00E-04
gij7262488 dbj AB030496.1	Bombyx mori mRNA for Annexin IX-A, complete cds	54.0	1,00E-04
gij7262494 dbj AB031208.1	Bombyx mori gene for annexin IX-C, annexin IX-B, annexin IX-A	52.0	4,00E-04
gij9717070 emb AL354872.9	Human DNA sequence from clone RP11-42015 on chromosome 1	40.1	1,5
gij4902764 emb AL049550.5 HSDJ90L14	Human DNA sequence from clone RP1-90L14 on chromosome 6	40.1	1,5
gij77735272 emb CT025157.6	Mouse DNA sequence from clone RP23-292D13 on chromosome 14	38.2	5,9
gij67971605 dbj AB179094.1	Macaca fascicularis testis cDNA clone: GtsA-12717	38.2	5,9
gij16924128 gb AC092811.2	Homo sapiens chromosome 1 clone RP11-496N12	38.2	5,9
gij60650546 gb AC154315.2	Mus musculus BAC clone RP23-34816 from chromosome 14	38.2	5,9
gij29339464 gb AE016935.1	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482	38.2	5,9
gij28201761 gb AC129664.7	Homo sapiens BAC clone RP11-237A9 from 4	38.2	5,9
gij22549627 gb AC126471.4	Homo sapiens 12 BAC RP11-629O19	38.2	5,9
gij29823246 emb AL731767.18	Mouse DNA sequence from clone RP23-338L13 on chromosome 2	38.2	5,9

Tab.3.10: BLAST des Ergebnisses der Sequenzierung des 150 bp grossen cDNA-Fragments von *Acherontia atropos* (Abb.3.74)

3.12.5. Direkter Vergleich einer aus den Sequenzierungen der ca. 150 bp großen Bande erhaltenen Sequenz mit der partiellen mRNA für *Manduca sexta* Annexin IX-A:

Der Sequenzvergleich über das NCBI Online-Tool bl2seq für Sequenz der 150 bp Bande (Abb.3.75) gegen gi 58864723 (Abb. 3.75) ergab eine Übereinstimmung (614 bp – 705 bp) im vorderen Bereich von gi 58864723, der mit dem Beginn des in dieser Sequenz noch vorhandenen Introns endete, sowie einen weiteren gemeinsamen Bereich (2168 bp – 2198 bp), der 146 Basenpaare hinter dem erwarteten C-Ende dieses Introns begann. Diese Bereiche gingen bei der aus der dritten Bande ermittelten Sequenz (Abb. 3.71) lückenlos ineinander über (12 bp – 106 bp und 106 bp bis 136 bp).

```

Query: 614 aatcgtgggtcagccgctccgagatcgacctcgggggacatcaaaca-ggcattcc-ttgac 671
          ||| | ||| |||| | |||| || || || ||||| ||||| ||||| ||| |
Sbjct: 12  aatggngggtnagccnntnnnagatnganctnggngacatnaaacaaggcattcccttgnc 71

Query: 672 aaatacggcaagccc-ctggagagctggatcgctg 705
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 72  aaatacngcaagcccgctggagagctggatcgctg 106

```

```

Query: 2168 gacgatacgaagggcgacttcaaacacgcgt 2198
           || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 106 gangatacgaagggngacttcaaacacgcgt 136

```

Abb. 3.75: Sequenzvergleich zwischen der durch Sequenzierung der dritten Bande erhaltenen Sequenz (Sbjct) gegenüber gi 58864723 (Query): Es treten Übereinstimmungen in den Bereichen 614 -705 und 2168 – 2198 bzw. 12 – 106 und 106 – 136 auf. Basenpaar 705 von gi 58864723 ist das Ende des vorderen, den drei Isoformen

3.13. Splice Site Vorhersage in gi 58864723 (*Manduca sexta* partielle mRNA für Annexin IX-A):

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der RT-PCR und der anschließenden Sequenzvergleiche wurde die in der NCBI-Datenbank hinterlegte Nukleotidsequenz von Annexin IX-A, die laut LESCH (2005) auch die Sequenzen der anderen beiden Isoformen enthält auf mögliche weitere Splice-Sites untersucht.

Die Splice-Site Vorhersage in gi 58864723 über das Online-Werkzeug des Berkeley Drosophila Genome Project ergab mehrere Donor-Sites mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten (Tab. 3.11). Die Site des höchsten Scores (0,79) geht mit der von Dr. Christine Lesch vorhergesagten Donor-Site des den gemeinsamen Teil der Isoformen beendenden Introns konform .

Die Berechnung der Acceptor-Sites zeigt ebenso mehrere Möglichkeiten auf, unter denen die drei, für die die drei höchsten Scores (0,86, 0,84 und 0,81) errechnet wurden, den von Dr. Christine Lesch angenommenen Splicing-Sites für die drei Isoformen entsprechen. Weiterhin wird eine Acceptor-Site mittleren Scores (0,65) angegeben, deren Lage mit dem Beginn der zweiten Übereinstimmung der aus der dritten Fragment-Bande ermittelten Sequenz und gi 58864723 übereinkommt.

Start	End	Score	Exon	Intron
291	305	0.41	aaccagggt	gtggac
536	550	0.73	gagcaagg	tggttt
698	712	0.79	gatcgtg	taagttg
1335	1349	0.56	ccgaatgg	tcaggat
1507	1521	0.45	gtgagatg	taaat
1559	1573	0.47	cggtcatg	taactct
2027	2041	0.61	ctgactgg	tgacttc
2386	2400	0.68	ctattatg	tatgta

Tab.3.11: Ergebnis der Berechnung möglicher, den Beginn eines Introns anzeigenden Donor-Sites in der Sequenz gi 58864723 (Anx BIX-A); die Site des höchsten Scores (0,79) entspricht der vorhergesagten, das den Isoformen gemeinsame Exon beendenden Splicing-Site.

Start	End	Score	Intron	Exon
593	633	0.70	aaatgataagaccctcatc	aJaatcgtgggtcagccgctccg
793	833	0.57	attgaaaatttatcagttt	aJtttgatggtgaatttaaagt
965	1005	0.74	tctatgttttatatttaat	aJaaatatataaactgacccat
1086	1126	0.78	taatataacttattatac	aJatctgtttataggaatattc
1098	1138	0.61	attatacagatctgtttat	aJgaatattcaagattagtat
1170	1210	0.66	atgtgttaattgttctaac	aJagaaaagcactaattggcat
1251	1291	0.86	cagaatccgttttgattgc	aJgacgacacttccggggatta
1390	1430	0.67	tttttttgtaatttgct	aJattattaagacagttagggc
1518	1558	0.84	atttatttgagatctgtat	aJttcgcttgtgagcacgggtcc
1560	1600	0.70	ggatcatgtaactctccgt	aJctaacagctttatgtgtcgc
1622	1662	0.40	ttcctcattagttttgctt	aJttttacaagttagttgttgggt
1649	1689	0.81	aagtagttgttggtttttc	aJgaggacataggaggtccgct
1887	1927	0.69	gatttccattctcatgtat	aJtcagaaccaagaatgcacgt
2000	2040	0.81	gttttccgctgttgtttac	aJgatgacctgactgggtgactt
2104	2144	0.50	tgaatatttggtaagctt	aJcatgttgttgcggaacgcta
2147	2187	0.65	aagtacaataatggtttgc	aJgacgatatacgaagggcgactt

Tab. 3.12: Ergebnis der Berechnungen möglicher, das Ende eines Introns anzeigender Acceptor-Sites in der Sequenz gi 58864723 (Anx IX-A); die Sites der drei höchsten Scores (0,86, 0,84 und 0,81) entsprechen den jeweiligen vorhergesagten Anfängen der unterschiedlichen Teilstücke der drei Isoformen. Eine weitere Vorhersage mittleren Scores (0,65, bei 2147 bis 2187 liegend) liegt passend mit dem Beginn der zweiten Übereinstimmung der aus der kleinsten Bande ermittelten Sequenz und gi 58864723.

3.14. Anwendung des neuen Intron-Endes auf die Nukleotidsequenz von Annexin IX-C:

Wendet man die Annahme eines längeren Introns an, so erhält man aus der vermuteten Prä-mRNA (LESCH 2005) für Annexin IX C eine neue Nukleotidsequenz der mRNA (Abb. 3.76):

AUGAG	CGGAC	AACAG	UACUA	CCCCU	AUAAG	UGCAC	CCCCA	CGGUG
UACCC	CGCGG	AGCCU	UUCGA	CCCCG	CGGCG	GAUGC	GGAGA	CCCUC
CGCAA	GGCUA	UGAAA	GGGUU	UGGCA	CCGAC	GAGAA	GGCCA	UCAUC
GACGU	CCUUU	GCCGC	CGCGG	UAUCG	UCCAG	CGUCU	GGAGA	UUGCC
GAAAC	UUUCA	AGACU	AACUA	UGGCA	AGGAC	CUCAU	CAGCG	AGUUG
AAGAG	CGAAC	UGAGC	GGCAA	CUUGG	AGAAC	GUCAU	CGUUG	CGCUG
AUGAC	CCCCC	UGCCA	CACUU	CUACG	CUAAG	GAACU	GCACG	ACGCC
GUCGC	GGGAC	UCGGU	ACCGA	CGAGG	AGGCG	AUCAU	UGAGA	UCCUG
UGCAC	ACUCU	CAAAC	UACGG	CAUCC	GCACC	AUCUC	AGCUU	UCUAC
GAACA	AUUUAU	ACAAC	AAGAG	CUUGG	AAUCG	GAUCU	GAAAG	GCGAC
ACAUC	UGGCC	ACUUC	AAGAG	GCUGU	GUGUU	UCCCU	AUGUA	UGGCC
AACCG	UGAUG	AGAAC	CAGGG	UGUGG	ACGAA	GGCGC	CGCUA	GGGCU
GACGC	UGAGG	CCCUG	GCCAA	CGCCG	GCGAG	GGACA	AUGGG	GCACC
GACGA	GUCCG	UCUUC	AACUC	UAUUC	UUAUC	ACACG	AUCCU	ACCAA
CAGCU	GAGAC	AGAUA	UUCGC	UGAAU	UCGAG	GCGUU	GACUG	GAAAG
GACAU	CGAAG	AAUCU	AUCAA	GAAGG	AAUUC	UCUGG	AAGCA	UCGAG
AAGGG	CAUGC	UUGCU	AUUGU	GAAAU	GCGUA	AAGAG	CAAGG	UUGGU
UUCUU	CGCUG	AGCGC	CUGUA	CUAUU	CCAUG	AAAGG	GCUCG	GUACA
AAUGA	UAAGA	CCCUC	AUCAG	AAUCG	UGGUC	AGCCG	CUCCG	AGAUC
GACCU	CGGGG	ACAUC	AAACA	GGCAU	UCCUU	GACAA	AUACG	GCAAG
CCCCU	GGAGA	GCUGG	AUCGC	UGGGA	CGAUA	CGAAG	GGCGA	CUUCA
AACAC	GCGUU	ACUGA	CCCUA	GUGUC	GUAGG	GACGC	AUACG	CAUUA
UACUG	CAGAC	CGAUA	GACAU	GCCUU	UGACC	CGUAU	AACUG	UUAAG
AGAUG	UUUAG	AAAUU	AAAGC	UUGAU	AUUUU	UGUGA	AAAUG	AGAUA
UUUAU	UGGUG	CUGUA	CUUUU	GUUUA	CAUUA	UACAU	AUUUA	CAUnA
UAAUU	AUUAA	AUCAC	ACUAU	UAUGU	AUGUU	AnAAA	GAGAA	AAAAA
AAAAA	AAAAA	AAAAA	AAAAA	CUnAA	GGGGG	GGCCC	GGUAC	CCAA

Abb. 3.76: Basierend auf den Sequenzierungsergebnisse und anschließender BLASTs angenommene Nukleotidsequenz von *Manduca sexta* annexin IX-C. Grün-rot dargestellt ist die neu angenommene Splicing-site.

