

Untersuchungen zur Rolle des larvalen hämatopoetischen Organs von *Manduca sexta* bei der Hämatopoese und der Immunantwort

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08 – Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christoph-Rüdiger Hubertus Harald Alexander von Bredow
geboren in Regen

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

Erstgutachter: Prof. Dr. Martina E. Trenczek

Zweitgutachter: PD Dr. Ellen Kauschke

Gießen, im Februar 2017

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

VON BREDOW C.-R., VON BREDOW Y., TRENCZEK T. (in Vorbereitung): The haematopoietic organ as a source of putative prohaemocytes and plasmatocytes in *Manduca sexta* larvae.

VON BREDOW C.-R., VON BREDOW Y., DVOŘÁK J., ŠKANTA F., KAUSCHKE E., PROCHÁZKOVÁ P., BILEJ M., TRENCZEK T. (in Vorbereitung): Differential expression of immunity related genes in larval *Manduca sexta* tissues in response to gut inflammation and systemic infection.

Tagungsbeiträge

VON BREDOW C.-R. UND TRENCZEK T. (2011): (Immuno-)histochemical Characterisation of Hematopoietic Organs in *Manduca sexta* (L. 1763). Posterpräsentation, Jahrestagung der deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG) in Saarbrücken, 2011.

KÜHNEL Y., VON BREDOW C.-R., TRENCZEK T. (2012): Hemocyte Identification in Embryos and Larvae of *Manduca sexta* L 1763 (Lepidoptera, Sphingidae). Posterpräsentation, Jahrestagung der deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Universität Konstanz, 2012.

KÜHNEL Y., VON BREDOW C.-R., ŠKANTA F., DVOŘÁK J., TRENCZEK T. (2013): Quantitative Analysis of Gut Associated Immunity in *Manduca sexta*. Posterpräsentation, Jahrestagung der deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Ludwig-Maximilians-Universität München, 2013.

KÜHNEL Y., VON BREDOW C.-R., TRENCZEK T. (2015): Monoclonal Antibody MS75, a Marker for Plasmatocytes and Hematopoietic Organs in *Manduca sexta* Embryos and Larvae. Posterpräsentation, Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE) und der Société Française de Biologie du Développement, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2015

Präsentierende Autoren unterstrichen.

„Wie stets in der Wissenschaft hatte sich damit die Zahl der Probleme insgesamt aber keineswegs verringert.“

VON DITFURTH, Der Geist fiel nicht vom Himmel, Bezug nehmend auf die Aufklärung der Funktion des Stammhirns durch REICHARDT.

Abkürzung	Bedeutung
A	<u>A</u> mpere
α	Alpha bzw. anti
AC-Saline	Antikoagulanzsaline (<i><u>ant</u>icoagulant <u>sal</u>ine</i>)
AMP	<u>ant</u> imikrobielles <u>pe</u> ptid
AP	<u>al</u> kalische <u>ph</u> osphatase
AS	<u>A</u> minosäure
BCIP	5- <u>B</u> rom-4- <u>cl</u> hor-3- <u>in</u> doxyl <u>ph</u> osphat
βGRP	β-1,3-Glucan-Erkennungsprotein (β-1,3- <i><u>gl</u>ucan <u>rec</u>ognition <u>pr</u>ote<u>in</u></i>)
BSA	<u>bo</u> vines <u>se</u> rum <u>al</u> bumin, Fraktion V
bzw.	<u>be</u> ziehungs <u>we</u> ise
°C	Grad Celsius
ca.	<u>cir</u> ca
cDNA	komplementäre DNA (Produkt reverser RNA-Transkription; <i><u>com</u>plementary <u>DNA</u></i>)
Cy3, Cy5	Indocarboc <u>ya</u> nin-Farbstoffe
d	Tag (<i><u>da</u>y</i>)
DAB	<u>D</u> iaminobenzidin
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2- <u>ph</u> enyl <u>in</u> dol
DEPC	<u>D</u> iethylpyroc <u>ar</u> bonat
DHC	<i><u>diff</u>erential <u>hem</u>ocyte <u>cou</u>nt</i> , Differentielle Hämozytenzahl
DMSO	<u>Di</u> methylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i><u>de</u>oxyribo<u>nuc</u>leic <u>ac</u>id</i>)
ECM	extrazelluläre Matrix (<i><u>extra</u>cellular <u>ma</u>trix</i>)
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>ac</u> etat
EtOH	Ethanol
evtl.	<u>event</u> uell
FA	<u>F</u> lügelimaginalan <u>la</u> nge
FISH	<u>F</u> luoreszenz-RNA- <i><u>in</u>-<u>si</u>tu</i> -Hybridisierung
FITC	<u>F</u> luoresceinisothiocyanat
FK	<u>F</u> ettkörper
g	<u>G</u> ramm
g	mittlere Erdbeschleunigung 9,81 m/s ² , in Verbindung mit einer Zahl X das X-fache der mittleren Erdbeschleunigung
γ	Gamma
ggf.	<u>ge</u> gebenenfalls
gDNA	<u>ge</u> nomische <u>DNA</u>
GR	<u>gr</u> anuläre Zelle
GRspr	gespreitete granuläre Zelle (<i><u>gr</u>anular <u>cell</u>, <u>spre</u>aded</i>)
h	Stunde (<i><u>hou</u>r</i>)
HC	Hämozyte (<u>he</u> mocyte)
HEWL	<u>H</u> ühnereiweislysozym
HEWLÄq	<u>H</u> ühnereiweislysozym-Äquivalent
HO	<u>h</u> ämatopoetisches <u>Org</u> an (<i><u>he</u>matopoietic <u>org</u>an</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i><u>hor</u>se<u>ra</u>dish <u>per</u>oxidase</i>)
HZ	<u>H</u> ämozyte
IF	<u>I</u> mmun <u>flu</u> oreszenz
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IHC	<u>I</u> mmun <u>hi</u> sto <u>che</u> mie
IML	<u>I</u> mmu <u>le</u> ktin
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalaktopyranosid
ISH	RNA- <i><u>in</u>-<u>si</u>tu</i> -Hybridisierung
kDa	<u>K</u> ilo <u>dal</u> ton
l	<u>L</u> iter
L	Larvenstadium
LB	<i><u>lys</u>ogeny <u>bro</u>th</i>
m	<u>M</u> illi
M	<u>M</u> olar (= mol/liter)
μ	Mikro
mAb	monoklonaler Antikörper (<i><u>mono</u>clonal <u>anti</u>body</i>)
MeOH	Methanol
min	<u>Min</u> ute

Abkürzung	Bedeutung
mRNA	<u>m</u> essenger- <u>R</u> NA
MS ⁻	Calcium- und Magnesium-freie <u>M</u> anduca <u>s</u> exta- <u>S</u> aline
MU	<u>M</u> uskel
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
NBT	<u>N</u> itro <u>b</u> lau <u>T</u> etrazolium
n	Nano
<i>n</i>	Anzahl
N/A	<u>N</u> icht <u>a</u> nwendbar (<u>n</u> ot <u>a</u> pplicable)
N:C	Zellkern-zu-Zytoplasma-Verhältnis (<u>n</u> uclear-to- <u>c</u> ytoplasm ratio)
ND	nicht bestimmt (<u>n</u> ot <u>d</u> etermined)
NGS	Ziegenserum (<u>n</u> ormal <u>g</u> oat <u>s</u> erum)
OE	<u>O</u> enozytoid
o. g.	<u>o</u> ben <u>g</u> enannt
p	<u>P</u> ico
<i>p</i>	Signifikanzwert
PA	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<u>p</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pers.Mitt.	<u>p</u> ersönliche <u>M</u> itteilung
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormaldehyd
PGRP	Peptidoglykan-Erkennungsprotein (<u>p</u> eptidoglycan <u>r</u> ecognition <u>p</u> rotein)
PL	<u>P</u> lasmatocyte
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> -Lektin (<u>p</u> eanut <u>a</u> gglutinin)
PNAm+	durch PNA an der Zellmembran markiert
PO	<u>P</u> henoloxidase
PPO	<u>P</u> rophenoloxidase
ProHZ oder ProHC	<u>P</u> rohämocyte (<u>p</u> rohaemocyte)
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor)
PTU	Phenylthioharnstoff (<u>p</u> henyl <u>t</u> hiourea)
PTW	Phosphat-gepufferte Saline mit 0,1 % Tween® 20
PVDF	<u>P</u> olyvinylidenfluorid
PVP	<u>P</u> olyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
rPL	<u>r</u> unde <u>P</u> lasmatocyte
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> CR, cDNA-Synthese gefolgt von PCR-Analyse
s	<u>S</u> ekunde
SD	Standardabweichung (<u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
smPL	kleine Plasmatozyte (<u>s</u> mall <u>p</u> lasmatocyte)
SOC	<u>s</u> uper <u>o</u> ptimal broth with <u>c</u> atabolite repression Medium
SP	<u>s</u> phärule Zelle
syn.	<u>s</u> ynonym
T	<u>T</u> horakalsegment
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
TBS	Tris-gepufferte Saline (<u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
TR	<u>T</u> rachee
Tris	<u>T</u> risaminomethanbase
TRITC	<u>T</u> etramethylrhodaminisothiocyanat
U	<u>u</u> nit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	<u>V</u> olt
v/v	Volumen pro Volumen
WB	<u>W</u> estern <u>B</u> lot
WD	Flügelimaginalanlage (<u>w</u> ing <u>d</u> isc)
WDTr	Tracheenknäuel der Flügelanlage

Abkürzung	Bedeutung
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-Galaktosid
z. B.	zum Beispiel

Abkürzung	Nukleinsäure
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Abkürzung	Ribonukleosidtriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat

Abkürzung	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

Abkürzung	Aminosäure
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung und Summary

1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summary	3

2 Einleitung

2.1 Hämozyten der Insekten	5
2.2 Hämozytentypen und –funktion in <i>Manduca sexta</i> -Larven	5
2.3 Hämatopoese bei Insekten	8
2.4 Hämatopoetische Gewebe der Insekten	9
2.5 Beschreibende und funktionelle Analysen der Insektenhämatopoese	13
2.6 Immunspezifische Reaktionen hämatopoetischer Gewebe	13
2.7 Zielsetzung	14

3 Material und Methoden

3.1 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien	16
3.2 Zucht und Haltung von <i>Manduca sexta</i>	24
3.3 Gewinnung von Hämozyten	25
3.4 Herstellen von Hämozytenmonolayern	25
3.5 Präparation des hämatopoetischen Organs	25
3.6 Histologische Techniken	25
3.6.1 Anfertigen histologischer Schnitte des hämatopoetischen Organs	25
3.6.2 Pikrosirius-Rot-Färbung mit Kernfärbung von Schnitten	26
3.7 Antikörper- und Lektinmarkierung	26
3.7.1 Antikörper und Lektine	26
3.7.2 Antikörper- und Lektinmarkierung von Hämozytenmonolayern	28
3.7.3 Kompetitive Inhibition der Antikörper- oder Lektinbindung durch Kohlenhydrate	29
3.7.4 Antikörper- und Lektinmarkierung von <i>whole-mount</i> -Präparaten des hämatopoetischen Organs	29
3.7.5 Antikörper- und Lektinmarkierung von Paraffinschnitten	30
3.7.6 Antikörper- und Lektinmarkierung von <i>in-vitro</i> -kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs	30
3.8 Mikroskopische Analyse	31
3.9 Bildbearbeitung	31
3.10 Differentielle Zellzahlermittlung und Bestimmung des Mitoseindex	31
3.11 Zytometrische Methoden	32
3.11.1 Messung der Zellgröße	32
3.11.2 Messung des Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnisses	32
3.11.3 Messung der Fluoreszenzintensität DAPI-markierter Zellkerne	32
3.12 Zellkulturtechniken	33
3.12.1 Bakterienkulturen	33
3.12.2 Hybridomazellkultur und Gewinnung monoklonaler Antikörper	34
3.12.3 Dauerkultur der CH-1-Zelllinie und Gewinnen von CH-1-konditioniertem Medium	34
3.12.4 Primärkultur von hämatopoetischen Organen	34
3.13 Elektrophoresemethoden für Proteinanalysen	35
3.13.1 Aufbereiten von Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	35
3.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.13.3 Western Blot	36

3.13.4 Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine bei SDS-PAGE und Western Blot	36
3.14 Infektionsversuche	37
3.14.1 FITC-markieren von <i>E. coli</i> K12 D31	37
3.14.2 Orale Applikation von <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i>	37
3.14.3 Injektion von lebenden <i>E. coli</i> K12	37
3.14.4 Bestimmung der Wachstumsrate	38
3.14.5 Bestimmung der lytischen Aktivität der Hämolymphe	38
3.14.6 Bestimmung der anti- <i>E. coli</i> K12 D31-Aktivität der Hämolymphe	38
3.14.7 Injektion von abgetöteten FITC-markierten <i>E. coli</i> K12 D31	39
3.14.8 Nachweis der Phagozytosekompetenz des hämatopoetischen Organs <i>in vivo</i>	39
3.15 Molekularbiologische Methoden	39
3.15.1 Suche nach und Identifizierung von bestimmten Genen bzw. Genprodukten bei <i>Manduca sexta</i>	39
3.15.1.1 Bekannte immunrelevante Gene von <i>Manduca sexta</i>	39
3.15.1.2 Auswahl bisher nicht in <i>Manduca sexta</i> beschriebener Gene anderer Taxa	40
3.15.1.3 Bestimmung der Sequenzähnlichkeit zu Genen aus anderen Taxa	40
3.15.2 Analyse der Übereinstimmung zwischen verschiedenen Polypeptidsequenzen	41
3.15.2.1 Multiple Sequenzalignments	41
3.15.2.2 Erstellen phylogenetischer Stammbäume	42
3.15.2.3 <i>In-silico</i> -Identifizierung konservierter Proteindomänen	42
3.15.3 Isolierung genomischer DNA	43
3.15.4 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese für RT-PCR und <i>real-time</i> qPCR	43
3.15.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	44
3.15.5.1 Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung von PCR-Produkten	45
3.15.5.2 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese	45
3.15.6 mRNA-Nachweis mittels RT-PCR	45
3.15.7 <i>Real-time</i> qPCR	46
3.15.8 PCR-Primer	47
3.15.9 Klonieren von DNA-Sequenzen	48
3.15.9.1 Ligieren von DNA-Sequenzen in pCR™ II Vektoren	48
3.15.9.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> K12 5α	48
3.15.9.3 Verwendeter DNA-Vektor	49
3.15.9.4 Kolonie-PCR und Überprüfung der Transformation	49
3.15.9.5 Plasmidaufreinigung	50
3.15.10 DNA-Sequenzierung	50
3.15.11 RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung und Fluoreszenz-RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	50
3.15.11.1 Allgemeine Arbeitsvorbereitungen	50
3.15.11.2 Herstellen Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	50
3.15.11.3 RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Hämocyten	52
3.15.11.4 RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von hämatopoetischen Organen	53
3.16 Statistische Analysen und Diagramme	54
3.17 Verwendete Chemikalien, Kits und Laborgeräte	55

4 Ergebnisse

4.1 Sektion I: Die Rolle des hämatopoetischen Organs bei der Hämatopoese	59
4.1.1 Identifizierung von Hämocytenmarkern	59
4.1.2 Markierung von Oenocytyten mit Hämocytenmarkern	66
4.1.3 Charakterisierung kleiner gespreiteter Hämocyten	70
4.1.4 Zellkernmorphologie und relativer DNA-Gehalt der Hämocytentypen	71
4.1.5 Aufbau und histologische Analyse des hämatopoetischen Organs	75
4.1.6 Identifizierung von Hämocytentypen im hämatopoetischen Organ	77
4.1.6.1 Oenocytyten	77

4.1.6.2 Sphärule Zellen	79
4.1.6.3 Granuläre Zellen	79
4.1.6.4 Plasmatozyten	80
4.1.7 Zellsubpopulationen und Zonierung des hämatopoetischen Organs	80
4.1.7.1 Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs mit MS13, MS75 und MS77	82
4.1.7.2 Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs mit MS13, MS77 und NG3B11	84
4.1.7.3 Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs mit MS77, PNA und NG3B11	86
4.1.7.4 Prozentualer Anteil durch MS13, MS75, NG3B11 oder PNA markierten Zellen im hämatopoetischen Organ	88
4.1.8 Mitotische Aktivität von Zellen des hämatopoetischen Organs	88
4.1.9 <i>In-vitro</i> -Kultur des hämatopoetischen Organs	91
4.1.9.1 Lebendzellbeobachtungen	91
4.1.9.2 Analyse der aus <i>in-vitro</i> -kultivierten hämatopoetischen Organen gewonnenen Hämozytentypen	92
4.1.10 Vergleichende Analyse der PNA-positiven Zellen in zirkulierenden Hämozyten und im hämatopoetischen Organ	96
4.1.11 Analyse der durch PNA markierten Proteine der Hämozyten und des hämatopoetischen Organs	98
4.1.12 Identifizierung von in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ synthetisierten mRNA-Transkripten und Proteinen	99
4.1.12.1 Eater-like Protein	100
4.1.12.2 Croquemort-like Protein	107
4.1.12.3 Peroxidase-like Protein	114
4.1.12.4 Heixuedian-like Protein	119
4.2 Sektion II: Untersuchungen zur Immunkompetenz	124
4.2.1 Immunreaktionen des hämatopoetischen Organs und weiterer Gewebe auf bakterielle Infektionen	124
4.2.2 Einfluss von oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Gabe und von <i>E. coli</i> K12-Injektion auf den allgemeinen Gesundheitszustand	124
4.2.3 Einfluss von oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Gabe und von <i>E. coli</i> K12-Injektion auf das Wachstum	125
4.2.4 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Bakterien aus der Hämolymphe <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> - und <i>E. coli</i> K12-behandelter Larven	126
4.2.5 Lytische Aktivität der Hämolymphe nach oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Aufnahme und <i>E. coli</i> K12-Injektion	128
4.2.6 Anti- <i>E. coli</i> -Aktivität in der Hämolymphe nach oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Aufnahme und <i>E. coli</i> K12-Injektion	129
4.2.7 <i>Real-time</i> qPCR-Analysen von vier Genen nach oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Aufnahme und <i>E. coli</i> K12-Injektion	130
4.2.8 <i>Real time</i> qPCR-Analysen von vier Genen im Mitteldarm von L5d2-Larven und Präpuppen (L5d13)	132
4.2.9 Lysozym in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ	133
4.2.10 Ist das hämatopoetische Organ ein filtrierendes Organ?	136

5 Diskussion

5.1 Sektion I: Die Rolle des hämatopoetischen Organs bei der Hämatopoese	137
5.1.1 Hämozytenmarker und Zelltypspezifität	137
5.1.1.1 Monospezifische Marker für Oenozytoide	137
5.1.1.2 Monospezifischer Marker für sphärule Zellen	140
5.1.1.3 Monospezifischer Marker für granuläre Zellen	141

5.1.1.4 Monospezifische Marker für Plasmatozyten	142
5.1.1.5 Marker für Plasmatozyten und Oenozytoide	143
5.1.1.6 Marker für Plasmatozyten und sphärule Zellen	143
5.1.1.7 Marker für Plasmatozyten, sphärule Zellen und Oenozytoide	144
5.1.1.8 Marker für granuläre Zellen und Oenozytoide	145
5.1.1.9 PNA markiert unterschiedliche Zellstrukturen der Hämocyten	146
5.1.2 Nachweis gespreiteter granulärer Zellen	147
5.1.3 Zytometrische Eigenschaften der Hämocytentypen	149
5.1.4 Identifikation neuer Marker für Hämocyten und hämatopoetische Organe	153
5.1.4.1 Eater-like Protein	154
5.1.4.2 Croquemort-like Protein	155
5.1.4.3 Peroxidasin-like Protein	157
5.1.4.4 Heixuedian-like Protein	159
5.1.5 Organisation des hämatopoetischen Organs	160
5.1.6 Nachweis von Hämocytentypen im hämatopoetischen Organ	163
5.1.6.1 Plasmatozytensubpopulationen im hämatopoetischen Organ	163
5.1.7 Zonierung des hämatopoetischen Organs	165
5.1.8 Mitotische Aktivität im hämatopoetischen Organ	168
5.1.9 Eigenschaften <i>in-vitro</i> -kultivierter Zellen des hämatopoetischen Organs	169
5.1.9.1 Adhärente und nicht-adhärente Zellen <i>in-vitro</i> -kultivierter hämatopoetischer Organe	170
5.1.10 Verwandtschaft der Hämocytentypen und Verbindung zum hämatopoetischen Organ: Prohämocyten, hämatopoetische Zellen, Pluripotenz?	171
5.1.11 Modelle der Hämatopoese in <i>Manduca sexta</i> -Larven	176
5.2 Sektion II: Immunkompetenz des hämatopoetischen Organs und weiterer Organe	181
5.2.1 Immunreaktionen auf orale <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Gabe und auf Injektion mit <i>E. coli</i> K12	181
5.2.1.1 Darminfektion durch <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i>	182
5.2.1.2 Systemische Infektion über <i>E. coli</i> K12-Injektion	184
5.2.1.3 mRNA-Synthese immunrelevanter Gene im hämatopoetischen Organ und dessen Rolle bei der Immunantwort	187
5.2.2 Lysozym im hämatopoetischen Organ und in den Hämocyten	188
5.2.3 Ist das hämatopoetische Organ ein filtrierendes Organ?	190
5.3 Fazit	192
6 Internetressourcen	194
7 Literaturverzeichnis	195
8 Abbildungsverzeichnis	210
9 Tabellenverzeichnis	213
10 Versicherung	215
11 Danksagung	216
A Appendix	
A.1 Abbildungen	I
A.2 Tabellen	XIII
A.3 Nukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen	XXIII

1. Zusammenfassung und Summary

1.1 Zusammenfassung

Insekten besitzen ein Immunsystem, welches auf humoralen und zellulären Aktivitäten fußt und als „angeborenes Immunsystem der Insekten“ bezeichnet wird (Reviews: BOMAN *et al.*, 1991; HULTMARK, 1993; HOFFMANN, 1995; GILLESPIE *et al.*, 1997). Ihnen fehlt das adaptive Immunsystem der Vertebraten, welches auf Antikörperbildung, T-Zell-vermittelten Immunreaktionen oder klonaler Proliferation von B-Zellen basiert (Review: COOPER und ALDER, 2006). Die für die zelluläre Immunantwort der Insekten zuständigen Zellen sind v. a. im Hämocoel zirkulierende sogenannte Hämozyten, die Fremdkörper erkennen und bekämpfen können (Review: STRAND, 2008). Der Ursprung der Hämozyten in Lepidoptera wurde bislang mit Hilfe morphologischer Kriterien und weniger Marker untersucht. Es sind bei *Manduca sexta*-Larven hämatopoetische Organe bekannt, die mit den Flügelanlagen assoziiert sind. Zu diesen hämatopoetischen Organen existieren zurzeit zwei Publikationen, die die Bildung und Verteilung von Plasmatozyten in bzw. durch diese beschreiben (NARDI *et al.*, 2003; BEETZ *et al.*, 2004). Untersuchungen innerhalb der AG TRENCZEK legen nahe, dass noch weit differenziertere Aussagen über die Verteilung und Entwicklung der Hämozyten in diesen Organen möglich sind (WÜNSCH, 2008; C.-R. VON BREDOW, 2010; KOZISSNIK, 2011).

Für die Analyse der durch das hämatopoetische Organ gebildeten Hämozyten wurde ein Werkzeugkasten, bestehend aus Antikörpern, Lektinen, RNA-Sonden gegen bekannte sowie bislang in *M. sexta* unbeschriebene Gene und Enzymaktivitätstests erstellt, um mit diesem das hämatopoetische Organ zu charakterisieren. Der Vergleich mit zirkulierenden Hämozyten bestätigte, dass im hämatopoetischen Organ, neben nicht markierbaren Hämozyten, nur Plasmatozyten enthalten sind. Es konnte eine Zonierung gezeigt werden, die auf eine lokale Konzentration von Zellen in unterschiedlichen Differenzierungszuständen hinweist. Sowohl in Zirkulation als auch im hämatopoetischen Organ konnten Hämozyten nachgewiesen werden, die sich durch eine Markierung der Zellmembran mit dem Lektin aus *Arachis hypogaea* (PNA) nachweisen lassen und eine hohes Zellkern-zu-Zytoplasma-Verhältnis aufweisen. Letzteres wird als Merkmal für Prohämozyten angesehen (BEAULATON und MONPEYSSIN, 1976; MONPEYSSIN und BEAULATON, 1978; GUPTA, 1979). Im hämatopoetischen Organ liegen diese Zellen in einer Zone nahe der von Öffnungen durchbrochenen Basallamina, die ein Auswandern von Hämozyten ermöglichen. Doppelmarkierungen mit PNA und verschiedenen gegen Hämozyten gerichteten Antikörpern zeigten, dass durch PNA an der Zellmembran markierbare Hämozyten Merkmale aller Hämozytentypen besitzen können.

In Hämozyten und hämatopoetischen Organen von *M. sexta* konnten erstmals die mRNA für zwei Phagozytoserezeptoren (Eater-ähnliches Protein und Croquemort-ähnliches Protein), für eine Prenyltransferase (Heixuedian-ähnliches Protein) und für ein Peroxidasin-ähnliches Protein identifiziert werden. Die für das Eater-ähnliche Protein kodierende mRNA konnte nur in Zellen des hämatopoetischen Organs, die dem Hämocoel zugewandt sind, sowie Plasmatozyten in Zirkulation nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde eine gesteigerte mRNA-Synthese ausgewählter immunrelevanter Gene in Antwort auf Infektionen in Hämozyten, im hämatopoetischen Organ, im Fettkörper und im Mitteldarm mit Hilfe von *real-time* qPCR nachgewiesen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Darminfektion eine Reaktion im Darmgewebe und, ohne dass Bakterien in das Hämocoel eingedrungen sind, auch im Fettkörper, in den Hämozyten und im hämatopoetischen Organ auslöst. Bei einer systemischen Infektion reagierten ebenfalls der Fettkörper, die Hämozyten und das hämatopoetische Organ mit veränderter mRNA-Synthese dieser Gene, jedoch nicht der Mitteldarm. Das hämatopoetische Organ reagierte mit erhöhter mRNA-Synthese von *PGRP-1A* auf die Darminfektion und erhöhter mRNA-Synthese von *PGRP-1A*, *Lysozym* und *Scolexin A* auf die systemische Infektion.

Die für Lysozym kodierende mRNA sowie das Protein selbst konnten in Zellen des hämatopoetischen Organs außerdem durch RNA-*in-situ*-Hybridisierung bzw. Antikörpermarkierungen nachgewiesen werden. Dies sind die ersten Hinweise für eine direkte Beteiligung des hämatopoetischen Organs am Immungeschehen in *M. sexta*.

1.2 Summary

Immunity in insects relies on humoral factors and cell mediated responses, which are the two parts of the innate immune system. Antibodies, T-cell-mediated reactions or clonal selection as it is known for the adaptive immune system of vertebrates are absent in insects (reviewed in: BOMAN *et al.*, 1991; HULTMARK, 1993; HOFFMANN, 1995; GILLESPIE *et al.*, 1997). The cellular immune response is mediated by circulating haemocytes (reviewed in STRAND, 2008). Haemocytes are able to phagocytise and encapsulate foreign bodies. In *Manduca sexta* larvae, haematopoietic organs associated with the wing discs are known to be a source for plasmatocytes and putative prohaemocytes. This was demonstrated by antibody labelling with three haemocyte specific antibodies (NARDI *et al.*, 2003, BEETZ *et al.*, 2004).

To better understand the function of the haematopoietic organ, a set of tools comprising antibodies specific for one or more haemocyte types, lectins, and enzyme based assays was used. Cells of the haematopoietic organs and cells released by these organs *in vitro* were compared with circulating haemocytes. Only plasmatocyte markers and the lectin PNA labelled cells in distinct regions of the haematopoietic organ. These results lead to the conclusion that the only differentiating haemocyte type in the haematopoietic organs is the plasmatocyte. Granular cells, oenocytoids, and spherule cells were absent in the haematopoietic organ as well as in *in-vitro*-cultured haemocytes derived from the haematopoietic organ. Different plasmatocyte markers labelled cells in different, but overlapping regions of the haematopoietic organ with prevalence to the distal part of the haematopoietic organ, i.e. near openings of the basal matrix where the cells are in close contact to the haemolymph. These regions may represent areas of gradual cell differentiation within the tissue, leading to plasmatocytes ready to leave the organ. Peanut agglutinin (PNA) labels the cell membrane of a haemocyte type with similarities to prohaemocytes. However, haematopoietic organ cells positive for PNA and free floating haemocytes positive for PNA at the cell membrane (PNAm⁺) exhibit a high nucleus-to-cytoplasm ratio which is recognized as a characteristic of prohaemocytes (BEAULATON and MONPEYSSIN, 1976; MONPEYSSIN and BEAULATON, 1978; GUPTA, 1979). By double labelling, some PNAm⁺-haemocytes were shown to possess epitopes specific for other haemocyte types as well. Therefore, it is likely that PNA membrane labelling marks haemocytes of a distinct, less differentiated state. Since PNAm⁺-haemocytes were found in the haematopoietic organ, a connection of the haematopoietic organ derived putative prohaemocytes to the circulating differentiated haemocytes is highly likely.

Transcripts of two phagocytosis receptors (*eater*-like and *croquemort*-like), an extracellular matrix associated protein (*peroxidase*-like) and a prenyl transferase involved in normal haematopoiesis in *D. melanogaster* (*heixuedian*-like) were identified in *M. sexta*. *Eater*-like-mRNA was detected in

free plasmacytes and the distal region of the haematopoietic organ. The expression of phagocytosis receptors marks functionally differentiated haemocytes. Therefore, the expression of *eater*-like-mRNA in the distal region of the haematopoietic organ is another indication for plasmacyte maturation in distinct regions of the haematopoietic organ.

The reaction of the haematopoietic organ, the haemocytes, the fat body and the midgut in response to either gut borne infection or systemic infection was determined based on the mRNA-levels of four different immunity-related genes by real-time quantitative PCR. In response to gut mediated infection, the midgut as well as the haemocytes, the haematopoietic organ and the fat body increased the synthesis of the mRNA of at least one gene observed. In response to a systemic infection, the midgut did not react at all, whereas the other tissues observed .

For the haematopoietic organ, an increased level of *PGRP-1A*-mRNA in response to the gut infection and an increased level of *lysozyme*- and *scolexin A-1A*-mRNA in response to the systemic bacterial infection were measured. Furthermore, *lysozyme*-mRNA and lysozyme-protein were detected in the haematopoietic organ by means of *RNA-in-situ*- hybridization and immune histology. Together, these are the first evidences of a direct involvement of the haematopoietic organ in immune responses in *M. sexta*.

2. Einleitung

2.1 Hämozyten der Insekten

Frei im Blutgefäßsystem bzw. offenen Blutsinus zirkulierende Zellen werden bei Invertebraten als Hämozyten bezeichnet. Diese Zellen wurden mit dem Aufkommen der Lichtmikroskopie bereits im 17. Jahrhundert von VAN LEEUWENHOEK und SWAMMERDAM beobachtet und als den menschlichen Blutzellen ähnelnd beschrieben (SWAMMERDAM, 1758). Später wurden anhand morphologischer und ultrastruktureller Merkmale die Hämozyten verschiedener Insektentaxa genauer typisiert. Bei *Spodoptera eridania* (Lepidoptera; syn. *Prodenia eridania*) unterteilte YEAGER (1945) bspw. die Hämozyten in zehn Überklassen und 32 Typen. Durch Zusammenfassen verschiedener Morphen konnte die Anzahl verschiedener Hämozytentypen reduziert werden (JONES, 1962) bis ARNOLD (1982) die Anzahl der Hämozytentypen in Lepidoptera auf fünf Haupttypen eingrenzte, diese sind die Prohämozyten, granulären Zellen, Plasmatozyten, Oenozytoide und sphärulären Zellen. Die in Hinsicht auf Funktion und Entwicklung der Hämozyten am besten untersuchte Modellspezies ist *Drosophila melanogaster* (Diptera). Die Hämozyten von *D. melanogaster* werden in vier Typen unterschieden (Prohämozyten, Plasmatozyten, Kristallzellen und Lamellozyten). Es sollte von einer Anwendung der für die Hämozyten von *D. melanogaster* angewendeten Nomenklatur für die Hämozyten der Lepidoptera Abstand genommen werden, auch wenn funktionelle Übereinstimmungen zwischen einzelnen Hämozytentypen bestehen (RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006). Zahlreiche detaillierte Untersuchungen konnten die embryonale (TEPASS *et al.*, 1994, HOLZ *et al.*, 2003), larvale (LANOT *et al.*, 2001) und adulte (GHOSH *et al.*, 2015) Hämatopoese und deren regulatorische Netzwerke in *D. melanogaster* aufklären. Selbst für die hinsichtlich der zellulären Abwehr gut untersuchten Lepidoptera liegen keine solch detaillierten Ergebnisse vor.

2.2 Hämozytentypen und -funktion in *Manduca sexta*-Larven

Für *Manduca sexta* werden, wie allgemein für Lepidoptera üblich, fünf Hämozytentypen morphologisch unterschieden: Prohämozyten, granuläre Zellen, Plasmatozyten, sphäruläre Zellen und Oenozytoide (HOROHV und DUNN, 1982; ARNOLD, 1982; WILLOT *et al.*, 1994; LAVINE und STRAND, 2002; STRAND, 2008; RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006). Eine Übersicht der Hämozytentypen in *M. sexta*-Larven ist in Tabelle 2.1 und Abbildung 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Hämozytentypen, deren Charakteristika und Funktion in *Manduca sexta*.

Hämozytentyp	Abk.	Morphologie f)	Funktion	DHC L5d4 a)	Referenz
granuläre Zelle	GR	rund, granuläre Einschlüsse, Nukleus klein	Einkapselung, Phagozytose, beinhaltet ECM-Komponenten	~ 82 %	b), c)
Plasmatozyte	PL	(mittel-)groß, spindelförmig od. gespreitet, variable Form, Pseudopodien, Nukleus (mittel-) groß, Zytoplasma granuliert	Einkapselung, Phagozytose	~ 12 %	c)
Oenozytoide	OE	rund, groß, hyalines Zytoplasma, Kern mittelgroß	Prophenoloxidasynthese und -freisetzung, Melanisierung	~ 4 %	d)
sphärule Zelle	SP	klein, Form irregulär, große sphärule Einschlüsse, meist irregulär geformter Nukleus	Unbekannt. Eine Rolle bei ECM- und Kutikula-Aufbau wird vermutet	< 1 %	e)
Prohämozyte	ProHZ	rund, relativ zum Zytoplasma großer Kern	Unreife Hämozyte, Vorläufer reifer Hämozyten	ND	f)

a) Der Anteil der Hämozytentypen wurde von BEETZ *et al.* (2008) übernommen und gerundet. b) NARDI und MIKLASZ, 1989; c) LING und YU, 2006; d) JIANG *et al.*, 1997; e) *Calpodex ethlius*: SASS *et al.*, 1994; *Galleria mellonella*: ASHHURST, 1982; f) HOROHOV und DUNN, 1982. Abkürzungen: DHC = Differentielle Hämozytenzählung, ND = nicht ermittelt.

Granuläre Zellen machen die Mehrheit der larvalen Hämozyten in *M. sexta* aus. Sie sind anhand ihrer zahlreichen granulären Zytoplasmainschlüsse und dem relativ kleinen, runden Nukleus gut zu erkennen (Abbildung 2.1, GR). Abweichend von der runden Form ist die Bildung von dünnen Filopodien, so genannten *microspikes*, möglich. **Plasmatozyten** können Pseudopodien ausbilden und erscheinen vielgestaltig (Abbildung 2.1, PL). Der Nukleus ist groß. Ein Verhältnis des Nukleus zum Zytoplasma ist in Adhäsionspräparaten aufgrund der starken Formveränderung nicht bestimmbar. Neben den typischen großen Plasmatozyten treten auf Monolayerpräparaten auch kleinere gespreitete Hämozyten auf, die von der Form her Plasmatozyten entsprechen aber deutlich kleiner sind und einen kleinen Zellkern besitzen. Sie könnten entweder eine kleine Form der Plasmatozyten oder spreitende granuläre Zellen sein (Abbildung 2.1, smPL/GRspr). **Ungespreitete Plasmatozyten** (rPL) sind anhand des großen Zellkerns von Oenozytoiden unterscheidbar (Abbildung 2.1, rPL). **Oenozytoide** sind runde, meist große bis sehr große Hämozyten mit einem mittelgroßen Kern und einem großen Zytoplasmaanteil (Abbildung 2.1, OE). **Sphärule Zellen** sind kleine Zellen mit meist großen sphäkulen Einschlüssen, die der Zelle und häufig auch dem Nukleus eine irreguläre Gestalt geben (Abbildung 2.1, SP). **Prohämozyten** sind rund und besitzen ein hohes Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnis. Die Zuordnung von Hämozyten zu diesem Typ ist schwierig, da einzig Indizien wie eine geringe Größe und ein geringer Zytoplasmaanteil zur Identifizierung herangezogen werden (BEAULATON und MONPEYSSIN, 1976; MONPEYSSIN und BEAULATON, 1978; GUPTA, 1979). In Abbildung 2.1 sind zwei Hämozyten, die den Kriterien für Prohämozyten entsprechen abgebildet, jedoch ist eine definitive Zuordnung nicht möglich (Abbildung 2.1, ProHC (?)). Sie werden als Hämozytenvorläufer angesehen, die zu anderen Hämozytentypen differenzieren.

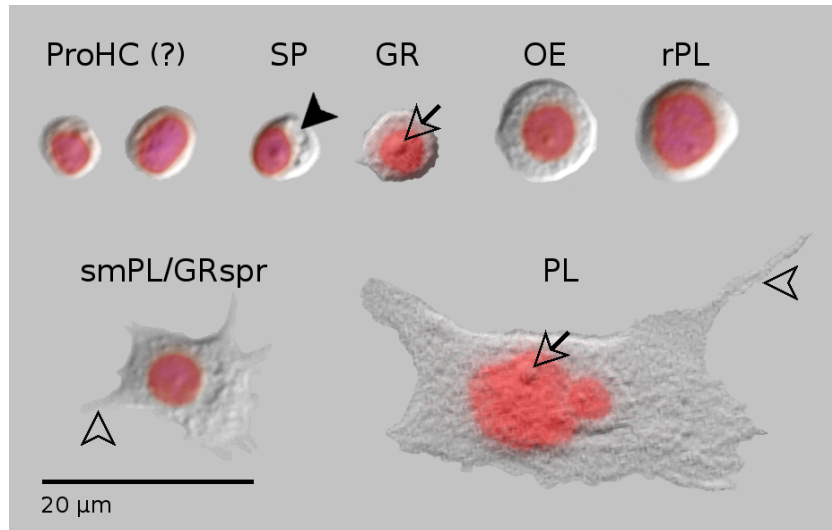


Abbildung 2.1: Hämozytentypen in *Manduca sexta*-Larven.

Differentielle Phasenkontrastaufnahme, Zellkerne in Rot. Leere Pfeilspitzen: Pseudopodien, schwarze Pfeilspitze: großer Einschluss im Zytoplasma (Sphärule), Pfeile: Nukleoli.

Abkürzungen: ProHC (?) = mutmaßliche Prohämozyten, SP = sphärule Zelle, GR = granuläre Zelle, OE = Oenozytoid, rPL = runder (ungespreiteter) Plasmatozyt, smPL/GRspr = kleine gespreitete Hämozyte, PL = Plasmatozyt.

Von den Hämozytentypen granuläre Zellen, Plasmatozyten und Oenozytoiden ist bei *M. sexta* bekannt, dass diese an Immunreaktionen wie Phagozytose und Einkapselung beteiligt sind (siehe Review: RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006). Für die Rolle bei der Immunantwort konnten in Insektenhämozyten Faktoren identifiziert werden, die der Erkennung von Fremdstoffen (bspw. *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) dienen (so genannte Mustererkennungszuzeptoren, *pattern recognition receptors*, PRRs; Review: STRAND, 2008). Die Erkennung von Pathogenen resultiert in der Produktion und Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden und der Auslösung der Prophenoloxidasekaskade, die antimikrobiell wirkende Metabolite erzeugt und zur Einkapselung von Fremdkörpern in eine Melaninhülle führt, sowie in Phagozytose, Koagulation und Einkapselung durch die Hämozyten (Tabelle 2.1). Zur Charakterisierung von Hämozyten eignen sich einige immunrelevante Moleküle hervorragend. Eine Auswahl immunrelevanter Rezeptoren und Effektoren, die in der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung von Hämozyten und hämatopoetischen Organen und zur Untersuchungen der Immunkompetenz verwendet wurden, sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Auswahl immunrelevanter Proteine, deren Funktion und Vorkommen in Insektenhämozyten.

Protein	Klasse	primäre Funktion(en)	weitere Funktion(en)	Hämozyten	
Lysozym	AMP	PGN-Lyse, antimikrobiell	PPO-Kaskade-Inhibition	<i>L. migratoria</i> GR, KoZ	a)
PPO	Enzym	Melanisierung, Chinonbildung		<i>M. sexta</i> OE	b)
IML-3	Lektin	Opsonin, PRR	Mitoseaktivierung	<i>M. sexta</i> GR	c)
Croquemort	Rezeptor	Scavenger-Rezeptor, Phagozytose		<i>D. melanogaster</i> KR, PL	d) *
Eater	Rezeptor	Scavenger-Rezeptor, PGN-bindend		<i>D. melanogaster</i> PL	e) *
βGRP-1	Rezeptor	β-1,3-Glucan-Bindung	PPO-Aktivierung	<i>M. sexta</i> OE	f), g)
PGRP-1	Rezeptor	Peptidoglycan-Rezeptor	PPO-Aktivierung	<i>M. sexta</i> HZ **	h)
Scolexin A	?	?	Koagulation	<i>M. sexta</i> alle HZ	i)

a) RAO *et al.*, 2009; ZACHARY und HOFFMANN, 1970; b) JIANG *et al.*, 1997; c) YU *et al.*, 2005; d) FRANC *et al.*, 1999; e) KOCKS *et al.*, 2005; CHUNG und KOCKS, 2011; f) MA und KANOST, 2000; g) TRENCZEK pers. Mitt.; h) SUMATHIPALA *et al.*, 2010; i) KYRIAKIDES *et al.*, 1993; GÖKÇEN, 2010. * = bislang nicht in *M. sexta* beschrieben; ** = mRNA-Nachweis ohne Differenzierung der Hämozytentypen. Abkürzungen: AMP = antimikrobielles Peptid, KoZ = Koagulozyten, KR = Kristallzellen, PGN = Peptidoglycan, PPO = Prophenoloxidase, PRR = Mustererkennungsprotein, βGRP-1 = beta-1,3-glucan recognition protein 1, PGRP-1 = peptidoglycan recognition protein 1.

Neben immunrelevanten Molekülen werden auch Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) von Insektenhämozyten synthetisiert, sezerniert und für Remodellierungsvorgänge wieder abgebaut (WIGGLESWORTH, 1973; ASHHURST, 1982; BALL *et al.*, 1987, NARDI und MIKLASZ, 1989; FESSLER und FESSLER, 1989; KUSCHE-GULLBERG *et al.*, 1992; FOGERTY *et al.*, 1994; NELSON *et al.*, 1994). Dies wird besonders deutlich bei dem Abbau und der Aufnahme von ECM-Komponenten in Vorbereitung zur Häutung oder Metamorphose (NARDI und MIKLASZ, 1989). Monoklonale Antikörper zeigen in *M. sexta* häufig eine Markierung von Hämozyten (v. a. granuläre Zellen) und ECM (NARDI und MIKLASZ, 1989; NARDI, 2004; BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004, eigene Beobachtungen).

2.3 Hämatopoese bei Insekten

Die Hämatopoese bei Insekten und anderen Arthropoden ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Prozesse, die zur Bildung funktionsfähiger Hämozyten führt. Dabei kann man grundlegend in eine Aufrechterhaltung oder Zunahme der Abundanz eines Hämozytentyps über mitotische Teilung einer funktionell ausgereiften Hämozyte und eine Differenzierung zu funktionellen Hämozyten aus Vorläuferzellen unterscheiden. In den meisten untersuchten Insektenarten existiert eine kleine Population frei flottierender Hämozyten, für die keine konkrete Funktion beim Immungeschehen bekannt ist und die als hämatopoetische Stamm- oder Vorläuferzelle angesehen werden. Diese so genannten Prohämozyten sind mitotisch aktiv und können zu ausgereiften Hämozyten differenzieren (GUPTA, 1979; YAMASHITA und IWABUCHI, 2001). Auch bei differenzierten Hämozytentypen (außer den Oenozytoiden) konnte in verschiedenen Lepidopteraarten mitotische Aktivität nachgewiesen werden, die zur Aufrechterhaltung oder Vermehrung der Hämozytenpopulationen führt (*Euxoa declarata*: HINKS und ARNOLD, 1976; ARNOLD und HINKS, 1982; *Spodoptera*

frugiperda und *Pseudoplusia includens*: GARDINER und STRAND, 2000). HINKS und ARNOLD (1976) beschrieben die mitotische Aktivität von Prohämocyten und Plasmatozyten jedoch als zu gering, um deren Zellzahlzunahme während der Larvalentwicklung zu erklären und schlossen daraus auf eine weitere Quelle für diese Zelltypen.

2.4 Hämatopoetische Gewebe der Insekten

Die Bildung von Hämocyten findet, neben der o. g. Teilung in Zirkulation, auch in so genannten hämatopoetischen Nischen statt, die in abgegrenzten Organen oder (temporären) sessilen Hämocytennestern zu finden sind.

Bei den Orthoptera wird das phagozytäre Organ, das in verschiedenen Grillenarten (Gryllidae) vorkommt (CUÉNOT, 1895; NUTTING, 1951), als hämatopoetisch aktiv beschrieben (HOFFMANN, 1970), während das weniger stark strukturierte phagozytäre Organ der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae), welches ebenfalls als hämatopoetisch aktiv gilt (HOFFMANN, 1973), inzwischen nicht mehr als Hauptquelle für die schnelle Hämocytenbildung angesehen wird (DURESSA *et al.*, 2015). DURESSA *et al.* (2015) zeigten, dass im Fall einer Infektion die Zunahme an Hämocyten durch vermehrte Teilungsaktivität zirkulierender Hämocyten zu erklären ist. Ähnlich aufgebaute Gewebe, die immer nahe dem Dorsalgefäß lokalisiert sind, sind für Coleoptera (*Melolontha melolontha*: BREHÉLIN, 1973; *Tenebrio molitor*: CHUNG und MOON, 2007), Zygentoma (*Thermobia domestica*: FRANCOIS, 1975), Phasmatodea (*Carausius morosus*: LOCCI *et al.*, 1998) und Diptera (*Calliphora erythrocephala*: CROSSLEY, 1964; *D. melanogaster*: STARK und MARSHALL, 1930; SHRESTHA und GATEFF, 1982) beschrieben.

Für die Bildung des hämatopoetischen Organs (Lymphdrüse) bei *D. melanogaster* wird aufgrund der gemeinsamen Abstammung des Dorsalgefäßes und der Lymphdrüse aus dem kardiogenen Mesoderm ein entwicklungsbiologischer Zusammenhang dieser Gewebe angenommen (MANDAL *et al.*, 2004).

Die in Lepidopteralarven vorhandenen thorakalen hämatopoetischen Organe wurden von SCHÄFFER (1889) erstmals als solche erkannt. Sie unterscheiden sich von den zuvor beschriebenen hämatopoetischen Organen anderer Taxa darin, dass sie nicht räumlich mit dem Dorsalgefäß assoziiert sind, sondern meist den Flügelanlagen in Meso- und Metathorax angelagert vorliegen (Tabelle 2.3, Abbildung 2.2). Diese hämatopoetischen Organe wurden innerhalb der Lepidoptera bislang nur bei Vertretern der Ditrysia beschrieben (Tabelle 2.3). Für das Schwestertaxon der Lepidoptera, die Köcherfliegen (Trichoptera; WHEELER *et al.*, 2001), gibt es bislang keine Untersuchungen, die sich mit hämatopoetischen Geweben beschäftigen.

Auch temporär sessile Hämocyten können hämatopoetische Nischen bilden (*D. melanogaster* embryonale, larvale und adulte sessile Hämocyten: LEITÃO und SUCENA, 2015; MÁRKUS *et al.*, 2009; BRETSCHER *et al.*, 2015). Hämocytenaggregationen solcher Art sind noch nicht systematisch in Lepidoptera untersucht worden. Die von LOCKE (1997) beschriebene, durch Sauerstoffmangel induzierbare Sessilität von Hämocyten an Tracheen bei *Calpodes ethlius* und die von ARVY (1952, 1953) beschriebenen abdominalen hämatopoetischen Organe bei *Malacosoma neustria* und *Thaumtopoea processionae* können jedoch als Hinweise auf „sessile Hämocytennester“ oder akzessorische hämatopoetische Organe in Lepidoptera angesehen werden.

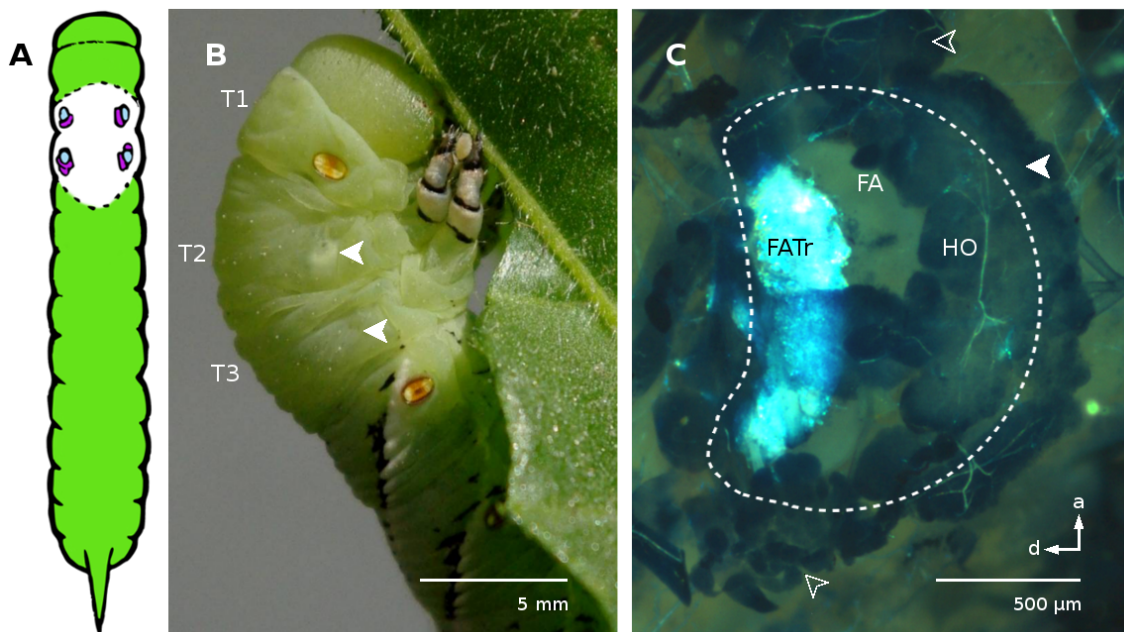


Abbildung 2.2: Lage und Aufbau der hämatopoetischen Organe in *Manduca sexta*-Larven.

A: Schematische Lage der Flügelanlagen (blau) und der hämatopoetischen Organe (magenta) in *M. sexta* Larven (Schema von Y. VON BREDOW). Anterior ist oben.

B: Larvale Flügelanlagen sind durch die Kutikula hindurch als weißer Fleck (Pfeilspitze) erkennbar. Fotografie aus C.-R. VON BREDOW, 2010.

C: Flügelanlage mit hämatopoetischem Organ (kontrastiert mit Trypanblau). Das hämatopoetische Organ (HO) umgibt die Flügelanlage (FA, gestrichelte Linie). Das hämatopoetische Organ besteht aus wenigen großen Loben (weiße Pfeilspitze) und zahlreichen kleinen Loben (leere Pfeilspitzen).

Abkürzungen: T = Thorakalsegment, FA = Flügelanlage, HO = hämatopoetisches Organ, FATr = Tracheenknäuel der Flügelanlage.

Tabelle 2.3: Bekannte hämatopoetische Organe in Lepidoptera und deren anatomische Lage.

Alle untersuchten Spezies gehören zum Taxon Ditrysia.

Familie	Gattung	Spezies	Referenz	HO T2	HO T3	FK T2–3
Bombycidae	<i>Bombyx</i>	<i>mori</i>	ARVY, 1952; 1953; NITTONO, 1964	+	+	-
Erebidae	<i>Pyrrharctia</i>	<i>isabella</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Erybidae	<i>Ocneria</i>	<i>dispar</i>	SCHÄFFER, 1889	+	-	-
Hesperiidae	<i>Thorybes</i>	<i>pylades</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Lasiocampidae	<i>Gastropacha</i>	<i>quercus</i>	SCHÄFFER, 1889	+	+	-
Lasiocampidae	<i>Malacosoma</i>	<i>neustria</i>	ARVY, 1952; 1953	+	+	- d)
Noctuidae	<i>Amathes</i>	<i>C-nigrum</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Anaplectoides</i>	<i>prasina</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Cucullia</i>	<i>intermedia</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Euxoa</i>	<i>declarata</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Euxoa</i>	<i>messoria</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Helicoverpa</i>	<i>zea</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Ochropleura</i>	<i>pecta</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Polia</i>	<i>imbrifera</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Noctuidae	<i>Pseudoplusia</i>	<i>includens</i>	GARDINER und STRAND, 2000	-	+	- a)
Noctuidae	<i>Spodoptera</i>	<i>frugiperda</i>	GARDINER und STRAND, 2000	+	+	-
Noctuidea	<i>Diacrisia</i>	<i>virginica</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Notodontidae	<i>Harpyia</i>	<i>vinula</i>	SCHÄFFER, 1889	+	+	-
Notodontidae	<i>Thaumetopoea</i>	<i>processionea</i>	ARVY, 1952; 1953	+	+	- d)
Nymphalidae	<i>Aglais</i>	<i>urticae</i>	SCHÄFFER, 1889	+	+	-
Papilionidae	<i>Papilio</i>	<i>polyxenes</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Papilionidae	<i>Papilio</i>	<i>xuthus</i>	MITSUHASHI, 1972	+	+	-
Pieridae	<i>Pieris</i>	<i>brassicae</i>	SCHÄFFER, 1889	+	+	-
Psychidae	<i>Eumeta</i>	<i>variegata</i>	NIITSU <i>et al.</i> , 2008	+	+	-
Pyalidae	<i>Ephestia</i>	<i>kuehniella</i>	ARVY, 1952; 1953	+	+	+
Pyalidae	<i>Galleria</i>	<i>mellonella</i>	JONES und LIU, 1968; 1969	+	+	ND e)
Saturniidae	<i>Antheraea</i>	<i>pernyi</i>	BEAULATON, 1980	+	+	-
Saturniidae	<i>Antheraea</i>	<i>polyphemus</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Sphingidae	<i>Hemaris</i>	<i>diffinis</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Sphingidae	<i>Manduca</i>	<i>sexta</i>	NARDI <i>et al.</i> , 2003	+	+	-
Sphingidae	<i>Phlegothontius</i>	<i>quinquemaculatus</i>	HINKS und ARNOLD, 1977	+	+	-
Sphingidae	<i>Smerinthus</i>	<i>populi</i>	SCHÄFFER, 1889	+	+	- b)
Yponomeutidae	<i>Yponomeuta</i>	<i>evonymella</i>	SCHÄFFER, 1889	+	+	-
Yponomeutidae	<i>Yponomeuta</i>	<i>padella</i>	ARVY, 1952; 1953	+	+	+

a): Bei *P. includens* kommt nur ein Paar hämatopoetischer Gewebe assoziiert mit den metathorakalen Flügelanlagen im letzten Larvenstadium vor der Metamorphose vor. b): SCHÄFFER zitiert PANCRITIUS, 1884. c): Die thorakalen hämatopoetischen Organe sind mit dem Fettkörper assoziiert und liegen nicht um die Flügelanlage. d): In den Abdominalsegmenten 1–4 sind weitere, kleinere „hämatopoetische Organe“ in Höhe der Stigmata vorhanden. e) Keine histologische Untersuchung. Textpassagen lassen auf hämatopoetische Organe in Meso- und Metathorax schließen. Abkürzungen: HO T2 / HO T3 = hämatopoetische Organe mit der Flügelanlage des zweiten bzw. dritten Thoraxsegment assoziiert. FK T2–3 = hämatopoetisches Gewebe mit Fettkörper in Thoraxsegment 2 und 3 assoziiert. Abkürzungen: FK = Fettkörper, HO = hämatopoetisches Organ, ND = geht nicht aus Beschreibung hervor, T = Thorakalsegment.

Gemein haben die hämatopoetischen Organe der Lepidoptera mit den in Diptera beschriebenen Lymphdrüsen, dass sie während oder kurz vor der Metamorphose Hämozyten entlassen und degenerieren (Diptera: *D. melanogaster*: LANOT *et al.*, 2001; HOLZ *et al.*, 2003; GRIGORIAN *et al.*, 2011; Lepidoptera: *E. declarata*: HINKS und ARNOLD, 1977; *S. frugiperda*: GARDINER und STRAND, 2000 *M. sexta*: NARDI *et al.*, 2003), während die phagozytären Organe der hemimetabolen Orthoptera im adulten Tier bestehen bleiben (HOFFMANN, 1970).

Die Mitose in und die Hämozytenfreisetzung durch hämatopoetische Organe kann durch endokrine Faktoren beeinflusst werden (NAKAHARA *et al.*, 2003) und verschiedene Experimente bei denen hämatopoetische Organe zerstört wurden zeigten meist eine Abnahme der Gesamthämozytenzahl und eine Reduktion des Plasmatozyten- und Prohämozytenanteils in der Hämolymphe (NITTONO *et al.*, 1964; TU *et al.*, 2002; BEAULATON, 1980). Der Befund von NARDI (2004), dass im späten *M. sexta*-Embryo das Auftreten der ersten MS13-positiven freien Plasmatozyten mit dem Auftreten von MS13-positiven hämatopoetischen Organen zeitlich korreliert, ist ein Indiz dafür, dass im Embryo kurz vor dem Schlupf und demnach auch in Larven, das hämatopoetische Organ an der Hämozytenbildung beteiligt ist. Ob die hämatopoetischen Organe von *M. sexta* an der larvalen Hämatopoese aktiv beteiligt sind oder keinen Anteil an der larvalen Hämatopoese tragen, ist bisher jedoch nicht abschließend geklärt.

Als bestuntersuchtes Modell der Hämatopoese bei Insekten ist *D. melanogaster* hervorzuheben. Viele Prozesse und Faktoren, die zur Differenzierung bestimmter Hämozytentypen und zur Bildung hämatopoetischer Nischen führen, sind für *D. melanogaster* beschrieben worden (LEBESTKY *et al.*, 2000; LANOT *et al.*, 2001; KRZMIEN *et al.*, 2007, Review: CROZATIER und MEISTER, 2007). Aus den gleichen Gründen, die eine Homologisierung der Zelltypen schwierig machen, ist es fraglich, ob die Hämatopoese in anderen Taxa in vergleichbarer Weise stattfindet. Die Differenzierung zu bestimmten Zelltypen kann sich durchaus von den Mechanismen in anderen Insekten unterscheiden, während einige grundlegende Mechanismen gleich oder ähnlich ablaufen. So sind Transkriptionsfaktoren (bspw. der GATA- oder RUNX-Familie), bestimmte Signalwege (bspw. JAK/STAT) und weitere Proteine unterschiedlicher Funktion als an der Hämatopoese in *D. melanogaster* beteiligt identifiziert worden. Des Weiteren beeinflussen auch am Stoffwechsel beteiligte Proteine (bspw. Heixuedian, XIA *et al.*, 2015) und ECM-Bestandteile (bspw. *terribly reduced optic lobes*; GRIGORIAN *et al.*, 2013) die Bildung, Organisation und Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Nische in der Lymphdrüse. Unter den Transkriptionsfaktoren, die die Hämozytendifferenzierung beeinflussen, sind *serpent*, *lozenge* und *glial cells missing* hervorzuheben (Review: CROZATIER und MEISTER, 2007). Bei fehlerhafter Expression dieser Transkriptionsfaktoren sind Differenzierungswege zu bestimmten Hämozytentypen gestört.

2.5 Beschreibende und funktionelle Analysen der Insektenhämatopoese

Über die Vorgänge, die zu differenzierten, funktional unterschiedlichen Hämocyten führen, ist bei *M. sexta* bisher nur wenig bekannt. So wurde der Ursprung der embryonalen Hämocyten aus dem Kopfmesoderm junger Embryonen (NARDI, 2004) beschrieben. Dies entspricht den Befunden zur Bildung embryonaler Hämocyten bei *D. melanogaster* (TEPASS *et al.*, 1994, HOLZ *et al.*, 2003). Die Anlage eines Gewebes, dessen Zellen teilweise ein plasmatozytentypisches Integrin tragen, wird für *M. sexta* spätembryonal beschrieben (NARDI, 2004). Dieses liegt mit den Flügelimaginalanlagen des zweiten und dritten Thoraxsegments assoziiert vor und entspricht dem hämatopoetischen Organ der Larve. Das hämatopoetische Organ ist ein von einer extrazellulären Matrix abgegrenzter Zellverbund, der in Zellkultur Hämocyten entlässt (AKAI und SATO, 1971; MITSUHASHI, 1972; GARDINER und STRAND, 2000). Histologische Untersuchungen an verschiedenen Lepidopteraarten führten zu unterschiedlichen Befunden bezüglich der Fähigkeit einen oder mehrere Hämocytentypen zu bilden. Einig ist man sich über das Vorhandensein von Prohämocyten und Plasmatozyten im hämatopoetischen Organ. Für *Bombyx mori* sind auch granuläre Zellen und Oenozytoide bei Untersuchungen des hämatopoetischen Organs nachgewiesen worden (AKAI und SATO, 1971), diese Zelltypen wurden jedoch nur in der Nähe von Öffnungen der das hämatopoetische Organ ummantelnden extrazellulären Matrix gefunden und es wurde nicht ausgeschlossen, dass diese Zelltypen aus der Hämolymphe in das Gewebe einwandern können. HAN *et al.* (1998) bestätigten den Befund, schlossen jedoch daraus, dass alle Hämocytentypen außer sphäkulen Zellen aus Prohämocyten innerhalb des hämatopoetischen Organs hervorgehen. Versuche, bei denen der Thorax durch Einschnürungen vom Abdomen und Kopfbereich getrennt wurde, zeigten bei *E. declarata* eine Zunahme der Prohämocyten, Plasmatozyten und Oenozytoide im Bereich der hämatopoetischen Organe, was als Indiz für die Herkunft dieser Zellen aus den hämatopoetischen Organen gedeutet werden kann (HINKS und ARNOLD, 1977).

2.6 Immunspezifische Reaktionen hämatopoetischer Gewebe

Als Antwort auf Immunstimuli reagieren hämatopoetische Gewebe von *D. melanogaster* und *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea, Decapoda) mit erhöhter Proliferation, Freisetzung und Differenzierung der Zellen zu immunkompetenten Hämocyten (LANOT *et al.*, 2001; SÖDERHÄLL *et al.*, 2003). Außerdem ist den hämatopoetischen Geweben einiger Insektenarten eine filtrierende Funktion zugesprochen worden, d. h., dass diese in die Hämolymphe eindringende Fremdstoffe aufnehmen und speichern bzw. degradieren (CUÉNOT, 1895; NUTTING, 1951, HOFFMANN, 1970). Ob auch humorale Faktoren der Immunantwort in hämatopoetischen Geweben der Arthropoden gebildet

und abgegeben werden, wurde bislang nicht systematisch untersucht. Einzig die Untersuchungen an *D. melanogaster* und *P. leniusculus* geben Hinweise auf eine solche Funktion. Es wurde die Synthese von Prophenoloxidase in Zellen der *D. melanogaster*-Lymphdrüse und antimikrobieller Peptide in hämatopoetischen Organen von *P. leniusculus* beschrieben (*D. melanogaster* PPO: FERJOUX *et al.*, 2007; *P. leniusculus* AMPs: JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007). Weder für *M. sexta* noch für andere Lepidopteraarten wurde nach meinem Wissensstand bislang eine mögliche Rolle des hämatopoetischen Organs an der Immunantwort untersucht.

2.7 Zielsetzung

Das Ziel vorliegenden Dissertation war eine umfassende Analyse der larvalen hämatopoetischen Organe von *Manduca sexta*. Dabei lagen die besonderen Schwerpunkte auf der Hämatopoese-funktion und der Rolle des hämatopoetischen Organs bei einer Immunantwort.

Zur Aufklärung der Hämatopoese-funktion des hämatopoetischen Organs sollten folgende Punkte bearbeitet werden:

1. Um zu erkennen, welche Hämozytentypen vom hämatopoetischen Organ gebildet werden, sollten etablierte Hämozytenmarker zur Identifizierung bekannter Hämozytentypen eingesetzt werden.
2. Zu Genen, die eine Rolle bei der Hämatopoese in anderen Spezies spielen oder zur Identifizierung bestimmter Hämozytentypen verwendet werden, sollten in *M. sexta* Gene mit einer hohen Ähnlichkeit *in silico* identifiziert werden. Weiter sollten durch mRNA- bzw. Protein-Nachweise deren mögliche Expression in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ untersucht werden.
3. Basierend auf der Markierungsmöglichkeit der Zellen im hämatopoetischen Organ sollte eine Kartierung erstellt werden. Damit sollte eine mögliche Zonierung des Organs mit differenzierten Hämozyten und möglichen generativen Zentren abgeleitet werden.
4. Mittels Primärkultur gewonnene und kultivierte Zellen des hämatopoetischen Organs sollten anhand ihrer Morphologie und Markierbarkeit mit Hämozytenmarkern darauf hin untersucht werden, ob sie sich nach dem Verlassen des Organs in weitere Hämozytentypen differenzieren.

Diese Daten sollten zusammengekommen eine Aussage über den oder die vom hämatopoetischen Organ gebildete(n) Hämozytentyp(en) ermöglichen und eine Schlussfolgerung über die Bildung differenzierter Hämozytentypen in der Larve von *M. sexta* zulassen.

Um zu überprüfen, ob das hämatopoetische Organ auf Immunstimuli reagiert, sollten folgende Punkte aufgeklärt werden:

1. Es sollte die mRNA von immunrelevanten Genen im hämatopoetischen Organ und weiteren Geweben prinzipiell nachgewiesen werden und eine mögliche Veränderung der Synthese in Antwort auf Infektionsszenarien quantifiziert werden.
2. Um die Frage nach der Phagozytosekompetenz bzw. Filtrationsleistung des hämatopoetischen Organs zu klären, sollten abgetötete Bakterien injiziert und überprüft werden, ob diese in Zellen des hämatopoetischen Organs wiedergefunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Phosphatgepufferte Saline (PBS), pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
in Reinstwasser	

Phosphatgepufferte Saline mit 0,1 % Tween® 20 (PTW), pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
Tween® 20	896 µM
in Reinstwasser	

Tris-gepufferte Saline (TBS), pH 7,5

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
in Reinstwasser	

Tris-gepufferte Saline mit 0,1 % Triton™ X-100 (Triton-TBS), pH 7,5

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
Triton™ X-100	0,1 % (v/v)
in Reinstwasser	

Tris-gepufferte Saline mit 0,1 % Tween® 20 (Tween-TBS), pH 7,5

NaCl	500 mM
Tris	20 mM
Tween® 20	896 µM
in Reinstwasser	

Antikoagulanzsaline (AC-Saline), pH 6,5

NaCl	3,9 mM
KCl	40 mM
Saccharose	146 mM
Polyvinylpyrrolidon 40	0,1 % (w/v)
EDTA	8 mM
Citronensäure-Monohydrat	9,5 mM
Trinatriumcitrat	27 mM
PIPES	1,7 mM
in Reinstwasser	

Kalzium/Magnesium-freie *M. sexta*-Saline (MS⁻), pH 6,5

NaCl	3,9 mM
KCl	40 mM
Saccharose	146 mM
Polyvinylpyrrolidon 40	0,1 % (w/v)
PIPES	1,7 mM
in Reinstwasser	

3,5 % Paraformaldehyd in MS⁻ (3,5 % PFA-MS⁻), pH 6,5

Paraformaldehyd	3,5 % (w/v)
in MS ⁻	

Paraformaldehyd wurde in ca. 80 % des Endvolumens MS⁻ gegeben und auf 70 °C unter Rühren erhitzt. Durch Zugabe von einigen Tropfen 10 M NaOH Lösung wurde die Lösung alkalisiert; dadurch zerfällt das Paraformaldehyd zu Formaldehyd. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der pH-Wert auf pH 6,5 durch Titration mit 32 % HCl eingestellt. Das Endvolumen wurde durch Zugabe von MS⁻ erreicht. De facto handelt es sich um eine 3,5 % Formaldehydlösung.

Alkalische Phosphatasepuffer (AP-Puffer), pH 9,5

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Tween® 20	4,48 mM
in Reinstwasser	

Alkalische Phosphataseentwicklungslösung (AP-Entwicklungslösung), pH 9,5

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Tween® 20	4,48 mM
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	4 mM
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in Reinstwasser	5,5 mM

Alkalische Phosphatasestopplösung (AP-Stopplösung), pH 8,0

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
Tween® 20 in Reinstwasser	4,48 mM

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz 10 B	1,61 mM
Isopropanol	3,21 M
Essigsäure in Reinstwasser	1,75 M

Amidoschwarz-Entfärber

Isopropanol	3,21 M
Essigsäure in Reinstwasser	1,75 M

Antikörperblockierlösung, pH 7,5

Ziegsenrum	5 % (v/v)
Rinderserumalbumin	3 % (w/v)
Natriumazid in TBS	7,7 mM

Antikörperwaschlösung, pH 7,5

Ziegsenrum	0,5 % (v/v)
Rinderserumalbumin	0,3 % (w/v)
Natriumazid in TBS	7,7 mM

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE, pH 6,8

Tris	330 mM
SDS	7 mM
in Reinstwasser	

Trenngelpuffer für SDS-PAGE, pH 8,8

Tris	636 mM
Tris-Hydrochlorid	117 mM
SDS	7 mM
in Reinstwasser	

Elektrodenpuffer für SDS-PAGE, pH 8,3

	1 X	10 X
Tris	50 mM	500 mM
Glycin	192 mM	1,92 M
SDS	3,5 mM	35 mM
in Reinstwasser		

Acrylamid-Stammlösung für SDS-PAGE

Acrylamid	4,22 M
bis-Acrylamid	52 mM
in Reinstwasser	

SDS-PAGE Probenpuffer (modifiziert nach LAEMMLI 1970)

	2 X	5 X
Tris	75 mM	187,5 mM
Glycerin	1,1 M	2,7 M
SDS	139 mM	347 mM
β-Mercaptoethanol	1,15 M	2,86 M
Bromphenolblau	30 µM	75 µM
in Reinstwasser		

Sensitive Coomassie Färbelösung modifiziert nach DYBALLA und METZGER (2009)

Coomassie Brillantblau G250	234 µM
Aluminiumsulfat-(16)-Hydrat	79 mM
Ethanol	1,71 M
Ortho-Phosphorsäure	384 mM
in Reinstwasser	

Sensitive Coomassie Entfärbelösung modifiziert nach DYBALLA und METZGER (2009)

Ethanol	1,71 M
Ortho-Phosphorsäure in Reinstwasser	426 mM

Zellkulturmedien

Hybridomazellkulturmedium, pH 7,0

Fötales Rinderserum (FBS)	5 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	480 µM
NaHCO ₃	8,93 mM
HEPES	1,19 mM
in RPMI-1640 mit L-Glutamin	

Zellkulturmedium für CH1-Zellen, pH 6,1

TC-100 Insektenmedium	95 % (v/v)
Fötales Rinderserum (FBS)	5 % (v/v)

Hämatopoetisches Organ-Kulturmedium, pH 6,1

TC-100 Insektenmedium	45 % (v/v)
Fötales Rinderserum (FBS)	10 % (v/v)
CH1-konditioniertes TC-100 Insektenmedium*	45 % (v/v)
Amphotericin B	5 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	0,1 U/ml

*siehe Abschnitt 3.12.3

Super optimal broth with catabolite repression (SOC-Medium) (nach HANAHAN, 1983) von New England Biolabs bezogen, Zusammensetzung:

Pflanzenpepton	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM

Lysogeny broth (LB-Miller-Medium; BERTANI, 1951; MILLER, 1972), pH 7,0
als Pulvermischung von Carl Roth GmbH bezogen, Zusammensetzung:

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	172 mM
in Reinstwasser.	

Wurde nach dem Ansetzen sofort autoklaviert und steril verschlossen.

LB-Miller-Agar, pH 7,0

Agar-Agar	1,5 % (w/v)
in LB-Miller-Medium.	

Wurde nach dem Ansetzen sofort autoklaviert und in Petrischalen gegossen.

LB-Miller-Selektivmedium (*Lysogeny broth* mit Ampicillin), pH 7,0

Ampicillin	0,005 % (w/v)
In LB-Miller-Medium	

LB-Miller-Selektivagar (*Lysogeny broth* mit Ampicillin), pH 7,0

Agar-Agar	1,5 % (w/v)
Ampicillin	0,005 % (w/v)
in LB-Miller-Medium.	

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 42 °C wurde Ampicillin (Endkonzentration 0,005 % (w/v)) zugegeben und in Petrischalen gegossen. Für die Blau-Weiß-Selektion wurde 0,2 M Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) und 97,9 μ M 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-gal) zugegeben.

Standard-Nährmedium I, pH 7,5

als Pulvermischung von Carl Roth GmbH bezogen, Zusammensetzung:

Pepton	1,5 % (w/v)
Hefeextrakt	0,3 % (w/v)
NaCl	103 mM
Glucose	5,6 mM
in Reinstwasser.	

Wurde nach dem Ansetzen sofort autoklaviert und steril verschlossen.

Lösungen für die Histologie

Chromalaun-Gelatine-Lösung für die Objektträgerbeschichtung

Gelatine	0,5 % (w/v)
Chrom-III-Kaliumsulfat	1,77 mM
in Reinstwasser	

Pikrosirius-Rot-Lösung nach PUCHTLER *et al.* (1973)

Direct Red 80	728 µM
in gesättigter Pikrinsäurelösung	

Weigerts Hämatoxylinlösung

Eisen(III)-chlorid	35,76 mM
Hämatoxylin	16,54 mM
HCl	34,28 mM
Ethanol	7,92 M
in Reinstwasser	

Lösungen für die Molekularbiologie

DNA-Extraktionspuffer nach STELLER und PIROTTA (1986), pH 9,0

Tris	100 mM
EDTA	100 mM
SDS	34,67 mM
Ethanol	7,92 M
in Reinstwasser	

20 X Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (SSC) nach SOUTHERN (1975), pH 7,0

NaCl	3 M
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,3 M
in Reinstwasser	

Die Lösung wurde mit 1 ‰ (v/v) DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und autoklaviert.

50 X Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), pH 8,5

Tris	2 M
EDTA	50 mM
Essigsäure	1 M
in Reinstwasser	

Für DNA-Analysen wurde der Puffer nach o. g. Rezept angesetzt, für RNA-Analysen wurde 50 X TAE-Puffer *molecular biology grade* (Applichem, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

50 X Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 8,5

Tris	2 M
EDTA	50 mM
in Reinstwasser	

10 X DNA-Auftragspuffer

Glycerin	5,47 M
Xylencyanol	1,71 mM
Tartrazin O	1,87 mM
in TE-Puffer	

RNA-Probenpuffer für die Elektrophorese nach MASEK *et al.* (2005)

Formamid, deionisiert	66 % (v/v)
10 X DNA-Auftragspuffer	11 % (v/v)
in Reinstwasser	

RNA- (Fluoreszenz-) *in-situ*-Hybridisierungspuffer

Formamid, deionisiert	50 % (v/v)
20 X SSC	25 % (v/v)
Heparin	0,1 % (w/v)
Fischsperma-DNA	0,1% (w/v)
Tween® 20	0,1 % (v/v)
in RNase-freiem Reinstwasser	

Lösung mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren.

Maleinsäurepuffer, pH 7,5

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
in Reinstwasser	

Boehringer-Blockierlösung in Maleinsäurepuffer, pH 7,5

Boehringer <i>Blocking reagent</i> in Maleinsäurepuffer	1 % (w/v)
--	-----------

Acridinorange Stammlösung zur Visualisierung von Nukleinsäurebanden (modifiziert nach MCMASTER und CARMICHEL, 1977)

Acridinorange in Reinstwasser	100 mM
----------------------------------	--------

Der Einsatz von 1,4 μ M in der Endkonzentration (entspricht 0,7 μ l Stammlösung pro 50 ml Gel, vor dem Gießen zugesetzt) als Zusatz zum Agarosegel für die Visualisierung von Banden doppelsträngiger RNA und DNA wurde über Verdünnungsreihen ermittelt. Die Färbeintensität ist Vergleichbar mit dem Referenzprodukt Roti®-GelStain (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Fluoreszenzanregung und Detektion erfolgte mit üblichen Anlagen für die Visualisierung Ethidiumbromid-gefärbter Gele. Zu beachten ist, dass der Farbstoff gegenläufig der DNA / RNA im elektrischen Feld wandert, deshalb sollte für ein optimales Ergebnis als maximale Trennstrecke der Nukleinsäuren die halbe Gellänge nicht überschritten werden.

3.2 Zucht und Haltung von *Manduca sexta*

Manduca sexta-Larven wurden in Kleingruppen (für die Zucht) oder in Einzeltierhaltung (für die meisten Experimente) in Kunststoffgefäßen bei Raumtemperatur (23 ± 2 °C) unter Langtagbedingungen (18 h hell: 6 h dunkel) gehalten. Kunstfutter (Zusammensetzung siehe Tabelle A.19) wurde *ad libitum* gefüttert. Offensichtlich kranke Tiere (melanisierte Larven, Larven mit Biss Spuren, langsam wachsende Larven, schwarze Puppen) wurden ausgesondert. Puppen wurden bis kurz vor dem Schlupf bei Raumtemperatur gelagert und zum Schlupf in einen Flugkäfig transferiert. Die Imagines wurden unter Langtagbedingungen bei 25 ± 2 °C im Flugkäfig gehalten, Wasser und gesättigte Saccharoselösung wurden *ad libitum* angeboten. Eine Tabakpflanze (*Nicotiana rustica*) wurde in dem Käfig platziert, um die Eiablage zu ermöglichen. Die Eier wurden zwei- bis dreimal wöchentlich abgesammelt und bei Raumtemperatur in Kunststoffgefäßen mit einem Block Kunstfutter, der sowohl der Ernährung der schlüpfenden Larven als auch der Luftfeuchtereulation dient, inkubiert. Geschlüpfte Larven wurden in Gruppen oder einzeln in Kunststoffgefäße transferiert.

3.3 Gewinnen von Hämozyten

Larven des gewünschten Stadiums wurden unter fließendem Wasser gewaschen, mit 70 % Ethanol desinfiziert und für ca. 30 min auf Eis sediert. Ein Abdominalfüßchen wurde abgetrennt, austretende Hämolymphe in 5 ml eiskalter AC-Saline aufgefangen und sanft gemischt. Die Hämozyten wurden bei 300 – 500 g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml AC-Saline resuspendiert und der Vorgang zweimal wiederholt.

3.4 Herstellen von Hämozytenmonolayern

Die gewaschenen Hämozyten wurden mit TC-100 Insektenmedium überschichtet, die flüssige Phase wieder abgenommen, das Hämozytenpellet einer Larve in ca. 1 ml TC-100 Insektenmedium resuspendiert und auf Mehrloch-Glasobjektträgern in einer feuchten Kammer aufgetragen. Nach 45 min wurden die Hämozyten mit 3,5 % PFA-MS⁻ für 5 min bei Raumtemperatur fixiert, mit TBS dreimal gewaschen und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.5 Präparation des hämatopoetischen Organs

Larven des gewünschten Stadiums wurden wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben gesäubert und sediert. Die Raupen wurden dorsal unter eiskalter AC-Saline oder eiskalter TBS eröffnet, der Thorax aufgespannt, Flügelanlagen und hämatopoetische Organe mit Uhrmacherpinzetten und einer feinen Schere freipräpariert und von der Epidermis gelöst. Die Gewebe wurden entnommen und in TBS oder AC-Saline und unter leichtem Schwenken auf einem Rotationsschüttler gewaschen.

3.6 Histologische Techniken

3.6.1 Anfertigen histologischer Schnitte des hämatopoetischen Organs

Die hämatopoetischen Organe wurden zusammen mit den Flügelanlagen für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit 3,5 % PFA-MS⁻ fixiert, dreimal mit TBS je 45 min bei Raumtemperatur gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 % - 40 % - 50 % - 60 % - 70 % Ethanol in TBS, 80 % - 90 % Ethanol in Wasser) und zweimal mit 96 % Ethanol, je Schritt für 1 h bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C, dehydriert. Für die Einbettung in Paraffin (Histosec®) wurden zwei weitere Dehydrierungsschritte (zweimal 100 % Isopropanol für 1 h bei Raumtemperatur) durchgeführt. Die Objekte in 100 % Isopropanol wurden auf 56 °C erwärmt, gefolgt von einer Inkubation in 50 % Histosec® 50 % Isopropanol über Nacht bei 56 °C, einer weiteren Inkubation in 100 % Histosec® bei 56 °C über Nacht. Nach einem Wechsel in frisches Histosec® wurden die Objekte in kleine Aluminiumformen gegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Schnitte von 7 bis 8 µm Stärke wurden mit einem Leitz Schlittenmikrotom und einem Messer mit C-Schliff angefertigt, auf mit Chromalaun beschichtete Glasobjektträger gebracht und mit Roti®-Histol entparaffiniert.

Für die Einbettung in Kunstharz (Technovit® 8100, Heraeus) wurden die Objekte dehydriert bis zur 96 % Ethanol-Stufe, über Nacht bei 4 °C in Infiltrationslösung nach Herstellerangabe inkubiert und danach mit der Kunstharzlösung bei 4 °C ausgehärtet. Schnitte von 4 bis 5 µm Stärke wurden mit einem Leitz Rotationsmikrotom unter Verwendung eines Messers mit D-Schliff angefertigt.

3.6.2 Pikrosirius-Rot-Färbung mit Kernfärbung von Paraffinschnitten

Zur Darstellung von Kernen, Kollagen und Zytoplasma auf Paraffinschnitten des hämatopoetischen Organs wurde eine Pikrosirius-Rot Färbung mit Weigerts Hämatoxylin Zellkernfärbung durchgeführt. Die entparaffinierten Schnitte wurden 2 min in Weigerts Hämatoxylinlösung inkubiert, 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und für 1 h in Pikrosirius-Rot-Lösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 0,5 % (v/v) Essigsäure für 1 min wurden die Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (70 % - 80 % - 90 % - 96 % Ethanol, je 10 min bei Raumtemperatur), für 20 min in 100 % Xylol gebracht, an der Luft getrocknet und mit Entellan® eingedeckt.

3.7 Antikörper- und Lektinmarkierungen

3.7.1 Antikörper und Lektine

Als primäre Antikörper kamen Hybridomaüberstand, konzentrierter Hybridomaüberstand oder Immunseren zum Einsatz (Tabelle 3.1). Alle Verdünnungen wurden mit 5 % Ziegeserum, 3 % BSA, 0,05 % Natriumazid in TBS angesetzt. Bei Mehrfachmarkierungen wurden die primären Antikörper entweder gleichzeitig oder nach der jeweils angegebenen Inkubationszeit nacheinander aufgetragen. Die sekundären Antikörper wurden bei Mehrfachmarkierungen zeitgleich aufgetragen.