Diese mRNA ergibt, in Aminosäuren übersetzt, wählt man den Leserahmen, der auch für das vorherige Produkt angenommen wurde, folgende Aminosäuresequenz (Abb.3.77):

<u>M</u> SGQQ	YYPYK	CTPTV	YPAEP	FDPAA	DAETL	RKAMK
GFGTD	EKAII	DVLCR	RGIVQ	RLEIA	ETFKT	NYGKD
LISEL	KSELS	GNLEN	VIVAL	<u>M</u> TPLP	HFYAK	ELHDA
VAGLG	TDEEA	IIEIL	CTLSN	YGIRT	ISAFY	EQLYN
KSLES	DLKGD	TSGHF	KRLCV	SLC <u>M</u> A	NRDEN	QGVDE
GAARA	DAEAL	ANAGE	GQWGT	DESVF	NSILI	TRSYQ
QLRQI	FAEFE	ALTGK	DIEES	IKKEF	SGSIE	KG <u>MLA</u>
IVKCV	KSKVG	FFAER	LYYS <u>M</u>	KGLGT	NDKTL	IRIVV
SRSEI	DLGDI	KQAFL	DKYGK	PLESW	IAGTI	RRATS
NTRY						

Abb. 3.77: Basierend auf den Sequenzierungsergebnissen und anschließender BLASTs angenommene Aminosäuresequenz von *Manduca sexta* Annexin IX-C. Rot dargestellt ist die Lage der Annexin-Domänen.

Diese Sequenz wurde bei einem BLAST der NCBI-Datenbank als Annexin IX-B oder IX-C mit der höchsten Trefferquote erkannt. Weiterhin werden vier Annexin-Domänen gefunden, die bei Aminosäure 30-90, 97-162, 193-246 und 256 bis 308 zu liegen kommen.

Das aus diesen Überlegungen erhaltene Protein zeigte ein berechnetes Molekulargewicht von 35491.35 D und eine Übereinstimmung von 96,8 % zu dem von LESCH (2005) erwarteten Annexin IX-C.

3.15. Anwendung des neuen Intron-Endes auf die Nukleotidsequenz von Annexin IX-A und B:

Da hier keine direkten, das mögliche neue Intron überspannenden Sequenzbeweise, sondern nur die Fragmentlänge als Hinweis diente, wurde anhand der berechneten Splice-Sites und der erhaltenen Fragmente mögliche Introns gewählt, die, sollten sie zum Tragen kommen, die erhaltenen Fragmentlängen ergäben.

Wendet man die Ergebnisse der Splice-Site-Vorhersage in Kombination mit den erhaltenen Fragmentlängen auf gi 58864723 an und rekonstruiert das dem NCBI-Datenbankeintrag fehlende Stück aus den Einträgen von *Manduca sexta* Annexin IX-B und C , so ergibt sich eine Nukleotidsequenz (Abb. 3.78), die translatiert (Abb. 3.79) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 34,4 kD erbringt, das Annexin-Domänen bei Aminosäure 30-90, 97-162, 193-246 und 256-308 enthält und nach einem BLAST mit der NCBI-Datenbank die besten Übereinstimmungen mit Annexin IX-B oder C von *Manduca sexta* und Annexin IX-A, B oder C von *Bombyx mori* zeigt.

```

AUGAG CGGAC AACAG UACUA CCCC UUAAG UGCAC CCCC CGGUG
UACCC CGCGG AGCCU UUCGA CCCC CGGCG GAUGC GGAGA CCCUC
CGCAA GGCUA UGAAA GGGUU UGGCA CCGAC GAGAA GGCCA UCAUC
GACGU CCUUU GCCGC CGCGG UAUCG UCCAG CGUCU GGAGA UUGCC
GAAAC UUUCA AGACU AACUA UGGCA AGGAC CUCAU CAGCG AGUUG
AAGAG CGAAC UGAGC GGCAA CUUGG AGAAC GUCAU CGUUG CGCUG
AUGAC CCCC UGCCA CACU CUACG CUAAG GAACU GCACG ACGCC
GUCGC GGGAC UCGGU ACCGA CGAGG AGGCG AUCAU UGAGA UCCUG
UGCAC ACUCU CAAAC UACGG CAUCC GCACC AUCUC AGCUU UCUAC
GAACA AUUAU ACAAC AAGAG CUUGG AAUCG GAUCU GAAAG GCGAC
ACAUC UGGCC ACUUC AAGAG GCUGU GUGUU UCCCU AUGUA UGGCC
AACCG UGAUG AGAAC CAGGG UGUGG ACGAA GGCGC CGCUA GGGCU
GACGC UGAGG CCCUG GCCAA CGCCG GCGAG GGACA AUGGG GCACC
GACGA GUCCG UCUUC AACUC UAUUC UUAUC ACACG AUCCU ACCAA
CAGCU GAGAC AGAUA UUCGC UGAAU UCGAG GCGUU GACUG GAAAG
GACAU CGAAG AAUCU AUCAA GAAGG AAUUC UCUGG AAGCA UCGAG
AAGGG CAUGC UUGCU AUUGU GAAAU GCGUA AAGAG CAAGG UUGGU
UUCUU CGCUG AGCGC CUGUA CUAUU CCAUG AAAGG GCUCG GUACA
AAUGA UAAGA CCCUC AUCAG AAUCG UGGUC AGCCG CUCCG AGAUC
GACCU CGGGG ACAUC AAACA GGCAU UCCUU GACAA AUACG GCAAG
CCCCU GGAGA GCUGG AUCGC UGAU AUUAA GACAG UUAGG GCUUG
ACGGC CGAUC GUAAA GUAAA ACAAG CACAA CGCUA GUCUA GACGU
UCGCG GUCGU CGGGU GUGCU AGGUU AUCGU GAGAU GGUCA GAACC
AAGAA UGCAC GUUUG AAGUU UGAGC GCAGU GGUUU GAACU AUGGG
CCAGU UUAUU UUGUU CGCUA ACAUG UGAAG CGUGA GCGCG UUUUC
CGCUG UUGUU UACAG GAUGA CCUGA CUGGG GACGA UACGA AGGGC
GACUU CAAAC ACGCG UUACU GACCC UAGUG UCGUA GGGAC GCAUA
CGCAU UAUAC UGCAG ACCGA UAGAC AUGCC UUUGA CCGGU AUAAC
UGUUA AGAGA UGUUU AGAAA UUAUU GCUUG AUUUU UUUGU GAAAA
UGAGA UAUUU AUUGG UGCUG UACUU UUGUU UACAU UAUAC AUUUU
UACAU UAUAA UUAUU AAAUC ACACU AUUAU GUAUG UUAUU AAGAG
AAAAA AAAAA AAAAA AAAAA AAAAA AA

```

Abb. 3.78: Mit Hilfe der aus den Fragmentlängen und Splice-Site-Vorhersagen ermittelte Nukleotid-Sequenz der mRNA des möglichen *Manduca sexta* Annexin IX-A. Kursiv und unterstrichen ist der aus den Sequenzen von *Manduca sexta* Annexin IX-B und C der NCBI-Datenbank rekonstruierte Teil. In grün-rot dargestellt sind die neu angenommenen Splicing-Sites

```

MSGQQ YYPYK CTPTV YPAEP FDPAA DAETL RKAMK
GFGTD EKAII DVLCR RGIVQ RLEIA ETFKT NYGKD
LISEL KSELS GNLEN VIVAL MTPLP HFYAK ELHDA
VAGLG TDEEA IIEIL CTLSN YGIRT ISAFY EQLYN
KSLES DLKGD TSGHF KRLCV SLCMA NRDEN QGVDE
GAARA DAEAL ANAGE GQWGTDESVF NSILI TRSYQ
QLRQI FAEFE ALTGK DIEES IKKEF SGSIE KGMLA
IVKCV KSKVG FFAER LYYSM KGLGT NDKTL IRIVV
SRSEI DLGDI KQAFL DKYGK PLESW IADY

```

Abb. 3.79: Mit Hilfe der aus den Fragmentlängen und Splice-Site-Vorhersagen ermittelte Aminosäure-Sequenz der mRNA des möglichen *Manduca sexta* Annexin IX-A. Rot dargestellt ist die Lage der Annexin-Domänen

Bei gleicher Vorgehensweise ergab sich für die ursprüngliche Annexin IX-B mRNA der NCBI-Datenbank eine Nukleotid-Sequenz (Abb. 3.80), deren translatiertes Protein (Abb.3.81) ein berechnetes Molekulargewicht von 35,3 kD besaß und Annexin-Domänen bei Aminosäure 30-90, 97-162, 193-246 und 256-308 enthielt. Der BLAST mit der NCBI-Datenbank ergab die besten Übereinstimmungen mit Annexin IX-B oder C von *Manduca sexta* und Annexin IX-A, B oder C von *Bombyx mori*

AUGAG	CGGAC	AACAG	UACUA	CCCCU	AUAAG	UGCAC	CCCCA	CGGUG
UACCC	CGCGG	AGCCU	UUCGA	CCCCG	CGGCG	GAUGC	GGAGA	CCCUC
CGCAA	GGCUA	UGAAA	GGGUU	UGGCA	CCGAC	GAGAA	GGCCA	UCAUC
GACGU	CCUUU	GCCGC	CGCGG	UAUCG	UCCAG	CGUCU	GGAGA	UCGCC
GAAAC	UUUCA	AGACU	AACUA	UGGCA	AGGAC	CUCAU	CAGCG	AGUUG
AAGAG	CGAAC	UGAGC	GGCAA	CUUGG	AGAAC	GUCAU	CGUUG	CGCUG
AUGAC	CCCCC	UGCCA	CACUU	CUACG	CUAAG	GAACU	GCACG	ACGCC
GUCGC	GGGAC	UCGGU	ACCGA	CGAGG	AGGCG	AUCAU	UGAGA	UCCUG
UGCAC	ACUCU	CAAAC	UACGG	CAUCC	GCACC	AUCUC	AGCUU	UCUAC
GAACA	AUUUAU	ACAAC	AAGAG	CUUGG	AAUCG	GAUCU	GAAAG	GCGAC
ACAUC	UGGCC	ACUUC	AAGAG	GCUGU	GUGUU	UCCCU	AUGUA	UGGCC
AACCG	UGAUG	AGAAC	CAGGG	UGUGG	ACGAA	GGCGC	CGCUA	GGGCU
GACGC	UGAGG	CCCUG	GCCAA	CGCCG	GCGAG	GGACA	AUGGG	GCACC
GACGA	GUCCG	UCUUC	AACUC	UAUUC	UUAUC	ACACG	AUCCU	ACCAA
CAGCU	GAGAC	AGAUU	UUCGC	UGAAU	UCGAG	GCGUU	GACUG	GAAAG
GACAU	CGAAG	AAUCU	AUCAA	GAAGG	AAUUC	UCUGG	AAGCA	UCGAG
AAGGG	CAUGC	UUGCU	AUUGU	GAAAU	GCGUA	AAGAG	CAAGG	UUGGU
UUCUU	CGCUG	AGCGC	CUGUA	CUAUU	CCAUG	AAAGG	GCUCG	GUACA
AAUGA	UAAGA	CCCUC	AUCAG	AAUCG	UGGUC	AGCCG	CUCCG	AGAUC
GACCU	CGGGG	ACAUC	AAACA	GGCAU	UCCUU	GACAA	AUACG	GCAAG
CCCCU	GGAGA	GCUGG	AUCGC	UGGUC	AGUAC	CAAGA	AUGCA	CGUUU
GAAGU	UUGAG	CGCAG	UGGUU	UGAAC	UAUGG	GCCAG	UUUAU	UUUGU
UCGCU	AACAU	GUGAA	GCGUG	AGCGC	GUUUU	CCGCU	GUUGU	UUACA
GGAUG	ACCUG	ACUGG	GGACG	AUACG	AAGGG	CGACU	UCAAA	CACGC
GUUAC	UGACC	CUAGU	GUCGU	AGGGA	CGCAU	ACGCA	UUUAU	CUGCA
GACCG	AUAGA	CAUGC	CUUUG	AACCG	UAUAA	CUGUU	AAGAG	AUGUU
UAGAA	AUUAA	AGCUU	GAUUA	UUUUG	UGAAA	AUGAG	AUAUU	UAUUG
GUGCU	GUACU	UUUGU	UUACA	UUUAU	CAUAU	UUACA	UUUAU	AUUUAU
UAAAU	CACAC	UAUUA	UGUAA	AAAAA	AAAAA	AAAAA	A	

Abb. 3.80: Mit Hilfe der aus den Fragmentlängen und Splice-Site-Vorhersagen ermittelte Nukleotid-Sequenz der mRNA des möglichen *Manduca sexta* Annexin IX-B. Grün-rot dargestellt sind die Übergänge der neu angenommenen Splicing-sites.

MSGQQ	YYPYK	CTPTV	YPAEP	FDPAA	DAETL	RKAMK
GFGTD	EKAII	DVLCR	RGIVQ	RLEIA	ETFKT	NYGKD
LISEL	KSELS	GNLEN	VIVAL	MTPLP	HFYAK	ELHDA
VAGLG	TDEEA	IIEIL	CTLSN	YGIRT	ISAFY	EQLYN
KSLES	DLKGD	TSGHF	KRLCV	SLCMA	NRDEN	QGVDE
GAARA	DAEAL	ANAGE	GQWGT	DESVF	NSILI	TRSYQ
QLRQI	FAEFE	ALTGK	DIEES	IKKEF	SGSIE	KGMLA
IVKCV	KSKVG	FFAER	LYYSM	KGLGT	NDKTL	IRIVV
SRSEI	DLGDI	KQAFL	DKYGK	PLESW	IAGQY	QECTF
EV						

Abb. 3.81: Mit Hilfe der aus den Frangmentlängen und Splice-Site-Vorhersagen ermittelte Aminosäure-Sequenz der mRNA des möglichen *Manduca sexta* Annexin IX-B. Rot dargestellt ist die Lage der Annexin-Domänen.

4. Diskussion:

Als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Nachweise von Annexin IX in *Manduca sexta* (LESCH 2005) und *Bombyx mori* (XIA *et al.* 2001). Für das in *Manduca sexta* vorkommende Annexin IX als Antigen ist ein monoklonaler Antikörper bekannt (LESCH 2005), dessen hohe Spezifität im Verlauf der Arbeit genutzt wurde, um das Vorkommen von Annexin IX im Organismus selbst und in weiteren Lepidopteren zu untersuchen.

Weiterhin wurde der durch den Vorgang des alternativen Splicens bedingte Aufbau der mRNA des untersuchten Proteins (LESCH 2005, XIA *et al.* 2001) genutzt, um das Vorkommen der Isoformen zu spezifizieren.

4.1. Monolayer der untersuchten Lepidopteren:

Zuerst soll kurz erörtert werden, welche Schlüsse sich aus den vorliegenden Ergebnissen in Bezug auf ein Vorkommen von Annexin IX innerhalb der Lepidoptera ziehen lassen.

Antikörper #78 findet sein Antigen bei allen darauf hin untersuchten Lepidopteren. Da der verwendete monoklonale Antikörper eine hohe Spezifität aufweisen, ist anzunehmen, dass bei allen markierten Zellen ein entsprechendes Epitop vorhanden ist. Bei *Manduca sexta* liegt dieses Epitop im konservierten Teil des Annexin IX (LESCH 2005), ein Annexin, für das in *Bombyx mori* ein Homolog gefunden wurde (XIA *et al.* 2001). Bei den getesteten Hämocyten vom *Bombyx mori* ist eine positive Markierung mit Antikörper #78 zu beobachten. Dies und die hohe Ähnlichkeit (Sequenzübereinstimmung) der beiden Annexine beider Arten lassen darauf schließen, dass auch hier Annexin IX als Ziel des verwendeten Antikörpers fungiert. Betrachtet man die bisher angenommenen Verwandtschaftsverhältnisse der getesteten Lepidopteren (SHIMADA *et al.* 1995), wird ersichtlich, dass *Manduca sexta* und *Bombyx mori* taxonomisch weniger eng zusammen stehen als z.B. *Acherontia atropos* und *Manduca sexta*. Bei *Acherontia atropos* wurde im Verlauf dieser Arbeit eine kurze Nucleotidsequenz gefunden, die eine große Ähnlichkeit mit *Manduca sexta* mRNA für Annexin IX aufweist. Dies und die Markierung durch den Antikörper lassen den Schluss zu, dass auch *Acherontia atropos* Annexin IX in ihrem Proteom besitzt. Betrachtet man die beiden untersuchten Saturniden, und geht man davon aus, dass Annexine eine hoch konservierte gemeinsame Struktur aufweisen und in allen eukaryotischen Zweigen der Organismen gefunden wurden (GERKE & MOSS 2002), so lässt sich schließen, dass bereits die gemeinsame Stammart der Bombycoidea und Sphingoidea zumindestens ein Annexin besaß, das eine hohe Ähnlichkeit mit dem heutigen Annexin IX aufwies, da sich die Sequenzen von Annexin IX von *Manduca sexta* und *Bombyx mori* sehr ähneln. Ausgehend davon, mit Betrachtung der Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung, kann gefolgert werden, dass auch *Hyalophora cecropia* und *Actias artemis* Annexin IX besitzen. Dass Annexin IX ebenfalls bei *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* gefunden wurde (JOHNSTON *et al.* 1990, KOTSYFAKIS *et al.* 2005), die als Dipteren eine Außengruppe bilden, lässt die Folgerung zu, dass es sich bei der bei *Galleria mellonella* festgestellten Markierung ebenfalls um Annexin IX handelt.

4.2. Monolayer von *Manduca sexta* und *Acherontia atropos*:

Nach der Erörterung des Vorkommens von Annexin IX innerhalb der Lepidoptera soll anhand der aus der Untersuchung der jeweiligen Monolayer erhaltenen Ergebnisse versucht werden, das Verhalten des Annexins IX innerhalb der Hämocyten während des Vorgangs der Anheftung zu diskutieren.

Bei den in der Arbeit verwendeten Monolayer-Typen, insbesondere bei den Kurzzeit-Intervall-Monolayern, werden Unterschiede in der Markierung erkennbar. Während bei von der Hämolymphe durch Waschen in AC-Saline befreiten Hämocyten bereits in den ersten Zeitfenstern schon bei noch runden und nicht gespreiteten Hämocyten flächendeckende Markierungen auftraten, die bei Granulären Zellen erhalten blieben und sich bei Plasmacyten hin zu abgegrenzten Bereichen veränderten, zeigten Hämocyten im Monolayer des zweiten Typs eine Markierung, die nur bei wenigen Zellen gleichmäßig flächendeckend ausfiel. Die meisten Zellen zeigten eine fleckartige Musterung, die sich bei einigen Plasmacyten in die Pseudopodien ausdehnte. Sowohl bei *Manduca sexta* als auch bei *Acherontia atropos* war dieses Muster zu beobachten. Die Unterschiede zwischen gewaschenen und ungewaschenen Zellen von *Manduca sexta* könnten verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte der Aufenthalt in hämolymphfremden Medium zu einer Aktivierung führen, zum anderen könnte der Vorgang des Waschens selber eine mechanische Reizung ausüben. Weiterhin enthält Hämolymphe die für die Wirkungsweise von Annexinen notwendigen Calciumionen, die während des Waschens durch den Chelatbildner EDTA entfernt werden. Betrachtet man die Ergebnisse der Direktfixierung während des Blutens und der FACS-Analyse, so scheint es, als bilde sich die Musterung durch Präsentation des Epitops erst während des Absetzens der Zellen. Allerdings führt die Direktfixierung zu hohen Verlusten an Zellen, da u. a. auf EDTA verzichtet wurde, und die Hämolymphe quasi sofort beim Eintritt in die Fixans koagulierte. Daher ist es möglich, dass die wenigen Zellen, die diese Prozedur überstanden haben, nicht repräsentativ für das Gesamtbild sind. Bei den FACS-Ergebnissen mit Antikörper #78 fällt auf, dass sich die Zellpopulationen von denen der in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Silvia Geuenich (GEUENICH 2005) durchgeführten Kontrollen unterschieden. Daher sind auch diese Ergebnisse vorerst mit einer gewissen Zurückhaltung in die Überlegungen mit ein zu beziehen. Betrachtet man allerdings diese Experimente, so zeigt sich, dass Zellen, die entweder ohne AC-Saline aufbereitet wurden oder in der Saline direkt durch NaAzid abgetötet wurden, keine bis nur eine geringe Markierung

zeigen. Diese geringe Markierung geht mit der Beobachtung konform, dass die Fluoreszenzmarkierung während des Anheftungsvorgangs zunimmt.