Tabelle 3.1: Primäre Antikörper.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezifität / Epitop</u>	<u>Wirt / Typ</u>	<u>Ig-Typ / -Subtyp / Fragment</u>	<u>Hersteller / Referenz</u>	<u>Verdünnung</u>
mAb MS2	Granuläre Zellen, Oenozytoide Zellmembran, Epitop unbekannt	Maus, monoklonal	IgG1	WILLOT <i>et al.</i> , 1994; BEETZ <i>et al.</i> , 2004	Hybridoma-überstand
mAb MS7	Granulen granulärer Zellen, Epitop unbekannt	Maus, monoklonal	IgG1	WILLOT <i>et al.</i> , 1994	Hybridoma-überstand
mAb MS13	Plasmatozytenzellmembran, β -Integrin	Maus, monoklonal	IgG2b	WILLOT <i>et al.</i> , 1994; WIEGAND <i>et al.</i> , 2000; Levin <i>et al.</i> , 2005; BEETZ <i>et al.</i> , 2004	Hybridoma-überstand
mAb MS39	Granuläre Zellen, Granulen, Epitop unbekannt	Maus, monoklonal	IgG1 κ	WILLOT <i>et al.</i> , 1994	Hybridoma-überstand
mAb MS75	Plasmatozyten, Zellmembran, Epitop unbekannt	Maus, monoklonal	IgG1 *	WILLOT <i>et al.</i> , 1994; BEETZ <i>et al.</i> , 2004	Hybridoma-überstand
mAb MS77	Plasmatozyten, Zellmembran, Epitop unbekannt	Maus, monoklonal	IgM	WILLOT <i>et al.</i> , 1994; BEETZ <i>et al.</i> , 2004	Hybridoma-überstand
mAb NG3B11	<i>M. sexta</i> Neuroglial	Maus, monoklonal	IgG1	NARDI, 1993	Hybridoma-überstand
anti-Digoxigenin-AP	Digoxigenin	Schaf, polyklonal	Fab	Roche-11093274910	1:500 – 1:2000 (ISH, FISH)
anti-PGRP-1A	<i>M. sexta</i> peptidoglycan recognition protein 1A	Kaninchen, polyklonal	-	KANOST a)	1:1.000
anti-Esterase	<i>Ephestia kuehniella</i> Esterase der Hämolymphe	Kaninchen, polyklonal	-	MANN, 1992 b)	1:1.000
anti-Lysozym**	<i>Hyalophora cecropia</i> Lysozym	Kaninchen, polyklonal	-	TRENCZEK und FAYE, 1988	1:1.000 (IF); 1:5.000 (WB)
anti-Phospho-histon H3 (Ser28)	Humanes Histon H3, phosphoryliert an Ser28 Aminosäuren 25-37 (ARK[pS]APATGGVKK-C)	Kaninchen, polyklonal	-	Millipore Upstate # 07-145	1:50
anti- <i>B. mori</i> Prophenol-oxidase	<i>Bombyx mori</i> Prophenoloxidase, Oenozytoide	Kaninchen, polyklonal	-	IWAMA und ASHIDA, 1986; ASHIDA, 1988; c)	1:1.000
anti- <i>M. sexta</i> Prophenol-oxidase	<i>M. sexta</i> Prophenoloxidase, Oenozytoide	Kaninchen, polyklonal	-	KANOST a)	1:1.000
anti- β GRP-1 3a	<i>M. sexta</i> β -1,3 glucan recognition protein 1	Kaninchen, polyklonal	-	MA und KANOST, 2000 a)	1:500
anti-HRP	Meerrettichperoxidase	Kaninchen, polyklonal	-	Sigma-Aldrich P7899	1:5.000
anti-LanB2	<i>D. melanogaster</i> Laminin B2	Kaninchen, polyklonal	-	abcam® ab47651	1:250 – 1:750
anti-PXDN	<i>H. sapiens</i> Peroxidasin, N-terminal	Kaninchen, polyklonal	-	abcam® ab179663	1:20
anti-Croquemort	<i>D. melanogaster</i> Croquemort, 420 AS C-terminal	Ratte, polyklonal	-	NAKANISHI d)	1:100

a) Freundliche Gabe von Prof. M. KANOST; b) Freundliche Gabe von Dr. G. MANN c) Freundliche Gabe von Prof. M. ASHIDA; d) Freundliche Gabe von Prof. Y. NAKANISHI; * Der IgG-Subtyp wurde mittels spezifischen Sekundärantikörpern bestimmt (Daten nicht gezeigt); ** Es wurden verschiedene Immunsereen (Chargen 43322 und 43414) verwendet, die aus unabhängigen Immunsierungen verschiedener Kaninchen mit *H. cecropia*-Lysozym stammten.

Tabelle 3.2: Sekundäre Antikörper, *Arachis hypogaea* Lektin (PNA) und Streptavidin.

<u>Antikörper / Lektin / Streptavidin</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Hersteller / Nummer</u>	<u>Verdünnung*</u>
anti-Maus IgG1	FITC	Santa Cruz SC-2078	1:4.000 (IF)
anti-Maus IgG2b	Biotin	Santa Cruz SC-2074	1:20.000 (IF)
anti-Maus IgG Fcγ	TRITC	Dianova 315-025-008	1:250 (IF)
anti-Maus IgM Fcμ	Cy5	Dianova 111-175-020	1:200 (IF)
anti-Maus IgM Fcμ	FITC	Dianova 115-095-020	1:200 (IF)
anti-Maus IgG/IgM	FITC	Dianova 115-095-044	1:200 (IF)
anti-Maus IgG/IgM	Cy3	Dianova 111-165-044	1:200 (IF)
anti-Maus IgG H&L	alkalische Phosphatase	Abcam ab97020	1:1.000 (IHC), 1:5.000 (WB)
anti-Kaninchen IgG	DyLight 488	Vector DI-1488	1:2.000 (IF)
anti-Kaninchen IgG (H&L)	Chromeo 546	Abcam ab60317	1:2.000 (IF)
anti-Kaninchen IgG	alkalische Phosphatase	Carl Roth 4751	1:1.000 (IHC), 1:5.000 (WB)
anti-Ratte Ig	Biotin	Vector 112-065-003	1:100 (IF)
anti-Schaf Ig	Biotin	Dianova 713-065-003	1:400 (FISH)
<i>Arachis hypogaea</i> Lektin (PNA)	FITC	Sigma-Aldrich L7381	1:2.000 (IF)
<i>Arachis hypogaea</i> Lektin (PNA)	TRITC	Sigma-Aldrich L3766	1:2.000 (IF)
<i>Arachis hypogaea</i> Lektin (PNA)	Biotin	Sigma-Aldrich L6135	1:5.000 (WB)
Streptavidin	Cy3	Sigma-Aldrich S6402	1:20.000 (IF)
Streptavidin	alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich S2890	1:250 (IHC), 1:1.000 (WB)

* für Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie (IHC) oder Western Blot (WB).

3.7.2 Antikörper- und Lektinmarkierung von Hämocytenmonolayern

Eingefrorene Hämocytenmonolayer wurden nach der Entnahme aus -20 °C mit TBS überschichtet, bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit Antikörperblockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit primärem Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt, gefolgt von drei Waschschritten für je 15 min mit Antikörperwaschlösung bei Raumtemperatur. Danach wurde mit sekundärem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine Einfachmarkierung mit Lektin wurde direkt nach dem Blockieren das Lektin aufgetragen, für eine Doppelmarkierung wurde das Lektin der sekundären Antikörperlösung zugesetzt. Nach einem Waschschriff mit Antikörperwaschlösung für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Hämocytenmonolayer mit 360 nM DAPI in TBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal kurz mit TBS gewaschen und in Fluoromount G® eingebettet.

3.7.3 Kompetitive Inhibition der Antikörper- oder Lektinbindung durch Kohlenhydrate

Um die Bindespezifität des *Arachis hypogaea* Lektins (PNA) an Zuckerbestandteile der untersuchten Gewebe zu bestätigen und um eventuelle zuckerspezifische Bindung der Antikörper anti-HRP und mAb MS77 zu untersuchen, wurden Zuckerinhibitionsversuche durchgeführt.

Für PNA wurde für die Inhibition der Bindung D-Galactose eingesetzt. Hierzu wurde zu der PNA Lösung (PNA-TRITC, 1:2000 in Antikörperblockierlösung) 1 % (w/v) D-Galactose zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für mAb MS77 und anti-HRP-Immunsereum wurden zehn Zucker (α -D-Lactose, α -Rhamnose, D(-)Fructose, D-Galactose, D(+)-Mannose, D(+)-Saccharose, D(+)-Trehalose, Maltose, N-Acetyl-D-Galactosamin und N-Acetyl-D-Glucosamin) sowie bovines Fetuin (Glycoprotein) 1 % (w/v) als mögliche kompetitive Komponenten der jeweiligen Antikörperlösung (mAb MS77: unverdünnter Hybridomaüberstand, anti-HRP: 1:5.000 verdünnt) zugegeben und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde mit den jeweiligen vorinkubierten Antikörper- bzw. Lektinlösungen wie unter Abschnitt 3.7.2 beschrieben eine Färbung auf fixierten Hämocytenmonolayern durchgeführt. Für die Detektion des anti-HRP-Antikörpers wurde der sekundäre Antikörper anti-Kaninchen IgG DyLight 488 (Vector Laboratories), 1:2000 verdünnt, und für mAb MS77 der anti-Maus IgG/IgM Cy3 (Dianova), 1:200 verdünnt, eingesetzt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60). Ein Ausbleiben des Fluoreszenzsignals wurde als erfolgreiche Inhibition gewertet. Als Kontrolle dienten Antikörper- bzw. Lektinlösungen ohne Zuckerzusatz.

3.7.4 Antikörper- und Lektinmarkierung von whole-mount-Präparaten des hämatopoetischen Organs

Die hämatopoetische Organ-Flügelanlagen-Komplexe wurden dreimal für 5 min mit eiskalter AC-Saline oder TBS unter sanftem Schütteln auf einem Rotationsschüttler bei 150 U/min gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 3,5 % PFA-MS⁻ für 45 min bei 150 U/min. Nach drei Waschschritten mit TBS für je 30 min bei Raumtemperatur wurden die Gewebe mit Antikörperblockierlösung mit 0,5 % (v/v) Triton™ X-100 bei 4 °C über Nacht blockiert. Für den Nachweis des detergentempfindlichen Epitops für mAb MS2 wurde auf den Einsatz von Triton™ X-100 verzichtet.

Die hämatopoetischen Organe wurden in primärer Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert, gefolgt von vier 45-minütigen Waschschritten mit Antikörperwaschlösung mit 0,1 % Triton™ X-100 bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper fand über Nacht bei 4 °C statt,

gefolgt von einem Waschschrift mit Triton-TBS für 45 min bei Raumtemperatur. Um Zellkerne zu visualisieren wurden die Organe für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 360 nM DAPI in TBS inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit TBS für 45 min bei Raumtemperatur. Eingebettet wurden die Organe in Fluoromount G®

3.7.5 Antikörper- und Lektinmarkierung von Paraffinschnitten

Das Protokoll für Lektin- und Antikörperfärbung von Paraffinschnitten entsprach dem für Hämozytenmonolayer (siehe Abschnitt 3.7.2).

3.7.6 Antikörper- und Lektinmarkierung von *in-vitro*-kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs

Aus den in Kultur genommenen hämatopoetischen Organen wanderte stets eine beträchtliche Anzahl an Hämozyten aus. Diese sind teilweise adhärent und teilweise nicht adhärent. Um beide Fraktionen mit Antikörpern oder Lektin zu markieren wurde das folgende Protokoll angewendet.

Alle Pelletierschritte wurden in einer Zentrifuge bei 500 *g* für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nicht adhärente Zellen, die *in vitro* das hämatopoetische Organ verlassen haben, wurden durch Zentrifugation des Kulturüberstands bei 500 *g* für 15 min bei Raumtemperatur pelletiert, in 3,5 % PFA-MS⁻ resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 500 *g* für 15 min bei Raumtemperatur wurde das Zellpellet in Tween-TBS resuspendiert und erneut pelletiert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male durchgeführt, danach das Pellet in Antikörperblockierlösung mit 0,1 % (v/v) Tween® 20 resuspendiert, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in primärer Antikörperlösung bei 4 °C über Nacht inkubiert, pelletiert, der Überstand abgenommen, in 1 ml Antikörperwaschlösung mit 0,1 % (v/v) Tween® 20 resuspendiert und pelletiert. Das Hämozytenpellet wurde in sekundärer Antikörperlösung resuspendiert, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, pelletiert, das Pellet in Tween-TBS resuspendiert, erneut bei 500 *g* für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit 360 nM DAPI in TBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurde das Hämozytenpellet in TBS resuspendiert, pelletiert, in ca. 30 µl TBS aufgenommen und mit Fluoromount G® eingebettet.

Adhärente Zellen, die sich auf der Oberfläche eines Deckgläschens befanden, wurden nach der in Abschnitt 3.7.2 beschriebenen Methode behandelt. Als Modifikation wurde den Blockier- und

Waschschritten 0,1 % (v/v) Tween® 20 zugesetzt. Für die Markierung mit mAb MS2 wurde auf den Einsatz von Tween® 20 verzichtet.

3.8 Mikroskopische Analyse

Für die Visualisierung fluorochromgekoppelter Antikörper oder Lektine bzw. der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden die Proben in Fluoromount G® eingebettet. Die Analyse erfolgte mit einem Olympus BX60 Fluoreszenzmikroskop oder einem Leica SP 2 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (KLSM).

Für die Visualisierung mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper, enzymbasierender *in-situ*-Hybridisierung und der Prophenoxidase-Aktivitätsnachweise wurden die Objekte in Kaisers Glyceringelatine eingebettet und mit einem Olympus BX60 Mikroskop analysiert.

Lebendzellbeobachtungen wurden mit einem Olympus IMT-2 Mikroskop mit invertiertem Strahlengang durchgeführt.

3.9 Bildbearbeitung

Einige Abbildungen wurden als Kompositbild aus mehreren Einzelaufnahmen erstellt („Panoramafunktion“). Dazu wurden die Einzelbilder mit der Software AutoStitch v2.2 (<http://matthewalunbrown.com/autostitch/autostitch.html>) zu einem Gesamtbild zusammengeführt.

Einige Bilder wurden nachträglich mit der Open-Source-Software GIMP 2.8.10 (<http://www.gimp.org/>) verändert. Dabei wurden Kontrast und Farben optimiert. Diese Manipulationen wurden stets auf die gesamte Abbildung angewendet.

Bildtafeln wurden mit GIMP 2.8.10 erstellt und beschriftet.

Projektionen mehrerer konfokaler Einzelebenen sowie Überlagerungen verschiedener KLSM-Scans wurden mit der Software Leica LCS (Leica Microsystems) angefertigt.

3.10 Differentielle Zellzahlermittlung und Bestimmung des Mitoseindex

Zur Ermittlung der differentiellen Zellzahl (DHC) wurden Mikrofotografien oder KLSM-Aufnahmen fluoreszenzmarkierter Zellpräparate mit Open-Source-Software ImageJ 1.50e und dem ImageJ

Plug-in Cell Counter (<http://imagej.nih.gov/ij>; ABRÀMOFF *et al.*, 2004) analysiert. Der Anteil markierter Zellen wurde als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl ermittelt.

3.11 Zytometrische Methoden

3.11.1 Messung der Zellgröße

Die Größe von Hämozyten und Zellen des hämatopoetischen Organs wurde mit der Funktion *Measure* der *Open Source* Software ImageJ 1.50e (<http://imagej.nih.gov/ij>; ABRÀMOFF *et al.*, 2004) pro Zelle entweder der Durchmesser an zwei Stellen orthogonal stehender Achsen gemessen und der Mittelwert bestimmt oder die geringste Ausdehnung (Breite) und die höchste Ausdehnung (Länge) gemessen. Die Fläche der Zellen wurde mittels Freihandauswahl bestimmt.

3.11.2 Bestimmung des Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnisses

Für die Bestimmung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses wurden KLSM-Aufnahmen oder Mikrofotografien fluoreszenzmarkierter Zellpräparate verwendet. Als Fläche des Zellkerns wurde der DAPI-positive Bereich verwendet, als Fläche des Zytoplasmas die Gesamtzellfläche abzüglich der Kernfläche. Diese Werte wurden mit der Funktion *Measure* der *Open Source* Software ImageJ 1.50e (<http://imagej.nih.gov/ij>; ABRÀMOFF *et al.*, 2004) bestimmt. Hierbei wird die Anzahl der Pixel in dem durch die Freihandauswahl umrahmtem Gebiet bestimmt. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis wurde als Quotient der Fläche des Zellkerns zur Fläche des Zytoplasmas bestimmt.

3.11.3 Messung der Fluoreszenzintensität DAPI-markierter Zellkerne

Hämozytenmonolayer wurden mit hämozytenspezifischen Antikörpern, dem Lektin PNA und DAPI markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die Bilder wurden für die Messung der Fluoreszenz-Intensität des DAPI-Signals über die Funktion *Measure* des Programms ImageJ 1.50e (<http://imagej.nih.gov/ij>; ABRÀMOFF *et al.*, 2004) verwendet. Die Werte „Fläche“, „Dichte“ und „integrierte Dichte“ wurden gemessen. Dazu wurden drei zellfreie Stellen in jedem Bild manuell markiert, das Fluoreszenzsignal des Hintergrunds gemessen und der Mittelwert bestimmt (Hintergrundfluoreszenz). Dann wurde an fünf anhand morphologischer Kriterien bestimmter granulärer Zellen die Fläche des Zellkerns markiert und die Intensität anhand des Graustufensignals gemessen.

Die Formel zur Berechnung der korrigierten Total-Kern-Fluoreszenz (TKF) lautet:

$$\text{TKF} = \text{Integrierte Dichte} - (\text{Fläche} \times \text{Hintergrundfluoreszenz}).$$

Die TKF der zu messenden Zellen (TKFHZ) wurde in Relation zur durchschnittlichen TKF der Zellkerne ausgewählter (offensichtlich nicht in Mitose befindlichen) granuläre Zellen (TKFGR) gesetzt:

$$\text{Relative DAPI-Intensität} = \text{TKFHZ} \times \text{TKFGR}^{-1}$$

Für die Zuordnung der Zellkerne zu bestimmten Hämozytentypen wurden morphologische Charakteristika der Hämozyten sowie zusätzliche Markierung mit Antikörpern und dem Lektin PNA genutzt. Zur Identifizierung der PNAm⁺ Zellen wurde eine Markierung mit PNA an der Zellmembran sowie die Kernmorphologie verwendet.

3.12 Zellkulturtechniken

3.12.1 Bakterienkulturen

Bacillus thuringiensis ssp. *kurstaki* und *Escherichia coli* K12 D31 (BOMAN und MONNER, 1975) stammten aus dem Labor der AG TRENCZEK, Institut für allgemeine und spezielle Zoologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland. *E. coli* K12 stammte aus dem Labor der AG BILEJ, Institut für Mikrobiologie der tschechischen Akademie der Wissenschaften, Prag, Tschechische Republik.

Bacillus thuringiensis ssp. *kurstaki*, *Escherichia coli* Stamm K12 (*E. coli* K12) und *E. coli* K12 Stamm D31 (*E. coli* K12 D31) wurden in Standard-Nährmedium I oder LB-Miller-Medium auf einem Rotationsschüttler bei 250 U/min bei 37 °C oder auf LB-Miller-Agar bei 37 °C angezogen.

Zur Gewinnung von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* Sporen wurden die Bakterien in Standard-Nährmedium I für 15 Tage bei Raumtemperatur im Bakterieninkubator bei 180 U/min inkubiert. Die Kultur wurde bei Erreichen von ca. 50 % Sporen zu 50 % vegetativen Zellen (mikroskopische Kontrolle) bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche für Versuche verwendet.

3.12.2 Hybridomazellkultur und Gewinnung monoklonaler Antikörper

Die Hybridomazelllinien MS75 und MS13, gewonnen durch Fusion von Myelomzellen mit B-Zellen aus BALB/C Mäusen, die gegen intakte *M. sexta* Hämozyten immunisiert wurden (WILLOT *et al.*, 1994), sowie die Linie neuroglial 3B11 (DSHB Hybridoma Produkt neuroglial 3B11, entwickelt von NARDI, J) wurden in Hybridomazellkulturmedium als Adhäsionskulturen in Zellkulturflaschen (T25 oder T50) bei 37 °C, 5 % CO₂, kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt, der Überstand gesammelt, durch Zentrifugation von Zellbestandteilen getrennt und mit 0,05 % (w/v) Natriumazid versetzt.

Überstände der Linien NG3B11, MS13 oder MS75 wurden mit einem 100.000 *molecular weight cut off*-Filter und einer Amicon 8400 Filtrationsanlage 20- bis 60-fach konzentriert. Diese Konzentrate wurden vor der Verwendung mit Blockierlösung auf Ausgangskonzentration verdünnt. Alle anderen verwendeten Hybridomaüberstände wurden direkt als Antikörperlösung verwendet, bzw. nach vorausgegangenen Titrationsversuchen auf eine niedrigere Konzentration verdünnt. Die Lagerung der Überstände bzw. Konzentrate erfolgte bei 7 °C.

Zur Lagerung der Hybridomalinien wurden diese nach Standardverfahren (HARLOW und LANE, 1988) bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Bedarf aus der Lagerung entnommen und wieder in Kultur genommen.

3.12.3 Dauerkultur der CH1-Zelllinie und Gewinnen von CH1-konditioniertem Medium

Die embryonale *M. sexta* Zelllinie CH1 (syn. MRRL-CH1, EIDE *et al.*, 1975) wurde als adhärente Kultur in T25 oder T50 Zellkulturflaschen bei 25 °C gehalten. Als Zellkulturmedium kam TC-100 Insektenmedium mit 5 % FBS (PAA Gold) zum Einsatz. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt, der Überstand aufgefangen, sterilfiltriert und für die Kultivierung von Primärkulturen als Zusatz verwendet (CH1-konditioniertes Medium).

3.12.4 Primärkultur von hämatopoetischen Organen

Hämatopoetische Organe wurden wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben unter eiskalter AC-Saline entnommen, einmal in AC-Saline gewaschen und Muskeln, Flügelanlage und soweit möglich die Tracheen entfernt. Die hämatopoetischen Organe wurden in 1 ml eiskalter AC-Saline mit 5 mg/ml

Amphotericin B, 100 mg/l Streptomycin, 100 Einheiten/l Penicillin für 1 h auf Eis bei 300 U/min auf einem Kreisschüttler gewaschen, um lose adhärierende Hämozyten aus dem Gewebe zu entfernen. Die Organe wurden für 1 min in hämatopoetischem Organ-Kulturmedium gewaschen und in 4-Loch Kulturschalen mit eingelegten, runden, sterilen Deckgläsern (Durchmesser 1 cm) mit 1 ml hämatopoetischem Organ-Kulturmedium bei 25 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

3.13 Elektrophoresemethoden für Proteinanalysen

3.13.1 Aufbereiten von Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Gewebeproben von hämatopoetischen Organen ohne Flügelanlage (siehe Abschnitt 3.5) bzw. gewaschene Hämozyten (siehe Abschnitt 3.3) gewogen und pro 1 mg Gewebe in 4 µl eiskalter SDS-PAGE Sammelgelpuffer mit 1 X Proteinaseinhibitor-Cocktail (Sigma P2714) und 10 % Glycerin aufgenommen, mit einem Pistill zerkleinert und im eisgekühlten Ultraschallbad dreimal für 15 s sonifiziert. Nach Zugabe von fünf Volumenteilen 2 X SDS-PAGE Probenpuffer nach LAEMMLI (1970) wurde die Probe für 5 min auf 96 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und, wenn nicht sofort verwendet, bei -20 °C gelagert.

3.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Gele wurden nach den Angaben in SAMBROOK *et al.* (1989) und HARLOW und LANE (1988) gemischt und in einer Mini Protean II Anlage gegossen. Die Größe der Gele betrug 60 x 90 x 0,75 bzw. 60 x 90 x 1 mm. Trenngele wurde mit 10 % bzw. 12 % Acrylamidkonzentration angefertigt, Sammelgele mit 4 % Acrylamidkonzentration.

Pro Tasche wurden 10 µl ($\pm$ 1 mg Probengewebe) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einer BioRad Protean II Minigelelektrophoreseanlage für ca. 30 min bei konstanter Spannung von 50 V gefolgt von konstant 100 V aufgetrennt.

Die Gele wurden dann entweder für einen Western Blot verwendet (siehe folgenden Abschnitt) oder die Proteinbanden mit kolloidaler Coomassiefärbung modifiziert nach der Methode von DYBALLA und METZGER (2009) gefärbt. Für die Färbung der Proteinbanden im SDS-PA-Gel wurden die Gele für 20 min in Reinstwasser gewaschen und danach in der sensitiven Coomassie Färbelösung

für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde mit der Entfärbelösung unter Sichtkontrolle aus dem Gel gewaschen. Die Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität (selbst ermittelt: 5 ng BSA-Bande konnte visualisiert werden) und der weitgehende Verzicht auf giftige Chemikalien. Nachteilig kann der Verzicht auf einen Fixierschritt für den Nachweis kleiner Proteine sein, da diese die Gelmatrix durch Diffusion verlassen können (TRENCZEK, pers. Mitteilung).

3.13.3 Western Blot

Der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel erfolgte nach der *semi dry* Methode auf eine nach Herstellerangabe vorbehandelte PVDF-Blotmembran mittels Elektroblob bei 0,8 mA/1 cm² Blotmembran für 1 h. Die Blotmembran wurde nach dem Transfer mit 3 % BSA, 0,1 % Tween® 20 in TBS für 1 h blockiert und mit dem primären Antikörper in 0,3 % BSA in TBS über Nacht bei 4 °C auf einem Kippschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,3 % BSA, 0,1 % Tween® 20 in TBS für je 15 min wurde die Membran mit dem alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit 0,1 % Tween 20 in TBS und einmal mit alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer) für je 15 min gewaschen. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase-Entwicklungslösung (mit NBT und BCIP) unter Sichtkontrolle. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges waschen mit Wasser unterbunden.

Für den Nachweis von Proteinen über Lektinbindung mit PNA wurde statt des primären Antikörpers Biotin-konjugiertes PNA verwendet und statt des sekundären Antikörpers alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin.

Die Referenzspur des Proteingrößenmarkers wurde direkt nach dem Proteintransfer von der Nachweismembran abgetrennt, für 2 min in Amidoschwarzfärbelösung geschwenkt und mit Amidoschwarzentfärber differenziert.

3.13.4 Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine bei SDS-PAGE und Western Blot

Die Trennstrecke der Proteinbanden in den Proben und die Trennstrecke eines Molekulargewichtsmarkers wurden vermessen und der *relate to front*-Wert (R_f) mit folgender Formel bestimmt:

$$R_f = (\text{Wanderstrecke der Proteinbande}) / (\text{Wanderstrecke der Lauffront})$$

Das relative Molekulargewicht von Proteinbanden unbekannter Größe wurde anhand der Regressionsgerade der Wanderstrecke des Molekulargewichtsmarkers bestimmt.

3.14 Infektionsversuche

3.14.1 FITC-markieren von *E. coli* K12 D31

Frische Übernachtskulturen von *E. coli* K12 D31 wurden mit 3,5 % Paraformaldehyd in 155 mM NaCl für 45 min bei Raumtemperatur abgetötet und mehrfach mit 155 mM NaCl gewaschen. Hierzu wurden die Bakterien zwischen jedem Schritt bei 2000 g für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml 0,1 % (w/v) Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in 0,05 M Natriumbicarbonatpuffer, pH 9,0, resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 10 ml PBS wurden die markierten Bakterien bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.14.2 Orale Applikation von *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*

Vegetative Zellen und Sporen von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* aus Flüssigkulturen mit ca. 50 % Sporenanteil wurden pelletiert (1000 g für 15 min bei Raumtemperatur), der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml sterilem Wasser aufgenommen, erneut zentrifugiert und das Pellet in wenig sterilem Wasser aufgenommen. Die Sporenkonzentration wurde mit Wasser auf $2,5 \times 10^6$ Sporen pro ml eingestellt. Kunstfutterwürfel von ca. 1 cm Kantenlänge wurden in die Bakteriensuspension getaucht und in der Sterilbank luftgetrocknet. Jedem L5d1-Tier wurden drei präparierte Futterwürfel über einen Zeitraum von 15 h angeboten.

3.14.3 Injektion von lebenden *E. coli* K12

Frische Übernachtskulturen von *E. coli* K12 in Standard I Medium wurden wie unter Abschnitt 3.14.1 beschrieben gewaschen. Die Bakterien wurden in Saline (155 mM NaCl) auf 2×10^8 Zellen/ml eingestellt. L5d1 Raupen wurden 2×10^6 lebenden *E. coli* K12 pro 1 g Körpergewicht in das Hämocoel injiziert. Die Injektion erfolgte immer ventrolateral links an der Segmentgrenze zwischen den Abdominalsegmenten fünf und sechs. Als Kontrolle wurden Tiere des gleichen Stadiums mit dem entsprechenden Volumen (10 µl pro g Körpergewicht) Saline injiziert.

3.14.4 Bestimmung der Wachstumsrate

Um die Zunahme an Körpergewicht innerhalb eines bestimmten Zeitraums (15 h) wiederzugeben, wurde diese als Wachstumsrate angegeben. Diese wurde über folgende Formel kalkuliert:

$$\text{Wachstumsrate} = (\text{Körpergewicht}_{t_1} - \text{Körpergewicht}_{t_0}) \times \text{Körpergewicht}_{t_0}^{-1}.$$

3.14.5 Bestimmung der lytischen Aktivität der Hämolymphe

Hämolympheproben der Versuchstiere wurden stets bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der Lysozymaktivität wurden 9 cm Petrischalen mit 7 ml *Micrococcus luteus*-Agar (0,5 % (w/v) *M. luteus*, lyophilisiert, 1 % (w/v) Oxoid Agar, in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5) versehen, 4 mm Löcher ausgestanzt und 5 µl Hämolymphe zugegeben. Zur Eichung wurde Hühnereiweißlysozym (HEWL) in folgenden Konzentrationen verwendet: 10 µg/ml, 25 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1 mg/µl, 2500 mg/ml, 5 mg/ml, 7,5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml. Die Platten wurden 18 h bei 37 °C inkubiert.

Die Durchmesser der lysierten (klaren) Höfe wurden vermessen und anhand der Eichproben die Lysozymaktivität der Hämolympheproben in Hühnereiweißlysozymäquivalent (µg HEWL/ml) bestimmt.

3.14.6 Bestimmung der anti-*E. coli* K12 D31-Aktivität der Hämolymphe

Für die Bestimmung der anti-*E. coli* K12 D31-Aktivität wurden von jedem Versuchstier 5 µl Hämolymphe jeweils in ein 4 mm Loch in *E. coli* K12 D31-Diffusionsagar (9 cm Petrischalen mit 7 ml *E. coli* K12-Agar, d. h. ca. 1×10^5 lebende *E. coli* K12 D31 in Wachstumsphase pro ml 1 % (w/v) Oxoid Agar in Standard I Nährmedium, pH 6,5) gegeben. Zur Eichung wurde Gentamicinsulfat in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml. Nach 18 h Inkubation bei 37 °C wurden die Hemmhöfe vermessen. Die anti-*E. coli*-Aktivität der Hämolymphe wurde in Gentamicinsulfatäquivalent (µg Gentamicinsulfat/ml) bestimmt.

3.14.7 Injektion von abgetöteten FITC-markierten *E. coli* K12 D31

FITC-markierte *E. coli* K12 D31 wurden in MS⁻ auf 2×10^9 Zellen pro ml verdünnt. 2×10^7 FITC-markierte tote *E. coli* K12 D31 pro Gramm Körpergewicht wurden dorsolateral in den Abdomen von L5d1-Larven in das Hämocoel injiziert.

3.14.8 Nachweis der Phagozytosekompetenz des hämatopoetischen Organs *in vivo*

Die hämatopoetischen Organe von drei FITC-*E. coli* K12 D31-injizierten Tieren wurden nach 16 h Inkubation bei Raumtemperatur wie in Abschnitt 3.5 beschrieben entnommen, in TBS eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch und lichtmikroskopisch untersucht. Dabei wurden die Zellen des hämatopoetischen Organs auf Vorhandensein von fluoreszierenden Einschlüssen und melanisierte Bereiche hin untersucht.

3.15 Molekularbiologische Methoden

3.15.1 Suche nach und Identifizierung von bestimmten Genen bzw. Genprodukten bei *Manduca sexta*

Die Auswahl bestimmter Genprodukte zur Charakterisierung der Immunkompetenz von Zellen des hämatopoetischen Organs wurde nach folgenden Überlegungen durchgeführt:

1. Welche Gene werden in Antwort auf Immunstimuli besonders bei *M. sexta* verstärkt exprimiert?
2. Welche Gene spielen bei der Differenzierung oder Identifikation spezieller Hämozytentypen bei *M. sexta* oder anderen Taxa eine Rolle?
3. Welche Gene werden in hämatopoetischen Geweben anderer Spezies exprimiert und können ähnliche Sequenzen bei *M. sexta* in Datenbanken gefunden werden?

3.15.1.1 Bekannte immunrelevante Gene von *Manduca sexta*

Gene, die in Antwort auf Immunstimuli verstärkt exprimiert werden, wurden durch Literaturrecherche bestimmt und eine Auswahl an *Pattern recognition proteins* (PRPs) und Effektoren getroffen. Als PRPs wurden Immulectin-3 (IML-3, Yu *et al.*, 2005) und *Peptidoglycan recognition receptor 1* (PGRP-1, Yu *et al.*, 2002) ausgewählt, als Effektormolekül Lysozym (MULNIX und DUNN, 1994).

Scolexin A (ScoA, syn. M13, RUPP und SPENCE, 1985; KYRIAKIDES *et al.*, 1995) ist ein als Antwort auf Immunstimulation gebildetes Protein, dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist und sowohl eine PRP-Funktion als auch eine Funktion als Effektor innehaben könnte. Die Aminosäure- und Nukleotidsequenzen wurden Veröffentlichungen und der NCBI-Datenbank (GenBank) entnommen, Primer abgeleitet und die Veränderungen der mRNA-Synthese in Antwort auf Immunstimulation mittels *real-time* qPCR bestimmt. Für PGRP-1 und Lysozym wurden außerdem RNA-*in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt um die räumliche Verteilung der Transkripte nachzuweisen.

3.15.1.2 Auswahl bisher nicht in *Manduca sexta* beschriebener Gene anderer Taxa

Gene, die in anderen Spezies eine Rolle bei der Differenzierung von Hämocyten spielen und/oder in hämatopoetischen Regionen in spezifischen Bereichen exprimiert werden, wurden durch Literaturrecherche bestimmt. Die Aminosäuresequenz wurde den Publikationen oder etablierten Datenbanken (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; FlyBase, <http://www.flybase.org/>, ATRILL *et al.*, 2016; MCQUILTON *et al.*, 2012) entnommen und für die Suche nach ähnlichen Genen in *M. sexta* verwendet.

3.15.1.3 Bestimmung der Sequenzähnlichkeit zu Genen aus anderen Taxa

Mit den artfremden, in Hämocyten und/oder hämatopoetischen Geweben exprimierten und bisher nicht für *M. sexta* beschriebenen Aminosäuresequenzen wurde über *basic local alignment search tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1997) eine Suche gegen die auf Manduca Base (<http://agripestbase.org/manduca/>) hinterlegten Datenbanken (OGS2_20140407_proteins und Msex05162011.genome.except-5small-scaf.maker-2.25.revised-OGS-June2012.proteins) durchgeführt. Die verwendete Substitutionsmatrix war BLOSUM62 (*Blocks Substitution Matrix*; HENIKOFF und HENIKOFF, 1992). Diese ist für relativ nah verwandte Sequenzen (Identität > 62 %) optimiert, ist jedoch auch für weniger nah verwandte Sequenzen anwendbar.

Für die Treffer der BLAST-Anfrage auf Manduca Base wurden BLAST-Analysen gegen alle Taxa der auf NCBI hinterlegten Datenbanken durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine ungefilterte BLAST-Anfrage (Abgefragte Datensätze: alle nicht-redundanten GenBank CDS Translationen, PDB, SwissProt, PIR und PRF) durchgeführt sowie eine SmartBLAST-Anfrage, die v. a. gut charakterisierte Modellorganismen umfasst.

Als positives Resultat der Anfragen galt für diese Arbeit:

1. der Fund einer signifikant ähnlichen Sequenz auf Manduca Base und
2. die Bestätigung der Ähnlichkeit durch Anfrage über NCBI-BLAST.

Als nicht bindende Regel galt, dass eine Aminosäuresequenzidentität von > 25 % und ein E-Wert von $< 1 \times 10^{-3}$ ein gutes Indiz für eine mögliche Homologie oder konvergente Funktion zweier Sequenzen ist. Für die identifizierten Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu Genen anderer Taxa wurde die korrespondierende Nukleotidsequenz aus den auf Manduca Base hinterlegten Datensätzen OGS2_20140407_transcripts.fa bzw. Msex05162011.genome.except-5small-scaf.maker-2.25.revised-OGS-June2012.transcripts ermittelt.

3.15.2 Analyse der Übereinstimmung zwischen verschiedenen Polypeptidsequenzen

3.15.2.1 Multiple Sequenzalignments

Von den ermittelten Polypeptiden wurden multiple Sequenzalignments angefertigt. Hierzu wurde der ClustalW Algorithmus (LARKIN *et al.*, 2007) über den Onlineservice ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) oder über die *Standalone*-Software ClustalX 2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2>) angewendet, sowie der proprietäre Algorithmus „*high accuracy*“ des CLC-Sequence Viewers Version 7.6.1 (<http://clcbio.com>). Die grafische Darstellung gibt den Grad der Konservierung nach folgendem Schema (Tabelle 3.3) an, wobei die Aminosäure an der jeweiligen Position auf die Kriterien der Übereinstimmung hin untersucht wird.

Tabelle 3.3: Farbkodierung für multiple Sequenzalignments mit ClustalW oder ClustalX.

Aminosäurerest	Farbe	Übereinstimmung [%] Aminosäuregruppe
A, I, L, M, F, W, V	Blau	≥ 60 % WLVIAMFCYHP
C	Blau	≥ 60 % WLVIAMFCYHP
R, K	Rot	≥ 60 % KR; ≥ 80 % K, R, Q
N	Grün	≥ 50 % N; ≥ 85 % N, Y
Q	Grün	≥ 60 % KR; ≥ 50 % QE; ≥ 85 % Q, E, R, K
S, T	Grün	≥ 60 % WLVIAMFCYHP; ≥ 50 TS; ≥ 85 % S, T
C	Rosa	100 % C
E	Magenta	≥ 60 % KR; ≥ 50 % QE; ≥ 85 % Q, E, K, R
D	Magenta	≥ 60 % KR; ≥ 85 % K, R, Q; ≥ 50 % ED
G	Orange	≥ 0 % G
H, Y	Cyan-Blau	≥ 60 % WLVIAMFCYHP; ≥ 85 % W, Y, A, C, P, Q, F, H, I, L, M, V
P	Gelb	≥ 0 % P

Die jeweilige Position muss zu mehr als X % ($\geq X\%$) durch die angegebenen Aminosäuren besetzt sein. Durch Komma getrennte Aminosäuren bedeutet, dass die Aminosäure mit einer dieser Aminosäuren zu X % übereinstimmen muss, Aminosäuregruppen, die nicht durch Komma getrennt sind stellen Gruppen dar, eine Übereinstimmung mit einer beliebigen Aminosäure der Gruppe $\geq X\%$ an der jeweiligen Position führt zu positivem Ergebnis.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen konservierten Position finden sich in diesem Farbcode ebenfalls: Blau = hydrophob, Magenta = negativ geladen, Rot = positiv geladen, Grün = polar, Cyan-Blau = aromatisch.

Die Höhe des Balkens unter der jeweiligen Position gibt den Grad der Konservierung an.

3.15.2.2 Erstellen phylogenetischer Stammbäume

Für die SmartBLAST und BLAST-Ergebnisse wurden über NCBI *Tree Viewer* 1.7.7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/treeviewer/>) phylogenetische Stammbäume (*Distance tree of results*) erstellt. Als Berechnungsmethode wurde „*Fast Minimum Evolution*“ verwendet, mit maximaler Sequenzdifferenz = 0,85, die Distanzberechnung erfolgte nach GRISHIN (1997). Diese geben grafisch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zu Polypeptiden anderer Spezies im phylogenetischen Kontext an. Die Anzahl an Aminosäuresubstitutionen pro Aminosäure wurde anhand der Astlänge dargestellt, der Messbalken gibt die errechnete Anzahl pro Längeneinheit an.

3.15.2.3 In-silico-Identifizierung konservierter Proteindomänen

Zur Absicherung der Identität der ermittelten Gene in *M. sexta* wurden die Eigenschaften der vorhergesagten Polypeptide über verschiedene Programme ermittelt. Eingesetzt wurden die *InterPro*

protein domain search (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; MITCHELL *et al.*, 2015) und die *NCBI conserved domain databank* (CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>; MARCHLER-BAUER *et al.*, 2012). Beide Vorhersageprogramme suchen konservierte Proteindomänen aus Datenbanken und ermöglichen so eine Vorhersage der Organisation des Polypeptids sowie möglicher biologischer Funktionen.

Des Weiteren wurden für die vorhergesagten *M. sexta* Polypeptidsequenzen die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer Transmembrandomäne über die Analysesoftware TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; KROGH *et al.*, 2001) bestimmt.

3.15.3 Isolierung genomischer DNA

Genomische *M. sexta* DNA wurde aus L5 Larven gewonnen. Kleine Gewebestücke (Muskeln, Epidermis, Tracheen) wurden mittels einer Methode modifiziert nach STELLER und PIROTTA (1986) lysiert und die DNA gefällt. Hierzu wurden 16 µl DNA-Extraktionspuffer zu je 1 mg Gewebe gegeben, diese Mischung mit einem Pistill verrieben und bei 65 °C für 20 min inkubiert. Dann wurden pro 100 µl Lysat 14 µl 8 M Kaliumacetat zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde bei 21.400 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Vorgang wiederholt. Zu je 100 µl Überstand wurden 70 µl Isopropanol (99 %) zugegeben, das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert (21.400 g für 15 min bei 4 °C,) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol überspült, getrocknet und in HyClone™ Wasser auf 1 µg DNA pro µl verdünnt.

3.15.4 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese für RT-PCR und *real-time* qPCR

Gesamt-RNA wurde jeweils aus Fettkörper, hämatopoetischem Organ, Mitteldarmepithel und Hämocyten mit einem Qiagen RNeasy® Mini RNA Isolationskit gewonnen. Dazu wurden pro Behandlung Gewebe aus 4 Tieren (Kohorte) vor der RNA-Gewinnung vereint. Die Zielgewebe wurden nach standardisierten Methoden aufgearbeitet: gewaschene Hämocyten wurden wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben gewonnen, hämatopoetische Organe wurden wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben präpariert, die Flügelanlage wurde entfernt und die Tracheen, soweit möglich, entfernt. Fettkörperproben wurden ventrolateral in Höhe des Thoraxsegments 3, des Abdominalsegments 4 oder 5 und des Abdominalsegments 6 oder 7 entnommen. Der Mitteldarm wurde geöffnet, die peritrophische Membran und der Darminhalt entnommen und das Darmepithel mit eiskaltem MS⁻

gewaschen. Die Gewebeproben wurden in Höhe der Segmente Abdominalsegment 1; Abdominalsegment 4 bis 5 und Abdominalsegment 6 entnommen. Alle Gewebeproben wurden zweimal für 3 min mit eiskaltem MS⁻ gewaschen und auf Eis gesammelt.

Für jede Behandlung und die dazugehörige Kontrolle wurden drei Kohorten an unterschiedlichen Zeitpunkten präpariert. Die Integrität der RNA-Isolate wurde mittels denaturierender RNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.15.5.2) ermittelt. Der Gesamt-RNA-Gehalt wurde mit einem NanoDrop™ 2000c Fotospektrometer (Thermo Scientific) bestimmt.

Vor der reversen Transkription wurden die RNA-Isolate durch eine Inkubation mit 0,1 U / µl DNase I RNase *free* pro Ansatz (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) für 15 min bei 37 °C von evtl. koelulierter genomischer DNA (gDNA) befreit und die DNase nach Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 5 mM durch Erhitzen auf 75 °C für 10 min inaktiviert. Für die reverse Transkriptase-Reaktion wurden 550 ng Gesamt-RNA mit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Life Technologies) und *anchored oligo(dT)₂₀* Primern nach Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. Pro Ansatz wurde ein Aliquot ohne Zugabe von reverser Transkriptase angefertigt, um den Verdau der genomischen DNA zu überprüfen. Eine Kontrolle möglicher gDNA-Kontaminationen wurde über PCR (siehe Abschnitt 3.15.5) mit Primern für das *housekeeping*-Gen EF1A und je 1 µl Template (cDNA oder Kontrollansatz) durchgeführt. Das Ausbleiben eines PCR-Produkts im Kontrollansatz bestätigt die Abwesenheit von gDNA. Nur gDNA-freie cDNA wurde für die weiteren Analysen eingesetzt.

3.15.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation gewünschter DNA-Produkte wurde die MyTaq™ DNA-Polymerase und Reaktionspuffer von Bioline verwendet. Pro 25 µl PCR-Ansatz wurde 1 U DNA-Polymerase, 5 pmol Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 5 nmol je dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) verwendet. Die Standard-PCR-Bedingungen waren:

1. 95 °C, 2 min	initiale Denaturierung
2. 95 °C, 30 s	Denaturierung
3. X °C (je nach Primer), 1 min	<i>Primer annealing</i>
4. 72 °C, 50 s	Elongation
5. 72 °C, 10 min	Finale Elongation

Schritte 2-4 wurden zyklisch wiederholt, je nach Ansatz 34 bis 37 Zyklen.

Der Hersteller empfiehlt Elongationszeiten von 10 bis 30 s für Amplifikate von 1 kb bzw. 5 kb und kann je nach Komplexität des Templates verlängert werden. Eine Elongationszeit von 50 s wurde eingesetzt, da sich dies als geeignet für alle amplifizierten Produkte erwies.

3.15.5.1 Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung von PCR-Produkten

Zur Auftrennung der PCR-Produkte im elektrischen Feld wurde ein 1 %iges Agarose-TAE-Gel mit 1,4 µM Acridinorange und TAE-Puffer eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit DNA-Auftragspuffer gemischt. Für RT-PCR-Analysen wurden 20 µl des PCR-Ansatzes mit 2,2 µl DNA-Auftragspuffer gemischt bzw. 5 µl PCR-Produkt mit 0,55 µl DNA-Auftragspuffer gemischt und jeweils die gesamte Menge aufgetragen. Für andere Standardverfahren wurden variable Mengen an PCR-Produkt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 115 V. Zur Visualisierung und Dokumentation wurde das Geldokumentationssystem Lourmat (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) verwendet. Die DNA-Banden fluoreszierten aufgrund des angelagerten Acridinoranges. Als Größenmarker kamen die Marker NEB 1 kb DNA-Ladder (New England Biolabs), NEB 100 bp DNA-Ladder (New England Biolabs) sowie GeneCraft® 100 bp DNA-Ladder (Ares Bioscience GmbH) zum Einsatz.

3.15.5.2 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA wurde nach der Methode von MASEK *et al.* (2005) durchgeführt. Die RNA-Proben (Gesamt-RNA oder RNA-Sonden) wurden mit RNA-Probenpuffer 1:10 (v/v) verdünnt, für 10 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Visualisierung erfolgte wie bei den DNA-Proben (siehe Abschnitt 3.15.5.1).

3.15.6 mRNA-Nachweis mittels RT-PCR

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration ausgewählter Gene in bestimmten Geweben wurde eine Standard-PCR (siehe Abschnitt 3.15.5) durchgeführt. Als Template wurden definierte Mengen cDNA verwendet (üblicherweise 10 ng oder 12,5 ng) und spezifische Primer für das ausgewählte Zielgen eingesetzt. Bei jeder PCR wurden als interne Kontrolle für jede Probe eine PCR mit cDNA aus 2,5 ng Gesamt-RNA als Template und den Primern für das *housekeeping*-Gen EF1A eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden als Mastermix angesetzt, um mögliche Pipettierfehler zu minimieren. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert wie unter Abschnitt

3.15.5.1 beschrieben. Unterschiede der mRNA-Konzentration verschiedener Proben sind durch unterschiedlich starke Banden im Gel zu erkennen.

3.15.7 **Real-time qPCR**

Real-time qPCR Analysen wurden durchgeführt, um Veränderungen der mRNA-Menge der immunrelevanten Proteine Immulectin-3, Scolexin A, PGRP-1A und Lysozym bei immunstimulierten Tieren zu bestimmen. Jede Reaktion wurde als 25 µl Ansatz angesetzt. Dazu wurden 12,5 µl iQ™ Supermix (Bio-Rad), je 1 µl 10 mM Vorwärts- und Rückwärts-Primer (siehe Tabelle 3.4) und 4 µl cDNA (1:20 verdünnt) gemischt. Alle Ansätze wurden als Duplikat angesetzt. Ein Duplikat wurde für jedes spezifische Primerpaar bei jeder Analyse ohne cDNA-Template angesetzt und analysiert. Dies diente der internen Kontrolle der Reaktionsqualität und Reinheit des Analyseansatzes. Die PCR und die Ct- und Schmelzkurven-Analyse wurde mit einem iQ5 *real time* PCR *detection system* (Bio-Rad) durchgeführt. Die Amplifikation unter folgenden Bedingungen statt:

1. 95 °C, 3 min	initiale Denaturierung
2. 95 °C, 30 s	Denaturierung
3. 57 °C, 40 s	<i>primer annealing</i>
4. 72 °C, 70 s	Elongation

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40-mal zyklisch wiederholt.

Es folgte eine graduelle Erhöhung der Temperatur bis 95 °C. Dadurch wurde die Schmelzkurve der amplifizierten Fragmente ermittelt. Dies diente der Bestätigung, dass nur ein Produkt gebildet wurde und somit die Reaktion spezifisch war.

Die relative Konzentration der Ziel-mRNA wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001) ermittelt. Zur Normalisierung der Expression der untersuchten Gene wurde die mRNA zweier Referenzgene, *ribosomales Protein S3* (RPS3) und Elongationsfaktor 1- α (EF1A), verwendet. Deren stabile Expression wurde zuvor für jedes Gewebe überprüft. Die relative mRNA-Expression wurde als Mehrfaches der Expression der jeweiligen Kontrolltiere angegeben. Es handelt sich somit bei der verwendeten Methode um eine relative (semiquantitative) Konzentrationsbestimmung der mRNA. Für den Ansatz „*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefüttert“ dienten unbehandelte L5d2-Larven als Kontrolle. Für den Ansatz „*E. coli* K12 injiziert“ wurden L5d1-Larven mit der gleichen Menge Saline ohne Bakterien injiziert (Scheininjektion) und nach 15 h (= L5d2) präpariert. Die Ergebnisse der *real-*

time qPCR-Analysen wurden als Durchschnitt ($\pm$ Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3.15.8 PCR-Primer

Alle genspezifischen PCR-Primer, die für *real-time* qPCR, RT-PCR und die Herstellung von RNA-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung eingesetzt wurden, wurden mit dem Programm primer3 Version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>; UTERGASSER *et al.*, 2012; KORESSAAR und REMM, 2007) ermittelt.

Tabelle 3.4: Primer für *real-time* PCR, RT-PCR und Sondensynthese.

Gen	Vorwärts-Primer 5'-3'	Rückwärts-Primer 5'-3'	GenBank Nummer	Verwendung
β GRP-1	GATGGAGAGCCTTTAGAC	GTTCCAGGGTTCGTTGC	AF177982.1	RT-PCR
Msex007423-RA (<i>croquemort-like</i>)	TCGGATATTGCACGTACATGATAC	AGGACTGTCACGCCTACTATAAGTA	NA	RT-PCR, ISH
Msex2.07580-RB (<i>eater-like</i>)	TTTAAGTCCTGGTAATTGTCAC	TTGTTAGGTTCTATACACGTTT	NA	RT-PCR, ISH
Msex2.06039-RA (<i>heixuedian-like</i>)	TGGAAGAAGATATTGTAGTCGA	GTCAATCTCTAAGTCTCTTGTC	NA	RT-PCR, ISH
Msex2.09018-RA / Msex010330-RA (<i>peroxidasin-like</i>)	AGATAACGCTGAATTTATGTGTTCC	ATCTGGTCATTCTGTAGAGATCATG	NA	RT-PCR, ISH
Prophenoloxidase Untereinheit 2 / Msex2.11367-RI	GATGTCCTAATGAGTGTAAGT	CAATATAACGTTACCAGTAGCA	Q25519.3	RT-PCR, ISH
Immulectin-3	GAAGAAGCTGGCTATGCGAA	TGCGCACTACACTAATGACG	AY768811.1	<i>real-time</i>
Scolexin A	ATACGCAAGTTCGGAGTTTCG	CAGACGGGTCCTATGGAGAA	AF087004.1	<i>real-time</i>
PGRP-1A	ATCTTCGTTCTGATTGGCG	CAGCAGGGCTTTGATAGCAT	AF413068.1	<i>real-time</i>
PGRP-1A *	<u>GAAAATTTAGGTGACACTATAGAAG</u> <u>NG</u> ACCTGGCTGCGATACCGACGAC (SP6 Promotor)	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGA</u> <u>GA</u> GCGATGGCCACGACTTTGTAAT (T7 Promotor)	AF413068.1	ISH
Lysozym	GTGGAGAATGAGAGCAGCAG	GTACCACGCTTGGAACCTGT	S71028	<i>real-time</i>
Lysozym *	<u>GAAAATTTAGGTGACACTATAGAAG</u> <u>NG</u> TCTTGTGGCCGACGACTTCTC (SP6 Promotor)	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGA</u> <u>GA</u> TTGTGGCGTTTGTATATCTTCTTG (T7 Promotor)	S71028	ISH
RP S3	GTCGGTGACGGAGTTTCAA	CTTTCTCAGCGTACAGCTCC	U12708.1	<i>real-time</i>
EF1A	CTTCACAGCTCAGGTCATCG	GAAGGACTCCACACACATGG	AF234571.1	<i>real-time</i> , RT-PCR
SP6	<u>CATTTAGGTGACACTATAG</u>			ISH, Kolonie-PCR, Seq.
T7	<u>TAATACGACTAATACGACTCACTATA</u> <u>GGG</u>			ISH, Kolonie-PCR, Seq.

* = Primer beinhalten die SP6 bzw. T7 Promotor-Sequenz (unterstrichen) für die *in vitro* RNA-Transkription. Rot markiert = zusätzlich zur Ziel-mRNA-antisense-Sequenz eingebaute Nukleotide. Abkürzungen: ISH = Primer für die Synthese von RNA-Sonden, *real-time* = Primer für *real-time*-qPCR, RT-PCR = Primer für Reverse Transkriptase-PCR, Seq. = Primer für DNA-Sequenzierung.

3.15.9 Klonieren von DNA-Sequenzen

3.15.9.1 Ligieren von DNA-Sequenzen in pCR™ II Vektoren

Für die molekulare Klonierung wurde das *TA Cloning® Kits, Dual Promotor with pCR™ II Vector* von Thermo Fisher Scientific eingesetzt. TA-Klonierung bezeichnet das Einfügen eines doppelsträngigen DNA-Fragments mit 3'-poly-Adenin-Überhängen (*sticky ends*) in einen Plasmidvektor mit 3'-poly-Thymidin-Überhängen an den offenen Enden des linearisierten Plasmids. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Banden mit einem *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Das gereinigte DNA-Fragment wurde in einen pCR™ II-Vektor mittels T4-DNA-Ligase (ExpressLink™ T4-Ligase; beides Bestandteile des *TA Cloning® Kits, Dual Promotor with pCR™ II Vector*; Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangabe ligiert. Dabei wurde das PCR-Produkt im Überschuss zu der Reaktionslösung zugegeben (Verhältnis von 3 mol PCR-Produkt : 1 mol pCR™ II-Vektor). Die Inkubationsschritte entsprachen dem Herstellerprotokoll.

3.15.9.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* K12 5α

Chemisch kompetente *E. coli* (NEB 5-alpha, New England Biolabs) wurden modifiziert nach Herstellerprotokoll mit den ligierten pCR™ II-Vektoren transformiert. Die Bakterien wurden aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und für 10 min auf Eis aufgetaut. Es wurden 25 µl Bakteriensuspension mit 50 ng ligiertem pCR™ II-Vektor vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für exakt 70 s (abweichend von 30 s Hitzeschock wie im Herstellerprotokoll angegeben) wurden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert, 125 µl SOC-Medium (nach HANAHAN, 1983; bezogen von New England Biolabs) zugegeben und bei 250 U/min auf einem Rotationsschüttler für 45 min bei 37 °C inkubiert. Auf vorgewärmten (37 °C) Ampicillin-haltigen LB-Miller-Selektivagar-Platten wurden je einmal 50 µl und einmal 100 µl Bakterien-suspension ausgestrichen. Der pCR™ II-Vektor trägt ein Gen für Ampicillin-Resistenz (Abbildung 3.1). Dadurch können transformierte *E. coli* in Anwesenheit von Ampicillin wachsen, während das Wachstum nicht-transformierter *E. coli* unterdrückt wird.

3.15.9.3 Verwendeter DNA-Vektor

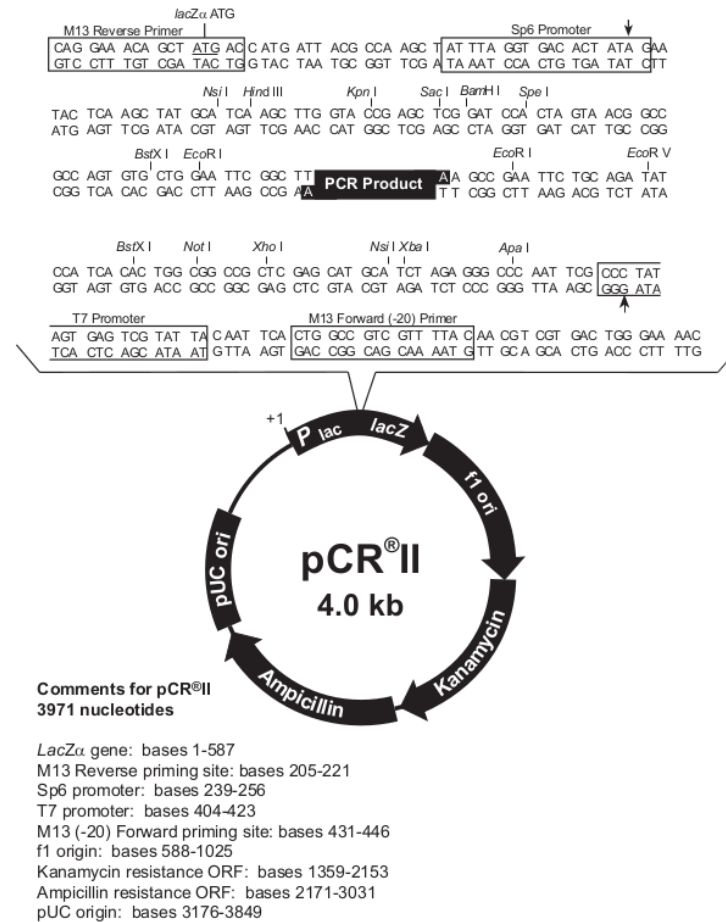


Abbildung 3.1: Vektorkarte des pCR[™] II-Plasmids. Quelle: Thermo Fisher Scientific Inc., https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcrII_map.pdf, 01.07.2016.

3.15.9.4 Kolonie-PCR und Überprüfung der Transformation

Nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden Einzelkolonien der *E. coli* 5-alpha auf erfolgreiche Transformation getestet. Dazu wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern aufgenommen, auf eine frische LB-Selektivagar-Platte (Ampicillin-haltig) ausgestrichen und die restlichen Bakterien als Template für eine Standard-PCR-Reaktion (siehe Abschnitt 3.15.5) verwendet. Dabei wurden SP6-Primer und T7-Primer eingesetzt. PCR-Produkte der zu erwartenden Größe (Länge des klonierten Produkts plus Länge der *multiple cloning site*) waren ein Indiz für die erfolgreiche Klonierung und Transformation.

3.15.9.5 Plasmidaufreinigung

Die positiv auf Transformation getesteten *E. coli* 5-alpha wurden in LB-Selektivmedium (LB-Miller-Medium mit Ampicillin) auf einem Rotationsschüttler bei 250 U/min über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Plasmide wurden mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangabe aufgereinigt.

3.15.10 DNA-Sequenzierung

Um die Identität der klonierten Nukleotidsequenzen oder PCR-Produkte zu bestätigen wurden frische PCR-Produkte unter Standardbedingungen (3.15.5) hergestellt. Dazu wurden entweder die genspezifischen Primer oder der SP6-Primer und der T7-Primer für die PCR mit Plasmidtemplate eingesetzt (Tabelle 3.4). Die PCR-Produkte wurden nach der Auftrennung über Agarosegelelektrophorese mit einem *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) oder dem *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerprotokoll aus dem Gel aufgereinigt und von SeqLab (Göttingen, Deutschland) sequenziert.

3.15.11 RNA-in-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-RNA-in-situ-Hybridisierung

3.15.11.1 Allgemeine Arbeitsvorbereitungen

Alle Arbeitsschritte bis zur Stringenzwaschung wurden mit RNase freien Materialien und Lösungen in einer RNase freien Sterilbank durchgeführt.

Hitzestabile Materialien wurden durch Backen bei 200 °C für 4 h, hitzelabile Materialien die nicht von Herstellerseite her zertifiziert RNase-frei waren wurden mit RNase Away® von möglichen RNase Kontaminationen befreit. Um Verunreinigungen mit RNAsen vorzubeugen, wurde zu den Lösungen 0,1 % (v/v) DEPC zugegeben, diese über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert bzw. mit DEPC behandeltem Wasser und zertifiziert RNase freien Chemikalien angesetzt.

3.15.11.2 Herstellen Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Die RNA-Sonden zur Lysozym- bzw. PGRP-1A-mRNA-Detektion wurden mit dem *DIG RNA labelling Kit* (SP6 bzw. T7) (Hoffmann-La Roche) nach dem Herstellerprotokoll hergestellt. Dazu wurden die

in Tabelle 3.4 genannten spezifischen Primer verwendet, die die SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase-Promotorsequenz beinhalten, um ein PCR-Produkt aus Fettkörper-cDNA zu erstellen. Dieses diente als Template für die *in-vitro*-Transkription der DIG-markierten RNA Sonden.

Alle weiteren RNA-Sonden wurden mit dem *MegaScript® SP6 Transcription Kit* (Life Technologies) bzw. dem *MegaScript® T7 Transcription Kit* (Life Technologies) und Digoxigenin-11-UTP (Hoffmann-La Roche) synthetisiert. Hierfür wurde ein PCR-Produkt aus Plasmid-DNA und SP6- und T7-Primern unter Standard-PCR-Bedingungen hergestellt und als *Template* für die *in-vitro*-RNA-Transkription verwendet. Die Zusammensetzung jedes Syntheseansatzes war wie folgt:

	MegaScript® T7	MegaScript® SP6
PCR-Produkt mit T7- bzw. SP6-Promotor	50 ng/μl	50 ng/μl
10 x Reaktionspuffer	1:10 (v/v)	1:10 (v/v)
ATP	7,5 mM	5,0 mM
CTP	7,5 mM	5,0 mM
GTP	7,5 mM	5,0 mM
UTP	5,1 mM	3,4 mM
Digoxigenin-11-UTP	2,1 mM	2,1 mM
RNA-Polymerase	1:10 (v/v)	1:10 (v/v)

Die RNA-Synthese wurde bei 37 °C (T7) bzw. 40 °C (SP6) für 8 h durchgeführt. Es folgte ein DNA-Verdau mit 0,2 U/μl TurboDNase (Thermo Fisher Scientific) für 15 min bei 37 °C. Die RNA-Sonden wurden mittels LiCl-Fällung (2,5 M LiCl in 75 μl Gesamtvolumen) über Nacht bei -70 °C präzipitiert, pelletiert (14.000 g, 2 min bei Raumtemperatur), das Pellet mit 70 % EtOH (RNase-frei) gewaschen, luftgetrocknet und in HyClone™-Wasser gelöst. Die Überprüfung auf Qualität, Menge und Digoxigenin-11-UTP-Inkorporation erfolgte über denaturierender Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.15.5.2) und Dot-Blot mit anti-Digoxigenin-AP Antikörper. Für die Dot-Blot-Analyse wurden je 1 μl der seriell verdünnten RNA-Sonde (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) auf Amersham Hybond-N+ Nylonmembran (GE Healthcare Life Sciences) gegeben und die RNA auf der Membran durch 30 min Bestrahlung mit UV-Licht fixiert. Danach wurde die Membran mehrfach mit PBS gewaschen, für 1 h bei RT mit Boehringer-Blockierlösung blockiert und über Nacht mit anti-Digoxigenin AP-Antikörper (1:1000 in Boehringer-Blockierlösung) inkubiert. Die weiteren Waschschrte und der AP-Nachweis mit NBT und BCIP erfolgten wie unter Abschnitt 3.13.3 für Western Blots beschrieben. Die RNA-Sonden wurden auf 50 ng/μl in Hybridisierungspuffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.15.11.3 RNA-*in-situ*-Hybridisierung von Hämozyten

Hämozytenmonolayer wurden wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben hergestellt, mit der Besonderheit, dass bei 200 °C gebackene runde Deckgläser als Substrat für die Zellen benutzt wurden und ausschließlich mit RNase freien Materialien und Lösungen gearbeitet wurde.

Nach dem Fixieren und Waschen mit PBS wurden die Hämozyten mit aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (30 % bis 90 % EtOH in PBS, in 10 % Schritten, 96 % EtOH), in absteigender Ethanolreihe (96 %, 90 %, 80 %, 70 % EtOH in DEPC-Wasser) rehydriert und bei 4 °C gelagert.

Für die eigentliche *in-situ*-Hybridisierung wurden die Hämozytenmonolayer weiter rehydriert mit 50 % EtOH, 30 % EtOH, PBS und PBS mit 0,1 % (v/v) Tween® 20 (PTW), je Schritt für 5 min. Danach folgte die Acetylierung positiv geladener Aminogruppen durch Inkubation mit 1 % (v/v) Triethanolamin, 0,3 % (v/v) Essigsäureanhydrid in PTW für 5 min. Die Hämozyten wurden zweimal für 5 min mit PTW gewaschen. Darauf folgte eine zweite Fixierung für 5 min mit 3,5 % PFA-MS⁻ und vier Waschschrte mit PTW für je 5 min. Die Monolayer wurden zweimal kurz mit Hybridisierungspuffer gespült, in Hybridisierungspuffer für 2 h bei 56 °C in einer feuchten Kammer erwärmt. Die RNA-Sonden wurden vor dem Einsatz bei 85 °C für 10 min inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Darauf folgte die RNA-Hybridisierung mit den spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonden über Nacht bei 56 °C (für den enzymvermittelten Nachweis wurden ca. 1 ng/μl, für fluoreszenzvermittelten Nachweis ca. 5 ng/μl Sondenkonzentration verwendet). Stringenzwaschschrte wurden bei 56 °C mit auf 56 °C temperierten Puffern durchgeführt. Dazu wurden die Monolayer einmal für 1 min und einmal für 5 min mit Hybridisierungspuffer gewaschen, gefolgt von fünfminütigen Waschschrten mit 25 % 2x SSC in Hybridisierungspuffer, 50 % 2x SSC in Hybridisierungspuffer, 75 % 2x SSC in Hybridisierungspuffer, 100 % 2x SSC, zweimal 0,05 x SSC, 25 % PTW in 0,05 x SSC, 50 % PTW in 0,05 x SSC, 75 % PTW in 0,05 x SSC.

Nach drei Waschschrten für je 5 min bei Raumtemperatur mit PTW folgte das Blockieren unspezifischer Bindestellen mit Boehringer Blockierlösung in Maleinsäurepuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit Schaf anti-Digoxigenin Fab-Fragment, AP konjugiert (Hoffmann-La Roche) in einer Verdünnung von 1:500 in Boehringer Blockierlösung über Nacht bei 4 °C und drei Waschschrte für je 15 min bei Raumtemperatur mit PTW.

Für den Nachweis mittels alkalischer Phosphatase Aktivität wurden die Präparate für 15 min bei Raumtemperatur mit AP-Puffer gewaschen und mit NBT und BCIP in AP-Entwicklungslösung entwickelt. Bei Erreichen der gewünschten Färbeintensität wurde die Reaktion durch mehrmaliges Spülen mit TBS gestoppt, für 10 min in 360 nM DAPI in TBS inkubiert, einmal für 5 min mit TBS gewaschen und die Objekte in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

Um die Markierung der Ziel-RNA mittels Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren, wurden die Präparate mit Esel-anti-Schaf IgG, Biotin gekoppelt (Dianova), Verdünnung 1:400 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal für 15 min mit PTW bei Raumtemperatur gewaschen. Die eigentliche Fluoreszenzmarkierung basierte auf einer Kombination der ABC-Methode (Vectastain® Elite® ABC Kit, Vector Laboratories) und der Tyramid-Signalamplifikationstechnik (TSA) mit Tyramid-Fluorescein (Renaissance® TSA™ Fluorescence System, PerkinElmer). Hierzu wurde ein Strept-avidin-HRP-Komplex (Komponenten A und B des Vectastain® Elite® ABC Kits) nach Herstellerprotokoll an den Biotin-konjugierten Sekundärantikörper gebunden. Eine Kopplung des Fluorescein-Tyramids an Tyrosinreste von Proteinen wurde enzymatisch durch die HRP unter Zugabe von Wasserstoffperoxid als Substrat vermittelt. Dazu wurden die Monolayer dreimal für 5 min mit PTW gewaschen und danach für 30 min mit Tyramid-Fluorescein (1:100 in der mitgelieferten Verdünnungslösung verdünnt) im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PTW und eine Inkubation mit 360 nM DAPI in TBS für 10 min. Nach einem Waschschrte für 5 min mit TBS wurden die Objekte in Fluoromount G® eingebettet.

3.15.11.4 RNA-in-situ-Hybridisierung von hämatopoetischen Organen

Wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben wurden hämatopoetische Organ-Flügelanlage-Komplexe präpariert, für eine Stunde mit 3,5 % PFA in MS⁻ bei Raumtemperatur fixiert, zweimal für 5 min mit PTW gewaschen und in einer aufsteigender Methanolreihe dehydriert (50 % MeOH in PTW, 66 % MeOH in PTW, zweimal 100 % MeOH; alle Schritte für 10 min bei Raumtemperatur) und in 100 % MeOH bei -20 °C gelagert. Rehydriert wurden die Organe mit absteigender Methanolreihe (66 % MeOH in PTW, 50 % MeOH in PTW, PTW; alle Schritte für 10 min bei Raumtemperatur). Es folgte eine zweite Fixierung mit 3,5 % PFA-MS⁻ für 5 min bei Raumtemperatur. Nach vier Waschschrten mit PTW für je 5 min erfolgte ein Proteinverdau mit 3 µg/ml Proteinase K in PTW für 5 min bei Raumtemperatur, gefolgt von 20 min Inkubation auf Eis. Die Proteinase K-Aktivität wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,2 % Glycin in PTW für 5 min gestoppt. Darauf folgte ein Acetylierungsschritt durch Inkubation mit 1 % Triethanolamin, 0,3 % Essigsäureanhydrid in PTW für 10 min bei Raumtemperatur, zwei Waschschrte mit PTW für 5 min und eine dritte Fixierung mit 3,5 % PFA-MS⁻ für 5 min. Nach drei Waschschrten mit PTW für 5 min wurden endogene alkalische Phosphatasen durch Erhitzen des Gewebes auf 80 °C für 10 min in PTW inaktiviert. Anschließend wurden die Organe einmal mit Hybridisierungspuffer für 1 min gespült, einmal mit Hybridisierungspuffer für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit Hybridisierungspuffer bei 56 °C für 2 h prähybridisiert. Die RNA-Sonden wurden währenddessen für 10 min auf 85 °C erwärmt, um

Sekundärstrukturen aufzulösen. Danach wurden die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden zugegeben (für ISH: ca. 1–2 ng/μl, für FISH 5 ng/μl) und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Es folgten Stringenzwaschschritte mit auf 56 °C erwärmten Puffern bei 56 °C mit Hybridisierungspuffer einmal für 1 min und einmal für 20 min. Für je 10 min wurden die Organe mit 25 % 2 x SSC in Hybridisierungspuffer, 50 % 2 x SSC in Hybridisierungspuffer, 75 % 2 x SSC in Hybridisierungspuffer jeweils bei 56 °C gewaschen. Es folgten zwei Waschschritte mit 2 x SSC für 5 min und zwei Waschschritte mit 0,05 x SSC für 20 min, jeweils bei 56 °C. Danach wurden die hämatopoetischen Organe für je 10 min bei 56 °C mit 75 % 0,05 x SSC in PTW, 50 % 0,05 x SSC in PTW, 25 % 0,05 x SSC in PTW gewaschen.

Darauf folgten drei Waschschritte mit PTW für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Das Blockieren unspezifischer Antikörperbindestellen erfolgte durch Inkubation mit Boehringer Blockierlösung in Maleinsäurepuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Nach einer Inkubation mit Schaf anti-Digoxigenin Fab-Fragment, AP konjugiert (Hoffmann-La Roche) in einer Verdünnung von 1:500 in Boehringer Blockierlösung über Nacht bei 4 °C wurden die Organe viermal mit TBS für je 15 min und zweimal mit AP-Puffer für je 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Nachweisreaktion durch Entwicklung mit AP-Entwicklungslösung (beinhaltet NBT und BCIP) wurde unter mikroskopischer Kontrolle bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde bei Erreichen der gewünschten Färbintensität durch mehrmaliges Waschen mit AP-Stopplösung unterbrochen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Organe in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt oder zur Anfertigung histologischer Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die dehydrierten Organe wurden wie unter Abschnitt 3.6.1 beschrieben in Kunstharz eingebettet und histologische Schnitte angefertigt.

3.16 Statistische Analysen und Diagramme

Die Ergebnisse der Differentiellen Zellzahlermittlung, Mitoserate und des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses wurden mit einer statistischen Analyse über die Open-Source-Software PSPP V 0.8.4 (<http://www.gnu.org/software/pspp/>) abgesichert. Die Daten wurden einem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung unterzogen. Bei Vorliegen normalverteilter Daten wurde ein *t*-Test für unabhängige Variablen durchgeführt. Bei nichterfüllen der Vorgaben für Normalverteilung wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-*U*-Test mit R Version 3.0.3 (<http://www.R-project.org>) und dem Paket *coins*, Funktion *wilcox_test*, durchgeführt. Als signifikant unterschiedlich wurden die Daten bei einem *p*-Wert von ≤ 0.05 angesehen.

Balkendiagramme und statistische Analysen für die Expressionsstudien wurden mit der GraphPad Prism® 5.0 Software (GraphPad Software, San Diego, California USA) erstellt. Die Signifikanz der Werte wurde mit einem Einstichproben-*t*-Test bestimmt. Ein *p*-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant angesehen.

Alle weiteren Balkendiagramme wurden mit Microsoft® Excel 2002 Version 10.2614.2625 erstellt, *Box-and-Whiskers*-Diagramme wurden mit R Version 3.0.3 (<http://www.R-project.org>), Funktion *boxplot*, erstellt. Dabei werden jeweils die 25 % der Daten die ober- bzw. unterhalb des Median (schwarzer Querstrich innerhalb der *box*) liegen als Kasten (*box*) dargestellt, die Kanten der *box* geben das obere bzw. untere Quartil an. Die Fehlerindikatoren (*whisker*) zeigen das 1,5-fache des Interquartilenabstands an, was als normales Streumaß angesehen wird. Kreise ober- oder unterhalb der *whisker* werden als Ausreißer betrachtet. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) wurden im Format MW $\pm$ SD als Ziffern im Diagramm angegeben.

Zusätzliche Beschriftung der Diagramme wurde mit InkScape V. 0.91 (<http://www.inkscape.org>) eingefügt.

3.17 Verwendete Chemikalien, Kits und Laborgeräte

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro Analysis* (p. A.). Für sensible Schritte bei molekularbiologischen Arbeiten wurden nur zertifiziert DNA- und RNase-freie Chemikalien (*molecular biology grade*) verwendet.

Chemikalie

N-Acetyl-D-Galactosamin
N-Acetyl-D-Glucosamin
Acridinorange
Acrylamid
Agar-Agar, bakteriologisch
Agar-Agar Kobe I
Agar, für Diffusionsplattentest (Oxoid Agar No. 1)
Agarose, für Gelelektrophorese, 2267
Aluminiumsulfat-16-Hydrat
Amidoschwarz 10 B

6-Amino-Hexansäure
Ammoniumperoxodisulfat
Amphotericin B
Ampicillin
Arachis hypogaea Lektin, Fitc konjugiert
Arachis hypogaea Lektin, Tritc konjugiert
Ascorbinsäure
Biotin
Bisacrylamid

Hersteller

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Applchem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Oxoid, Basingstoke, Vereinigtes Königreich
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Chroma Gesellschaft Schmid und Co., Stuttgart-Untertürkheim, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Applchem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Chemikalie

Blockierlösung Boehringer *blocking reagent for nucleic acid detection*
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)
Bromphenolblau
Bovines Serumalbumin Fraktion V
Casein
Chrom-III-Kaliumsulfat
Citronensäure-Monohydrat
Coomassie Brilliant Blue G250
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)
Digoxigenin-11-UTP
Diethylpyrocarbonat (DEPC)
Dinatriumhydrogenphosphat
Direct Red 80
1,4-Dithiothreitol (DTT)
DNA aus Fischsperma
DNA-Größenmarker NEB 100 bp *DNA-Ladder*
DNA-Größenmarker NEB 1000 bp *DNA-Ladder*
DNase I RNase free Fermentas
Eisen(III)-chlorid
Essigsäure
Essigsäureanhydrid
Ethanol, 96 % mit 1 % Petrolether
Ethanol Emprove® absolute ($\geq 99,5$ %) *molecular biology grade*
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)
Entellan®
Essigsäureanhydrid
Fluoromount G®
Folsäure
Formaldehyd, 37 %
Formamid *molecular biology grade*
D(-)Fructose
D-Galactose
Gelatine 1.04078.0500
GeneCraft 100 bp *DNA-Ladder*
Gentamicinsulfat
Glycin
Glycerin
Hämatoxylin
Hefeextrakt
Heparin
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
Hühnereiweißlysozym
HyClone™ Wasser *molecular biology grade*
Isopropanol 99,8 %, *molecular biology grade*
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)
Kaisers Glyceringelatine
Kalziumcarbonat (CaCO_3)
 α -D-Lactose
Lithiumchlorid (LiCl) 7.5 M
Lysozyme broth (LB), Pulver
Magnesiumdichlorid-6-Hydrat
Magnesiumdichlorid-Lösung 50 mM *molecular biology grade*
Maleinsäure

Hersteller

Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
BTS BioTech Trade and Service GmbH, Kraichtal, Deutschland
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Fermentas Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH, Dillenburg, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SouthernBiotech, Birmingham, USA
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ares Bioscience GmbH, Köln, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GE Healthcare Life Sciences, Logan, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bioline GmbH, Luckewalde, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie

Maltose
D(+)-Mannose
2-Mercaptoethanol
Methanol, 99,9 %
Methylparaben
Micrococcus lysodeikticus, gefriergetrocknet, ATCC® 4698™
Natriumchlorid (NaCl)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat
Natriumdihydrogenphosphat
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Nikotinsäure
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)
Ortho-Phosphorsäure, 85 %
Paraformaldehyd
Paraffin für Histologie Histosec®
Phenylthioharnstoff (PTU)
Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP 40)
Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Blotmembran, ImmobilonP Porengröße 0,45 µm
Proteinase K
α-Rhamnose
Riboflavin
RNAse Away®
Roti®-Histol
RPMI 1640 Säugerzellmedium
D(+)-Saccharose
Standard-Nährmedium I, Pulver
Sorbinsäure
SuperScript III Reverse Transcriptase
Taq-DNA Polymerase MyTaq™
Tartrazin O

TC-100 Insect Medium
Technovit 8100® Kunstharzeinbettmittel für histologische Schnitte
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
Thiaminhydrochlorid
D(+)-Trehalose
Triethanolamin
Tris-aminomethan (Tris)
Tris-Hydrochlorid
Triton™ X-100
Trypton
Tween® 20
Tween® 20 *molecular biology grade*
Xylencyanol
Ziegenserum (*normal goat serum*)

Kit

GeneJET Gel Extraction Kit
GeneJET Plasmid Miniprep Kit
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7))
Megascript® SP6 Transcription Kit
Megascript® T7 Transcription Kit
PureLink® Quick Gel Extraction Kit
Renaissance® TSA™ Fluorescence System

Hersteller

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acros Organics, New Jersey, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
VWR International, Radnor, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Molecular BioProducts™ Thermo Scientific, Waltham, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Life Technologies, Carlsbad, USA
Bioline GmbH, Luckewalde, Deutschland
Chroma Gesellschaft Schmid und Co., Stuttgart-Untertürkheim, Deutschland
Gibco™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heraeus, Hanau, Deutschland

Acros Organics, New Jersey, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acros Organics, New Jersey, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Difco Laboratories, Detroit, USA
Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
ICN Biomedicals, Aurora, USA
Fiebig Nährstofftechnik GmbH, Idstein-Niederauroff, Deutschland

Hersteller

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Life Technologies, Carlsbad, USA
Life Technologies, Carlsbad, USA
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PerkinElmer, Inc., Waltham, USA

Kit

RNeasy® Mini Kit
TOPO® TA Cloning Kit
Vectastain® Elite® ABC Kit

Laborgerät

Analysewaage EW2200-2NM
Analysewaage Typ 2462
Autoklav Biomedis® 3850 ELV
Autoklav System 2540 EL
Bakterieninkubator Certomat B / H
CO₂-Zellkulturinkubator FunctionLine BB16
Digitale Spiegelreflexkamera Pentax K200d
Digitale Spiegelreflexkamera Pentax K7
Elektroblotanlage
Fluoreszenzmikroskop BX60
Fluoreszenzmikroskop IMT-2, invertierter Strahlengang
Geldokumentationsanlage Lourmat
Gelelektrophoreseanlage MiniProtean® II, für PA-Gele
Gelelektrophoreseanlage PerfectBlue™, für Agarosegele
Heizblock VLM LS1

Hybridisierungsöfen für RNA-*in-situ*-Hybridisierung
Compact Line OV4
Kippschüttler Rocky
Konfokales *Laser Scanning* Mikroskop Leica SP2
Mikroliterpipetten, diverse Volumina Typ Eppendorf Research
Mikroskop Diavert, invertierter Strahlengang
Mikroskopkamera Olympus Altra 20
Mikroskopkamera Olympus XC10
real-time PCR System iQ5
Reinstwasseranlage GenPure UV
Rührzelle Amicon® 8400 zur Proteinkonzentration
Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000
Stereomikroskop Leica L2 mit Kameratubus
Sterilbank Laminair ELB 2448
Sterilbank Holten Safe 2010 1.2
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm Porengröße

Sterilfilter Nalgene™ RapidFlow™ mit Schraubgewinde für Laborglasflasche, 0,2 µm Porengröße
Thermocycler Eppendorf Mastercycler Gradient
Wasserbad HC 4
Zellkulturinkubator Sanyo Incubator MIR
Zentrifuge Hettich Mikro 20
Zentrifuge, kühlbar, Hettich Mikro 22 R
Zentrifuge, kühlbar, Sorvall™ Super T21
Zentrifuge Centrifuge 5415 D
Zentrifuge, kühlbar, Hermle Z 320 K

Hersteller

Qiagen GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Vector Laboratories, Burlingame, USA

Hersteller

Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen, Deutschland
Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland
Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Ricoh Imaging K. K., Itabashi, Tokio, Japan
Ricoh Imaging K. K., Itabashi, Tokio, Japan
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Olympus K.K., Shinjuku, Tokio, Japan
Olympus K.K., Shinjuku, Tokio, Japan

Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Bio Rad, Hercules, USA

Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland

VLM Korrosions-Prüftechnik, Labortechnik & Dienstleistungen GmbH, Bielefeld, Deutschland
Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland
Olympus K.K., Shinjuku, Tokio, Japan
Olympus K.K., Shinjuku, Tokio, Japan
Bio Rad, Hercules, USA
TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Leica, Wetzlar, Deutschland
Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sarstedt AG und Co Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Julabo USA Inc., Allentown, USA
Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4 Ergebnisse

4.1 Sektion I: Die Rolle des hämatopoetischen Organs bei der Hämatopoese

Für den eindeutigen Nachweis bestimmter Hämozytentypen im hämatopoetischen Organ bzw. ob frei flottierende Hämozyten aus Zellen des hämatopoetischen Organs hervorgehen, ist es notwendig zuverlässige Identifizierungsmerkmale für Hämozytentypen zu nutzen. Dies können ultrastrukturelle oder lichtmikroskopisch erkennbare Charakteristika, enzymatische Aktivitätsnachweise oder, worauf diese Arbeit im Wesentlichen beruht, der Nachweis bestimmter Proteine und deren mRNAs sein. Antikörper und Lektine, die bekannte oder noch nicht identifizierte Strukturen der Hämozyten markieren, wurden auf ihre Bindspezifität an zirkulierenden Hämozyten hin untersucht bevor mit diesen die Nachweise auf dem hämatopoetischen Organ durchgeführt wurden

4.1.1 Identifizierung von Hämozytenmarkern

Mit immunhistochemischen, lektinhistochemischen und enzymatischen Nachweisen, sowie mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurden verschiedene Hämozytentypen von gesunden, nicht immunstimulierten *Manduca sexta* L5d2-Larven charakterisiert. Hierbei wurden auf Glasobjektträgern adhätierende Hämozyten verwendet. Die Markierung wurde als hämozytentypspezifisch gewertet, wenn ausschließlich ein klar definierter Hämozytentyp markiert wurde und als hämozytentypisch, wenn mehrere Hämozytentypen markiert wurden. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Das (Pro-)Enzym (Pro-)Phenoloxidase [(P)PO] lässt sich durch verschiedene Methoden nachweisen. Es kann die für PPO kodierende mRNA über mRNA-*in-situ*-Hybridisierung markiert werden (JIANG *et al.*, 1997), das Protein mittels PPO-spezifischen Antikörpern gebunden werden (ASHIDA *et al.*, 1988) oder die enzymatische Umsetzung eines geeigneten Substrats visualisiert werden. Mit jeder dieser Nachweismethoden konnten mittelgroße (Durchmesser ca. 7 – 10 µm) bis große (Durchmesser ca. 10 – 15 µm) runde Hämozyten markiert werden.