In Folge dieser Beobachtungen kann man also schließen, dass Annexin IX in zumindestens einer Isoform beim Vorgang des Spreitens beteiligt ist, zumal die Markierung bei einigen Zellen bis in die Pseudopodien ausstrahlt. Von einigen Annexinen ist bekannt, dass sie im Zusammenhang mit dem Cytoskelett stehen (BABYCHUK & DRAEGER 2000, ARESCHER & GERKE 2004). Eine solche Funktion passte insofern zu den Beobachtungen, dass vor allem Plasmacyten, die sich durch ein besonders großes Spreitungsvermögen auszeichnen, eine Markierung bis in die Pseudopodien zeigen.

Weiterhin zeigten die Versuche, dass nach einer Behandlung der Zellen mit TritonX-100, also einer Permeabilisierung der Zellmembran, eine die gesamte Zelle erfassende Markierung resultiert. Folglich ist Annexin IX in einer seiner Isoformen im Cytoplasma oder an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Zieht man die Ergebnisse der nicht mit Triton behandelten ungewaschenen Zellen hinzu, lässt sich folgern, dass Annexin IX in zumindest einer seiner Isoformen während des Anheftungsvorganges oder auf einen anderen Reiz hin vom Cytosol nach außen verbracht wird. Von z.B. humanem Annexin II und VI wird belegt, dass diese Proteine als Rezeptor für Fetuin-A an der extrazellulären Seite der Membran positioniert und als solche an Adhäsionsvorgängen beteiligt sind (KUNDRANDA *et al.* 2004). Annexin I wird in neutrophilen Granulocyten von Säugetieren von Granulen des Cytoplasma an die Zelloberfläche verbracht, wenn sich die Zelle an entzündetes Endothel anheftet (PERRETTI *et al.* 1996, PERRETTI *et al.* 2000, PERRETTI & FLOWER 2004). Somit wird auch bei Neutrophilen ein Annexin im adherenten Zustand an der Zelloberfläche nachweisbar. Annexin 1 spielt in Säugetieren eine wichtige Rolle als anti-inflammatorischer Mediator (KAMAL *et al.* 2005). Ob eine Ähnliche Rolle für Annexin IX zu erwarten ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Zieht man die Markierung der mit AC-Saline gewaschenen Zellen hinzu, drängt sich die Folgerung auf, dass die Zellen durch einen noch nicht näher geklärten Vorgang während des Waschens, betrachtet in Bezug auf die Translokalisierung von Annexin IX von der Innenseite der Membran nach außen, aktiviert wurden. Dieser Vorgang könnte einerseits in dem Mediumwechsel begründet liegen, der, allerdings in nicht so vollständigem Maße, auch bei der Herstellung der Monolayer des Typs II erfolgt, oder mit der Entfernung von Kalziumionen durch EDTA zusammenhängen.

Zieht man in Betracht, dass von unterschiedlichen Annexinen eine Ionenkanalaktivität bekannt ist (POLLARD & ROJAS 1988, ROJAS *et al.* 1990, POLLARD *et al.* 1992, BERENDES *et al.* 1993, BURGER *et al.* 1994, LIEMANN *et al.* 1996, LIEMANN & HUBER 1997), könnte die Translokation von Annexin IX an die Aussenseite der Membran evtl. zusätzlich in einem solchen Zusammenhang gesehen werden, bei dem zumindest eine Isoform des Proteins als fakultativer Kalziumkanal fungieren würde. Dies könnte die „Aktivierung“ durch den Waschvorgang mit EDTA erklären, da bei Kalziummangel mehr Kanäle geöffnet werden müssten.

Fremdkörper, die zu groß sind, um phagozytiert oder durch Knötchenbildung unschädlich gemacht zu werden, werden von den Hämocyten eingekapselt. Hierbei treten vor allem Granuläre Zellen und Plasmacyten in Aktion, die die Fremdkörper zuerst umhüllen und dann mit einer extrazellulären Schicht umhüllen (PECH & STRAND 1996, PECH UND STRAND 2000, GILLESPIE *et al.* 1997, WIEGAND *et al.* 2000). Der Objektträger, auf dem sich die Zellen absetzen, stellt einen Fremdkörper dar. Daher könnte die wachsende Markierung durch Antikörper #78 auch in einem solchen Zusammenhang gesehen werden.

Weitere Hinweise liefern die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Parasitisierung durch *Cotesia congregata*. Die Braconide gewährleistet eine Entwicklung ihrer Eier und Larven, indem sie deren Einkapselung im Wirt verhindert (AMAYA *et al.* 2005). Die Auswirkungen auf die Hämocyten sind vielfältig und reichen von anfänglicher Eliminierung der Hämocyten über ein reduziertes Spreitungsvermögen bis hin zu Veränderungen der exprimierten Proteine (BECKAGE *et al.* 1994, ALLEYNE & BECKAGE 1997, WIESLER 2003).

Die Hämocyten befallener *Manduca sexta*-Larven zeigen in Bezug auf die Markierung durch Antikörper #78 eine deutlich geringere Fluoreszenz. Erst nach Aufbrechen der Zellmembran durch z.B. Tritonbehandlung gleichen sich die Markierungen der Hämocyten parasitisierter und unparasitisierter Tiere. Daher ist davon auszugehen, dass Annexin IX in den Hämocyten parasitisierter Tiere zwar vorhanden ist, aber nicht, wie bei unparasitierten Tieren, in großem Umfang an die Zellaußenseite gelangt. Dass Annexin IX zumindest exprimiert wird, wird auch durch die RT-PCR belegt, die bei aus Hämocyten parasitisierter Tiere gewonnener RNA drei deutliche Banden zeigt. Geht man also davon aus, dass durch die Einwirkung von *Cotesia* die Abwehrfähigkeit gehemmt wird, lässt dies den Schluss zu, dass Annexin IX, sollte es aufgrund von Spreitungsvorgängen zur Zellaussenseite translokiert werden, entweder

als Teil einer Kaskade zu sehen ist, deren vorherige Schritte durch den parasitoiden Einfluss unterbrochen wurden, oder nur indirekt in Bezug auf das Spreiten als Antwort auf den Spreitungsvorgang oder die Fremdkörpererkennung an die Zellaussenseite gelangt. In einem ähnlichen Kontext lässt sich auch die Vermutung sehen, dass Annexin IX im Zusammenhang mit dem Aufbau der extrazellulären Matrix stehen könnte. Auch die Einkapselung muss die Wespe unterdrücken: Gelangt ein für den Aufbau notwendiges Protein nicht an die Zellaußenseite, kann die Einkapselung nicht stattfinden. Auch hier wäre Annexin IX als Teil einer Reaktionskette zu sehen, da das Protein in der Zelle zwar vorhanden ist, aber nicht die Membran durchquert, so dass ein vorher liegendes Glied der Reaktionskette, das diese Translokation auslöst, gehemmt sein oder fehlen muss. Dass Proteine bei einer Parasitisierung aus dem Proteinpool verschwinden, wurde durch WIESLER 2003 belegt. Eine weitere Möglichkeit in diesem Zusammenhang wäre auch, dass Annexin IX z.B. durch ein virales Protein der durch den Parasitoiden eingebrachten Polydnaviren (SAVARY *et al.* 1999) gehemmt würde. Dass Annexine von Insekten als Bindungsziel von Parasiten dienen können, ist bekannt ((KOTSYFAKIS *et al.* 2005).

Betrachtet man die Ergebnisse von M. Wiesler (WIESLER 2003), so fällt auf, dass kein Unterschied parasitisierter und unparasitisierter *Manduca sexta*-Larven in Bezug auf Antikörper #78 auftritt. Die Erklärung für diese Diskrepanz ist darin zu sehen, dass die bearbeiteten Monolayer vor der Immunhistochemie eingefroren gelagert wurden (mündl. Mitteilung M. Wiesler). Einfrieren bewirkt eine Perforierung der Membran durch Eiskristallbildung, was einen ähnlichen Effekt wie eine Tritonbehandlung zur Folge hat. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten mit TritonX-100 behandelte Hämocyten parasitisierter Tiere ein ähnliches Bild wie Hämocyten unbehauelter Tiere nach Tritoneinwirkung, was die Aussage von Frau M. Wiesler bestätigt.

4.3. Optische Schnitte:

Um die Funktion von Annexin IX weiter zu untersuchen, müssen noch weitere Ergebnisse herangezogen werden. Wie aus den optischen Schnitten durch die Antikörpermarkierung erkennbar wird, ist Annexin IX vor allem an der Außenseite der Organe wie eine Hülle flächendeckend lokalisiert. Da die Organe vorher mit TritonX-100 behandelt wurden, kann angenommen werden, dass der verwendete Antikörper die Möglichkeit hatte, in die Organe einzudringen, dort aber keine Bindung stattfand. Vor allem die Ganglion- und Tracheenprobe zeigen diese Verteilung. Andere Organe weisen teilweise schwächere Markierungen auf. Bei der Spinndrüse und den Malpighi'schen Gefäßen schien es, als wäre die Markierung nicht nur auf die Außenseite beschränkt, sondern auch schwach innerhalb des Organs sichtbar.

Das Vorkommen von Annexin in den getesteten Organen wird durch die Ergebnisse der Westernblots gestärkt, da hier, bis auf Ausnahme des Darms, jedes verwendete Organlysat eine mehr oder weniger deutliche Bande zeigte. Die einzige Ausnahme, der Darm, zeigt eine schwache, schwer zu lokalisierende Markierungswolke, die etwa um 36 kD bis in den niedermolekularen Bereich liegt. Zieht man in Betracht, dass der Darm als Ort der Verdauung ein ganzes Arsenal an Enzymen besitzt, liegt die Vermutung nahe, dass Annexin IX während der Präparation diesen Enzymen ausgesetzt und von ihnen zersetzt wurde. Dies würde das Vorhandensein der Wolke erklären, die sich hiernach aus verschiedenen großen Teilstücken des Proteins zusammensetzen würde.

Da vor der Elektrophorese die Proteinproben auf den gleichen Proteingehalt der reinen Hämocytenprobe eingestellt wurden und die Ausgangsorgane unter AC-Saline entnommen wurden, die eine Anheftung von Hämocyten hemmt, kann davon ausgegangen werden, dass eventuell den Organen anhaftende Hämocyten nur einen geringen Anteil der Probe ausmachen. Infolgedessen müsste, sollte sich die Positivreaktion des Westernblots nur aufgrund der Proteine anheftender Hämocyten einstellen, diese geringer als die Reaktion der reinen Hämocytenprobe ausfallen. Die registrierten Banden hingegen zeigen eine etwa gleichstarke bis sogar stärkere (bei Nerv und Malpighi'schen Gefäßen) Reaktion, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den beobachteten Ergebnissen um organeigene Proteinbanden handelt.

Die umhüllende Fluoreszenzmarkierung an der Außenseite der Organe durch die Bindung des genutzten Antikörpers #78, die eine komplette dreidimensionale Rekonstruktion bis hin zu Strukturen, wie z.B. bei Muskel und Fettkörper möglich machte, deutet auf einen Zusammenhang zwischen Annexin IX in zumindest einer Isoform und der extrazellulären Matrix hin, da dieses Element ebenfalls einer Hülle gleich die Organe zur Leibeshöhle umgibt.

Bei der Spinndrüse von Larven des *Bombyx mori* ist ebenfalls das Vorhandensein von Annexin IX bekannt. Hier spielt es eine Rolle beim programmierten Zelltod während der Metamorphose. Das Protein wird in den Spinndrüsen während des Wachstums der Larven auf hohem Level expremiert und nimmt beim Eintritt in die Metamorphose, wahrscheinlich Ecdyson-gesteuert, ab (KANEKO *et al.* 2006). Bei *Manduca sexta* wird die Spinndrüse ebenfalls während der Metamorphose eingeschmolzen, so dass hier ein ähnlicher Zusammenhang zu erwarten ist. Jedenfalls für die Spinndrüse wäre somit die Verteilung ins Organinnere auf diese Weise erklärbar.

Die Annexin IX-Verteilung ins Organinnere bei den Malpighi'schen Gefäßen könnte eine andere Ursache haben. Für Annexin V wird bei Rattennieren ein Zusammenhang mit der Kalziumexkretion vermutet (MATSUDA *et al.* 2001). Zwar unterscheiden sich die jeweiligen Vorgänge der Primärharnherstellung (Filtration durch Druck in den Nieren versus Ionensekretion in den Malpighi'schen Gefäßen), aber die Malpighi'schen Gefäße stehen wie die Nieren der Säugetiere im Dienste der Sekretion (WEHNER R. & GEHRING W. 1995, PENZLIN H. 1996), so dass unter Umständen auch hier ein Annexin eine Rolle im Kalziumhaushalt spielt.

Neben der Möglichkeit einer Beteiligung am Aufbau der Extrazellulären Matrix könnte das Vorkommen von Annexin IX in Bezug auf die Vermutung gesehen werden, Annexin IX könnte als Kalzium-Kanal fungieren. Kalzium spielt eine wichtige Rolle bei der Reizweiterleitung sowie bei der Muskelkontraktion (PENZLIN 1996). Nicht erklärt wäre hierdurch allerdings die starke Markierung der Tracheen.

Zusammenfassend lässt sich also, die Ergebnisse der konfokalen Laserscanmikroskopie in Bezug auf die Organe betrachtend, schließen, dass die Markierung und damit das Vorkommen von Annexin IX in Organen hauptsächlich auf die Aussenseite der Organe beschränkt ist. Von Annexin-V z.B. ist eine Bindung an Integrinrezeptoren bekannt, es steht somit im Zusammenhang mit der Anheftung an die extrazelluläre Matrix (ANDERSEN *et al.* 2002). Da diese die Organe, ähnlich wie die beobachtete Markierung äußerlich umhüllt, könnte eventuell ein Zusammenhang mit zumindestens einer Isoform des Annexin IX in Betracht gezogen werden. Weiterhin kommt die Überlegung hinzu, dass die inneren Organe während der Larvenzeit erheblich wachsen, was eine kontinuierliche Neubildung der Extrazellulären Matrix erforderlich machen würde.

Einen weiteren Hinweis, ebenfalls über die konfokale Laserscanmikroskopie gewonnen, liefert die Analyse einer einzelnen Plasmatoocyte. Diese Zelle zeigte eine besonders starke Markierung, die an einer Stelle der Zelloberseite lokalisiert war. An dieser Stelle war die Ausbildung von Pseudopodien allerdings gering, was durch das TRITC-Phalloidin-markierte Cytoskelett der Zelle erkennbar wurde.

Diese Beobachtung, verbunden mit der Exponierung von Annexin IX bei angehefteten Hämocyten und der Einbeziehung der Lage des Proteins an der Außenseite der Organe, lässt die anfangs gestellte Annahme, Annexin IX könnte in einem räumlich positiven Zusammenhang mit der Ausbildung des Cytoskeletts gesehen werden, zumindest fraglich erscheinen.

4.4. Vergleich der bisherigen Schlüsse mit vorhergehenden Arbeiten an Annexin IX bei *Manduca sexta*:

Vergleicht man die bisherigen Überlegungen und Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen von LESCH (2005), so wird hier ein Unterschied deutlich. LESCH schließt aus den Ergebnissen ihrer Arbeit, dass Annexin IX hauptsächlich im Cytoplasma vorkomme, eine Membranbindung wird allerdings nicht ausgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass Annexin IX zumindest zu bestimmten Zeitpunkten der Membran assoziiert vorliegt. Dies wird auch durch die konfokale Laserscanmikroskopie der Hämocyten gestützt.

Nach Tritonbehandlung betrifft die Markierung die gesamte Zelle, so dass zumindest bei Plasmatoocyten aufgrund der starken Fluoreszenz und der abgeflachten Zellform nicht leicht zu bestimmen ist, ob das Protein membranständig oder im Zellplasma gelegen vorkommt, solange es nicht an die Membranaussenseite gelangt. Granuläre Zellen behalten größtenteils ihre runde Form, im fluoreszenzmikroskopischen Bild erscheint die Zellmitte auch nach Tritonbehandlung schwächer fluoreszent als die Peripherie, was als Hinweis für eine Membranständigkeit gedeutet werden kann.

Anders verhalten sich die Zellen der GV1-Kultur. Hier ist die Zellmitte stärker gefärbt, dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass hier das den Kern umgebende Plasma der hauptsächliche Aufenthaltsort von Annexin IX ist.

Von Annexinen ist bekannt, dass sie sowohl als cytoplasmische Bindungspartner agieren als auch an die Zellmembran gebunden sein können (GERKE & MOSS 2002).

4.5. Diskussion der Ergebnisse der RT-PCR:

Mit Hilfe der RT-PCR sollte in dieser Arbeit die Expression von Annexin IX in seinen Isoformen beleuchtet werden. Der geschachtelte Aufbau der Isoformen (XIA *et al* 2001, LESCH 2005) bot hierbei die Möglichkeit, mit nur zwei Primern sowohl die mRNA-Isoformen anhand ihrer Länge zu unterscheiden als auch, ebenfalls über die Länge, eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, da genomische DNA aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Introns und Exons ein wesentlich längeres Fragment erzeugen würde. Tatsächlich erbrachten alle getesteten Organe mit Ausnahme des Darms nach Durchführung der RT-PCR drei mehr oder weniger gut abgrenzbare Fragmente, die anhand einer sich anschließenden Sequenzierung als Teile der Nucleotidsequenz von Annexin IX identifiziert werden konnten. Diese Fragmente waren mit etwa 500, 300 und 150 Basenpaaren Länge ca. 564, 365 und 165 bp kürzer als erwartet. Die anschließende Sequenzierung dieser Stücke erbrachte ohne weiteres nicht die Möglichkeit, diese Fragmente direkt einer Isoform zuzuordnen, ließen aber eine Identifizierung als Annexin IX zu. Hierbei traten die besten Übereinstimmungen mit Annexin IX von *Manduca sexta* auf (LESCH 2005), gefolgt von Annexin IX in seinen Isoformen von *Bombyx mori* (XIA *et al.* 2001). Die Schwierigkeit der direkten Zuordnung anhand der Sequenz liegt im Aufbau der Fragmente (XIA *et al* 2001, LESCH 2005). Alle drei mit den verwendeten Primern hergestellten Fragmente haben einen gemeinsamen Teil, der von den verwendeten Algorithmus natürlich nicht getrennt betrachtet wird. Der weitere Aufbau der mRNA, bei der, wie unter 2.2.11.6. erläutert, an jeder Isoform zumindest die Sequenz für den C-Teil, bei zwei Isoformen die Sequenz für den B-Teil und nur bei einer Isoform die A-Sequenz anhängt, kann von dem Programm nicht berücksichtigt werden, da z.B. die Nucleotidsequenz der C-Isoform in allen drei Isoformen zu finden ist. Also müssen die Isoformen anhand ihrer Länge zugeordnet werden, wobei das längste Fragment von Isoform A, das kürzeste von Isoform C gestellt wird.

Wie bereits erwähnt, zeigten alle getesteten Organe die Isoform C, dies stimmt mit den vom *Bombyx mori* bekannten Verteilungen überein (XIA *et al.* 2001). Auch bei *Manduca sexta* zeigt der Darm ein Fehlen der A-Form, bei der vorliegenden Arbeit fehlt *Manduca sexta* ebenfalls die B-Form. Dies könnte in den interspezifischen Unterschieden begründet liegen. Bei der Spinndrüse von *Bombyx mori* kommen nur die Isoformen B und C vor (XIA *et al.* 2001). Diese beiden und zusätzlich eine sehr schwache undeutliche Bande der A-Form treten auch bei der Spinndrüse von *Manduca sexta* auf.