Anti-*B. mori* Prophenoloxidase-Immunserum (anti-PPO; ASHIDA *et al.*, 1988) und anti-*M. sexta* Prophenoloxidase-Immunserum (JIANG *et al.*, 1997) banden an zytoplasmatische Komponenten mittelgroßer bis großer, runder Hämozyten mit mittelgroßem, kreisrunden Zellkern (anti-*B. mori* PPO: Abbildung 4.2; anti-*M. sexta* PPO: nicht gezeigt). Außerdem konnten Zellen desselben Typs

mittels spezifischem (Pro-)Phenoloxidasenachweis über die enzymatische Oxidation von Diaminobenzidin (DAB) markiert werden. Die Reaktion konnte durch Zugabe von einigen Kristallen Phenylthiourea (PTU), einem Phenoloxidaseinhibitor, gehemmt werden. Die Anwesenheit von 1 % Natriumazid als Peroxidaseinhibitor beeinträchtigte die Markierung nicht (Daten nicht gezeigt). Eine *in-situ*-Hybridisierung mit einer PPO- (Untereinheit 2-) mRNA-spezifischen RNA-Sonde auf Hämocytenmonolayern markierte ausschließlich mittelgroße bis große, runde Hämocyten (Daten nicht gezeigt; entspricht den Ergebnissen für PPO-Untereinheit 1 von JIANG *et al.*, 1997).

Der gleiche Zelltyp wurde mit anti- β -1,3-glucan recognition protein 1-Immunsersum (anti- β GRP-1; MA und KANOST, 2000) markiert (Abbildung 4.1 D, Abbildung 4.3). Keine der genannten Methoden markierte einen anderen als den beschriebenen Hämocytentyp. Der durch diese Methoden spezifisch markierte Zelltyp entspricht den publizierten Kriterien für Oenocytoide (HOROHV und DUNN, 1982; RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006, JIANG *et al.*, 1997).

Anti-*E. kuehniella* Esterase-Immunsersum (anti-Esterase; MANN, 1992) markierte kleine (Durchmesser ca. 5 μ m), unregelmäßig runde bis länglich geformte Hämocyten mit oft unregelmäßig geformtem Zellkern und großen zytoplasmatischen Einschlüssen (Sphärulen). Dieser Hämocytentyp entspricht morphologisch sphärulen Zellen (HOROHV und DUNN, 1982; RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006). Somit ist anti-Esterase der einzige spezifische Antikörper für sphärule Zellen von *M. sexta* (Abbildung 4.1 G).

Der Hämocyten-Integrin β -Untereinheit-spezifische mAb MS13 (LEVIN *et al.*, 2005) markierte Plasmatozyten und wird als spezifisch für diesen Zelltyp angesehen (Abbildung 4.1 B; WILLOT *et al.*, 1994; WIEGAND *et al.*, 2000; LEVIN *et al.*, 2005).

Zusätzlich zu gespreiteten Plasmatozyten wurden einige runde Hämocyten durch MS13 markiert. Diese Zellen waren mittelgroß (Durchmesser ca. 8 – 10 μ m, selten größer) mit großem, unregelmäßig geformtem Zellkern (Abbildung 4.4 B', B'') oder kleinere (Durchmesser ca. 6 – 7 μ m) Hämocyten mit wenig Zytoplasma und kleinem Zellkern (Abbildung 4.1 B').

Mit dem mAb MS77 wurden Plasmatozyten und runde Hämocyten markiert, die entweder mittelgroß (Durchmesser ca. 7 – 10 μ m, selten größer) mit großem, unregelmäßig geformtem Zellkern oder klein waren (Durchmesser ca. 6 – 7 μ m) waren (Abbildung 4.1 A').

Der mAb MS7 markierte granuläre Zytoplasmainschlüsse von zumeist kleinen (Durchmesser ca. 6 – 7 μ m) runden Hämocyten mit rundem Zellkern (Abbildung 4.1 E', Abbildung 4.4 A', A''). Dieser

Zelltyp wird als granuläre Zelle bezeichnet (HOROHV und DUNN, 1982; RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006). Die Markierung der Granulen ermöglichte die Identifizierung von granulären Zellen einerseits durch die spezifische Markierung mit mAb MS7 und andererseits anhand der histologischen Eigenschaft des Vorhandenseins von Granulen.

Die oben genannten Marker anti-PPO (bzw. Nachweis der PPO-Aktivität oder -mRNA), anti- β GRP-1, anti-Esterase und die mAbs MS13, MS77 und MS7 sind wegen der spezifischen Markierung jeweils nur eines Hämozytentyps hämozytentypspezifisch (= monospezifisch für jeweils einen bestimmten Hämozytentyp).

Das Immunsereum gegen Meerrettichperoxidase (Sigma Aldrich, anti-HRP) markierte auf Hämozytenmonolayern Plasmatozyten, sphärule Zellen und runde, ungespreitete Hämozyten mit relativ großem Zellkern, während granuläre Zellen und Oenozytoide nicht markiert wurden (Abbildung A.1 B).

Der mAb MS75 markierte Plasmatozyten, sphärule Zellen und runde Hämozyten (Abbildung 4.1 C, C'). Die markierten runden Hämozyten ähnelten entweder Oenozytoiden oder ungespreiteten Plasmatozyten.

Der monoklonale anti-Neuroglial Antikörper 3B11 (NG3B11; NARDI, 1993) bindet laut einigen Untersuchungen eine Plasmatozytensubpopulation und granuläre Zellen (NARDI *et al.*, 2003; NARDI *et al.*, 2006: „*When hemocytes that have been separated into neuroglial-positive and neuroglial-negative populations are analyzed with flow cytometry, the positively selected hemocytes consist of primarily granular cells (diploid) with interspersed plasmatoocytes (polyploid). The negatively selected hemocytes that do not immunolabel with anti-neuroglial consist primarily of plasmatoocytes (>60%).*“; ZHUANG *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde eine abweichende Markierungsspezifität beobachtet. Es wurden sowohl gespreitete Plasmatozyten (Abbildung 4.1 H) als auch große, runde Hämozyten mit großem Zellkern markiert (Abbildung 4.1 H'), während eine Markierung der granulären Zellen ausblieb.

Alle eingesetzten plasmatozytenspezifischen oder -typischen Antikörper, die mAbs MS13, MS75, MS77 und NG3B11, markierten einen Hämozytentyp, der nach Kurzzeitkultivierung ohne Hämolymphplasma (45 – 60 min) auf Glasobjektträgern keine Spreitung oder Pseudopodienbildung aufweist. Diese Hämozyten sind rund, relativ groß, haben einen relativ großen Zellkern und

vergleichsweise wenig Zytoplasma. Der Zellkern ist unregelmäßig geformt und ähnelt dem gespreiteter Plasmatozyten.

Der mAb MS2 band an der Zytoplasmamembran von granulären Zellen und Oenozytoiden (Doppelmarkierung mit Oenozytoiden-Markern: Abbildung 4.2 E, Abbildung 4.1 E morphologisch belegt: BEETZ, 2002). Daneben markierte MS2 auch andere Gewebe (Fettkörper, Basallamina, Muskel, Daten nicht gezeigt; BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004). Die Markierungsspezifität ist für diesen mAb deshalb als typisch, aber nicht spezifisch für granuläre Zellen anzusehen. Das Epitop für MS2 konnte durch Detergenzbehandlung maskiert oder entfernt werden (BEETZ, 2002; Y. VON BREDOW, pers. Mitt.; eigene Beobachtung, Daten nicht gezeigt).

Der mAb MS39 markierte bei einigen Oenozytoiden Einschlüsse im Zytoplasma (Abbildung 4.2 G, Abbildung 4.3 G) sowie in manchen Fällen die Zellmembran (Abbildung A.1 B'). Die granulären Einschlüsse traten in Oenozytoiden in tendenziell geringerer Zahl als in granulären Zellen auf und waren häufig kleiner als die granulärer Zellen. Des Weiteren markierte MS39 die extrazelluläre Matrix, u. a. des hämatopoetischen Organs (Abbildung A.2 C). Somit ist die Markierung durch den mAb MS39 typisch für granuläre Zellen und Oenozytoide, aber nicht spezifisch für diese Zelltypen.

Anti-*Drosophila melanogaster* Laminin B2-Immunsersum (anti-LanB2) markierte granuläre Einschlüsse in granulären Zellen, die Zelloberfläche von Oenozytoiden und von runden Hämozyten mit relativ großem Kern und geringem Zytoplasmaanteil (Abbildung A.1 A). Eine Markierung der extrazellulären Matrix von Organen wurde ebenfalls nachgewiesen (Abbildung 4.6 B', Abbildung A.2 B), weswegen anti-LanB2 nicht als hämozytenspezifischer Antikörper angesehen werden kann.

Das Lektin aus *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin, PNA) markierte vor allem Granulen granulärer Zellen (Abbildung 4.1, Abbildung 4.4; NARDI, 2004). Bei diesem Zelltyp wurden häufig, aber nicht immer, die gleichen Granulen durch PNA und MS7 (Abbildung 4.4 A', A''). Zusätzlich markierte PNA die Zellmembran von wenigen runden Hämozyten, die keine oder nur wenige PNA positive Granulen besitzen (Abbildung 4.1). Genauere Analysen dieser durch PNA an der Zellmembran markierten Hämozyten durch Doppelmarkierung mit Antikörpern zeigten, dass einige PNA-Zellmembran-positive (PNAm⁺) Hämozyten mit MS2, MS7, MS13, MS75, MS77, NG3B11, anti-βGRP-1 oder anti-PPO markiert werden können (Übersicht in Tabelle 4.3). In Oenozytoiden traten außerdem zytoplasmatische Einschlüsse (Granulen) ähnlich denen der granulären Zellen auf, die durch PNA markiert wurden (anti-βGRP-1-positive Oenozytoide: Abbildung 4.1 D; anti-PPO-positive-Oenozytoide: Abbildung 4.2 I). Sphärule Zellen, die durch anti-Esterase Immunfärbung

identifiziert wurden, besitzen keine PNA positiven Granulen. Ihre Zytoplasmamembran ist PNA positiv, sie unterscheiden sich jedoch durch die charakteristische Zellform und Sphärulen von den runden PNAm⁺-Zellen (Abbildung 4.1 G), so dass man diese Zelltypen morphologisch voneinander unterscheiden konnte.

Außer Hämozyten werden das embryonale Nervensystem (NARDI, 2004; KÜHNEL, 2010) sowie larval dermale sekretorische Zellen (Verson-Drüsen) und hämatopoetische Organe (NARDI *et al.*, 2016) durch PNA markiert. Deshalb ist PNA ein hämozytentypischer aber nicht hämozytenspezifischer Marker.

Die Markierung durch die Marker anti-HRP, MS2, MS39, MS75, NG3B11, anti-LanB2 und PNA ist aus oben ausgeführten Gründen nicht monospezifisch für einen Hämozytentyp und deshalb als hämozytentypisch anzusehen.

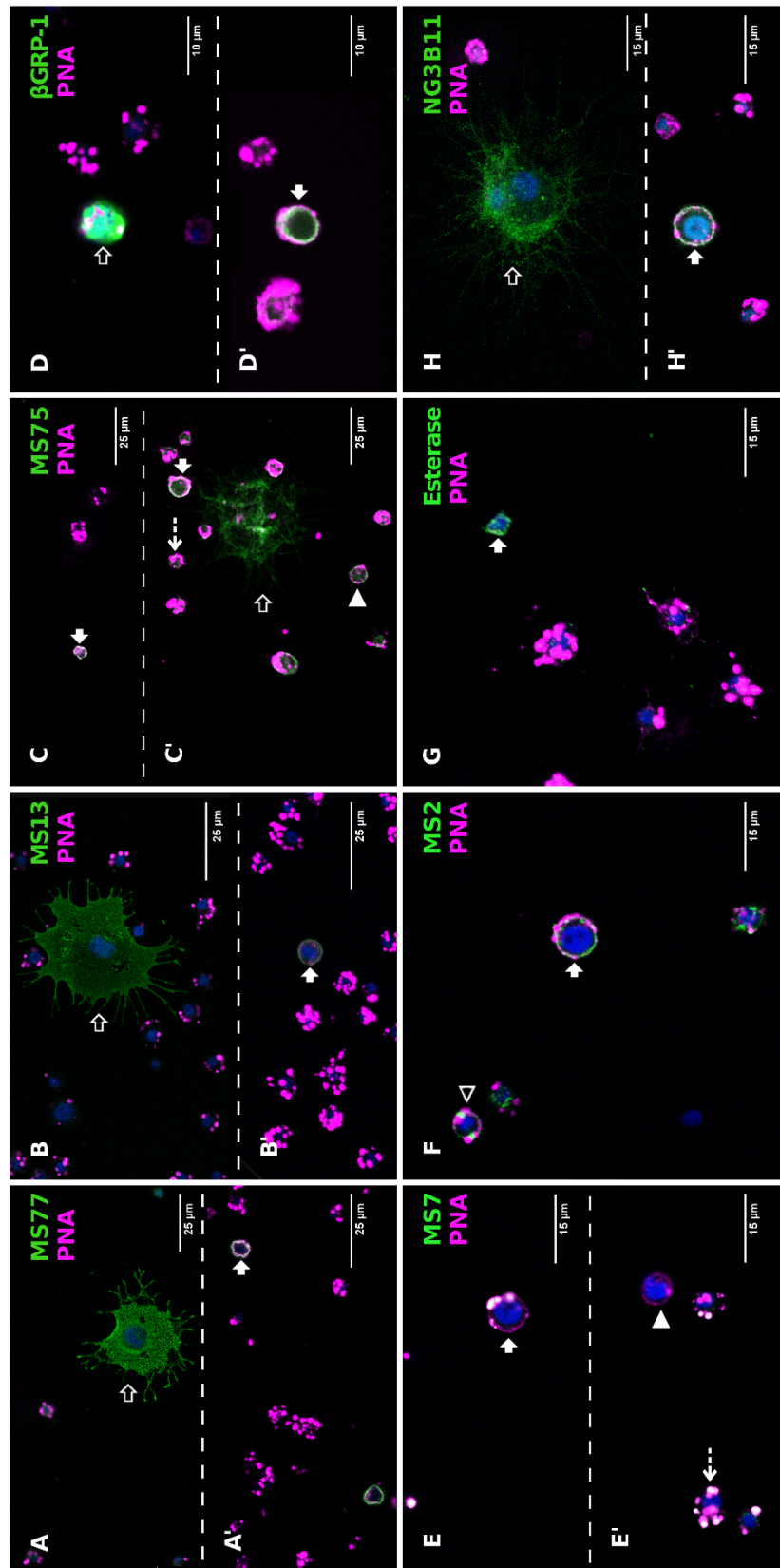


Abbildung 4.1: Doppelmarkierung von larvalen (L5d2) Hämozyten mit PNA und hämozytenmarkierenden Antikörpern.

Granuläre Zellen können anhand der großen, zahlreichen PNA-positiven Granulen identifiziert werden (exemplarisch: gestrichelte Pfeile in C' und E'). Fortsetzung auf Folgeseite.

Fortsetzung Abbildung 4.1. **A:** MS77-positive gespreitete Plasmatozyten sind PNA-negativ (leerer Pfeil). **A':** MS77-positive, runde Hämozyten weisen eine PNA Markierung der Zellmembran (PNAm⁺) auf (weißer Pfeil). **B:** MS13-positive, gespreitete Plasmatozyten sind PNA negativ (leerer Pfeil). **B':** Runde MS13-positive Hämozyten können eine PNA-positive Zellmembran besitzen (weißer Pfeil). **C:** MS75 und PNA markieren sphärule Zellen an der Zytoplasmamembran (weißer Pfeil). **C':** Der weiße, gefüllte Pfeil markiert eine runde, PNAm⁺-Hämozyte, die gleichzeitig MS75-positiv ist. MS75-positive, runde Hämozyten können PNA-positive Granulen besitzen (Pfeilspitze). Gespreitete, MS75-positive Plasmatozyten können vereinzelte PNA-positive Bereiche auf der Zellmembran besitzen (leerer Pfeil). **D, D':** Oenozytoide sind β GRP-1 positiv und besitzen PNA positive Granulen, außerdem kann die Zellmembran PNA-negativ (D, leerer Pfeil) oder PNA-positiv (D', weißer Pfeil) sein. **E, E':** PNAm⁺-Hämozyten können MS7-positive Granulen besitzen (E, weißer Pfeil) oder negativ für MS7 sein (E', Pfeilspitze). MS7 und PNA markieren Granulen granulärer Zellen (E', gestrichelter Pfeil). **F:** Die meisten MS2-positiven granulären Zellen besitzen keine PNA-positive Zellmembran, aber PNA-positive Granulen (leere Pfeilspitze). Größere PNAm⁺-Zellen können MS2-positiv sein (weißer Pfeil). **G:** PNA markiert die Zellmembran von sphärulen Zellen (weißer Pfeil). **H:** Gespreitete, NG3B11-positive Plasmatozyten sind PNA negativ (leerer weißer Pfeil). **H':** NG3B11 markiert PNAm⁺ runde Hämozyten (weißer Pfeil). KLSM-Aufnahmen; A, B, D, G, H: Projektion mehrerer Z-Ebenen.

Tabelle 4.1: Doppelmarkierbarkeit von PNA-Zellmembran-positiven Hämozyten mit Antikörpern.

	MS2	MS7	MS13*	MS75*	MS77*	NG3B11*	β GRP-1	PPO	Esterase
PNAm⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNAg⁺	+	+	-	+	-	+	+	+	-

Legende: + = Doppelmarkierung möglich; - = keine Doppelmarkierung beobachtet; *typische, gespreitete Plasmatozyten weisen keine PNAm⁺ Markierung auf.

Zur Ermittlung des Anteils PNA-zellmembranmarkierter Hämozyten wurden Hämozytenmonolayer mit PNA und anti-Esterase-Immunserum markiert und der Anteil PNA-zellmembranmarkierter (PNAm⁺) Hämozyten ermittelt. Sphärule Zellen wurden durch Markierung mit anti-Esterase-Immunserum und zusätzlich aufgrund morphologischer Kriterien bestimmt. Der Gesamtanteil an PNAm⁺-Zellen betrug $7,37 \pm 2,63$ % der Gesamthämozytenpopulation. Diese setzten sich zusammen aus sphärulen Zellen ($4,37 \pm 1,52$ %) und runden Hämozyten, die keine Merkmale sphäruler Zellen trugen ($3,00 \pm 1,67$ %; Tabelle 4.2). Innerhalb der runden PNAm⁺-Zellen konnte man außerdem in Zellen unterscheiden, die in etwa der Größe granulärer Zellen entsprachen (HC PNAm⁺ [excl. SP] klein; DHC $1,93 \pm 1,61$ %) und solchen, deren Zelldurchmesser vergleichbar mit Oenozytoiden oder runden Plasmatozyten waren (HC PNAm⁺ [excl. SP] groß; DHC $1,07 \pm 0,19$ %). Die Durchmesser der Zellen wurden mit den jeweiligen Hämozytentypen beim Mikroskopieren verglichen und für diese Analyse nicht gemessen.

Die quantitative Auswertung der Doppelmarkierungen der kleinen PNAm⁺-Hämozyten mit anderen Hämozytenmarkern ist Tabelle A.18 (Appendix) zu entnehmen.

Tabelle 4.2: Differentielle Zellzahlermittlung (DHC) von Hämozyten mit PNA-positiver Zellmembran in L5d2-Larven.

	Hämozytentyp	DHC [%] $\pm$ SD
	HC PNA ⁺ [excl. SP] groß [*]	1,07 $\pm$ 0,19
+	HC PNA ⁺ [excl. SP] klein [*]	1,93 $\pm$ 1,61
Σ	HC PNA ⁺ [excl. SP]	3,00 $\pm$ 1,67
+	SP PNA ⁺	4,37 $\pm$ 1,52
Σ	PNA ⁺ gesamt	7,37 $\pm$ 2,63

* Einschätzung bei Beobachtung, große PNA⁺-Hämozyten entsprachen ca. der Größe von Oenozytoiden oder runden Plasmatozyten, kleine PNA⁺-Hämozyten etwa der granulärer Zellen (vergl. Abbildung 4.19 A). Abkürzungen: PNA⁺ SP = sphärule Zellen mit PNA-positiver Zellmembran, PNA⁺ HC [excl. SP] = PNA-Zellmembran-positive Hämozyten, die keine sphärule Zellen sind. Auswertung von $n = 3094$ Zellen von $n = 4$ Tieren.

4.1.2 Markierung von Oenozytoiden mit Hämozytenmarkern

Als spezifische Antikörper zur Markierung von Oenozytoiden wurden Immunsereen gegen *B. mori*-Prophenoloxidase (anti-PPO; ASHIDA *et al.*, 1988), *M. sexta*-PPO (MA und KANOST, 2000) und gegen *M. sexta*- β -1,3-glucan recognition protein 1 (JIANG *et al.*, 1997) eingesetzt. In Oenozytoiden der Lepidoptera wird PPO synthetisiert (Review: STRAND, 2008) und in *M. sexta* sind Oenozytoide der einzige Hämozytentyp der PPO synthetisiert (JIANG *et al.*, 1997). Die Markierung von Oenozytoiden durch anti- β GRP-1 Immunsereum wiederum wurde bereits von BEETZ beobachtet (TRENCZEK, pers. Mitteilung). Mit jedem der drei genannten Antikörper konnten auf Hämozytenmonolayern eine spezifische Markierung der Oenozytoide bestätigt werden (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3). Auffällig war hierbei, dass PPO bzw. β GRP-1 entweder in einem sehr breiten Bereich oder eher kortikal direkt unter der Zellmembran liegend lokalisiert war (Vergleiche Abbildung 4.2 D, H bzw. Abbildung 4.3 D, F).

Von an Plasmatozyten bindenden Antikörpern werden auch große, runde Hämozyten ohne Pseudopodien markiert. Diese werden daher als ungespreitete Plasmatozyten bezeichnet. Da diese Zellen bei lichtmikroskopischer Betrachtung oft nicht klar von Oenozytoiden zu unterscheiden sind wurde über Doppelmarkierungen mit oenozytoidspezifischen Antikörpern und verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen *M. sexta*-Hämozyten bzw. dem Lektin PNA die Identität dieser Zellen überprüft.

Die Doppelmarkierungen ergaben, dass Hämozyten, die die plasmatozytenspezifische Integrin β -Untereinheit (MS13-Antigen) tragen, negativ sowohl für den Oenozytoidemarker PPO als auch für β GRP-1 waren (Abbildung 4.2 A, Abbildung 4.3 A). Mit dem monoklonalen Antikörper MS77

markierte Hämozyten waren ebenfalls negativ für beide Oenozytoidemarker, anti-PPO und anti- β GRP-1 (Abbildung 4.2 C, Abbildung 4.3 C).

Mit Antikörper MS75 konnten sowohl β GRP-1-positive als auch PPO-positive Oenozytoide markiert werden. MS75-positive sphärule Zellen waren hingegen negativ für beide Oenozytoidemarker (Daten nicht gezeigt). Gleichfalls zeigten MS75-positive Plasmatozyten keine Markierung mit anti-PPO oder anti- β GRP-1 (Abbildung 4.2 B, Abbildung 4.3 B). PPO- bzw. β GRP-1-positive Oenozytoide konnten außerdem mit dem mAb NG3B11 markiert werden, der für das Adhäsionsmolekül Neuroglialin spezifisch ist (Abbildung 4.2 D, Abbildung 4.3 D).

Der monoklonale Antikörper MS2 markierte PPO-negative und β GRP-1-negative granuläre Zellen und PPO-positive und β GRP-1-positive Oenozytoide (Abbildung 4.2 E, Abbildung 4.3 E). Nicht eindeutig waren die Markierungen mit MS7. Eindeutig identifizierbare granuläre Zellen waren MS7-positiv und negativ für anti-PPO und anti- β GRP-1. Es ließen sich eindeutig identifizierbare Oenozytoide als MS7-negativ nachweisen (Abbildung 4.2 F, Abbildung 4.3 F). Eine Zelle mit relativ großem Kern und niedrigem Zytoplasmaanteil, die positiv für PPO und MS7 war, ist in Abbildung 4.2 F (weiße Pfeilspitze) gezeigt. Für den die Granulen granulärer Zellen markierenden Antikörper MS39 ergab sich ein heterogenes Markierungsmuster auf Oenozytoiden. Während PPO-positive Oenozytoide MS39-positive granuläre Einschlüsse besitzen können (Abbildung 4.2 G), konnten auch MS39-negative Oenozytoide gefunden werden (nicht gezeigt). Ebenso konnten β GRP-1-positive Zellen MS39-positiv oder -negativ sein (Abbildung 4.3 G). Der Antikörper MS73 markierte granuläre Einschlüsse granulärer Zellen, sowie, in geringerer Anzahl, auch Granulen von PPO-positiven (Abbildung 4.2 H) und β GRP-1-positiven (Abbildung 4.3 H) Oenozytoiden. Das *Arachis hypogaea* Lektin (PNA) markierte Granulen granulärer Zellen sowie die Zytoplasmamembran von einigen PPO-positiven (Abbildung 4.2 I) und einigen β GRP-1-positiven (Abbildung 4.1 D', Abbildung 4.3 I) Oenozytoiden. Außerdem markierte PNA Granulen in Oenozytoiden, sowohl solchen mit PNA-positiven als auch mit PNA-negativen Zellmembranen (Abbildung 4.1 D, Abbildung 4.3 I).

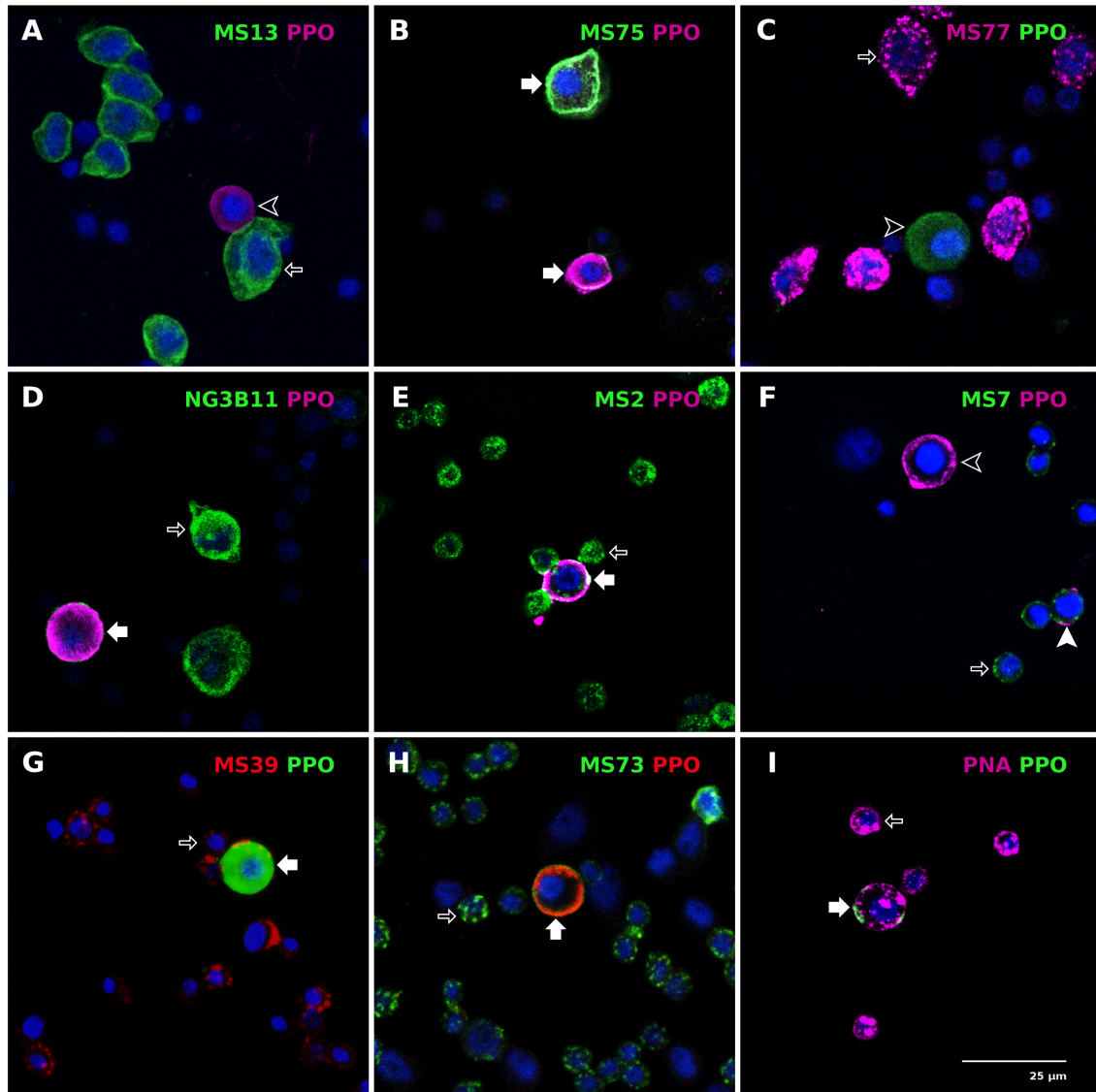


Abbildung 4.2: Identifizierung von Prophenoloxidase (PPO) beinhaltenen Oenozytoiden durch Doppelmarkierung.

A: PPO-positive Oenozytoide sind nicht MS13-positiv (leere Pfeilspitze), MS13 markiert Plasmatozyten (leerer Pfeil). **B:** PPO-positive Oenozytoide können mit MS75 markiert werden (weiße Pfeile). **C:** MS77 positive Hämozyten sind PPO-negativ (leerer Pfeil) und *vice versa* (leere Pfeilspitze). **D:** PPO-positive Oenozytoide können NG3B11-positiv sein (weißer Pfeil). NG3B11-positive Plasmatozyten sind PPO-negativ (leerer Pfeil). **E:** Oenozytoide sind positiv für MS2 und PPO (weißer Pfeil), granuläre Zellen sind PPO-negativ und MS2-positiv (leerer Pfeil). **F:** PPO-positive Oenozytoide sind MS7 negativ (leere Pfeilspitze), während an nicht klar definierbaren Zellen (GR oder kleine OE?) beide Signale auftreten können (weiße Pfeilspitze), das PPO ist bei diesen Zellen an der Zelloberfläche lokalisiert. Typische granuläre Zellen sind PPO-negativ und MS7-positiv (leerer Pfeil). **G:** PPO-positive Oenozytoide besitzen MS39-positive zytoplasmatische Einschlüsse (weißer Pfeil) während granuläre Zellen MS39-positiv und PPO-negativ sind (leerer Pfeil). **H:** MS73 markiert sowohl granuläre Zellen (leerer Pfeil) als auch PPO-positive Oenozytoide (weißer Pfeil). **I:** PNA markiert die Granulen typischer PPO-negativer granuläre Zellen (leerer Pfeil) als auch PPO-positive Oenozytoide (weißer Pfeil). Der Messbalken in I gilt für alle Einzelabbildungen dieser Tafel. KLSM-Aufnahmen; C, D, E, G: Projektion mehrerer Z-Ebenen.

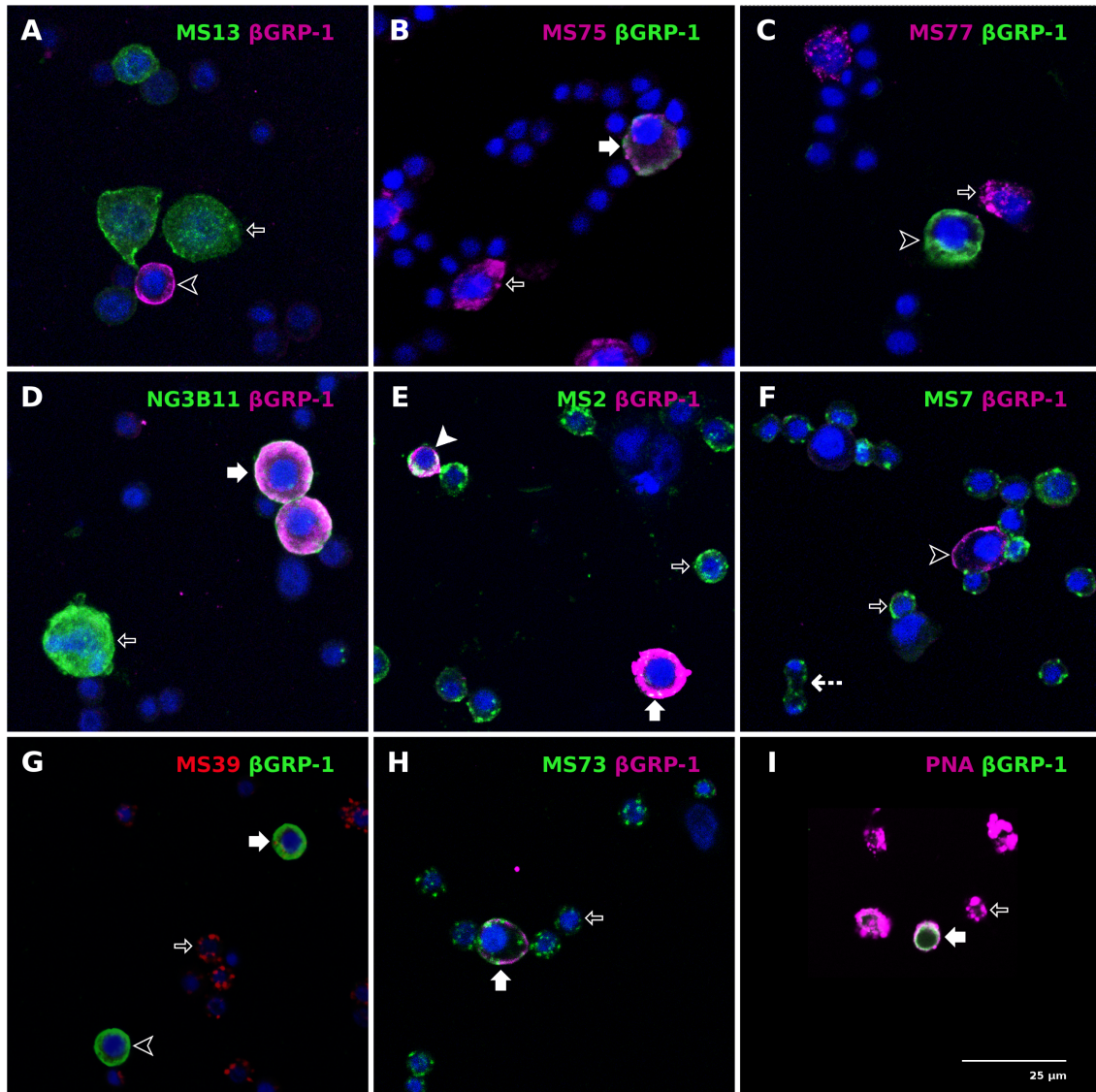


Abbildung 4.3: Identifizierung von β GRP-1 beinhaltenden Oenozytoiden durch Doppelmarkierung.

Das β GRP-1-Signal liegt entweder in breiten Bereichen im Zytoplasma (z. B. in D) oder in einem eher kortikalen schmalen Bereich (z. B. in F).

A: β GRP-1 positive Oenozytoide sind MS13-negativ (leere Pfeilspitze), MS13-positive Plasmatozyten sind β GRP-1 negativ (leerer Pfeil). **B:** β GRP-1 positive Zellen sind positiv für MS75 (weißer Pfeil). Plasmatozyten sind ausschließlich positiv für MS75 (leerer Pfeil). **C:** Hämozyten, die MS77 positiv sind, sind negativ für β GRP-1 (leerer Pfeil) während β GRP-1-positive Oenozytoide nicht mit MS77 markiert werden (leere Pfeilspitze). **D:** NG3B11-positive, nicht gespreitete Zellen können β GRP-1 positiv (weißer Pfeil) oder β GRP-1-negativ (leerer Pfeil) sein. **E:** β GRP-1-positive Oenozytoide sind MS2-positiv (weißer Pfeil). Granuläre Zellen sind MS2-positiv und β GRP-1-negativ (leerer Pfeil). Eine Hämozyte von Größe und Gestalt einer granulären Zelle ist sowohl β GRP-1-positiv als auch MS2-positiv (weiße Pfeilspitze). **F:** Anti- β GRP-1 markiert keine MS7-positiven granulären Zellen (leerer Pfeil). β GRP-1-positive Oenozytoide sind negativ für MS7 (leere Pfeilspitze). Der gestrichelte Pfeil markiert eine granuläre Zelle in der Telophase der Mitose. **G:** MS39 markiert β GRP-1-positive Oenozytoide (weißer Pfeil) und β GRP-1-negative granuläre Zellen (leerer Pfeil). β GRP-1-positive Oenozytoide können auch MS39-negativ sein (leere Pfeilspitze). **H:** MS73 markiert granuläre Zytoplasmainschlüsse von β GRP-1-negativen granulären Zellen (leerer Pfeil) und von β GRP-1-positiven Oenozytoiden (weißer Pfeil). **I:** Bild übernommen aus Abbildung 4.1. D' PNA markiert granuläre Einschlüsse von β GRP-1-negativen granulären Zellen (leerer Pfeil), sowie Zytoplasmamembran und vereinzelte granuläre Strukturen in β GRP-1-positiven Oenozytoiden (weißer Pfeil).

Messbalken in I gilt für alle Einzelabbildungen. KLSM-Aufnahmen; C, D, E, G: Projektion mehrerer Z-Ebenen.

Tabelle 4.3: Differentialdiagnose der *Manduca sexta*-Hämozyten mittels Antikörpermarkierung, enzymatischer Aktivität und mRNA-Expression.

		Plasmato- zyten	granuläre Zellen	Oeno- zytoide	sphärule Zellen	Prohämö- zyten
Antikörper	α -HRP	+	-	-	+	?
	MS2	-	+	+	-	?
	MS7	-	+	-	-	?
	MS13	+	-	-	-	?
	MS75	+	-	+	+	?
	MS77	+	-	-	-	?
	NG3B11	+	-	+	-	?
	α - β GRP-1	-	-	+	-	?
	α -PPO	-	-	+	-	?
	α -Esterase	-	-	-	+	?
	α -LanB2	-	+	+	-	?
enzymatisch	PPO	-	-	+	-	?
mRNA	PPO UE 2	-	-	+	-	?

Die Bestimmung der Hämozytentypen erfolgte anhand morphologischer Merkmale und Doppelmarkierungsexperimenten. Abkürzungen und Symbole: β GRP-1 = β -1,3-*glucan recognition protein*; HRP = Meerrettichperoxidase; LanB2 = Laminin B2; PPO = Prophenoloxidase; PPO UE 2 = Prophenoloxidase Untereinheit 2; α = anti; + = Hämozytentyp wird durch diese Methode markiert; - = Hämozytentyp wird durch diese Methode nicht markiert; ? = keine definitive Aussage möglich.

4.1.3 Charakterisierung kleiner gespreiteter Hämozyten

Bei der Charakterisierung von Hämozyten mittels morphologischer Kriterien ergeben sich häufig Unsicherheiten bei der Zuordnung von Zellen zu einem bestimmten Hämozytentyp. So ähneln sich bspw. Oenozytoide und ungespreitete Plasmatozyten stark in Größe und Form. Des Weiteren treten außer den typischen, sehr groß erscheinenden gespreiteten Plasmatozyten auch kleinere, gespreitete Hämozyten auf. Die Zugehörigkeit der letztgenannten Hämozyten zu einem bestimmten Hämozytentyp wurde bislang nicht systematisch untersucht. Mittels Antikörpermarkierung mit hämozytenspezifischen Antikörpern wurde dieser Zelltyp genauer charakterisiert. Mit dem granuläre Zellen-spezifischen mAb MS7 konnten Granulen in gespreiteten kleinen Hämozyten markiert werden. Ebenfalls markierte PNA die Granulen, beide Markierungsmuster entsprechen denen für granuläre Zellen (Abbildung 4.4 A – A''). Der granuläre Zellen- und Oenozytoide-bindende mAb MS2 markierte ebenfalls kleine gespreitete Hämozyten (Daten nicht gezeigt). Mit den Plasmatozytenmarkern mAb MS13 (Abbildung 4.4 B') und MS77 (Abbildung 4.4 E'), dem Oenozytoide-markierenden anti- β GRP-1-Immunsereum (Abbildung 4.4 C') und dem spezifisch sphärule Zellen

markierenden anti-Esterase-Immunserum (Abbildung 4.4 D') konnten kleine gespreitete Hämozyten nicht markiert werden.

Die typischen Merkmale MS7- bzw. PNA-positive Granulen, Markierbarkeit mit MS2 sowie die Abwesenheit der plasmatozytenspezifischen Marker (MS13- bzw. MS77-Epitop), des sphärule Zellen-spezifischen Markers (anti-Esterase-Immunserum-Antigen) und des Oenozytoidmarkers (β GRP-1) führt zu der Klassifizierung der kleinen gespreiteten Hämozyten als gespreitete granuläre Zellen (GRspr).

4.1.4 Zellkernmorphologie und relativer DNA-Gehalt der Hämozytentypen

Die Hämozyten von *M. sexta*-Larven unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich der Zellform und spezifischer Marker voneinander, sondern auch hinsichtlich der Morphologie, Größe und des DNA-Gehalts ihrer Zellkerne. Für Plasmatozyten wurde DNA-Endoreplikation und damit einhergehend eine Zunahme des DNA-Gehalts beschrieben, während granuläre Zellen als diploid bzw. während der Mitose tetraploid sind (NARDI *et al.*, 2003). Die DAPI-Intensität als Maß für den relativen Chromatingehalt wurde für jede ausgewertete mikrofotografische Aufnahme an fünf eindeutig identifizierten granulären Zellen, die sich nicht in Mitose befanden, gemessen und der Durchschnittswert als „1“ gesetzt. Anhand dieser Eichwerte wurde die relative DAPI-Intensität der Hämozyten ermittelt.

Hämozytenmonolayer wurden mit den hämozytentypspezifischen Antikörpern mAb MS7 (granuläre Zellen), mAb MS13 bzw. mAb MS77 (Plasmatozyten), anti- β GRP-1-Immunserum (Oenozytoide) und anti-Esterase-Immunserum (sphärule Zellen) markiert, um eine Zuordnung der Zellkerne zu dem jeweiligen Hämozytentyp zu ermöglichen (Abbildung 4.4). Der Zellkern von granulären Zellen auf Hämozytenmonolayern war in der Regel kreisrund im Querschnitt (Abbildung 4.4 A''', GR). Neben der typischen runden Zellform traten auch kleine Zellen mit deutlicher Spreitung und Filopodienbildung auf (siehe Abschnitt 4.1.3). Die Zellkerne der gespreiteten granulären Zellen ist mutmaßlich aufgrund der abgeflachten Zellform eher oval (Abbildung 4.4 A'''). MS7-positive runde granuläre Zellen wiesen eine $1,22 \pm 0,38$ -fache DAPI-Intensität auf. Die DAPI-Intensität der Zellkerne gespreiteter granulärer Zellen unterschied sich nicht signifikant von diesem Wert ($1,32 \pm 0,84$ -fache DAPI-Intensität, Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5). Die erhöhte DAPI-Intensität der runden granulären Zellen gegenüber den zur Eichung gemessenen granulären Zellen kann als Hinweis auf das Vorhandensein granulärer Zellen in Mitose (tetraploide granuläre Zellen) gedeutet werden.

Große runde Zellen, die positiv für die Plasmatozytenmarker mAb MS13 oder mAb MS77 waren (Abbildung 4.4 B', E'), besaßen einen charakteristisch großen, unregelmäßig geformten Zellkern, der nicht kreisrund im Querschnitt erschien, sondern gestreckt oder mit Ausbuchtungen versehen war (Abbildung 4.4 B'', E''). Diese Zellen waren negativ für granuläre Zellen-Marker (MS7, Abbildung 4.4 A'), Oenozytoidemarker (anti- β GRP-1, Abbildung 4.4 C') und sphärule Zellen-Marker (anti-Esterase, Abbildung 4.4 D'). Die relative DAPI-Intensität der Zellkerne dieser Hämozyten betrug das $3,11 \pm 0,65$ -fache der Zellkerne granulärer Zellen und unterschied sich signifikant von der Intensität gespreiteter Plasmatozyten-Zellkerne (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5). Ein signifikanter Unterschied zur DAPI-Intensität von Zellkernen von Oenozytoiden bestand nicht (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5).

Die Zellkerne von gespreiteten Plasmatozyten nahmen eine große Fläche ein und waren oval oder rundlich mit unregelmäßigem Querschnitt (Abbildung 4.4 B''). Die Zellkernmorphologie dieses Zelltyps ist dem starken Abflachen der Zelle geschuldet. Die DAPI-Intensität gespreiteter Plasmatozyten war mit $3,85 \pm 0,95$ -facher Intensität von granulären Zellen die größte aller Hämozytentypen (Abbildung 4.5). Sie unterschied sich signifikant von allen anderen Hämozytentypen hinsichtlich der DAPI-Intensität (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5). Oenozytoide besaßen einen Zellkern, der rund im Querschnitt war (Abbildung 4.4 C'', E'') und eine relativ hohe DAPI-Intensität aufwies ($3,20 \pm 1,28$ -fache Intensität von granulären Zellen, Abbildung 4.5). Die DAPI-Intensität unterschied sich signifikant von allen anderen Hämozytentypen außer den runden Plasmatozyten (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5).

Sphärule Zellen wiesen den kleinsten Zellkern aller Hämozytentypen auf, die Form variierte von unregelmäßig-rund über dreieckig oder halbmondförmig bis zu langgestreckt-oval (Abbildung 4.4 D''). Die variable Form des Zellkerns kann auf das Auftreten der namensgebenden großen zytoplasmatischen Einschlüsse (Sphärulen) zurückgeführt werden, die den Nukleus in die jeweilige Form pressen. Die relative DAPI-Intensität war die niedrigste aller Hämozytentypen ($0,81 \pm 0,25$ -fache Intensität von granulären Zellen) und unterschied sich signifikant von allen anderen Hämozytentypen (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5). Hämozyten, die mit PNA an der Zellmembran markiert wurden (sphärulen Zellen wurden getrennt betrachtet) besaßen einen annähernd kreisrunden Zellkern (Abbildung 4.4 E''), der morphologisch Zellkernen von granulären Zellen ähnelte. Die DAPI-Intensität betrug das $1,38 \pm 0,43$ -fache derer der Zellkerne von granulären Zellen (Abbildung 4.5) und unterschied sich signifikant von granulären Zellen, runden Plasmatozyten, gespreiteten Plasmatozyten, Oenozytoiden und sphärulen Zellen (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5). Zu der DAPI-Intensität gespreiteter granulärer Zellen bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.5, Tabelle A.4, Tabelle A.5).

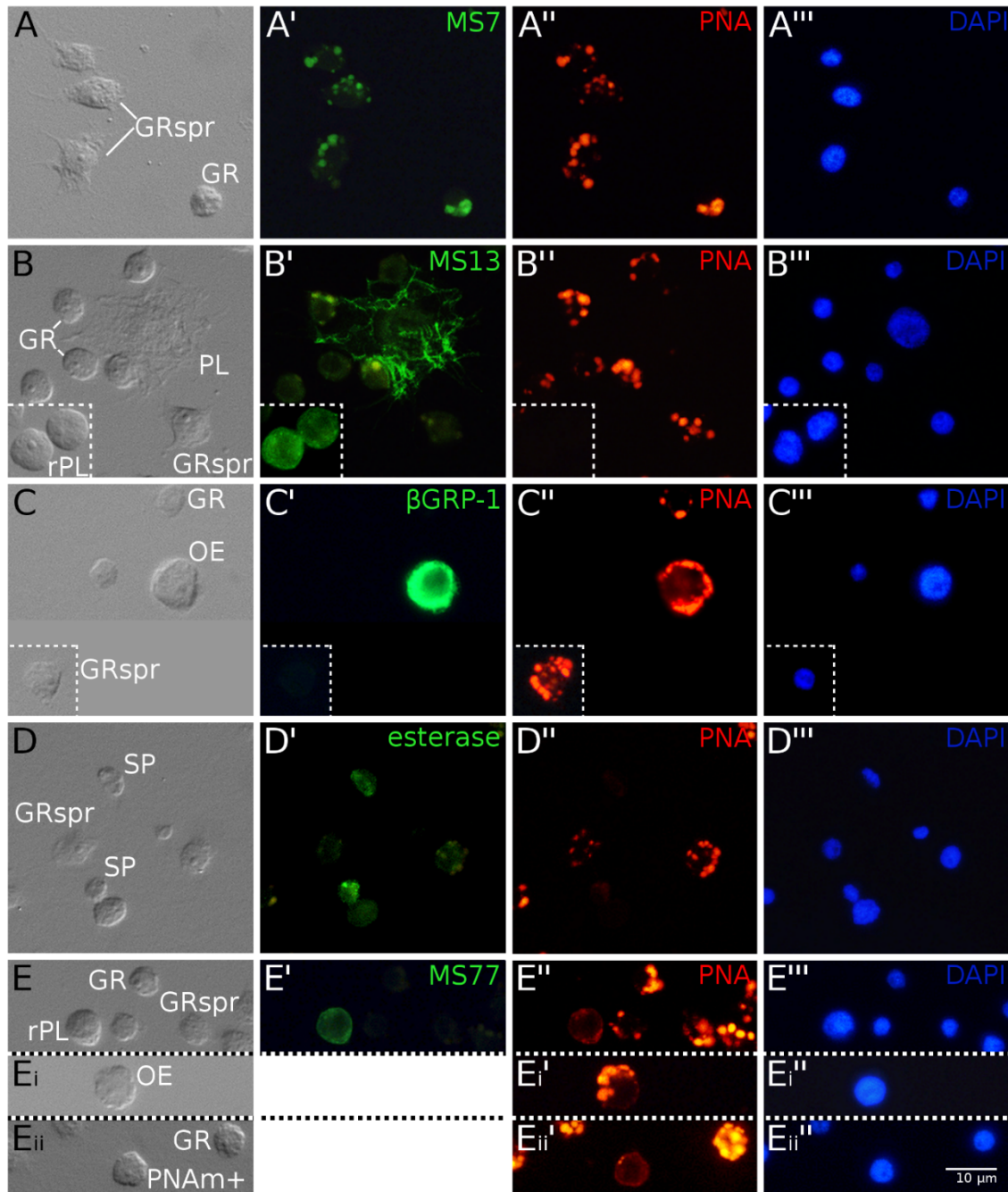


Abbildung 4.4: Zellkernmorphologie verschiedener Hämozytentypen.

A – A''': Granuläre Zellen (GR) besitzen einen Zellkern mit annähernd kreisrundem Querschnitt, der Nukleus kleiner gespreiteter Hämozyten (gespreitete granuläre Zellen, GRspr) ist rund bis oval. **B – B'''**: Die Zellkerne von Plasmatozyten (PL) und runden Plasmatozyten (rPL) sind groß und unregelmäßig geformt. Kleine gespreitete Hämozyten (GRspr) sind negativ für den Plasmatozytenmarker MS13 (B'). **C – C'''**: Oenozytoide (OE) besitzen einen annähernd kreisrunden, großen Nukleus. **D – D'''**: Der Zellkern sphärulärer Zellen ist klein und meist sehr unregelmäßig geformt. **E – E'''**: Zellkernmorphologie von Hämozyten mit PNA-positiver Zytoplasmamembran (PNA⁺). **E – E'''**: Eine ungespreitete Plasmatozyten (rPL) positiv für MS77 und PNA⁺. Der Zellkern ist unregelmäßig-oval. **E_i – E_i'''**: Oenozytoide können neben PNA-positiven Granulen eine PNA-positive Zellmembran besitzen (E_i'), der Zellkern ist kreisrund im Querschnitt und groß (E_i''). **E_{ii} – E_{ii}'''**: Eine Hämozyte mit PNA-positiver Zellmembran (PNA⁺) mit kreisrundem, kleinen Zellkern. Fortsetzung auf Folgeseite.

Fortsetzung Abbildung 4.4. Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, GRspr = gespreitete kleine Hämozyte mit Eigenschaften granulärer Zellen, OE = Oenozytoid, SP = sphärule Zelle, PL = Plasmatozyte, rPL = runde (ungespreitete) Plasmatozyte, PNAm+ = Hämozyte mit PNA-positiver Zellmembran. Der Messbalken in Eii'' gilt für alle Einzelabbildungen.

Der Messbalken in Eii'' gilt für alle Einzelabbildungen dieser Tafel. Erste Spalte: differentielle Interferenzkontrastaufnahmen, restliche Aufnahmen: Fluoreszenzmikroskopie.

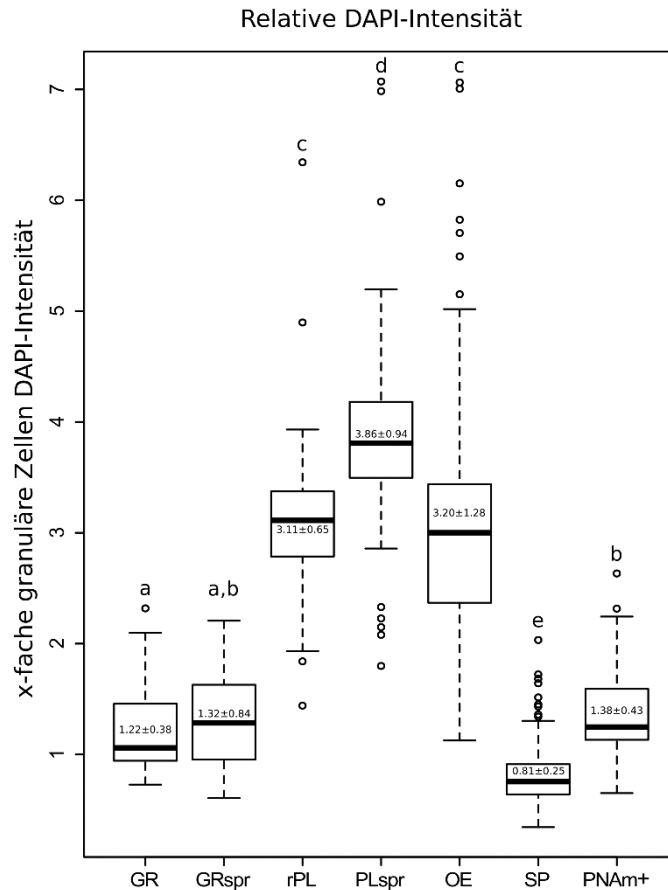


Abbildung 4.5: Relative Stärke des DAPI-Signals der Zellkerne verschiedener Hämozytentypen.

Die DAPI-Intensität ist in Relation zur DAPI-Intensität von granulären Zellen angegeben und dient als Indiz für den DNA-Gehalt der Hämozytentypen. Die DAPI-Intensität für granuläre Zellen (GR) zeigt den durchschnittlichen Wert der Gesamtheit der GR gegenüber der für die Normalisierung verwendeten, nicht-mitotischen GR. Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede an ($p \leq 0,05$ Mann-Whitney-U-Test). Einzeldaten in Tabelle A.5. Für die Analysen wurden $n = 87$ (GR), $n = 112$ (GRspr), $n = 76$ (rPL), $n = 60$ (PLspr), $n = 66$ (OE), $n = 174$ (SP) und $n = 46$ (PNAm+) Hämozyten von $n = 5$ L5d2-Larven untersucht.

Abkürzungen: GR = granuläre Zellen, GRspr = gespreitete kleine Hämozyten mit Eigenschaften granulärer Zellen, OE = Oenozytoide, SP = sphärule Zellen, PL = Plasmatozyten, rPL = runde (ungespreitete) Plasmatozyten, PNAm+ = Hämozyten mit PNA-positiver Zellmembran.

4.1.5 Aufbau und histologische Analyse des hämatopoetischen Organs

Im zweiten und dritten Thorakalsegment von *M. sexta*-Larven befinden sich assoziiert mit den Flügelimaginalanlagen die hämatopoetischen Organe. Die hämatopoetischen Organe bestehen aus mehreren kleineren und wenigen großen Loben (Abbildung A.9, Abbildung 2.2 C). Die Zellen und die extrazelluläre Matrix (ECM) wiesen konkrete Organisationsmerkmale auf.

Deutlich erkennbar war eine Organisation innerhalb der Loben in Bereiche mit dicht gepackten Zellen und Bereiche mit locker assoziierten Zellen. Die kompakten Bereiche waren bevorzugt nahe der Flügelanlage (proximal) zu finden, die locker assoziierten Zellen im zentralen Bereich und dem der Flügelanlage abgewandten (distalen) Bereich (Abbildung 4.6).

Die ECM des hämatopoetischen Organs, von Tracheen, Flügelanlage und Muskeln konnte u. a. mit der Pikro-Siriusrot Färbemethode (Abbildung 4.6 A, A') und dem anti-*D. melanogaster* Laminin B2-Immunserum (anti-LanB2; Abbildung 4.6 B, Abbildung A.2 B) markiert werden. Laminine sind integrale Bestandteile der Basallamina (TIMPL *et al.*, 1979). Die Markierung mit anti-LanB2 wies deshalb die markierten Strukturen als Basallamina aus. Die Basallamina des proximalen (der Flügelanlage zugewandten) Bereichs des hämatopoetischen Organs unterschied sich von dem des distalen (der Flügelanlage abgewandten) Bereichs. Die proximale Oberfläche war von einer geschlossenen Basallamina abgegrenzt, während die Basallamina des distalen Bereichs von zahlreichen Lücken durchbrochen war (Abbildung 4.6 A', B'). Über diese Unterbrechungen der Basallamina kann eine Kommunikation mit dem Hämocoel stattfinden, bspw. das Auswandern von Hämocyten. Die Basallamina durchzog außerdem die innere Zellmasse der Loben (Abbildung 4.6 A') Einige Zellen des hämatopoetischen Organs waren augenscheinlich in eine eigene kollagen- bzw. lamininhaltigen Matrix eingebettet (Abbildung 4.6 A', B', leere Pfeile). Dabei könnte es sich entweder um randständig liegende Zellen innerhalb eines Lobus handeln, so dass der Eindruck einer isoliert vorliegenden Zelle entstehen konnte, oder um eine individuelle Basallamina der Zellen.

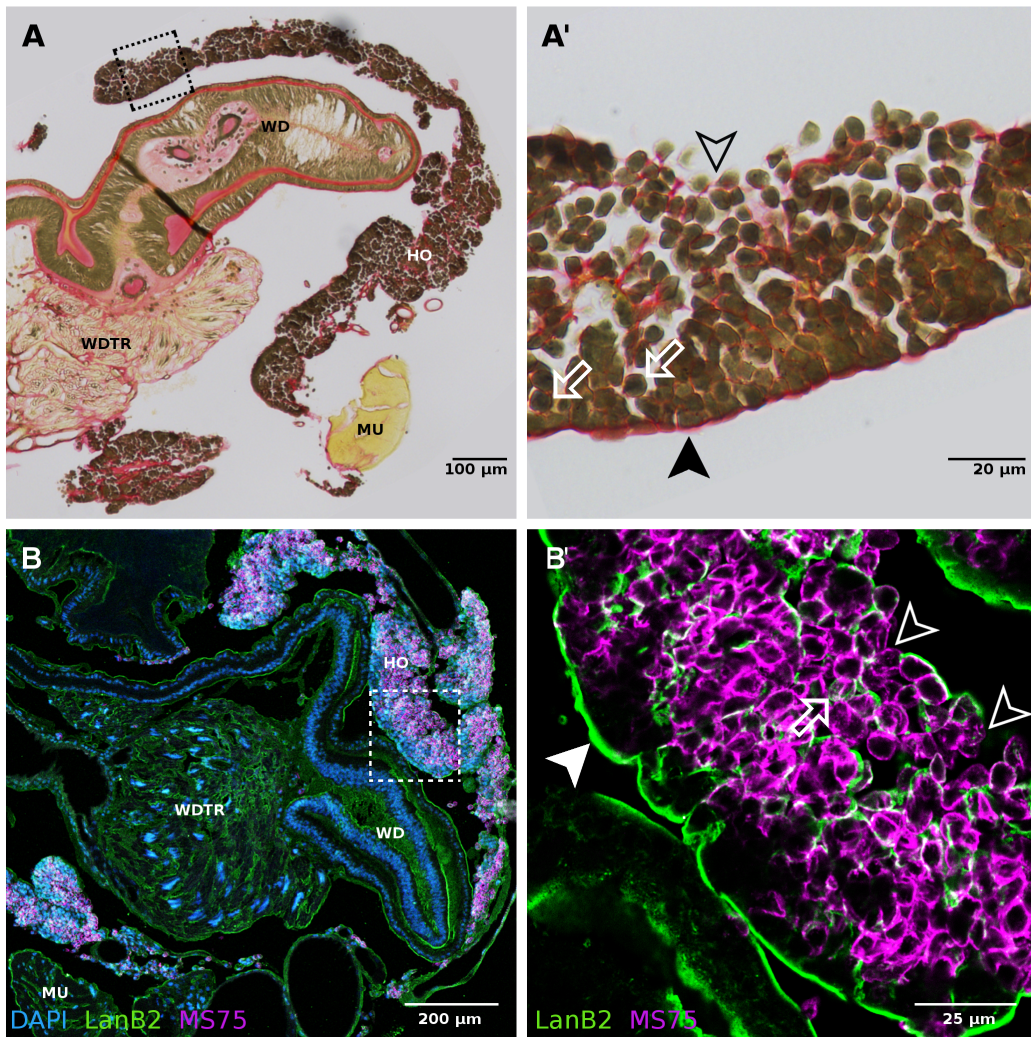


Abbildung 4.6: Aufbau des hämatopoetischen Organs und Lokalisation der extrazellulären Matrix.

A, A': Mesothorakales hämatopoetisches Organ einer L5d7-Larve (Herzstadium). Paraffinschnitt, 7 µm, Pikro-Siriusrot-Färbung mit Hämatoxylin nach Weigert: Kollagen: rot, Zellkerne: braun, Zytoplasma: gelb. **A:** Lagebeziehung des hämatopoetischen Organs zur Flügelanlage. **A':** Ausschnitt aus A, schwarze Pfeilspitze: Durchgehende ECM der proximalen Oberfläche. Proximal liegende Zellen sind dicht gepackt. Leere Pfeilspitze: ECM mit Unterbrechungen an der distalen Oberfläche. Zellen des distalen Bereichs sind locker assoziiert. Leere Pfeile: Zellen in verzweigter, kollagenhaltiger Matrix. **B, B':** Mesothorakales hämatopoetisches Organ einer L5d2-Larve. Paraffinschnitt, 7 µm, Immunfluoreszenzmarkierung mit anti-LanB2 (grün) und MS75 (magenta), Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. KLSM Aufnahme. **B:** Anti-LanB2 markiert die Basallamina (BL) der Flügelimaginalanlage, Tracheen, Muskeln und des hämatopoetischen Organs. **B':** Ausschnitt aus B, weiße Pfeilspitze: Durchgehende BL an der proximalen Oberfläche. Leere Pfeilspitze: BL mit Unterbrechungen an der distalen Oberfläche. Leerer Pfeil: von BL umgebene Zelle. Abkürzungen: WD = Flügelimaginalanlage, WDTR = Tracheenknäuel der Flügelimaginalanlage, HO = hämatopoetisches Organ, MU = Muskel. A, A': Hellfeldmikroskopie, B, B': KLSM-Aufnahmen.

4.1.6 Identifizierung von Hämozytentypen im hämatopoetischen Organ

Mit Hilfe von Antikörpern, Lektinen, enzymatischen Nachweisen sowie RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurden sich im hämatopoetischen Organ befindende Hämozytentypen identifiziert. Hierbei lag das Hauptaugenmerk darauf, ob Marker für bestimmte Hämozytentypen Zellen des hämatopoetischen Organs binden und so die Bildung dieser Hämozytentypen durch das hämatopoetische Organ angenommen werden kann.

4.1.6.1 Oenozytoide

Das anti-*Bombyx mori* Prophenoloxidase-Immunsrum (anti-PPO) markierte keine Zellen des hämatopoetischen Organs. In seltenen Fällen konnten Hämozyten, die auch morphologisch als Oenozytoide identifiziert wurden, am hämatopoetischen Organ oder angrenzenden Tracheen adhärierend mit diesem Antikörper markiert werden (Abbildung 4.7 C, C').

Anti-*M. sexta* Prophenoloxidase-Immunsrum markierte keine Zellen des hämatopoetischen Organs. Ausschließlich Oenozytoide in Hämozytenaggregaten und adhärierend an der Oberfläche des hämatopoetischen Organs wurden mit diesem Antikörper markiert (Daten nicht gezeigt).

Mit dem anti- β -1,3-*glucan recognition protein 1* (β GRP-1-) Immunsrum konnten keine Zellen im hämatopoetischen Organ markiert werden. Es wurden vereinzelt β GRP-1 positive Zellen mit dem hämatopoetischen Organ assoziiert nachgewiesen. Diese Zellen lagen stets adhärant außerhalb der Basallamina der hämatopoetischen Organ-Loben oder mit Tracheen assoziiert vor (Abbildung 4.7 D). Die β GRP-1-positiven Zellen konnten außerdem mit der Flügelanlage oder Hämozytenaggregationen assoziiert sein (Daten nicht gezeigt).

Mit dem enzymatischen Aktivitätsnachweis von Phenoloxidase (PO) mittels Oxidation von Diaminobenzidin (DAB), wie es zur Identifikation von Oenozytoiden auf Hämozytenmonolayern eingesetzt wird, konnten keine Zellen des hämatopoetischen Organs markiert werden. In wenigen Präparaten konnten PO-positive Zellen an hämatopoetischen Organen, Tracheen und Flügelanlage adhärierend nachgewiesen werden (Abbildung 4.7 B). Bei gleichzeitiger Zugabe des Phenoloxidaseinhibitors Phenylthioharnstoff (PTU) wurden auf Hämozytenmonolayer und hämatopoetischen Organen keine Oenozytoide oder sonstige Zellen markiert. Die Inhibition von Peroxidaseaktivität durch Zugabe von Natriumazid beeinträchtigte die Enzymaktivität und somit die Markierung von Oenozytoiden auf Hämozytenmonolayern und hämatopoetischen Organen nicht.

Mittels *in-situ*-RNA-Hybridisierung wurde zusätzlich ein Nachweis der Prophenoloxidase-(PPO-) mRNA durchgeführt. Die PPO-mRNA-Sonde markierte auf Hämozytenmonolayer ausschließlich Oenozytoide (Daten nicht gezeigt), dies entspricht auch den von JIANG *et al.* (1997) gezeigten

Ergebnissen. Vereinzelt konnten an den hämatopoetischen Organen adhärierende, PPO-mRNA-positive Zellen nachgewiesen werden. Diese lagen nie innerhalb der Loben des hämatopoetischen Organs (Abbildung 4.7 A).

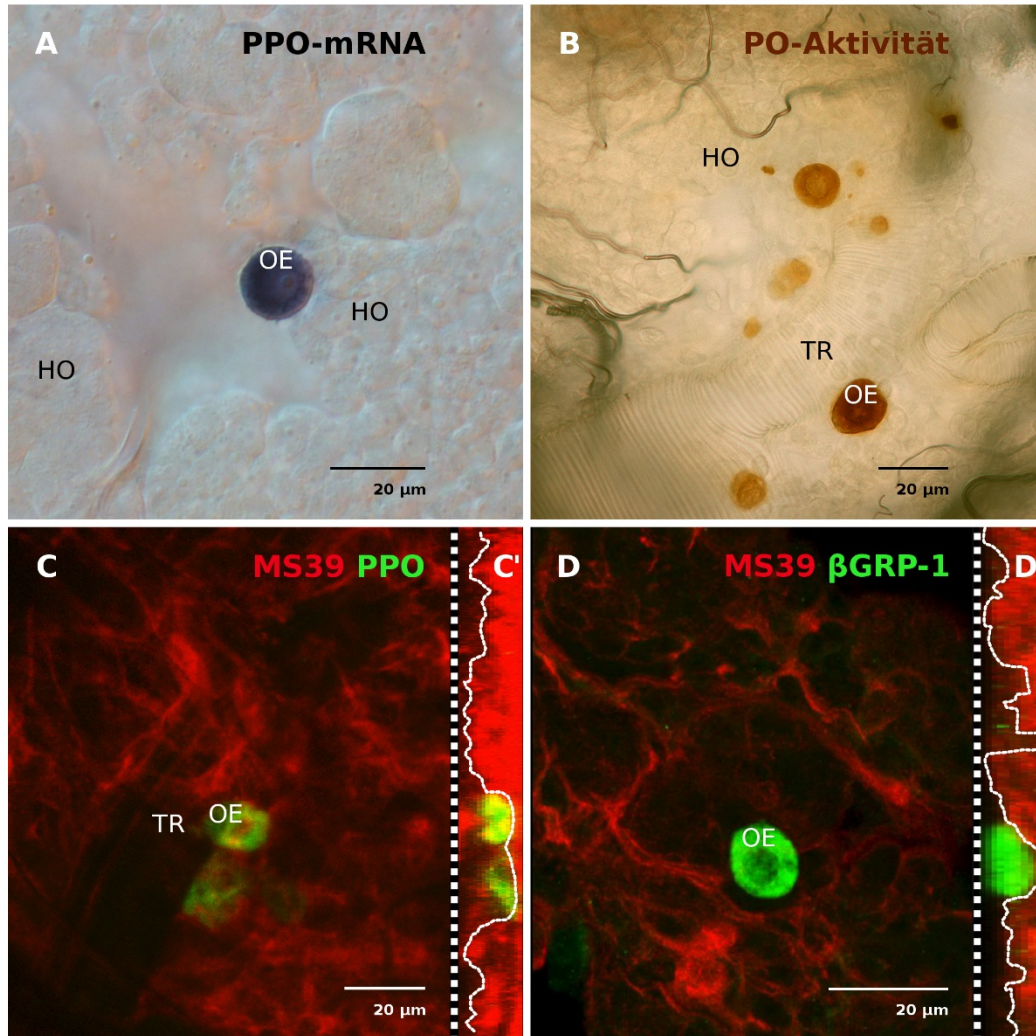


Abbildung 4.7: Hämatopoetische Organe beinhalten keine Oenozytoide.

A: Prophenoloxidase-mRNA wird in Oenozytoiden synthetisiert. Diese Oenozytoide liegen nicht innerhalb der hämatopoetischen Organe. **B:** Phenoloxidaseaktivitätsnachweis mit H_2O_2 und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Hämatopoetische Organe wurden mit 100 % Aceton für 4 min bei $-20^\circ C$ fixiert, mehrfach mit 50 mM Tris, pH 7,5, gewaschen und mit 2,33 mM DAB, 128 μM H_2O_2 , 150 mM Natriumazid in 50 mM Tris, pH 7,5, bis zum Farbumschlag entwickelt. Oenozytoide (braun) befinden sich außerhalb des hämatopoetischen Organs. **C:** Nachweis von Prophenoloxidase mit anti-PPO-Immunsereum. PPO-positive Oenozytoide adhärieren an der Basallamina (MS39-positiv). KLSM-Aufnahme. **C':** Z-Ebenen-Rekonstruktion von C. Die gestrichelte Linie markiert die MS39-positive Basallamina des hämatopoetischen Organs. Die PPO-positiven Oenozytoide liegen auf der Basallamina und nicht innerhalb des hämatopoetischen Organs. **D:** β -1,3-*glucan recognition protein-1*- (β GRP-1-) positive Zellen adhärieren an der MS39-positiven Basallamina. KLSM-Aufnahme. **D':** Z-Ebenen-Rekonstruktion von D. Die gestrichelte Linie markiert den Verlauf der Basallamina. Die β GRP-1-positive Oenozytoide liegt außerhalb des hämatopoetischen Organs.

Abkürzungen: HO = hämatopoetisches Organ, OE = Oenozytoide, TR = Trachee. A, B: differentielle Interferenzkontrastaufnahme, C, D: KLSM-Aufnahmen, Projektion mehrerer konfokaler Ebenen.

4.1.6.2 Sphärule Zellen

Anti-*Ephestia kuehniella* Esterase Immunsersum markierte keine Strukturen des hämatopoetischen Organs. Auch konnten keine Esterase-positiven adhärenenten Zellen an der Außenseite des hämatopoetischen Organs gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.6.3 Granuläre Zellen

Die granuläre Zellen Marker mAbs MS7 und MS21, sowie der granuläre Zellen und Oenozytoide bindende mAb MS2 markierten keine Zellen des hämatopoetischen Organs. Einzig einige wenige granuläre Zellen, die an der Basallamina des hämatopoetischen Organs oder an Tracheen adhärirten, oder in Hämocytenaggregaten lagen, waren positiv für diese Marker (für MS7 und MS21: Abbildung 4.8). Anders verhielt es sich mit dem granuläre Zellen und Oenozytoide markierenden mAb MS39 Dieser markierte keine Zellen des hämatopoetischen Organs, sondern die das hämatopoetische Organ umgebende Basallamina (Abbildung 4.7 C, D, Abbildung A.2 C) und daran adhärirende granuläre Zellen. Das granuläre Zellen und Oenozytoide markierende anti-*D. melanogaster* Laminin B2-Immunsersum (anti-LanB2) markierte ebenfalls die Basallamina des hämatopoetischen Organs (siehe Abschnitt 4.1.5; Abbildung 4.6 B, B', Abbildung 4.8). Vereinzelt konnten kleine, separat umhüllt erscheinende Bereiche im hämatopoetischen Organ auf histologischen Schnitten markiert werden, diese könnten separat von Basallamina umhüllte Zellen oder angeschnittene Randbereiche eines Lobus sein (siehe Abschnitt 4.1.5; Abbildung 4.6 B', leerer Pfeil).

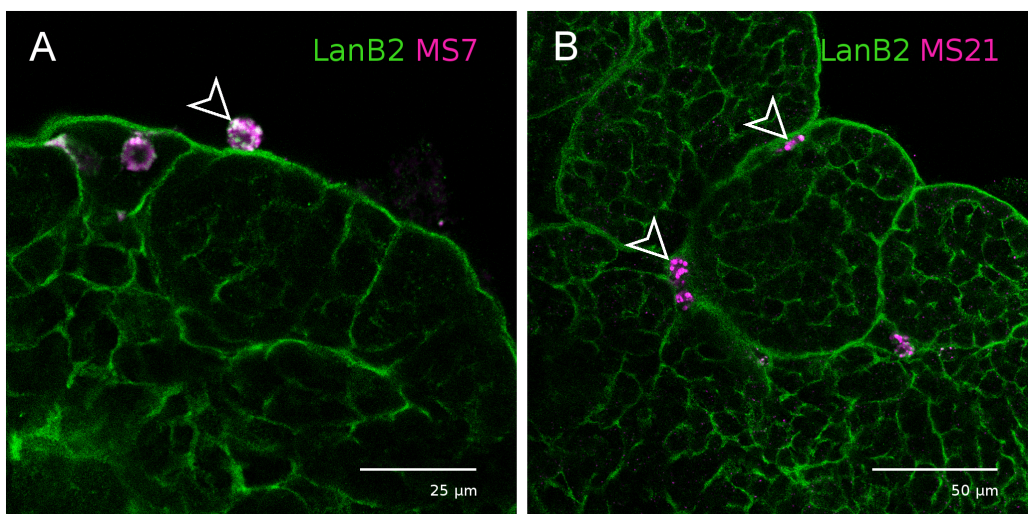


Abbildung 4.8: Hämatopoetische Organe beinhalten keine granulären Zellen.

Grün = anti-Laminin B2 (LanB2) markierte Basallamina. Fortsetzung auf Folgesseite.

Fortsetzung Abbildung 4.8. A: Der mAb MS7 markiert granuläre Zellen (magenta, leere Pfeilspitze) außerhalb des hämatopoetischen Organs. Weiße Granulen beinhalten gleichzeitig das MS7-Epitop und LanB2. **B:** MS21-positive granuläre Zellen (magenta) liegen außerhalb des hämatopoetischen Organs zwischen den Loben (leere Pfeilspitzen). KLSM-Aufnahmen.

4.1.6.4 Plasmatozyten

Antikörper, die Plasmatozyten oder Plasmatozyten und weitere Hämozytentypen binden sind in Tabelle 4.3 aufgelistet. Mit diesen wurde geprüft, ob eine Markierung von Zellen des hämatopoetischen Organs auftritt. Für alle beschriebenen Plasmatozytenmarker konnte eine Bindung an Zellen des hämatopoetischen Organs gezeigt werden. Allen eingesetzten Plasmatozytenmarker ist gemein, dass sowohl bei Hämozytenmonolayern als auch bei Zellen des hämatopoetischen Organs die Zytoplasmamembran markiert wurde (Hämozyten: Abbildungen 4.1 – 4.3; hämatopoetisches Organ: Abbildungen 4.9 – 4.12).

Die Verteilung der positiven Zellen im hämatopoetischen Organ wird im folgenden Kapitel detailliert beschrieben. Für die Plasmatozytenmarker MS13, MS75, und Neuroglian (NG3B11) wurden auch der Anteil der positiven Zellen im hämatopoetischen Organ (siehe Abschnitt 4.1.7.4) und die mitotische Aktivität innerhalb der markierten Zellpopulationen bestimmt (siehe hierzu Abschnitt 4.1.8).

4.1.7 Zellsubpopulationen und Zonierung des hämatopoetischen Organs

Alle untersuchten Marker für Plasmatozyten (MS13, MS75, MS77, NG3B11, anti-HRP: Abbildungen 4.9 – 4.12) markierten Zellen des hämatopoetischen Organs. Außerdem konnten Zellen des hämatopoetischen Organs mit *Arachis hypogaea* Lektin (PNA) markiert werden (Abbildung 4.9 D, Abbildung 4.12 B, D – F, Abbildung 4.13 D). Die Verteilung der durch anti-HRP, MS75, MS77 und PNA markierten Zellen innerhalb des hämatopoetischen Organs ist nachfolgend auf histologischen Schnitten gezeigt (Abbildung 4.9). Mit den mAbs MS13 und NG3B11 konnten keine Zellen in unbehandelten, mit Trypsin behandelten oder in Citrat-Puffer erhitzten Paraffinschnitten markiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisierung MS13- und NG3B11-positiver Zellen im hämatopoetischen Organ wurde jedoch bereits von NARDI *et al.* (2003) gezeigt. Anti-HRP-positive Zellen (Abbildung 4.9 A) waren im proximalen und distalen Bereich sowie in der inneren Zellmasse des hämatopoetischen Organs zu finden. Einige Bereiche der proximalen Oberfläche waren nicht HRP-positiv. Mit MS75 ließen sich die distalen Zellen und die Zellen der inneren Zellmasse des

hämatopoetischen Organs markieren (Abbildung 4.9 B). Die proximal zur Flügelanlage liegenden Zellen waren in einem dünnen, etwa drei bis vier Zellen starken Streifen MS75-negativ. In allen Bereichen des hämatopoetischen Organs markierte der mAb MS77 Zellen. Jedoch fanden sich weniger MS77-positive Zellen im proximalen Bereich als im distalen Bereich (Abbildung 4.9 C). PNA-positive Zellen befanden sich v. a. im distalen Bereich. Die Zellen des proximalen Bereichs wurden größtenteils nicht durch PNA markiert (Abbildung 4.9 D).