Alle drei Isoformen konnten in den Eiern sowohl von *Manduca sexta* (siehe 3.11.1) als auch *Bombyx mori* nachgewiesen werden (XIA *et al.* 2001). Da die mRNA von Annexin IX bereits in Eiern am Tag der Ablage nachgewiesen werden konnte, lässt darauf schließen, dass Annexin IX für die Zelle allgemein von großer Bedeutung ist und nicht erst bei spezialisierten und ausdifferenzierten Zellen zum tragen kommt. Weiterhin kann durch das Vorhandensein der C-Isoform in allen gestesteten Organen in einer relativ betrachtet höheren Menge die Vermutung, Annexin IX-C stelle eine Grundform des Proteins dar (XIA *et al.* 2001) auch bei *Manduca sexta* bestätigt werden.

Um zu klären, warum die erhaltenen Fragmente kürzer als im Vergleich zu LESCH (2005) erwartet ausfallen, wurde ein Sequenzvergleich (BLAST) gegen gi 58864723 (*Manduca sexta* partielle mRNA für Annexin IX-A) (LESCH 2005) durchgeführt. Dieser ergab für das dritte Fragment (150 kb) eine Sequenz mit einer Übereinstimmung im vorderen Teil der Sequenz bis zum Intron, aber hinter dem erwarteten Anfang des C-Exons ihre Übereinstimmung fortsetzte, ohne dass eine Lücke entstand. Eine daraufhin angestellte Berechnung der Splicemöglichkeiten (REESE & EECKMANN 1996, REESE *et al.* 1997) der ursprünglich angenommenen Sequenz ergab, dass eine mögliche Splice Stelle genau so zu liegen kam, dass das in dem Fragment fehlende Exonstück genau herausgeschnitten würde. Diese Stelle zeigte zwar eine geringere Wahrscheinlichkeit als die von LESCH (2005) postulierte, erklärte aber zumindest das kürzere C-Fragment und kam mit dem Ergebnis des Sequenzvergleichs überein.

Wendet man diese Berechnungen auf die Nukleotidsequenz an und translatiert die daraus folgende Sequenz, erhält man eine Aminosäuresequenz, die ebenfalls vier Annexin-Domänen und eine hohe Übereinstimmung mit dem ursprünglichen Protein zeigt. In Folge dessen ergibt sich aus dem neu definierten Intron keine Veränderung bezüglich des Proteins, die berechnete Molekularmasse entsprach auch den von LESCH (2005) angenommenen Werten.

Eine Neubewertung der Splice-Sites in den beiden restlichen vorhandenen Annexin-Sequenzen (LESCH 2005) ergab kürzere Nukleotidsequenzen, deren Fragmente in Bezug auf die verwendeten Primer nun eine in etwa übereinstimmende Größe zeigten. Die resultierenden Aminosäuresequenzen konnten bei einem Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank als Annexin IX, sowohl von *Manduca sexta* als auch *Bombyx mori*, identifiziert werden.

4.6. Vermutungen zur Funktion von Annexin IX in *Manduca sexta*:

Die bisherigen Ergebnisse lassen keine eindeutige Klärung *einer bestimmten* Funktion von Annexin IX zu. Es könnte als Kalziumkanal fungieren, wie dies z.B. für Annexin-V in vitro (ROJAS *et al.* 1990) gezeigt wurde, obwohl dieses nur mit der Membran assoziiert ist und nicht transmembran zu liegen kommt (HUBER *et al.* 1992). Ebenfalls für Annexin-V ist eine intrazelluläre Bindung an Integrinrezeptoren bekannt, und dieses Protein könnte daher im Zusammenhang mit der Anheftung an die extrazelluläre Matrix stehen (ANDERSEN *et al.* 2002). Von *Manduca sexta* Hämocyten ist bekannt, dass diese ein spezifisches Integrin besitzen, welches bei Einkapselungsvorgängen notwendig ist (LEVIN *et al.* 2004). Von Annexinen (hier Annexin V bzw. Anchorin CII) ist bekannt, dass es selektiv an Kollagen, einem Baustein der extrazellulären Matrix, zu binden vermag und in diesem Zusammenhang mit dem Aufbau der Matrix gesehen wird (KIRSCH & PFÄFFLE 1992). Ein Zusammenhang von Annexin IX in *Manduca sexta* mit der extrazellulären Matrix lässt sich aus den Ergebnissen der konfokalen Laserscanmikroskopie schliessen. Ebenfalls erklären würde es das Vorkommen von Annexin IX in zumindestens einer Isoform in allen daraufhin untersuchten Organen. Die Veränderungen des Fluoreszenzmusters in Zusammenhang mit der Parasitisierung durch *Cotesia congregata* kann ebenfalls in diesem Kontext interpretiert werden. Der Parasitoid verhindert die Einkapselung seiner Nachkommen durch die Hämocyten (BECKAGE *et al.* 1994, ALLEYNE & BECKAGE 1997, AMAYA *et al.* 2005) und somit auch deren Umhüllung mit extrazellulärem Material.

Die Veränderungen der Hämocyten während des Anheftens können auch im Zusammenhang mit der Immunantwort gesehen werden.

Dass Annexine eine Rolle im Immungeschehen zu spielen vermögen, wird durch die Auswirkungen von Annexin I auf die neutrophile Extravasation bei Säugetieren deutlich. Hier wirkt Annexin I inhibitorisch auf das Austreten der Neutrophilen aus den Gefässen (WALTER *et al.* 2000, RESCHER & GERKE 2004).

Annexin IX könnte nach den vorliegenden Beobachtungen also durchaus eine Rolle bei der Immunantwort spielen.

Weiterhin wurde für Annexin IX in *Bombyx mori* ein Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod festgestellt (KANEKO *et al.* 2006). Hier scheint ein hohes Expressionslevel den programmierten Zelltod zu verhindern. Annexin IX wurde im Laufe der Arbeit ebenfalls in Spinndrüsen von *Manduca sexta* beobachtet, so dass hier ein ähnlicher Zusammenhang zu bedenken ist.

Dass Annexine nicht nur eine Funktion im Zellgeschehen übernehmen, zeigen die vielfältigen Funktionen von z.B. Annexin (A) 1 (PARENTE & SOLITO 2004), zumal für Annexin IX drei Isoformen bekannt sind, die sich in ihrem Core-Bereich, der die Kalzium- und Phospholipid-Bindestellen enthält, unterscheiden (XIA *et al.* 2001, LESCH 2005). Es wäre daher durchaus möglich, dass die diversen Isoformen mehrere Funktionen ermöglichen.

Nach den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen könnte das Protein sowohl am Aufbau der bzw. dem Anheften der Zellen an der extrazellulären Matrix beteiligt sein als auch als Kalziumkanal fungieren.

4.7. Ausblicke:

Die genauen Funktionen von Annexin IX könnten durch weitere Untersuchungen, etwa einer Hemmung der Annexin IX-Synthese durch RNAi und durch Aufreinigen des Proteins und anschließende Bindeversuche weitergehend beleuchtet werden.

Weitere Schlüsse könnten durch den Vergleich der Expression von Annexin IX während der Häutungsphasen bzw. der Metamorphose oder auch bei Infektionen gewonnen werden.

Auch ein direkter Einsatz des Antikörpers #78 *in vivo*, wie dies z.B. mit Antikörper #13 durchgeführt wurde (LEVIN *et al.* 2005), könnte einen weiteren Schritt darstellen, allerdings könnte hier das aus dieser Arbeit geschlossene flächendeckende Vorkommen des Antigens an der Innenseite der Leibeshöhle zu Komplikationen durch eine Immunantwort auf ein durch diese Prozedur ubiquitäres Fremdprotein führen.

Weiterhin könnte durch die hohe Konservierung der Domänen Annexin IX durch Vergleich bei mehreren Insektenarten neue Einblicke in die Taxonomie ermöglichen.

5. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurde über einen für *Manduca sexta* Annexin IX spezifischen monoclonalen Antikörper (Antikörper #78) ein Vorkommen von Annexin IX in diversen Lepidopteren nachgewiesen. Neben den bisher bekannten unterschiedlichen Nachweisen von Annexin IX in *Manduca sexta* und *Bombyx mori* wurde Annexin IX in *Acherontia atropos*, *Hyalophora cecropia*, *Actias artemis* und *Galleria mellonella* gefunden und dokumentiert. Zusätzlich gelang es für *Acherontia atropos*, den Nachweis von Annexin IX über RT-PCR zu bekräftigen.

Weiterhin wurde Antikörper #78 eingesetzt, um ein Vorkommen von Annexin IX in Hämocyten und die Veränderung über die Zeit während des Anheftungsvorganges der Zellen sichtbar zu machen. Es wurde eine Zunahme der markierten Zelloberfläche während des Vorganges festgestellt. Ausserdem konnte beobachtet werden, dass eine Parasitisierung mit *Cotesia congregata* negative Auswirkungen auf die Grösse der markierten Fläche hatte, während Annexin IX selbst innerhalb der Zelle vorhanden blieb. Daher wurde der Schluss gezogen, dass Annexin IX am Vorgang der Einkapselung innerhalb einer Reaktionskette beteiligt sein könnte.

Ebenfalls über Antikörper #78 wurde der optische Nachweis von Annexin IX im KLSM in Nervengewebe, Tracheen, Fettkörper, Malpighi'schen Gefässen, Spinndrüsen und weiteren Organen erbracht und durch Western-Blot bekräftigt. Den optischen Schnitten folgend kommt Annexin IX in den Organen hauptsächlich in den umhüllenden äusseren Bereichen vor. Bei Malpighi'schen Gefässen und Spinndrüsen allerdings scheint Annexin IX auch im Organinneren vorzukommen.

Da es mit Hilfe des verwendeten Antikörpers nicht möglich war, zwischen den drei vermuteten Isoformen von Annexin IX zu differenzieren, wurde der Vorgang der RT-PCR genutzt, da sich die erwarteten Fragmente der jeweiligen Isoformen theoretisch in der Länge unterscheiden. Es wurden in den meisten Organen drei Fragmente gefunden, die allerdings jeweils kürzer als erwartet waren. Eine Sequenzanalyse und anschließender Sequenzvergleich ergab, dass es sich bei den Fragmenten um Annexin IX-Sequenzen handelte, die allerdings nicht an den bisher erwarteten Splice-Sites verknüpft waren. Eine erneute Berechnung der möglichen Lage Introns und Exons ergab mehrere Möglichkeiten, von denen je eine pro

Isoform die vorliegenden Ergebnisse zu erklären vermochten. Eine Translation der auf diese Weise erhaltenen Nukleotidsequenzen brachte drei Aminosäuresequenzen hervor, die sich als Annexin IX identifizieren liessen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass andere Splicing-Sites als bisher erwartet (siehe LESCH 2005) bei *Manduca sexta* Annexin IX genutzt werden.