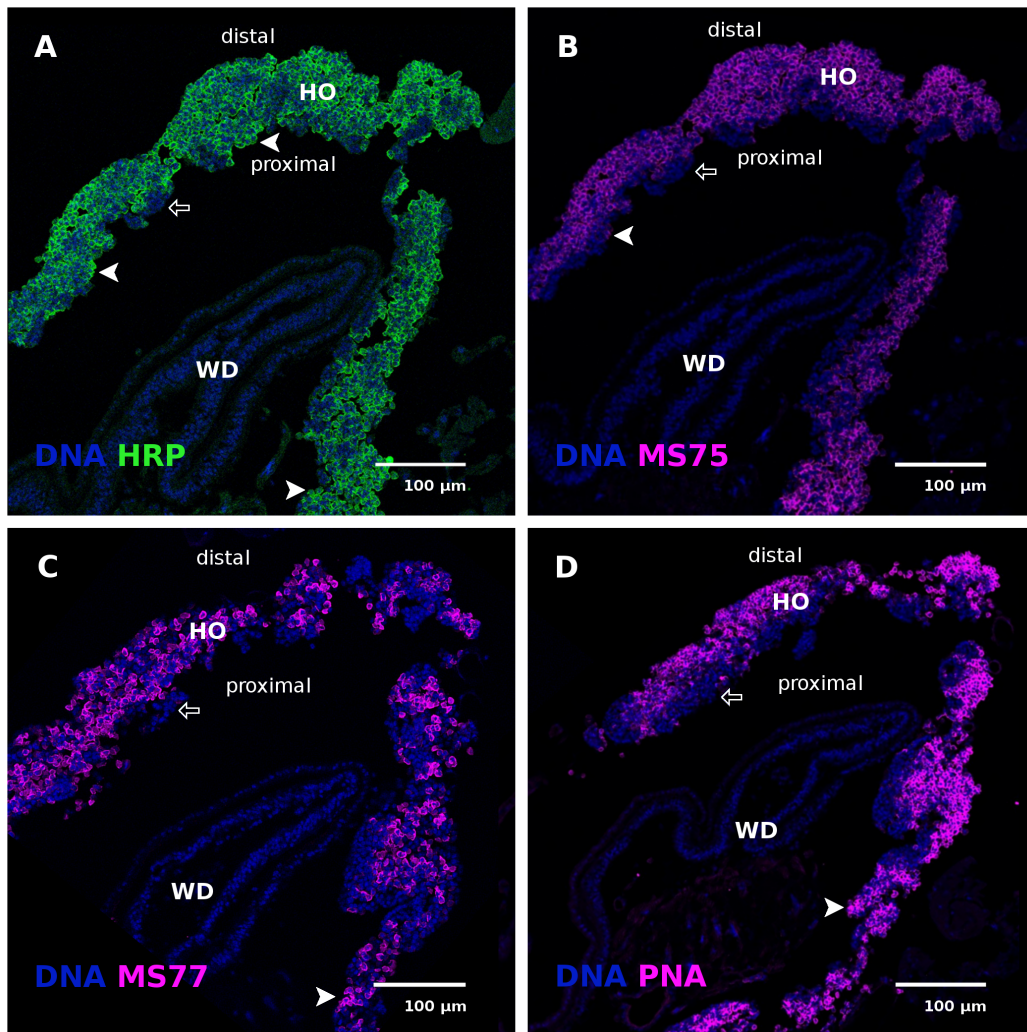


Abbildung 4.9: Verteilung der mit anti-HRP, MS75, MS77 und PNA markierbaren Zellsubpopulationen im hämatopoetischen Organ (HO) einer L5d2-Larve.

Paraffinserienschnitt, 7 µm, durch den zentralen Bereich des hämatopoetischen Organs. Zellkerne mit DAPI markiert (blau). **A – D:** Leere Pfeile: Region, die für die gezeigten Marker negativ ist. Weiße Pfeilspitzen: positive Zellen der proximalen Region. **A:** Anti-HRP-positive Zellen (grün). **B:** MS75-positive Zellen (magenta). **C:** MS77-positive Zellen (magenta). **D:** PNA positive Zellen (magenta).

Abkürzungen: HO = hämatopoetisches Organ, WD = Flügelimaginalanlage. KLSM-Aufnahmen.

Um eine differentielle Identifizierung dieser Zellpopulationen zu ermöglichen wurden Mehrfachmarkierungen mit monoklonalen Antikörpern verschiedener Ig-Klassen und adäquaten sekundären Antikörpern, dem anti-HRP-Immunsersum, sowie dem Lektin PNA auf Paraffinschnitten und *whole-mount*-Präparaten des hämatopoetischen Organs durchgeführt (Übersicht in Tabelle 4.4, Abbildungen 4.9 – 4.12, Abbildung A.15 im Appendix). In allen eingesetzten Kombinationen wurden Zellen des hämatopoetischen Organs identifiziert, die für beide Marker positiv sind aber auch solche, die jeweils nur von einem Antikörper bzw. dem Lektin PNA markiert wurden (Tabelle 4.4, Abbildungen 4.9 – 4.12).

Im hämatopoetischen Organ ließen sich Zonen darstellen, welche von Zellen dominiert werden, die positiv für nur einen Marker waren (Abbildung 4.10, Abbildung 4.12). Diese Bereiche waren teilweise recht großflächig (MS13: Abbildung 4.11 A) oder beschränkten sich auf kleine Zellgruppen (MS77: Abbildung 4.10 C). Mitunter ergänzten sich die unterschiedlich markierbaren Zellgruppen von der Lage her so, dass eine Zonierung in bestimmte Bereiche erkennbar war (für Neuroglian- bzw. MS77-positive Zellen siehe Abbildung 4.12 F).

4.1.7.1 Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs mit MS13, MS75 und MS77

Nicht alle Zellen des hämatopoetischen Organs sind MS75-positiv (Abbildung 4.9 B, Abbildung 4.10 B; quantitative Auswertung: Abbildung 4.14 A). Trotzdem konnten bei Mehrfachmarkierung mit MS13 bzw. MS77 und MS75 keine Zellen des hämatopoetischen Organs identifiziert werden, die positiv für MS13 bzw. MS77 waren und dabei keine MS75-Markierung aufwiesen. *Vice versa* konnten jedoch MS75-positive Zellen des hämatopoetischen Organs negativ für MS13 und MS77 sein (Abbildung 4.10, weißer Pfeil). Auffällig war weiter, dass einige Zellen die von den mAbs MS75 und/oder MS77 markiert wurden negativ für mAb MS13 waren (Abbildung 4.10, punktierter Kreis) während andere Zellen durch alle drei mAbs gebunden wurden (Abbildung 4.10, weiße Pfeilspitze). Des Weiteren konnte Zellen identifiziert werden, die durch MS13 und MS75 markiert wurden, jedoch nicht durch MS77 (Abbildung 4.10, leere Pfeilspitze).

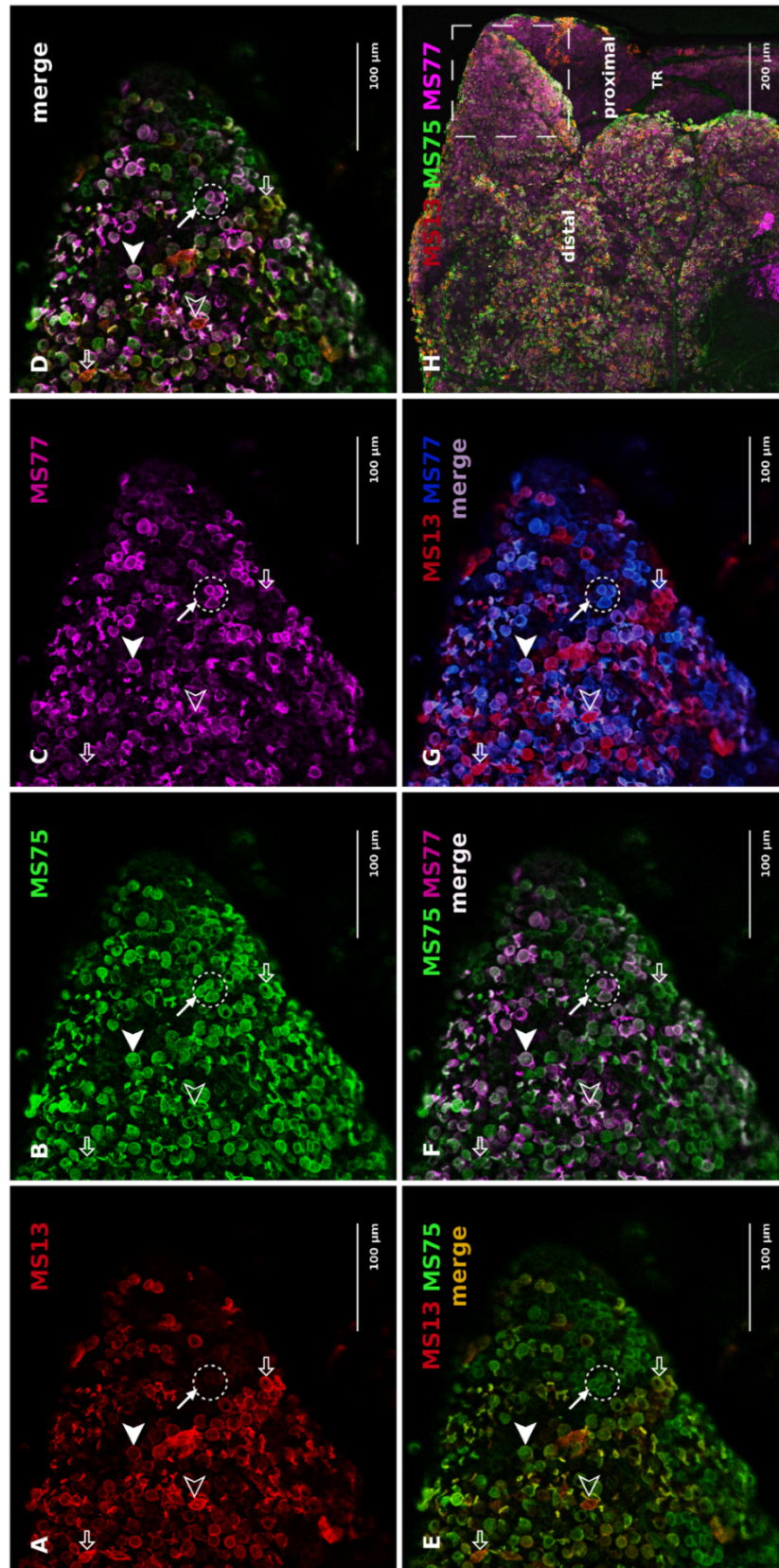


Abbildung 4.10: Mehrfachmarkierung der Zellen eines hämatopoetischen Organs einer L5d2-Larve mit MS13, MS75 und MS77.

Fortsetzung auf Folgeseite.

Fortsetzung Abbildung 4.10. **A – G:** Gefüllte Pfeilspitze: Zelle positiv für alle drei eingesetzten Marker. Leere Pfeilspitze: spindelförmige Plasmatozyte, die MS13 und MS75 positiv und MS77 negativ ist. Punktierter Kreis: MS13-negativer und MS75- und MS77-positiver Bereich. Weißer Pfeil: MS75-positive Zelle, die MS13- und MS77-negativ ist. Leere Pfeile: MS75 und MS13 positive Zellen, die MS77-negativ sind. **A – C:** Markierung durch den jeweiligen Antikörper an der distalen Oberfläche. **D:** Überlagerung der in A-C gezeigten Markierungen. **E:** MS13-positive (rot) und MS75-positive (grün) Zellen. **F:** MS75-positive (grün) und MS77-positive (magenta) Zellen. **G:** MS77- (blau) und MS13-positive (rot) Zellen. **H:** Übersicht des hämatopoetischen Organs und der in A – G detailliert dargestellte Bereich (gestricheltes Quadrat). KLSM-Aufnahmen; H: Projektion mehrerer konfokaler Ebenen.

4.1.7.2 Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs mit MS13, MS77 und NG3B11

Mittels Mehrfachmarkierung mit den mAbs MS13, MS77 und NG3B11 konnte gezeigt werden, dass einige Zellen im hämatopoetischen Organ gleichzeitig alle drei Marker tragen können (Abbildung 4.11 A – F). Dies widerspricht publizierten Beobachtungen, wonach MS13-positive Zellen im hämatopoetischen Organ immer NG3B11-negativ sind (NARDI *et al.*, 2003). Neben den in der inneren Zellmasse des hämatopoetischen Organs liegenden Zellen sind auch große, an der Oberfläche liegende Zellen durch MS13 und NG3B11 markiert (Abbildung 4.11 G – I, gestricheltes Quadrat), bei denen es sich um adhärierende Plasmatozyten handeln kann. Zonen mit ausschließlich NG3B11-positiven Zellen konnten ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 4.11 A – F, gelb umrandeter Bereich, Abbildung 4.11 G – I, weiße Pfeile).

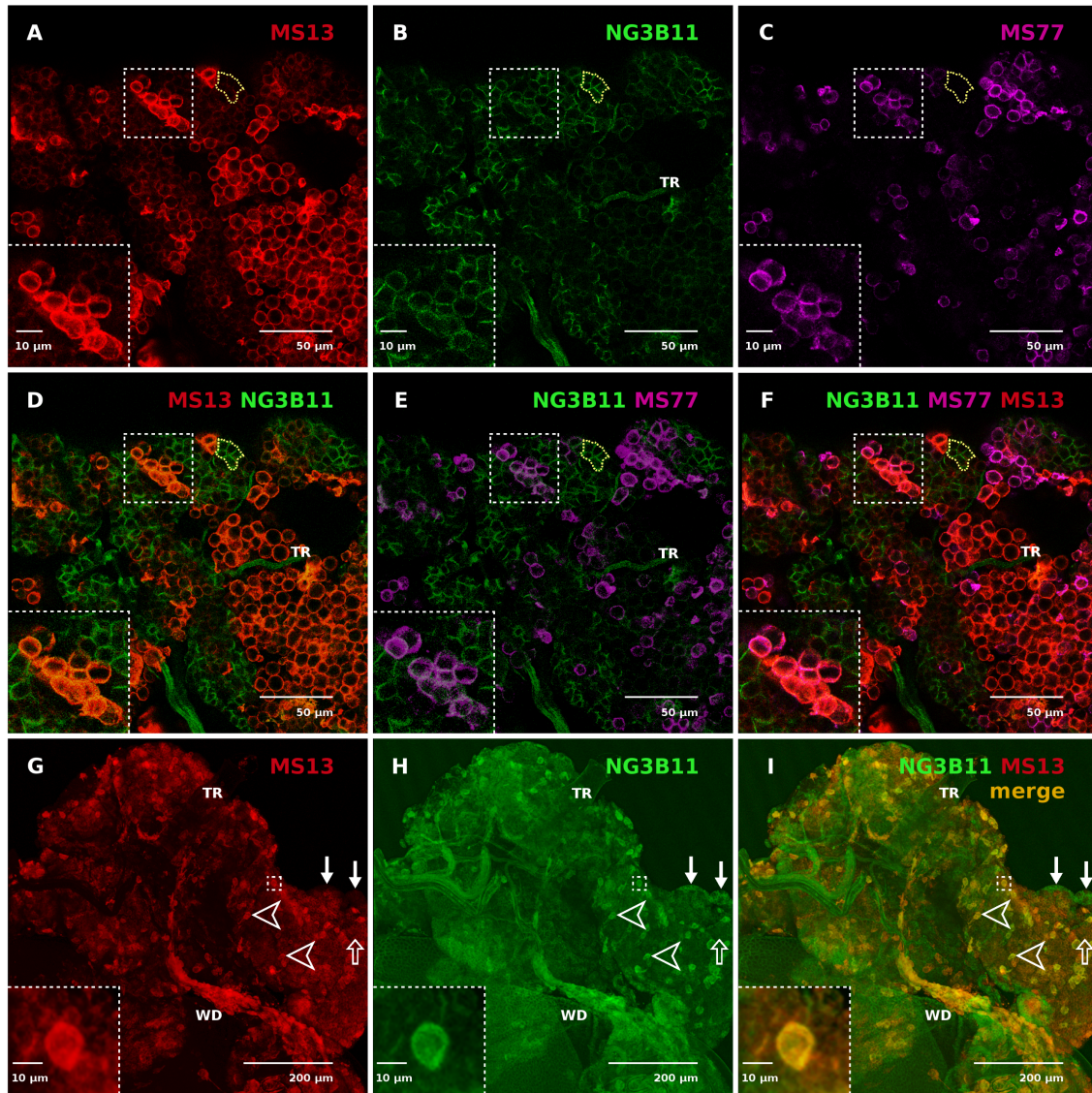


Abbildung 4.11: Mehrfachmarkierung hämatopoetischer Organe von L5d2-Larven mit MS13, MS77 und NG3B11.

A – F: Dreifachmarkierung mit MS13, NG3B11 und MS77, mesothorakales hämatopoetisches Organ; **G – I:** Doppelmarkierung mit MS13 und NG3B11, metathorakales hämatopoetisches Organ. Die distale Oberfläche des hämatopoetischen Organs weist MS13-positive (rot, **A**), NG3B11-positive (grün, **B**) und MS77-positive Zellen (magenta, **C**) auf. Weiß gestrichelte Quadrate: Zellgruppe gleichzeitig positiv für MS13, NG3B11 und MS77. Gelb gestrichelte Umrandung: Ausschließlich NG3B11-positive Zellgruppe. **G – I:** Leere Pfeilspitzen und gestricheltes Quadrat: Große Zellen, die gleichzeitig positiv für MS13 und NG3B11 sind. Leerer Pfeil: Bereich mit ausschließlich MS13 positiven Zellen. Weißer Pfeil: Bereich mit ausschließlich NG3B11-positiven Zellen. Zellen der Flügelanlage (WD) sind NG3B11-positiv. Die doppelt markierte Zelle im gestrichelten Quadrat liegt an oder auf der Oberfläche des Lobus.

Abkürzungen: WD = Flügelanlage; TR = Trachee. KLSM-Aufnahmen.

4.1.7.3 Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs mit MS77, PNA und NG3B11

Bei der Mehrfachmarkierung hämatopoetischer Organe mit den mAbs MS77 und NG3B11 sowie dem Lektin PNA fiel auf, dass wenige Zellen von allen drei Markern markiert wurden (Abbildung 4.12, weiße Pfeilspitze). NG3B11 markierte sowohl Einzelzellen als auch Zellgruppen von einer kapselartigen NG3B11-positiven Schicht umhüllte Zellgruppen (Abbildung 4.12, Asterisk). Innerhalb dieser Kapseln lagen sowohl NG3B11-positiv als auch PNA- und MS77-positiv Zellen. Weiter konnten PNA-positiv Bereiche, die aus mehreren angrenzenden Zellen bestehen, identifiziert werden, die negativ für NG3B11 und MS77 waren (Abbildung 4.12 D – F, weiß umrahmt) sowie MS77-positiv Zonen angrenzender Zellen, die negativ für PNA und NG3B11 waren (Abbildung 4.12 D – F, hellblau umrahmt). Einige vereinzelt liegende Zellen waren ausschließlich NG3B11-positiv (Abbildung 4.12, weißer Pfeil), andere wurden nur durch MS77 (Abbildung 4.12, gestrichelter Pfeil) oder PNA (Abbildung 4.12, weißer Doppelpfeil) markiert.

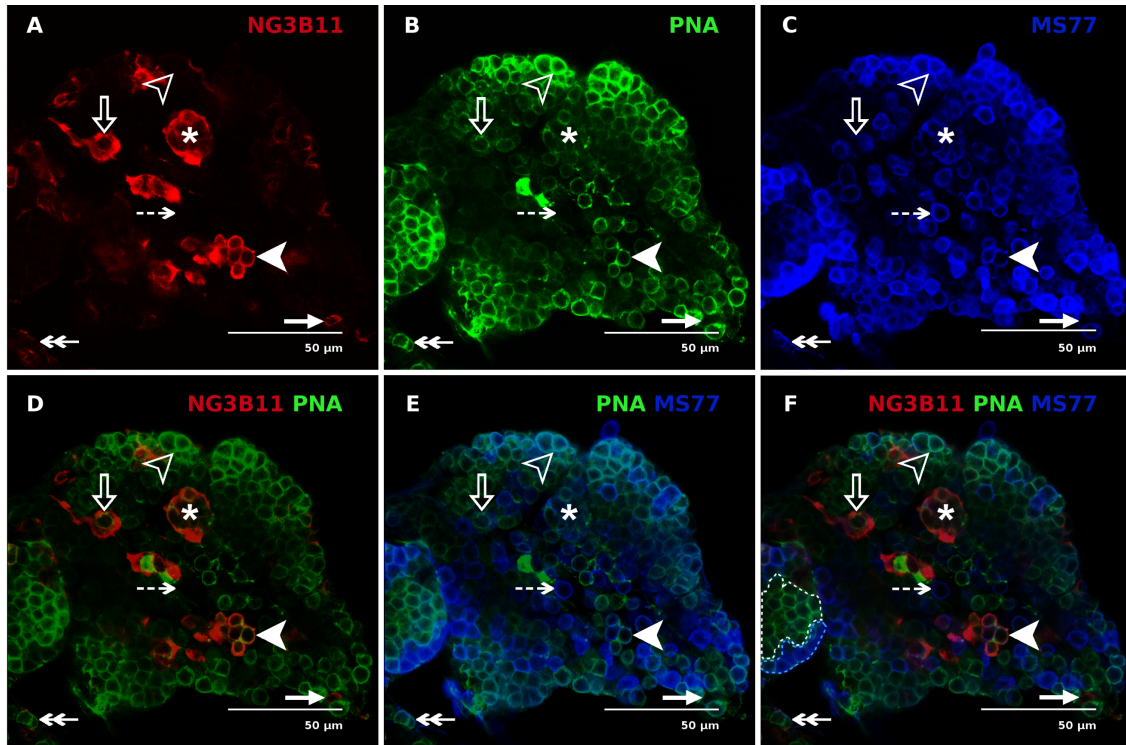


Abbildung 4.12: Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs einer L5d2-Larve mit NG3B11, PNA und MS77.

A: NG3B11-positive Zellen im hämatopoetischen Organ, teilweise in Gruppen angeordnet oder in aus mehreren Zellen bestehenden, von einer NG3B11-positiven Schicht umschlossenen „Kapseln“ (Asterisk). **B:** PNA-positive Zellen im hämatopoetischen Organ. **C:** MS77-positive Zellen des hämatopoetischen Organs. **D:** Gleichzeitige Darstellung der NG3B11-positiven (rot) und der PNA-positiven (grün) Zellen. **E:** Überlagerung der PNA-positiven (grün) und der MS77-positiven (blau) Zellen. **F:** Überlagerung der NG3B11-positiven, PNA-positiven und MS77-positiven Zellen.

Zellkerne mit DAPI markiert (blau). Weißer Pfeil: Ausschließlich NG3B11 positive Zelle. Doppelpfeil: Ausschließlich PNA-positive Zelle. Gestrichelter Pfeil: Ausschließlich MS77-positive Zelle. Leerer Pfeil: Zelle, die positiv für NG3B11 und PNA ist. Leere Pfeilspitze: Zelle, die positiv für PNA und MS77 ist. Weiße Pfeilspitze: Zelle, die positiv für NG3B11, PNA und MS77 ist. Weiße gepunktete Linie: PNA-positive Region. Hellblau gestrichelte Linie: MS77-positive Region. KLSM-Aufnahmen.

Tabelle 4.4: Doppelmarkierung von Zellen des hämatopoetischen Organs mit verschiedenen Hämozytenmarkern.

	MS75	MS77	NG3B11	PNA	anti-HRP
MS13	+	+	+	ND/- *	ND
MS75		+	N/A	+	+
MS77			+	+	+
NG3B11				+	ND
PNA					+

+ = Zellen positiv für beide Marker kommen vor, - = Zellen positiv für beide Marker kommen nicht vor, N/A = Doppelmarkierung mit der verwendeten Methode nicht möglich, ND = Nicht bestimmt.

* Vorhergehende Untersuchungen (C.-R. von BREDOW, 2010) zeigten keine gleichzeitige Markierung von Zellen des hämatopoetischen Organs durch MS13 und PNA.

4.1.7.4 Prozentualer Anteil durch MS13, MS75, NG3B11 oder PNA markierter Zellen im hämatopoetischen Organ

Die quantitative Auswertung der durch die mAbs MS13, MS75 und NG3B11 bzw. das Lektin PNA markierten Zellen des hämatopoetischen Organs ergab, dass keiner dieser Marker die Mehrheit aller Zellen markierte (Abbildung 4.14 B). Die meisten Zellen markierte MS75 ($23,52 \pm 8,81 \%$), gefolgt von NG3B11 ($15,36 \pm 5,20 \%$). MS13-positive Zellen machten den geringsten Anteil aus ($11,71 \pm 3,15 \%$). Der Anteil PNA-positiver Zellen schwankte stark zwischen den untersuchten Individuen (zwischen $2,58 \%$ und $45,35 \%$). Im Mittel waren $17,23 \pm 17,71 \%$ der Zellen des hämatopoetischen Organs PNA-positiv.

4.1.8 Mitotische Aktivität von Zellen des hämatopoetischen Organs

Die mitotische Aktivität der Zellen des hämatopoetischen Organs von L5d2 Larven wurde mittels anti-Phosphohiston H3-Antikörpermarkierung bestimmt. Neben der Gesamtzahl mitotisch aktiver Zellen wurde mit Antikörper- und PNA-Markierungen die mitotische Aktivität innerhalb der Subpopulationen (MS13, MS75, NG3B11, PNA; Abbildung 4.13, Abbildung 4.14 B) bestimmt.

Der Prozentsatz der mitotisch aktiven Zellen des hämatopoetischen Organs lag bei $2,47 \pm 1,17 \%$. Für MS13-positive Zellen konnten $1,94 \pm 1,05 \%$ Phosphohiston H3-positive Zellen identifiziert werden. Von den mit MS75 markierten Zellen waren $5,49 \pm 1,12 \%$ mitotisch aktiv, von den NG3B11-

positive Zellen $1,97 \pm 1,56$ %. Der durchschnittliche Anteil mitotisch aktiver PNA-positiver Zellen betrug $4,31 \pm 3,50$ %, mit einem Maximalwert von 9,24 % und einem Minimalwert von 2,25 %. Eine Häufung mitotisch aktiver Zellen in einer bestimmten Region trat nicht auf. Auf Paraffinschnitten von hämatopoetischen Organen konnten durch anti-Phosphohiston H3 markierte Zellen in allen Bereichen (proximal, zentral und distal in Lagerrelation zur Flügelanlage) verteilt gefunden werden. Aufgrund der schwachen, schnell verblassenden Markierung konnten dies nicht fotografisch dokumentiert werden.

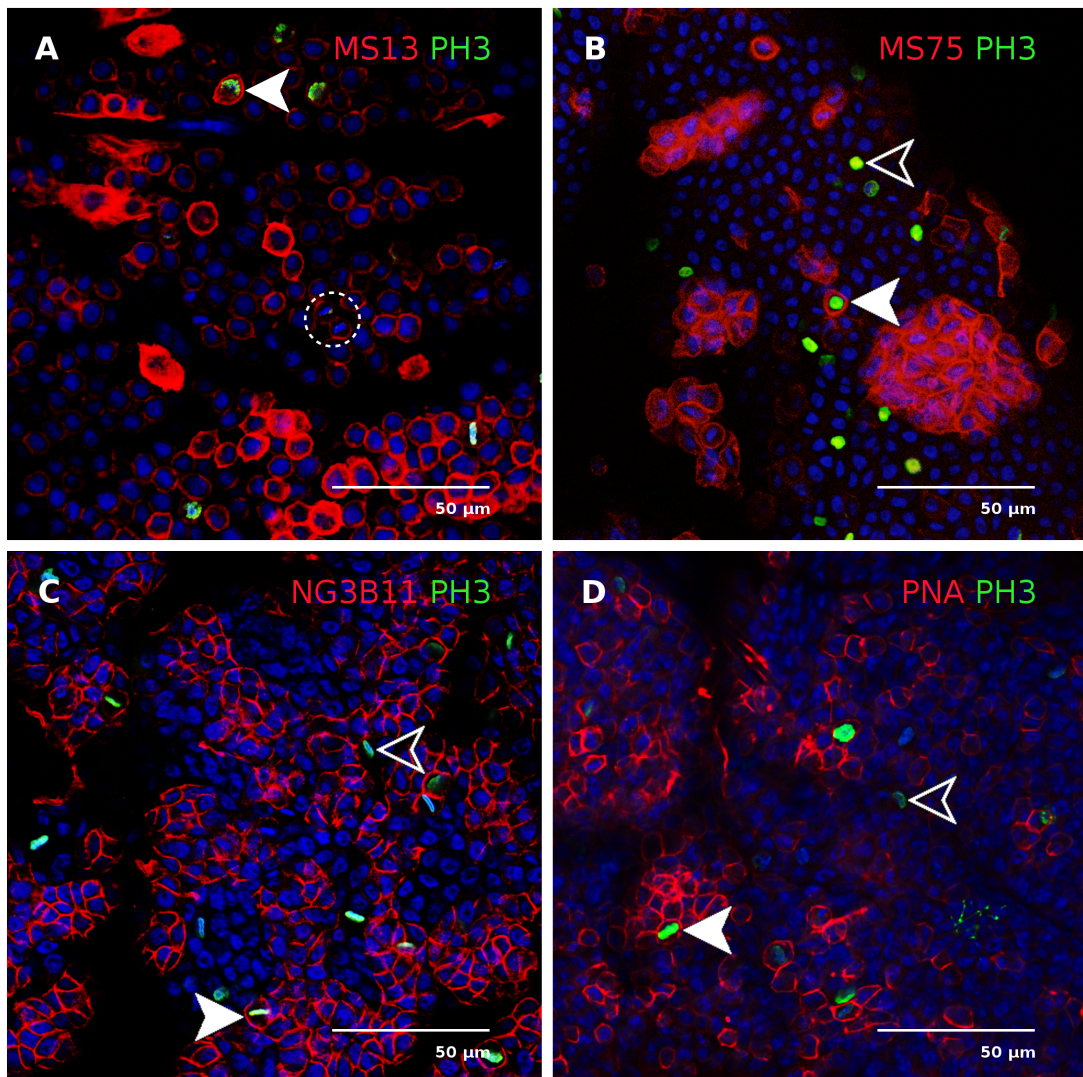


Abbildung 4.13: Mitotische Aktivität verschiedener Hämoytensubpopulationen in hämatopoetischen Organen von L5d2-Larven.

A – D: Mitotisch aktive Hämoyten des hämatopoetischen Organs markiert mit anti-Phosphohiston H3 (PH3, grün). Markierung (rot) mit MS13 (**A**), MS75 (**B**), NG3B11 (**C**) und PNA (**D**). Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. Weiße Pfeilspitzen: mitotisch aktive Zellen die gleichzeitig durch den angegebenen Marker markiert sind. Leere Pfeilspitzen: mitotisch aktive Zellen die nicht das entsprechende Antigen tragen. Gestrichelter Kreis in **A**: MS13- und anti-PH3-positive Zellen nach der Zytokinese. KLSM-Aufnahmen.

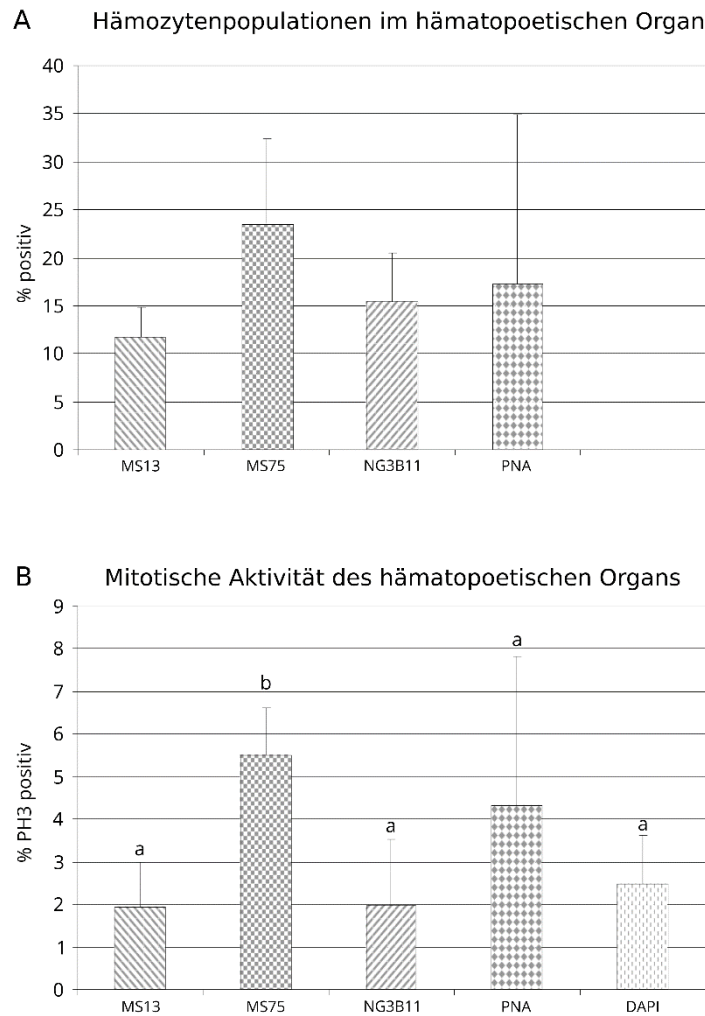


Abbildung 4.14: Prozentualer Anteil verschiedener Hämozytenpopulationen im hämatopoetischen Organ und der mitotischen Aktivität innerhalb der Populationen.

A: Prozentualer Anteil der Zellen positiv für die Marker MS13, MS75, NG3B11 und PNA im hämatopoetischen Organ. **B:** Prozentualer Anteil mitotisch aktiver Zellen innerhalb der untersuchten Subpopulationen im hämatopoetischen Organ (MS13, MS75, NG3B11, PNA) bzw. Gesamtmitoseaktivität aller Zellen des hämatopoetischen Organs (DAPI).

Die zugrundeliegende Auswertung erfolgte aus unabhängigen Analysen von MS13: $n = 3$ Tiere, $n = 6.699$ Zellen; MS75: $n = 3$ Tiere, $n = 13.391$ Zellen; NG3B11: $n = 4$ Tiere, $n = 9.957$ Zellen; PNA: $n = 5$ Tiere, $n = 22.010$ Zellen; DAPI: $n = 15$ Tiere, $n = 52.067$ Zellen. Die Buchstaben (a, b) markieren signifikante Unterschiede der Mitoseaktivität, ungepaarter t -Test bei $p \leq 0,05$. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.1.9 In-vitro-Kultur des hämatopoetischen Organs

4.1.9.1 Lebendzellbeobachtung

Hämatopoetische Organe, die als intakte Gewebe kultiviert wurden, entließen ständig Zellen in das Kulturmedium. Einige dieser Zellen nahmen sofort über Filopodien Kontakt zum Boden des Kulturgefäßes auf und adhärten während sie den Kontakt zum hämatopoetischen Organ aufgaben, während andere als nicht-adhärierende, runde Zellen das Organ verließen und im Kulturmedium trieben.

Die freigesetzten, nicht-adhärenenten Zellen wiesen zwei bemerkenswerte Verhaltensweisen auf: 1. konnten diese sich teilen (Abbildung 4.15) und 2. konnten nicht-adhärenente, runde Zellen adhären werden und durch Ausbildung von Pseudopodien die Morphologie ändern (Abbildung 4.16). Beide Phänomene konnten durchgängig bis eine Woche nach Kulturstart beobachtet werden. Die Beobachtung wurde nach dieser Zeit nicht fortgesetzt.

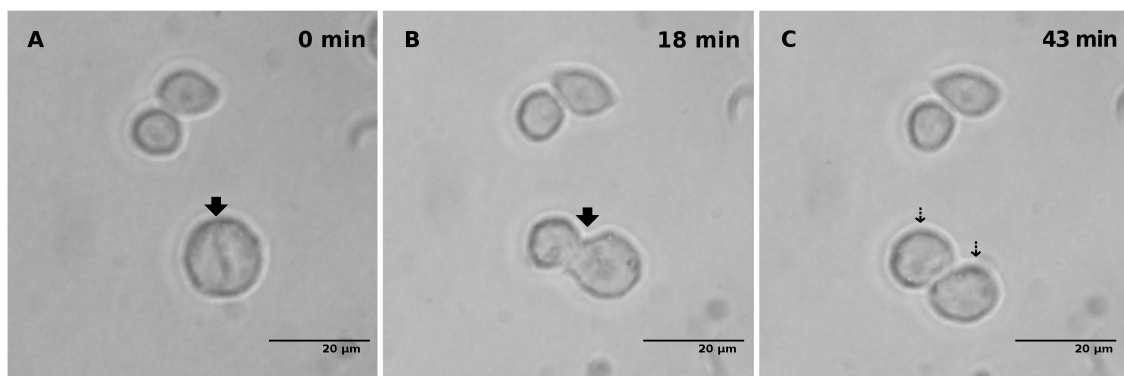


Abbildung 4.15: Hämozyte aus *in-vitro*-kultiviertem hämatopoetischem Organ in Zytokinese.

Aufnahme entstand am fünften Tag der Kultur.

A: Zelle in Metaphase, Durchmesser ca. 12 µm; schwarzer Pfeil: Metaphaseplatte. **B:** Tochterzellen separieren sich voneinander und sind durch Zytoplasmamembran miteinander verbunden (schwarzer Pfeil). **C:** Die Tochterzellen (gestrichelte Pfeile) liegen nach 43 Minuten vollständig separiert vor, Durchmesser ca. 7 µm.

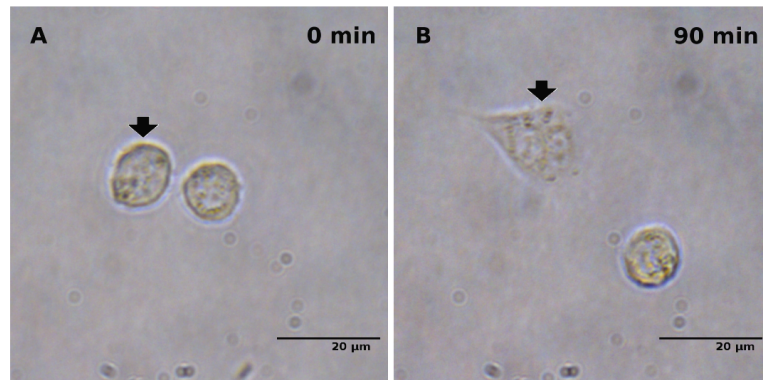


Abbildung 4.16: Adhäsion und Formänderung einer dem hämatopoetischen Organ entstammenden Zelle *in vitro*.

Aufnahme entstand am vierten Tag der Kultur.

A: Nicht-adhärente Zellen. Eine Zelle (schwarzer Pfeil) weist eine leicht ovale Form auf. **B:** Nach 90 Minuten ist die Zelle adhärent, stark abgeflacht und gespreitet (schwarzer Pfeil). Die Morphologie entspricht der einer typischen Plasmatozyte.

4.1.9.2 Analyse der aus *in-vitro*-kultivierten hämatopoetischen Organen gewonnenen Hämozytentypen

Die *in vitro* gewonnenen Zellen des hämatopoetischen Organs wurden in adhärente und nicht-adhärente Zellen aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörpern bzw. PNA markiert. Alle eingesetzten Marker für Plasmatozyten markierten vom hämatopoetischen Organ abstammende Zellen an deren Zelloberfläche (Abbildung 4.17). Die Anteile der für verschiedene Marker positiver Zellen und die statistische Auswertung sind in den Tabellen A.7, A.8 und A.9 im Appendix aufgelistet.

Der mAb MS13 markierte den größten Teil sowohl der adhärenen (92,81 ± 11,60 %) als auch der nicht-adhärenen Zellen (92,84 ± 12,44 %); die Anteile markierter Zellen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Populationen (ungepaarter *t*-Test, $p = 0,998$; Abbildung 4.17 B, B'; Abbildung 4.18). Alle nicht-adhärenen Zellen (100,00 ± 0,00 %) und fast alle adhärenen Zellen (98,41 ± 0,80 %) waren MS75-positiv (Abbildung 4.17 C, C'; Abbildung 4.18). Ebenso wurde ein hoher Prozentsatz der nicht-adhärenen Zellen durch MS77 markiert (85,20 ± 11,62 %), jedoch nur 74,17 ± 2,88 % der adhärenen Zellen, der Unterschied war nicht signifikant (ungepaarter *t*-Test, $p = 0,119$; Abbildung 4.17 A, A'; Abbildung 4.18). Auffällig war der Unterschied zwischen der adhärenen und der nicht-adhärenen Population für ihre Markierbarkeit mit dem mAb NG3B11. Der Anteil NG3B11-positiver nicht-adhärenen Zellen betrug 48,83 ± 23,60 %, der der adhärenen Zellen 76,60 ± 19,42 %. Der Unterschied zwischen diesen Populationen ist signifikant (ungepaarter *t*-Test, $p = 0,017$; Abbildung 4.17 D, D'; Abbildung 4.18). Zahlreiche anti-HRP-positive Zellen wurden

in beiden Fraktionen nachgewiesen (Abbildung 4.17 F, F'). Die Anteile der mit anti-HRP-Immunserum markierbaren Zellen unterschieden sich tendenziell, aber nicht signifikant zwischen den beiden Populationen ($90,61 \pm 10,72$ % der adhären Zellen und $61,21 \pm 21,59$ % der nicht-adhären Zellen waren HRP-positiv, ungepaarter t -Test $p = 0,086$; Abbildung 4.18).

PNA markierte stets die Zellmembran eines beträchtlichen Anteils der nicht-adhären Zellen (Abbildung 4.17 E). Bei den adhären Zellen band PNA inhomogen die Zellmembran und darüber hinaus intrazelluläre Bestandteile (Abbildung 4.17 E'). Signifikant unterschieden sich die adhären und nicht-adhären Zellen hinsichtlich des Anteils PNA-positiver Zellen (ungepaarter t -Test, $p = 0,000$). Während $72,37 \pm 19,43$ % der nicht-adhären Zellen PNA positiv waren, waren es nur $12,59 \pm 10,00$ % der adhären Zellen.

Die oenozytoidspezifischen Proteine β GRP-1 und PPO konnten in keiner der beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden (Abbildung 4.18, exemplarisch für PPO gezeigt). Der sphärule Zellen-Marker anti-Esterase-Immunserum markierte weder adhären noch nicht adhären Zellen (Abbildung 4.18). Der granuläre Zellen Marker MS2 markierte nur vereinzelt Zellen in geringer Zahl in der adhären Population und keine nicht-adhären Zellen (Abbildung 4.18). Der granuläre Zellen Marker MS7 markierte in einer von drei Präparationen wenige adhären Zellen, sowie keine Zellen in zwei Präparaten nicht-adhären Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der auswertbaren Präparate und Zellen war für eine verlässliche Aussage zu gering.

Innerhalb der nicht-adhären Population unterschieden sich die Anteile der durch die auf Hämozytenmonolayern plasmatozytenspezifischen mAbs MS13 und MS77 nicht signifikant voneinander oder vom Anteil der PNA-positiven Zellen, während zwischen den durch die mehrere Hämozytentypen bindenden Marker MS75, anti-HRP und NG3B11 markierten Zellen teilweise signifikante Unterschiede in den Anteilen markierter Zellen bestanden (Abbildung 4.18 A).

Bei den adhären Zellen unterschieden sich die Anteile der durch die auf Hämozytenpräparaten plasmatozytenspezifisch bindenden Marker MS13 und MS77 markierten Zellen signifikant voneinander (Abbildung 4.18 B). Die Anteile der durch die neben Plasmatozyten weitere Hämozytentypen bindenden Marker MS75, NG3B11 und anti-HRP markierten Zellen unterschieden sich nicht signifikant von dem der durch MS13 markierten Zellen (Abbildung 4.18 B). Demgegenüber unterschieden sich die Anteile der durch MS75 und anti-HRP markierten Zellen signifikant vom Anteil der durch den auf Hämozytenpräparaten plasmatozytenspezifischen mAb MS77 markierten Zellen (Abbildung 4.18 B). Der Anteil durch PNA markierter Zellen unterschied sich signifikant von denen der durch Plasmatozyten markierenden Markern (MS13, MS75, MS77, NG3B11 und anti-HRP; Abbildung 4.18 B).

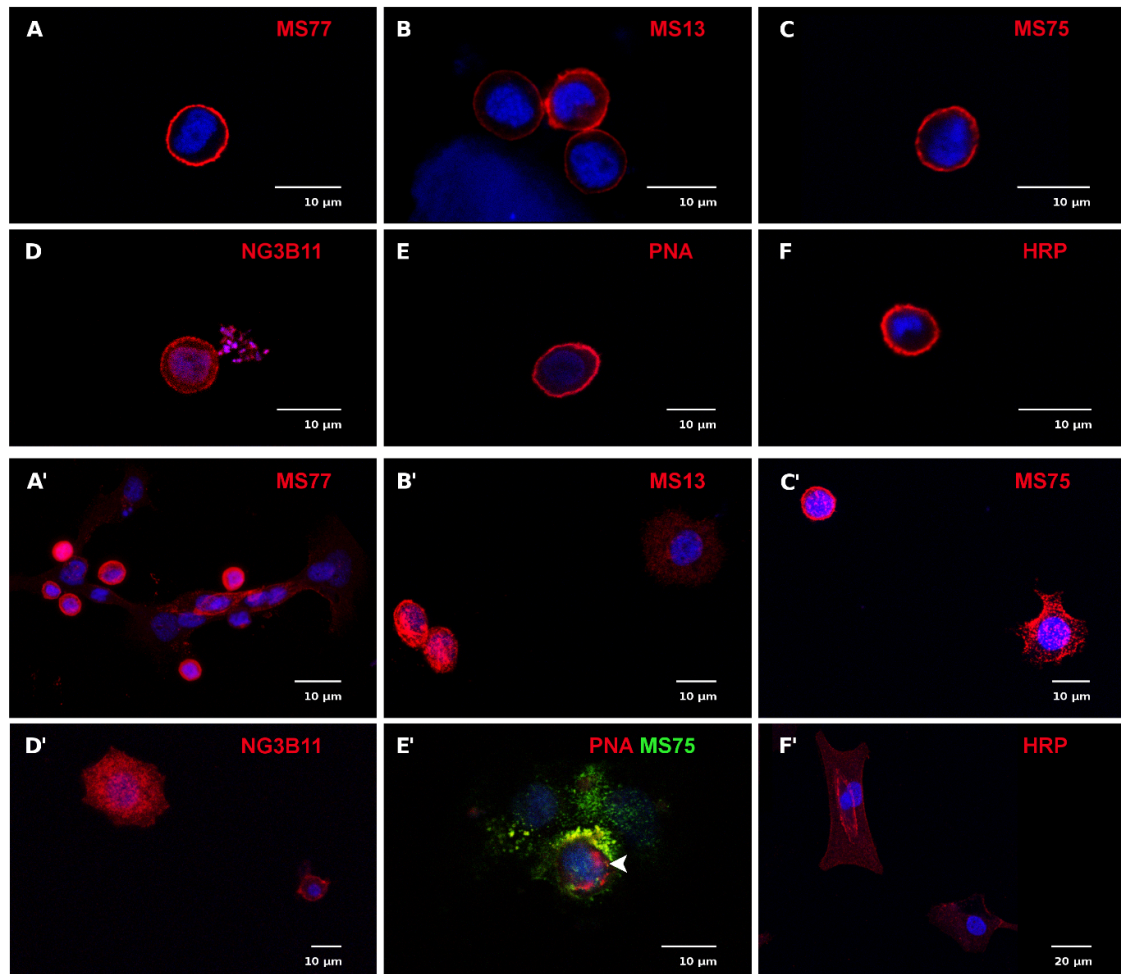


Abbildung 4.17: Markierung von *in-vitro*-kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs mit verschiedenen Hämozytenmarkern.

A – F: Markierung nicht-adhärenente Zellen. **A' – F':** Markierung adhärenente Zellen. **F':** Der PNA-positive Bereiche befinden sich nicht auf der Zellmembran, sondern in gespreiteten Plasmatozyten (Pfeilspitze).

KLSM-Aufnahmen; A' – F': Projektion mehrerer konfokaler Ebenen.

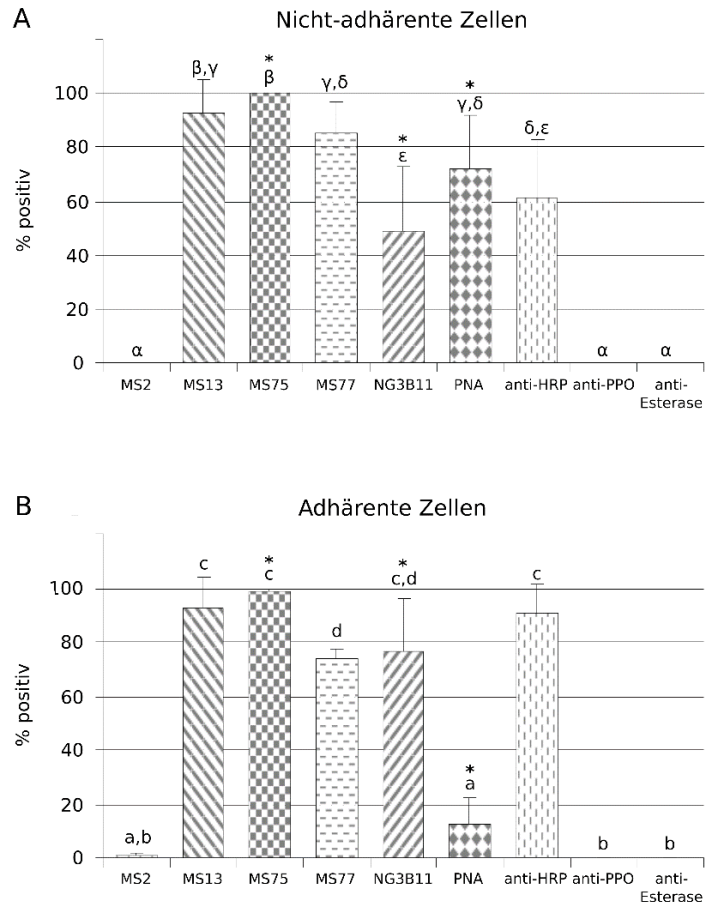


Abbildung 4.18: Differentielle Zellzahlermittlung von 48 h *in-vitro*-kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs.

Verschiedene griechische Buchstaben (α - ϵ) markieren signifikante Unterschiede zwischen nicht adhärenenden Zellen ($p \leq 0,05$ ungepaarter *t*-Test, Tabelle A.9), verschiedene Kleinbuchstaben (a-d) markieren signifikante Unterschiede zwischen adhärenenden Zellpopulationen ($p \leq 0,05$ ungepaarter *t*-Test, Tabelle A.8). Asterisk (*) markiert signifikante Unterschiede der Zellzahl zwischen den Zellpopulationen von adhärenenden und nicht-adhärenenden Zellen ($p \leq 0,05$ ungepaarter *t*-Test, Tabelle A.7). Auswertung von: MS2: nicht-adhärenierend $n = 433$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, adhärenierend $n = 410$ Zellen aus $n = 3$ Tieren; MS13: nicht-adhärenierend $n = 141$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, adhärenierend $n = 417$ Zellen aus $n = 4$ Tieren; MS75: nicht-adhärenierend $n = 108$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, adhärenierend $n = 472$ Zellen aus $n = 5$ Tieren; MS77: nicht adhärenierend $n = 145$ Zellen aus $n = 3$ Tieren, adhärenierend $n = 343$ Zellen aus $n = 4$ Tieren; NG3B11: nicht-adhärenierend $n = 340$ Zellen aus $n = 5$ Tieren, adhärenierend $n = 473$ Zellen aus $n = 5$ Tieren; PNA: nicht-adhärenierend $n = 348$ Zellen aus $n = 5$ Tieren, adhärenierend $n = 441$ Zellen aus $n = 5$ Tieren; anti-HRP: nicht adhärenierend $n = 433$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, adhärenierend $n = 410$ Zellen aus $n = 3$ Tieren; anti-PPO: nicht adhärenierend $n = 649$ Zellen aus $n = 3$ Tieren, adhärenierend $n = 646$ Zellen aus $n = 3$ Tieren; anti-Esterase: nicht-adhärenierend $n = 155$ Zellen aus $n = 2$ Tieren, adhärenierend $n = 38$ Zellen aus $n = 2$ Tieren.

4.1.10 Vergleichende Analyse der PNA-positiven Zellen in zirkulierenden Hämozyten und im hämatopoetischen Organ

Für Hämozyten von *M. sexta*-Larven ist eine Markierung der Granulen granulärer Zellen durch PNA bekannt (BEETZ, 2002; NARDI, 2004). Daneben sind sphärule Zellen nach bakterieller Immunstimulation ebenfalls PNA positiv (BEETZ, 2002). Bei Hämozytenmonolayern naiver *M. sexta* L5d2 fiel ein weiterer Zelltyp als PNA positiv auf, der eine deutliche Markierung der Zytoplasmamembran (PNAm⁺) aufweist (Abbildung 4.1). Diese Zellen können die Charakteristika runder Plasmatozyten oder Oenozytoide aufweisen (Abbildung 4.1, Abbildung 4.4 C, C'', E', E''; DHC $1,07 \pm 0,19$ %, Tabelle 4.2) oder von granulären Zellen (Abbildung 4.1 E, F; DHC $1,93 \pm 1,61$ %, Tabelle 4.2). Von sphärulen Zellen, die ebenfalls eine Markierung der Zellmembran durch PNA aufwiesen (Abbildung 4.1 C, E; DHC $4,37 \pm 1,52$ %, Tabelle 4.2) unterscheiden sich diese Zellen in der Form und aufgrund des Fehlens von Sphärulen und wurden deshalb getrennt von den sphärulen Zellen betrachtet. Außerdem ließen sich die Zellmembranen einiger Zellen des hämatopoetischen Organs mit PNA markieren (Abbildung 4.9 D, Abbildung 4.12 B, Abbildung 4.13 D), sowie die Zellmembranen von einigen Zellen, die das hämatopoetische Organ in Primärkultur verlassen hatten (Abbildung 4.17 E).

Zur Klassifizierung der Hämozytentypen und dem Vergleich der Zellen des hämatopoetischen Organs wurde von granulären Zellen (GR), sphärulen Zellen (SP), runden (ungespreiteten) Plasmatozyten (rPL), Oenozytoiden (OE), PNAm⁺-Hämozyten exklusive der sphärulen Zellen (HC PNAm⁺), PNAm⁺-Zellen in *whole-mount*-Präparaten des hämatopoetischen Organs (HOWm PNAm⁺) sowie PNAm⁺-Zellen, die *in vitro* vom hämatopoetischen Organ entlassen wurden (HOiv PNAm⁺) der Durchmesser der Zelle und das Verhältnis von Kernfläche zu Zytoplasmafläche bestimmt (Abbildung 4.19 A, B; Einzelergebnisse der statistischen Analyse in Tabelle A.10, Tabelle A.11). Die Zugehörigkeit zu bestimmten Hämozytentypen wurde morphologisch und zusätzlich durch Antikörper- und PNA-Markierung bestimmt (GR: MS7 und PNA⁺-Granulen, SP: anti-Esterase, rPL: MS13 und MS77, OE: anti-PPO und anti-βGRP1). Die Durchmesser der Hämozytentypen granuläre Zellen ($6,55 \pm 0,99$ μm), sphärule Zellen ($5,35 \pm 0,53$ μm), runde Plasmatozyten ($8,26 \pm 0,89$ μm) und Oenozytoide ($9,25 \pm 1,98$ μm) unterschieden sich signifikant voneinander, während sich die Größe der PNAm⁺-Hämozyten ($6,89 \pm 1,17$ μm) nicht signifikant von der von granulären Zellen unterschied (Abbildung 4.19 A). Innerhalb der untersuchten PNAm⁺-Zellpopulationen konnten signifikante Unterschiede der Größe zwischen allen drei Populationen festgestellt werden, wobei die PNAm⁺-Hämozyten den geringsten Durchmesser ($6,89 \pm 1,17$ μm) aufwiesen, gefolgt von PNAm⁺-Zellen im hämatopoetischen Organ ($8,02 \pm 1,16$ μm) und *in vitro* freigesetzten PNAm⁺-Zellen des hämatopoetischen Organs ($9,12 \pm 1,29$ μm). Der Zelldurchmesser der *in vitro* vom hämatopoetischen Organ entlassenen PNAm⁺-Zellen unterschied sich nicht signifikant von dem der Oenozytoide. Der

Durchmesser PNAm⁺-Zellen des hämatopoetischen Organs, gemessen in *whole-mount*-Präparaten, unterschied sich nicht signifikant von dem runder Plasmatozyten. Die Zellgrößen innerhalb der einzelnen Zellpopulationen sind recht variabel, und die Größen der einzelnen Populationen überlappen (Abbildung 4.19 A). Deshalb ist keine exakte Bestimmung des Zelltyps nur anhand der Zellgröße möglich.

Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis (N:C) wurde als weiteres Kriterium zur Charakterisierung der Zelltypen herangezogen (Abbildung 4.19 B). Die *p*-Werte der statistischen Analyse sind Tabelle A.11 zu entnehmen. Die Hämozytentypen granuläre Zellen (GR), sphärule Zellen (SP), runde Plasmatozyten (rPL), Oenozytoide (OE) und Hämozyten positiv für PNA an der Zellmembran (HC PNAm⁺) unterschieden sich bezüglich des N:C signifikant voneinander (Abbildung 4.19 B). Granuläre Zellen besaßen den verhältnismäßig größten Zytoplasmaanteil (N:C $0,63 \pm 0,22$), gefolgt von Oenozytoiden (N:C $0,82 \pm 0,25$), sphärulen Zellen (N:C $1,09 \pm 0,44$) und runden Plasmatozyten (N:C $1,21 \pm 0,42$). PNAm⁺-Hämozyten hatten den geringsten Zytoplasmaanteil aller untersuchten Zellpopulationen (N:C $1,77 \pm 0,56$), der sich jedoch signifikant von dem der *in vitro* abgegebenen PNAm⁺-Zellen des hämatopoetischen Organs unterschied (N:C $1,56 \pm 0,66$).

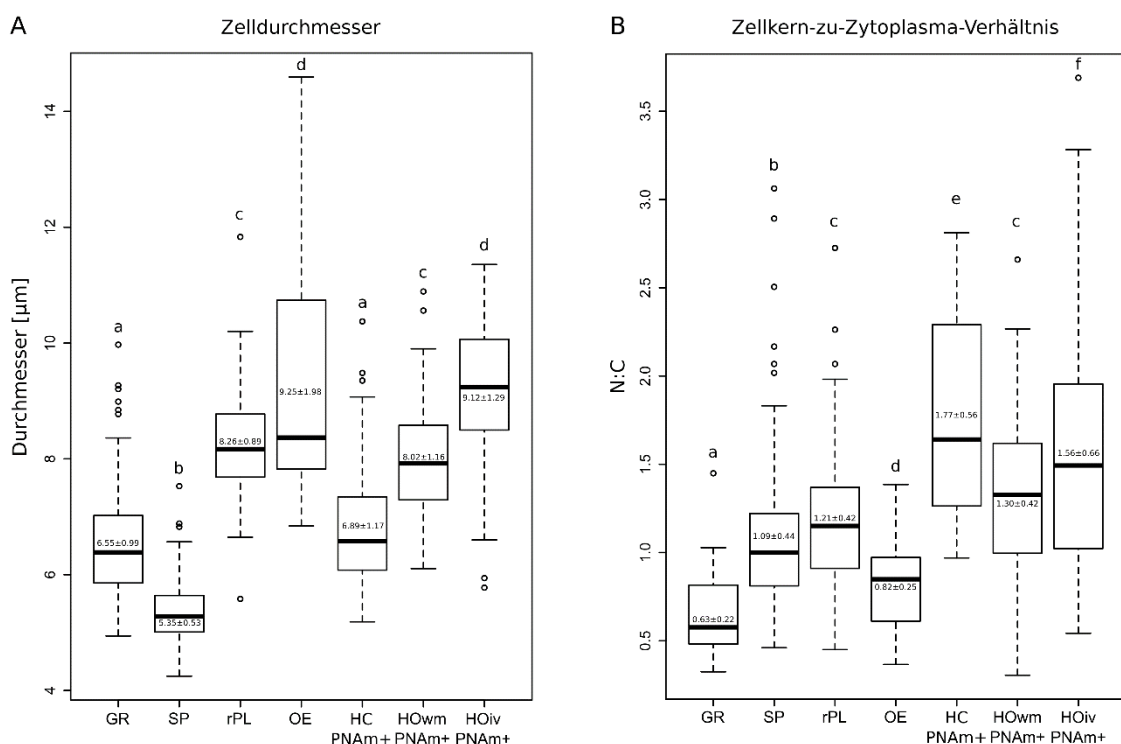


Abbildung 4.19: Durchmesser und Kern-Zytoplasma-Verhältnis von Hämozytentypen und Zellen des hämatopoetischen Organs.

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$) werden durch unterschiedliche Buchstaben ausgewiesen. Fortsetzung auf Folgeseite.

Fortsetzung Abbildung 4.19. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung sind in Zahlen in der jeweiligen Höhe angegeben. **A:** Zelldurchmesser in μm . **B:** Kern-Zytoplasma-Flächen-Verhältnis (N:C). Der Auswertung zugrundeliegende Anzahl der Zellen und Tiere: Zelldurchmesser (A): GR $n = 93$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, SP $n = 157$ Zellen aus $n = 5$ Tieren, rPL $n = 84$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, OE $n = 48$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, HC PNA $^{+}$ $n = 62$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, HOwm PNA $^{+}$ $n = 51$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, HOiv PNA $^{+}$ $n = 47$ Zellen aus $n = 4$ Tieren. Kern-Zytoplasma-Verhältnis (B): GR $n = 62$ Zellen aus $n = 5$ Tieren, SP $n = 120$ Zellen aus $n = 5$ Tieren, rPL: $n = 71$ Zellen aus $n = 3$ Tieren, OE $n = 55$ Zellen aus $n = 7$ Tieren, HC PNA $^{+}$ $n = 33$ Zellen aus $n = 5$ Tieren, HOwm PNA $^{+}$ $n = 87$ Zellen aus $n = 4$ Tieren, HOiv PNA $^{+}$ $n = 56$ Zellen aus $n = 6$ Tieren. Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, HC PNA $^{+}$ = Hämozyten mit PNA positiver Zellmembran, HOwm PNA $^{+}$ = Zellen des hämatopoetischen Organs mit PNA positiver Zellmembran, HOiv PNA $^{+}$ = Zellen mit PNA positiver Zellmembran, die das hämatopoetische Organ *in vitro* verlassen, N:C = Kern-Zytoplasma-Verhältnis.

4.1.11 Analyse der durch PNA markierten Proteine der Hämozyten und des hämatopoetischen Organs

Die Bindung von PNA an Proteinen aus Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ wurde mittels Western Blot getestet. PNA markierte Proteinbanden konnten nur im Hämozytenlysat bei 127 kDa bzw. größer als ca. 175 kDa nachgewiesen werden. Im hämatopoetischen Organ-Lysat konnte keine Proteinbande mit PNA markiert werden (Abbildung 4.20).

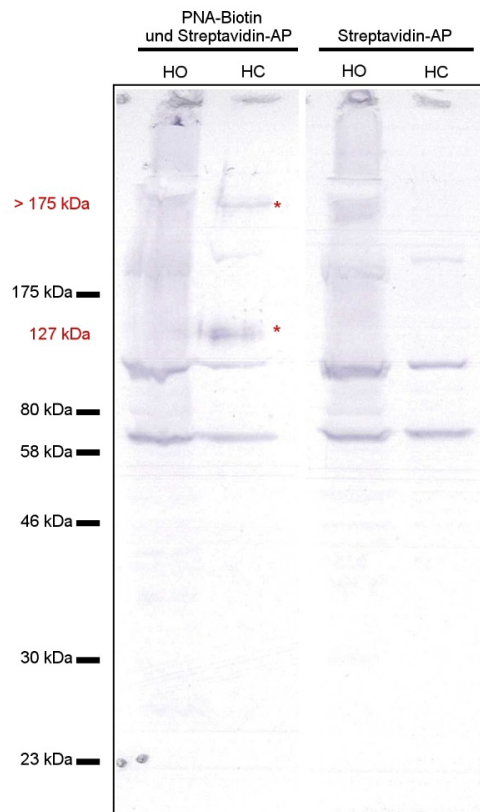


Abbildung 4.20: Nachweis PNA-positiver Proteine in Hämozyten und hämatopoetischem Organ.
Fortsetzung auf Folgeseite.

Fortsetzung Abbildung 4.20. Der Nachweis erfolgte mittels Lektin-Blot nach denaturierender SDS-PAGE. Pro Spur wurde 1 mg Gewebe aufgetragen. Rote Asteriske markieren die spezifisch durch PNA markierten Proteinbanden. Linke Hälfte der Membran: Nachweis der Lektinbindung. Rechte Hälfte der Membran: Kontrolle zum Nachweis von Streptavidin-AP-Bindung an Proteinen der Proben.
Abkürzungen: HO = hämatopoetisches Organ, HC = Hämozyten.

4.1.12 Identifizierung von in Hämozyten und im hämatopoetischen Organ synthetisierten mRNA-Transkripten und Proteinen

Im Zuge der Suche nach Hämozyten(-typ)-typischen Markern und Genen, deren Expression bei der Hämatopoese eine Rolle spielen können, wurden Sequenzen zu folgenden Genen anderer Spezies *in silico* mittels Protein-BLAST auf Manduca Base (<http://agripestbase.org/manduca/?q=blast>) und als mRNA über RT-PCR sowie *in-situ*-RNA-Hybridisierung in *M. sexta* identifiziert (Übersicht Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Identifikation und mRNA-Expression nicht beschriebener Gene in *M. sexta*. Die *M. sexta*-Gene wurden durch BLAST-Analysen gegen die Aminosäuresequenz der Proteine aus *B. mori* und *D. melanogaster* identifiziert.

Gen	Spezies	<i>In silico</i> *	RT-PCR HZ	RT-PCR HO	ISH HZ	ISH HO
Croquemort / Scavenger Receptor class B member 3	<i>D. melanogaster</i> / <i>B. mori</i>	+ MSex007423-RA	+	+	-	-
Eater	<i>D. melanogaster</i>	+ Msex2.07580-RB, Msex2.07580-RA	+	+	+	+
Heixuedian	<i>D. melanogaster</i>	+ Msex2.06039-RA	+	+	-	-
Peroxidasin	<i>D. melanogaster</i>	+ Msex2.09018-RA, Msex2.09018-RB	+	+	-	-

* BLAST-Ergebnis mit höchster Sequenzhomologie auf der Manduca Base Datenbank.

Abkürzungen: HZ = Hämozyten, HO = hämatopoetisches Organ, ISH = RNA-*in-situ*-Hybridisierung.

Nukleotidsequenzen aller untersuchten Gene wurden mit spezifischen Primern aus cDNA von Hämozyten oder hämatopoetischen Organen amplifiziert, in einen bakteriellen Vektor ligiert und die DNA-Sequenz sequenziert, um die Identität der Gene zu bestätigen.

4.1.12.1 Eater-like Protein

Eater ist ein *Scavenger*-Rezeptor der Nimrod-Familie, der in *D. melanogaster* exklusive auf der Zelloberfläche von Hämocyten vorkommt und für die Erkennung, Bindung und Phagozytose von Bakterien (genauer von Peptidoglykan) und typischen Liganden für *Scavenger*-Rezeptoren (oxidierte und acetylierte *low-density*-Lipoproteine) mit verantwortlich ist (Kocks *et al.*, 2005). Eine Funktion von Eater bei der Aufrechterhaltung hämatopoetischer Nischen wird ebenfalls angenommen (BRETSCHER *et al.*, 2015).

Die BLAST-Analyse der Manduca Base für die Proteinsequenz von *D. melanogaster*-Eater und *D. melanogaster*-Nimrod C1, beides sind Peptidoglycan bindende *Scavenger*-Rezeptoren der Nimrod-Proteinfamilie, ergab eine hohe Übereinstimmung mit folgenden Proteinen:

Anfrage	Manduca Base Resultat	Score	E-Wert	Identität
Dmel Eater	Msex2.07580-RB	583 bits	e-166	41 %
Dmel Eater	Msex2.07580-RA	583 bits	e-166	41 %
Dmel Eater	Msex2.07580-RC	583 bits	e-156	41 %

Mehrere weitere Treffer mit niedrigerem Score- und E-Wert und somit geringerer Ähnlichkeit zu Eater oder Nimrod C1 wurden erzielt jedoch nicht weiter untersucht.

Für die weitere Analyse wurde mit der Sequenz Msex2.07580-RB gearbeitet. Eine SmartBLAST-Analyse der Msex2.07580-RB Aminosäuresequenz auf NCBI führte zu folgendem Ergebnis:

BLAST Resultat	Max. Score	Total Score	Query cover	E-Wert	Identität	GenBank Accession
eater [<i>Drosophila melanogaster</i>]	421	2620	84 %	1e-130	41 %	NP_651533.3
Predicted von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein [<i>Danio rerio</i>]	117	418	69 %	3e-25	36 %	XP_009294487.1

Aufgrund der höchsten Übereinstimmung von Msex2.07580-RB mit *D. melanogaster*-Eater wird dieses Protein im Weiteren als Eater-like Protein bezeichnet.

Die BLAST-Anfrage ergab weitere Treffer, die Msex2.07580-RB in die Nähe von nicht näher charakterisierten oder veröffentlichten Proteinen der Nimrod-Proteinfamilie oder der von Willebrand Faktor D und EGF-Domänen beinhaltenden Proteinen, Tenascin-X, sowie eine Anzahl nicht charakterisierter, hypothetischer Proteine stellt:

BLAST Resultat	Max Score	Total Score	Query cover	E-Wert	Identität	GenBank Accession
nimrod [<i>Locusta migratoria</i>]	426	1222	82 %	5e-133	42 %	AJF38202.1
nimrod-like protein [<i>Tribolium castaneum</i>]	394	394	91 %	9e-121	33 %	EFA12386.1
EGF-like domain containing protein [<i>Oryctes borbonicus</i>]	353	1196	83 %	1e-106	37 %	KRT80591.1
Tenascin-X [<i>Zootermopsis nevadensis</i>]	355	1974	80 %	7e-106	38 %	KDR23475.1
von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein [<i>Meliponia quadrifasciata</i>]	366	2733	88 %	1e-105	34 %	KOX80233.1
Tenascin-X [<i>Camponotus floridanus</i>]	331	1329	85 %	8e-95	34 %	EFN73275.1
eater [<i>Anopheles gambiae</i>]	323	1200	82 %	2e-94	34 %	AHB62099.1
von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein [<i>Papilio xuthus</i>]	309	602	99 %	5e-90	34 %	KPJ05450.1
nimrod C2 isoform B [<i>Drosophila melanogaster</i>]	299	926	86 %	5e-87	36 %	NP_7888047.1

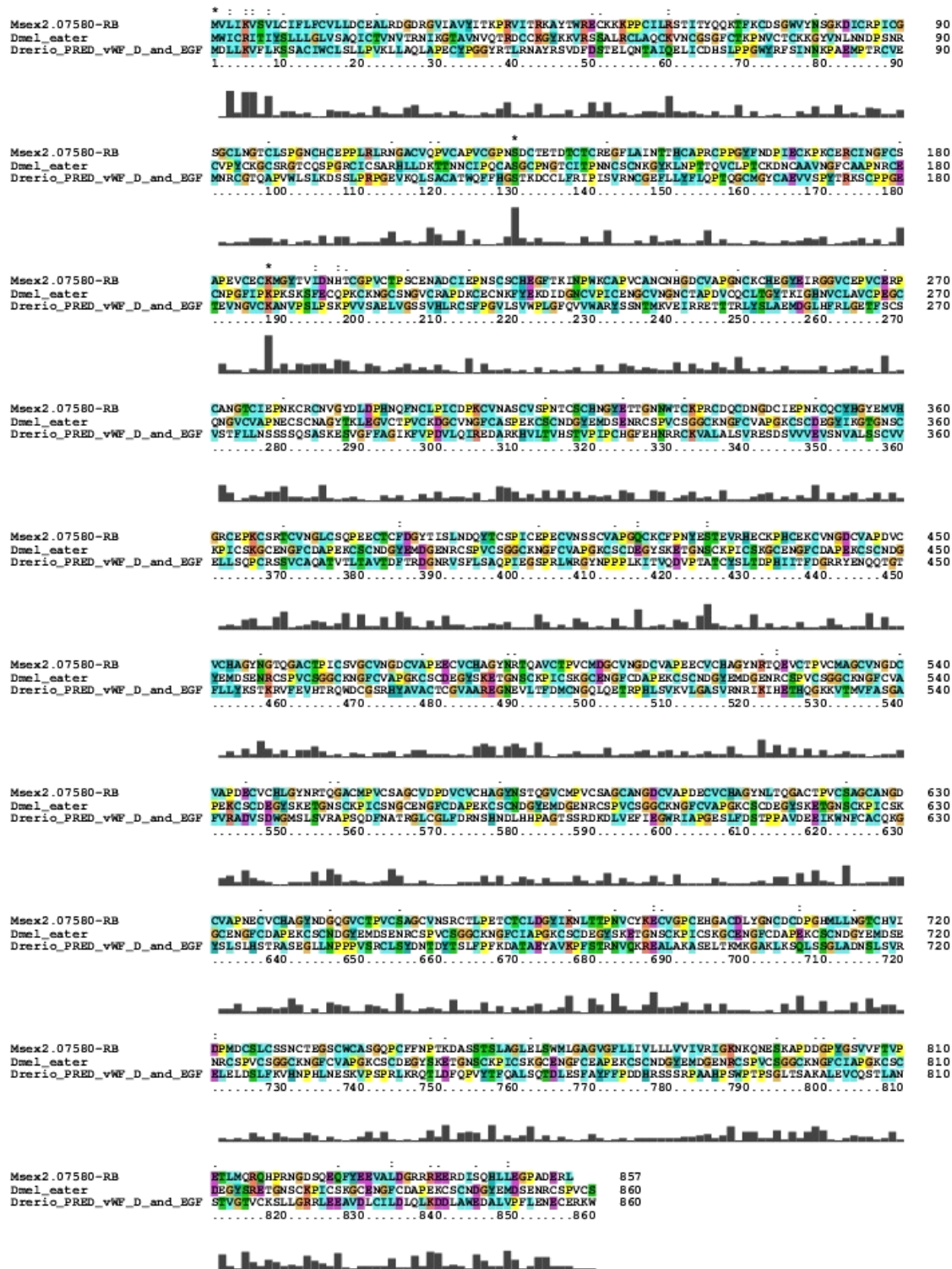


Abbildung 4.21: Multiples Sequenzalignment der SmartBLAST Ergebnisse für Msex2.07580-RB.

Dmel_eater = *D. melanogaster* eater, Drerio_PRED_vWF_D_and_EGF = Vorhergesagtes *Danio rerio* von Willebrand factor D und EGF-Domänen beinhaltendes Protein. Die Aminosäuresequenzen sind hier nicht komplett dargestellt, bei Dmel_eater wurden 214 und bei Drerio_PRED_vWF_D_and_EGF 1123 C-terminale Aminosäuren entfernt, in diesen Bereichen gab es keine Übereinstimmung mit Msex2.07580-RB. Die Farbkodierung ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Schwarze Balken = Grad der Konservierung.

Eine *distance-tree*-Analyse der über SmartBLAST ermittelten Sequenzen zeigte eine nähere Verwandtschaft von Msex2.07580-RB Sequenz mit *D. melanogaster* Eater (Abbildung 4.22).

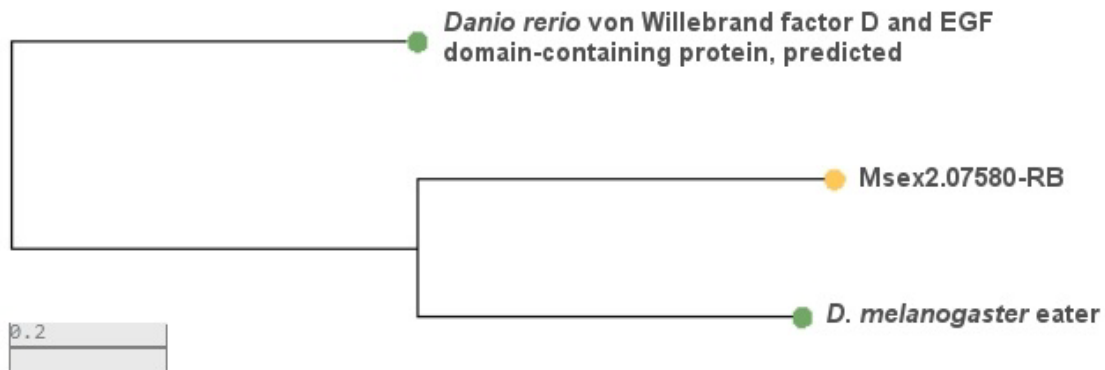


Abbildung 4.22: Distance tree of results des SmartBLAST-Ergebnis mit Anfrage von Msex2.07580-RB. Msex2.07580-RB bildet eine Klade mit dem Eater-Protein aus *D. melanogaster*.

Die Verwandtschaftsanalyse der BLAST-Ergebnisse gruppiert Msex2.07580-RB bei dem von Willebrand-Faktor und EGF beinhaltenden Protein von *P. xuthus*, diese Klade spaltet basal von den Sequenzen aus anderen Insekten ab. *D. melanogaster*-Eater bildet hier die Schwesterklade zu allen anderen ermittelten Proteinen (Abbildung 4.23).

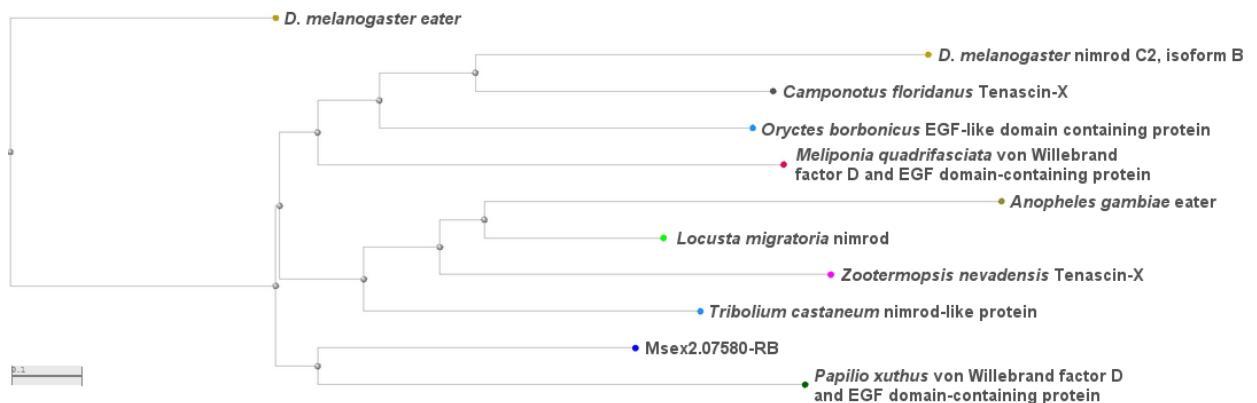


Abbildung 4.23: Distance tree of results des BLAST-Ergebnis mit der Anfrage Msex2.07580-RB. Aussagekräftige Ergebnisse wurden manuell ausgewählt. Msex2.07580-RB zeigt die größte Ähnlichkeit mit dem *P. xuthus*-von Willebrand-Faktor D und EGF-Domäne beinhaltenden Protein. *D. melanogaster*-Eater spaltet basal von allen anderen Proteinen ab.

Mit dem Proteindomänenanalyseprogramm InterPro wurden folgende Eigenschaften für das Msex2.07580-RB-Protein ermittelt:

Proteinfamilie:	Unbekannt
Domänen:	EGF-like, Eater-related, N-terminales Signalpeptid
Strukturelle Domänen:	Transmembrandomäne
Vorhergesagte Funktion:	Selektive Proteinbindung
Biologische Funktion:	Unbekannt

Dieselben Eigenschaften wurden für *D. melanogaster*-Eater-PC ermittelt. Eine von Willebrand Faktor-Domäne konnte über Conserved Domain Databank (CCD) und InterPro Domänensuche weder in *D. melanogaster*-Eater-PC noch in Msex2.07580-RB identifiziert werden. Die CCD Datenbanksuche (KOG v1.0 – 4825 PSSMs *position-specific scoring matrices*) ergab eine *Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor* [Signal transduction mechanisms]-Domäne, die auch im *D. melanogaster*-Eater-PC-Protein in drei Bereichen erkannt wurde, sowie zwei *Insulin/growth factor receptor (contains protein kinase domain)*-Domänen, die nicht in *D. melanogaster*-Eater-PC auftreten (Abbildung 4.24). Die *Teneurin-1 and related extracellular matrix proteins, contain EGF-like repeats*-Domäne der *D. melanogaster*-Eater-PC ist nicht in Msex2.07580-RB nachweisbar.

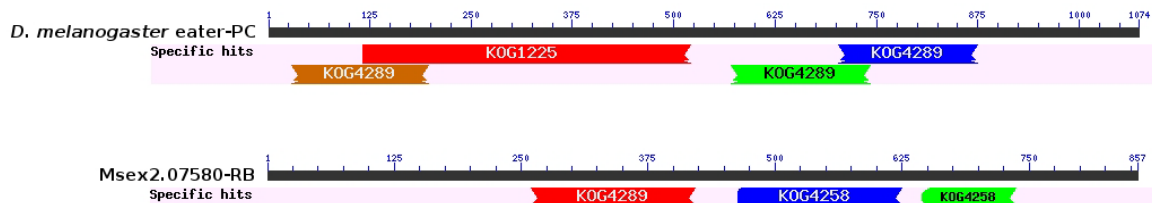


Abbildung 4.24: Konservierte Domänen in *D. melanogaster*-Eater-PC- und Msex2.07580-RB-Protein.

KOG1225 = *Teneurin-1 and related extracellular matrix proteins, contain EGF-like repeats*; KOG4258 = *Insulin/growth factor receptor (contains protein kinase domain)*; KOG4289 = *Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor*.

Die Analyse der Polypeptidsequenz von Msex2.07580-RB mit der Transmembrandomänenvorher-sagesoftware TMHMM ergab, dass die Aminosäuren 765 bis 787 eine α -Helix als Sekundärstruktur ausbilden. Dieser Bereich wird als Transmembrandomäne vorhergesagt. Die Aminosäuren an Position 1 bis 764 entsprechen einer extrazellulären Domäne, die Aminosäuren 788 bis 857 entsprechen einer intrazellulären Domäne (Abbildung 4.25).

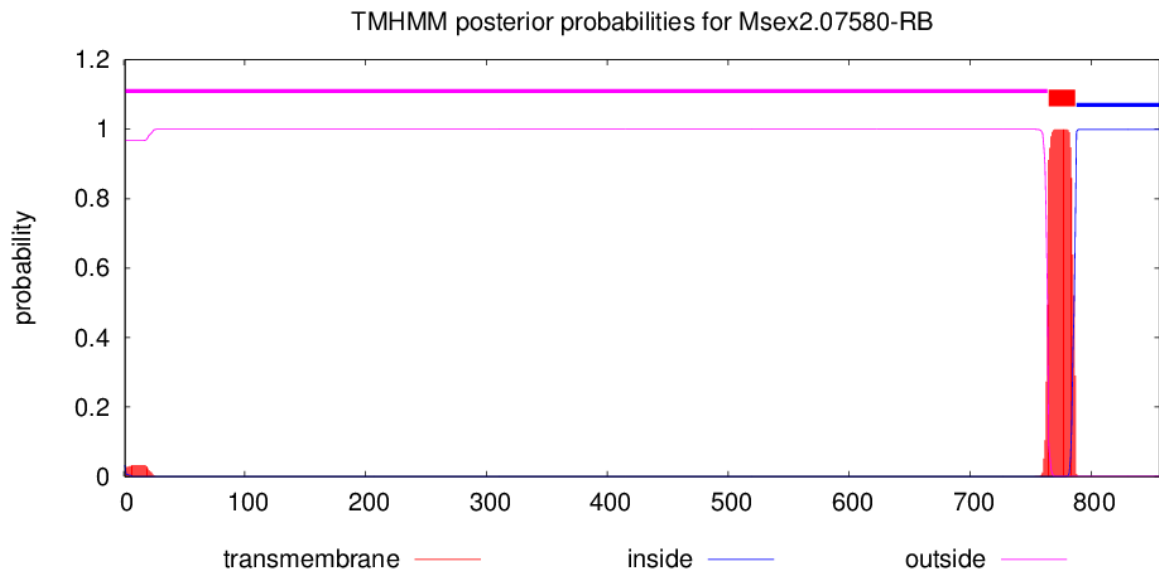


Abbildung 4.25: Grafische Darstellung der vorhergesagten Transmembrandomäne der Msex2.07580-RB Aminosäuresequenz.

Rot = Transmembrandomäne, magenta = extrazelluläre Domäne, blau = intrazelluläre Domäne.

Der Gehalt bzw. die Lokalisation von Msex2.07580-mRNA wurde in Hämozyten und hämatopoetischem Organ mittels RT-PCR und RNA-*in-situ*-Hybridisierung untersucht (Abbildung 4.26). Über eine RT-PCR-Analyse konnte die mRNA sowohl in Hämozyten als auch im hämatopoetischen Organ prinzipiell nachgewiesen werden. Interessanterweise war das Signal in Hämozyten deutlich stärker als im hämatopoetischen Organ (Abbildung 4.26 D). Dies lässt auf einen deutlich höheren Gehalt an Msex2.07580-mRNA in den Hämozyten als im hämatopoetischen Organ schließen. Über RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurde in Hämozyten und hämatopoetischen Organen die Lokalisation der Msex2.07580-mRNA nachgewiesen (Abbildung 4.26 A – C). Während Plasmatozyten und große ungespreitete Zellen (runde Plasmatozyten oder Oenozytoide) ein starkes Signal aufwiesen, wurden einige kleine Zellen mit deutlichen Einschlüssen (Sphärulen oder Granulen) nicht bzw. deutlich schwächer markiert (Abbildung 4.26 A, SP). In Zellen, die von Form und Größe granulären Zellen entsprechen konnte die Msex2.07580-mRNA deutlich, aber schwächer als in großen runden Hämozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.26 A, GR). Im hämatopoetischen Organ wurden v. a. Zellen des distalen Bereichs markiert (Abbildung 4.26 B, C). Die Negativkontrollsonde (*sense*) markierte auf Hämozytenmonolayern interessanterweise Oenozytoide, alle anderen Hämozytentypen wurden nicht markiert (Abbildung A.7 A im Appendix). Auf hämatopoetischen Organen markierte die Negativkontrollsonde keine Strukturen (Abbildung A.7 B im Appendix).

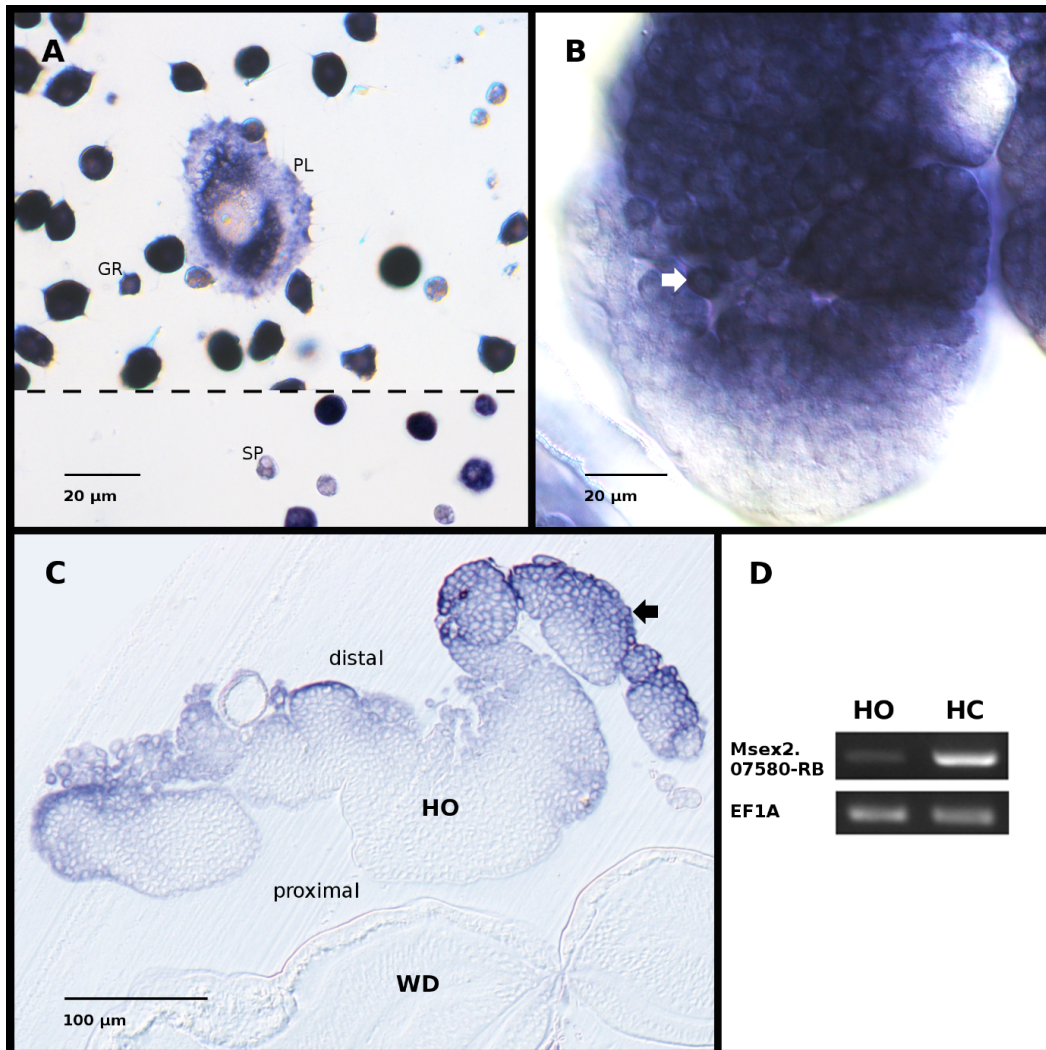


Abbildung 4.26: Nachweis der Msex2.07580-RB mRNA (Eater-like) mit RNA-*in-situ*-Hybridisierung und RT-PCR.

A: *In-situ*-Hybridisierung (ISH) an Hämozyten einer L5d2-Larve. Die Ziel-RNA wird stark in Plasmatozyten (PLs) und großen, runden Hämozyten exprimiert. Granuläre Zellen (GR) sind schwächer markiert, sphärule Zellen (SP) sind nicht oder sehr schwach markiert. **B:** ISH an *whole-mount*-Präparat des mesothorakalen hämatopoetischen Organs einer L5d2-Larve. Weißer Pfeil: exemplarische positive Zelle. **C:** Histologischer Schnitt eines hämatopoetischen Organs nach *in-situ*-Hybridisierung, 5 µm Technovit 8100. Die Msex2.07580-RB mRNA ist v. a. im distalen Bereich des hämatopoetischen Organs nachweisbar (schwarzer Pfeil). **D:** RT-PCR mit cDNA aus hämatopoetischem Organ und Hämozyten von L5d2-Larven. Der Gehalt an Msex2.07580-RB-mRNA ist deutlich höher in Hämozyten (HC) als im hämatopoetischen Organ (HO). Die EF1a Expression diente als interne Kontrolle. Für Msex2.07580-RB wurde jeweils cDNA aus 2,5 ng Total-RNA und für EF1a aus 1,0 ng Total-RNA als Template verwendet.

Abkürzungen: PL = Plasmatozyte, GR = granuläre Zelle, SP = sphärule Zelle, WD = Flügelimaginalanlage, HO = hämatopoetisches Organ. A, B: Differentielle Interferenzkontrast-Aufnahmen, C: Hellfeldmikroskopie.

4.1.12.2 Croquemort-like Protein

In *D. melanogaster* wird das zur CD36-Rezeptorfamilie gehörende Protein Croquemort in Hämocyten exprimiert und dient der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen (FRANC *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass Croquemort nur in phagozytosekompetenten, „reifen“ Makrophagen exprimiert wird (FRANC *et al.*, 1996; EVANS und BANERJEE, 2003) und daher als Differenzierungsmarker für Hämocyten dienen kann.

Die *in-silico*-Datenbankanalyse mit *D. melanogaster* Croquemort-Protein (Dmel Crq-PA) auf der Datenbank Manduca Base ergab die höchste Übereinstimmung mit der *M. sexta* Aminosäuresequenz Msex007423-RA:

Anfrage	Manduca Base Resultat	Score	E- Wert	Identität
<i>D. melanogaster</i> Croquemort-PA	Msex007423-RA	291	5e-79	33 %
<i>D. melanogaster</i> Croquemort-PA	Msex007421-RA	252	3e-67	32 %

Eine BLAST-Anfrage mit Msex007423-RA auf der NCBI-Datenbank ergab die höchste Übereinstimmung mit:

Anfrage	BLAST Resultat	Score	E-Wert	GenBank Accession	Identität
Msex007423-RA	<i>B. mori</i> Scavenger receptor class B member 3	291	5e-79	NM_001171179.1	74 %

Eine SmartBLAST-Anfrage mit Msex007423-RA auf NCBI ergab:

SmartBLAST Resultat	Score	E-Wert	Identität	GenBank Accession	Abkürzungen
PREDICTED: protein Croquemort-like isoform X1 [<i>Amyelois transitella</i>]	686	0,0	70 %	XP_013187177.1	A_transitella_CRQ-L (Alignment), Amyelois transitella (<i>Distance tree of results</i>)
Scavenger receptor class B member 3 [<i>Danaus plexippus</i>]	544	0,0	58 %	EHJ68989.1	Dplex_Scav_Rec_B (Alignment), monarch butterfly (<i>Distance tree of results</i>)
Croquemort isoform A [<i>D. melanogaster</i>]	300	4e-96	35 %	NP_787957.1	Dmel_CRQ-PA(Alignment), fruit fly (<i>Distance tree of results</i>)
Scavenger receptor class B member 1 isoform 1 [<i>H. sapiens</i>]	211	2e-61	32 %	NP_005496.4	Human_Scav_Rec_B(Alignment), human (<i>Distance tree of results</i>)

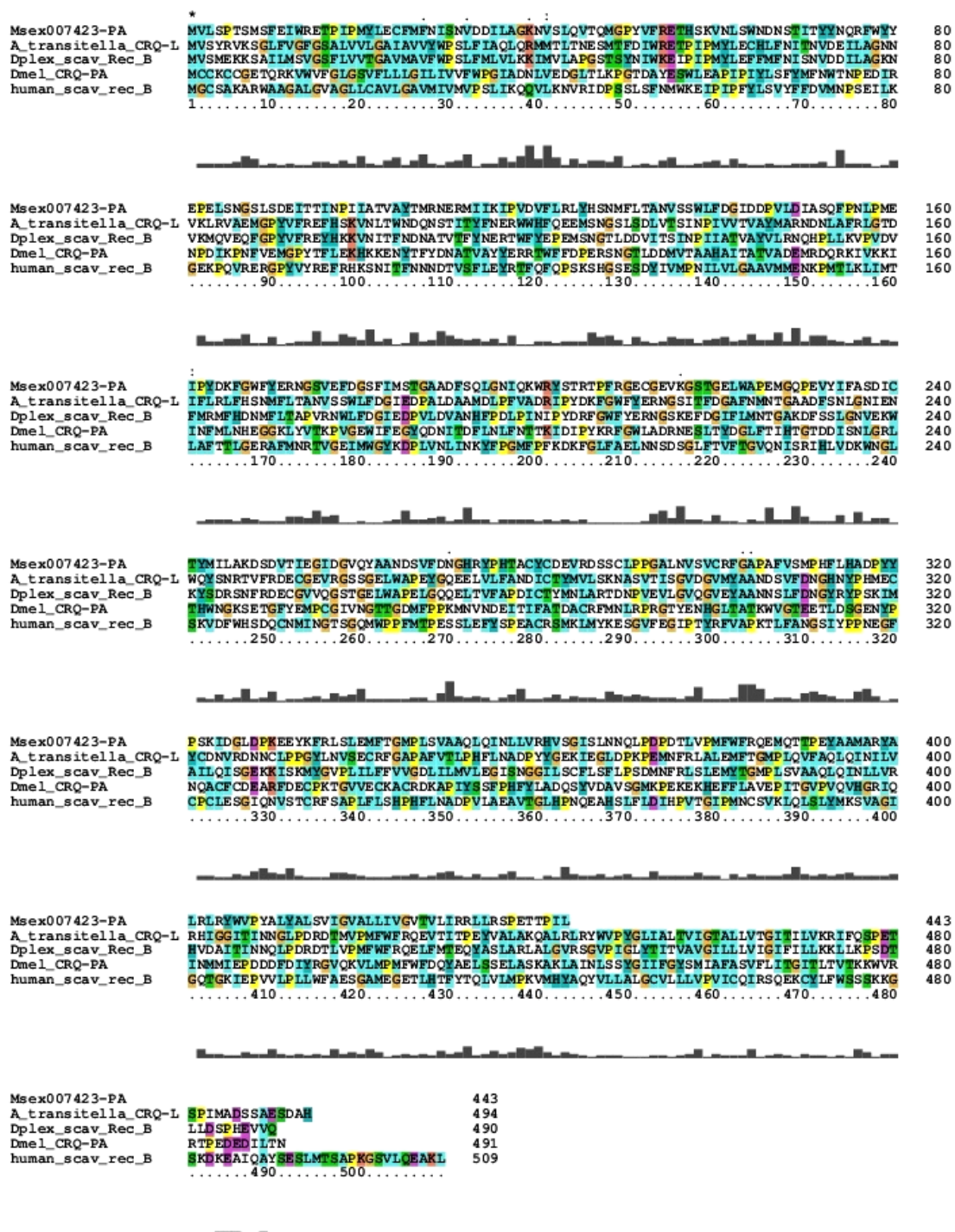


Abbildung 4.27: Multiples Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen der SmartBLAST-Ergebnisse für Msex007423-PA.

Die Farbkodierung ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Schwarze Balken = Grad der Konservierung.

Mit den erhaltenen Sequenzen wurden *distance-tree*-Analysen durchgeführt. Sie ergaben einen engen Bezug von Msex007423-RA zu allen Scavenger receptor class B- bzw. Croquemort oder Croquemort-like Sequenzen und eine eindeutig nähere Verwandtschaft zu den Proteinen der Lepidoptera (Abbildung 4.28, Abbildung 4.29).

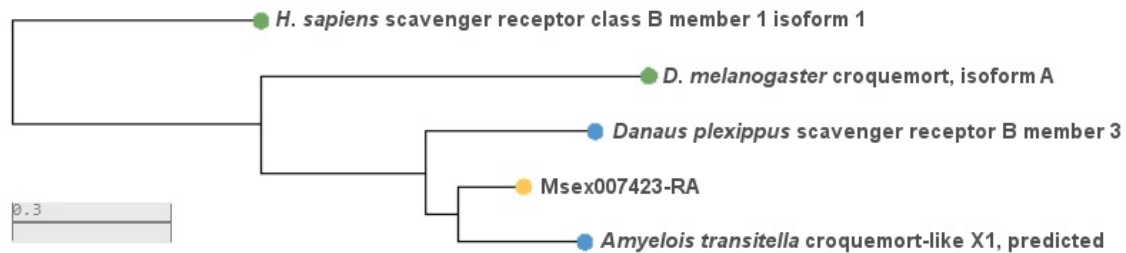


Abbildung 4.28: Distance tree of results der SmartBLAST-Analyse mit Msex007423-RA-Protein.

Das Msex007423-RA-Protein zeigt die höchste Übereinstimmung mit den Sequenzen der Lepidopteraarten *A. transitella* und *D. plexippus*, gefolgt von *D. melanogaster*. Die humane Scavenger receptor class B-Sequenz spaltet sich basal von den Insekten-Croquemort- bzw. Scavenger Rezeptor-Proteinen ab.

Eine *distance-tree*-Analyse von repräsentativen Proteinen der BLAST-Analyse, unter Ausschluss von mit dem Zusatz „hypothetic“ bzw. „predicted“ markierten Proteinen, ergab eine stärkere Ähnlichkeit des Msex007423-RA-Proteins mit den Scavenger receptor class B-Sequenzen der Lepidoptera (Abbildung 4.29). Als Vertreter anderer Insektenordnungen wurden die Proteine mit der höchsten Übereinstimmung von zwei Vertretern der Hymenoptera (*Habropoda laboriosa* und *Harpegnathus saltator*), eines Vertreters der Isoptera (*Zootermopsis nevadensis*) sowie eines Vertreters der Diptera (*Aedes darlingi*) ausgewählt.

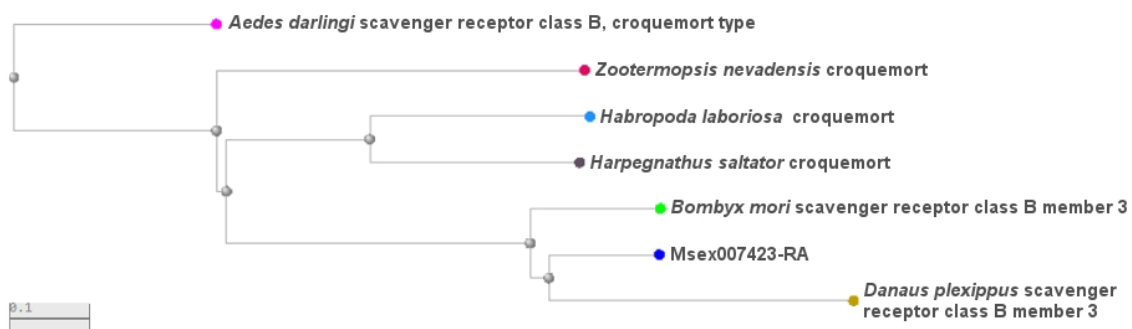


Abbildung 4.29: Distance tree of results einer Auswahl der Ergebnisse der BLAST-Analyse mit Msex007423-RA.

Msex007423-RA zeigt die höchste Übereinstimmung mit den Proteinsequenzen der Lepidoptera-Proteine Scavenger receptor class B member 3, gefolgt von den croquemort-Proteinen aus den Hymenoptera-Spezies (*Habropoda laboriosa* und *Harpegnathus saltator*) und der Isoptera *Zootermopsis nevadensis*. Der Scavenger receptor class B, croquemort type aus der Diptera *Aedes darlingi* spaltet sich basal von den Sequenzen der anderen Spezies ab.

Die InterPro Proteindomänen Analyse für Msex007423-RA-Protein ergab folgende Eigenschaften:

Proteinfamilie: CD36 Antigen
Scavenger Receptor Class B Type 1 SR-B1
Adhäsionsmolekül CD36
Biologischer Prozess: Zelladhäsion
Molekulare Funktion: Keine Vorhersage
Zelluläre Lokalisation: Membran

Die Analyse konservierter Proteindomänen bei Msex007423-RA-Protein und *D. melanogaster* Croquemort-PA-Protein brachte für beide Proteine einen übereinstimmenden Treffer, eine CD36-Domäne (Abbildung 4.30).

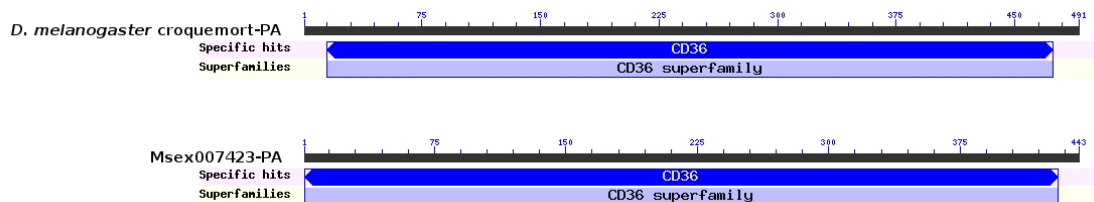


Abbildung 4.30: Konservierte Proteindomänen bei *D. melanogaster*-Croquemort-PA-Protein und Msex007423-PA-Protein.

Verwendete Metadatenbank: NCBI *conserved domain databank*. Die einzige konservierte Proteindomäne ist CD36, Accession: pfam01130.

Die Analyse des Msex007423-RA-Polypeptids mit der Proteinsekundärstruktur-Vorhersagesoftware TMHMM ergab, dass die Aminosäuren von Position 1 bis 407 extrazellulär liegen, die Aminosäuren 408 bis 430 eine Transmembrandomäne bilden und die C-terminalen Aminosäuren 431 bis 443 intrazellulär sind (Abbildung 4.31). Die extrazelluläre Domäne und die Transmembrandomäne bilden zusammen die CD36-Domäne (Abbildung 4.30).

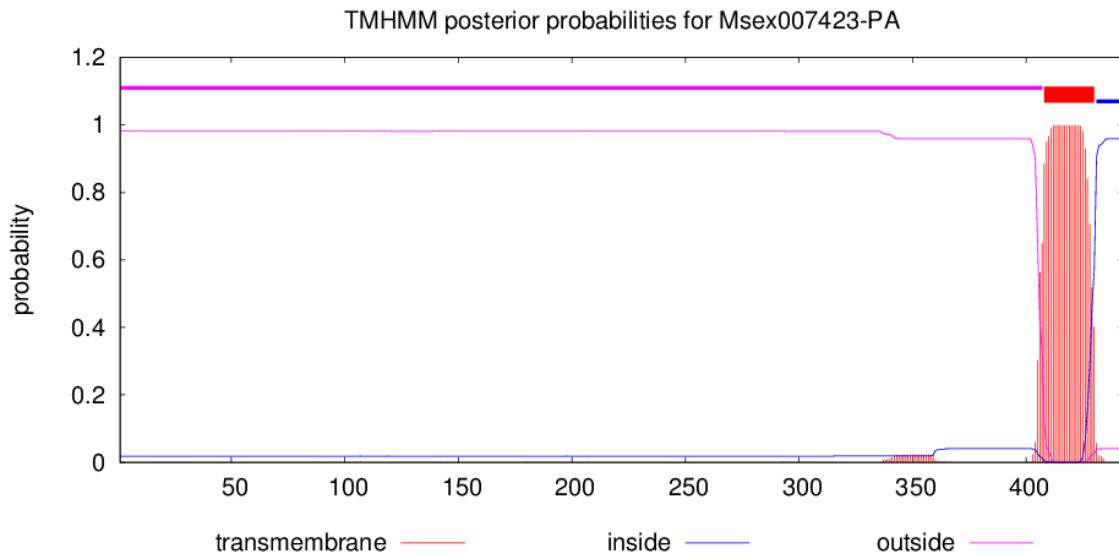


Abbildung 4.31: Grafische Darstellung der vorhergesagten Transmembrandomäne der Msex007423-PA Aminosäuresequenz.

Rot = Transmembrandomäne, magenta = extrazelluläre Domäne, blau = intrazelluläre Domäne.

Über RT-PCR konnte die Msex007423-RA mRNA im hämatopoetischen Organ und in Hämocyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.32). Ein Nachweis der RNA über *in-situ*-Hybridisierung konnte nicht erbracht werden. Weder in Hämocyten noch dem hämatopoetischen Organ unterschied sich die Markierung durch die *antisense*-RNA-Sonde von der der Negativkontrolle mit der *sense*-RNA-Sonde (Daten nicht gezeigt).

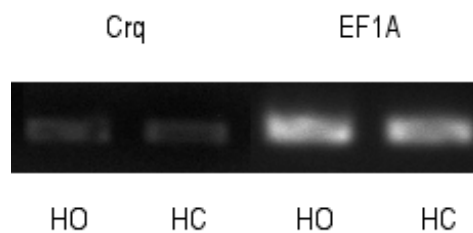


Abbildung 4.32: Nachweis der Msex007423-RA-mRNA (*croquemort/scavenger receptor class B-like*, Crq) in Hämocyten (HC) und hämatopoetischen Organen (HO) mittels RT-PCR.

Für den Msex007423-RA-Nachweis wurde cDNA aus 7,5 ng Gesamt-RNA und für EF1a aus 1,0 ng Gesamt-RNA als Template verwendet.

Das anti-*D. melanogaster* Croquemort-Immunsersum (anti-Crq) wurde per Western Blot (Abbildung 4.33) auf Kreuzreaktivität mit *M. sexta*-Proteinen getestet. Neben zahlreichen Proteinbanden, die sowohl in Hämocyten als auch im hämatopoetischen Organ durch das Immunsersum markiert wurden, wurden zwei Proteinbanden nur in Hämocyten nachgewiesen, von denen die höher liegende bei ca. 81 kDa und die niedrigere bei ca. 69 kDa lag (schwarze Pfeilspitzen in Abbildung 4.33).

Das Msex007423-RA Protein besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 50 kDa, *D. melanogaster* Croquemort-PA Protein eines von ca. 56 kDa. Im Western Blot läuft *D. melanogaster* Croquemort bei ca. 68 kDa (MANAKA *et al.*, 2004), in einer ähnlichen Höhe wie die niedermolekulare markierte Bande in *M. sexta* Hämocyten.

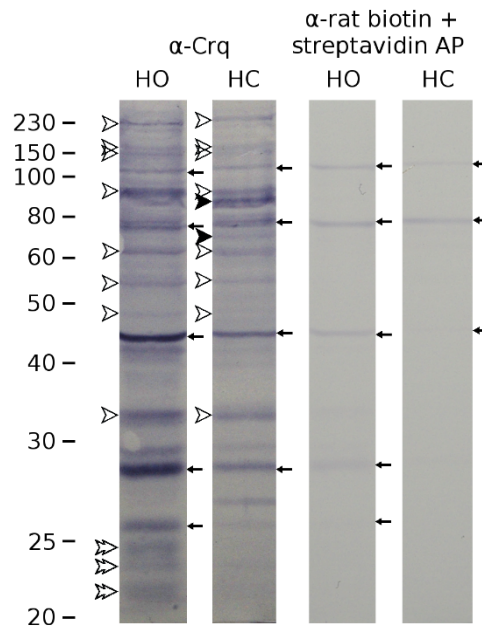


Abbildung 4.33: Nachweis von Proteinen markiert mit anti-*D. melanogaster* Croquemort-Immunserum in Hämocyten und hämatopoetischem Organ einer L5d2-Larve.

Western Blot nach denaturierender PAGE mit 10 % PA-Gel, 1 mg Gewebe pro Spur.

Schwarze Pfeilspitzen: Proteinbanden die nur in Hämocyten markiert wurden. Die größere Bande weist ein Molekulargewicht von ca. 81 kDa auf, die kleinere eines von ca. 69 kDa. Leere Pfeilspitzen: Proteinbanden die in Hämocyten und hämatopoetischem Organ markiert wurden. Schwarze Pfeile: Proteinbanden, die durch den sekundären Antikörper bzw. Streptavidin markiert wurden. Doppelte leere Pfeilspitzen: Proteine, die häufig unspezifisch markiert werden.

Abkürzungen: α-Crq = anti-*D. melanogaster* Croquemort Immunserum; α-rat biotin + streptavidin AP = Kontrolle mit anti-Ratte Antikörper, Biotin-markiert und Streptavidin, alkalische Phosphatase markiert; HC = Hämocyten, HO = hämatopoetisches Organ.

Molekulargewichte des Markers (NEB 7711) sind in kDa angegeben.

Eine Immunfluoreszenzmarkierung mit anti-Crq auf *M. sexta* L5d2 Hämocyten markierte Plasmatozyten und einige granuläre Zellen, sphärule Zellen wurden nicht markiert (Abbildung 4.34). Zellen des hämatopoetischen Organs konnten nicht mit anti-Crq markiert werden (Daten nicht gezeigt).

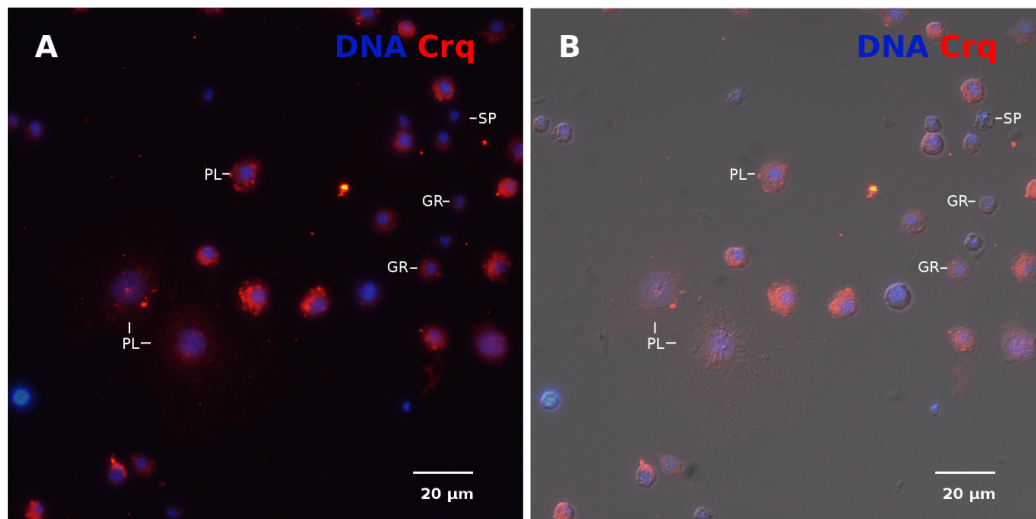


Abbildung 4.34: Markierung von Hämocyten mit anti-*D. melanogaster* Croquemort-Immuns serum (Crq).

A: Plasmatozyten (PL) und ungespreitete runde Zellen mit großem Zellkern sind deutlich markiert. Bei gespreiteten Plasmatozyten ist das Signal fein verteilt. Einige granuläre Zellen (GR) sind markiert, sphärule Zellen (SP) sind nicht markiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. **B:** Zusätzliche Überlagerung mit dem differentiellen Interferenzkontrastbild.

Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, PL = Plasmatozyte, SP = sphärule Zelle.

4.1.12.3 Peroxidasin-like Protein

Peroxidasin ist ein Enzym, welches für die Vernetzung von extrazellulären Matrix-Komponenten über Bildung von Sulfiliminbindungen zwischen den Kollagen-Molekülen verantwortlich ist (BHAVE *et al.*, 2012; WEISS, 2012) und einer der ersten Marker für *D. melanogaster*-Hämozyten in der Embryonalentwicklung ist (ABRAMS *et al.*, 1993, NELSON *et al.*, 1994, TEPASS *et al.* 1994, HOLZ *et al.*, 2003). Eine Datenbankanfrage gegen die Aminosäuresequenz von *D. melanogaster*-Peroxidasin (Dmel Pxn PA, FlyBase ID FBgn0011828) auf der Datenbank Manduca Base ergab eine starke Übereinstimmung (E-Wert 0,0, Score 1261, Identität 45 %) mit Msex010330-RA aus dem Datensatz *revised proteins OGS June 2012* bzw. das gleiche Ergebnis für die Sequenzen Msex2.09018-RA und Msex2.09018-RB aus dem Datensatz *2014 OGS2 proteins*.

Eine SmartBLAST Analyse mit den ermittelten Sequenzen Msex010330-RA ergab außerdem hohe Übereinstimmung mit Peroxidasin aus *B. mori*, *Papilio polytes*, *P. xuthus*, *D. melanogaster*, *Mus musculus* und weiteren Arten:

SmartBLAST Resultat	Score	E-Wert	Identität	GenBank Accession	Abkürzungen
PREDICTED: peroxidasin isoform X1 [<i>Bombyx mori</i>]	2222	0,0	76 %	XP_004929845.1	Bombyx_mori_PXN_X1_Pred
PREDICTED: peroxidasin [<i>Papilio polytes</i>]	2089	0,0	72 %	XP_013140000.1	Papilio_polytes_PXN_Pred
PREDICTED: peroxidasin [<i>Papilio xuthus</i>]	2074	0,0	72 %	XP_013179276.1	Papilio_xuthus_PXN_Pred
peroxidasin, isoform A [<i>Drosophila melanogaster</i>]	1333	0,0	47 %	NP_523891.2	D_melanogaster_PXN-PA
Peroxidasin homolog precursor [<i>Mus musculus</i>]	1194	0,0	47 %	NP_852060.2	Mus_musculus_PXN_Precursor

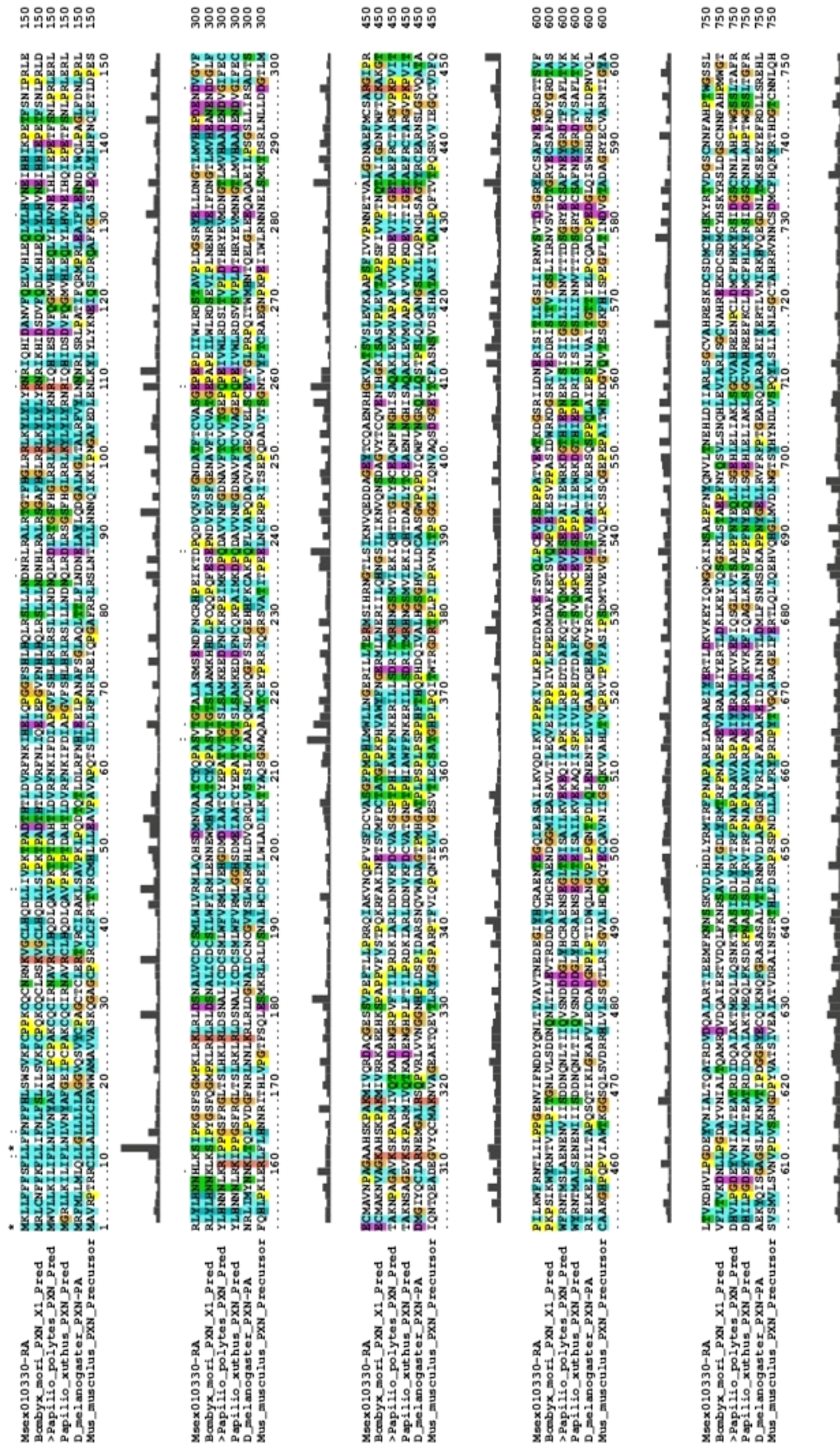
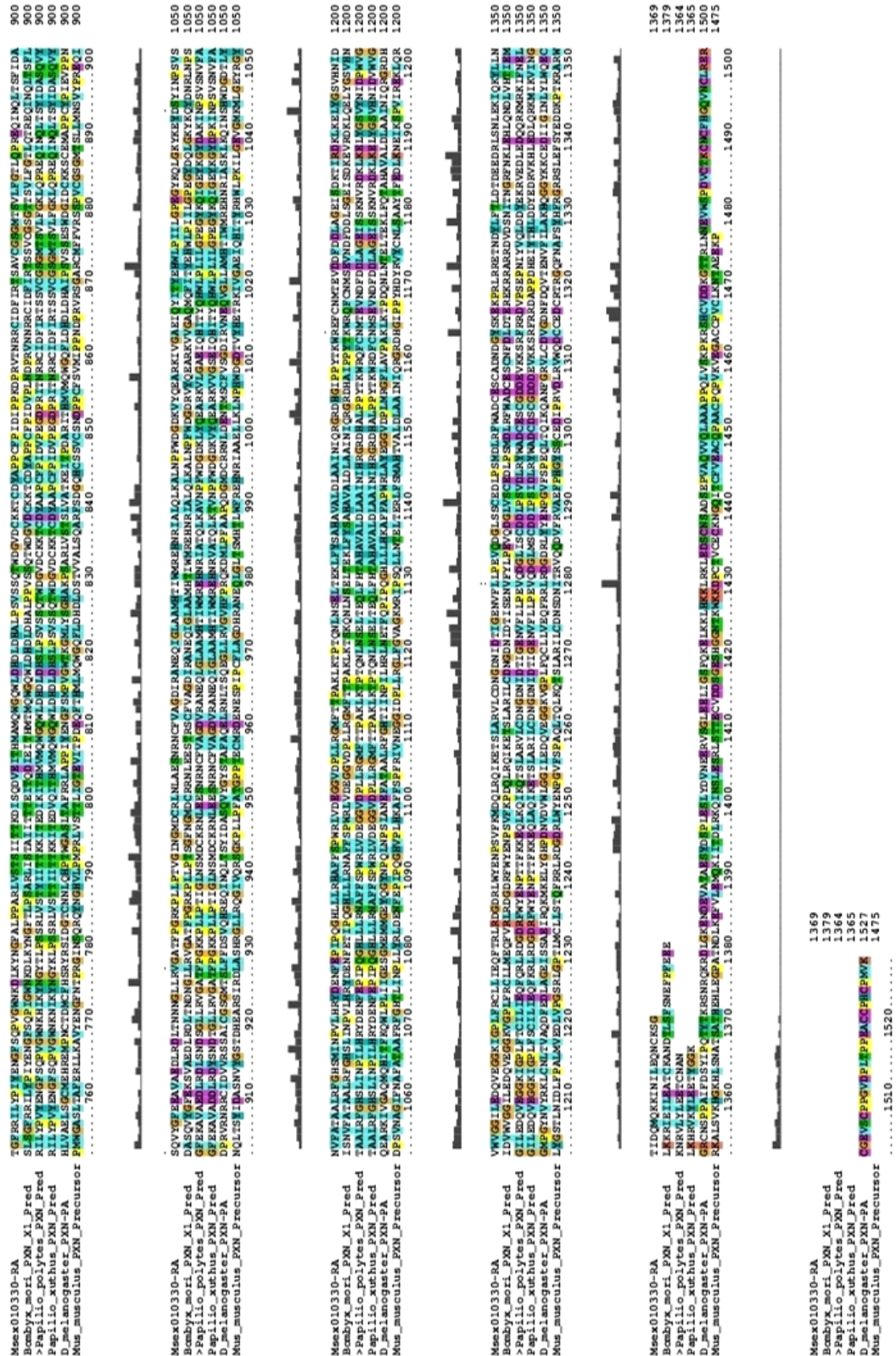


Abbildung 4.35: Multiples Sequenzalignment der SmartBLAST Ergebnisse für Msex010330-RA.

Die Farbkodierung ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Schwarze Balken = Grad der Konservierung. Die *distance-tree*-Analyse der mutmaßlichen *M. sexta*-Peroxidasin Sequenz (Msex010330) bestätigte die nahe Verwandtschaft mit Peroxidasin-Proteinen anderer Lepidoptera sowie mit *D. melanogaster* Peroxidasin (Abbildung 4.36).



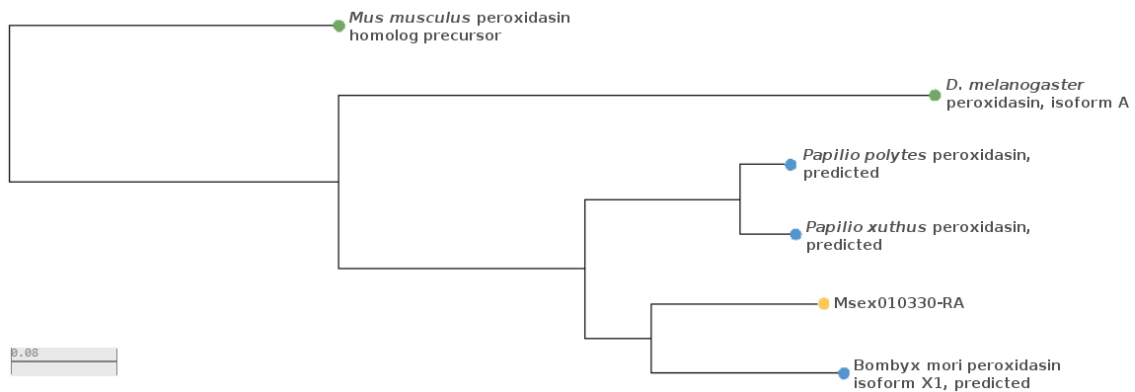


Abbildung 4.36: Distance tree of results der SmartBLAST-Analyse von Msex010330-RA.

Msex010330-RA gruppiert mit Peroxidasin aus anderen Lepidoptera, v. a. mit *B. mori* Peroxidasin Isoform X1. Zusammen mit *D. melanogaster*-Peroxidasin bilden diese eine Klade, die basal von *Mus musculus* Peroxidasin abspaltet.

Mittels RT-PCR konnte die Msex010330-RA mRNA in Hämocyten und hämatopoetischem Organ nachgewiesen werden (Abbildung 4.38 C). Das 656 bp PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung als Msex010330-RA bestätigt.

Die InterPro Proteindomänen Analyse für Msex010330-RA-Protein ergab:

Proteinfamilie: Hämperoxidase

Biologische Funktion: Reaktion auf oxidativen Stress, Oxidation-Reduktions-Prozess

Molekulare Funktion: Peroxidaseaktivität, Proteinbindung, Hämbindung

Zelluläre Komponente: Keine Vorhersage

Die vorhergesagten Proteineigenschaften sind deckungsgleich mit den für *D. melanogaster*-Peroxidasin vorhergesagten Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Die NCBI *conserved domain databank* (CDD) gibt an, dass Msex010330-RA aus einer *leucin-rich repeats*-Domäne, vier Immunoglobulin-Domänen und einer Peroxidasin-ähnlichen-Domäne besteht. Die gleichen Eigenschaften werden für *D. melanogaster*-Peroxidasin-PA angegeben, mit einer zusätzlichen C-terminalen von-Willebrand-Faktor Typ C-Domäne (Abbildung 4.37).

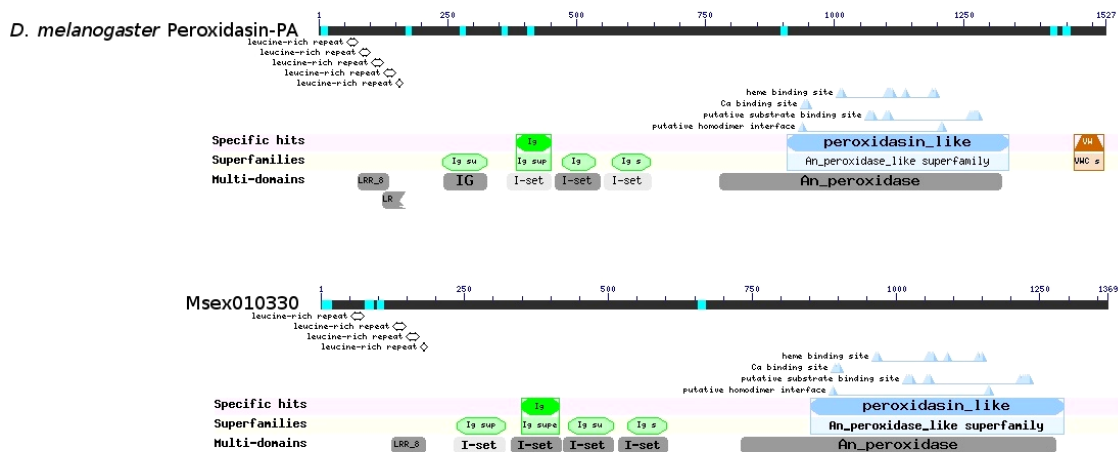


Abbildung 4.37: Vergleich der konservierten Proteindomänen in Msex010330-Protein und *D. melanogaster*-Peroxidasin-PA.

Verwendete Metadatenbank: NCBI *conserved domain databank*. Bei beiden Proteinen folgt auf eine *leucine-rich repeats*-Region (LRR_8; Accession: pfam13855) eine Immunglobulin-Domäne (Ig; Accession cd00096) und eine Peroxidasin-ähnliche-Domäne (peroxidasin_like; cd09826). Bei *D. melanogaster*-Peroxidasin-PA liegt zusätzlich eine von-Willebrand-Faktor Typ C-Domäne (VWC; Accession pfam00093) C-terminal vor.

Die Msex010330-RA-Polypeptidsequenz weist laut Analyse mit der Transmembrandomänenanalyse-software TMHMM keine vorhergesagte α -Helix und somit keine Transmembrandomäne auf (Daten nicht gezeigt).

RNA-*in-situ*-Hybridisierungen zur Detektion der Msex010330-RA-mRNA mit spezifischen RNA-Sonden ergaben weder auf Hämocyten noch auf hämatopoetischen Organen eine spezifische Markierung, die Signale der spezifischen (*antisense*) Sonde unterschieden sich nicht von denen der Kontrollsonde (*sense*, Daten nicht gezeigt). Hingegen konnten per RT-PCR die mRNA indirekt in Hämocyten und hämatopoetischem Organ nachgewiesen werden (Abbildung 4.38 C). Ein polyklonaler Antikörper gegen *H. sapiens*-Peroxidasin (anti-PXDN, abcam) markierte freie Hämocyten, aber keine Zellen die innerhalb des hämatopoetischen Organs liegen (Abbildung 4.38 A, B). Western-Blot-Analysen mit denaturierten Proteinlysaten aus Hämocyten und hämatopoetischen Organen fielen negativ aus (Daten nicht gezeigt).

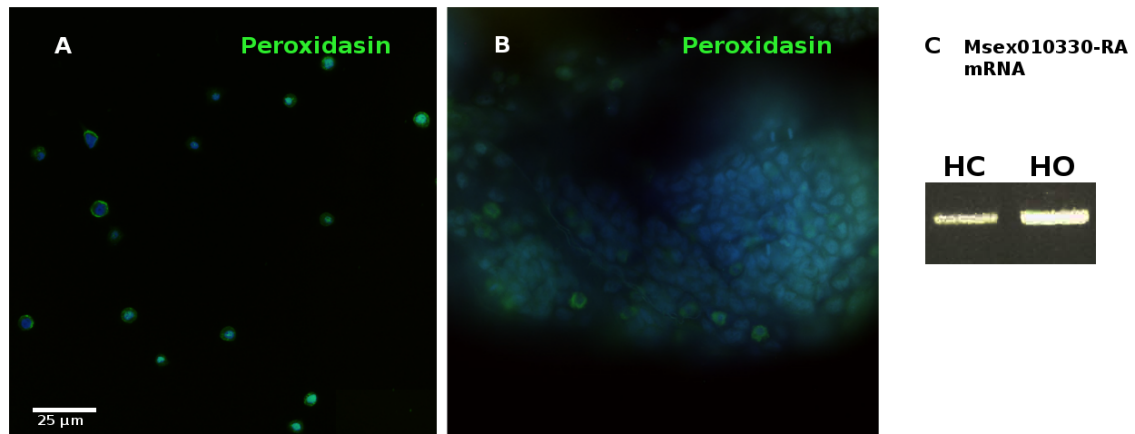


Abbildung 4.38: Markierung von Hämocyten und hämatopoetischem Organ mit anti-PXDN-Immunserum und Nachweis von Msex010330-RA-mRNA in Hämocyten und hämatopoetischem Organ.

A: Anti-PXDN Immunserum markiert alle Hämocytentypen. **B:** In seltenen Fällen sind anti-PXDN-positive Hämocyten in der Peripherie des hämatopoetischen Organs nachweisbar. Zellen des hämatopoetischen Organs sind PXDN-negativ. Der abgebildete Ausschnitt zeigt einen kleinen Lobus eines ansonsten nicht markierten hämatopoetischen Organs. **C:** RT-PCR-Nachweis der Msex010330-RA mRNA in Hämocyten (HC) und hämatopoetischem Organ (HO). Sowohl in Hämocyten als auch in hämatopoetischem Organ kann Msex010330-RA-mRNA nachgewiesen werden.

A, B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

4.1.12.4 Heixuedian-like Protein

Das Protein Heixuedian (Heix) ist ein zu den Prenyltransferasen gehörendes Enzym, das an zahlreichen biologischen Funktionen wie z. B. der Koenzym Q10 Synthese beteiligt ist (Xia *et al.*, 2015). In *D. melanogaster* führen Verlustmutationen u. a zu gestörter Hämatopoese und überaktivierten immunrelevanten Signalwegen. Außerdem wird Heixuedian embryonal in den frühen Hämocyten sowie der kortikalen Zone der larvalen Lymphdrüse exprimiert (Xia *et al.*, 2015).

Die BLAST-Analyse mit der *D. melanogaster* Heixuedian-PA-Proteinsequenz auf der Datenbank Manduca Base ergab einen Treffer mit hoher Übereinstimmung, Msex2.06039-RA (Score 405, E-Wert e-113, Identität 65 %). Weitere Treffer waren Msex2.02661-RA bis RH mit sehr niedriger Übereinstimmung (Score 29 bits, E-Wert 6,1, Identität 39 %), diese Sequenzen wurden nicht näher untersucht.

Eine SmartBLAST-Analyse mit der Msex2.06039-RA-Sequenz auf der NCBI-Datenbank ergab:

SmartBLAST Resultat	Score	E-Wert	Identität	GenBank Accession	Abkürzungen
1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase [<i>Operophtera brumata</i>]	602	0,0	90 %	KOB76048.1	Obrumata_1_4-2OH-2-naph_octaprenyltr
PREDICTED: ubiA prenyltransferase domain-containing protein 1 homolog [<i>Amyelois transitella</i>]	585	0,0	87 %	XP_013189746.1	Atrans_PRED_ubiA_prenyltr_cont_prot
PREDICTED: ubiA prenyltransferase domain-containing protein 1 homolog [<i>Papilio xuthus</i>]	582	0,0	87 %	XP_013179725.1	Pxuthus_PRED_ubiA_prenyltr_cont_prot_1
heixuedian [<i>Drosophila melanogaster</i>]	428	1e-149	68 %	NP_523581.1	Dmel_Heix (multiples Sequenzalignment)
ubiA-prenyltransferase-domain-containing protein 1 [<i>Homo sapiens</i>]	322	3e-108	92 %	NP_037451.1	Human_ubiA_prenyltr_cont_prot_1

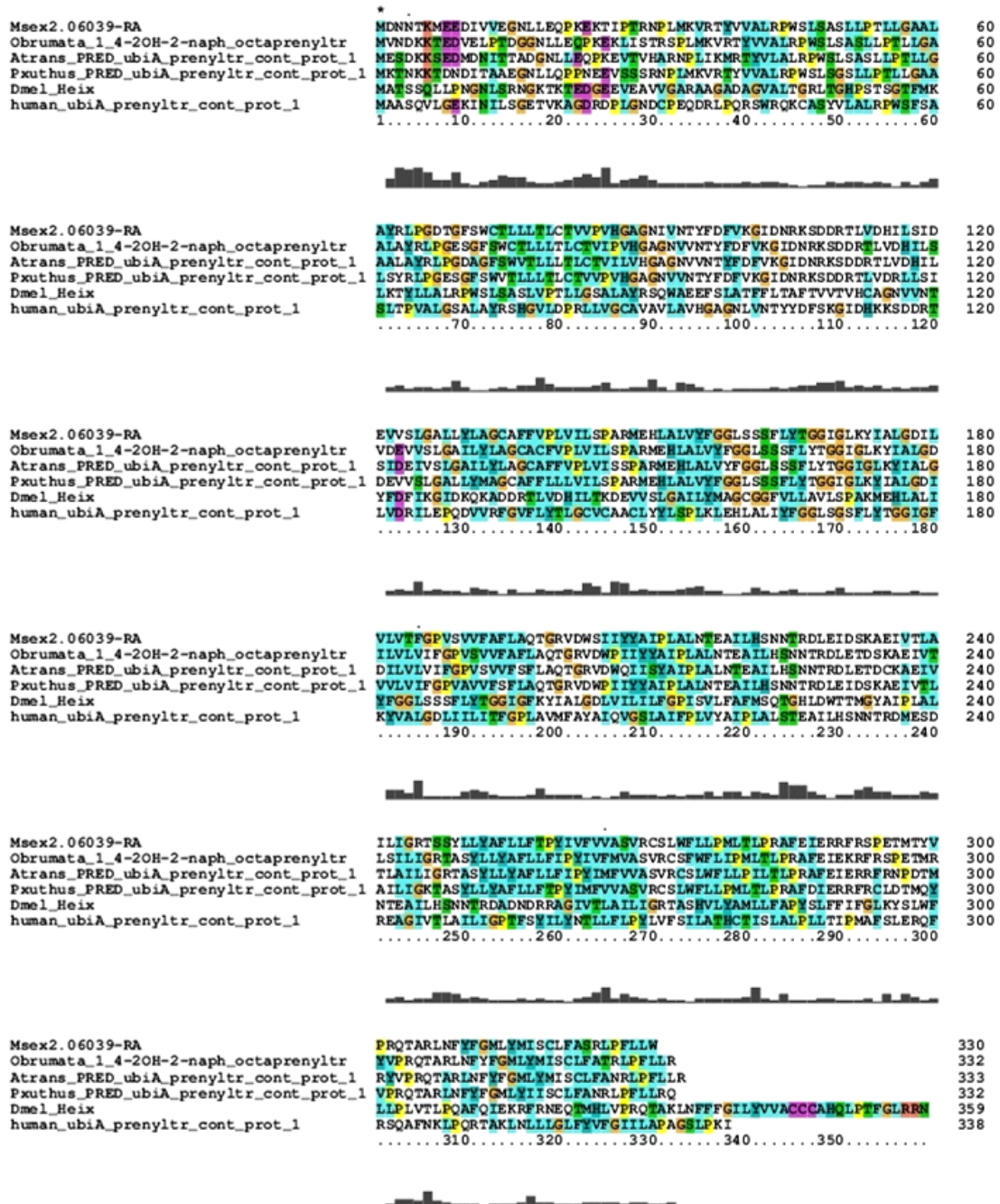


Abbildung 4.39: Multiples Sequenzalignment der SmartBLAST Ergebnisse für Msex2.06039-RA.
Die Farbkodierung ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Schwarze Balken = Grad der Konservierung.

Die zusätzlich durchgeführte *distance-tree*-Analyse der SmartBLAST-Ergebnisse ergab eine sehr enge Gruppierung der Lepidopterasequenzen gegenüber *D. melanogaster*-Heixuedian. Das humane ubiA-Prenyltransferase *domain containing protein 1* spaltete basal von den Aminosäuresequenzen der Insektenproteine ab (Abbildung 4.40).

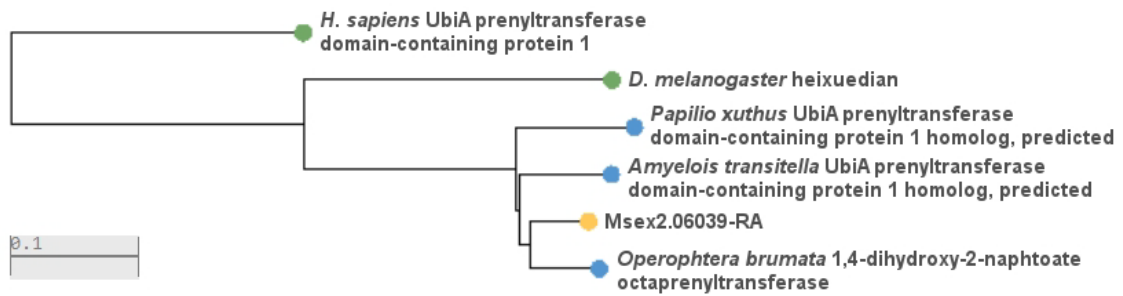


Abbildung 4.40: Distance tree of results der SmartBLAST-Analyse von Msex2.06039-RA.

Die Msex2.06039-RA-Proteinsequenz gruppiert mit den Sequenzen aus anderen Lepidoptera.

Die Interpro Proteindomänenanalyse von Msex2.06039-RA ergab:

Proteinfamilie: UbiA-Prenyltransferase
 Proteinunterfamilie: UbiA-Prenyltransferase-domain containing protein 1
 Biologische Funktion: Keine Vorhersage
 Molekulare Funktion: Prenyltransferaseaktivität
 Zelluläre Komponente: Integrale Komponente der Zellmembran

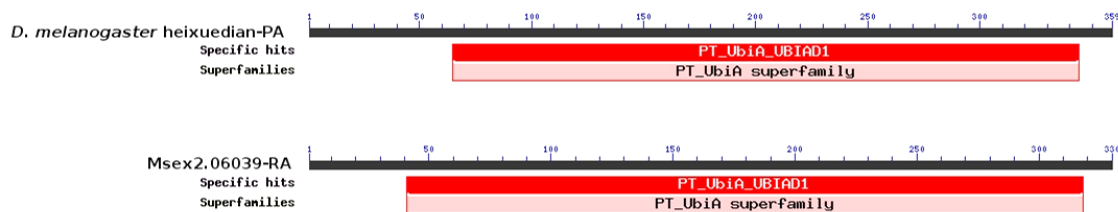


Abbildung 4.41: Vergleich der konservierten Proteindomäne in Msex2.06039-RA-Protein und D. melanogaster-Heixuedian-PA-Protein.

Verwendete Metadatenbank: NCBI *conserved domain databank*. In beiden Proteinen wurde eine 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat Octaprenyltransferase-Domäne (PT_UbiA_UBIAD1) als einzige konservierte Domäne identifiziert (Accession: cd13962).

Die Analyse der Sekundärstruktur der Msex2.06039-RA-Polypeptidsequenz mit der Transmembrandomänenanalysesoftware TMHMM ergab, dass sieben Transmembrandomänen vorliegen (Abbildung 4.42).

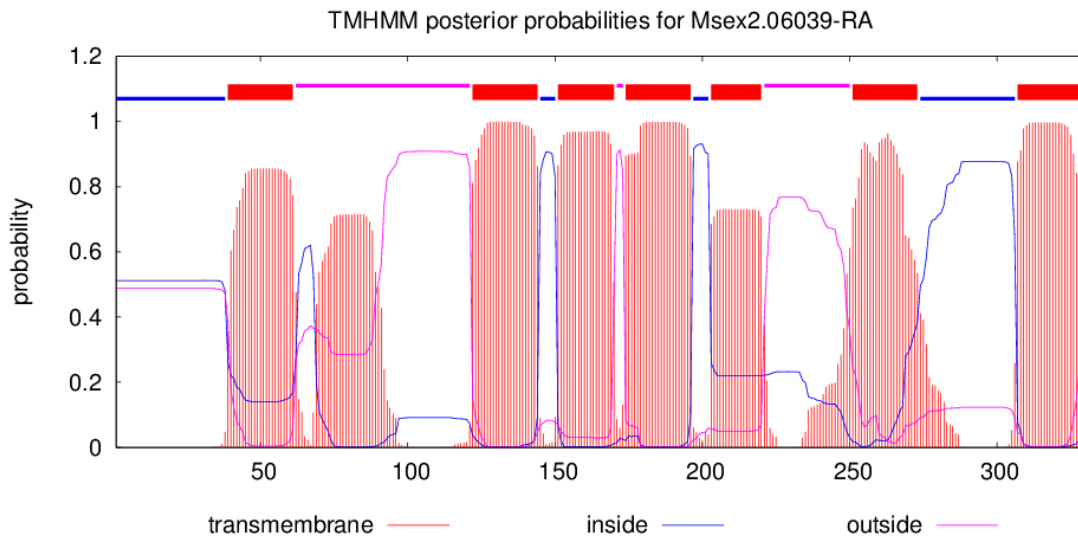


Abbildung 4.42: Grafische Darstellung der vorhergesagten Transmembrandomänen der Msex2.06039-RA Aminosäuresequenz.

Rot = Transmembrandomänen, magenta = extrazelluläre Domänen, blau = intrazelluläre Domänen.

Die Msex1.06039-RA-mRNA wurde mittels semiquantitativer RT-PCR in Hämozyten und hämatopoetischem Organ von L5d2-Larven detektiert (Abbildung 4.43). Ein deutlicher Unterschied des Msex1.06039-RA-mRN-Anteils zwischen Hämozyten und hämatopoetischem Organ konnte nicht beobachtet werden.

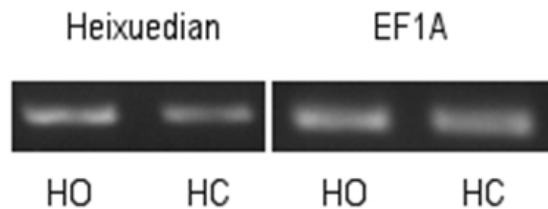


Abbildung 4.43: Nachweis der Msex2.06039-RA-mRNA (Heixuedian) in hämatopoetischem Organ (HO) und Hämozyten (HC) von L5d2-Larven mittels semiquantitativer RT-PCR.

Die für den Nachweis von Msex2.06039-RA mRNA wurde cDNA aus 2,5 ng Gesamt-RNA als Template verwendet, für die Kontrollreaktion mit EF1A-Primern wurde cDNA aus 1 ng Gesamt-RNA verwendet.

Das amplifizierte 674 bp PCR-Produkt für Msex1.06039-RA wurde kloniert, die Sequenz wurde durch Sequenzierung als Msex2.06039-RA bestätigt. *In-situ*-Hybridisierung mit Msex2.06039-RA-spezifischen RNA-Sonden auf Hämozyten und hämatopoetischem Organ zeigte kein eindeutiges Ergebnis, das schwache Signal der spezifischen Sonde (*antisense*) unterschied sich nicht von dem der Negativkontrolle (*sense*-Sonde; Daten nicht gezeigt).

4.2 Sektion II: Untersuchungen zur Immunkompetenz

4.2.1 Immunreaktion des hämatopoetischen Gewebes und weiterer Gewebe auf bakterielle Infektionen

Die Fähigkeit des hämatopoetischen Organs auf Immunstimuli durch Veränderungen der mRNA-Synthese von vier ausgewählten, immunrelevanten Molekülen zu reagieren wurde mittels *real time* qPCR geprüft. Dabei wurden zwei bakterielle Infektionsszenarien simuliert:

1. Es wurden L5d1-Larven mit sporulierten *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefüttert, um so eine Infektion bzw. Entzündung des Darms zu simulieren, und
2. Es wurden L5d1-Larven lebende *E. coli* K12 in das Hämocoel injiziert, um eine systemische Infektion zu simulieren.

Als Parameter für den allgemeinen physiologischen Status sowie des Infektions- bzw. Immunstatus der Versuchstiere wurde die Gewichtszunahme in den 15 Stunden zwischen Infektion und Probengewinnung, das Vorhandensein von melanisierten Einschlüssen im Hämocoel, die Lysozymaktivität sowie die antimikrobielle Aktivität von Hämolympheproben bestimmt.

Die Anzahl koloniebildender Bakterien in der Hämolymphe wurde bei unabhängigen Gruppen, die gleich behandelt wurden wie die für die restlichen Analysen verwendeten Tiere bestimmt.

4.2.2 Einfluss von oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe und von *E. coli* K12-Injektion auf den allgemeinen Gesundheitszustand

Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe wiesen eine normale Körperspannung auf, zeigten keine melanisierten Strukturen im Hämocoel und die peritrophische Membran des Darms war stabil. Mit Saline injizierte Tiere waren normal turgeszent, wiesen Melanisierungen nur rund um die Injektionsstelle und eine stabile peritrophische Membran auf. Mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefütterte Tiere stellten innerhalb zwei Stunden nach der Verabreichung des behandelten Futters die Nahrungsaufnahme ein. Die durchschnittliche Menge konsumierter *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Sporen betrug 88.596 ± 38.622 (errechnet über die Fläche konsumierter Futterwürfel). Nach 15 Stunden waren die Larven schlaff und reagierten mit konvulsiven Zuckungen auf Berührungsreize. Es wurden keine melanisierten Einschlüsse im Hämocoel beobachtet. Die peritrophische Membran des Darms war nicht stabil und zerfiel bei dem Versuch den Darminhalt samt peritrophischer Membran zu entfernen. *E. coli* K12-injizierte Tiere wiesen eine normale

Körperspannung auf. Im Hämocoel konnten an Tracheen und Fettkörper haftend zahlreiche melanierte Einschlüsse (Noduli) beobachtet werden. Die peritrophische Membran des Darms war stabil.

4.2.3 Einfluss von oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe und von *E. coli* K12-Injektion auf das Wachstum

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies die höchste Wachstumsrate (WR, $0,38 \pm 0,08$) auf, diese unterscheidet sich signifikant von allen anderen Versuchsgruppen ($n = 12$ Tiere pro Behandlung, Mann-Whitney-*U*-Test; Saline-injiziert: WR = $0,26 \pm 0,09$, $p = 0,01208$; *B. thuringiensis* ssp *kurstaki*-gefüttert: WR = $-0,05 \pm 0,03$, $p = 0,00000$; *E. coli* K12-injiziert: WR = $0,24 \pm 0,08$, $p = 0,00072$; Abbildung 4.44). *M. sexta*-Larven reagierten auf eine orale Infektion mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* durch Einstellen der Nahrungsaufnahme und über die gesamte Versuchszeit einer Abnahme des Körpergewichts (Abbildung 4.44). Gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe, aber auch gegenüber den *E. coli* K12-injizierten Tieren und der Saline-injizierten Kontrollgruppe unterschied sich die Wachstumsrate *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-infizierter Tiere signifikant (Mann-Whitney-*U*-Test; unbehandelt: $p = 0,00000$, Saline-injiziert: $p = 0,00000$, *E. coli* K12-injiziert: $p = 0,00000$; $n = 12$ Tiere pro Behandlung, Abbildung 4.44). *E. coli* K12-injizierte Tiere wiesen eine positive Wachstumsrate auf, die sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe Saline-injizierter Tiere unterschied (Mann-Whitney-*U*-Test; unbehandelt: $p = 0,28462$, Abbildung 4.44).

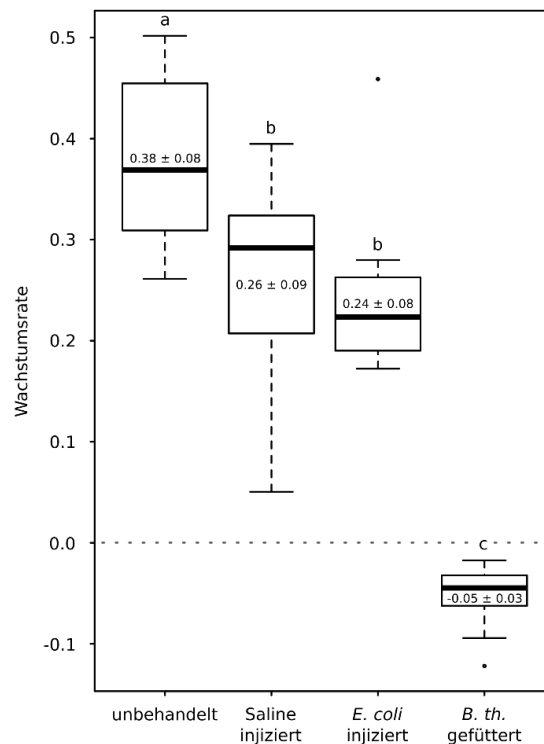


Abbildung 4.44: Einfluss von oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe und von *E. coli* K12-Injektion auf die Wachstumsrate.

Unbehandelte Larven zeigen die größte Wachstumsrate, gefolgt von Saline-injizierten und *E. coli*-injizierten Tieren. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefütterte Larven zeigen eine negative Wachstumsrate. Unterschiedliche Buchstaben (a, b, c) markieren signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0.05$, Einzelwerte in Tabelle A.12 gelistet). Pro Behandlung wurde die Gewichtszunahme von $n = 12$ Individuen ausgewertet ($n = 3$ unabhängigen Infektionsversuche mit je $n = 4$ Tieren).

4.2.4 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Bakterien aus der Hämolymphe *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*- und *E. coli* K12-behandelter Larven

Um nachzuweisen, ob die experimentellen Behandlungen systemischen Infektion führen, wurde die Anzahl koloniebildender Bakterien aus der Hämolymphe 15 Stunden nach der Infektion überprüft. Dazu wurden L5d1-Larven analog zu den zuvor genannten Experimenten mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefüttert bzw. mit *E. coli* K12 injiziert. Zusätzlich wurden Tiere mit höheren Konzentrationen *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefüttert, um einen schwereren Infektionsverlauf durch erhöhte Erregerzahl zu simulieren.

Neben einer geringen Zahl Bakterien, die in wenigen Fällen aus unbehandelten oder Saline-injizierten Tieren isoliert werden konnten (Abbildung 4.45, Tabelle 4.6), konnte in allen *E. coli* K12 injizierten Tieren koloniebildende Bakterien aus der Hämolymphe isoliert werden. Diese Kolonien

entsprachen morphologisch den Kolonien von *E. coli* K12 (Tabelle 4.6). Eine Infektion mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* führte in wenigen Fällen zur Besiedelung des Hämocoels mit Bakterien. Dabei war die höchste Anzahl an Bakterien in der Hämolymphe der mit der niedrigsten Konzentration an Erregern gefütterten Larven zu finden (Abbildung 4.45). Die aus der Hämolymphe isolierten Kolonien der mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Sporen gefütterten Larven waren entweder sehr klein, hyalin und glattrandig oder cremeweiß, groß und mit irregulärem Kolonierand, der typischen Kolonieform von *B. thuringiensis* ähnelnd (Tabelle 4.6). Dies lässt auf einen Übertritt von sowohl *B. thuringiensis* als auch anderer Bakterienarten aus dem Darm in das Hämocoel schließen.

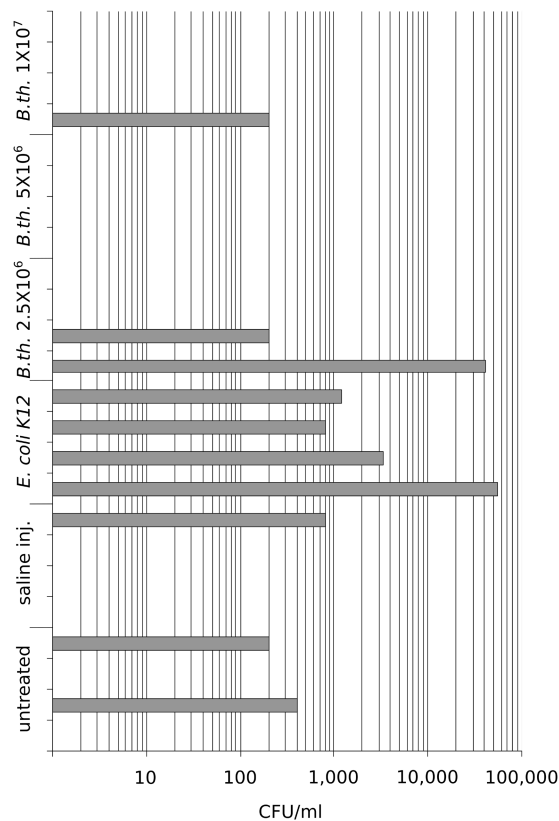


Abbildung 4.45: Anzahl koloniebildender Bakterien pro ml Hämolymphe 15 Stunden nach oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe bzw. *E. coli* K12-Injektion.

x-Achse logarithmisch skaliert, Werte unter 1CFU/ml kamen nicht vor. Abkürzungen: *B. th* = *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-gefüttert, *E. coli* K12 inj. = *E. coli* K12-injiziert. Konzentration der für die Behandlung des Futters verwendeten Bakteriensuspension ist in *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Sporen pro ml angegeben.

Tabelle 4.6: Koloniebildende Bakterienisolate aus *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-gefütterten und *E. coli* K12-injizierten Tieren.

Behandlung	Anteil der Tiere mit Bakterien in der Hämolymphe	Kolonien pro ml Hämolymphe ($\pm$ SD)	Morphologie der Kolonien ¹	Bemerkungen
unbehandelt	2 von 4 (50 %)	150 $\pm$ 190	Weiß, glattrandig (66,6 %) weiß, irregulär (33,3 %)	
Saline-injiziert	1 von 4 (25 %)	200 $\pm$ 400	Weiß/gelblich, irregulär, groß (100 %)	
<i>E. coli</i> K12-injiziert (2*10 ⁶ Zellen / g Körpergewicht)	4 von 4 (100 %)	15.150 $\pm$ 26.720	Klein, hyalin, rund, wie <i>E. coli</i> K12 (100 %)	
<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -gefüttert (2.5*10 ⁶ Sporen/ml Behandlungslösung)	2 von 4 (50 %)	10.150 $\pm$ 20.170	Sehr klein, hyalin, glattrandig, rund (84,7 %), cremeweiß, groß, irregulär, wie <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> (14,8 %), klein, gelb, glattrandig, wie <i>Micrococcus luteus</i> (0,5 %)	Alle Kolonien aus einem Tier, mit Ausnahme der <i>M. luteus</i> -ähnlichen Kolonie, die einem zweiten Tier entstammte.
<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -gefüttert (5*10 ⁶ Sporen/ml Behandlungslösung)	0 von 4 (0 %)	0 $\pm$ 0	-	
<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -gefüttert (1*10 ⁷ Sporen/ml Behandlungslösung)	1 von 4 (25 %)	50 $\pm$ 100	Cremeweiß, groß, irregulär, wie <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> (100 %)	Eine Kolonie aus 5 μ l Hämolymphe eines Tiers.

¹ Anteil des jeweiligen Morphs an allen isolierten Bakterien in Klammern.

4.2.5 Lytische Aktivität der Hämolymphe nach oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Aufnahme und *E. coli* K12-Injektion

Um den Einfluss der experimentellen Infektion mit *E. coli* K12 bzw. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* auf die Lysozymaktivität in *M. sexta*-Larven zu testen, wurde die lytische Aktivität der Hämolymphe auf abgetöteten *Micrococcus luteus* mittels Diffusionsagartest bestimmt. Die lytische Aktivität wurde mit der von Hühnereiweißlysozym geeicht und die Aktivität in mg/ml Hühnereiweißlysozymäquivalenten (HEWLÄq) angegeben.

Sowohl Hämolympfproben unbehandelter Tiere als auch mit Saline-injizierter Tiere wiesen Lysozymaktivität auf ($742 \pm 549 \mu\text{g/ml HEWLÄq}$ bzw. $965 \pm 756 \mu\text{g/ml HEWLÄq}$). Zwischen beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied der lytischen Aktivität (Abbildung 4.46 A). *E. coli* K12-injizierte Tiere wiesen die höchste Lysozymaktivität auf ($2144 \pm 555 \mu\text{g/ml HEWLÄq}$). Sie war signifikant höher als bei allen anderen Versuchsansätzen (Abbildung 4.46 A). Die lytische Aktivität *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-gefütterter Tiere ($1464 \pm 684 \mu\text{g/ml HEWLÄq}$) war gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht, nicht jedoch im Vergleich mit Saline-injizierten Tieren (Abbildung 4.46 A).

4.2.6 Anti-*E. coli*-Aktivität in der Hämolymphe nach oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Aufnahme und *E. coli* K12-Injektion

Der Einfluss der experimentellen Infektion mit *E. coli* K12 bzw. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* auf die antimikrobielle Aktivität der Hämolymphe wurde mittels Diffusionsagartest mit lebenden *E. coli* K12 D31 untersucht. Die anti-*E. coli* K12 D31-Aktivität wurde mit der von einer Gentamicineichreihe verglichen und in $\mu\text{g/ml}$ Gentamicinäquivalenten (GEÄq) angegeben.

In der unbehandelten Kontrollgruppe und der Saline-injizierten Kontrollgruppe wiesen jeweils sieben von 12 untersuchten Tieren eine unter der Nachweisgrenze liegende anti-*E. coli*-Aktivität auf, während fünf Tiere in beiden Gruppen eine nachweisbare Aktivität zeigten (Mittelwert: unbehandelt $9,19 \pm 18,14 \mu\text{g/ml GEÄq}$, Saline-injiziert $4,02 \pm 5,03 \mu\text{g/ml GEÄq}$, Abbildung 4.46 B). Die höchste individuelle Aktivität aller untersuchten Proben konnte in einer Hämolympfprobe der unbehandelten Tiere gemessen werden ($64,43 \mu\text{g/ml GEÄq}$, siehe Ausreißer Abbildung 4.46 B). Unbehandelte Tiere und Saline-injizierte Tiere unterschieden sich in ihrer anti-*E. coli*-Aktivität nicht signifikant voneinander.

Die *E. coli* K12-injizierten Tiere besaßen die höchste durchschnittliche anti-*E. coli*-Aktivität ($14,44 \pm 4,04 \mu\text{g/ml GEÄq}$, Abbildung 4.46 B). Diese war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und zur Saline-injizierten Kontrollgruppe signifikant höher. Zur anti-*E. coli*-Aktivität in der Hämolymphe *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-gefütterter Tiere unterschied sich die Aktivität in *E. coli* K12-injizierten Tiere nicht signifikant. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-gefütterte Tiere wiesen eine gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe und der Saline-injizierten Gruppe deutlich erhöhte anti-*E. coli*-Aktivität auf ($11,63 \pm 3,69 \text{ GEÄq}$, Abbildung 4.46 B).

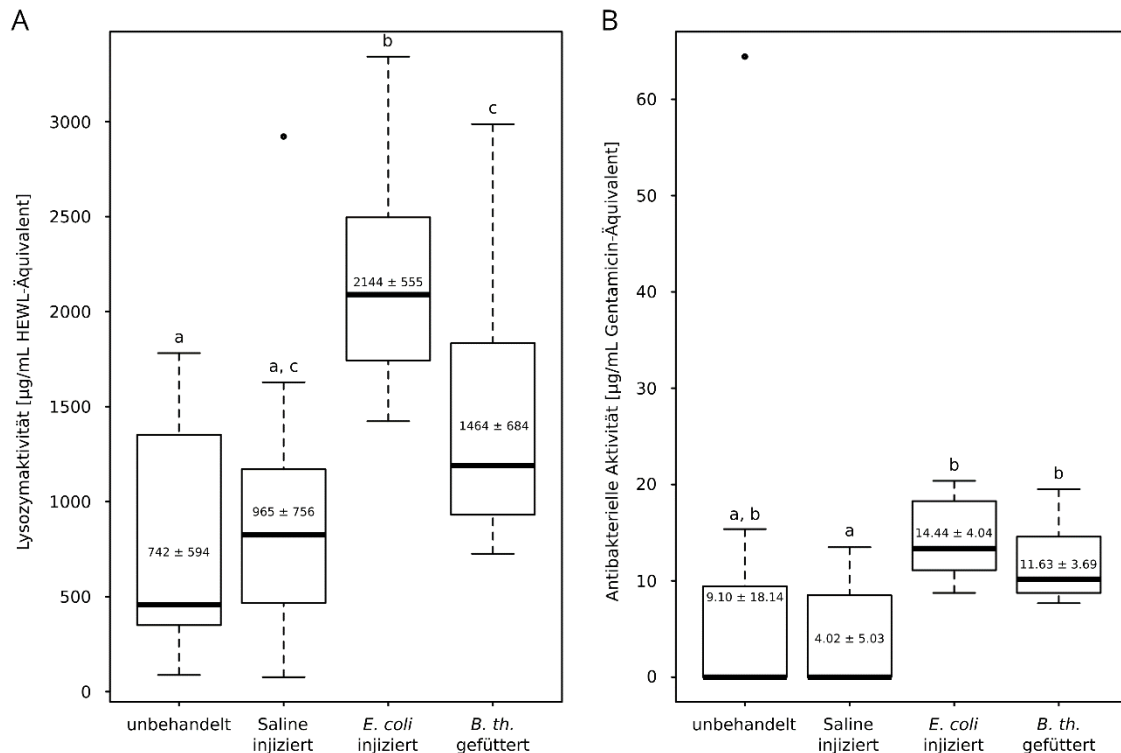


Abbildung 4.46: Einfluss von oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe und von *E. coli* K12-Injektion auf die Lysozymaktivität und die anti-*E. coli*-Aktivität.

A: Lysozymaktivität der Hämolymphe. Die stärkste lytische Aktivität wurde in *E. coli* K12-injizierten Tieren ermittelt, gefolgt von mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefütterten Tieren. **B:** Anti-*E. coli*-Aktivität der Hämolymphe. Mittelwerte ± Standardabweichung sind in Zahlen in den Boxen angegeben. Schwarzer Querbalken = Median. Unterschiedliche Buchstaben (a, b, c) markieren signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0.05$; Einzelwerte siehe Tabelle A.13 und Tabelle A.14). Pro Behandlung $n = 12$ individuelle Hämolympheproben ($n = 3$ unabhängigen Infektionsversuche mit je $n = 4$ Tieren).

Abkürzung: HEWL = Hühnereiweißlysozym.

4.2.7 Real-time qPCR-Analysen von vier Genen nach oraler *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Aufnahme und *E. coli* K12-Injektion

Die Synthese von Immulectin-3 (IML3), Lysozym, *Peptidoglycan Recognition Protein* 1A (PGRP 1A) und Scolexin A-mRNA in hämatopoetischen Organen, Hämozyten, Fettkörper und Mitteldarm von immunstimulierten L5d2 Larven (15 Stunden nach Applikation der Erreger) wurde mittels *real-time* qPCR ermittelt und in Relation zur jeweiligen Kontrollgruppe gesetzt.

Die Detektionsgrenze, also die Anzahl der PCR-Zyklen bis zur ersten Detektion eines Fluoreszenzsignals durch den *real-time* Cyclyer (*cycle threshold*, Ct), ist ein Maß für die mRNA-Konzentration in der analysierten Probe. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto mehr mRNA des Zielgens ist in der Probe vorhanden. Ct-Werte über 30 wurden als schwache mRNA-Expression gewertet. Die Ct Werte für jede Behandlung und jedes untersuchte Gewebe sind in Tabelle A.15 angegeben. Wurde nach

40 Zyklen in beiden Simultanansätzen kein Signal detektiert, wurde das Gen als nicht exprimiert gewertet. Dies trat ausschließlich bei dem Gen IML-3 in Mitteldarmproben auf.

Die Injektion mit Saline erhöhte die mRNA-Synthese im Mitteldarm von Lysozym und PGRP-1A signifikant (Lysozym-mRNA: $2,38 \pm 0,45$, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0341$; PGRP-1A: $2,17 \pm 0,45$, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0462$), während keine signifikante Veränderung der mRNA-Synthese aller untersuchten Gene im hämatopoetischen Organ, in Hämocyten oder im Fettkörper beobachtet wurde (Ct-Werte sind Tabelle A.15 zu entnehmen).

Eine orale Verabreichung von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* rief eine Veränderung der mRNA-Expression eines oder mehrerer der untersuchten Gene in jedem Gewebe gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe hervor. In hämatopoetischen Organen wurde nur die PGRP-1A-mRNA-Synthese signifikant erhöht ($8,31 \pm 1,24$ -facher mRNA-Gehalt, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0094$). In Hämocyten wurde in mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gefütterten Larven die mRNA-Synthese von Lysozym signifikant erhöht ($1,87 \pm 0,33$ -facher mRNA-Gehalt, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0208$) und die von IML-3 erniedrigt ($0,5 \pm 0,16$ -facher mRNA-Gehalt, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0333$). Fettkörpergewebe und das Mitteldarmepithel reagierten mit signifikant erhöhter Synthese von Lysozym- und PGRP-1A-mRNA auf eine *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Infektion (Abbildung 4.47 A). Im Fettkörper konnte ein $6,16 \pm 1,46$ -fach erhöhter Lysozym-mRNA-Gehalt (Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0256$) sowie ein $24,30 \pm 5,92$ -fach erhöhter PGRP-1A-mRNA-Gehalt (Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0209$) nachgewiesen werden. Im Mitteldarm war der Lysozym-mRNA-Gehalt um das $9,30 \pm 2,32$ -fache erhöht (Einstichproben-*t*-Test $p = 0,025$) und der PGRP-1A-mRNA-Gehalt um das $3,30 \pm 0,884$ -fache erhöht (Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0461$). Die Steigerung der Scolexin A-mRNA-Synthese schwankte zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen stark, so dass die durchschnittliche Steigerung bei $15,04 \pm 10,44$ lag aber nicht als signifikant angesehen werden kann (Einstichproben-*t*-Test $p = 0,1452$). IML-3-mRNA konnte im Mitteldarm nicht detektiert werden.