6. Literaturverzeichnis:

- ALLEYNE M. & BECKAGE N.E. (1997): Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology* 43: 407-424
- AMAYA K.E., ASGARI S., JUNG R., HONGSKULA M. & BECKAGE N.E. (2005): Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. *Journal of Insect Physiology* 51: 505-512
- ANDERL I. (2001) Untersuchungen zur Phagozytose von *Manduca sexta* L., Sphingidae. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen
- ANDERSSON K. & STEINER H. (1987) Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem* 17(1): 133-140
- ANDERSEN M.H., BERGLUND L., PETERSEN T.E. & RASMUSSEN J.T. (2002): Annexin-V binds to the Intracellular Part of the β_5 Integrin Receptor Subunit. *Biochem Biophys Res.* 292:550-557.
- ARUR S., UCHE U. E., REZAUL K., FONG M., SCRANTON V., COWAN A. E., MOHLER W. & HAN D. K. (2003) Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 4:587-598
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (2004): The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198:116-126.
- BABIYCHUK E. B. AND DRAEGER A. (2000): Annexins in cell membrane dynamics: Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J. Cell Biol.* 150, 1113-1124.
- BANCES P., FERNANDEZ M.-R., RODRIGUEZ-GARCIA M.-I., MORGAN R. O. & FERNANDEZ M.-P. (2000) Annexin A11 (ANXA11) gene structure as the progenitor of paralogous annexins and source of orthologous cDNA isoforms. *Genomics* 69: 95-103

BLACK D. L. (2003): Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336

BECKAGE N.E., RIDDIFORD L.M. (1982): Effects of parasitism by *Apantheles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *General Comparative Endocrinology* 47: 308-322.

BECKAGE N.E. & TEMPLETON T.J. (1986): Physiological effects of parasitism by *Apantheles congregatus* in terminal-stage tobacco hornworm larvae. *Journal of Insect Physiology* 32: 299-314.

BECKAGE N.E., TAN F.F., SCHLEIFER K.W., LANE R.D., CHERUBIN L.L.(1994): Charakterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 26: 165-195.

BELLE E., BECKAGE N.E., ROUSSELET J., POIRIE M., LEMEUNIER F.& DREZEN J.-M. (2002): Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. *Journal of Virology* 76: 5793-5796.

BERENDES R., VOGES D., DEMANGE P., HUBER R., BURGER A. (1993): Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science* 262: 555-561.

BJORCK L & KRONVALL G. (1984):Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol.*;133(2):969-74.

BLAKE M. S., JOHNSTON K. H., RUSSEL-JONES G. J. & GOSCHLICH E. C. (1984): A rapid, sensitive method for detection of Alkaline Phosphatase-conjugated anti-antibody on Western Blots. *Anal Biochem* 136: 175-179

BLUM H., BEIER H., GROSS H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

BOMAN H. G. (1996): Peptide Antibiotics: Holy or heretic grails of innate immunity? *Scand J Immunol* 43: 475-482

BRADFORD M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemie*, 72: 284-251.

BURGER A., VOGES D., DEMANGE P., PEREZ C.R., HUBER R. & BERENDES R. (1994): Structural and electrophysical analysis of annexin V mutants. Mutagenesis of human annexin V, an in vitro voltage-gated calcium channel, provides information about the structural features of the ion pathway, the voltage sensor and the ion selectivity filter. *J. Molec. Biol.* 237: 479-499.

DELMER D. P. & POTIKHA T. S. (1997) Structures and functions of annexins in plants. *Cell Mol Life Sci* 53: 546-553

DUNN P. E. (1986) Biochemical aspects of insect immunology. *Ann Rev Entomol* 31: 321-339

FINNERTY C. M., KARPLUS P. A. & GRANADOS R. R. (1999) The insect immune protein scolexin is a novel serine protease homolog. *Protein Sci* 8: 242-248

GASTEIGER E., HOOLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D. & BAIROCH A. (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005): pp. 571-607.

GELMAN D.B., REED D.A., BECKAGE N.E. (1998): Manipulation of fifth-instar host (*Manduca sexta*) ecdysteroid levels by the parasitoid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology* 44: 833-843.

GERKE V. & MOSS S. E. (2002) Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 82: 331-371

GEUENICH S. (2005): Durchflusscytometrische und immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der Hämocyten des Tabakswärmers *Manduca sexta* L. .Diplomarbeit an der JLU Giessen.

GILLESPIE JP, KANOST MR, TRENCZEK T (1997): Biological mediators of insect immunity; *Annu Rev Entomol.*:42:611-43

GRAVELEY B.R. (2001): Alternative. Splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genet* 17(2): 100-107

GRIGAT J. (2003): Untersuchungen zur Signaltransduktion bei Phagozytosevorgängen an Hämocyten von *M. sexta*. Diplomarbeit an der JLU-Gießen

HEGEMER C. (2003): Untersuchungen an Hämocyten und Hämolymphe von *Manduca sexta* mittels verschiedener elektrophoretischer Methoden. Diplomarbeit an der JLU-Gießen.

HOFFMANN J.A. (1995): Innate immunity of insects; *Curr Opin Immunol.* Feb;7(1):4-10

HOROHOV D. W. & DUNN P. E. (1982): Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *J Invertebr Pathol* 40: 327-339

HUBER R., BERENDES R., BURGER A., LUECKE H. & KARSHIKOV A. (1992): Annexin V-crystal structure and its implications on function. *Behring. Inst. Mitt.*:107-125.

HULTMARK D (1996): Insect lysozymes; *EXS.*;75: 87-102

JOHNSTON, P.A., PERIN, M.S., REYNOLDS, G.A., WASSERMAN, S.A. & SUDHOF, T.C. (1990): Two novel annexins from *Drosophila melanogaster*. Cloning, characterization, and differential expression in development. *J Biol Chem* 265: 11382–11388.

JOHNSON J. M., CASTLE J., GARRETT-ENGELE P., KAN Z., LOERCH P. M., ARMOUR C. D., SANTOS R., SCHADT E. E., STOUGHTON R. & SHOEMAKER D. D. (2003): Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302: 2141-2144.

Kamal AM, Flower RJ & Perretti M. (2005): An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Mar;100 Suppl 1:39-47.

KANEKO Y, TAKAKI K., IWAMI M. & SAKURAI S. (2006): Developmental Profile of Annexin IX and its Possible Role in Programmed Cell Death of the *Bombyx mori* Anterior Silk Gland. *Zoological Science*, Vol 23, pp. 533-542.

KANOST M. R., ZEPP M. K., LADENDORFF N. E. & ANDERSSON L. A. (1994): Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *Arch. Insect Biochem Physiol*. 27(2):123-36.

KIRSCH T. & PFÄFFLE M. (1992): Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins. *FEBS Lett*. 310(2):143-147.

KUNO H. & KIHARA H. K. (1967): Simple microassay of protein with membrane filter. *Nature* 215: 974-975

KUNDRANDA M.N., RAY S., SARIA M., FRIEDMAN D., MATRISIAN L.M., LUKYANOV P. & OCHIENG J. (2004): Annexins expressed on the cell surface serve as receptors for adhesion to immobilized fetuin-A. *Biochim Biophys Acta*. 23;1693(2):111-23.

KOTSYFAKIS M., VONTAS J, SIDEN-KIAMOS I, LOUIS C. (2005): The annexin gene family in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*. 14(5):555-62

KOTSYFAKIS M., EHRET-SABATIER L., SIDEN-KIAMOS I., MENDOZA J., SINDEN R.E., LOUIS C. (2005): Plasmodium berghei ookinetes bind to *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* annexins. *Molecular Microbiology* 57(1): 171-179.

KYRIAKIDES T. R., MCKILLIP J. & SPENCE K. D. (1995) Biochemical characterization, developmental expression, and induction of the immune protein scolexin from *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 29: 269-280

- KYHSE-ANDERSEN J. (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 3: 97-128
- LACKIE, A. M. (1988) Haemocyte behaviour. *Adv Insect Physiol* 21: 85-178
- LAMBERTY M ADES S, UTTENWEILER-JOSEPH S, BROOKHART G, BUSHEY D, HOFFMANN JA, BULET P (1999): Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity; *J Biol Chem.* Apr 2;274(14):9320-6.
- LADENDORFF N. E. & KANOST M. R. (1991) Bacteria-induced protein P4 (Hemolin) from *Manduca sexta*: A member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch Insect Biochem Physiol* 18: 285-300
- LESCH C (2005): Untersuchungen zu möglichen Bindungs- und Aktivierungsfaktoren der zellulären Immunantwort bei *Manduca sexta* L.; Inauguraldissertation an der JLU Giessen.
- LEVIN D.M., BREUER L.N., ZHUANG S., ANDERSON S.A., NARDI J.B. & KANOST M. (2005): A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35:369-380.
- LIEMANN S., BENZ J., BURGER A., VOGES D., HOFMANN A., HUBER R. *et al.* (1996): Structural and functional characterisation of the voltage sensor in the ion channel human annexin V. *J. Molec. Biol.* 258: 555-561.
- LIEMANN S. & HUBER R. (1997) Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* 53: 516-521
- LYNN D.E. & OBERLANDER H. (1981): The effect of cytoskeletal disrupting agents on the morphological response of a cloned *Manduca sexta* cell line to 20-hydroxy-ecdysone. *Roux's Arch Dev. Biol* 190: 150-155.
- MAILLARD W. S., HAIGLER H. T. & SCHLAEPFER D. D. (1996) Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of Annexin I. *J Biol Chem* 271(2): 719-725

MARCHLER-BAUER A., PANCHENKO A.R., SHOEMAKER B.A., THIESSEN P.A., GEER L.Y. & BRYANT S.H. (2002): CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 30:281-283

MARCHLER-BAUER A., ANDERSON J.B., DEWEESE-SCOTT C., FEDOROVA N.D., GEER L.Y., HE S., HURWITZ D.I., JACKSON J.D., JAKOBS A.R., LANCZY C.J., LIEBERT C.A., LIU C., MADEJ T., MARCHLER G.H., MAZUMDER R., NIKOLSKAYA A.N., PANCHENKO A.R., RAO B.S., SHOEMAKER B.A., SIMONYAN V., SONG J.S., THIESSEN P.A., VASUDEVAN S., WANG Y., YAMASHITA R.A., YIN J.J. & BRYANT S.H. (2003): CDD: a curated Entrezdatabase of conserved domain alignments. *Nucleic Acid Res.* 31:383-387.

MARCHLER-BAUER BRYANT S.H. (2004): protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acid Res.* 32 (Web Server issue):W327-331.