Nach einer Injektion mit *E. coli* K12 wurde die mRNA-Synthese von Lysozym ($3,00 \pm 0,34$ -fach, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0095$), PGRP-1A ($2,31 \pm 0,41$ -fach, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0317$) und Scolexin A ($7,10 \pm 0,89$ -fach, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0070$) im hämatopoetischen Organ gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 4.47 B). In Hämocyten wurde die Synthese von Lysozym-mRNA signifikant erhöht ($3,44 \pm 0,62$ -fach, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0208$, Abbildung 4.47 B). Im Fettkörper wurde nach einer *E. coli*-Infektion die Lysozym- ($2,97 \pm 0,78$, Einstichproben-

t -Test $p = 0,048$) und die Scolexin A-mRNA Synthese ($122,08 \pm 13,80$, Einstichproben- t -Test $p = 0,0043$) signifikant erhöht (Abbildung 4.47 B). Das Mitteldarmepithel zeigte keine signifikanten Veränderungen der mRNA Synthese von Lysozym, PGRP-1A und Scolexin A (Abbildung 4.47 B). IML-3-mRNA konnte im Mitteldarm nicht nachgewiesen werden.

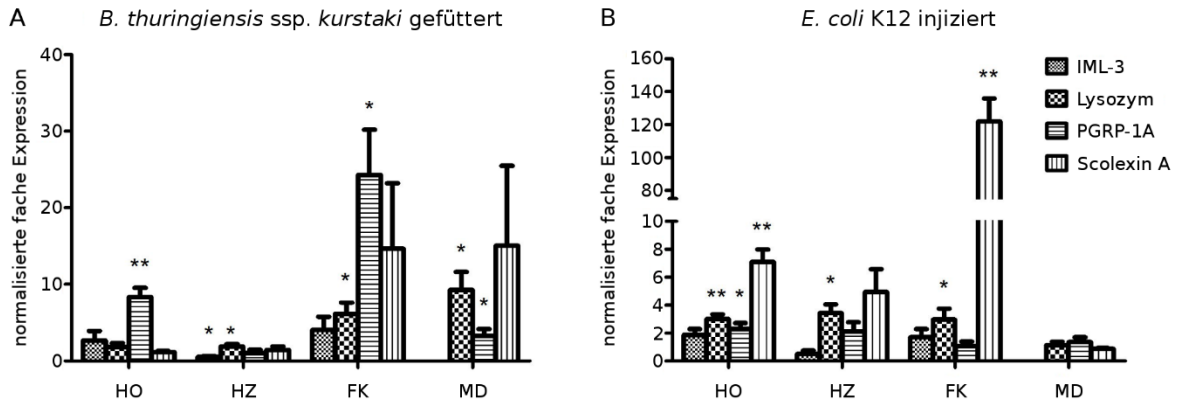


Abbildung 4.47: Relative Veränderung der mRNA-Expression verschiedener immunrelevanter Gene nach oraler *B. thuringiensis ssp. kurstaki*-Aufnahme (A) bzw. Injektion von *E. coli* K12 (B).

Als Kontrollgruppe (unstimuliert) dienten unbehandelte Tiere (A) bzw. Saline-injizierte Tiere (B). Die veränderte mRNA-Konzentration ist als das Vielfache der mRNA-Konzentration der jeweiligen Kontrolle angegeben (normalisierte fache Expression). Signifikante Unterschiede (Einstichproben t -Test) zu der jeweiligen Kontrolle wurden durch * ($p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,01$) markiert.

Abkürzungen: FK = Fettkörper, HO = hämatopoetisches Organ, HZ = Hämozyten, MD = Mitteldarm.

4.2.8 Real-time qPCR-Analysen von vier Genen im Mitteldarm von L5d2-Larven und Präpuppen (L5d13)

Der Mitteldarm von Insekten wird während der Metamorphose vom larvalen zum adulten Mitteldarm umgewandelt, was mit einer erhöhten Lysozymaktivität des Mitteldarmepithels einhergeht (RUSSEL und DUNN, 1991) und gemeinhin als Vorgang zur Reduktion der Darmflora angesehen wird, mit dem Ziel das Infektionsrisiko während der Metamorphose zu verringern.

Die Expression von Lysozym-mRNA und der mRNA von PGRP-1A und Scolexin A im Mitteldarm von Präpuppen (L5d13) wurde mit der von unbehandelten L5d2-Larven mittels *real time* qPCR verglichen. IML-3-mRNA war weder im Mitteldarm von L5d2-Larven noch von L5d13-Larven detektierbar (Tabelle A.15, Tabelle A.16). Die Lysozym-mRNA-Synthese war im Mitteldarm von Präpuppen um das $470,11 \pm 95,90$ -fache signifikant gegenüber der L5d2-Larve erhöht (Einstichproben- t -Test $p = 0,0136$). Die Synthese von Scolexin A-mRNA war signifikant niedriger im Mitteldarm von Präpuppen war als in dem von L5d2-Larven ($0,08 \pm 0,06$ -facher mRNA-Gehalt, Einstichproben- t -Test $p = 0,0012$). Der Gehalt der für PGRP-1A kodierenden mRNA im Mitteldarm unterschied sich

tendenziell, aber nicht signifikant zwischen den beiden Entwicklungsstadien ($14,33 \pm 7,26$ -fache Erhöhung in L5d13 gegenüber L5d2, Einstichproben-*t*-Test $p = 0,0862$).

4.2.9 Lysozym in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ

Lysozym mRNA konnte in Hämozyten und Zellen des hämatopoetischen Organs mittels RNA-*in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Abbildung 4.48 A, B). Auf Hämozytenmonolayern waren vor allem Plasmatozyten und große, runde Zellen markiert, daneben auch einige granuläre Zellen (Abbildung 4.48 A). In hämatopoetischen Organen konnte in einigen Zellen die Lysozym-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 4.48 B). Mit den anti-*H. cecropia* Lysozym-Immunsereen wurden Hämozyten sowie Zellen des hämatopoetischen Organs markiert (Abbildung 4.48 C, D). Auf Monolayern wurden Plasmatozyten sowie runde Hämozyten markiert, die als granuläre Zellen identifiziert wurden (Abbildung 4.48 C). Die Markierung ist körnig und im Zytoplasma lokalisiert. Durch die Membranmarkierung mit MS75 wird im hämatopoetischen Organ deutlich, dass das Lysozym sich in granulären Einschlüssen im Zytoplasma befindet (Abbildung 4.48 D).

Prinzipiell glichen sich die Markierungsmuster der Lysozym-Nachweise bei unbehandelten Tieren und immunstimulierten Tieren (Daten nicht gezeigt).

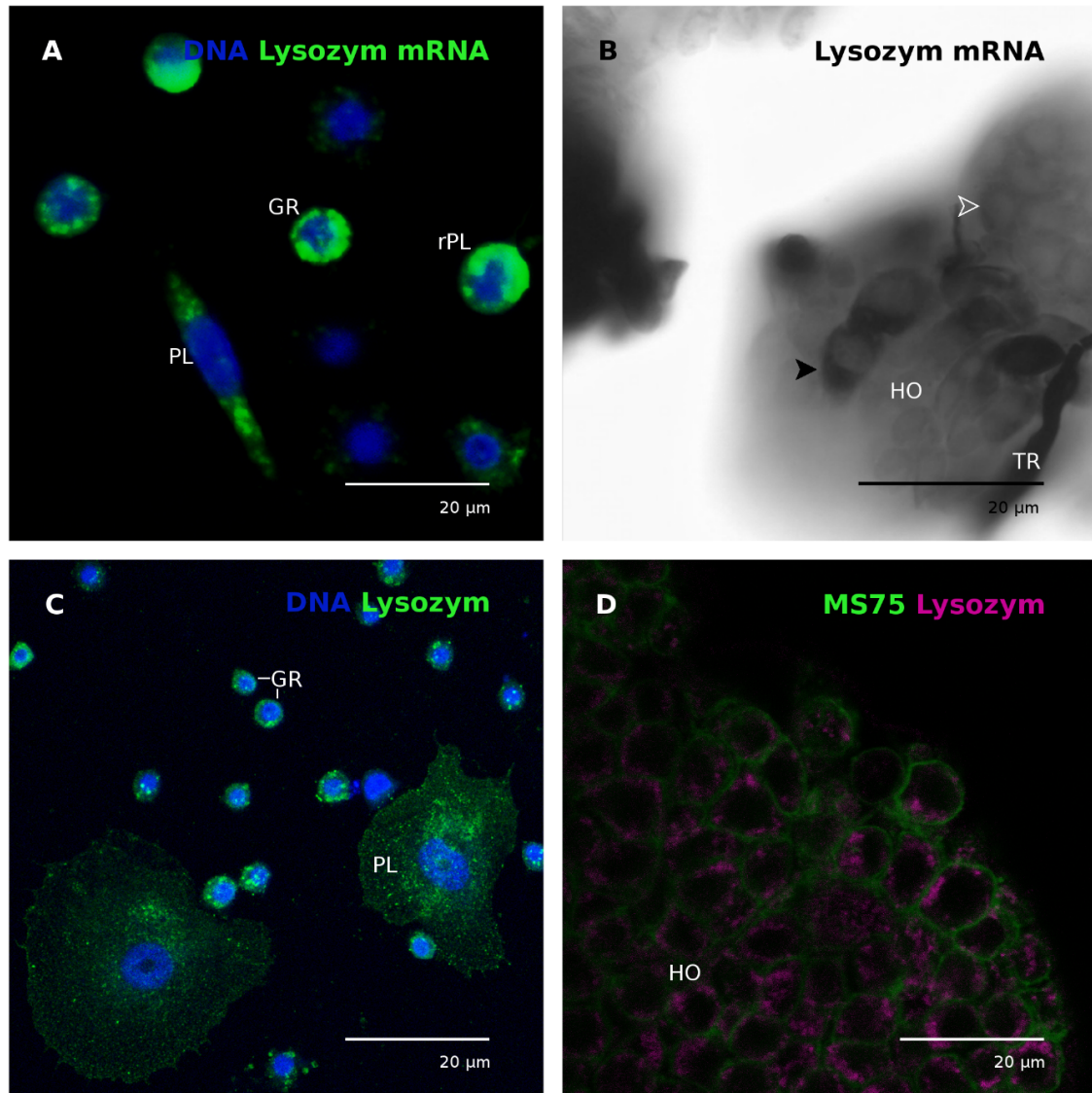


Abbildung 4.48: Nachweis von Lysozym-mRNA und -Protein in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ.

A: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der Lysozym-mRNA auf Hämozyten von *E. coli* K12-injizierten L5d2-Larven. Gespreitete Plasmatozyten (PL), ungespreitete Plasmatozyten (rPL) und einige granuläre Zellen (GR) beinhalten Lysozym-mRNA im Zytoplasma. **B:** Zellen des hämatopoetischen Organs beinhalten Lysozym-mRNA. Gefüllte Pfeilspitze: stark markierte Zelle. Leere Pfeilspitze: schwach markierte Zelle. Das hämatopoetische Organ entstammt einem zuvor verwundeten Tier. **C:** Mit anti-*Hyalophora cecropia* Lysozym-Immunsereum (#43414) markierte Hämozyten unbehandelter L5d2-Larven. Sowohl Plasmatozyten (PL) als auch granuläre Zellen (GR) beinhalten Lysozym. **D:** Nachweis von Lysozym im hämatopoetischen Organ unbehandelter L5d2-Larven mit anti-*Hyalophora cecropia* Lysozym-Immunsereum (#43422, magenta). Die Zellen des hämatopoetischen Organs wurden zusätzlich mit dem mAb MS75 (grün) markiert.

Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, HO = hämatopoetisches Organ, PL = Plasmatozyte, rPL = runde Plasmatozyte, TR = Trachee.

A, C, D: KLSM-Aufnahmen; A, C: Projektion mehrerer konfokaler Ebenen. B: Differentielle Interferenzkontrast-Aufnahme.

Zwischen den verwendeten Immunseren gegen *H. cecropia*-Lysozym (anti-*H. cecropia* Lysozym-Immunserum #43322 bzw. #43414) konnte auf Hämozyten und hämatopoetischen Organen kein Unterschied der Markierung beobachtet werden.

Beide Immunseren markierten im Western Blot mit Hämolympbproben eine einzelne Bande bei ca. 17 kDa (Abbildung A.10).

Sowohl in der Hämozytenprobe als auch bei dem hämatopoetischen Organ-Lysat wurde mittels Western Blot-Analyse nach denaturierender SDS-PAGE jeweils eine Bande durch anti-*H. cecropia* Lysozym Immunserum (#43414) markiert. Die positiven Banden liefen in beiden Proben in der gleichen Höhe. Die Markierung fiel bei gleicher Probenkonzentration etwas stärker in der hämatopoetischen Organ-Probe aus. Das relative Molekulargewicht der Lysozymbande beträgt ca. 29 k (Abbildung 4.49). Hühnereiweißlysozym wurde durch den eingesetzten Antikörper nicht markiert (Abbildung 4.49).

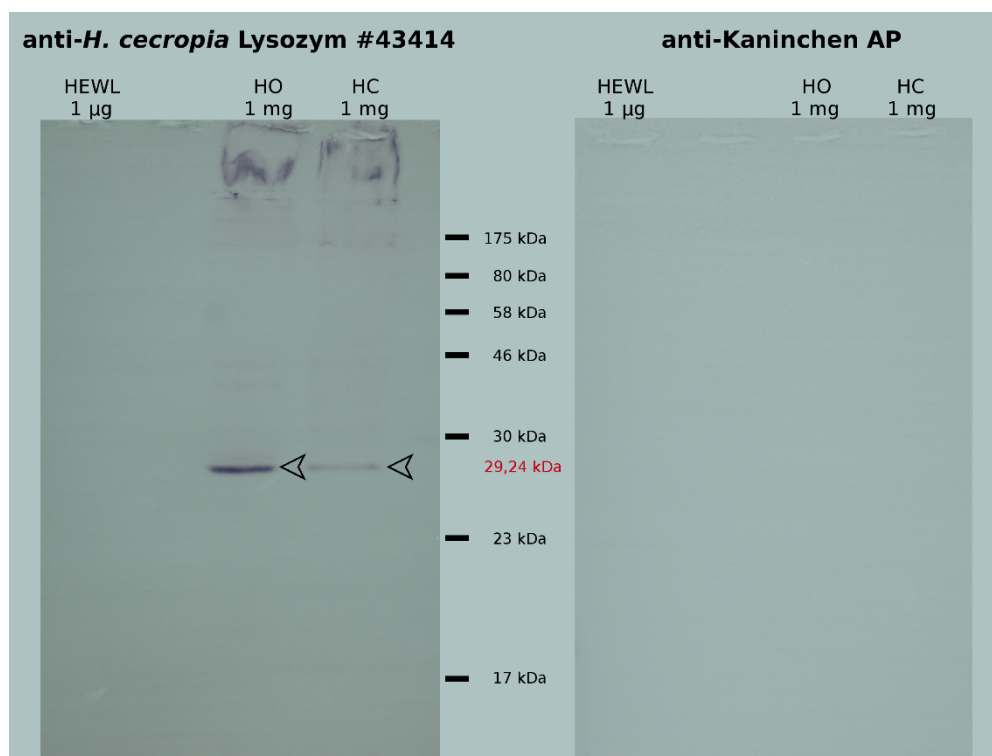


Abbildung 4.49: Nachweis von Lysozym in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ mittels Western Blot.

Linke Membran: Verwendung von anti-*H. cecropia*-Lysozym-Immunserum (#43414). **Rechte Membran:** Kontrolle mit sekundärem Antikörper. Deutlich sind Proteine bei ca. 29 kDa durch anti-*H. cecropia*-Lysozym-Immunserum im hämatopoetischen Organlysate (HO) und dem Hämozytenlysate (HC) markiert. Hühnereiweißlysozym (HEWL) wurde nicht markiert. Die Lage der Molekulargewichtsmarkerbanden ist durch schwarze Balken angegeben, das berechnete Molekulargewicht der markierten Proteinbande ist in Rot angegeben. Pro Spur wurde 1 mg Gewebelysate bzw. 1 µg Hühnereiweißlysozym aufgetragen.

4.2.10 Ist das hämatopoetische Organ ein filtrierendes Organ?

Um herauszufinden, ob das hämatopoetische Organ von *M. sexta* *in vivo* Mikroorganismen aufnehmen bzw. phagozytieren kann wurden hier in einer Pilotuntersuchung FITC-markierte, tote *E. coli* K12 D31 in L5d2-Larven injiziert und nach 16 h das hämatopoetische Organ entnommen und als *whole-mount* fluoreszenz- und lichtmikroskopisch untersucht.

Zahlreiche melanisierte Knötchen lagen im Hämocoel, häufig assoziiert mit dem Fettkörper und den Tracheen. Auch an der Oberfläche der Flügelanlage und des hämatopoetischen Organs konnten adhärierende Noduli identifiziert werden. In weniger stark melanisierten Noduli konnte die FITC-Fluoreszenz der eingeschlossenen *E. coli* K12 D31 nachgewiesen werden (Abbildung 4.50, leere Pfeilspitze), während stärker melanisierte Noduli entweder aufgrund von Degradation des Fluoreszenzfarbstoffes oder einer Abschirmung des Lichts durch das Melanin keine Fluoreszenz zeigten (Abbildung 4.50, schwarze Pfeilspitze). Innerhalb des hämatopoetischen Organs konnten keine Bakterien nachgewiesen werden (Abbildung 4.50).

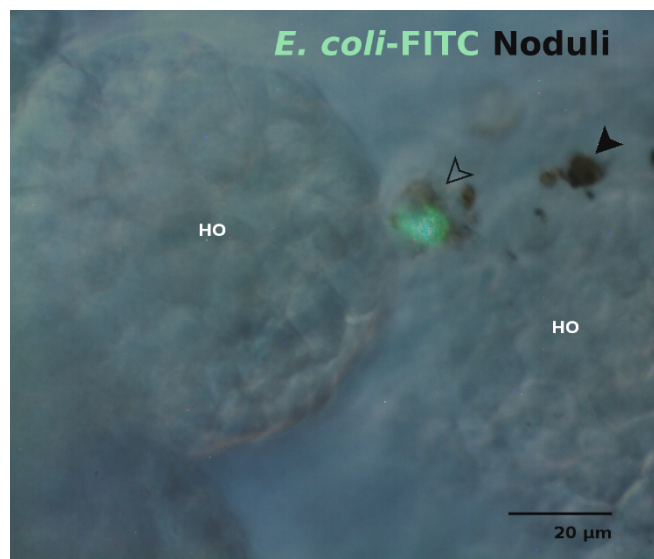


Abbildung 4.50: Nachweis fehlender Endozytose von *E. coli*-K12 D31 durch das hämatopoetische Organ.

Whole-mount-Präparat eines hämatopoetischen Organs 16 Stunden nach Injektion von FITC-markierten *E. coli* K12 D31. Schwarze Pfeilspitze: melanisierte Noduli an der Basallamina des hämatopoetischen Organs. Leere Pfeilspitze: große FITC-markierte *E. coli* K12 D31-Aggregate in einem Nodulus.

Abkürzung: HO = hämatopoetisches Organ. Überlagerung einer differentiellen Interferenzkontrastaufnahme und einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme.

5 Diskussion

5.1 Sektion I: Die Rolle des hämatopoetischen Organs bei der Hämatopoese

5.1.1 Hämozytenmarker und Zelltypspezifität

Die Grundlage der Entwicklungs- und Differenzierungsanalyse einer Zellpopulation oder Mischpopulation von Zellen eines Organismus ist die Unterscheidbarkeit der Zelltypen. Deutlich wird dies beim Fortschritt der Aufklärung der Hämatopoese und Hämozytendifferenzierung in *D. melanogaster*. Für diesen Modellorganismus sind genetische Manipulationsmethoden etabliert, die die Verfolgung des Entwicklungsschicksals ihrer Hämozytentypen (Prohämozyten, Plasmatozyten, Lamellozyten und Kristallzellen) ermöglichen (z. B. TEPASS *et al.*, 1994; LANOT *et al.*, 2001; HOLZ *et al.*, 2003; KURUCZ *et al.*, 2007; HONTI *et al.*, 2007; Review: CROZATIER und MEISTER, 2007). Bei diesen und anderen Arbeiten wurden spezifische Antikörper genutzt, um die Hämozyten bzw. Hämozyten-subtypen zu identifizieren. Gegen *M. sexta*-Hämozyten generierte mAbs aus der Arbeit von WILLOT *et al.* (1994) wurden bereits mehrfach zur Identifikation von Hämozytentypen verwendet (WILLOT *et al.*, 1994; BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004, 2008; NARDI *et al.* 2003; LEVIN *et al.*, 2005). Mit dem Ziel, zuverlässige Nachweismethoden für die Charakterisierung des hämatopoetischen Organs zu etablieren, wurde an diese Arbeiten anknüpfend die Spezifität dieser und weiterer Marker auf Hämozyten von *M. sexta*-Larven untersucht. So fanden sich Marker, die zwei oder mehr Hämozytentypen markieren ebenso wie solche, die nur einen Hämozytentyp markieren. Als hämozytenspezifisch oder monospezifisch markierend wurden Marker klassifiziert, die nur einen Hämozytentyp markieren. Als hämozytentypisch wurden Marker bezeichnet, die mehr als einen bestimmten Hämozytentyp markierten. Marker, die neben Hämozyten keine anderen Strukturen markierten, wurden als hämozytenspezifisch eingestuft, Marker, die nur einen Hämozytentyp, jedoch auch andere Gewebe markieren (bspw. MS77) sind hämozytentypisch. In den folgenden Abschnitten werden die nach Hämozytentyp geordneten Markierungsmuster diskutiert.

5.1.1.1 Monospezifische Marker für Oenozytoide

Phenoloxidasen (POs) werden in Insekten und anderen Invertebraten als nicht enzymatisch aktive Prophenoloxidase (PPO) gebildet. Um die enzymatisch aktive Form zu erhalten wird durch proteolytische Spaltung die PPO in die aktive PO transformiert (Reviews: KANOST *et al.*, 2004; CERENIUS und

SÖDERHÄLL, 2004), dies kann auch durch eine chemische Aktivierung mit z. B. Aceton, 2-Propanol oder Methanol geschehen (ASADA *et al.*, 1993; ASHIDA und BREY, 1998; Review: LU *et al.*, 2014). Für die Melanisierungsreaktion des Insektenimmunsystems ist die aktive PO das Schlüsselenzym. Die Befähigung zur Synthese von PPO ist Oenozytoiden eigen (*M. sexta*: Abbildung 4.2; JIANG *et al.*, 1997; *B. mori*: IWAMA und ASHIDA, 1986; ASHIDA *et al.*, 1988; *Spodoptera exigua*: SHRESTHA und KIM, 2008; Review: STRAND, 2008). In *M. sexta* sind Oenozytoide der einzige Hämozytentyp, bei dem PPO-mRNA und PPO-Protein nachgewiesen werden können (Abbildung 4.2, JIANG *et al.*, 1997). Bei *B. mori* können auch Plasmatozyten in geringerem Maße PPO beinhalten (ASHIDA *et al.*, 1988) bzw., wie von LING *et al.* (2005) beschrieben wurde, setzen Plasmatozyten, Oenozytoiden und Prohämozyten nach chemischer Aktivierung der PO L-DOPA um, welches allerdings ein weniger gut geeignetes Substrat für den Nachweis aktiver PO darstellt (siehe HALL *et al.*, 1995). Außerdem fehlt in der von LING *et al.* (2005) verwendeten Methode der Nachweis, dass keine Peroxidaseaktivität vorliegt, die zu solchen Ergebnissen führen könnte, es wurde also keine Peroxidaseinhibition mit z. B. Natriumazid durchgeführt, welches die PPO-Aktivität unbeeinträchtigt lässt (ORTIZ DE MONTANELLO *et al.*, 1988). Jedoch konnte die Reaktion durch Zugabe von Phenylthioharnstoff (PTU), einem Inhibitor der PO-Aktivität, unterbunden werden, was als Beleg für eine PO-Aktivität anzusehen ist. Bei *D. melanogaster* sind drei PPO-Varianten bekannt, PPO1, PPO2 und PPO3. Bemerkenswerterweise beinhaltet auch in diesem Insekt nur ein einziger Hämozytentyp, die Kristallzellen, PPO1 und PPO2, während PPO3 in Lamellozyten vorkommt (DUDZIC *et al.*, 2015).

Eine Funktion der Oenozytoide der Lepidoptera bei der Immunantwort ist die Freisetzung der PPO. Dies geschieht durch Aufplatzen der Zelle (SHRESTHA und KIM, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2003; LING *et al.*, 2005). Dadurch kann die durch PO katalysierte Melanisierung, nach proteolytischer Aktivierung der PPO zur aktiven PO, am Wirkungsort stattfinden. Die ortsspezifische Aktivität der freigesetzten PO kann auch über das Binden an der Zelloberfläche von sphäkulen Zellen und granulären Zellen vermittelt werden (LING und Yu, 2005), von denen zumindest letztere auch an Einkapselungsprozessen beteiligt sind. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl die aktive PO (ASHIDA und BREY, 1998) als auch die inaktive PPO (LING und Yu, 2005) an Hämozytenoberflächen bindet. Wie die Aktivierung der PO räumlich reguliert wird ist noch nicht vollständig geklärt. Denkbar wäre hierbei, dass an der Zelloberfläche der PPO-bindenden Hämozyten PO-aktivierende Proteasen lokalisiert sind, die eine lokale Begrenzung der Reaktion gewährleisten. Die Bildung von Melanin läuft über die Umsetzung von Phenolen zu Chinonen, die durch Autopolymerisation Melanin bilden (SÖDERHÄLL und CERENIUS, 1998; Reviews: CERENIUS und SÖDERHÄLL, 2004; GONZÁLEZ-SANTOYO und CÓRDOBA-ANGUILAR, 2012). Das Melanin bildet eine Verstärkung der zuvor durch Hämozyten gebildeten Kapsel. Es wird jedoch nicht

für den zellulären Einkapselungsprozess *per se* benötigt (RIZKI und RIZKI, 1990). Die Phenoloxidaseaktivität erzeugt des Weiteren Produkte, die eine breit gefächerte antimikrobielle Wirkung innehaben (NAPPI *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 2007). An der Aktivierung der PPO-Kaskade sind mehrere Faktoren beteiligt, u.a. *pattern recognition receptors* (PRRs), die nach dem Binden an *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) Signale vermitteln, die zur proteolytischen Aktivierung der PPO beitragen. Zu diesen PRRs gehören *peptidoglycan recognition proteins* (PGRPs; SUMATHIPALA und JIANG, 2010) und *beta-1,3 glucan recognition proteins* (β GRPs; MA und KANOST, 1999; JIANG *et al.*, 2004). Als (Haupt-)Syntheseort für beide PRR-Typen gilt der Fettkörper. Ein *Screening* mit Immunseren gegen PGRP-1, β GRP-1 und β GRP-2 auf Hämocyten von nicht infizierten Larven ergab, dass weder PGRP-1 noch β GRP-2 in Hämocyten nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Der mittels *real-time* qPCR ermittelte PGRP-1A-mRNA-Gehalt in Hämocyten unbehandelter Tiere widerspricht jedoch dem Nichtvorhandensein von PGRP-1 in Hämocyten (Abbildung 4.47, Tabelle A.15). Möglicherweise wird das PGRP-1-Protein schnell sezerniert, so dass keine ausreichende Proteinmenge für einen immunhistologischen Nachweis in den Hämocyten vorhanden ist. Das anti- β GRP-1-Immunserum markierte auf Hämocytenmonolayern ausschließlich Oenocytoide (Abbildung 4.3), wie bereits u. a. von BEETZ beobachtet wurde (BEETZ unveröffentlicht, pers. Mitteilung TRENCZEK; VON BREDOW, 2010). Die Markierung lag entweder in breiten Bereichen im gesamten Zytoplasma oder in einem kortikalen Bereich (Vergl. Abbildung 4.3 D und 4.3 F). Unterstützt wird der Befund der intrazellulären Lokalisation durch das Fehlen einer integralen Transmembrandomäne (Abbildung A.5). MA und KANOST (2000) wiesen die für β GRP-1 kodierende mRNA mittels Northern Blot im Fettkörper nach, während sie in Hämocyten nicht nachweisbar war. Weiter zeigten sie, dass der Fettkörper β GRP-1-Protein *in vitro* sezerniert und sie hypothetisierten, dass auf diesem Weg β GRP-1 *in vivo* in die Hämolymphe abgegeben wird. Dies impliziert, dass β GRP-1 nicht von Oenocytoiden synthetisiert wird, sondern von diesen aus der Hämolymphe aufgenommen und akkumuliert wird. In *B. mori* konnte ebenfalls ein β GRP in Hämocyten nachgewiesen werden. Anders als bei *M. sexta*- β GRP-1 ist das *B. mori*- β GRP jedoch in sphäkulen Zellen und granulären Zellen lokalisiert (OCHIAI *et al.*, 1992). Das β GRP von *B. mori* ist an der Aktivierung der PPO-Kaskade beteiligt (OCHIAI und ASHIDA, 1988).

β GRP-1 von *M. sexta* bindet und agglutiniert grampositive und gramnegative Bakterien sowie Hefen (MA und KANOST, 2000). Agglutinierte Pathogene werden im Hämocoel durch spezifische Interaktionen von Hämocyten eingekapselt und die zellulären Kapseln (Noduli) werden abschließend häufig durch eine Melaninhülle umschlossen (HOROHV und DUNN, 1983; STRAND und Pech, 1995; LAVINE und STRAND, 2002). Da Oenocytoide β GRP-1 und PPO beinhalten und β GRP-1 bei Anwesenheit von β -1,3-Glucanen die PO-vermittelte Melanisierungsreaktion stimuliert (MA und KANOST,

2000), kann man schließen, dass es von Vorteil ist, dass PPO und ein in der Melanisierungskaskade vermittelnder Faktor, hier β GRP-1, in Oenozytoiden kolokalisiert sind. Da die β GRP-1-mRNA-Synthese nicht durch Infektionen gesteigert wird (MA und KANOST, 2000), ist das gezielte Freisetzen dieses Faktors im Zuge einer Immunantwort am Wirkungsort durch Ruptur der Oenozytoide (SHRESTHA und KIM, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2003; LING *et al.*, 2005), die das β GRP-1 Protein aus der Hämolymphe akkumulierten, bei gleichzeitigem Freisetzen von PPO ein denkbare Modell. Welcher Mechanismus der Ruptur der Oenozytoide zugrunde liegt ist noch unklar. SHRESTHA und KIM (2008) wiesen bei *S. exigua* nach, dass bei gestörter Eicosanoidsynthese die Anzahl an platzenden Oenozytoiden nach einem Immunstimulus vermindert ist. Die durch einen Immunstimulus induzierte Ruptur der Kristallzellen von *D. melanogaster* wird durch den JNK-Signalweg, kleine GTPasen und einem Tumornekrosefaktorhomolog (Eiger) beeinflusst, wobei angenommen wird, dass diese Faktoren direkt auf die Integrität der Kristallzellen wirken und nicht über eine transkriptionelle Aktivierung weiterer Faktoren (BIDLA *et al.*, 2007). Beide Untersuchungen erklären jedoch nicht, wie es zu der ortsspezifischen Aktivierung der Oenozytoid- bzw. Kristallzellruptur kommt. Die genannten Faktoren könnten jedoch auch bei der Ruptur der Oenozytoiden von *M. sexta* eine Rolle spielen.

Weitere, die PPO-Reaktion modulierende Faktoren wie Serin-Proteasen oder PPO-aktivierende Proteasen (PAPs, Reviews: CERENIUS und SÖDERHÄLL, 2004; KANOST *et al.*, 2004) sollten in Zukunft auf ihr Vorhandensein in Oenozytoiden hin untersucht werden.

Für die Identifizierung der Hämozytentypen wurden die beiden Marker anti-PPO- und anti- β GRP-1-Immunserum als auf Hämozytenmonolayern monospezifisch Oenozytoide bindend eingestuft und in diesem Sinne verwendet.

Mit anti-PPO- bzw. anti- β GRP-1-Immunserum als Oenozytoidemarker und ausgewählten Hämozytenmarkern wurden Doppelmarkierungen durchgeführt um die Markierungsspezifität der Antikörper näher einzugrenzen. Oenozytoide ließen sich dabei nicht mit dem granuläre Zellen-Marker mab MS7 und den Plasmatozytenmarkern mab MS13 bzw. mab MS77 markieren (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3).

5.1.1.2 Monospezifischer Marker für sphärule Zellen

Verschiedene Antikörper gegen *M. sexta*-Hämozyten markieren sphärule Zellen zusammen mit Plasmatozyten (WILLOT *et al.*, 1994). Ein monospezifischer Marker für sphärule Zellen wurde bislang noch nicht publiziert. Das Immunserum gegen *Ephesia kuehniella*-Hämolymphesterase (anti-Esterase) stellte sich als monospezifisch sphärule Zellen markierend heraus (VON BREDOW, 2010).

unveröffentlicht; Abbildung 4.1 G, Abbildung 4.4 D'). Die Markierung liegt innerhalb des Zytoplasmas der sphärulen Zellen, wobei die Sphärulen bzw. deren Inhalt nicht besonders stark markiert wurden (Abbildung 4.4 D'). Damit wurde der erste spezifische Marker für sphärule Zellen gefunden. Jedoch ist dieser nur auf Hämozytenmonolayern als monospezifisch anzusehen, da andere Organe ebenfalls markiert werden (Speicheldrüsen, Epidermis, Mitteldarm und Malpighi'sche Gefäße, PANZER, 2004 unveröffentlicht).

Eine Analyse des Epitops konnte hier nicht erfolgen, der Antikörper markierte auf Western Blots mit Hämozytenlysate aus *M. sexta*-Larven keine Proteinbande (Daten nicht gezeigt). In der Hämolymphe von *E. kuehniella* markiert dieses Immunsereum mehrere, zum Teil durch Immunstimulation induzierbare Proteine, die Esteraseaktivität besitzen (MANN, 1992). Welche Enzyme dies im Besonderen sind wurde nicht geklärt, weshalb die mögliche Funktion des Antigens in *M. sexta* auch ungeklärt bleibt. Die Markierung von Hämozyten wurde in *E. kuehniella* nicht gezeigt (MANN, 1992). Um die Identität des Antigens zu klären, ob es sich also tatsächlich um eine Esterase handelt, die vom anti-Esterase-Immunsereum gebunden wird, empfehlen sich weitere Untersuchungen, z. B. Reinigung des Antigens über Immunopräzipitation und Analyse über Massenspektrometrie. Dadurch könnte die Funktion des relativ unerforschten Hämozytentyps sphärule Zelle, für den es bspw. in *D. melanogaster* kein Gegenstück gibt (RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006), im Immungeschehen und entwicklungsbiologischen Prozessen von *M. sexta* näher erforscht werden.

5.1.1.3 Monospezifischer Marker für granuläre Zellen

Von den untersuchten Markern für Hämozyten stellte sich der mAb MS7 als monospezifisch granuläre Zellen markierend heraus. Dabei markiert er die Granulen, die typisch und namensgebend für diese Hämozytenklasse sind. Dass nicht alle Granulen innerhalb einer granulären Zelle durch MS7 markiert werden zeigen Doppelmarkierungen mit dem ebenfalls Granulen markierenden Lektin PNA (Abbildung 4.1 E', Beobachtung innerhalb der AG TRENCZEK von A. GÖKÇEN, Y. VON BREDOW, C.-R. VON BREDOW). Dass die Granulen granulärer Zellen Komponenten der ECM beinhalten wurde bereits von NARDI *et al.* (1989) gezeigt. MS7 markiert jedoch keine ECM der larvalen Organe. Daraus kann man schließen, dass das MS7-Epitop kein ECM-Bestandteil ist und der Inhalt der Granulen sich nicht nur aus ECM-Bestandteilen zusammensetzt.

Aufgrund der genannten Markierungseigenschaften ist der mAb MS7 hämozytenspezifisch und monospezifisch für granuläre Zellen.

5.1.1.4 Monospezifische Marker für Plasmatozyten

Plasmatozyten lassen sich auf Monolayern anhand ihrer gespreiteten Form meist leicht von allen anderen Zelltypen (evtl. mit Ausnahme der in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen kleinen gespreiteten Zellen) morphologisch unterscheiden (Abbildung 2.1, Abbildung 4.5). Daneben wurden wiederholt spindelförmige oder runde, ungespreitete Plasmatozyten in Lepidoptera beschrieben (bspw. AKAI und SATO, 1976; BEAULATON, 1979; ARNOLD, 1982), die unter bestimmten Einflüssen in die gespreitete Form übergehen (CLARK *et al.*, 1996; Reviews: GILLESPIE *et al.*, 1997; LAVINE und STRAND, 2002).

Der mAb MS13 markierte Plasmatozyten in typischer gespreiteter Form sowie runde, große Hämozyten (siehe auch WILLOT *et al.*, 1994; BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004; NARDI *et al.*, 2003) durch Binden an eine plasmatozytenspezifische Integrin β -Untereinheit (LEVIN *et al.*, 2005). Doppelmarkierungen mit den Markern für Oenozytoide - anti-PPO-Immunserum und anti- β GRP1-Immunserum - zeigten, dass durch MS13 keine Oenozytoide markiert werden. Die ungespreiteten, großen runden MS13-positiven Zellen sind demnach ungespreitete Plasmatozyten (Abbildung 4.2 A, Abbildung 4.3 A). Zellen anderer Gewebe (außer den hämatopoetischen Organen) werden nicht durch MS13 markiert (BEETZ, 2002; TRENCZEK, pers. Mitteilung). Dadurch werden die Befunde früherer Arbeiten bestätigt, dass der mAb MS13 monospezifisch Plasmatozyten markiert (WILLOT *et al.*, 1994; BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004; NARDI *et al.*, 2003; LEVIN *et al.*, 2005).

Ähnlich wie MS13 band der mAb MS77 an runden Hämozyten und gespreiteten Plasmatozyten. Außerdem markierte MS77 ebenfalls keine Oenozytoide, wie durch Doppelmarkierungen mit MS77 und anti-PPO- bzw. anti- β GRP1-Immunserum bestätigt wurde (Abbildung 4.2 C, Abbildung 4.3 C). Die markierten runden Zellen sind demnach als runde Plasmatozyten anzusehen. Im Gegensatz zu MS13 markiert MS77 jedoch die Kutikula (PANZER, 2004 unveröffentlicht, Y. VON BREDOW, pers. Mitt.) bzw. Basallamina (BEETZ, 2004). Aus diesem Grund ist die Markierung durch MS77 auf Hämozytenmonolayern monospezifisch für Plasmatozyten, jedoch nicht als hämozytenspezifisch anzusehen. Für den mAb MS77 konnte bisher kein Epitop identifiziert werden, die Markierung von Kutikula und ECM lässt jedoch ein glykosyliertes Protein als Epitop möglich erscheinen. Deshalb wurde mit verschiedenen Kohlenhydraten bzw. dem glykosylierten Protein Fetuin versucht, die Bindung an Hämozyten zu inhibieren. Keines der eingesetzten Kohlenhydrate führte zur Inhibition der Bindung (Tabelle A.3). Der Einsatz von Monosacchariden widerlegt jedoch noch nicht, dass es sich bei dem Epitop um eine glykosylierte Struktur handelt.

Weder MS13 noch MS77 markierten sphärule Zellen oder granuläre Zellen. Für Analysen auf Hämozytenpräparaten sind beide mAbs als plasmatozytenspezifisch anzusehen.

5.1.1.5 Marker für Plasmatozyten und Oenozytoide

Der mAb 3B11 gegen *M. sexta*-Neuroglian (anti-NG3B11) markiert ein Zelladhäsionsmolekül der L1-*cell adhesion molecules* Familie (L1-CAM), das in verschiedenen Geweben in Embryonen und Larven exprimiert wird (NARDI *et al.*, 1993, 1994). In Hämozyten spielt Neuroglian eine Rolle bei der Bildung von Hämozytenaggregaten (NARDI *et al.*, 2006; ZHUANG *et al.*, 2007) und kann auf granulären Zellen und Plasmatozyten von *M. sexta* nachgewiesen werden (ZHUANG *et al.*, 2007). Das beschriebene Markierungsmuster auf larvalen Hämozyten konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden: Markiert wurden durch anti-NG3B11 ausschließlich Plasmatozyten und große, runde Hämozyten. Granuläre Zellen wurden nicht markiert, bei einer Doppelmarkierung mit PNA lassen sich keine PNA-positiven Granulen in NG3B11-positiven Zellen finden (Abbildung 4.1 H). Die großen, runden durch anti-NG3B11 markierten Hämozyten sind zum Teil Oenozytoide, wie durch Doppelmarkierungen mit den Oenozytoide markierenden Immunseren gegen PPO- bzw. β GRP-1 deutlich wird (Tabelle 4.1; Abbildung 4.2 D, Abbildung 4.3 D). Somit wurde anti-NG3B11 in dieser Arbeit als hämozytentypischer Marker für Plasmatozyten und Oenozytoide angesehen.

5.1.1.6 Marker für Plasmatozyten und sphärule Zellen

Das anti-Meerrettichperoxidase-Immunserum (anti-HRP, Sigma-Aldrich) markierte auf Hämozytenmonolayern gespreitete Plasmatozyten und sphärule Zellen. Die Markierung ist bei beiden Hämozytentypen auf der Zelloberfläche zu finden (Abbildung A.1 B; unveröffentlichte Arbeiten innerhalb der AG TRENCZEK; TRENCZEK, pers. Mitteilung; Y. VON BREDOW, pers. Mitteilung). Weiterhin wurden große, runde (ungespreitete) Plasmatozyten, identifiziert durch die charakteristisch unregelmäßig geformten Zellkerne (Abbildung A.1 B), markiert. Morphologisch den Oenozytoiden zugeordnete Hämozyten sowie granuläre Zellen wurden nicht durch anti-HRP markiert. Aufgrund der Markierungseigenschaften auf Hämozyten wurde anti-HRP-Immunserum als Plasmatozyten und sphärule Zellen markierend gewertet. Eine Hämozytenspezifität besteht nicht, da anti-HRP auch nicht-hämozytenassoziierte Organe in *M. sexta*-Embryonen und –Larven markiert (Y. VON BREDOW, pers. Mitteilung; TRENCZEK, pers. Mitteilung). Beobachtungen in anderen Insekten bestätigen, dass anti-HRP sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Gewebe markiert (SNOW *et al.*, 1987; STRAUß und LAKES-HARLAN, 2006) und dabei α -1,3-fukosylierte N-Glykane gebunden werden (PASCHINGER *et al.*, 2004; Review: PASCHINGER *et al.*, 2009). Dass Hämozyten von Lepidoptera in der Lage sind α -1,3-fukosylierte Proteine zu synthetisieren, ist indirekt von der Beobachtung abzuleiten, dass die von *Mamestra brassicae*-Hämozyten abstammende Zelllinie IZD-MB-0503 (MILTENBURGER *et al.*, 1976) Fucose α -1,3-glykosidisch an GlcNac binden kann (STAUDACHER *et al.*, 1992). Die Markierung von

M. sexta-Hämozyten mit anti-HRP ließ sich nicht durch Zugabe von verschiedenen Kohlenhydraten oder dem glykosylierten Protein Fetuin inhibieren (Tabelle A.3), wobei keine Inhibition mit Fucose bzw. komplexen Fucose-haltigen Kohlenhydraten oder Glykoproteinen außer Fetuin durchgeführt wurde. Die Markierung mehrerer Proteinbanden unterschiedlicher Größe im Western Blot mit Hämozyten- und hämatopoetischem Organ-Lysat (Abbildung A.4) zeigen, dass mehr als ein Antigen in *M. sexta* durch anti-HRP erkannt wird. Dies bestätigt die Befunde in anderen Insekten, bei denen mehrere Proteine von anti-HRP markiert werden, deren Gemeinsamkeit wohl in der Glykosylierung liegt (Review: PASCHINGER *et al.*, 2009). Mehrere dem Nervensystem assoziierte Proteine in *D. melanogaster* werden von anti-HRP markiert (bspw. Neuroglian; WANG *et al.*, 1994; Review: PASCHINGER *et al.*, 2009). Interessanterweise trat im Hämozytenlysate eine anti-HRP-positive Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 155 k auf, dies entspricht annähernd der Laufhöhe von Neuroglian in *M. sexta* (156 k, NARDI, 1993). Das Markierungsmuster von anti-HRP auf *M. sexta*-Hämozyten entspricht jedoch nicht dem des anti-*M. sexta*-Neuroglian. Eine Markierung von Oenozytoiden durch anti-HRP, sowie eine Markierung von sphäkulen Zellen durch NG3B11, war nicht zu beobachten.

5.1.1.7 Marker für Plasmatozyten, sphäkulen Zellen und Oenozytoide

Ein anderer eingesetzter Antikörper, mAb MS75, markiert larvale Plasmatozyten, sphäkulen Zellen und Oenozytoide (Abbildung 4.1 C und C', Abbildung 4.2 B, Abbildung 4.3 B), was bereits anhand morphologischer Kriterien von BEETZ (2002; BEETZ *et al.*, 2004) und über Doppelmarkierung mit dem oenozytoidespezifischen mAb MS19 von GEIBLER (pers. Mitteilung TRENCZEK) beobachtet wurde. Ungespreitete, große runde Hämozyten mit unregelmäßig geformten Zellkernen, d. h. runde Plasmatozyten, wurden ebenfalls von MS75 markiert. Die Markierungsmuster deuten auf eine Zellmembranmarkierung hin. Interessant ist hierbei der Ausschluss der granulären Zellen. Dadurch kann man vermuten, dass es sich bei dem MS75-Epitop um eine Hämozytenkomponente handelt, die in drei Hämozytentypen auftritt, aber den granulären Zellen fehlt und diese so als eigenständigen Hämozytentyp bestätigt. Dies macht den mAb MS75 interessant für die Aufklärung der Hämatopoese, da dieser ein früh während der Hämozytenentwicklung auftretendes Epitop einer bestimmten Entwicklungslinie markieren könnte. Untersuchungen zur Identität und Funktion des MS75-Epitops sind zurzeit im Gange (pers. Mitteilung Y. VON BREDOW).

5.1.1.8 Marker für granuläre Zellen und Oenozytoide

Eine Anzahl monoklonaler Antikörper markiert granuläre Zellen und Oenozytoide (WILLOT *et al.*, 1994; BEETZ, 2002), wodurch ein engerer Zusammenhang zwischen diesen Hämozytentypen wahrscheinlich erscheint. Denkbar ist hierbei eine Differenzierung von einem zum anderen Zelltyp, oder aber ein gemeinsamer Ursprung aus einem anderen Hämozytentyp (Prohämozyte?). Dieses häufig beobachtete Phänomen betrifft vornehmlich Antikörper, die neben Hämozyten auch andere Gewebe und vorzugsweise deren Basallamina markieren, so dass die Gemeinsamkeit zwischen Oenozytoiden und granulären Zellen am ehesten bei der Rolle im ECM-Auf- und Abbau zu suchen ist.

Der mAb MS2 markiert granuläre Zellen und Oenozytoide, letzteres belegt durch Doppelmarkierung mit anti-PPO- bzw. anti-GRP-1-Immunserum (Abbildung 4.2 E, Abbildung 4.3 E) sowie anhand morphologischer Kriterien (WILLOT *et al.*, 1994; BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004). MS2 markiert Oenozytoide und granuläre Zellen an der Zelloberfläche. Nach einer Detergenzbehandlung der Zellen markiert MS2 keine Strukturen, weshalb angenommen wird, dass das Epitop kein integraler Bestandteil der Zellmembran ist, sondern ein Zellmembran-assoziiertes Faktor ist (BEETZ, 2002; eigene Beobachtungen, nicht gezeigt). Des Weiteren beschreibt BEETZ (2002) eine Markierung von Muskelgewebe und Fettkörper durch MS2. Demnach ist der mAb MS2 nicht hämozytenspezifisch und nicht monospezifisch für granuläre Zellen, sondern auf Hämozytenmonolayern als granuläre Zellen und Oenozytoide markierend anzusehen.

Ein weiterer monoklonaler Antikörper, mAb MS39, markiert Granulen der granulären Zellen und der Oenozytoide (Abbildung 4.2 G, Abbildung 4.3 G, Abbildung A.1 B'; BEETZ, 2002) sowie die extrazelluläre Matrix, u. a. des hämatopoetischen Organs (Abbildung A.2 C). Plasmatozyten und sphärule Zellen werden nicht von MS39 gebunden (Abbildung A.1 B'). Der mAb MS39 ist somit nicht als hämozytenspezifisch anzusehen.

MS73 markiert laut BEETZ *et al.* (2004) granuläre Zellen, Plasmatozyten, Oenozytoide und sphärule Zellen auf Hämozytenmonolayern von *M. sexta*-Larven. Dieser Befund konnte nur teilweise bestätigt werden. Granuläre Zellen wurden von MS73 markiert, daneben Oenozytoide, die durch Markierung mit anti- β GRP-1- bzw. anti-PPO-Immunserum identifiziert wurden (Abbildung 4.2 H, Abbildung 4.3 H). Plasmatozyten und sphärule Zellen wurden hingegen nicht durch mAb MS73 markiert. Neben Hämozyten markiert MS73 die Basallaminae aller Organe (BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004, Y. VON BREDOW, pers. Mitt.). Deshalb ist MS73 weder hämozytenspezifisch noch monospezifisch für einen Hämozytentyp auf Hämozytenpräparaten.

5.1.1.9 PNA markiert unterschiedliche Zellstrukturen der Hämocyten

Das Lektin PNA markiert sehr auffällig die Granulen granulärer Zellen (Abbildung 4.1 C', E') und wurde deshalb als Marker für granuläre Zellen beschrieben (NARDI, 2004). Außerdem werden in deutlich geringerer Anzahl granuläre Bestandteile, die häufig kleiner als die typischen Granulen granulärer Zellen sind, an oder in Oenozytoiden markiert (Abbildung 4.1 D', 4.2 I). Neben der Markierung granulärer Strukturen konnte eine Markierung der Zytoplasmamembran einiger Hämocytentypen identifiziert werden. Außer sphäkulen Zellen, die aufgrund der Zell- und Zellkernform leicht zu identifizieren sind (Abbildung 4.1 G), kommt diese Markierung bei kleinen bis mittelgroßen Hämocyten (Abbildung 4.5 E_{ii}'') vor. Auch wenige Oenozytoide tragen diese Markierung, sowie wenige runde Plasmatozyten (Abbildung 4.5 E_i' bzw. E''). PNA-Zellmembran-positive (PNAm⁺) Hämocyten besitzen meist einen Zellkern mit annähernd kreisrundem Querschnitt und ähneln den von HOROHV und DUNN (1982) beschriebenen Prohämocyten (Abbildung 4.5 E_{ii}''). Somit lässt sich das Markierungsmuster durch PNA in Markierung der Granulen (PNAg⁺) und Markierung der Zellmembran (PNAm⁺) unterscheiden. PNAg⁺ Zellen können granuläre Zellen oder Oenozytoide sein, PNAm⁺-Zellen sphäkulen Zellen, Oenozytoide, ungespreitete Plasmatozyten oder mutmaßliche Prohämocyten, wobei bei Letzteren auch vereinzelt durch PNA markierte Granulen auftreten können. Auf Hämocytenmonolayern von L5d2 Raupen machten die sphäkulen Zellen den größten Anteil der PNAm⁺-Hämocyten aus (ca. 4,4 % der Gesamtpopulation), gefolgt von kleinen runden PNAm⁺-Zellen, die noch etwa 1,9 % der Gesamthämocyten ausmachen und ca. 1,1 % großer runder PNAm⁺-Hämocyten, die der Größe nach den Oenozytoiden oder ungespreiteten Plasmatozyten zuzuordnen sind (Tabelle 4.2).

Doppelmarkierungen mit PNA und verschiedenen Antikörpern zeigten, dass neben ausschließlich PNAm⁺-Hämocyten immer auch Hämocyten positiv für PNA und den jeweiligen Antikörper waren. Das bedeutet, dass die als monospezifisch betrachteten Antikörper auch einige PNAm⁺-Hämocyten markieren, die morphologisch als Prohämocyten gewertet wurden und im Umkehrschluss, dass die mutmaßlichen Prohämocyten auch Marker für definitive Hämocytentypen tragen können.

Für die Hämocytenmarker MS7, MS13, MS75, MS77 und anti-βGRP1 sind die Anteile der doppelmarkierten, kleinen PNAm⁺-Hämocyten an der Gesamthämocytenzahl (DHC) bzw. an der PNAm⁺-Zellpopulation in Tabelle A.18 aufgelistet. Dabei fällt auf, dass die überwiegende Mehrheit (82,50 ± 23,63 %) der PNAm⁺-Zellen mit dem Plasmatozyten, Oenozytoide und sphäkulen Zellen markierenden mAb MS75 markierbar sind, während nur 5,40 ± 6,39 % durch den plasmatozytenspezifischen mAb MS13 markiert werden. Der für granuläre Zellen spezifische mAb MS7 markiert einen ähnlich hohen Anteil der PNAm⁺-Zellpopulation wie das Oenozytoide markierende anti-βGRP1 Immunsereum (59,72 ± 8,33 % bzw. 60,21 ± 7,09 %). Durch Addition dieser Werte wird

ersichtlich, dass an einzelnen PNAm⁺-Zellen höchstwahrscheinlich mehrere, ansonsten spezifisch Hämozytentypen markierende Antikörper binden. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass es sich bei diesen Zellen noch nicht um vollständig differenzierte Hämozyten handelt, sondern vielmehr um Übergangsformen, aus denen differenzierte Hämozytentypen hervorgehen könnten. Die Differenz der Anzahl der durch den Plasmatozytenmarker MS77 markierten Zellen ($49,86 \pm 36,77 \%$) und der durch den Plasmatozytenmarker MS13 markierten Zellen ($5,40 \pm 6,39 \%$) deutet auf einen graduellen Übergang hin. Der niedrige Anteil durch MS13 markierbarer Zellen lässt schließen, dass erst zu einem bestimmten späten Differenzierungszeitpunkt der Zellen das MS13-Epitop (β -Integrin) auftritt und vermutlich das PNAm⁺-Signal kurz darauf verloren geht. Der fast identische Anteil der PNAm⁺-Zellen, die den Marker für Oenozytoide tragen und derer, die den Marker für granuläre Zellen tragen, lässt den Gedanken aufkommen, dass beide Hämozytentypen einer gemeinsamen Entwicklungslinie entstammen könnten. Auf diese Hypothese wird in den Abschnitten 5.1.1.9, 5.1.10 sowie 5.1.11 näher eingegangen.

Weitere Überlegungen die PNAm⁺-Hämozyten betreffend werden in Kapitel 5.1.10 mit Bezug zum hämatopoetischen Organ aufgegriffen. Anzumerken ist, dass das Differenzierungspotential der mutmaßlichen Prohämozyten in *M. sexta* noch nicht untersucht wurde, dass also noch kein Übergang einer Prohämozyte zu einem anderen Zelltyp *in vivo* oder *in vitro* beschrieben wurde. Diese Fragestellung wurde für *B. mori* anhand morphologischer Veränderungen *in-vitro*-kultivierter Prohämozyten versucht aufzuklären (YAMASHITA und IWABUCHI, 2000). So kam es augenscheinlich zu einer direkten Differenzierung zu Plasmatozyten und granulären Zellen. Sphärule Zellen wiederum gingen aus den granulären Zellen hervor, Oenozytoide entstanden nicht (YAMASHITA und IWABUCHI, 2000). Inwieweit diese Ergebnisse sich auf andere Spezies übertragen lassen und die Vorgänge im Organismus widerspiegeln, bleibt offen. Diese Ergebnisse belegen jedoch, dass die morphologisch als Prohämozyten identifizierten Hämozyten der Lepidoptera sich zu anderen Zelltypen transformieren können.

5.1.2 Nachweis gespreiteter granulärer Zellen

Die klassische Definition der Morphologie granulärer Zellen von *M. sexta* beschreibt diese als rund oder oval und mit der Befähigung feine, kurze Filopodien (*microspikes*) ausbilden zu können, jedoch nicht als zur Spreitung durch Abflachen und Ausbildung von Lamellopodien befähigt. Dennoch fiel auf Hämozytenmonolayern immer wieder ein Hämozytentyp auf, der morphologisch Plasmatozyten ähnelt (gespreitet, abgeflacht und Lamellopodien ausbildend), jedoch weder den typisch

großen Kern noch die Zellgröße von Plasmatozyte besitzt (Beobachtungen innerhalb der AG TRENCZEK, pers. Mitteilung TRENCZEK, Abbildung 4.3 A). Diese vorläufig als „kleine Plasmatozyten“ bezeichneten Hämocyten wurden bisher nicht näher charakterisiert, und deren Auftreten in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium, Kulturdauer, Immunstatus oder Hämolympfhaktoren nicht untersucht. Durch Markierung mit Antikörpern und dem Lektin PNA, sowie der Bestimmung der relativen DAPI-Markierungsstärke des Zellkerns, konnte nun die Identität dieses Zelltyps ermittelt werden. Während weder plasmatozytenspezifische Antikörper (mAbs MS13 bzw. MS77) noch das oenozytoidspezifische Immunserum gegen β GRP1 und das sphärule Zellen-spezifische Immunserum gegen *E. kühniella* Esterase diesen Zelltyp markierten, wurden die Granulen im Zytoplasma durch den granuläre Zellen-spezifischen mAb MS7 und durch das Lektin PNA markiert (Abbildung 4.4), sowie durch den Oenozytoide und granuläre Zellen markierenden mAb MS2 (Daten nicht gezeigt). Die Zellkernmorphologie wich etwas von der von granulären Zellen ab, die Zellkerne der kleinen gespreiteten Zellen waren eher oval als rund. Dies ist vermutlich auf das Spreitungsverhalten und der damit einhergehenden Abflachung der Zelle zurückzuführen, in deren Folge der Zellkern abgeflacht wird (Abbildung 4.4 A''). Die DAPI-Intensität unterschied sich nicht signifikant von der von granulären Zellen (Abbildung 4.5) und lässt auf den gleichen Ploidiegrad ($2n$ bis $4n$) schließen. Die kleinen gespreiteten Hämocyten wiesen also Granulen auf, die mit den gleichen Markern wie Granulen der granulären Zellen markierbar waren, sowie eine DAPI-Intensität, die der von granulären Zellen entspricht und sind deutlich kleiner als Plasmatozyten. Deshalb wird eine Klassifizierung dieses Zelltyps als gespreitete granuläre Zelle vorgeschlagen. Interessanterweise werden in einer Abbildung (*fig. 1 D*) des Reviews von LAVINE und STRAND (2002) granuläre Zellen „(...) *found in lepidopterans like Pseudoplusia includens*“ mit deutlicher Spreitung und Pseudopodienbildung gezeigt; die Herkunftsspezies ist jedoch nicht näher genannt worden. Desweiteren bezeichnet İZZETOĞLU (2012) bei *Galleria mellonella* kleinere gespreitete Zellen als granuläre Zellen. Für *Mythimna unipuncta* (RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006) und *B. mori* (Yamashita und Iwabuchi, 2001) wurde ebenfalls die Ausbildung von Lamellopodien bei granulären Zellen gezeigt. Die Fähigkeit von zumindest einigen granulären Zellen Lamellopodien auszubilden ist für Lepidoptera also bekannt und wird hier für *M. sexta* erstmals beschrieben (Abbildung 4.4 A).

Wodurch die granulären Zellen bei *M. sexta* zu diesem gesteigerten Spreitungsverhalten veranlasst werden ist unklar. Als Faktor, der das Spreiten von Plasmatozyten auslöst, ist das *plasmatoocyte spreading peptide* (PSP) aus *Pseudoplusia includens* identifiziert worden (CLARK *et al.*, 1997) und wurde nachfolgend in *M. sexta* beschrieben (ELEFThERIANOS *et al.*, 2009). Dieser Faktor hat keine spreitungsauslösende Wirkung auf granuläre Zellen, es sind jedoch ähnliche Faktoren, die das Spreiten von granulären Zellen auslösen, vorstellbar. Faktoren der Hämolymphe sollten bei der

Kurzzeitkultur der Hämozyten keine größere Rolle spielen können, da hier ausschließlich gewaschene (hämolymphplasmafreie) Hämozyten untersucht wurden. Eventuell werden nach gewisser Zeit der Kultur (Absitzzeit auf dem Objektträger) von den Hämozyten die Spreitung auslösende Faktoren abgegeben. Beispielsweise wird das für PSP kodierende Gen in granulären Zellen von *P. includens* exprimiert (CLARK *et al.*, 1998), jedoch nicht in *M. sexta* Hämozyten (ELEFThERIANOS *et al.*, 1998). In Betracht gezogen werden sollte auch, dass eine Aktivierung der Spreitung bereits vor der Hämozytenentnahme stattfand, so dass auch der Immunstatus der Versuchstiere in Zukunft mitberücksichtigt werden sollte.

Als ursächlich für das Spreiten granulärer Zellen kann auch ein durch Exozytose bzw. Degranulation verursachter Volumenverlust sein, wodurch ein Abflachen und Spreiten begünstigt wäre. In einigen Lepidopteraarten sind granuläre Zellen direkt an Einkapselungsprozessen beteiligt und bilden unter Lamellopodienbildung die erste zelluläre Schicht um einen Fremdkörper (*P. includens*: PECH und STRAND, 1996; *M. unipuncta*: RIBEIRO und BREHÉLIN, 2006). Dies entspricht nicht dem von WIEGAND *et al.* (2000) gezeigten Vorgängen bei *M. sexta*: Hier bilden die Plasmatozyten die ersten Kontakte sowie die primäre zelluläre Kapsel um einen Fremdkörper aus, granuläre Zellen lagern sich erst später in diesem Prozess ohne sichtbare Formveränderung an diese Kapsel an. Trotz allem ist eine Formvariabilität der granulären Zellen auch bei *M. sexta* für vergleichbare Prozesse denkbar, die auch das Ausbilden von Lobopodien bzw. Lamellopodien und Abflachen der Zellen, wie in Abbildung 4.4 A gezeigt ist, beinhaltet.

5.1.3 Zytometrische Eigenschaften der Hämozytentypen

Die Einteilung der Hämozyten in verschiedene Hämozytentypen wurde für *M. sexta* von HOROHV und DUNN (1982) eingeführt, basierend auf der Insektenhämozytenklassifizierung von GUPTA (1979). Die Zellen wurden deskriptiv anhand des Erscheinungsbildes und ultrastruktureller Merkmale eingeteilt. Basierend auf dieser Einteilung und der Bindecharakteristik der oben genannten Hämozytenmarker wurden die Hämozytentypen in Hinsicht auf Durchmesser, Zellkernmorphologie, Zellkern-zu-Zytoplasma-Verhältnis (N:C-Ratio) und relativen DNA-Gehalt (DAPI-Intensität) untersucht. Eine systematische zytometrische Analyse der *M. sexta*-Hämozyten wurde nach meinem Wissensstand bis dato nicht publiziert.

Zellgröße

Für alle nicht-spreitenden Hämozytentypen wurde der durchschnittliche Zelldurchmesser ermittelt (Abbildung 4.19 A). Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen den Zelltypen ermittelt werden: Sphärule Zellen bilden den kleinsten Zelltyp, gefolgt von granulären Zellen und den PNA⁺-Hämozyten, wobei sich der Durchmesser der durch PNA an der Zelloberfläche markierten Hämozyten (PNA⁺-Zellen) nicht signifikant von dem granulärer Zellen unterschied.

Oenozytoide sind der im Durchschnitt größte Zelltyp und runde Plasmatozyten der zweitgrößte, jedoch liegt die Größe dieser beiden Zelltypen nahe beieinander. Zu beachten ist, dass es keine wirkliche scharfe Grenze zwischen Zellgrößen der einzelnen Hämozytentypen gibt. Die Zellgrößen der einzelnen Hämozytentypen überlappen: So sind größere sphärule Zellen und kleinere granuläre Zellen nicht anhand des Durchmessers unterscheidbar und ebenso wenig große granuläre Zellen von kleinen runden Plasmatozyten oder kleinen Oenozytoiden. Dadurch lässt sich der Zelldurchmesser nicht als Ausschlusskriterium (es sei denn zwischen den Extrema) anwenden, sondern muss mit weiteren Eigenschaften kombiniert werden, um eine Zuordnung zu gewährleisten. Dabei sind die im Folgenden diskutierten Eigenschaften des Zellkerns zu beachten.

Nukleusmorphologie

Als weiteres Entscheidungskriterium für die Hämozytenbestimmung wurde das Erscheinungsbild des DAPI-markierten Zellkerns herangezogen (die typische Zellkernmorphologie für jeden Zelltyp ist Abbildung 4.4 zu entnehmen). Dieser besitzt für jeden Hämozytentyp eine mehr oder weniger charakteristische Form. Bei granulären Zellen ist der Zellkern meist kreisrund. Dies gilt ebenso für Oenozytoide, bei denen der Zellkern aber größer ist als der der granulären Zellen. Abweichend von der runden Form findet man bei den gespreiteten granulären Zellen (siehe Abschnitt 5.1.2) ovale Zellkerne. In sphärulen Zellen ist der Zellkern variabel geformt. Es kommen unregelmäßig runde Zellkerne ebenso vor wie langgestreckt-ovale (z.B. in Abbildung 4.4 D''), halbmondförmige oder dreieckig geformte. Diese Formvariabilität korreliert augenscheinlich mit der Anzahl und Lage der Sphärulen, zwischen denen der Zellkern seine Position einnimmt und von diesen verformt wird (siehe auch HOROHV und DUNN, 1982). Relativ große Zellkerne, die eine unregelmäßige, annähernd runde oder ovale Form besitzen sind typisch für gespreitete und runde Plasmatozyten. Der Zellkern der gespreiteten Plasmatozyten nimmt häufig eine größere Fläche ein, was auf die extreme Abflachung durch den Spreitungsvorgang der Zelle zurückzuführen ist. Der Zellkern der mutmaßlichen Prohämozyten (nach HOROHV und DUNN, 1982) ist rund und ähnelt dem der granulären Zellen (Abbildung 4.4 E_{ii}'').

Wiederum ist die Zellkernmorphologie nicht allein anwendbar, um die Hämozytentypen zuverlässig zu unterscheiden, aber sie bildet in Kombination mit der Zellgröße und –form einen zuverlässigen Parameter. Weitere Merkmale des Zellkerns sind der relative DNA-Gehalt sowie das Verhältnis der Kerngröße zum Zytoplasma. Diese zu bestimmen ist für die schnelle Bestimmung eines Hämozytentyps weniger gut anwendbar, ermöglicht aber eine genaue Bestimmung der Hämozytentypen.

Relativer DNA-Gehalt

Die Hämozytentypen konnten, basierend auf ihrem relativen DNA-Gehalt, in zwei Gruppen unterteilt werden: 1. Hämozyten, die einen niedrigen DNA-Gehalt besitzen (d. h. ähnlich dem von granulären Zellen) und 2. Hämozyten, die sich durch einen deutlich höheren DNA-Gehalt ausweisen. Zu 1. können die granulären Zellen, gespreitete granuläre Zellen, sphärule Zellen und PNAm⁺-Zellen gezählt werden, zu 2. die Oenozytoide, runde und gespreitete Plasmatozyten (Abbildung 4.5). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Hämozytentypen innerhalb dieser Gruppen fallen hierbei weniger stark ins Gewicht, als dass die Hypothese gestützt wird, dass sowohl Plasmatozyten (gespreitete und ungespreitete) als auch Oenozytoide DNA-Endoreplikationen durchlaufen und dadurch als polyploidisierte Zellen vorliegen, während die anderen Hämozytentypen diploid bzw. tetraploid (in S, G2 oder M-Phase des Zellzyklus) sind. Granuläre Zellen wurden bereits früher als diploid bzw. tetraploid erkannt (NARDI *et al.*, 2004). Ebenso wurde die Polyploidisierung von Plasmatozyten bereits beschrieben (NARDI *et al.*, 2004). Dies bestätigen meine Befunde. Die Bestimmung des DNA-Gehalts der Oenozytoide, sphärulen Zellen und mutmaßlicher Prohämozyten (PNAm⁺-Zellen) ist dagegen noch nicht quantitativ beschrieben worden und ist somit ein neuer Befund. Setzt man voraus, dass nur diploide Zellen zur mitotischen Replikation in der Lage sind, kann man schließen, dass sphärule Zellen, granuläre Zellen und mutmaßliche Prohämozyten zur Zellteilung potentiell befähigt sind, während Plasmatozyten und Oenozytoide terminal differenzierte, sich nicht eigenständig replizierende Hämozytentypen sind. Des Weiteren sind die ähnlichen DNA-Gehalte der runden und gespreiteten granulären Zellen ein Indiz für die Gruppierung dieser Zellen innerhalb der granulären Zellen, sowie es der Nachweis der Polyploidie in runden und gespreiteten Plasmatozyten für die Plasmatozytengruppe ist. Demgegenüber steht noch der ähnliche Ploidiegrad der Oenozytoide und der runden Plasmatozyten, so dass man anhand des DNA-Gehalts nicht diese beiden Zelltypen voneinander trennen kann. In Blutzellen anderer Organismen ist die DNA-Endoreplikation in einzelnen Zelltypen ebenfalls bekannt: So sind die Kristallzellen in der Lymphdrüse von *D. melanogaster* polyploid (KRZEMIEN *et al.*, 2010) und die Megakaryozyten, von denen die (anukleären) Thrombozyten der Säuger abschnüren, mit 64n stark polyploidisiert (Reviews: RAVID *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2006). Die Polyploidie der Megakaryozyten geht mit einer

verstärkten mRNA- und Proteinsynthese einher (HANCOCK *et al.*, 1993, Review: RAVID *et al.*, 2002). Darauf beziehend ist eine erhöhte Transkription und Translation von bestimmten Genen auch für die Oenozytoide und Plasmatozyten aufgrund ihrer Polyploidie denkbar.

Zellkern-zu-Zytoplasma-Verhältnis (N:C)

Das Zellkern-zu-Zytoplasma-Verhältnis (im Weiteren als N:C abgekürzt) wird häufig zur Charakterisierung von Zellen herangezogen, wobei ein in Relation niedriger Zytoplasmaanteil bestimmter Zellen eines Gewebes oder Zellpools oft als Zeichen für weniger differenzierte Zellen (Stammzellen bzw. Blasten) gedeutet wird. Als relativer Wert wird das N:C immer in Bezug zu anderen Zellen desselben Zellpools bzw. Gewebes betrachtet, so dass keine allgemeingültige Aussage über einen „Grenzwert“ gegeben werden kann, ab welchem man eine Zelle als undifferenziert oder weniger differenziert ansieht.

Als Merkmal für granuläre Zellen von *M. sexta* geben HOROHV und DUNN (1982) ein niedriges N:C an, während dieses für Prohämocyten als hoch angegeben wird. Zahlenwerte wurden in ihrer Arbeit nicht angegeben. Zum N:C weiterer Zelltypen machten die Autoren keine Angaben. Die Aussagen granuläre Zellen und (mutmaßliche) Prohämocyten (PNAm⁺-Hämocyten exklusive der sphäkulen Zellen) betreffend konnten hier bestätigt werden und durch das N:C der anderen ungespreiteten Hämocytentypen ergänzt werden. PNAm⁺-Hämocyten (ausschließlich der sphäkulen Zellen) zeigen den größten N:C-Wert, während granuläre Zellen den niedrigsten Wert aufweisen. Auch Oenozytoide besitzen einen relativ hohen Zytoplasmaanteil (also niedrigen N:C-Wert) und die N:C-Werte der runden Plasmatozyten und der sphäkulen Zellen liegen zwar über denen der granulären Zellen und Oenozytoiden, aber noch deutlich unter dem der PNAm⁺-Hämocyten (Alle N:C-Werte sind in Abbildung 4.29 B gezeigt).

Erhärtet wurde durch diese Analyse die Vermutung, dass PNAm⁺-Hämocyten Prohämocyten sind (siehe Abschnitt 5.1.1.9). Der Bezug zu N:C-Werten der Zellen des hämatopoetischen Organs wird weiter unten (siehe Abschnitt 5.1.10) aufgegriffen.

Fazit der zytometrischen Eigenschaften und Hämocytenklassifizierung

Wie aus den o. g. Ausführungen ersichtlich ist, eignet sich keine der morphologischen bzw. zytometrischen Eigenschaften alleine, um einen Hämocytentyp sicher zu bestimmen. Nutzt man diese Informationen aber in Kombination, so lassen sich die Hämocytentypen folgendermaßen verallgemeinert beschreiben:

Granuläre Zellen sind rund, ca. 6,5 µm im Durchmesser (selten bis zu 10 µm), besitzen einen runden Nukleus, sind diploid oder seltener tetraploid und besitzen ein niedriges N:C.

Gespreitete granuläre Zellen sind ebenfalls diploid oder tetraploid, der Zellkern ist entweder rund wie bei runden granulären Zellen oder oval.

Runde Plasmatozyten sind rund, irregulär-rund oder oval, relativ groß (Durchmesser ca. 8 µm, bis zu 10 µm), besitzen einen großen, unregelmäßig geformten Nukleus, sind polyploid und besitzen ein mittleres N:C.

Gespreitete Plasmatozyten weisen einen sehr großen Zellkern auf, der unregelmäßig geformt ist und sind polyploid. Die Zellformen variieren stark durch Pseudopodienbildung und Spreitung.

Oenozytoide sind rund oder oval, groß mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 9 µm, wobei die Extreme bei ca. 7 µm und ca. 14 µm liegen, und besitzen einen runden Nukleus. In der Regel sind Oenozytoide polyploidisiert und das N:C ist stark zugunsten des Zytoplasmaanteils verschoben (niedriger N:C-Wert).

Sphärule Zellen sind rund, oval oder langgestreckt, dabei meist mit unregelmäßig erscheinenden Umrissen aufgrund der Sphärulen. Sie sind der kleinste Hämozytentyp (ca. 5 µm mittlerer Durchmesser; dabei variieren die Größen von ca. 4 µm bis ca. 7,5 µm). Der Zellkern ist klein, diploid oder tetraploid und das N:C liegt im Schnitt bei ca. 1.

Die mutmaßlichen **Prohämozyten** (PNAm⁺-Hämozyten exklusive sphärule Zellen) sind rund, ca. 5 – 10 µm im Durchmesser (Durchschnitt ca. 7 µm) und diploid oder tetraploid. Das N:C ist stark Richtung Kernfläche verschoben, so dass nur wenig Zytoplasma zu beobachten ist (durchschnittliches N:C ca. 1,8, Extrema bei ca. 3 und ca. 1).

5.1.4 Identifikation neuer Marker für Hämozyten und hämatopoetische Organe

Die Identifikation neuer Hämozytenmarker, sowohl auf mRNA Ebene (RT-PCR und *in-situ*-RNA-Hybridisierung) als auch auf Proteinebene (Antikörpermarkierung), ergab einige neue Erkenntnisse über die von larvalen Hämozyten und hämatopoetischen Organen synthetisierten Biomoleküle. Die Auswahl der Markerkandidaten erfolgte über Vergleiche publizierter Marker in anderen Organismen. Einen Schwerpunkt bildeten dabei Marker für funktionell differenzierte Hämozyten in *D. melanogaster*, wie Phagozytoserezeptoren (Eater, KOCKS *et al.*, 2005; Croquemort, FRANC *et al.*, 1996), ein ECM-Bestandteil, der gleichzeitig in *D. melanogaster* ein zuverlässiger Hämozytenmarker ist (Peroxidasin, ABRAMS *et al.*, 1993, NELSON *et al.*, 1994) und ein Faktor, der für die normale Hämatopoese in hämatopoetischen Geweben von *D. melanogaster* notwendig ist (Heixuedian, XIA *et al.*, 2015). Weitere Faktoren, die bei der Hämatopoese in Arthropoden beteiligt sind, konnten

zum Zeitpunkt nicht über *in-silico*-Analysen bei *M. sexta* identifiziert werden: Für *D. melanogaster*-Hemese (Kurucz *et al.*, 2003) konnte keine ähnliche Aminosäuresequenz in der ManducaBase gefunden werden. Die in *Pacifastacus leniusculus* beschriebenen Faktoren *crustacean hematopoietic factor* (LIN *et al.*, 2011) und Astakine 1 (LIN und SÖDERHÄLL, 2011) wiesen eine sehr niedrige Übereinstimmung mit in der Manduca Base hinterlegten *M. sexta*-Proteinsequenzen auf und wurden nicht weiter untersucht. Ebenso wenig wurden Sequenzen mit hoher Übereinstimmung zu den *D. melanogaster*-Proteinen *Glial cells missing* (BERNARDONI *et al.*, 1997), *Glial cells missing 2* (ALFONSO und JONES, 2002) sowie Atila (HONTI *et al.* 2009) gefunden (Tabelle A.2). Auf der aktualisierten Sequenzdatenbankversion der ManducaBase (Präfix Msex2) konnte eine *D. melanogaster*-Serpent-ähnliche Sequenz identifiziert werden (Y. VON BREDOW, pers. Mitteilung). Dieser Befund wurde jedoch hier nicht mehr berücksichtigt.

5.1.4.1 Eater-like-Protein

Das Protein Eater aus *D. melanogaster* ist an der Phagozytose von Bakterien beteiligt und gehört in die Proteinfamilie der Nimrod Transmembranrezeptoren (KOCKS *et al.*, 2005). Die Expression von *eater*-mRNA findet bis kurz vor dem Einsetzen der Metamorphose statt (KOCKS *et al.*, 2005), was einhergeht mit dem Ausreifen und der Abgabe der Lymphdrüsen-Hämozyten in *D. melanogaster* (GRIGORIAN *et al.*, 2011). Bei *eater*-defizienten Mutanten wurde eine starke Reduktion der Phagozytose von Bakterien beobachtet. Der N-terminale Teil des Eaterproteins bindet Bakterien, dies kann durch acetyliertes und oxidiertes *low density lipoprotein* (LDL) inhibiert werden (KOCKS *et al.*, 2005). Die Fähigkeit zur Bindung von oxidiertem oder acetyliertem LDL ist ein Merkmal von Scavenger-Rezeptoren. Spätere Untersuchungen zeigten, dass ein rekombinantes, Fc-markiertes Eater-Fragment (N-terminal, 199 AS) grampositive Bakterien direkt bindet, während gramnegative Bakterien erst nach einer Zerstörung der Bakterienzellmembran durch Cecropin A gebunden wurden (CHUNG und KOCKS, 2011).

D. melanogaster-Eater wird des Weiteren für die Adhäsion von (*D. melanogaster*-) Plasmatozyten benötigt. Sessile Hämozytenpopulationen, die mit der Epidermis assoziiert vorliegen, werden als mögliche Orte der Hämatopoese und Hämozytendifferenzierung angesehen (MÁRKUS *et al.*, 2009; LEITÃO und SUCENA, 2015, BRETSCHER *et al.*, 2015). In *eater*-Funktionsverlustmutanten ist die Bildung dieser Zellnester gestört (BRETSCHER *et al.*, 2015), so dass ein Einfluss von Eater auf die Aufrechterhaltung der „normalen“ Hämatopoese nicht auszuschließen ist. Die Organisation der Lymphdrüse wird hingegen nicht durch eine *eater*-Defizienz gestört (BRETSCHER *et al.*, 2015).

In-silico-Analysen legen die Existenz eines Proteins (Msex2.07580-RB) in *M. sexta* nahe, welches starke Sequenzübereinstimmung mit *D. melanogaster* Eater aufweist. Daneben weist es Ähnlichkeiten zu den Proteinen Nimrod und Tenascin-X auf. Eater zählt, wie bereits erwähnt, zur Nimrod Proteinfamilie, wodurch die Sequenzhomologien zwischen Nimrod und Msex2.07580-RB nicht verwunderlich ist. Tenascin-X ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix im Säuger (BRISTOW *et al.*, 1993). Die Gemeinsamkeit von Eater, Msex2.07580-RB, Nimrod und Tenascin-X ist das Vorhandensein von *epidermal growth factor-* (EGF-) *like* Domänen (nicht gezeigt). Die Tenascin-X Treffer bei der BLAST-Analyse bezogen sich auf Insekten, die Sequenzen entstammten aus Genomanalysen, die keine (funktionelle) Charakterisierung der Proteine beinhalteten.

Die Synthese der mRNA von Msex2.07580-RB in hämatopoetischen Organen und Hämocyten wurde für *M. sexta* mittels RT-PCR nachgewiesen. Dabei wurde eine deutlich stärkere Expression in Hämocyten als im hämatopoetischen Organ gezeigt (Abbildung 4.26 D). Die *in-situ*-Hybridisierung auf Hämocyten zeigte ein hämocytentypspezifisches Auftreten der Msex2.07580-RB-mRNA: Plasmatozyten und ungespreitete, große Hämocyten wurden eindeutig markiert, während in sphäkulen Zellen keine Msex2.07580-RB-mRNA nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.26 A). Die für Eater kodierende mRNA wird bei *D. melanogaster* in der larvalen Lymphdrüse in allen Loben exprimiert sowie in larvalen (*D. melanogaster*-) Plasmatozyten, jedoch nicht in Lamellozyten oder Kristallzellen sowie embryonalen Hämocyten (Kocks *et al.*, 2005). Der differentielle Nachweis der für Msex2.07580-RB kodierenden mRNA in Plasmatozyten und großen, runden Hämocyten in *M. sexta* zeigt eine ähnliche Zelltypspezifität, auch wenn *D. melanogaster*-Plasmatozyten nicht mit *M. sexta*-Plasmatozyten homologisiert werden können (RIBEIRO und BRÉHELIN, 2006). Im hämatopoetischen Organ von *M. sexta* wurden die Zellen nahe der distalen Oberfläche markiert, während die proximal liegenden Zellen nicht markiert wurden (Abbildung 4.26 B, C). Dies ist ein Indiz für eine Expression von *msex2.07580-RB* in differenzierten Hämocyten, die das hämatopoetische Organ verlassen können, sowie dafür, dass sich im hämatopoetischen Organ Plasmatozyten befinden.

5.1.4.2 Croquemort-like-Protein

Croquemort (Crq) ist ein Rezeptor der CD36-Proteinfamilie, der erstmals in *D. melanogaster*-Hämocyten identifiziert wurde und der an der Erkennung apoptotischer Zellen durch Hämocyten beteiligt ist (FRANC *et al.*, 1996). Bei *D. melanogaster-croquemort*-defizienten Mutanten ist die Phagozytose apoptotischer Zellen im Embryo gestört, nicht jedoch die Phagozytose von Bakterien (FRANC *et al.*, 1999). Das *D. melanogaster*-Gen für Croquemort kodiert für fünf Isoformen des Proteins

(Crq-PA, -PB, -PC, -PD, -PE; je 491 AS). Die *croquemort*-Expression wird als Marker für differenzierte embryonale Hämozyten (Makrophagen) in *D. melanogaster* hypothetisiert (FRANC *et al.*, 1996; EVANS und BANERJEE, 2003). In *D. melanogaster*-Embryonen wird *croquemort* in freien Makrophagen exprimiert, außerdem in den als hämatopoetische Nischen postulierten sessilen Hämozytennestern (HONTI *et al.*, 2010) sowie sessilen Hämozytennestern in adulten Fliegen (GHOSH *et al.*, 2015). In der embryonalen Lymphdrüse wird *croquemort* nicht exprimiert, was HONTI *et al.* (2010) schließen ließ, dass die *croquemort*-Expression ein Marker für einen Hämozytendifferenzierungsweg ist, der unabhängig von der Hämozytendifferenzierung in der Lymphdrüse abläuft. Die Expression von *croquemort* in larvalen Lymphdrüsen wurde meines Wissens noch nicht beschrieben.

Für den in Vertebraten beschriebenen Scavenger-Rezeptor CD36 und CD36-ähnliche Rezeptoren (bspw. Scavenger receptor class B member 1, SCARB1, syn. CD36L1) sind zahlreiche biologische Funktionen beschrieben. CD36 ist auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen zu finden (JANEWAY, 2014), sowie auf bestimmten Enterozyten (NASSIR *et al.*, 2007). Er wird u. a. für die Phagozytose apoptotischer Zellen (im Zusammenspiel mit Thrombospondin und dem Vitronectin-Rezeptor; SAVILL *et al.*, 1992) und die Aufnahme von Cholesterin und Fettsäuren im Darm (NASSIR *et al.*, 2007) benötigt.

Eine BLAST-Analyse mit der *D. melanogaster* Croquemort-PA-Aminosäuresequenz auf Manduca-Base ergab die höchste Übereinstimmung mit dem Protein Msex007423-RA. Die folgende Analyse der Msex007423-RA-Aminosäuresequenz über NCBI-BLAST zeigte eine hohe Übereinstimmung mit Scavenger-Rezeptoren in zwei Lepidopteraspezies (*Amyelois transitella* und *Danaus plexippus*), sowie eine moderate Übereinstimmung mit *D. melanogaster* crq-PA und humanem SCARB1 (Abbildung 4.27, Abbildung 4.28). Die Proteindomänenanalyse ergab eine Zugehörigkeit zur CD36-/Scavenger-Rezeptor Klasse B-Proteinfamilie (Abbildung 4.29). Die Msex007423-RA-mRNA konnte in Hämozyten und hämatopoetischem Organ über RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 4.32). Der Nachweis über RNA-*in-situ*-Hybridisierung war nicht erfolgreich.

Bei Untersuchungen auf Proteinebene mit dem anti-*D. melanogaster* Croquemort-Immunserum (freundliche Gabe von Prof. Y. NAKANISHI) wurden Hämozyten von *M. sexta* markiert, nicht jedoch das hämatopoetische Organ. Die markierten Hämozytentypen waren Plasmatozyten und einige, aber nicht alle granulären Zellen. Oenozytoide und sphärule Zellen wurden nicht markiert (Abbildung 4.34). Im Western Blot auf Hämozytenlysate sowie Lysat des hämatopoetischen Organs konnten zahlreiche Banden mit anti-Croquemort-Immunserum markiert werden. Auffällig waren hierbei zwei Banden, die in Hämozyten aber nicht im hämatopoetischen Organ auftraten (Abbildung 4.33). Die relativen Molekulargewichte dieser Banden lagen bei ca. 81 k und 69 k. Für *D. melanogaster*-Croquemort ist ein relatives Molekulargewicht von 68 k beschrieben (NAKANISHI,

pers. Mitteilung; MANAKA *et al.*, 2004), wobei der anhand der Aminosäuresequenz errechnete Wert sich auf ca. 56 k beläuft. Durch Glykosylierung läuft das Protein im Polyacrylamidgel bei höherem Molekulargewicht (FRANC *et al.*, 1996). Die Aminosäuresequenz von Msex007423-RA besitzt 9 potentielle N-Glykosylierungsstellen und 9 potentielle O-Glykosylierungsstellen (Daten nicht gezeigt; ermittelt über GlycoEP, <http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/>; *binary profile of patterns*-Methode, CHAUHAN *et al.*, 2013). Durch die mögliche Glykosylierung des Proteins kann das Molekulargewicht höher liegen als das der reinen Aminosäuresequenz. Demnach ist ein relatives Molekulargewicht von 68 k für Msex007423-RA denkbar. Analysen mit deglykosylierten Proteinproben zum Beweis der Glykosylierung wurden nicht durchgeführt. Ein Beweis für die Identität der markierten Banden steht aus. Die Markierung mehrerer Proteinbanden im Western Blot, die sowohl in Hämocyten als auch hämatopoetischen Organen auftraten, könnten der Denaturierung der Proteine und daraus folgender Zugänglichkeit von ansonsten maskierten Bindestellen geschuldet sein. Solange die durch den Antikörper markierten Proteinsequenzen nicht identifiziert wurden, bzw. die Markierung rekombinanten Msex007423-RA-Proteins durch anti-Croquemort-Immunserum bewiesen ist, ist die Spezifität des anti-Croquemort Antikörpers für Msex007423-RA-Protein nicht nachgewiesen.

5.1.4.3 Peroxidasin-like-Protein

Zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) werden in Insektenhämocyten gebildet und von diesen für den Aufbau der ECM sezerniert (z.B. in *M. sexta*: Lacunin: NARDI und MIKLASZ, 1989; in *D. melanogaster* über RNA-Nachweis und/oder Antikörperfärbung: Kollagen IV, Laminin B1: FESSLER und FESSLER, 1989; KUSCHE-GULLBERG *et al.*, 1992; Tiggrin: FOGERTY *et al.*, 1994; in *Rhodnius prolixus*: unbekannte ECM-Komponente(n) histochemisch nachgewiesen: WIGGLESWORTH, 1973; in *G. mellonella*: unbekannte ECM-Komponente(n) histochemisch nachgewiesen: ASHHURST, 1982; in *Locusta migratoria* über Antikörpermarkierung unbekannter ECM-Komponenten indiziert: BALL *et al.*, 1987). Peroxidasin ist ein Enzym, das die Vernetzung von Kollagen über eine N=S-(Sulfilimin-) Bindung zwischen den Aminosäuren Methionin und Hydroxylysin vermittelt (BHAVE *et al.*, 2012; WEISS, 2012). Es wird in embryonalen und larvalen Hämocyten von *D. melanogaster* exprimiert und von diesen sezerniert (NELSON *et al.*, 1994). Peroxidasin wird in Hämocyten und Fettkörper sowie den hämatopoetischen Zentren im Embryo und der Larve von *D. melanogaster* gebildet und ist einer der frühesten Marker für embryonale Hämocyten (ABRAMS *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1994; TEPASS *et al.*, 1994; HOLZ *et al.*, 2003). In *M. sexta* konnte *in silico* eine Aminosäuresequenz

(Msex010330) mit hoher Übereinstimmung zu *D. melanogaster*-Peroxidasin-Protein-PA identifiziert werden. Die SmartBLAST-Analyse ergab die höchste Übereinstimmung für Msex010330 mit Peroxidasinen der Insektenspezies *B. mori*, *Papilio xuthus*, *P. polytes*, und *D. melanogaster*, aber auch eine Übereinstimmung mit *Mus musculus*-Peroxidasin (Abbildung 4.35, Abbildung 4.36). Die Proteindomänenanalyse ergab eine gleiche Proteinfamilienzugehörigkeit für Msex010330 und *D. melanogaster* Peroxidasin-PA sowie gleiche vorhergesagte biologische und molekulare Funktionen. RNA-*in situ* Hybridisierungen der Msex010330-mRNA auf Hämocyten und hämatopoetischen Organen von *M. sexta* blieben aus unbekannten Gründen erfolglos (Daten nicht gezeigt), obwohl über RT-PCR-Analyse auf Hämocytenmonolayern und deutlicher noch im hämatopoetischen Organ die mRNA nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.38 C). Das Amplifikat wurde über Sequenzierung als Msex010330 bestätigt. Der Nachweis der für Msex010330 kodierenden mRNA in Zellen des hämatopoetischen Organs bedeutet, dass Plasmatozyten (so dies der einzige vom hämatopoetischen Organ gebildete Hämocytentyp ist) an der ECM-Bildung beteiligt sind. Bis dato werden bei *M. sexta* granuläre Zellen als an der ECM-Bildung beteiligt angesehen (NARDI *et al.*, 2001; BEETZ, 2002).

Erstaunlich ist, dass auf Hämocytenmonolayern der Antikörper gegen humanes Peroxidasin an alle Hämocyten band (Abbildung 4.38 A), während Zellen des hämatopoetischen Organs nicht markiert wurden. Nur in wenigen Fällen konnten einige Hämocyten adhärierend an der Oberfläche hämatopoetischer Organe markiert werden (Abbildung 4.38 B). Orientiert man sich daran, dass in *D. melanogaster* alle Hämocyten Peroxidasin beinhalten (NELSON *et al.*, 1993), so entspricht die Antikörpermarkierung an *M. sexta*-Hämocyten dem zu erwartenden Bild. Nicht zu erklären ist aber, warum bei einer mutmaßlich höheren Peroxidasin-mRNA-Konzentration im hämatopoetischen Organ als in den Hämocyten das Protein in ersterem nicht nachweisbar ist. In *D. melanogaster* ist Peroxidasin in larvalen Lymphdrüsen (GRIGORIAN *et al.*, 2011) und hämatopoetischen Zentren in adulten Fliegen (GHOSH *et al.*, 2015) nachgewiesen worden. Der hier eingesetzte Antikörper markierte bei Western Blot-Analysen keine Proteine der Hämocyten oder des hämatopoetischen Organs, deshalb kann keine Angaben zur Größe des markierten Antigens getätigt werden. Deshalb kann eine Kreuzreaktivität mit einem anderen Protein als dem mutmaßlichen *M. sexta*-Peroxidasin Msex010330 nicht ausgeschlossen werden. Für zukünftige Untersuchungen könnte die Sensitivität des Western Blots erhöht werden (bspw. über Chemilumineszenz) und als Positivkontrolle eine humane ECM-Probe eingesetzt werden. Ein Proteinnachweis mit einem anderen anti-Peroxidasin-Antikörper konnte nicht durchgeführt werden, da das anti-*D. melanogaster*-PXN-Immunserum nicht mehr in ausreichender Menge verfügbar ist (pers. Mitteilung J. FESSLER).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Protein mit hoher Übereinstimmung zu *D. melanogaster*-Peroxidasin in *M. sexta* identifiziert wurde, dass die dafür kodierende mRNA in Hämocyten und im hämatopoetischen Organ synthetisiert wird, ein Proteinnachweis jedoch noch nicht zweifelsfrei möglich war

5.1.4.4 Heixuedian-like-Protein

Das *D. melanogaster heixuedian*-Gen (*heix*) ist ein Ortholog des humanen UBIAD1 und das Protein Heixuedian hat verschiedene enzymatische Funktionen wie nicht-mitochondriale Q10-Synthese und Vitamin K2-Synthese (Xia *et al.*, 2015). *Heixuedian* wird in *D. melanogaster* bei der embryonalen Hämatopoese in den dem Kopfmesoderm entstammenden Hämocyten exprimiert und in der Larve v. a. in den *lozenge*-exprimierenden Zellen (Kristallzellen) der kortikalen Zone der Lymphdrüse (Xia *et al.*, 2015). Daneben führen Verlustmutationen von *D. melanogaster heix* zu stark gestörter Hämatopoese, hypertrophierten Lymphdrüsen und Überaktivierung von u. a. immunrelevanten Signalwegen (IMD und Toll) und, als mögliche Folge dessen, zu melanotischen Tumoren (Xia *et al.*, 2015).

Die multiplen Einflüsse von Heixuedian auf die Hämatopoese und das angeborene Immunsystem machen dieses Protein zu einem interessanten Untersuchungsobjekt in *M. sexta*. Eine vorhergesagte Aminosäuresequenz mit hoher Übereinstimmung zu *D. melanogaster*-Heixuedian wurde per BLAST-Analyse in Manduca Base gefunden: Msex2.06039-RA. Die SmartBLAST-Anfrage zeigte eine hohe Ähnlichkeit mit Prenyltransferasen bzw. Proteinen mit Prenyltransferasedomänen anderer Lepidopteraarten und Heixuedian aus *D. melanogaster* sowie dem *H. sapiens ubiA* Prenyltransferasedomäne-besitzenden Protein 1. Für *D. melanogaster*-Heixuedian wird eine Prenyltransferaseaktivität vorhergesagt (FlyBase; eigene Analyse über Interpro), diese wird für Msex2.06039-RA-Protein ebenfalls durch die Proteindomänenanalyse mit Interpro vorausgesagt. Außerdem gleichen sich die Proteine Msex2.06039-RA und *D. melanogaster*-Heixuedian hinsichtlich der vorhergesagten Transmembrandomänen (Abbildung 4.42, vergleiche mit Xia *et al.*, 2015).

Erste Untersuchungen bei *M. sexta* mittels RT-PCR brachten den Nachweis des Vorhandenseins der mRNA von Msex2.06039-RA in Hämocyten und dem hämatopoetischen Organ. Die entsprechende RNA-*in-situ*-Hybridisierung zeigte dagegen aus unbekannten Gründen kein Signal.

Die Funktion von Msex2.06039-RA muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. So bieten sich RNAi-vermittelte *knock-down*-Experimente an, um eine mögliche Rolle bei der Hämatopoese zu untersuchen.

5.1.5 Organisation des hämatopoetischen Organs

Die vier larvalen hämatopoetischen Organe oder, je nach Betrachtung, die vier Teile des hämatopoetischen Organs, liegen bei *Manduca sexta* im zweiten und dritten Thoraxsegment, jeweils eng mit den Flügelimaginalanlagen assoziiert (Abbildung 2.2; BEETZ, 2002; NARDI *et al.*, 2003; VON BREDOW, 2010 unveröffentlicht). Bei den meisten untersuchten Lepidopteraarten sind die hämatopoetischen Organe in der gleichen Position zu finden (*Bombyx mori*: AKAI und SATO, 1971; *Eumeta variegata*: NIITSU *et al.*, 2008; *Papilio xuthus*: MITSUHASHI, 1972; *Spodoptera frugiperda*: GARDINER und STRAND, 2000; weitere Arten siehe Tabelle 2.3). Grundlegend besteht jedes hämatopoetische Organ in *M. sexta*-Larven aus zwei großen und mehreren kleinen Loben (Abbildung A.9 A). Die großen Loben bedecken die lateralen Flächen der Flügelanlage (Abbildung A.10 B, C) und sind durch einen dünnen Gewebsteg miteinander verbunden (Abbildung A.9 A, C). Diese Verbindung ist als Falte oder Furche zu erkennen (Abbildung A.9, weiße Pfeile) und liegt auf der distalen (zum Hämocoel weisenden) Kante des hämatopoetischen Organs (Abbildung A.9 C). An den großen Loben schließen sich kleinere Loben an, die eine stärkere Einfaltung der Basallamina aufweisen. Daneben ist eine variable Anzahl sehr kleiner Kompartimente (Lobuli) direkt mit den Loben verbunden. Weiter kann man in eine dicht gepackte Zellschicht nahe der der Flügelimaginalanlage zugewandten Oberfläche (proximal) und locker aggregierte Zellen im dem Hämocoel zugewandten (distalen) Bereich unterscheiden (Abbildung 4.6, Abbildung 4.9; NARDI *et al.*, 2003). Die das hämatopoetische Organ umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) konnte mit mehreren Methoden markiert werden. Histologische Färbemethoden kamen hierbei ebenso zum Einsatz wie Immunfluoreszenzmarkierungen mit Antikörpern die an ECM-Komponenten binden (Abbildung A.2). Mittels der Pikrosirius-Rot-Färbung auf Paraffinschnitten konnte die ECM angefärbt werden (Abbildung 4.6 A). Mit dieser Färbemethode wird Kollagen rot angefärbt (PUCHTLER *et al.*, 1973), weshalb dies ein Indiz für Kollagen als Bestandteil der ECM des hämatopoetischen Organs ist. Ein Nachweis von Laminin B2 konnte aufgrund der Kreuzreaktivität eines gegen *D. melanogaster* Laminin B2 (eine Untereinheit des Lamininheterotrimers) gerichteten Antikörpers (anti-LanB2) erbracht werden (Abbildung 4.6 B). Laminine sind integrale Bestandteile der Basallamina (TIMPL *et al.*, 1979). Aufgrund der Markierung mit anti-LanB2 kann die ECM des hämatopoetischen Organs als Basallamina bezeichnet werden. Sowohl die Pikrosirius-Rot-Färbemethode als auch die Markierung mit anti-LanB2 waren geeignet, die Integrität bzw. Durchlässigkeit der ECM des hämatopoetischen Organs auf der proximalen bzw. distalen Seite zu zeigen. Während die ECM des proximalen Bereichs eine durchgehend geschlossene Abgrenzung bildet, ist die ECM des distalen Bereichs an vielen Stellen durchbrochen. Diese Öffnungen der ECM bilden die Kontaktzone der hämatopoetischen Organe zur Hämolymphe (Abbildung 4.6). Über diese Öffnungen können Zellen

des hämatopoetischen Organs in das Hämocoel gelangen und ggf. Hämozyten aus der Hämolymphe in das hämatopoetische Organ eindringen. Dies wurde bereits von mehreren Autoren für die hämatopoetischen Organe verschiedener Insektentaxa postuliert (für Lepidoptera z. B. NARDI *et al.*, 2003; AKAI und SATO, 1971). Außerdem ist vorstellbar, dass Faktoren der Hämolymphe die die Entwicklung der Hämozyten im hämatopoetischen Organ beeinflussen, über diese Öffnungen eindringen und die Zellen des hämatopoetischen Organs erreichen können. Davon sind dann v. a. die Zellen des distalen Bereichs betroffen. Des Weiteren wurde deutlich, dass die ECM-Komponenten nicht nur strikt um die Loben des hämatopoetischen Organs herum angeordnet sind, sondern auch eine Art retikuläre Struktur bilden, die zwischen und um einzelne Zellen bzw. Zellgruppen liegt (Abbildung 4.6). Dies gleicht den von HOFFMANN (1970) für das phagozytäre Organ von *Gryllus bimaculatus* beschriebenen *fibres réticulaires* (Retikuläres Bindegewebe), die dort im Interstitialraum des Organs zu finden sind. Der Aufbau ähnelt sowohl bei *G. bimaculatus* als auch bei *M. sexta* der Verteilung von Kollagen in hämatopoetischen Geweben der Vertebraten (HOFFMANN, 1970; DYGAJ und ZDHANOV, 2014). Für die von HOFFMANN (1970) für hämatopoetische Organe der Orthoptera beschriebenen retikulären Zellen, die als die ECM-sezernierenden Zellen angesehen wurden, wurden von NARDI *et al.* (2003) als äquivalente Zellmorphen im hämatopoetischen Organ von *M. sexta*-Larven kurz vor der Verpuppung beschrieben. Dieser Zelltyp trat in jüngeren Tieren nicht auf und konnte auch von mir in Schnittpräparaten jüngerer Tiere nicht gefunden werden.

Einige Zellen des hämatopoetischen Organs sind mit einer ECM-Schicht umgeben, die histochemisch und mittels anti-LanB2 Antikörpermarkierung nachgewiesen wurde (Abbildung 4.6 A', B', Asteriske). Da diese nur in histologischen Schnitten zu erkennen waren, ist es auch denkbar, dass diese ECM eigentlich Zellgruppen umschließt und nur eine randständige Zelle dieser Gruppe auf dem Schnittpräparat zu erkennen ist. Sollte es sich jedoch um Einzelzellen handeln, die von ECM ummantelt sind, so kann dies als Abgrenzung einzelner Zellen gegen das Umgebungsmilieu gedeutet werden. Bei *D. melanogaster* wurde in den Lymphdrüsen ein ähnliches Bild gezeigt (GRIGORIAN *et al.*, 2011; GRIGORIAN *et al.*, 2013; GRIGORIAN und HARTENSTEIN, 2015). Die *D. melanogaster*-Lymphdrüse ist in von Basallamina abgegrenzte Bereiche unterteilt und die nicht ausdifferenzierten Zellen der medullären Zone besitzen eine individuelle, dünne ECM, die bei den differenzierten Zellen der kortikalen Zone nicht mehr zu finden ist (GRIGORIAN *et al.*, 2011). Wie stark die normale Hämatopoese von der ECM beeinflusst wird, zeigen die Studien von GRIGORIAN *et al.* (2011): Das posteriore Signalzentrum, welches an der Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Nische in *D. melanogaster*-Lymphdrüsen beteiligt ist, zeigt eine starke Expression der ECM-Komponente Trol (*Terribly reduced optic lobes*, ein Homolog zu Perlecan, einem bei Vertebraten). Wird

diese Expression durch eine *loss of function* Mutation gestört, wird der Aufbau der Lymphdrüse beeinflusst, d. h. hämatopoetische Signalzentren werden fehlerhaft ausgebildet und die Hämozyten differenzieren vorzeitig (GRIGORIAN *et al.*, 2013). Dabei wird angenommen, dass die ECM um Einzelzellen und Zellgruppen im hämatopoetischen Gewebe als Diffusionsbarriere für Faktoren dient, die das Schicksal der Zellen beeinflussen können. So kann der Differenzierungsstatus durch Aufrechterhalten der Barriere beibehalten bzw. durch Abbau der ECM geändert werden (GRIGORIAN *et al.*, 2011). Eine ähnliche Funktion kann bei der ECM der Zellen des hämatopoetischen Organs in *M. sexta* vermutet werden. Interessanterweise konnten auch zirkulierende Hämozyten von *M. sexta*, die morphologisch am ehesten den Prohämozyten zugeordnet werden können, sowie Oenozytoide mit anti-LanB2 an der Zelloberfläche markiert werden (Abbildung A.1 A). Ob es sich dabei um eine spezifische Markierung von Laminin B2 handelt ist noch ungewiss. Das Immunsereum wurde durch Immunisierung mittels nativem *D. melanogaster* Laminin B2 gewonnen. *D. melanogaster* Laminine sind hochgradig glykosylierte Proteine (CALLAERTS *et al.*, 1995). Deshalb kann man annehmen, dass das Immunsereum auch andere Proteine mit ähnlicher Glykosylierung binden könnte (siehe hierzu Abbildung A.4, mehrere Proteinbanden werden im Hämozytenlysat von anti-LanB2 markiert).

Weitere Methoden zur Markierung von ECM sind Immunfluoreszenzmarkierungen mit den monoklonalen Antikörpern MS39 und MS73 (Abbildung A.2) und Markierung mit den Lektinen *Galanthus nivalis* Agglutinin (GNA; VON BREDOW, 2010 unveröffentlicht) und *Maclura pomifera* Agglutinin (MPA; VON BREDOW und TRENCZEK, 2011). Diese Marker haben gemein, dass sie Granulen granulärer Zellen markieren. Die in Granulen der granulären Zellen gespeicherten ECM-Komponenten werden zum Aufbau der ECM von diesen Zellen sezerniert (NARDI *et al.*, 2001). Dies lässt die Annahme zu, dass die bislang nicht identifizierten Epitope für MS39, MS73, GNA und MPA Bestandteile der ECM sind. Die Zellen des hämatopoetischen Organs konnten nicht mit MS39, MS73 oder GNA markiert werden, MPA markiert jedoch neben der ECM auch einige Zellen an der Zelloberfläche (VON BREDOW und TRENCZEK, 2011). Insbesondere konnten keine Granulen im Zytoplasma von Zellen des hämatopoetischen Organs mit diesen Markern markiert werden. Dadurch erscheint eine Beteiligung am Aufbau von ECM durch vom hämatopoetischen Organ gebildete Zellen unwahrscheinlich. Es bleibt somit offen, wie die ECM des hämatopoetischen Organs gebildet wird. Wahrscheinlich sind zirkulierende Hämozyten am Auf- und Abbau der ECM beteiligt. Ein Indiz hierfür sind an den hämatopoetischen Organen adhärierende granuläre Zellen (Abbildung 4.8).

5.1.6 Nachweis von Hämozytentypen im hämatopoetischen Organ

Durch den Einsatz von Markern für Oenozytoide, sphärule Zellen, granuläre Zellen und Plasmatozyten wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, dass nur Plasmatozytenmarker sowie das Lektin PNA Zellen des hämatopoetischen Organs markieren können (Abbildungen 4.9 – 4.13). Oenozytoide und granuläre Zellen lagen nie in durch Basallamina umhüllten Bereichen (Abbildung 4.7, Abbildung 4.8). Sphärule Zellen konnten nicht am oder im hämatopoetischen Organ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), auch wenn von WÜNSCH (2009 unveröffentlicht) eine Markierung des hämatopoetischen Organs mit dem sphärule Zellen-spezifischen anti-Esterase Immuns serum beschrieben wird. Vorangegangene Arbeiten, bei denen Marker für Plasmatozyten und granuläre Zellen, nicht jedoch für sphärule Zellen und Oenozytoide eingesetzt wurden, legen nahe, dass ausschließlich Plasmatozyten und mutmaßliche Prohämozyten im hämatopoetischen Organ der *M. sexta*-Larven liegen (BEETZ, 2002; NARDI *et al.*, 2003; BEETZ *et al.*, 2004). Durch den Einsatz weiterer spezifischer Nachweismethoden konnten die Befunde von BEETZ (2002) und NARDI *et al.* (2003) prinzipiell bestätigt werden.

5.1.6.1 Plasmatozytensubpopulationen im hämatopoetischen Organ

Als weiterführende Methode bei der Analyse der hämatopoetischen Organe kamen Mehrfachmarkierungen mit verschiedenen die Plasmatozyten markierenden Antikörpern und/oder dem Lektin PNA zum Einsatz. Auffällig waren hierbei die immer auftretenden Überlappungen der Markierungen: Während einige Zellen positiv für einen Marker und negativ für einen anderen waren, gab es immer auch Zellen, die für zwei oder drei der gleichzeitig eingesetzten Marker positiv waren (Abbildungen 4.10 – 4.12). Scharfe Abgrenzungen einzelner distinkter Zellgruppen traten ebenso auf wie Zellen, die mehrere Marker gleichzeitig trugen. Ein totaler Ausschluss der Markierungen in getrennten Populationen, die keine gemeinsam markierbaren Zellen aufweisen, wie für die Marker NG3B11 und MS13 beschrieben wurde (NARDI *et al.*, 2003: „*Figs. 22, 23 Laser scanning confocal images of hematopoietic organs from L5d4 larvae that have been labeled with anti-neuroglian (FITC) and anti-integrin (Texas Red). Note the absence of co-expression of these two cell surface proteins by the cells of these organs. (...)*“), konnte nicht gefunden werden. Vielmehr wurde die beschriebene Einteilung der Zellen des hämatopoetischen Organs in MS13-positive und NG3B11-positive Zellen durch den Nachweis mit diesen Antikörpern doppelmarkierter Zellen widerlegt (Abbildung 4.11). Sowohl dem Organ aufgelagerte Plasmatozyten (Abbildung 4.11 G, H, I) als auch im hämatopoetischen Organ liegende Zellen (Abbildung 4.11 A, B, D) konnten so markiert werden. Zur näheren Erläuterung möchte ich hier auf die in Abschnitt 5.1.9 diskutierten Analysen

der aus Primärkulturen hämatopoetischer Organe gewonnenen Erkenntnisse vorgreifen: Addiert man die Prozentwerte der MS13- und NG3B11-positiven Zellen, so kommt man bei den nicht-adhären und den adhären Zellen, die *in vitro* aus dem hämatopoetischen Organ austraten, auf Werte weit über 100 %, was zusätzlich impliziert, dass ein großer Anteil der Zellen beide Marker aufweisen muss (Abbildung 4.18).

Welche Molekülstruktur von den eingesetzten Markern gebunden werden ist größtenteils unbekannt. Deshalb ist eine Zuordnung des Differenzierungsstatus dieser Zellen spekulativ. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Zonen angrenzender Zellen, die für bestimmte Marker positiv sind, ein Hinweis für Differenzierungszonen bzw. klonalen Abkömmlingen einiger mitotisch aktiver Zellen sind, die die jeweiligen Moleküle tragen. Das Vorhandensein von plasmatozytenspezifischem β -Integrin (MS13-Epitop) wird als Marker für Plasmatozyten angesehen (siehe Abschnitt 5.1.1.4; WIEGAND *et al.*, 2000; NARDI *et al.*, 2003; LEVIN *et al.*, 2005). Daneben wurde als Subpopulation innerhalb der Plasmatozytengesamtpopulation ein kleiner Anteil der Plasmatozyten als hyperphagozytäre Zellen klassifiziert, die den Hauptteil der phagozytären Leistung übernehmen (DEAN *et al.*, 2006). Eine Expression des Adhäsionsmoleküls Neuroglian (NG3B11-Epitop) korreliert mit einer Plasmatozytensubpopulation, die als Adhäsionsfoci für andere Hämocyten dienen (NARDI *et al.*, 2006). Ob es sich dabei um die identischen Zellen wie den hyperphagozytären Plasmatozyten handelt, ist noch nicht bewiesen worden. Wie aus diesen Arbeiten hervorgeht gibt es Plasmatozytensubpopulationen, die für bestimmte Funktionen zuständig sind. Ob diese als terminal differenzierte Plasmatozyten angesehen werden können, oder ob es sich um eine transient auftretende oder arbeitsteilige Spezifizierung handelt, ist ebenso nicht bekannt. Ob die Expression bestimmter Marker, die eine Unterteilung der zirkulierenden Plasmatozyten ermöglichen, auch eine Unterteilung in spezialisierte Subpopulationen bzw. Differenzierungsstadien im hämatopoetischen Organ erlauben, ist deshalb nicht bewiesen. Basierend auf den Markierungsmustern, die durch Mehrfachmarkierungen in den hämatopoetischen Organen beobachtet wurden, ist jedoch eine distinkte Unterteilung in Subpopulationen denkbar. Weitere Analysen der markierten Strukturen, zirkulierender Plasmatozyten und des hämatopoetischen Organs sind nötig, um das von NARDI *et al.* (2003) postulierte, und durch die hier gezeigten Befunde unterstützte, Bild des mosaikartig zusammengefügt hämatopoetischen Organs bestehend aus undifferenzierten Hämocyten und Plasmatozytensubpopulationen zu verifizieren.

Im weiteren Verlauf wurde mit Markern, die auf histologischen Schnitten eingesetzt werden konnten (MS75, anti-HRP, MS77 und PNA), das Markierungsmuster im räumlichen Bezugssystem genauer untersucht.

5.1.7 Zonierung des hämatopoetischen Organs

Das hämatopoetische Organ kann in verschiedene Bereiche unterteilt werden. Es besteht aus Loben unterschiedlicher Größe, außerdem kann man es anhand seiner relativen Lage zur Flügelanlage in einen proximalen Bereich (= der Flügelanlage am nächsten liegend), einen distalen Bereich (= dem Hämocoel zugewandt) und den dazwischenliegenden zentralen Bereich unterscheiden (Abbildung 4.6, Abbildung 4.9, Abbildung A.9; NARDI *et al.*, 2003). Im proximalen Bereich findet man eng gepackte Zellgruppen, die in *M. sexta* und anderen Lepidoptera-Spezies als Prohämozyten oder hämatopoetische Stammzellen des hämatopoetischen Organs beschrieben oder angesehen wurden (NARDI *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 1998). Für den distalen Bereich sind bei *B. mori* neben Plasmatozyten auch granuläre Zellen, Oenozytoide und sphärule Zellen anhand morphologischer Merkmale identifiziert worden (AKAI und SATO, 1971). HAN *et al.* (1998) ordnen den granulären Zellen, Plasmatozyten und Oenozytoiden sogar jeweils einen eigenen hämatopoetischen Stammzelltyp im hämatopoetischen Organ von *B. mori* zu, der den jeweiligen Hämozytentyp hervorbringen soll. Diese Stammzellen unterscheiden sich ultrastrukturell und im Kern-Zytoplasma-Verhältnis voneinander. Für *Agria tau*, *M. sexta* und *Antherea pernyi* wurde mittels ultrastruktureller Vergleiche ebenfalls das Vorhandensein aller Hämozytentypen im hämatopoetischen Organ postuliert (MONPEYSSIN und BEAULATON, 1978). Auch hier wurde in einen dicht gepackten, proximalen Bereich, der Prohämozyten bzw. prohämozytenähnliche Zellen enthält und einen eher lose gepackten, distalen Bereich mit differenzierten Hämozyten, unterschieden. Außer den Studien von BEETZ (2002) und NARDI *et al.* (2003) an *M. sexta* und GARDINER und STRAND (2000) an *Spodoptera frugiperda* wurden jedoch keine Analysen mit hämozytenspezifischen Antikörpern oder anderen für Hämozytentypen spezifischen Nachweismethoden auf hämatopoetischen Organen der Lepidoptera durchgeführt. NARDI *et al.* (2003) konnten mit einer kleinen Auswahl an Hämozytenmarkern MS13- (β -Integrin-) positive, mitotisch inaktive Plasmatozyten als differenzierten Hämozytentyp nachweisen. Im Vergleich dazu, wurden Neuroglial-positive Zellen, die mitotisch aktiv sein können, als undifferenzierte oder wenig differenzierte Hämozytenvorläufer angesehen (NARDI *et al.*, 2003; siehe hierzu auch Abschnitt 5.1.8).

Neben dem bloßen Vorhandensein zweier unterscheidbarer Zellpopulationen postulierten NARDI *et al.* (2003), dass sich MS13-positive Zellen häufiger im distalen und NG3B11-positive Zellen häufiger im proximalen Bereich des hämatopoetischen Organs finden lassen. Diese Beobachtung wurde in Bezug zum Differenzierungsstatus der Zellen gesetzt (NARDI *et al.*, 2003). Die Markierung der hämatopoetischen Organe mit weiteren Markern zeigte hier ein differenzierteres Bild der Zonierung des hämatopoetischen Organs in unterschiedliche, überlappende Bereiche (Abbildung 4.9): Während anti-HRP den größten Teil der distal und zentral liegenden Zellen sowie einige Bereiche

des proximalen Bereichs markierte (Abbildung 4.9 A), markierte MS75 ein breites Band von distalen und zentral liegenden Zellen (Abbildung 4.9 B). Durch PNA markierte Zellen waren v. a. im distalen Bereich zu finden (Abbildung 4.9 D) und MS77-positive Zellen wurden in Gruppen v. a. im zentralen sowie im distalen Bereich liegend gefunden (Abbildung 4.9 C). Gemein war diesen heterogenen Markierungsmustern, dass einige proximal liegende Bereiche durch keinen der verwendeten Marker markiert wurden (leere Pfeile in Abbildung 4.9). Diese Bereiche trugen also keine Epitope für die plasmatozytenspezifischen Marker (MS13 und MS77) bzw. den plasmatozytentypischen Marker MS75 und waren nicht durch PNA an der Zelloberfläche markierbar. Daraus lässt sich schließen, dass diese proximal liegenden Zellgruppen den bereits von anderen Autoren (bspw. MONPEYSSIN und BEAULATON, 1978; HAN *et al.*, 1998; GARDINER und STRAND, 2000) beschriebenen hämatopoetischen Stammzellnestern der hämatopoetischen Organe der Lepidoptera entsprechen. Da es noch keinen etablierten Marker für diesen Zelltyp gibt, ist eine Identifikation dieser Zellen nur über den Nachweis des Nichtvorhandenseins von Markern für differenzierte Hämozyten möglich. In diesem Bereich ist auch eine im Vergleich zum zentralen bzw. distalen Bereich erhöhte Zelldichte zu erkennen (Abbildung 4.6, Abbildung 4.9).

Für die Lymphdrüsen von *D. melanogaster* Larven wurde eine Zonierung des Organs in drei Zonen beschrieben: Ein posteriores Signalzentrum (PSC), das die Differenzierung der Zellen der angrenzenden Zone beeinflusst, eine an dem PSC angrenzende medulläre Zone, in welcher Prohämozyten liegen und eine kortikale Zone, in der die Differenzierung der Hämozyten stattfindet (LEBESTKY *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2005, MANDAL *et al.*, 2007). Für die Aufrechterhaltung der Prohämozytennische ist das PSC zuständig, das über das Signalmolekül Hedgehog (Hh) die Differenzierung der Prohämozyten beeinflusst. In *hh*-Mutanten kommt es zu verfrühter Differenzierung der Prohämozyten zu Plasmatozyten und Kristallzellen in der medullären Zone (MANDAL *et al.*, 2007). Um das Signal von dem PSC zur medullären Zone zu übertragen wird angenommen, dass zelluläre Fortsätze der PSC-Zellen die Reichweite des Hh erweitern. In der medullären Zone wurde außerdem die Expression von dem Hh-Signalweg nachgeschalteten Genen gezeigt (MANDAL *et al.*, 2007). Des Weiteren vermittelt das PSC über den Notch-Liganden Serrate das Signal zur Differenzierung von Kristallzellen aus Vorläuferzellen in der Lymphdrüse (LEBESTKY *et al.*, 2003). In der kortikalen Zone findet, beeinflusst durch verschiedene Faktoren (bspw. *serpent* in allen Hämozytentypen, *glial cells missing* für die Plasmatozytenentwicklung, *lozenge* als Transkriptionsfaktor für Kristallzell-spezifische Gene), die Differenzierung zu reifen Hämozyten statt. Die von der Lymphdrüse gebildeten Hämozyten können, anders als die von den hämatopoetischen Organen von *M. sexta* gebildeten Hämozyten, allen frei flottierenden Hämozytentypen zugeordnet werden (JUNG *et al.*, 2005).

Eine solch detaillierte Darstellung der Differenzierungswege im hämatopoetischen Organ von *M. sexta*, bei der jeder Differenzierungsschritt nachweisbare Veränderungen der Zelle auslöst, konnte noch nicht erstellt werden. Als Hypothese wird vorgeschlagen, dass die Zellen in den generativen Zentren des proximalen oder zentralen Bereichs gebildet und nach distal geschoben werden, wo die Expression von Markern für Plasmatozyten (MS75, MS77, MS13, anti-HRP-Epitop) stattfindet und weitere mitotische Teilungen durchlaufen werden (Abbildung 4.13, Abbildung 4.14 B), bis im distalen Bereich die Hämocyten zur Abgabe ins Hämocoel bereit sind. Die Abgabe in das Hämocoel wurde über eine *in-vitro*-Kultur intakter hämatopoetischer Organe simuliert und die abgegebenen Zellen charakterisiert (siehe Abschnitt 5.1.9).

Das Vorhandensein eines Signalzentrums ist, wenn man die Beobachtungen bei *D. melanogaster* zugrunde legt, sehr wahrscheinlich. Die Lage eines solchen Signalzentrums ist in den nicht durch Antikörper gegen Hämocyten markierbaren proximalen Bereichen zu vermuten. Erste Ansätze ähnliche Zentren oder die angrenzenden, auf juxtakrine Signale reagierenden, Zellen zu lokalisieren, verliefen leider nicht erfolgreich. Gegen *D. melanogaster*-Proteine gerichtete Antikörper gegen DE-Cadherin, das die medulläre Zone bei der Lymphdrüse von *D. melanogaster* markiert, bzw. Notch, dem Serrate-bindenden Rezeptor, brachten kein Signal (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Untersuchung der Zonierung empfiehlt es sich deshalb über RNA-*in-situ*-Hybridisierung oder, sofern verfügbar, Antikörpermarkierung die Verteilung folgender Faktoren im hämatopoetischen Organ zusätzlich zu untersuchen:

1. Antennapedia, welches in der larvalen *D. melanogaster*-Lymphdrüse im PSC gebildet wird (MANDAL *et al.*, 2007),
2. Hedgehog und am Hh-Signalweg beteiligte Faktoren (siehe oben),
3. Notch und Serrate (siehe oben),
4. Domeless und E-Cadherin als Marker für die medulläre Zone der *D. melanogaster*-Lymphdrüse,
5. Diverser Marker, die funktionell differenzierte Hämocyten ausweisen, siehe das Beispiel Eater (Abschnitt 5.1.4.1).

5.1.8 Mitotische Aktivität im hämatopoetischen Organ

Im Verlauf der Larvalentwicklung nimmt die Zahl der Zellen des hämatopoetischen Organs zu (NARDI *et al.*, 2003). Dieser Zellproliferation liegen mitotische Zellteilungen zugrunde, jedoch konnten bislang keine Zonen erhöhter mitotischer Aktivität identifiziert werden, vielmehr scheinen die sich teilenden Zellen zufällig im hämatopoetischen Organ verteilt zu liegen (BEETZ, 2002; NARDI *et al.*, 2003; BEETZ *et al.*, 2004; eigene Beobachtungen). Interessanterweise finden sich im hämatopoetischen Organ nur diploide (bzw. wenige tetraploide) Zellen, wie NARDI *et al.* (2003) zeigten. Endomitotische DNA-Replikation der Plasmatozyten findet demnach erst nach dem Verlassen des hämatopoetischen Organs statt.

Die von NARDI *et al.* (2003) beschriebenen Subpopulationen NG3B11-positiver bzw. MS13-positiver Zellen im hämatopoetischen Organen wurden als unterschiedlich mitotisch aktiv beschrieben: Während MS13-positive Zellen keine mitotische Aktivität aufwiesen, waren NG3B11-positive Zellen mitotisch aktiv. Dem widersprechen die hier vorliegenden Untersuchungen: Unterschiede der Mitoseaktivität zwischen den NG3B11-positiven bzw. MS13-positiven Zellpopulationen des hämatopoetischen Organs konnten nicht bestätigt werden. Vielmehr waren NG3B11-positive Zellen und MS13-positive Zellen mitotisch aktiv, der Unterschied zwischen diesen Populationen hinsichtlich des Mitoseindex war marginal und nicht signifikant (Abbildung 4.14 B). Eine MS13-positive Zelle in der terminalen Zytokinesephase ist, neben weiteren anti-PH3-positiven Zellen, bspw. in Abbildung 4.13 A abgebildet. Der Mitoseindex der PNA-, MS13- bzw. NG3B11-positiven Zellen unterschied sich nicht von dem der Gesamtheit aller Zellen des hämatopoetischen Organs bzw. untereinander (Abbildung 4.14 B). Einzig MS75-positive Zellen des hämatopoetischen Organs wiesen einen signifikant höheren Mitoseindex auf (Abbildung 4.14 B). Dies impliziert, dass in der Population MS75-positiver Zellen vermehrt Mitosen, d. h. proliferierende Zellen, auftreten. Dazu passt auch der Befund, dass MS75-positive Zellen einen größeren Anteil im hämatopoetischen Organ ausmachen als MS13- bzw. NG3B11- oder PNA-positive Zellen (Abbildung 4.14 A). Man muss dabei beachten, dass das Markierungsmuster dieser Marker jeweils überlappt, dass also auch ein nicht geringer Teil der MS75-positiven Zellen positiv für die anderen Marker ist. Betrachtet man nun die Lokalisierung der MS75-positiven Zellen im hämatopoetischen Organ und vergleicht diesen mit dem Bereich durch PNA markierter (weniger mitotisch aktiver) Zellen (Abbildung 4.9 D, Abbildung A.15), bzw. mit den von NARDI *et al.* (2003) gezeigten Verteilung MS13-positiver Zellen, so fällt auf, dass die Verteilung der MS75-positiven Zellen sich von der distalen Oberfläche aus weiter nach proximal zieht als die der MS13- bzw. PNA-positiven Zellen. Als Folgerung dessen könnte man eine erhöhte mitotische Aktivität in diesem zentralen Bereich erwarten. Vielversprechend wäre in diesem Zusammenhang die Analyse der mitotischen Aktivität MS77-positiver

Zellen, die vermehrt in diesem zentralen Bereich zu finden sind (Abbildung 4.9 C). Markierungen von histologischen Schnitten hämatopoetischer Organe mit anti-PH3 zeigten jedoch kein gehäuftes Auftreten mitotisch aktiver Zellen in bestimmten Bereichen (Beetz, 2002; eigene Beobachtungen, Daten nicht gezeigt). Um diese Analysen der „Momentaufnahme“ von Mitosen auszuweiten empfiehlt es sich, den Einbau von bspw. Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA mitotisch aktiver Zellen zu untersuchen: Durch solche Experimente lässt sich der Zeitraum des Auftretens der Mitosen sowie auch eine eventuelle Häufung in bestimmten Bereichen besser untersuchen, außerdem können die entstandenen Tochterzellen so weiterverfolgt werden. Pilotstudien mit BrdU-injizierten Larven verliefen jedoch nicht erfolgreich, aus unbekannten Gründen konnten weder in hämatopoetischen Organen noch in Hämocyten ein BrdU-Nachweis erbracht werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.9 Eigenschaften *in-vitro*-kultivierter Zellen des hämatopoetischen Organs

Direkte Nachweise der Mitose in Zellen, die vom hämatopoetischen Organ *in situ* und *in vitro* gebildet werden, belegen, dass dem hämatopoetischen Organ entstammende Hämocyten mitotisch aktiv sein können (Abbildung 4.13, Abbildung 4.15). Diese Befunde korrelieren mit den beschriebenen Eigenschaften der hämatopoetischen Organe bei *M. sexta* und anderen Lepidoptera-arten (*M. sexta*: NARDI *et al.*, 2003; *B. mori*: NAKAHARA *et al.*, 2003; *Papilio xuthus*: MITSUHASHI, 1972). In früheren Untersuchungen zur Hämocytenbildung durch hämatopoetische Organe der Lepidoptera wurden mehrheitlich Plasmatozyten und Prohämocyten als vom hämatopoetischen Organ gebildete und in Zirkulation abgegebene Hämocyten nachgewiesen (MITSUHASHI, 1972; GARDINER und STRAND, 2000; NARDI *et al.*, 2003). Dies steht im Einklang mit den hier präsentierten Beobachtungen. Sowohl die morphologischen Kriterien der *in vitro* gewonnenen Zellen des hämatopoetischen Organs als auch deren Markierbarkeit mit PNA bzw. plasmatozytentypischen bzw. -spezifischen Markern an der Zelloberfläche entsprechen denen von Plasmatozyten oder runden Hämocyten, die am ehesten Prohämocyten ähneln (Abbildung 4.17).

5.1.9.1 Adhärente und nicht-adhärente Zellen *in-vitro*-kultivierter hämatopoetischer Organe

Die Eigenschaft von Immunzellen an fremden Oberflächen zu adhären kann genutzt werden, um Zellpopulationen voneinander zu trennen. Dies wird z. B. zur Separation von Makrophagen aus dem Blut von Wirbeltieren angewendet (FITZGEORGE *et al.*, 1967).

Die bei Zellen des hämatopoetischen Organs von *M. sexta* beobachtete Unterteilung in adhärente und nicht adhärente Zellen (Abbildung 4.15 – 4.17; NARDI *et al.*, 2003) kann als Hinweis auf unterschiedliche Zellpopulationen, die *in vitro* vom hämatopoetischen Organ entlassen werden, und/oder einer Transformation nicht adhärenter Zellen während der Kultivierung zu adhären Zellen (Abbildung 4.16) gedeutet werden. Die adhären Zellen entsprechen morphologisch gespreiteten Plasmatozyten, sowie ungespreiteten runden Plasmatozyten. Die nicht-adhären Zellen sind morphologisch uniforme, runde Zellen mit relativ großem Zellkern (Abbildung 4.15, Abbildung 4.17 A – F). Beide Zellpopulationen waren positiv für plasmatozytenspezifische und plasmatozytentypische Marker, jedoch nicht für oenozytoidespezifische oder sphärule Zellen-spezifische Marker (Abbildung 4.17, Abbildung 4.18). Das Vorhandensein adhären Zellen, die sich in wenigen Ansätzen mit granuläre Zellen-spezifischen oder –typischen Markern markieren ließen (MS2: Abbildung 4.18, MS7: nicht gezeigt), war aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine Kontamination der Zellkultur mit zirkulierenden Hämocyten bzw. an hämatopoetischen Organen hängenden granulären Zellen zurückzuführen. Deutliche Unterschiede zeigten sich zwischen den adhären und den nicht-adhären Zellen in Bezug auf die Markierbarkeit mit den Hämocytenmarkern NG3B11 und PNA. Für beide Marker gilt, dass ein signifikant größerer Anteil der nicht-adhären Zellen positiv für diese Marker war (Abbildung 4.18). Dies lässt auf einen (teilweisen) Verlust des jeweiligen Epitops bei einem Teil der Zellen schließen, wenn diese zu adhären („reifen“) Plasmatozyten transformieren. Bereits NARDI *et al.* (2003) beschrieben, dass alle das hämatopoetische Organ verlassenden Zellen das plasmatozytenspezifische Integrin (MS13-Epitop) tragen und somit nur Plasmatozyten dem hämatopoetischen Organ entstammen. Tatsächlich konnte die Markierung der meisten *in-vitro*-gewonnenen Zellen des hämatopoetischen Organs mit MS13 prinzipiell bestätigt werden, wenn auch nicht exakt 100 % der Zellen positiv waren, wie von NARDI *et al.* (2003) beschrieben wurde.

Bemerkenswert ist, dass alle Zellen der nicht-adhären Fraktion und fast alle Zellen der adhären Fraktion mit MS75 markierbar waren. Dies lässt bei einer Übertragung auf die Vorgänge in der Larve selbst schließen, dass die dem hämatopoetischen Organ entstammenden Hämocyten immer positiv für diesen Marker sind. Da jedoch neben Plasmatozyten sphärule Zellen (Abbildung 4.1 C) und Oenozytoide (Abbildung 4.2 B, Abbildung 4.3 B) durch MS75 markiert werden, könnte

man auf einen gemeinsamen Ursprung dieser Hämozytentypen schließen: Nicht terminal zu Plasmatozyten differenzierte Hämozyten, die das hämatopoetische Organ verlassen, könnten in Zirkulation zu Plasmatozyten, Oenozytoiden oder sphärulen Zellen differenzieren. Da experimentelle Beweise fehlen, bleibt diese Möglichkeit als Hypothese im Raum. Eindeutig widerlegt wurde hier nur die Differenzierung zu Oenozytoiden und sphärulen Zellen im Gewebe des hämatopoetischen Organs selbst (siehe Abschnitt 5.1.6) bzw. nach 48 Stunden *in-vitro*-Kultur.

5.1.10 Verwandtschaft der Hämozytentypen und Verbindung zum hämatopoetischen Organ: Prohämozyten, hämatopoetische Zellen, Pluripotenz?

Überlappende Markierung verschiedener Hämozytentypen mit dem gleichen Marker legt eine „Verwandtschaft“ zwischen den markierten Hämozytentypen, also eine direkte Verbindung durch Differenzierung aus einem gemeinsamen Vorläufer oder von einem Zelltyp in den Anderen, nahe, wenn man vom Prinzip der sparsamsten Erklärung (*maximum parsimony* bzw. Ockhams Rasiermesser) Gebrauch macht. Für die Hämozyten der Lepidoptera wurden Vergleiche zwischen den einzelnen Hämozytentypen gezogen und mögliche Differenzierungswege vorgeschlagen (WILLOT *et al.*, 1994, STRAND und JOHNSEN, 1996; GARDINER und STRAND, 1999, YAMASHITA und IWABUCHI, 2000). Welcher der bekannten Hämozytentypen eine weitere Differenzierung durchlaufen kann ist Bestandteil der aktuellen Diskussion um das Entwicklungsschicksal von Hämozyten in Lepidoptera. Für *Pseudoplusia includens* (STRAND und JOHNSEN, 1996; GARDINER und STRAND, 1999) und *M. sexta* (WILLOT *et al.*, 1994) wurden monoklonale Antikörper (mAbs) gegen Hämozyten generiert und deren Markierungsspezifität auf Hämozyten untersucht. Neben mAbs, die spezifisch einzelne Hämozytentypen oder alle Hämozyten markieren, kamen in diesen drei Studien auch mAbs vor, die an zwei Hämozytentypen binden. Bei *P. includens* kam es zu überlappender Markierung von Plasmatozyten und granulären Zellen (9 von 105 Hybridomalinien) sowie Plasmatozyten und Oenozytoiden (2 von 105 Hybridomalinien; STRAND und JOHNSEN, 1996), während bei *M. sexta* die Markierung von Plasmatozyten und granulären Zellen (10 von 140 Hybridomalinien), Plasmatozyten und sphärulen Zellen, (8 von 140 Hybridomalinien) Plasmatozyten und Oenozytoiden (1 von 140 Hybridomalinien) sowie granuläre Zellen und Oenozytoide vorkamen (14 von 140 Hybridomalinien; WILLOT *et al.*, 1994). Eine Aussage über mögliche Differenzierungswege nur anhand der Antikörpermarkierung konnte nicht getroffen werden.

Ein Teil der von WILLOT *et al.* (1994) generierten Antikörper diente als Grundlage für die Identifikation der Hämozytentypen in dieser Arbeit. Diese wurden mittels Mehrfachmarkierungen mit weiteren Hämozytenmarkern näher hinsichtlich ihrer Hämozytentypspezifität charakterisiert.

Die beschriebene und auch in dieser Arbeit beobachtete häufige Doppelmarkierung von Oenozytoiden und granulären Zellen mit den gleichen Markern (MS2, MS39, PNA-Granulemarkierung) lässt auf eine Einteilung der Hämozyten in einen „GR-OE-Komplex“ schließen, bei dem diese Zelltypen als Differenzierungsprodukt aus einem dieser beiden Zelltypen oder eines bipotenten Vorläufertyps hervorgehen. Da Oenozytoide i. d. R. polyploidisiert sind ist es unwahrscheinlich, dass diese zu den diploiden granulären Zellen differenzieren können.

Somit bleiben als Differenzierungsmöglichkeiten (? = unbekannter Zelltyp, → = Differenzierung zu)

? → GR → OE bzw. ? → GR und ? → OE bestehen.

Der Befund, dass auch ein mAb, der Plasmatozyten und sphärule Zellen markiert (MS75), Oenozytoide markiert, verkompliziert das Bild. Denkbar ist ein persistentes Merkmal (MS75), das auf Plasmatozyten, Oenozytoiden und sphärulen Zellen getragen wird, aber bei der (durch den polyploiden Zustand der Oenozytoide extrem unwahrscheinlichen) Differenzierung einer Oenozytoide zur granulären Zelle abhandenkommt.

? → MS75⁺ PL → MS75⁺ OE (→ MS75⁻ GR) (unwahrscheinlich, da OEs und PLs polyploid sind)

? → MS75⁺ PL → MS75⁺ SP (unwahrscheinlich, da PLs polyploid sind)

? → MS75⁻ GR → MS75⁺ OE (→ MS75⁺ PL)

? → MS75⁺ PL; ? → MS75⁺ SP; ? → MS75⁺ OE

Letztlich bleibt jede dieser Möglichkeiten spekulativ, da eine *in-vivo*- oder *in-vitro*-Transformation eines Zelltyps in einen anderen bei *M. sexta* noch nicht systematisch untersucht wurde.

Als Verbindungsglied zwischen den Hämozytentypen, wenn man die Markierung mit monospezifischen Markern zugrunde legt, wurde hier die bislang für larvale Hämozyten unbeschriebene Markierung der Zelloberfläche mit dem Lektin PNA identifiziert. Nur ein geringer Anteil der Hämozyten (ca. 3 %, sphärule Zellen ausgeschlossen) trägt dieses Signal, und die Doppelmarkierung mit Hämozytenmarkern zeigte, dass diese Zellen auch das Merkmal der Hämozytentypen Plasmatozyten, granuläre Zellen und Oenozytoide tragen können. Hinzu kommt das höchste Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnis (N:C) bei diesem Zelltyp, sowie die morphologische Erscheinung, beides Hinweise auf Prohämozyten (*M. sexta*: HOROHV und DUNN, 1982; *Antherea pernyi*: BEAULATON und MONPEYSSIN, 1976; MONPEYSSIN und BEAULATON, 1978; Insekten im Allgemeinen: Gupta, 1979), so wie

es auch für hämatopoetische Stammzellen von Vertebraten beschrieben ist (SPANGRUDE *et al.*, 1988). Im hämatopoetischen Organ konnten ebenfalls Zellen mit PNA an der Oberfläche markiert werden. Dieser Befund wurde durch NARDI *et al.* (2016) bestätigt, ohne die genaue Lokalisierung oder Eigenschaften der Markierung im hämatopoetischen Organ zu beschreiben. Die PNAm⁺-Zellen des hämatopoetischen Organs, gemessen im Organ selber und als aus dem Organ ausgewanderte, nicht-adhärente Zellen, wiesen gleichfalls ein hohes N:C auf, wenn auch niedriger als das der freien PNAm⁺-Hämozyten. Deutlich unterscheidet sich das N:C dabei von PNA-Granulen-positiven (PNAg⁺) granulären Zellen, die ein N:C von 0,55 aufweisen (Abbildung 4.19 B). Somit verbindet die PNAm⁺-Markierung der mutmaßlichen Prohämozyten in Zirkulation diese mit den mutmaßlichen, das hämatopoetische Organ verlassenden Zellen. Ein Beleg für eine gemeinsame Abstammungslinie der Hämozyten ist dies indessen noch nicht, da weder bekannt ist, ob PNA nur ein spezifisches Epitop an der Oberfläche markiert noch ob dieses Signal in mutmaßlichen Prohämozyten unterschiedlicher Genese (embryonalen oder larvalen Ursprungs? Aus dem hämatopoetischen Organ, aus Zirkulation, oder aus einem unbekannten hämatopoetischen Gewebe stammend?) vorkommt.

NARDI *et al.* (2003) spekulierten über die Möglichkeit, dass durch die PNA-Membranmarkierung, die in frühen embryonalen Hämozyten nachzuweisen ist (NARDI, 2004), ein transient auftretendes Molekül nachgewiesen wird, welches bei der Differenzierung zu Plasmatozyten verloren geht. Y. VON BREDOW (persönliche Mitteilung) konnte eine Markierung des bislang unbeschriebenen abdominalen embryonalen Hämozytenclusters, welches mit verschiedenen hämozytenspezifischen oder -typischen Antikörpern markierbar ist, mit PNA zeigen. Da diese Anhäufung sessiler embryonaler Hämozyten ähnliche Marker exprimiert wie das larvale, thorakale hämatopoetische Organ, ist eine spezifische Expression bzw. Glykosylierung des oder der von PNA markierten Moleküle in hämatopoetischen Zentren bzw. deren Abkömmlingen denkbar. Dass auch larvale zirkulierende mutmaßliche Prohämozyten diese Markierung aufweisen ist ein neuer Befund, der wiederum zu den Beobachtungen im Embryo (NARDI, 2004; Y. VON BREDOW, Publikation in Vorbereitung) passt.

Western Blot-Analysen der durch PNA markierten Proteine in Hämozyten und hämatopoetischen Organen zeigen kein einheitliches Bild. Laut BEETZ (2002) sind im hämatopoetischen Organen, in Hämozyten sowie in der Flügelanlage je eine PNA positive Proteinbande mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 120 k zu finden. NARDI (2004) wies zwei Proteinbanden in larvalen Hämozytenlysaten als PNA-positiv nach, diese lagen zwischen 116 k und 250 k. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls zwei Proteinbanden im Hämozytenlysate als PNA positiv nachgewiesen (Abbildung 4.20), die bei ca. 127 k und >175 k liegen. Diese können durchaus identisch mit den von NARDI (2004) beschriebenen Proteinbanden sein, und zumindest könnte das Protein mit einem

relativen Molekulargewicht von 127 k der von BEETZ (2002) beschriebenen 120 kDa Bande entsprechen. Allerdings ließ sich weder die von BEETZ (2002) beschriebene PNA-positive Bande im Lysat des hämatopoetischen Organs bei ca. 120 kDa nachweisen, noch eine Bande, die im Lysat des hämatopoetischen Organs stark und im Lysat der Hämocyten schwach oder überhaupt nicht durch PNA markiert ist. Somit konnte kein haltbares differentielles Bild in Bezug auf die PNA-positiven Proteine zwischen hämatopoetischen Organen und Hämocyten aufgestellt werden. Eine von NARDI *et al.* (2016) durchgeführte Analyse der PNA-positiven Proteine von epidermalen Drüsenzellen (Verson-Drüsen) in *M. sexta*-Larven zeigte, dass PNA ein Protein der Serpin-Proteinfamilie mit einem ungefähren Molekulargewicht von 42 kDa, ein Protein der Nitrilase-Proteinfamilie mit einem ungefähren Molekulargewicht von 62 kDa und ein Protein der *Major Royal Jelly Protein/Yellow*-Proteinfamilie mit einem ungefähren Molekulargewicht von 45 kDa markiert. Keine der spezifisch markierten Proteinbanden der Hämocyten lag in der Höhe dieser Proteine, so dass man davon ausgehen muss, dass die PNA-positiven Proteine in Hämocyten andere Proteine sind als die der Verson-Drüsen, und dass die durch PNA markierte Glykosylierung (bevorzugte Bindung an Gal- β (1-3)-GalNAc) in zahlreichen Proteinen verschiedener Gewebe auftritt. Weitere Untersuchungen wurden zur Charakterisierung der PNA⁺-Zellen und der Abgrenzung dieser gegen granuläre Zellen angestellt. *In-vitro*-kultivierte Zellen des hämatopoetischen Organs wurden mit PNA markiert. Hierbei stellte sich im Anteil der markierten Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen adhären und nicht adhären Zellen heraus. Ein kleiner Teil der adhären Zellen des hämatopoetischen Organs waren PNA⁺, nicht-adhären Zellen des hämatopoetischen Organs waren zu einem großen Teil PNA⁺ (siehe Abschnitt 5.1.9.1). Nicht-adhären vom hämatopoetischen Organ *in vitro* entlassene Zellen ähneln den in Zirkulation zu findenden PNA⁺ Hämocyten morphologisch, jedoch unterscheidet sich das Kern-Zytoplasma-Verhältnis (N:C) zwischen diesen Zelltypen. Während das N:C der PNA⁺ Hämocyten bei 1,8 liegt, beträgt es bei den *in vitro* gewonnenen, nicht-adhären PNA⁺-Zellen bei ca. 1,3 und den im Gewebe des hämatopoetischen Organs vermessenen PNA⁺-Zellen bei ca. 1,5. Deutlich unterscheidet sich das N:C dabei von PNA-positiven granulären Zellen, die ein N:C von 0,55 aufweisen (Abbildung 4.19 B). Wie bereits erwähnt ist ein hohes N:C ein Merkmal von Prohämocyten der Lepidoptera (BEAULATON und MONPEYSSIN, 1976; MONPEYSSIN und BEAULATON, 1978; GUPTA, 1979). Für *Euxoa declarata* wurde eine Zellgrößenveränderung der Prohämocyten im Laufe der Larvalentwicklung beschrieben (ARNOLD und HINKS, 1976). Dieses Phänomen kann als Erklärung für die Unterschiede des N:C dienen, ebenfalls können unterschiedliche Präparationsmethoden die Ursache sein, oder aber dass es in Zirkulation zu einem graduellen Anstieg des Kern-Zytoplasma-Verhältnis kommt, das bei Zellen des hämatopoetischen Organs und *in-vitro*-gewonnenen Zellen des hämatopoetischen Organs noch niedrig ist. Die

hämatopoetischen Stammzellen des hämatopoetischen Organs von *B. mori* werden von HAN *et al.* (1998) in drei Subtypen unterschieden, die nach Vergleich der zytologischen Eigenschaften jeweils für die Bildung eines bestimmten Hämozytentyps verantwortlich sein sollen. Von diesen hämatopoetischen Stammzellen besitzt ein Typ ein N:C von ca. eins (Vorläufer von Oenozytoiden) und zwei ein N:C von größer eins (Vorläufer für Plasmatozyten und granuläre Zellen). Das N:C der PNA⁺-Zellen des hämatopoetischen Organs von *M. sexta* liegt im Schnitt deutlich über eins. Die PNA⁺-Zellen des hämatopoetischen Organs liegen eher im locker aggregierten Bereich als in der Zone der kompakt gepackten Zellen, die als die Zone der generativen hämatopoetischen Zellen angesehen wird. Das N:C spricht also für einen Prohämozytentyp, die Lokalisation im Gewebe spricht jedoch dagegen, dass es sich um die mutmaßlichen hämatopoetischen Stammzellen des proximalen Bereichs des hämatopoetischen Organs handelt, sondern um einen weiter differenzierten Hämozytentyp, bzw. um hämatopoetische Stammzellen, die in Zirkulation gehen. Ableiten lässt sich daraus, dass nicht vollständig differenzierte, pluripotente, multipotente, oder, wie es die Datenlage für *M. sexta* suggeriert (siehe Abschnitt 5.1.6; NARDI *et al.*, 2003), unipotente, hämatopoetische Progenitoren im hämatopoetischen Organ gebildet und in die Hämolymphe entlassen werden. Wenn alle PNA⁺-Zellen (ausgenommen der sphärulen Zellen), die in der Hämolymphe gefunden wurden, dem hämatopoetischen Organ entstammten, so suggeriert dies, dass das hämatopoetische Organ Quelle für differenzierte Plasmatozyten ist, aber auch für Prohämozyten, die erst in der Zirkulation zu den Hämozytentypen Oenozytoide, granuläre Zellen und Plasmatozyten differenzieren können. Ein Indiz für diese Hypothese sind die Doppelmarkierungen der zirkulierenden PNA⁺-Zellen mit dem monospezifischen granuläre Zellen Marker MS7, dem monospezifischen Plasmatozytenmarker MS13 und den monospezifischen Oenozytoidemarkern anti-PPO und anti-βGRP-1 (Abbildung 4.1).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Befunde bei *B. mori*, dass alle Hämozytentypen dem hämatopoetischen Organ entspringen, auch für *M. sexta* gelten könnten. Die Differenzierung der Zellen des hämatopoetischen Organs zu granulären Zellen und Oenozytoiden fände dann aber nicht direkt im distalen Bereich des hämatopoetischen Organs statt, sondern erst nach Verlassen des Organs in Zirkulation. Gleichfalls könnte damit die PNA-Markierung der Zellmembran von sphärulen Zellen erklärt sein. Diese unterscheiden sich in Form und Größe, sowie der Zellkerngröße, von den übrigen PNA⁺-Hämozyten, könnten aber von diesen abstammen, und terminal differenzierte Hämozyten darstellen, wie es für *B. mori* beschrieben wurde (YAMASHITA und IWABUCHI, 2001).

5.1.11 Modelle der Hämatopoese in *Manduca sexta*-Larven

Aus der Erkenntnis, dass einige Hämozytentypen mehrere Merkmale mit einander teilen, die in anderen nicht zu finden sind, und den Beobachtungen der *in-vitro*-kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs sowie die Beschreibung der Zonierung des hämatopoetischen Organs, wurden zwei konkurrierende Modelle der Hämatopoese erstellt (Abbildung 5.1). Diese basieren einerseits auf der Gruppierung verschiedener Hämozytentypen aufgrund gemeinsamer Merkmale und andererseits auf den Beobachtungen, dass im hämatopoetischen Organ selber keine Hämozytentypen außer Plasmatozyten und mutmaßlichen Prohämozyten zu finden sind (abgesehen von nicht durch die eingesetzten Marker markierbaren mutmaßlichen hämatopoetischen Stammzellen; diese Arbeit und NARDI *et al.*, 2003). Das hämatopoetische Organ entlässt unter Zellkulturbedingungen Hämozyten, die MS75-positiv sind. Diese adhären an Fremdoberflächen und sind zum größten Teil PNA-negativ, oder sind nicht-adhären und zu einem großen Teil PNA-positiv an der Zellmembran (PNAm⁺). Diese PNAm⁺ Zellen wurden anhand der bereits erwähnten Eigenschaften (Morphologie, N:C) als Prohämozyten bestimmt. Sie werden im hämatopoetischen Organ gebildet und abgegeben (siehe Abschnitt 5.1.9) und sind in der Hämolymphe nachweisbar. Nicht eindeutig klären ließ sich, ob es weitere Quellen für Prohämozyten bzw. PNAm⁺-Hämozyten gibt. Deshalb liegt dem ersten hier vorgestellte Hämozytendifferenzierungsweg die Annahme zu Grunde, dass Prohämozyten (bzw. PNAm⁺-Hämozyten) dem hämatopoetischen Organ entstammen (Abbildung 5.1 B). Durch den Nachweis, dass PNAm⁺-Hämozyten Marker für alle Hämozytentypen tragen können (siehe Abschnitt 5.1.1.8) ist eine Verbindung der Zellen des hämatopoetischen Organs nicht nur zu Plasmatozyten und Prohämozyten denkbar, sondern auch zu Oenozytoiden, granulären Zellen und sphäkulen Zellen. Verlassen diese PNAm⁺-Zellen (Prohämozyten) das hämatopoetische Organ, so könnten sie graduell differenzieren. Durch Verlust der PNA-Zellmembranmarkierung bei persistierender MS75-Markierung und Zugewinn der Markierung mit MS13 bzw. MS77 wird das Differenzierungsschicksal „Plasmatozyte“ markiert. Plasmatozyten stellen dann einen terminal differenzierten Zelltyp dar, eine These, die aufgrund der Polyploidisierung dieses Zelltyps gestützt wird (Abbildung 4.5; NARDI *et al.*, 2003). Sphäkulen Zellen sind positiv für MS75 und PNAm⁺, außerdem diploid, und deshalb als direktes Differenzierungsprodukt von Prohämozyten denkbar. Dies beinhaltet beibehalten der Marker PNAm⁺ und MS75 und Zugewinn der Esterase-Markierung. Dieser Zelltyp wird nach dem hier vorgestellten Modell als terminal differenziert angenommen, dies kann jedoch nicht belegt werden. Durch die überlappende Markierung von Oenozytoiden und granulären Zellen mit verschiedenen Markern (MS2, MS39, MS73, PNAm⁺ und PNAg⁺) ist zu vermuten, dass diese beiden Zelltypen als Differenzierungsprodukt aus einem gemeinsamen Vorläufer entstehen. Diese Vorläuferzelle (Progenitor) geht den

mutmaßlich terminalen Differenzierungsstadien „Oenozytoide“ (markiert durch anti-PPO und anti- β GRP-1) und „granuläre Zelle“ (markiert durch MS7) voraus. Die Markierung mit MS75 geht hierbei nur bei dem Differenzierungsschritt zu granulären Zellen verloren, während das MS75-Epitop bei der Differenzierung zu Oenozytoiden beibehalten oder erneut exprimiert wird. In letzterem Fall wäre auch eine Differenzierung von granulären Zellen zu Oenozytoiden denkbar, während der gegenläufige Differenzierungsweg aufgrund der Polyploidisierung der meisten Oenozytoide (Abbildung 4.5) unwahrscheinlich ist.

Als alternativer Differenzierungsweg (Abbildung 5.1 C) ist denkbar, dass das hämatopoetische Organ Plasmatozyten sowie mutmaßlich unreife Plasmatozyten („Proplasmatozyten“, d. h. Hämozyten, die den Differenzierungsweg zu Plasmatozyten eingeschlagen haben aber noch nicht vollständig ausgeprägt haben) bildet und in Zirkulation abgibt. Dabei muss vorausgesetzt werden, dass alle anderen Hämozytentypen aus Vorläufern anderer Herkunft oder durch Teilung bereits differenzierter Hämozyten entstehen. Aus granulären Zellen könnten durch Differenzierung (oder vorausgegangene Mitose und Differenzierung der Tochterzelle) Oenozytoide und mutmaßlich terminal differenzierte granuläre Zellen (markiert durch MS7) entstehen. Die Herkunft der larvalen granulären Zellen und Oenozytoide wäre damit im Embryo zu verorten und die Zellzahlzunahme während der Larvalentwicklung kommt durch mitotische Teilungen zustande. Alternativ dazu könnten bisher nicht identifizierte hämatopoetische Zentren auch in Larven vorhanden sein (evtl. vergleichbar mit sessilen Hämozytennestern in *D. melanogaster* ?). Eine Differenzierung aus nicht differenzierten Vorläufern, also Prohämozyten für den granuläre Zellen-Oenozytoide-Komplex, erscheint ebenfalls wahrscheinlich. Dieser Zelltyp trägt nun den gleichen Marker wie die dem larvalen hämatopoetischen Organ entstammenden Prohämozyten, PNA^m, und differenziert zu Oenozytoiden und granulären Zellen. Dem bzw. den PNA^m-Epitop(en) käme(n) in diesem Fall die Bedeutung eines bzw. mehrerer universellen/r Hämozytenprogenitormarker(s) zu. Die Herkunft der sphäkulen Zellen ist nach diesem Modell nicht geklärt, eine direkte Differenzierung zu sphäkulen Zellen aus Vorläufern aus dem hämatopoetischen Organ ist ebenso denkbar wie eine Differenzierung aus den Prohämozyten des granuläre Zellen-Oenozytoide-Komplexes.

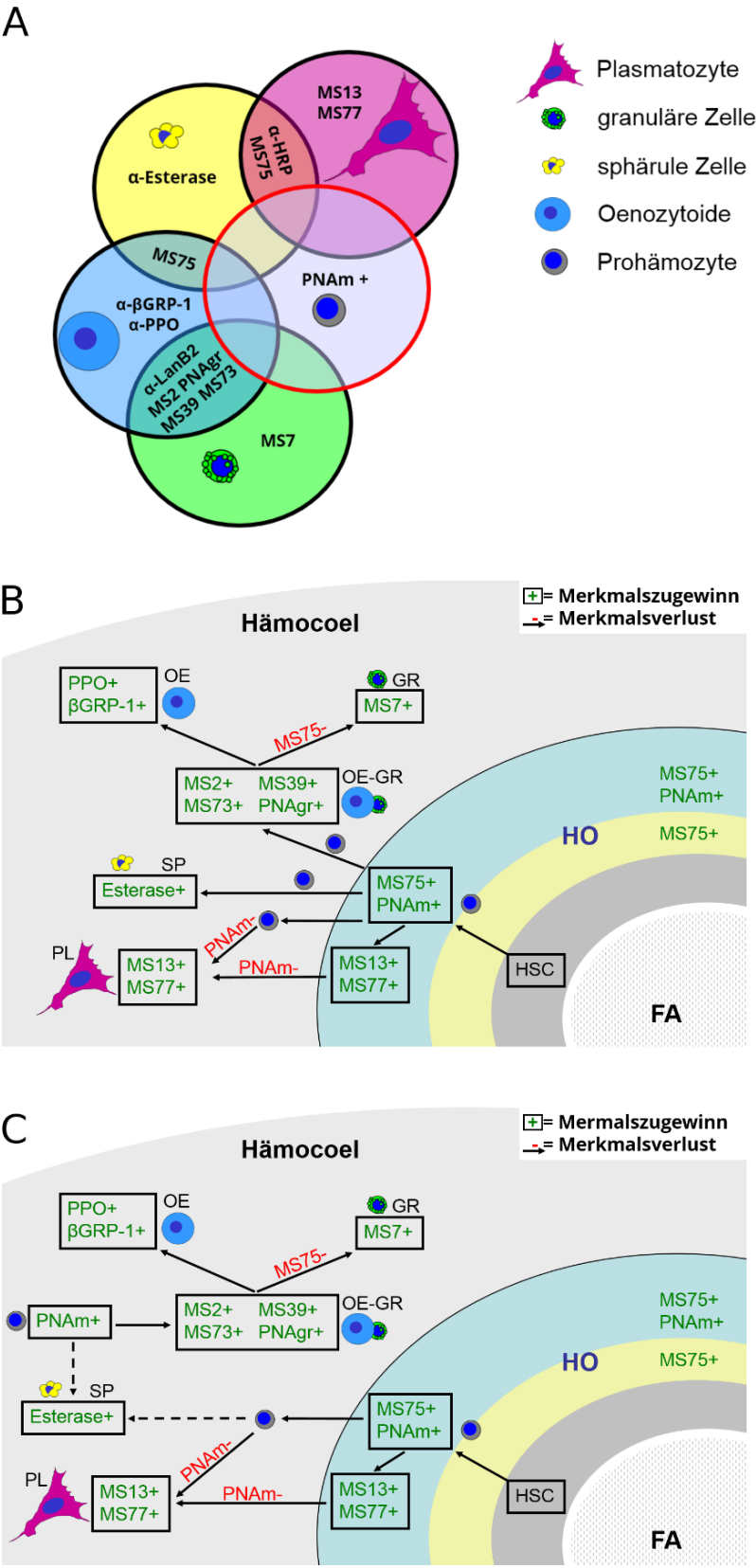


Abbildung 5.1: Verwandtschaftsverhältnisse der Hämocyten und mögliche Modelle der Hämatopoese.

Fortsetzung auf Folgende Seite.

Fortsetzung Abbildung 5.1. A: Monospezifische Marker (Kreise) sowie mehrere Hämozytentypen markierende Marker (überschneidende Bereiche) zeigen mögliche Verwandtschaft (Differenzierungsmerkmale) der Hämozytentypen. Gleichzeitige Markierung mehrerer Hämozytentypen impliziert einen möglichen gemeinsamen Differenzierungsweg oder eine Funktionsüberlappung. Es gruppieren granuläre Zellen mit Oenozytoiden und Plasmatozyten mit sphäkulen Zellen. MS75 verbindet Oenozytoiden mit sphäkulen Zellen und Plasmatozyten. PNA^m-Zellen (mutmaßliche Prohämozyten) verbinden die Hämozytentypen. Die Markierung von Plasmatozyten und Oenozytoiden durch anti-Neuroglian wurde außer Acht gelassen, da in anderen Arbeiten auch granuläre Zellen durch diesen Marker markiert wurden.

B, C: Mögliche Modelle der larvalen Hämatopoese basierend auf möglichst seltenen Merkmalsänderungen (maximale Sparsamkeit). Proliferation differenzierter Hämozyten wurden nicht berücksichtigt. Die vereinfachte Zonierung des hämatopoetischen Organs wurde farblich gekennzeichnet, grau = negativ für alle Marker, gelb = MS75-positiver Bereich, hellblau = MS75- und PNA-positiver Bereich (siehe hierzu auch Abbildung A.15). In **B** gehen alle Hämozytentypen aus PNA^m-Hämozyten des hämatopoetischen Organs hervor, in **C** wird eine weitere Quelle von Prohämozyten für den Oenozytoide-granuläre Zellen-Differenzierungsweg und evtl. für die Bildung von sphäkulen Zellen angenommen.

Abkürzungen: FA = Flügelanlage, HO = hämatopoetisches Organ, HSC = hämatopoetische Stammzelle, GR = granuläre Zelle, OE = Oenozytoide, OE-GR = Oenozytoide-granuläre Zellen-Komplex, PL = Plasmatozyte, SP = sphäkulare Zelle.

Quantitative Auswertungen sowie endgültige Belege, die die Bevorzugung einer dieser Hypothesen rechtfertigen, liegen noch nicht vor. Es handelt sich bei den vorgestellten Modellen um Rückschlüsse aufgrund von überlappenden Markierungen einzelner Zellen, morphologischer und zytometrischer Beobachtungen. Nicht jede Zelle eines Differenzierungswegs ist zwangsläufig positiv für alle für diesen Typ genannten Marker. Der Beleg mittels Einzelzellbeobachtung und Mehrfachmarkierungen mit Hämozytenmarkern setzt die Lösung einiger methodischer Probleme voraus (Doppelmarkierungen mit Antikörpern des gleichen Subtyps, Verwenden weiterer Lektine). Außerdem sind nicht alle Hämozytenmarker berücksichtigt worden: Neuroglian (NG3B11) markiert bspw. nach eigenen Beobachtungen Oenozytoiden und Plasmatozyten (Abbildung 4.1 H; 4.2 D; 4.3 D), während laut ZHUANG *et al.* (2007) granuläre Zellen und Plasmatozyten markiert werden. Ob und inwiefern die Markierung von Hämozytentypen durch NG3B11 abhängig von Entwicklungsstadien oder dem Immunstatus der Tiere ist, bleibt unklar. Ähnliches gilt für weitere monoklonale Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurden (WILLOT *et al.*, 1994), von denen bereits bekannt ist, dass diese in Larve und Puppe unterschiedliche Hämozytentypen markieren (BEETZ, 2002; BEETZ *et al.*, 2004) und deshalb eventuell Differenzierungsmarker sind.

Insgesamt ist die Rolle von larvalen hämatopoetischen Organen der Lepidoptera bei der larvalen Hämatopoese umstritten. Während der Larvalentwicklung nehmen die hämatopoetischen Organe an Größe zu und lösen sich kurz vor der Verpuppung vollständig auf, wobei die Mehrheit der Zellen des hämatopoetischen Organs in Zirkulation gehen und verbleibende Zellen degenerieren (NARDI *et al.*, 2003). Eine durch endokrine Faktoren gesteigerte Hämatopoese- und Hämozytenfreisetzungsrate des hämatopoetischen Organs ist bei *B. mori* beobachtet worden (NAKAHARA *et al.*, 2003). Dort führt die Zugabe von Hämolympheplasma verschiedener Larvalstadien genauso wie die Zugabe von

20-OH-Ecdyson zu vermehrter Mitose und Abgabe von Zellen aus dem hämatopoetischen Organ *in vitro* (NAKAHARA *et al.*, 2003). Auch die Hämatopoese zirkulierender Hämocyten wird durch 20-OH-Ecdyson und mehr noch durch Juvenilhormon-Analoga positiv beeinflusst, wie an *B. mori*-Larven mit entfernten hämatopoetischen Organen gezeigt wurde (ZHOU *et al.*, 2006). Da jeder Häutung ein Anstieg des Ecdysontiters vorausgeht (BOLLENBACHER *et al.*, 1981) ist mit einer Freisetzung von Hämocyten durch das hämatopoetische Organ zu jeder larvalen Häutung zu rechnen.

NITTONO *et al.* (1964) beobachteten an *B. mori* nach Kauterisieren der hämatopoetischen Organe eine Verminderung der Gesamthämocytenzahl (THC, *total hemocyte count*), sowie eine relative Verminderung der Prohämocyten und Plasmatozytenzahl (DHC, *differential hemocyte count*). Werden durch Bestrahlung die hämatopoetischen Organe von *B. mori*-L4-Larven zerstört, so kommt es zu einer Verminderung des THC im folgenden L5-Stadium (TU *et al.*, 2002). Das Entfernen der hämatopoetischen Organe bei *Antherea pernyi* führt zu einer Verminderung der Prohämocyten- und Plasmatozytenpopulationen sowie Zwischenformen (BEAULATON, 1980). Trennt man den Thorax als Sitz der hämatopoetischen Organe vom Abdomen durch eine Ligation ab, so nimmt bei *Euxoa declarata*-Larven die Gesamthämocytenzahl im Thoraxbereich relativ zum Abdomenbereich zu (HINKS und ARNOLD, 1977). Die Zahl der Prohämocyten und Plasmatozyten sinkt nach der Abschnürung in der posterioren (nicht die hämatopoetischen Organe einschließenden) Region.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die hämatopoetischen Organe an der larvalen Hämatopoese v. a. von Prohämocyten und Plasmatozyten direkt beteiligt sind. ZHOU *et al.* (2006) beobachteten nach Totalentfernung aller hämatopoetischen Organe im letzten Larvalstadium von *B. mori* erst eine Zunahme des THC und bei der Metamorphose einen drastischen Rückgang der Hämocytenzahl. Dies und die Befunde, dass die hämatopoetischen Organe der Lepidoptera vor und während der Metamorphose Zellen freisetzen und dann degenerieren zeigt auf, dass ähnlich wie bei *D. melanogaster* (GRIGORIAN *et al.*, 2011) eine Hämocytenbildungsphase in Vorbereitung der Metamorphose auch auf die Leistung der hämatopoetischen Gewebe zurückzuführen ist. Als Besonderheit ist die Beobachtung bei *Pseudoplusia includens* zu werten, dass hämatopoetische Organe erst im letzten Larvenstadium und nur metathorakal angelegt werden. Die Bildung larvaler Hämocyten muss bei dieser Spezies in anderen Kompartimenten (in Zirkulation?) stattfinden. Die thorakalen hämatopoetischen Organe spielen hier offensichtlich nur eine Rolle für die Hämatopoese bei der Metamorphose (GARDINER und STRAND, 2000).