MARCHLER-BAUER A., ANDERSON J.B., CHERUKURI P.F., DEWEESE-SCOTT C., GEER L.Y., GWADZ M., HE S., HURWITZ D.I., JACKSON J.D., KE Z., LANCZYCKI C., LIEBERT C.A., LIU C., LU F., MARCHLER G.H., MULLOKANDOV M., SHOEMAKER B.A., SIMONYAN V., SONG J.S., THIESSEN P.A., YAMASHITA R.A., YIN J.J., ZHANG D. & BRYANT S.H.(2005): CDD: a conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* 33: Database Issue:D192-6.

MATSUDA R., KANEKO N., HORIKAWA Y., CHIWAKI F., SHINOZAKI M., IEIRI T., SUZUKI T. & OGAWA N. (2001): Localization of annexin V in rat normal kidney and experimental glomerulonephritis. *Res Exp Med* 200:77-92.

MATSUNAGA T. M. & FUJIWARA H. (2002) Identification and characterization of genes abnormally expressed in wing-deficient mutant (*flügellos*) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 691-699

MINNICK M. F., RUPP R. A. & SPENCE K. D. (1986) A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte coagulation in *Manduca sexta*. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 729-735

MOLLENHAUER J. (1997): Annexins: what are they good for?. *Cell. Mol. Life sci.* 53: 506-507

MORGAN R. O., JENKINS N. A., GILBERT D. J., COPELAND N. G., BALSARA B. R., TESTA J. R. & FERNANDEZ M. P. (1999) Novel human and mouse Annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* 60: 40-49

MOSS S. E. & MORGAN R. O. (2004) The annexins. *Genome Biol* 5(4): 219.1-219.8
(*electronic version*) URL: <http://genomebiology.com/2004/5/4/219>

NEUMANN P, PIRK CW, HEPBURN HR, SOLBRIG AJ, RATNIEKS FL, ELZEN PJ, BAXTER JR (2001): Social encapsulation of beetle parasites by Cape honeybee colonies (*Apis mellifera capensis* ESCH.). *Naturwissenschaften*;88(5):214-6. [Erratum in: *Naturwissenschaften* 2001 Sep;88(9):400]

NORTON P.A. (1994): Commentary: Alternative pre.mRNA splicing: factors in splice site selection. *J. Cell. Sci.* 107(1):1-7

OZEKI M., HOSHINO S., HIAI H. & TOYOKUNI S. (2002) Isolation and characterization of *annexin 2* pseudogene on *Rattus norvegicus*. *Gene* 289: 185-190

PARENTE L. & SOLITO E. (2004): Annexin 1: more than an anti phospholipase protein. *Inflamm. res.* 53:125-132.

PECH L. L. & STRAND M. R. (1996) Granular cells are required of encapsulation for foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci* 109: 2053–2060

PECH L. L. & STRAND M. R. (2000) Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J Insect Physiol* 46: 1565-1573

PENZLIN H. (1996): *Lehrbuch der Tierphysiologie*, 6. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart.

PERRETTI M, CROXTALL JD, WHELLER SK, GOULDING NJ, HANNON R, FLOWER RJ (1996): Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med.* 2(11):1259-62.

PERRETTI M. (1998): Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol* 31: 545-552.

PERRETTI M, CHRISTIAN H, WHELLER SK, AIELLO I, MUGRIDGE KG, MORRIS JF, FLOWER RJ, GOULDING NJ. (2000): Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int*. 24(3):163-74.

PERRETTI M. & FLOWER R. (2004): Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukoc Biol*.76(1):25-9.

POLLARD H.B. & ROJAS E. (1988): Ca^{2+} activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca^{2+} channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2974-2978.

POLLARD H.B., GUY H.R., ARISPE N., DE LA FUENTE M., LEE G., ROJAS E.M., *et al.* (1992) Calcium channel and membrane fusion activity of synexin and other members of the Annexin gene family. *Biophys. J.* 62: 15-18

RASMUNSON T. & BOMAN H. G. (1979) Insect immunity – V. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Insect Biochem* 9: 259-264

RATCLIFFE N. A. & ROWLEY A. F. (1979) Role of hemocytes in defense against biological agents. In: *Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques*. Ed. A. P. Gupta, Cambridge University Press, London, UK, pp. 331-414

RAYNAL P. & POLLARD H. B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipidbinding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197: 63-93

REESE M.G. & EECKMAN F.H. (1996): Splice Sites: A detailed neural network study. *Proceedings of the 1996 Genome Mapping & Sequencing Meeting*, Cold Spring Harbour, New York, arranged by D. Bentley, E. Green and P. Hieter.

REESE M.G., EECKMAN F.H., KULP D. & HAUSSLER D. (1997): Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comp Biol.* 4(3):311-323.

RENAULT T., XUE Q.G. & CHILMONCZYK S. (2001): Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 11(3):269-74.

RESCHER, U. & GERKE, V. (2004): Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117: 2631–2639

RETY S, SOPKOVA J, RENOUEARD M, OSTERLOH D, TABARIES S, RUSSOMARIE F & LEWITT-BENTLEY A. (1999): The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nature Struct Biol* 6: 89–95

ROJAS E., POLLARD H.B., HAIGLER H.T., PARRA C. & BURNS A.L. (1990): Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J. Biol.Chem.* 265: 21207-21215.

SAVARY S., DREZEN J.M., TAN F., BECKAGE N.E., PERIQUET, G. (1999): The excision of polydnavirus sequences from the genome of the *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastrinae) is developmentally regulated but not strictly restricted to the ovaries in the adult. *Insect Molecular Biology* 8: 319-327.

SCHLEGEL H. G. (1992): *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

SHIMADA T., KURIMOTO Y. & KOBAYASHI M. (1995): Phylogenetic Relationship of Silkmoths Inferred from Sequence Data of the Arylphorin Gene. *Mol Phylogenet Evol.* 4 (3):223-34.

SMITH P. D. & MOSS S. E. (1994): Structural evolution of the annexin supergene family. *TIG* 10(7): 241-246

THEOPOLD U., SCHMIDT O., SODERHALL K. & DUSHAY M. S. (2004): Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* 25(6): 289-94.

- TRENCZEK T. (1998): Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology* 101(4): 298-315
- TRENCZEK T. & FAYE I. (1988): Synthesis of immune proteins in primary cultures of fat body from *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem* 18(3): 299-312
- VILMOS P. & KURUCZ É. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62: 59-66
- WAGO H. & ICHIKAWA Y. (1979) Changes in the phagocytic rate during the larval development and manner of hemocytic reactions to foreign cells in *Bombyx mori*. *Appl Entomol Zool* 14: 397-403
- WALTHER A., RIEHEMANN K. & GERKE V.(2000): A Novel Ligand of the Formyl Peptide Receptor: Annexin I Regulates Neutrophil Extravasation by Interacting with the FPR. *Molecular Cell*, Vol 5, 831-840
- WEHNER R. & GEHRING W. (1995): *Zoologie*, 23. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- WENG X, LUECKE H, SONG IS, KANG DS, KIM SH, & HUBER R. (1993):Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci* 2: 448–458.
- WIEGAND C., LEVIN D., GILLESPIE J. P., WILLOTT E., KANOST M. R. & TRENCZEK T. (2000) Monoclonal antibody M13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Arch Insect Biochem Physiol* 45: 95-108
- WIESLER M. (2003): Vergleichende Untersuchungen über Veränderungen der Hämocyten von *Manduca sexta* nach einer Parasitierung durch *Cotesia congregata*. Diplomarbeit an der JLU Giessen.

WILKINS M.R., LINDSKOG I., GASTEIGER E., BAIROCH A., SANCHEZ J.-C., HOCHSTRASSER D.F. & APPEL R.D. (1997): Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS – a World Wide Web accessible tool. *Electrophoresis* 18(3-4):403-408.

WILLOTT E., TRENCZEK T., THROWER L. W. & KANOST M. R. (1994) Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *Eur J Cell Biol* 65: 417-423

WILLOTT E., HALLBERG C. A. & TRAN H. Q. (2002) Influence of calcium on *Manduca sexta* plasmatocyte spreading and network formation. *Arch Insect Biochem Physiol*,49(4):187-202

WILLOTT E. & TRAN H. Q. (2002) Zinc and *Manduca sexta* hemocyte functions. *J Insect Sci* 2:6. URL: <http://www.insectscience.org/2.6>

XIA Q.-Y., FUJII H., KUSAKABE T. & BANNO Y. (2001) Identification of three annexin IX isoforms generated by alternative splicing of the carboxyl-terminal exon in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 32(1): 9-14

YAMAMOTO R. T. (1969): Mass rearing of the tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation. *J Econ Entomol* 62(6):1427-1431

YIN L., ZHANG C., QIN J., WANG C. (2003): Polydnavirus of *Campoletis chloridae*: characterization and temporal effects on host *Helicoverpa armigera* cellular immune response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 52: 104-113.

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. T. Trenczek für die Überlassung des Arbeitsthemas, vielfältige Hilfestellungen und Tipps sowie freundliche Anstöße in die richtige Richtung.

Prof. Dr. A. Dorresteijn danke ich für seine Bereitschaft, das Amt des Zweitgutachters zu übernehmen, für hilfreiche Korrekturhinweise und auch für die entgegengebrachte Freundlichkeit und vor allem Geduld.

Danken möchte ich auch der gesamten AG Trenczek, insbesondere Frau A. Diebel, Frau J. Friedl und Frau S. Renner, die als „gute Geister“ und mit zahllosen Tricks und Kniffen hilfreich zu Seite standen. Ebenfalls Dank schulde ich Frau Dr. C. Lesch für ihre Ratschläge und zahllose Diskussionen zum Thema Annexin.

Nicht vergessen werden dürfen Dr. S. Angeli, Dr. H. Schmidtberg und Dipl. Biol. F. Gökcen, denen ich für ihren mitgeteilten Erfahrungsschatz und Engagement danken möchte.

Unbedingt erwähnenswert sind auch die vielen hilfreichen Hände, die mir von Praktikanten und Diplomanden gereicht wurden, besonders zu erwähnen ist hier Dipl. Biol. S. Geuenich, deren unschätzbare Hilfe am FACS einen grossen Beitrag zu dieser Arbeit leistete.

Allgemein möchte ich auch der AG Dorresteijn danken, deren Hilfsbereitschaft u. a. sehr zum Gelingen der RT-PCR beitrug. Speziell erwähnen möchte ich Dr. A. Holz für ihre Unterstützung am KLSM.

Besonderer Dank gilt Dipl. Biol. Melanie Wiesler für unzählige Diskussionen, den „Kampf um die Cotesien“ und (vor allem) gegen die Tücken der Technik.

Sylvia, Anika, Georg und Stefan danke ich ganz einfach für ihre Unterstützung in vielerlei Hinsicht.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Marburg, im Juni 2008

Eidesstattliche Erklärung