5.2 Sektion II: Immunkompetenz des hämatopoetischen Organs und weiterer Organe

5.2.1 Immunreaktionen auf orale *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe und auf Injektion mit *E. coli* K12

Um die Reaktionen von *M. sexta*-Larven auf eine darmvermittelte Infektion und eine systemische Infektion zu vergleichen, wurden neben der Bestimmung antimikrobieller bzw. lytischer Aktivität der Hämolymphe die mRNA-Synthese von vier ausgewählten immunrelevanten Genen untersucht. Dabei wurden zwei Vertreter PAMP-bindender Proteine (IML-3 und PGRP-1A), ein antimikrobielles Peptid (Lysozym) und ein Protein, dessen Wirkung unklar ist, das aber bei Infektionen oder Verletzungen freigesetzt wird (Scolexin A), ausgewählt.

Dabei fiel auf, dass die antimikrobielle bzw. lytische Aktivität der Hämolymphe bei beiden Infektionsversuchen (*E. coli* K12-injiziert bzw. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-gefüttert) ähnlich stark erhöht war und es zu ähnlich hoher Steigerung der mRNA-Synthese von dem PAMP-bindenden Protein PGRP-1 und dem Effektor Lysozym in den Organsystemen gab. Andererseits reagierte das Mitteldarmepithel nicht auf eine systemische Infektion mit erhöhter mRNA-Synthese der beobachteten Gene. Ebenso unterschied sich die Stärke der mRNA-Expression von *Scolexin A*, eines mutmaßlichen Effektorgens, zwischen den Behandlungen. Dieses zeigte nur im Falle einer systemischen Infektion eine signifikant gesteigerte mRNA-Synthese. Die beiden verwendeten Bakterienarten, *B. thuringiensis* und *E. coli*, gehören zwar zu unterschiedlichen Hauptgruppen (grampositive bzw. gramnegative Bakterien), besitzen jedoch beide das (häufig als typisch für gramnegative Bakterien angesehene) meso-Diaminopimelin-Typ-Peptidoglykan (DAP-Typ-PGN) in der Zellwand (*E. coli*: Review VOLLMER und BERTSCHE, 2008; *B. thuringiensis*: KINGAN und ENSIGN, 1968). Das lösliche PAMP-bindende Protein PGRP-1 bindet DAP-Typ-PGN und löst nachgeschaltete Immunreaktionen (PPO-Aktivierungskaskade) aus (SUMATHIPALA und JIANG, 2010). Gleichzeitig wird Lysozym hierbei eine janusköpfige Rolle zugewiesen: Einerseits inhibiert Lysozym die Aktivierung von PPO zu PO (RAO *et al.*, 2010), andererseits wird den durch Lysozym gebildeten Peptidoglykanfragmenten eine die Immunantwort induzierende Wirkung zugesprochen (KANOST *et al.*, 1988). Im Drosophilamodell löst DAP-typ-PGN durch Binden an bestimmte PGRPs eine Immunantwort über den *Immune deficiency*-(Imd-) Signalweg aus, wodurch die Synthese u. a. von antimikrobiellen Peptiden ausgelöst wird (LEMAITRE *et al.*, 1995; KANEKO *et al.*, 2005; Review: ROYET *et al.*, 2011). Die Auswirkungen der beiden Infektionen auf die mRNA-Synthese sind in Abbildung 5.2 schematisch zusammengefasst.

5.2.1.1 Darminfektion durch *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*

Bacillus thuringiensis ist ein natürlich vorkommendes Pathogen, dessen Endo- und Exotoxine durch Interaktion mit dem Darmepithel von Insekten zu einer Schädigung bis hin zur Lyse des Mitteldarms führen. Es wird diskutiert, ob es sich bei *B. thuringiensis* eher um ein saprophages Bakterium („Bodenbakterium-Hypothese“) mit pathogenen Eigenschaften oder um ein „echtes“ Pathogen mit obligatem Wirtsbefall handelt (Review: ARGÔLO-FILHO und LOGUERCIO, 2014). Zur Überdauerung z. B. im Bodenmilieu bildet *B. thuringiensis* Sporen aus. Zeitgleich mit der Freisetzung der Sporen aus der Mutterzelle werden Proteinkristallen, die aus einem Gemisch aus Toxinen (Bt-Toxinen) bestehen, freigesetzt. Besondere Bedeutung kommt *B. thuringiensis* bzw. dessen Toxinen durch den massenhaften Einsatz in der Landwirtschaft zu (Reviews: WHALON und WINGERD, 2003; ROH *et al.*, 2007). Dabei ist die Spezifität der *B. thuringiensis*-Stämme ein ausschlaggebender Faktor für die sichere Anwendung: Bestimmte Unterarten sind, aufgrund der spezifischen Toxizität ihrer Bt-Toxine, pathogen für bestimmte Insektentaxa, während andere Insekten nicht geschädigt werden. Die Unterart *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* ist für Lepidoptera pathogen, basierend auf drei Cry1A-Proteinen, die im alkalischen Milieu des Darms proteolytisch aktiviert werden, an Cadherin-Rezeptoren der Darmzellen binden und so an die Zellmembran der Darmepithelzellen gelangen bzw. in diese inseriert werden (JENKINS *et al.*, 2000). Die folgende Schädigung der Epithelzellen wird auf zwei unterschiedliche Arten erklärt (SOBÉRON *et al.*, 2009):

1. Es kommt es zur Bildung von Ionenkanälen durch gebundenes Cry-Toxin, so dass durch ein osmotisches Ungleichgewicht die Zellen zugrunde gehen (SCHWARTZ *et al.*, 1993; LORENCE *et al.*, 1995; Review: SOBÉRON *et al.*, 2010).
2. Es wird durch das Binden von Cry1A-Toxin an den Rezeptor die Apoptose der Darmepithelzellen über den Adenylylcyclase / Proteinkinase A-Signalweg ausgelöst (ZHANG *et al.*, 2006).

Gleich welcher Mechanismus letztlich entscheidend ist, löst die Infektion eine Veränderung der Darmintegrität aus, die im ultimativen Stadium zum Eindringen von *B. thuringiensis*-Sporen in das Hämocoel führt, wo diese in das vegetative Stadium wechseln und sich vermehren können.

Nach oraler Infektion mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* konnten erhebliche Auswirkungen in *M. sexta*-Larven beobachtet werden. Die negative Wachstumsrate (Abbildung 4.44) und der Verlust des Körperturgors waren auf eine verminderte bzw. komplett eingestellte Nahrungsaufnahme nach der initialen Pathogenzufuhr zurückzuführen. Daneben war die peritrophische Membran des Darms labil oder zerstört. Es konnten jedoch im untersuchten Zeitraum (15 h) keine melanisierten Noduli im Hämocoel beobachtet werden, so dass geschlossen wurde, dass noch keine systemische Invasion zum Zeitpunkt der Probenentnahme vorlag. Bei einem weiteren Infektionsansatz wurden in zwei von vier Tieren Bakterienkolonien 15 Stunden nach der initialen *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*-Gabe

aus der Hämolymphe isoliert (Abbildung 4.45). Der verwendete Erreger war also potentiell in der Lage den Darm zu schädigen, um den Durchtritt der Darmflora in das Hämocoel zu gewährleisten. Ein direkter Kontakt der im Hämocoel liegenden Organe lag demnach bei den Versuchstieren, deren differentielle mRNA-Synthese untersucht wurde, wahrscheinlich nicht vor. Dennoch reagierten die Organe im Hämocoel, die nicht in direktem Kontakt mit dem Erreger kamen, sowie der Mitteldarm als direkte Kontaktzone mit Veränderungen der mRNA-Synthese immunrelevanter Gene, v. a. von *Lysozym* und *PGRP-1A*. Die *Scolexin A*-mRNA-Synthese wurde in den untersuchten Geweben nicht signifikant gesteigert. Bei einzelnen Messungen konnte eine erhöhte *Scolexin A*-mRNA-Synthese in Fettkörper und Mitteldarm gemessen werden, jedoch schwankten die Messwerte sehr stark zwischen den untersuchten Gruppen, so dass kein einheitliches Bild von diesen Reaktionen abzuleiten ist. Interessanterweise wurde jedoch das Scolexin-Protein in der Hämolymphe Bt-Toxin-gefütterter *M. sexta*-Larven gefunden (RUPP und SPENCE, 1985), was bereits ein Beleg für die Einbeziehung nicht darmassoziierten Organe bei der Bekämpfung einer Darminfektion ist. Möglicherweise wird die Scolexin A-Proteinsynthese sehr kurz nach dem ersten Pathogenkontakt induziert und der mRNA-Gehalt sinkt danach wieder ab, so dass im untersuchten Zeitraum keine signifikante Erhöhung der mRNA mehr nachweisbar war, obwohl das Protein in der Hämolymphe persistiert. Dass Gewebe, die nicht direkt darmassoziiert sind, an einer über das Darmepithel vermittelten Immunantwort beteiligt sind, spiegelt sich in ähnlicher Weise wie den hier dargelegten Ergebnissen in Studien mit *D. melanogaster*-Larven wieder die mit über den Verdauungskanal pathogen wirkenden Bakterien (*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* Stamm 15, BASSET *et al.*, 2000; *E. carotovora* ssp. *carotovora* Stamm 15 und *Pseudomonas entomophila*, VODOVAR *et al.*, 2005) gefüttert wurden. Die AMP-Synthese im Fettkörper sowie dem Darm ist bei diesen Tieren gesteigert (VODOVAR *et al.*, 2005). Eine Steigerung der Drosomycin- bzw. Diptericin-Synthese konnte sowohl nach Injektion als auch nach Fütterung mit *E. carotovora* ssp. *carotovora* Stamm 15 beobachtet werden (BASSET *et al.*, 2000). Der zur Stimulierung der nicht darmassoziierten Gewebe zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Es existieren zwei Erklärungsansätze, die voraussetzen, dass entweder eine direkte Passage von Peptidoglykanfragmente durch die Darmbarriere stattfindet, oder dass Stickstoffmonoxid (NO) als Signalvermittler fungiert (ROLFF und REYNOLDS, 2009). Studien mit RNAi-induzierter Defizienz des peptidoglykanspaltenden PGRP-LB lassen vermuten, dass Fragmente der Bakterienzellwand, so diese nicht zuvor durch PGRP-LB degradiert wurden, das Darmepithel durchdringen können und so eine systemische Antwort provozieren (MELLROTH *et al.*, 2003; ZAIDMAN-RÉMY *et al.*, 2006). Ein weiterer Weg vom Darmepithel ein Signal in das Hämocoel zu transduzieren läuft über NO (FOLEY und O'FARRELL, 2003). NO induziert über einen ungeklärten Mechanismus die Synthese des AMPs Diptericin, dessen Expression über

den Imd-Signaltransduktionsweg eingeleitet wird (NAPPI *et al.*, 2000). Über eine Darminfektion verursachte NO-Synthese sowie künstlich erzeugte NO-Radikale lösen die Synthese des Dipterins aus. Daran sind auch die Hämocyten und der Fettkörper als Syntheseorte beteiligt. Da NO als kleines Molekül leicht diffundiert, aber eine geringe Halbwertszeit besitzt (KELM, 1999; KOZLOV *et al.*, 2001), ist eine zumindest über kurze Distanzen (parakrine) bzw. endokrine Wirkung dieser Moleküle in *M. sexta* denkbar. NO ist deshalb gut geeignet um als Übermittler zwischen Darmepithel und im Hämocoel liegenden Organen zu dienen. Zur Klärung, welcher Weg zur Vermittlung des „Gefahrensignals“ vom Darm in das Hämocoel vorliegen sind mehrere Ansätze denkbar:

1. Könnte man die endogene NO-Synthese durch künstliche NO-Quellen imitieren und somit die Aktivierung des Immunsystems untersuchen,
2. könnte man bei gleichzeitiger Infektion und Gabe eines NO-Synthase-Inhibitors die Rolle des NOs klären oder den NO-Gehalt der Gewebe in Abhängigkeit von Infektionen messen, und
3. könnte man isoliertes, markiertes Peptidoglykan bzw. Fragmente davon und ggf. andere PAMPs verfüttern und deren Nachweis in der Hämolymphe tätigen.

Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch eine Kombination der Signalwege vorliegt. Außerdem ist es möglich, dass ein bisher unentdeckter Mechanismus zur Weiterleitung des Gefahrensignals existiert.

Die Lysozymaktivität und die anti-*E. coli* K12 D31-Aktivität der Hämolymphe waren nach der oralen *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* Infektion signifikant erhöht (Abbildung 4.46). Die erhöhte lytische Aktivität der Hämolymphe ist, wenn man die Ergebnisse der *real-time* qPCR-Analysen einbezieht, zumindest zum Teil auf die *de-novo*-Synthese von Lysozym zurückzuführen: Die *Lysozym*-mRNA-Transkription in Mitteldarm, Hämocyten und Fettkörper war nach der Gabe von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 4.47 A). Das hämatopoetische Organ reagierte bei diesem experimentellen Ansatz nicht mit einer signifikant erhöhten *Lysozym*-mRNA-Synthese. Über die Funktion und weitere Ergebnisse Lysozym betreffend wird in einem folgenden Absatz (5.2.2) diskutiert.

5.2.1.2 Systemische Infektion über *E. coli* K12-Injektion

Durch die Injektion von lebenden *E. coli* K12 in das Hämocoel von *M. sexta* Larven wurde eine systemische Infektion (Sepsis) simuliert, wie sie bspw. durch Verletzung des Integuments und Eindringen von Bakterien in das Hämocoel auftreten kann. *E. coli* besitzt ebenso wie *B. thuringiensis* eine DAP-Typ-PGN-haltige Zellwand wodurch eine ähnliche Immunreaktionen bei Kontakt des Immunsystems mit beiden Erregern zu erwarten ist (siehe Abschnitt 5.2.1).

Eine Injektion von *E. coli* K12 führte zu keiner signifikanten Reduktion der Wachstumsrate im Vergleich zu Saline injizierten Tieren (Abbildung 4.44). Auch konnte keine Veränderung des Körperturgors beobachtet werden und die Integrität der peritrophischen Membran war nicht beeinträchtigt. Bei der Präparation waren zahlreiche melanisierte Einschlüsse im Hämocoel zu finden. Dass 15 Stunden nach der Injektion noch lebende *E. coli* K12 im Hämocoel zu finden sind, konnte mit dem Bakterienisolationstest nachgewiesen werden. Diese Auswirkungen der systemischen Infektion unterschieden sich demnach von denen der Darminfektion mit *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*. Die Lysozymaktivität und anti-*E. coli* K12 D31-Aktivität war in *E. coli* K12-injizierten Tieren signifikant erhöht (Abbildung 4.46 A). Auch hier ist die erhöhte lytische Aktivität zumindest zum Teil durch *de-novo*-Synthese des Lysozyms zu erklären, da die *Lysozym*-mRNA-Konzentrationen in hämatopoetischen Organen, Hämocyten und Fettkörper signifikant erhöht sind, nicht jedoch im Mitteldarm.

Anders als bei einer Infektion über den Darm kam es also bei der systemischen Infektion nicht zu einer signifikant veränderten Synthese der beobachteten immunrelevanten Gene im Mitteldarm-epithel. Die im Hämocoel lokalisierten Organe reagierten jedoch auf ähnliche Weise wie bei der oralen Gabe von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* durch erhöhte *Lysozym*-mRNA-Synthese. Bei *Musca domestica* und *Aedes aegypti* wird die *Lysozym*-mRNA-Synthese im Darmgewebe in Antwort auf eine Infektion durch Injektion von Bakterien in das Hämocoel gesteigert (URSIC BEDOYA *et al.*, 2005; REN *et al.*, 2009). Dies steht im Kontrast zu den hier gezeigten Ergebnissen.

Als immunrelevantes Gen, dessen Transkription nicht signifikant durch die Darminfektion beeinflusst wurde, jedoch in hämatopoetischem Organ und Fettkörper bei der systemischen Infektion eine gesteigerte mRNA-Synthese aufwies, sei hier das *Scolexin A* genannt. Dieses zuerst als M13 benannte Protein wurde nach Injektion von Bakterien (HUGHES *et al.*, 1983) oder oraler Bt-Toxin-Gabe (RUPP und SPENCE, 1985) in der Hämolymphe von *M. sexta* nachgewiesen. Die Funktion von Scolexin ist noch nicht geklärt. Es wurde in einigen Arbeiten eine Beteiligung an der Koagulation nachgewiesen (MINNINCK *et al.*, 1986; KYRIAKIDES *et al.*, 1993). Dabei wird angenommen, dass eine *in silico* identifizierte, aber *in vitro* nicht nachgewiesene Serinproteasefunktion eine Rolle bei der Koagulation spielen könnte (FINNERTY *et al.*, 1999). Demgegenüber steht allerdings der Befund von FINNERTY und GRANADOS (1997), der besagt, dass durch eine Virusinfektion induziertes Scolexin keine koagulationsauslösende Wirkung hat. Ebenfalls passen Beobachtungen innerhalb der AG TRENCZEK zur Lokalisation des Scolexin-Proteins nicht unbedingt zu einer direkten oder hauptsächlichen Beteiligung an der Koagulation. So wurden zwar durch ein Immunserum gegen Scolexin Koagulationsfasern markiert (GÖKÇEN, 2010), daneben aber auch u. a. die apikale Seite des Mittel-

darms (TRENCZEK pers. Mitteilung) sowie die Oberfläche (evtl. die Basallamina) des hämatopoetischen Organs (Tabelle A.1). In *M. sexta* kommen zwei Scolexin Isoformen vor, Scolexin A und Scolexin B, wobei nicht bekannt ist, ob es sich um Zymogene oder aktive Formen handelt (FINNERTY *et al.*, 1999). *Scolexin A*-mRNA konnte in Hämozyten infizierter Tiere nachgewiesen werden, *Scolexin B*-mRNA jedoch nicht (GÖKÇEN, 2010), weshalb in der vorliegenden Studie nur die Synthese der für Scolexin A kodierenden mRNA untersucht wurde. Eventuell handelt es sich bei den beiden Formen auch um allelische Variationen eines Proteins (GÖKÇEN, 2010). Die enorme Steigerung der *Scolexin A*-mRNA-Synthese in Fettkörper und im hämatopoetischen Organ nach der Injektion von *E. coli* K12 (Abbildung 4.47 B) erklären sich demnach nicht aus einer bekannten Funktion heraus, stehen aber in Übereinstimmung mit den gesteigerten Scolexin-Konzentrationen, die in vorangegangenen Experimenten bei Infektionen mit verschiedenen Erregern und Verwundungsversuchen gemessen wurden (HUGHES *et al.*, 1983; RUPP und SPENCE, 1985; MINNINCK *et al.*, 1986; KYRIAKIDES *et al.*, 1993; FINNERTY *et al.*, 1999; GÖKÇEN, 2010). Ein *Scolexin A*-knockdown über RNAi beeinflusst überraschenderweise nicht die Nodulibildung und *Clearance* von injizierten Bakterien (GÖKÇEN, 2010). Ebenfalls verändert ein *knockdown* der *Scolexin A*-mRNA nicht die Expression anderer immunrelevanter Gene (GÖKÇEN, 2010). So ist eine Funktion als Vermittler nachgeschalteter Immunreaktionen unwahrscheinlich und die Rolle des Scolexins bleibt weiter rätselhaft.

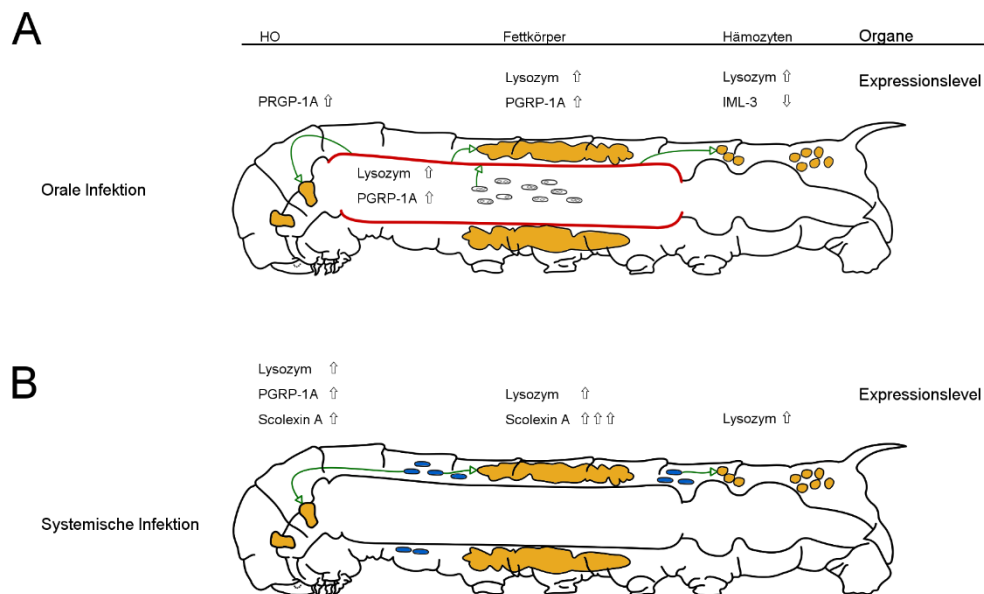


Abbildung 5.2: Die Auswirkungen oraler Infektion und systemischer Infektion auf die mRNA-Synthese immunrelevanter Gene in verschiedenen Organen im Vergleich.

A: Orale Applikation von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* führt zu veränderter Transkriptsynthese immunrelevanter Gene in allen untersuchten Organen. Die Transduktion des Gefahrensignals läuft über oder durch das Darmepithel.

B: Die systemische Infektion durch Injektion von *E. coli* K12 resultiert in erhöhter Transkriptsynthese immunrelevanter Gene in den hämatopoetischen Organen, im Fettkörper und in Hämocyten, nicht jedoch im Mitteldarm.

Leerer Pfeil nach oben = erhöhte mRNA-Synthese, leerer Pfeil nach unten = erniedrigte mRNA-Synthese, grüne Pfeile = auslösen erhöhter mRNA-Synthese im Zielorgan (orange bzw. rot).

5.2.1.3 mRNA-Synthese immunrelevanter Gene im hämatopoetischen Organ und dessen Rolle bei der Immunantwort

Es ist hervorzuheben, dass das hämatopoetische Organ von *M. sexta* bisher nicht auf seine Rolle bei der Immunantwort hin untersucht wurde. Auch in anderen Lepidoptera wurde bislang nicht die spezifische Reaktion des hämatopoetischen Organs in Hinsicht auf die Expression bekannter Immunfaktoren beschrieben. Die hier gezeigte Reaktion des hämatopoetischen Organs auf Immunstimuli sollte einen Impuls geben, dessen Rolle bei der Immunantwort in Zukunft in Untersuchungen mit einzubeziehen. Nicht zuletzt das Vorhandensein und die Induzierbarkeit von Lysozym als Vertreter der antimikrobiellen Peptide, sowie der Nachweis der für PGRP-1A kodierenden mRNA sprechen hierbei für eine aktive Rolle des hämatopoetischen Organs bei der Immunantwort. Dies lässt vermuten, dass neben einer Funktion als Bildungsort zellulärer Bestandteile des Immunsystems das hämatopoetische Organ auch an der Synthese und eventuell an der Sekretion von humoralen Faktoren beteiligt ist. Weiter kann man annehmen, dass die vom hämatopoetischen Organ in das Hämocoel entlassenen Hämocyten bereits im hämatopoetischen

Organ zur Synthese immunrelevanter Proteine befähigt sind. Folgende Fragen sollten in diesem Zusammenhang genauer untersucht werden:

1. Wird die Differenzierung und das Entlassen von Hämocyten in die Zirkulation durch Immunstimuli gesteigert? Hierzu eignen sich die hier präsentierten Marker für Hämocytentypen sowie die *in-vitro*-Kultur-Methode.
2. Findet die Synthese immunrelevanter Proteine bzw. deren mRNA in bestimmten Zonen statt und ist dies induzierbar? Dies kann mittels Immunfluoreszenz und *in-situ*-Hybridisierung untersucht werden.
3. Findet eine Sekretion von immunrelevanten Proteinen durch die Zellen des hämatopoetischen Organs statt? Über *in-vitro*-Kultur und Analyse der in Zellkultur sezernierten Faktoren (siehe zur Methode z. B. TRENCZEK und FAYE, 1988) könnten diese Faktoren isoliert und identifiziert werden. Ob diese Funktion von den sessilen, im hämatopoetischen Organ lokalisierten Zellen wahrgenommen wird oder erst durch in Zirkulation gehende Hämocyten ist dabei ebenfalls zu klären.

5.2.2 Lysozym im hämatopoetischen Organ und in den Hämocyten

Lysozym gehört zu den antimikrobiell wirkenden Peptiden. Seit der Entdeckung durch FLEMING (1922) in menschlichen Sekreten wurden Lysozyme in allen Stämmen der rezenten Lebewesen gefunden. Der antibakterielle Wirkmechanismus der Lysozyme, die Lyse von Peptidoglykan bakterieller Zellwände, wird nach neueren Erkenntnissen komplettiert durch nicht auf enzymatischen Funktionen basierenden bakteriziden Mechanismen (JOLLÈS, 1996; Review: MASSCHALK und MICHIELS, 2003). Neben einer Vielzahl anderer Gewebe können Insektenhämocyten antimikrobielle Peptide (AMPs), darunter auch Lysozym, beinhalten (ANDERSON und COOK, 1979; ZACHARY und HOFFMANN, 1984). Das in Vesikeln von Insektenhämocyten gespeicherte Lysozym ist einerseits in phagozytotischen Vesikeln nachgewiesen worden (ANDERSON und COOK, 1979) und wird andererseits im Falle einer Immunstimulation exozytiert und ist somit als Teil der humoralen Immunantwort zu werten (*Spodoptera eridania*: ANDERSON und COOK, 1979; *Locusta migratoria*: Zachary und HOFFMANN, 1984). Für *M. sexta* ist ein Lysozym charakterisiert worden, dieses gehört zu den sogenannten chicken-typ- (C-typ-) Lysozymen und dessen Synthese wird durch Infektionen induziert. Der Hauptsyntheseort ist hierbei der Fettkörper (MULNIX und DUNN, 1994).

Lysozym-mRNA konnte mittels *real-time* qPCR (Tabelle A.15) und RNA-*in-situ*-Hybridisierung, sowie das Lysozym-Protein über Immunfluoreszenzmarkierung in Hämocyten und hämatopoetischen Organen nachgewiesen werden (Abbildung 4.48).

Eine Western Blot-Analyse der Hämocyten und des hämatopoetischen Organs ergab eine Markierung einer Proteinbande durch anti-Lysozym-Immunsereum bei ca. 29 kDa (Abbildung 4.49). Dies entspricht nicht dem publizierten Gewicht von ca. 14 kDa für das *M. sexta*-Lysozym Monomer (SOTELO-MUNDO *et al.*, 2007), kann aber, eine leichte Ungenauigkeit der Größenbestimmung vorausgesetzt, der Größe eines Lysozymdimers (ca. 28 kDa) entsprechen. Warum keine monomere Form des Lysozyms im Western Blot markiert wurde bleibt offen, es ist laut vorhergehenden Untersuchungen unwahrscheinlich, dass ein anderes Protein dieser Größe mit dem verwendeten Antikörper markiert wird (TRENCZEK, pers. Mitteilung). Eventuell wurde bei der Präparation der Proben eine Dimerisierung des Lysozyms hervorgerufen, die jedoch durch denaturieren bei 96 °C im Lämmli-Puffer hätte aufgelöst werden können. Es ist bekannt, dass Hühnereiweißlysozym (HEWL) zu einem 28,6 kDa-Produkt unter Ausbildung verschiedener Nebenvaleanzbindungen dimerisiert. Zumindest schwach gebundene Dimere dissoziieren bei dem Prozess der SDS-PAGE (ONUMA und INAKA, 2007). Unter niedrigem pH kann es jedoch zu vermehrter HEWL-Dimer-Bildung kommen (WILSON *et al.*, 2002). Da TRIS-Puffer bei hoher Temperatur dazu neigen sauer zu werden (Abnahme des pK_s um 0,3 pro 1°C Temperaturerhöhung; EL-HARAKANY *et al.*, 1984) und die Proteinproben in (TRIS-gepuffertem) Lämmli-Puffer auf 96 °C erhitzt werden, ist eine Dimerisierung des Lysozymproteins durch diese Prozedur denkbar. Interessanterweise ist bei Arbeiten innerhalb der AG TRENCZEK ein ähnliches Phänomen bei der Analyse des Lysozyms im larvalen *M. sexta*-Darm aufgetreten: Mit Proben, die auf gleiche Weise wie die für diese Arbeit verwendeten aufbereitet wurden und verschiedenen anti-*H. cecropia*-Lysozym-Immunsereen (Chargen 43322 und 43601) traten markierte Banden bei ca. 33 kDa, 35 kDa und 16 kDa bzw. 18 kDa auf (NOTHACKER, pers. Mitteilung; NOTHACKER, 2016 unveröffentlicht). Bemerkenswert ist, dass Lysozym, welches in der Hämolymphe zu finden ist (sezerniertes Lysozym) von anti-*H. cecropia*-Antikörpern (Chargen 43322, 43324 und 43414) bei ca. 18 kDa markiert wurde, während ein gegen Hühnereiweißlysozym gerichtetes Immunsereum eine Bande bei ca. 34 kDa markiert (Abbildung A.10). Eine Erklärung für diese Unterschiede der Proteingrößen kann Dimerisierung sein (siehe zuvor), eine Weitere, dass andere Proteine als Lysozym markiert werden und eine dritte, dass mehrere Varianten des Lysozyms bzw. Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu Lysozym vorhanden sind. Ein Indiz für die zuletzt genannte Alternative ist der Nachweis der mRNA für ein Lysozym-ähnliches Protein im Mitteldarm von *M. sexta*-Larven (*lysozyme-like-protein 1*, PAUCHET *et al.*, 2010), welches jedoch ein vorhergesagtes Molekulargewicht von ca. 21 kDa hat. Auch ist es denkbar, dass intrazellulär

vorliegendes Lysozym als Dimer oder modifizierte Form des sezernierten Lysozyms gespeichert und durch die oder bei der Externalisierung verändert wird. Eventuell ist diese dimerisierte Form stabiler als spontan auftretende Dimere. Die Größenänderung durch abspalten des Signalpeptids bei der Freisetzung kann nicht für die dramatischen Größenunterschiede allein verantwortlich sein, dass Signalpeptid umfasst 18 Aminosäuren und würde einer Änderung des relativen Molekulargewichts von ca. 2 kDa entsprechen (MULNIX und DUNN, 1994). Eine zymogene Form des Lysozyms (Prolysozym), die für den beträchtlichen Größenunterschied verantwortlich sein kann, ist meines Wissens bei natürlich vorkommenden Lysozymen nicht bekannt.

Die durch anti-Lysozym-Immunseren markierten zytoplasmatischen Einschlüsse in Hämocyten und Zellen des hämatopoetischen Organs ähneln der beschriebenen intrazellulären Lokalisation von Lysozym in humanen Neutrophilen (CRAMER und BRETON-GORIUS, 1987) und im Fettkörper von *Harmonia axyridis* (BECKERT, 2015). Ob das in Hämocyten und hämatopoetischem Organ der *M. sexta*-Larven nachgewiesene (mutmaßliche) Lysozym-Protein ausschließlich auf endogene Proteinsynthese und -speicherung zurückzuführen ist, ist nicht abschließend geklärt, die nachgewiesene *Lysozym*-mRNA-Expression (Tabelle A.15, Abbildung 4.47 A, B) spricht in beiden Fällen dafür. Vorläufige Experimente zeigten, dass ein Homogenat aus hämatopoetischen Organen peptidoglykanspaltende Eigenschaften hat (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für das Vorhandensein von Lysozym im hämatopoetischen Organ.

Zusammengefasst wurde auf Proteinebene und mRNA-Ebene in hämatopoetischen Organen sowie Hämocyten Lysozym nachgewiesen. Die mRNA-Synthese wird durch Immunstimulation gesteigert (Abbildung 4.47). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass zumindest ein Teil des Lysozyms in Hämocyten und dem hämatopoetischen Organ endogen gebildet wird.

5.2.3 Ist das hämatopoetische Organ ein filtrierendes Organ?

Bei einigen Insektenarten, vornehmlich Vertretern der Orthoptera, ist das hämatopoetische Gewebe zuerst als phagozytäres Organ charakterisiert worden (CUÉNOT, 1895; NUTTING, 1951; HOFFMANN, 1970). Diese Gewebe liegen über Kanäle mit dem Dorsalgefäß verbunden vor und eine filtrierende Funktion kann über diese anatomische Gegebenheit erklärt werden (HOFFMANN, 1970). Die hämatopoetischen Gewebe der Lepidoptera kommunizieren nicht direkt über Kanäle mit dem Dorsalgefäß. Deshalb kann auf diesem Weg die Hämolymphe nicht aktiv durch das hämatopoetische Organ gelangen. Nichtsdestotrotz stehen die Zellen des hämatopoetischen Organs in direk-

tem Kontakt mit dem Hämocoel über die Öffnungen der Basallamina der distalen Oberfläche (Abbildung 4.6; NARDI *et al.*, 2003), so dass eine phagozytäre Leistung der sich dort befindenden „reifen“ Zellen mit plasmatozytentypischen oder -spezifischen Eigenschaften (Abbildungen 4.10 – 4.13; NARDI *et al.*, 2003) vorstellbar ist. Zur Klärung, ob die Zellen des hämatopoetischen Organs Fremdstoffe aufnehmen und so zur *Clearance* von Fremdstoffen beitragen, wurde in L5d1-Larven abgetötete FITC-markierte *E. coli* K12 D31 injiziert. Es konnte keine Aufnahme der Bakterien durch Zellen des hämatopoetischen Organs beobachtet werden. Die Injektionen resultierten in der Bildung von melanisierten Noduli im Hämocoel, die auch adhätierend an der Oberfläche des hämatopoetischen Organs nachgewiesen wurden. Jedoch konnten keine Bakterien in Zellen innerhalb des hämatopoetischen Organs nachgewiesen werden (Abbildung 4.50). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den hämatopoetischen Organen nicht um phagozytäre (bzw. filtrierende) Organe handelt. Inwiefern Zellen aus dem hämatopoetischen Organs in die Zirkulation rekrutiert werden, um Fremdkörper aufzunehmen wurde nicht untersucht. Denkbar ist dabei, dass die reifen Hämocyten des hämatopoetischen Organs dieses verlassen und an dessen Oberfläche Fremdstoffe aufnehmen oder einkapseln. Eine Untersuchung der *in-vitro*-gewonnenen Zellen des hämatopoetischen Organs in Bezug auf ihre Phagozytosekompetenz wurde bislang nicht beschrieben, könnte aber wertvolle Informationen zu Funktion und Differenzierungsgrad dieser Zellen generieren.

Der Nachweis einer für einen mutmaßlichen Phagozytoserezeptor (*Eater-like*-Protein) kodierenden mRNA in der distalen Zone des hämatopoetischen Organs spricht für eine Phagozytosekompetenz einiger, v. a. nahe der distalen Oberfläche lokalisierten, Zellen des hämatopoetischen Organs. Ebenso sind Zellen, die positiv für die plasmatozytenspezifische Integrin β -Untereinheit (MS13-Antigen) sind, v. a. im Bereich der distalen Oberfläche zu finden (Abbildung 4.10; NARDI *et al.*, 2003). Wird die Translation dieses Integrins über RNAi (LEVIN *et al.*, 2005) oder die Funktion durch Blockieren mittels Antikörperbindung (WIEGAND *et al.*, 2000) blockiert, resultiert das in einer reduzierten Nodulibildung als Antwort auf Fremdkörperkontakt. Weitere Untersuchungen, z. B. Injektion mit anorganischen Fremdstoffen (z. B. Kohlenstoffpartikel) oder Bestandteilen von Mikroorganismen (z. B. markiertes Lipopolysaccharid oder Peptidoglykanfragmente) wären geeignete Mittel um die Fähigkeit der Zellen des hämatopoetischen Organs zur Fremdstoff-*Clearance* weiter zu untersuchen.

5.3 Fazit

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften des hämatopoetischen Organs in Bezug auf Hämozytenbildung und der Rolle im Immungeschehen untersucht. Die Zellen des hämatopoetischen Organs konnten in Plasmatozyten und weitere, nicht durch Marker für bestimmte differenzierte Hämozyten markierbare Zellen unterschieden werden. *In vitro* differenzierten die Zellen des hämatopoetischen Organs nicht zu granulären Zellen, Oenozytoiden oder sphäkulen Zellen. Ebenso wenig konnten granuläre Zellen, Oenozytoide und sphäkulen Zellen im hämatopoetischen Organ nachgewiesen werden. Durch die Analyse spezifischer Markierungsmuster konnte eine Zellpopulation des hämatopoetischen Organs ausgewiesen werden, die als aus Progenitorzellen von Plasmatozyten bestehend interpretiert werden kann. Diese Zellpopulation weist mit PNA markierbare, glykosylierte Proteine in oder an der Zellmembran auf, die sich in Zellen des hämatopoetischen Organs *in situ* sowie nach Verlassen desselben *in vitro* finden lassen. Zellen mit ähnlichen zytometrischen Eigenschaften, die wie auch ein großer Teil der Zellen des hämatopoetischen Organs durch PNA an der Zellmembran markierbar waren, wurden in Zirkulation nachgewiesen. Die morphologischen und zytometrischen Eigenschaften dieser Zellen und der dem hämatopoetischen Organ entstammenden PNA-positiven Zellen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Prohämozyten. Um diese Zellpopulation als Stammzellen aller Hämozytentypen auszuweisen fehlen weiterhin eindeutige Belege. Das hämatopoetische Organ konnte als Ursprung dieser Vorläuferzellen belegt werden. Eine sich ständig erneuernde Population von Hämozyten bzw. Hämozytenprogenitoren kann aber durchaus, ohne den Ergebnissen zu widersprechen, auch frei im Hämocoel zirkulierend oder in nicht identifizierten sessilen hämatopoetischen Nischen vorliegen. Hierfür spricht die Markierbarkeit einiger dieser frei zirkulierender Zellen durch Antikörper, die keine direkt dem hämatopoetischen Organ entstammenden Zellen markieren.

Die Verteilung von verschiedenen, potentiellen Differenzierungsmarkern im hämatopoetischen Organ wurde untersucht und eine Zonierung festgestellt. Eine Unterteilung in einen proximalen Bereich mit mutmaßlichen Stammzellen oder ruhenden Zellen (die mit keinem der verwendeten Marker markiert werden können) und eine distale bzw. eine zentrale Zone, die weiter differenzierte Hämozyten aufweist (Plasmatozyten und Proplasmatozyten) wurde aus diesen Beobachtungen gefolgert. Die distal liegenden Zellen wanderten in hoher Zahl aus dem Organ aus, wenn dieses in Kultur genommen wurde. Diese Zellen konnten in adhäsionskompetente (entsprechend der Definition v. a. Plasmatozyten) und nicht adhäsionskompetente Zellen (evtl. Proplasmatozyten) unterteilt werden. Prinzipiell konnten sowohl adhärente als auch nicht-adhärente Zellen mit den gleichen plasmatozytenspezifischen bzw. plasmatozytentypischen Markern identifiziert werden. Beide

Fraktionen trugen stets das Epitop für den mAb MS75, während ein deutlich größerer Anteil der nicht-adhären Zellen positiv für PNA an der Zelloberfläche war.

Weiter wurde eine Auswahl an für *M. sexta* noch nicht beschriebenen Genen identifiziert und die Synthese der korrespondierenden mRNA in Hämocyten und hämatopoetischen Organen untersucht. Dies soll als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Dabei konnte die mRNA für einen Phagozytoserezeptor (Eater-like) in den distalen Zellen des hämatopoetischen Organs nachgewiesen werden, was die Hypothese der Differenzierungszonen im hämatopoetischen Organ stützt. Weiter konnte gezeigt werden, dass das hämatopoetische Organ in Antwort auf bakterielle Infektionen (Infektion mit *B. thuringiensis* bzw. Injektion von *E. coli*) mit gesteigerter mRNA-Synthese einiger immunrelevanter Gene reagiert. Für das antimikrobielle Peptid Lysozym konnte neben der gesteigerten mRNA-Synthese auch eine Lokalisierung der mRNA in Zellen des hämatopoetischen Organs sowie der Nachweis des Proteins mittels Antikörpermarkierung erbracht werden. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das hämatopoetische Organ eine Rolle bei der larvalen Hämatopoese innehat, dass differenzierte Plasmatozyten im Gegensatz zu allen anderen differenzierbaren Hämocytentypen im hämatopoetischen Organ nachweisbar sind, aber auch eine Verbindung zu allen anderen Hämocytentypen über den Nachweis PNA-positiver Membranzustrukturen nicht auszuschließen ist.

Die Zellen des hämatopoetischen Organs sind sensitiv für Immunstimuli und reagieren mit gesteigerter mRNA-Synthese von PGRP-1A (im Falle einer Darminfektion mit *B. thuringiensis*) oder zusätzlich gesteigerter mRNA-Synthese von Scolexin A und Lysozym (im Falle einer Injektion mit lebenden *E. coli* in das Hämocoel). Eine filtrierende Funktion, die zur Clearance von abgetöteten Bakterien führt, konnte für das hämatopoetische Organ nicht festgestellt werden.

6 Internetressourcen

AutoStitch, Download abrufbar unter <http://matthewalunbrown.com/autostitch/autostitch.html>, 12.08.2016

CDD The Conserved Domain Database, abrufbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>, 12.08.2016

CLC Sequence Viewer, Download abrufbar unter <http://clcbio.com>, 12.08.2016

Clustal W / Clustal X Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences, Download abrufbar unter <http://www.clustal.org/clustal2>, 12.08.2016

Clustal W2 Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences Onlinetool, abrufbar unter <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>, 12.08.2016

FlyBase A Database of Drosophila Genes & Genomes, abrufbar unter <http://www.flybase.org/>, 12.08.2016

Gimp 2.8.10, Download abrufbar unter <http://www.gimp.org/>, 12.08.2016

GlycoEP *in silico* Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences, abrufbar unter <http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/>, 12.08.2016

ImageJ 1.50e, Download abrufbar unter <http://imagej.nih.gov/ij>, 12.08.2016

Inkscape vector graphics editor download, Download abrufbar unter <http://www.inkscape.org>, 12.08.2016

InterPro: protein sequence analysis & classification, abrufbar unter <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, 12.08.2016

Manduca Base Agricultural Pest Genomics Resource Database, abrufbar unter <http://agripestbase.org/manduca/>, 12.08.2016

NCBI National Center for Biotechnology Information, abrufbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 12.08.2016

NCBI Tree Viewer, abrufbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/treeviewer/>, 12.08.2016

Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence, abrufbar unter <http://primer3.ut.ee/>, 12.08.2016

PSPP V 0.8.4, Download abrufbar unter <http://www.gnu.org/software/pspp>, 20.03.2015

The R Project for Statistical Computing, Download abrufbar unter <http://www.R-project.org>, 12.08.2016

TMHMM Server v. 2.0 Prediction of transmembrane helices in proteins, abrufbar unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, 12.08.2016

Vector map for PCR™ II plasmid, abrufbar unter https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcr_ii_map.pdf, 01.07.2016

7 Literaturverzeichnis

- ABRÀMOFF, M. D., MAGALHÃES, P. J. & RAM, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11** (7), 36–42.
- ABRAMS, J. M., WHITE, K., FESSLER, L. I. & STELLER, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117** (1), 29–43.
- AKAI, H. & SATO, S. (1976). Surface ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **5** (1), 17–21.
- AKAI, H. & SATO, S. (1971). An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **17** (9), 1665–1676.
- ALFONSO, T. B. & JONES, B. W. (2002). gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* **248** (2), 369–383.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3), 403–410.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25** (17), 3389–3402.
- ANDERSON, R. S. & COOK, M. L. (1979). Induction of lysozymelike activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eridania*. *Journal of Invertebrate Pathology* **33** (2), 197–203.
- ARGÔLO-FILHO, R. C. & LOGUERCIO, L. L. (2013). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects* **5** (1), 62–91.
- ARNOLD, J. W. (1982). Larval Hemocytes in Noctuidae (Insecta : Lepidoptera). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **11** (3/4), 173–188.
- ARNOLD, J. W. & HINKS, C. (1983). Haemopoiesis in Lepidoptera. III. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes. *Canadian Journal of Zoology* **61**, 275–277.
- ARNOLD, J. W. & HINKS, C. (1976). Haemopoiesis in Lepidoptera. I. The multiplication of circulating haemocytes. *Canadian Journal of Zoology* **54**, 1003–1012.
- ARVY, L. (1953). Données histologiques sur la leucopoièse chez quelque Lépidoptères. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **78**, 45–59.
- ARVY, L. (1952). Particularités histologiques des centres leucopoiétiques thoraciques chez quelques Lépidoptères. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* **235**, 1539–1541.
- ASADA, N., FUKUMITSU, T., FUJIMOTO, K. & MASADA, K. (1993). Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem and Molec Biol* **23**, 515–520.
- ASHHURST, D. E. (1982). Histochemical properties of the spherulocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **11**, 285–292.
- ASHIDA, M. & BREY, P. T. (1998). Recent advances in research on the insect Prophenoloxidase cascade. In: Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Brey, P. T. & Hultmark, D. (Eds.) (pp. 135 – 172). Chapman & Hall, London.
- ASHIDA, M., OCHIAI, M. & NIKI, T. (1988). Immunolocalization of Prophenoloxidase among Hemocytes of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue & Cell* **20**, 599–610.

- ATTRILL, H., FALLS, K., GOODMAN, J. L., MILLBURN, G. H., ANTONAZZO, G., REY, A. J., MARYGOLD, S. J. & the FlyBase consortium** (2016). FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* **44** (D1), D786-D792.
- BALCZUN, C., KNORR, E., TOPAL, H., MEISER, C. K., KOLLIEN, A. H. & SCHAUB, G. A.** (2008). Sequence characterization of an unusual lysozyme gene expressed in the intestinal tract of the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta). *Parasitology Research* **102** (2), 229–232.
- BALL, E., DE COUET, H., HORN, P. & QUINN, J.** (1987). Haemocytes secrete basement membrane components in embryonic locusts. *Development* **99** (2), 255–259.
- BARILLAS-MURY, C., CHARLESWORTH, A., GROSS, I., RICHMAN, A., HOFFMANN, J. A., & KAFATOS, F. C.** (1996). Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *The EMBO Journal*, **15**(17), 4691–4701.
- BASSET, A., KHUSH, R. S., BRAUN, A., GARDAN, L., BOCCARD, F., HOFFMANN, J. A. & LEMAITRE, B.** (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (7), 3376–3381.
- BEAULATON, J.** (1980). Effets de l'ablation des organes hématopoiétique et de ligatures sur l'évolution de l'hémocytogramme différentiel chez *Antheraea pernyi* (Lépidoptère) au dernier âge larvaire. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série D, Sciences naturelles* **290**, 247–250.
- BEAULATON, J. & MONPEYSSIN, M.** (1976). Ultrastructure et cytochimie des hémocytes d'*Antheraea pernyi*. (Lepidoptera, Attacidae) au cours du cinquième âge larvaire. I. Prohémocytes, plasmatocytes et granulocytes. *Journal of Ultrastructure Research* **55** (2), 143–156.
- BECKERT, A.** (2015). Molekulare Charakterisierung von c-Typ- und i-Typ-Lysozymen des Asiatischen Marienkäfers *Harmonia axyridis*. Doktorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- BEETZ, S.** (2002). Vergleichende Untersuchungen zum Hämocytenbild von Larve und Puppe des Tabakswärmers *Manduca sexta* L. Doktorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- BEETZ, S., BRINKMANN, M. & TRENCZEK, T.** (2004). Differences between larval and pupal hemocytes of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, determined by monoclonal antibodies and density centrifugation. *Journal of Insect Physiology* **50** (9), 805–819.
- BEETZ, S., HOLTHUSEN, T. K., KOOLMAN, J. & TRENCZEK, T.** (2008). Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **67** (2), 63–75.
- BERNARDONI, R., VIVANCOS, V. & GIANGRANDE, A.** (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Developmental Biology* **191** (1), 118–130.
- BERTANI, G.** (1951). Studies on Lysogenesis I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62** (3), 293–300.
- BHAVE, G., CUMMINGS, C. F., VANACORE, R. M., KUMAGAI-CRESSE, C., ERO-TOLLIVER, I. A., RAFI, M., KANG, J.-S., PEDCHENKO, V., FESSLER, L. I., FESSLER, J. H. & HUDSON, B. G.** (2012). Peroxidasin forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nat Chem Biol* **8** (9), 784–790.
- BIDLA, G., DUSHAY, M. S., THEOPOLD, U.** (2007). Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *Journal of Cell Science* **120**, 1209–1215.
- BOLLENBACHER, W. E., SMITH, S. L., GOODMAN, W. & GILBERT, L. I.** (1981). Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* **44** (3), 302–306.
- BOMAN, H. G., FAYE, I., GUDMUNDSSON, G. H., LEE, J. Y. & LIDHOLM, D. A.** (1991). Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem* **201** (1), 23–31.

- BOMAN, H. G. & MONNER, D. A.** (1975). Characterization of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* K-12 mutants. *Journal of Bacteriology* **121** (2), 455–464.
- VON BREDOW, C.-R.** (2010). Immunhistologische Untersuchungen des hämatopoetischen Organs von *Manduca sexta*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für allgemeine und spezielle Zoologie.
- VON BREDOW, C.-R. & TRENCZEK, T.** (2011). (Immuno-)histochemical Characterisation of Hematopoietic Organs in *Manduca sexta* (L. 1763). Posterabstract in *Deutsche Zoologische Gesellschaft - German Zoological Society - 104th Annual Meeting in Saarbrücken*, 51.
- BREHÉLIN, M.** (1973). Presence d'un tissu hématopoiétique chez le Coléoptère *Melolontha melolontha* (L.). *Experientia* **29** (12), 1539–1540.
- BRETSCHER, A., HONTI, V., BINGGELI, O., BURRI, O., POIDEVIN, M., KURUCZ, E., ZSÁMBOKI, J., ANDÓ, I. & LEMAITRE, B.** (2015). The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biology open* **4** (3), 355–363.
- BRISTOW, J., TEE, M. K., MELLON, S. H. & MILLER, W. L.** (1993). Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol* **122** (2), 265–278.
- CALLAERTS, P., VULSTEKE, V., LOOF, A. & PEUMANS, W.** (1995). Lectin binding sites during *Drosophila* embryogenesis. *Roux's archives of developmental biology* **204** (4), 229–243.
- CERENIUS, L. & SÖDERHÄLL, K.** (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* **198**, 116–126.
- CHAUHAN, J. S., RAO, A. & RAGHAVA, G. P. S.** (2013). *In silico* Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE* **8** (6), 1–10.
- CHEN, C.-L., LAMPE, D., ROBERTSON, H. & NARDI, J.** (1997). Neuroglial Is Expressed on Cells Destined to Form the Prothoracic Glands of *Manduca* Embryos as They Segregate from Surrounding Cells and Rearrange during Morphogenesis. *Dev Biol* **181**, (1), 1–13.
- CHUNG, K.-H. & MOON, M.-J.** (2004). Fine Structure of the Hemopoietic Tissues in the Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. *Entomological Research* **34** (2), 131–138.
- CLARK, K. D., PECH, L. L. & STRAND, M. R.** (1997). Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *J Biol Chem* **272** (37), 23440–23447.
- CLARK, K. D., WITHERELL, A. & STRAND, M. R.** (1998). Plasmatocyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*. *Biochem Biophys Res Commun* **250** (2), 479–485.
- COOPER, M. D. & ALDER, M. N.** (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124** (4), 815–822.
- CRAMER, E. M. & BRETON-GORIUS, J.** (1987). Ultrastructural localization of lysozyme in human neutrophils by immunogold. *J Leukoc Biol* **41** (3), 242–247.
- CROSSLEY, A. C. S.** (1964). An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the blue blow-fly *Calliphora erythrocephala*, (Meig). *Journal of Experimental Zoology* **157** (3), 375–397.
- CROZATIER, M. & MEISTER, M.** (2007). *Drosophila* haematopoiesis. *Cellular Microbiology* **9** (5), 1117–1126.
- CUÉNOT, L.** (1895). Études physiologiques sur les Orthoptères. *Archives de Biologie* **14**, 293–341.
- DEAN, P., POTTER, U., RICHARDS, E. H., EDWARDS, J. P., CHARNLEY, A. K. & REYNOLDS, S. E.** (2004). Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *J Insect Physiol* **50** (11), 1027–1036.
- DUDZIC, J. P., KONDO, S., UEDA, R., BERGMAN, C. M. & LEMAITRE, B.** (2015). *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biology* **13** (1), 1–16.

- DYBALLA, N. & METZGER, S. (2009). Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (30), 1431.
- DYGAI, A. & ZHDANOV, V. (2014). Theory of Hematopoiesis Control, Vol. 5. *Springer International Publishing*.
- DZIARSKI, R. & GUPTA, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biology* **7** (8), 232–232.
- EIDE, P., CALDWELL, J. & MARKS, E. (1975). Establishment of two cell lines from embryonic tissue of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *In vitro* **11** (6), 395–399.
- ELEFThERIANOS, I., XU, M., YADI, H., FFRENCH-CONSTANT, R. H. & REYNOLDS, S. E. (2009). Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *J Exp Biol* **212** (Pt 12), 1840–1848.
- EL-HARAKANY, A. A., ABDEL HALIM, F. M. & BARAKAT, A. O. (1984). Dissociation constants and related thermodynamic quantities of the protonated acid form of tris-(hydroxymethyl)-aminomethane in mixtures of 2-methoxyethanol and water at different temperatures. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **162** (1-2), 285-305.
- EVANS, C. & BANERJEE, U. (2003). Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. *Blood cells, molecules & diseases* **30** (2), 223–228.
- FERJOUX, G., AUGÉ, B., BOYER, K., HAENLIN, M. & WALTZER, L. (2007). A GATA/RUNX cis-regulatory module couples *Drosophila* blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Developmental Biology* **305** (2), 726–734.
- FESSLER, J. H. & FESSLER, L. I. (1989). *Drosophila* extracellular matrix. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 309–339.
- FINNERTY, C. M. & GRANADOS, R. R. (1997). The Plasma Protein Scolexin from *Manduca sexta* is Induced by Baculovirus Infection and Other Immune Challenges. *Insect Biochem. Biol.* **27** (1), 1–7.
- FINNERTY, C. M., KARPLUS, P. A. & GRANADOS, R. R. (1999). The insect immune protein scolexin is a novel serine proteinase homolog. *Protein Sci* **8** (1), 242–248.
- FITZGEORGE, R. B., SOLOTOROVSKY, M. & SMITH, H. (1967). The behaviour of *Brucella abortus* within macrophages separated from the blood of normal and immune cattle by adherence to glass. *British Journal of Experimental Pathology* **48** (5), 522–528.
- FLEMING, A. (1922). On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **93** (653), 306–317.
- FOLEY, E. & O'FARRELL, P. H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Development* **17** (1), 115–125.
- FRANC, N. C., DIMARCO, J. L., LAGUEUX, M., HOFFMANN, J. & EZEKOWITZ, R. A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4** (5), 431–443.
- FRANC, N. C., HEITZLER, P., EZEKOWITZ, R. A. & WHITE, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284** (5422), 1991–1994.
- FRANCOIS, J. (1975). Hémocytes et organe hématopoïétique de *Thermobia domestica* (Packard) (Thysanura: Lepismatidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **4** (6), 477–494.
- GARDINER, E. & STRAND, M. (2000). Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **43** (4), 147–164.
- GARDINER, E. M. & STRAND, M. R. (1999). Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *J Insect Physiol* **45** (2), 113–126.

- GHOSH, S., SINGH, A., MANDAL, S. & MANDAL, L.** (2015). Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev Cell* **33** (4), 478–488.
- GILLESPIE, J. P., KANOST, M. R. & TRENCZEK, T.** (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* **42**, 611–643.
- GÖKÇEN, F.** (2010). Untersuchungen zu den immunrelevanten Hämolympheproteinen Hämolin und Scolexin des Amerikanischen Tabakswärmers *Manduca sexta* (L.). Doktorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- GONZÁLEZ-SANTOYO, I. & CÓRDOBA-AGUILAR, A.** (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142** (1), 1–16.
- GRIGORIAN, M., LIU, T., BANERJEE, U. & HARTENSTEIN, V.** (2013). The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol* **384** (2), 301–312.
- GRIGORIAN, M., MANDAL, L. & HARTENSTEIN, V.** (2011). Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Dev Genes Evol* **221** (3), 121–131.
- GRISHIN, N. V.** (1997). Estimation of evolutionary distances from protein spatial structures. *J Mol Evol* **45** (4), 359–369.
- GUPTA, A. P.** (1979). Hemocyte types: Their structure, Synonymies, Interrelationships and Taxonomic Significance. in: *Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques*. A. P. Gupta (ed.), (pp. 83–127). Cambridge University Press.
- HALL, M., SCOTT, T., SUGUMARAN, M., SÖDERHÄLL, K. & LAW, J. H.** (1995). Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (17), 7764–7768.
- HAMADA, S. & FUJITA, S.** (1983). DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* **79** (2), 219–226.
- HAN, S.-S., LEE, M.-H., KIM, W.-K., WAGO, H. & YOE, S.-M.** (1998). Hemocytic Differentiation in Hemopoietic Organ of *Bombyx mori* Larvae. *Zoological Science* **15** (3), 371–379.
- HANAHAN, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166** (4), 557–580.
- HANCOCK, V., MARTIN, J. F. & LELCHUK, R.** (1993). The relationship between human megakaryocyte nuclear DNA content and gene expression. *British Journal of Haematology* **85** (4), 692–697.
- HARLOW, E. & LANE, D.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HENIKOFF, S. & HENIKOFF, J. G.** (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (22), 10915–10919.
- HINKS, C. F. & ARNOLD, J. W.** (1977). Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of the haemopoietic organs. *Canadian Journal of Zoology* **55** (10), 1740–1755.
- HOFFMANN J. A.** (1973). Blood-Forming Tissues in Orthopteran Insects: An Analogue to Vertebrate Hemopoietic Organs. *Experientia* **29**, 50–51.
- HOFFMANN J. A.** (1970). Les organes hématopoiétiques de deux insectes orthoptères : *Locusta migratoria* et *Gryllus bimaculatus*. *Zeitschrift für Zellforschung* **106**, 451–472.
- HOFFMANN, J. A.** (1995). Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* **7** (1), 4–10.
- HOLZ, A., BOSSINGER, B., STRASSER, T., JANNING, W. & KLAPPER, R.** (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* **130**, 4955–4962.

- HONTI, V., CSORDÁS, G., MÁRKUS, R., KURUCZ, E., JANKOVICS, F. & ANDÓ, I. (2010). Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol Immunol* **47** (11-12), 1997–2004.
- HONTI, V., KURUCZ, É., CSORDÁS, G., LAURINYEZ, B., MÁRKUS, R. & ANDÓ, I. (2009). *In vivo* detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters* **126** (1-2), 83–84.
- HOROHOV, D. W. & DUNN, P. E. (1983). Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Invertebrate Pathology* **41** (2), 203–213.
- HOROHOV, D. W. & DUNN, P. E. (1982). Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* **40** (3), 327–339.
- HUGHES, J. A., HURLBERT, R. E., RUPP, R. A. & SPENCE, K. D. (1983). Bacteria-induced haemolymph proteins of *Manduca sexta* pupae and larvae. *Journal of Insect Physiology* **29** (8), 625–632.
- HULTMARK, D. (1993). Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends in Genetics* **9** (5), 178–183.
- IWAMA, R. & ASHIDA, M. (1986). Biosynthesis of Prophenoloxidase in Hemocytes of larval Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry* **16**, 547–555.
- İZZETOĞLU, S. (2012). A new approach for classification of major larval hemocytes (prohemocytes, plasmatocytes and granulocytes) in the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) by acridine orange staining. *Turkish Journal of Entomology* **36** (2).
- JENKINS, J. L., LEE, M. K., VALAITIS, A. P., CURTISS, A. & DEAN, D. H. (2000). Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J Biol Chem* **275** (19), 14423–14431.
- JIANG, H., MA, C., LU, Z.-Q. & KANOST, M. R. (2004). beta-1,3-Glucan recognition protein-2 (βGRP-2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds β-1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34** (1), 89–100.
- JIANG, H., WANG, Y., MA, C. & KANOST, M. (1997). Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect biochemistry and molecular biology* **27** (10), 835–850.
- JIRAVANICHPAISAL, P., LEE, S. Y., KIM, Y.-A., ANDRÉN, T. & SÖDERHÄLL, I. (2007). Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Developmental & Comparative Immunology* **31** (5), 441–455.
- JOLLÈS, P. (1996). *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Birkhauser Verlag Basel.
- JONES, J. C. (1962). Current concepts concerning insect hemocytes. *American Zoologist* **2** (2), 209–246.
- JONES, J. C. & LIU, D. P. (1968). A quantitative study of mitotic divisions of haemocytes of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology* **14** (8), 1055–1061.
- JONES, J. C. & LIU, D. P. (1969). The effects of ligaturing *Galleria mellonella* larvae on total haemocyte counts and on mitotic indices among haemocytes. *Journal of Insect Physiology* **15** (10), 1703–1708.
- JOO, K. O., MUN, J. Y., LEE, K. E., YU, C. H., KANG, S. W., SEO, Y. R. & HAN, S. S. (2004). Three-Dimensional Reconstruction of Hematopoietic Organ of *Bombyx mori* Larva. *Entomological Research* **34** (4), 291–298.
- JUNG, S.-H., EVANS, C. J., UEMURA, C. & BANERJEE, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132** (11), 2521–2533.
- KANEKO, T., GOLENBOCK, D. & SILVERMAN, N. (2005). Peptidoglycan recognition by the *Drosophila* Imd pathway. *J Endotoxin Res* **11** (6), 383–389.

- KANOST, M. R., JIANG, H. & YU, X.-Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews* **198** (1), 97–105.
- KELM, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1411** (2–3), 273–289.
- KINGAN, S. L. & ENSIGN, J. C. (1968). Chemical composition of the cell wall of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J Bacteriol* **95** (2), 724–726.
- KOCKS, C., CHO, J., NEHME, N., ULVILA, J., PEARSON, A., MEISTER, M., STROM, C., CONTO, S., HETRU, C., STUART, L., STEHLE, T., HOFFMANN, J., REICHHART, J., FERRANDON, D., RÄMET, M. & EZEKOWITZ, R. (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* **123** (2), 335–346.
- KORESSAAR, T. & REMM, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23** (10), 1289–1291.
- KOZIŚNIK, A. (2011). *Histologische und histochemische Analysen zur zellulären Immunität von Manduca sexta*. Bachelor Thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- KOZLOV, A. V., SOBHIAN, B., COSTANTINO, G., NOHL, H., REDL, H. & BAHRAMI, S. (2001). Experimental evidence suggesting that nitric oxide diffuses from tissue into blood but not from blood into tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1536** (2–3), 177–184.
- KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G. & SONNHAMMER, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305** (3), 567–580.
- KRZEMIEN, J., OYALLON, J., CROZATIER, M. & VINCENT, A. (2010). Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Developmental Biology* **346** (2), 310–319.
- KÜHNEL, Y. (2010). Identifizierung von Hämozyten in *Manduca sexta* Embryonen. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für allgemeine und spezielle Zoologie.
- KURUCZ, É., VÁCZI, B., MÁRKUS, R., LAURINYEZ, B., VILMOS, P., ZSÁMBOKI, J., CSORBA, K., GATEFF, E., HULTMARK, D. & ANDÓ, I. (2007). Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biologica Hungarica* **58** (Supplement 1), 95–111.
- KURUCZ, E., ZETTERVALL, C.-J., SINKA, R., VILMOS, P., PIVARCSI, A., EKENGREN, S., HEGEDÜS, Z., ANDO, I. & HULTMARK, D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** (5), 2622–2627.
- KUSCHE-GULLBERG, M., GARRISON, K., MACKRELL, A. J., FESSLER, L. I. & FESSLER, J. H. (1992). Laminin A chain: expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *EMBO J* **11** (12), 4519–4527.
- KYRIAKIDES, T. R., BEDOYAN, J. K., PATIL, C. S. & SPENCE, K. D. (1993). In vivo distribution of immune protein scolexin in bacteria-injected *Manduca sexta* larvae. *Tissue Cell* **25** (3), 423–434.
- KYRIAKIDES, T. R., MCKILLIP, J. L. & SPENCE, K. D. (1995). Biochemical Characterization, Developmental Expression, and Induction of the Immune Protein Scolexin From *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 269–280.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680–685.
- LANOT, R., ZACHARY, D., HOLDER, F. & MEISTER, M. (2001). Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology* **230** (2), 243–257.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** (21), 2947–2948.

- LAVINE, M. D. & STRAND, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* **32** (10), 1295–1309.
- LEBESTKY, T., JUNG, S.-H. & BANERJEE, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes & Development* **17** (3), 348–353.
- LEE, H. O., DAVIDSON, J. M. & DURONIO, R. J. (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development* **23** (21), 2461–2477.
- LEITÃO, A. B. & SUCENA, É. (2015). *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *eLife* **4**, e06166.
- LEMAITRE, B., KROMER-METZGER, E., MICHAUT, L., NICOLAS, E., MEISTER, M., GEORGEL, P., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92** (21), 9465–9469.
- LESCH, C. (2005). Untersuchungen zu möglichen Bindungs- und Aktivierungsfaktoren der zellulären Immunantwort bei *Manduca sexta* L. Doktorarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- LEVIN, D. M., BREUER, L. N., ZHUANG, S., ANDERSON, S. A., NARDI, J. B. & KANOST, M. R. (2005). A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35** (5), 369–380.
- LIN, X., SÖDERHÄLL, K. & SÖDERHÄLL, I. (2011). Invertebrate hematopoiesis: an astakine-dependent novel hematopoietic factor. *J Immunol* **186** (4), 2073–2079.
- LIN, X. & SÖDERHÄLL, I. (2011). Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood* **117** (24), 6417–6424.
- LING, E., AO, J. & YU, X.-Q. (2008). Nuclear translocation of immulectin-3 stimulates hemocyte proliferation. *Mol Immunol* **45** (9), 2598–2606.
- LING, E., SHIRAI, K., KANEHATSU, R. & KIGUCHI, K. (2005). Reexamination of phenoloxidase in larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell* **37** (2), 101–107.
- LING, E. & YU, X.-Q. (2006). Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Developmental & Comparative Immunology* **30** (3), 301–309.
- LING, E. & YU, X.-Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35** (12), 1356–1366.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25** (4), 402–408.
- LOCCI, M., MASETTI, M., CECCHETTINI, A. & GIORGI, F. (1998). Cells released *in vitro* from the embryonic yolk sac of the stick insect *Carausius morosus* (BR.) (PHASMATODEA : HETERONEMIIDAE) may include embryonic hemocytes. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **27** (4), 325–331.
- LOCKE, M. (1997). Caterpillars have evolved lungs for hemocyte gas exchange. *J Insect Physiol* **44** (1), 1–20.
- LORENCE, A., DARSZON, A., DÍAZ, C., LIÉVANO, A., QUINTERO, R. & BRAVO, A. (1995). δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Letters* **360** (3), 217–222.
- LORET, S. M. & STRAND, M. R. (1998). Follow-up of protein release from *Pseudoplusia includens* hemocytes: a first step toward identification of factors mediating encapsulation in insects. *Eur J Cell Biol* **76** (2), 146–155.
- LOTAN, R., SKUTELSKY, E., DANON, D. & SHARON, N. (1975). The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Biological Chemistry* **250** (21), 8518–23.

- LU, A., ZHANG, Q., ZHANG, J., YANG, B., WU, K., XIE, W., LUAN, Y.-X., LING, E.** (2014). Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in Physiology* **5** (252), 1–15.
- MA, C. & KANOST, M. R.** (2000). A beta-1,3-Glucan Recognition Protein from an Insect, *Manduca sexta*, Agglutinates Microorganisms and Activates the Phenoloxidase Cascade. *Journal of Biological Chemistry* **275** (11), 7505–7514.
- MANAKA, J., KURAISHI, T., SHIRATSUCHI, A., NAKAI, Y., HIGASHIDA, H., HENSON, P. & NAKANISHI, Y.** (2004). Draper-mediated and Phosphatidylserine-independent Phagocytosis of Apoptotic Cells by *Drosophila* Hemocytes / Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **279** (46), 48466–48476.
- MANDAL, L., BANERJEE, U. & HARTENSTEIN, V.** (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* **36** (9), 1019–1023.
- MANDAL, L., MARTINEZ-AGOSTO, J. A., EVANS, C. J., HARTENSTEIN, V. & BANERJEE, U.** (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* **446** (7133), 320–324.
- MANN, G.** (1992). Das Immunsystem der Insekten: Untersuchungen zur Induktion der humoralen Immunantwort bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* (Lepidoptera). Doktorarbeit, Universität des Saarlandes.
- MARCHLER-BAUER, A., ZHENG, C., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., GEER, L. Y., GEER, R. C., GONZALES, N. R., GWADZ, M., HURWITZ, D. I., LANCZYCKI, C. J., LU, F., LU, S., MARCHLER, G. H., SONG, J. S., THANKI, N., YAMASHITA, R. A., ZHANG, D. & BRYANT, S. H.** (2012). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research* **41** (Database issue), D348–D352.
- MÁRKUS, R., LAURINYEZ, B., KURUCZ, ÉV., HONTI, V., BAJUSZ, I., SIPOS, B., SOMOGYI, K., KRONHAMN, J., HULTMARK, D. & ANDÓ, I.** (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (12), 4805–4809.
- MASEK, T., VOPALENSKY, V., SUCHOMELOVA, P. & POSPISEK, M.** (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry* **336** (1), 46–50.
- MATSUMOTO, Y., ODA, Y., URYU, M. & HAYAKAWA, Y.** (2003). Insect Cytokine Growth-blocking Peptide Triggers a Termination System of Cellular Immunity by Inducing Its Binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **278** (40), 38579–38585.
- MCMMASTER, G. K. & CARMICHAEL, G. G.** (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** (11), 4835–4838.
- MCQUILTON, P., ST PIERRE, S. E., THURMOND, J. & THE FLYBASE CONSORTIUM** (2012). FlyBase 101 – the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acid Research* **40**, 706–714.
- MELLROTH, P., KARLSSON, J. & STEINER, H.** (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem* **278** (9), 7059–7064.
- MILLER, J.** (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- MILTENBURGER, H. G., DAVID, P., MAHR, U. & ZIPP, W.** (1976). Über die Erstellung von Lepidopteren-Dauerzelllinien und die in vitro-Replikation von insektenpathogenen Viren. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **82** (1–4), 306–325.

- MITCHELL, A., CHANG, H.-Y., DAUGHERTY, L., FRASER, M., HUNTER, S., LOPEZ, R., MCANULLA, C., MCMENAMIN, C., NUKA, G., PESSEAT, S., SANGRADOR-VEGAS, A., SCHEREMETJEW, M., RATO, C., YONG, S.-Y., BATEMAN, A., PUNTA, M., ATTWOOD, T. K., SIGRIST, C. J., REDASCHI, N., RIVOIRE, C., XENARIOS, I., KAHN, D., GUYOT, D., BORK, P., LETUNIC, I., GOUGH, J., OATES, M., HAFT, D., HUANG, H., NATALE, D. A., WU, C. H., ORENGO, C., SILLITOE, I., MI, H., THOMAS, P. D. & FINN, R. D. (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research* **43** (D1), D213-D221.
- MITSUHASHI, J. (1972). Primary Culture of the Haemocytopoietic Tissue of *Papilio xuthus* LINNE. *Applied entomology and zoology* **7** (1), 39–41.
- MULNIX, A. B. & DUNN, P. E. (1994). Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* **24** (3), 271–281.
- MURPHY, K., TRAVERS, P. & WALPORT, M. (2009). *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- NAPPI, A. J., VASS, E., FREY, F. & CARTON, Y. (2000). Nitric Oxide Involvement in Drosophila Immunity. *Nitric Oxide* **4** (4), 423–430.
- NAPPI, A. J., VASS, E., FREY, F. & CARTON, Y. (1995). Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* **68**, 450–456.
- NARDI, J. B. (2004). Embryonic origins of the two main classes of hemocytes - granular cells and plasmatocytes - in *Manduca sexta*. *Development Genes and Evolution* **214** (1), 19–28.
- NARDI, J. B. (1993). Modulated expression of a surface epitope on migrating germ cells of *Manduca sexta* embryos. *Development* **118** (3), 967–975.
- NARDI, J. B., BEE, C. M., MILLER, L. A., IMAI, B. S. & YAU, P. M. (2016). Segmental pairs of giant insect cells discharge presumptive immune proteins at each larval molt. *Dev Biol*.
- NARDI, J. B., GAO, C. & KANOST, M. R. (2001). The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. *Journal of Insect Physiology* **47** (9), 997–1006.
- NARDI, J. B., MARTOS, R., WALDEN, K. K., LAMPE, D. J. & ROBERTSON, H. M. (1999). Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29** (10), 883–897.
- NARDI, J. B. & MIKLASZ, S. D. (1989). Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tissue and Cell* **21** (4), 559–567.
- NARDI, J. B., PILAS, B., BEE, C. M., ZHUANG, S., GARSHA, K. & KANOST, M. R. (2006). Neuroglial-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. *Developmental & Comparative Immunology* **30** (5), 447–462.
- NARDI, J. B., PILAS, B., UJHELYI, E., GARSHA, K. & KANOST, M. R. (2003). Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Dev Genes Evol* **213** (10), 477–491.
- NASSIR, F., WILSON, B., HAN, X., GROSS, R. W. & ABUMRAD, N. A. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* **282** (27), 19493–19501.
- NELSON, R. E., FESSLER, L. I., TAKAGI, Y., BLUMBERG, B., KEENE, D. R., OLSON, P. F., PARKER, C. G. & FESSLER, J. H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. *EMBO J* **13** (15), 3438–3447.
- NIITSU, S., LOBBIA, S., IZUMI, S. & FUJIWARA, H. (2008). Female-specific wing degeneration is triggered by ecdysteroid in cultures of wing discs from the bagworm moth, *Eumeta variegata* (Insecta: Lepidoptera, Psychidae). *Cell and Tissue Research* **333** (1), 169–173.
- NITTONO, Y., TOMABECHI, S. & ONODERA, N. (1964). Total haemocyte counts from the larvae and moths cauterized on their imaginal wing discs and the neighboring parts in their larval stage. *18th Sericult Congr jpn Sericult Soc*.

- NOTHACKER, J.** (2016). Morphologische und immunologische Kategorisierung des *Manduca sexta* Mitteldarms. Master Thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- NUTTING, W. L.** (1951). A comparative anatomical study of the heart and accessory structures of the orthopteroid insects. *Journal of Morphology* **89** (3), 501–597.
- OCHIAI, M. & ASHIDA, M.** (1988). Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **263** (24), 12056–12062.
- OCHIAI, M., NIKI, T. & ASHIDA, M.** (1992). Immunocytochemical localization of beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res* **268** (3), 431–437.
- ONUMA, K. & INAKA, K.** (2008). Lysozyme dimer association: Similarities and differences compared with lysozyme monomer association. *Journal of Crystal Growth* **310** (6), 1174–1181.
- ORTIZ DE MONTANELLO, P. R., DAVID S. K., ATOR M. A. & TEW, D.** (1988). Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoproporphyrin IX. *Biochemistry* **27** (15), 5470–5476.
- PANCRITIUS, P.** (1884). Beiträge zur Kenntnis der Flügelentwicklung bei den Insecten. Königsberger Dissertation. *Zoologischer Anzeiger* **7**.
- PASCHINGER, K., RENDIĆ, D. & WILSON, I. B. H.** (2009). Revealing the anti-HRP epitope in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Glycoconj J* **26** (3), 385–395.
- PASCHINGER, K., RENDIĆ, D., LOCHNIT, G., JANTSCH, V. & WILSON, I. B. H.** (2004). Molecular Basis of Anti-horseradish Peroxidase Staining in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **279** (48), 49588–49598.
- PAUCHET, Y., WILKINSON, P., VOGEL, H., NELSON, D. R., REYNOLDS, S. E., HECKEL, D. G. & FRENCH CONSTANT, R. H.** (2010). Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Mol Biol* **19** (1), 61–75.
- PECH, L. & STRAND, M.** (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science* **109** (8), 2053–2060.
- PUCHTLER, H., WALDROP, F. S. & VALENTINE, L. S.** (1973). Polarization Microscopic Studies of Connective Tissue Stained with Picro-Sirius Red. *Beiträge zur Pathologie* **150** (2), 174–187.
- RAO, X.-J., LING, E. & YU, X.-Q.** (2010). The Role of Lysozyme in the Prophenoloxidase Activation System of *Manduca sexta*: An *in vitro* approach. *Developmental and comparative immunology* **34** (3), 264–271.
- RAVID, K., LU, J., ZIMMET, J. M. & JONES, M. R.** (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *Journal of cellular physiology* **190** (1), 7–20.
- REN, Q., ZHAO, X. & WANG, J.** (2009). Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*). *J Genet Genomics* **36** (1), 7–16.
- RIBEIRO, C. & BREHÉLIN, M.** (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology* **52**, 417–429.
- RIZKI, R. & RIZKI, T.** (1990). Encapsulation of parasitoid eggs in phenoloxidase-deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **36** (7), 523–529.
- RIZKI, R. M. & RIZKI, T. M.** (1980). Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* **189** (3), 207–213.
- ROGERS, M. E., KRIEGER, J. & VOGT, R. G.** (2001). Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. *J Neurobiol* **49** (1), 47–61.

- ROH, J. Y., CHOI, J. Y., LI, M. S., JIN, B. R. & JE, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* **17** (4), 547–559.
- ROLFF, J. & REYNOLDS, S. (2009). *Insect infection and immunity: evolution, ecology, and mechanisms*. Oxford university press.
- ROYET, J., GUPTA, D. & DZIARSKI, R. (2011). Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11** (12), 837–851.
- RUPP, R. A. & SPENCE, K. D. (1985). Protein alterations in *Manduca sexta* midgut and haemolymph following treatment with a sublethal dose of *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin. *Insect Biochem* **15** (2), 147–154.
- RUSSELL, V. W. & DUNN, P. E. (1991). Lysozyme in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol* **17** (2-3), 67–80.
- SAKUDOH, T., KUWAZAKI, S., IIZUKA, T., NARUKAWA, J., YAMAMOTO, K., UCHINO, K., SEZUTSU, H., BANNO, Y. & TSUCHIDA, K. (2012). CD36 homolog divergence is responsible for the selectivity of carotenoid species migration to the silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Lipid Research* **54** (2), 482–495.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SASS, M., KISS, A. & LOCKE, M. (1994). Integument and hemocyte peptides. *Journal of Insect Physiology* **40** (5), 407–421.
- SAVILL, J., HOGG, N., REN, Y. & HASLETT, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* **90** (4), 1513–1522.
- SCHÄFFER, C. (1889). Beiträge zur Histologie der Insekten II. Ueber Blutbildungsherde bei Insectenlarven. *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog. Tiere* **3**, 626–636.
- SCHWARTZ, J.-L., GARNEAU, L., SAVARIA, D., MASSON, L., BROUSSEAU, R. & ROUSSEAU, E. (1993). Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *The Journal of Membrane Biology* **132** (1), 53–62.
- SHRESTHA, S. & KIM, Y. (2008). Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem Mol Biol* **38** (1), 99–112.
- SNOW, P. M., PATEL, N. H., HARRELSON, A. L. & GOODMAN, C. S. (1987). Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. *J Neurosci* **7** (12), 4137–4144.
- SOBERÓN, M., GILL, S. S. & BRAVO, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* **66** (8), 1337–1349.
- SOBERÓN, M., PARDO, L., MUÑOZ-GARAY, C., SÁNCHEZ, J., GÓMEZ, I., PORTA, H. & BRAVO, A. (2010). Pore formation by Cry toxins. *Adv Exp Med Biol* **677**, 127–142.
- SÖDERHÄLL, I., BANGYEKHUN, E., MAYO, S. & SÖDERHÄLL, K. (2003). Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental & Comparative Immunology* **27** (8), 661–672.
- SÖDERHÄLL, K. & CERENIUS, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10** (1), 23–28.
- SOTELO-MUNDO, R. R., LOPEZ-ZAVALA, A. A., GARCIA-OROZCO, K. D., ARVIZU-FLORES, A. A., VELAZQUEZ-CONTRERAS, E. F., VALENZUELA-SOTO, E. M., ROJO-DOMINGUEZ, A. & KANOST, M. R. (2007). The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. *Protein and peptide letters* **14** (8), 774–778.
- SOUTHERN, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98** (3), 503–517.

- SPANGRUDE, G., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I.** (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241** (4861), 58–62.
- STARK, M. B. & MARSHALL, A. K.** (1930). The Blood-Forming Organ of the Larva of *Drosophila melanogaster*. *Journal of the American Institute of Homeopathy* **23**, 1204–1206.
- STAUDACHER, E., KUBELKA, V. & MÄRZ, L.** (1992). Distinct N-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur J Biochem* **207** (3), 987–993.
- STELLER, H. & PIRROTTA, V.** (1986). P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol Cell Biol* **6** (5), 1640–1649.
- STRAND, M. R.** (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science* **15** (1), 1–14.
- STRAND, M. R. & JOHNSON, J. A.** (1996). Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* **42** (1), 21–31.
- STRAND, M. R. & PECH, L. L.** (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu Rev Entomol* **40**, 31–56.
- STRAUSS, J. & LAKES-HARLAN, R.** (2006). Embryonic development of pleuropodia of the cicada, *Magicicada cassini*. *J Insect Sci* **6**, 1–6.
- STUART, L. M., DENG, J., SILVER, J. M., TAKAHASHI, K., TSENG, A. A., HENNESSY, E. J., EZEKOWITZ, R. A. B. & MOORE, K. J.** (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *The Journal of Cell Biology* **170** (3), 477–485.
- STUART, L. M. & EZEKOWITZ, R. A.** (2008). Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* **8** (2), 131–141.
- SUMATHIPALA, N. & JIANG, H.** (2010). Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. *Insect biochemistry and molecular biology* **40** (6), 487–495.
- SWAMMERDAMM, J.** (1758). *The Book of Nature, or, The History of Insects*. Seyffert, C.G.
- TEPASS, U., FESSLER, L., AZIZ, A. & HARTENSTEIN, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120** (7), 1829–1837.
- TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P. G., RENNARD, S. I., FOIDART, J. M. & MARTIN, G. R.** (1979). Laminin – a glycoprotein from basement membranes. *Journal of Biological Chemistry* **254** (19), 9933–9937.
- TRENCZEK, T. & FAYE, I.** (1988). Synthesis of Immune Proteins in Primary Cultures of Fat Body from *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochemistry* **18**, 299–312.
- TU, Z.-L., KOBAYASHI, Y., KIGUCHI, K., WATANABE, H. & YAMAMOTO, K.** (2002). Effects of heavy-ion radiosurgery on the hemopoietic function of the silkworm *Bombyx mori*. *J Radiat Res* **43** (3), 269–275.
- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M. & ROZEN, S. G.** (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40** (15), e115.
- URSIC BEDOYA, R. J., MITZEY, A. M., OBRAZTSOVA, M. & LOWENBERGER, C.** (2005). Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* **14** (1), 89–94.
- VODOVAR, N., VINALS, M., LIEHL, P., BASSET, A., DEGROUARD, J., SPELLMAN, P., BOCCARD, F. & LEMAITRE, B.** (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (32), 11414–11419.

- VOLLMER, W. & BERTSCHE, U.** (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778** (9), 1714–1734.
- VOLLMER, W., BLANOT, D. & DE PEDRO, M. A.** (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* **32** (2), 149–167.
- WANG, X., SUN, B., YASUYAMA, K. & SALVATERRA, P. M.** (1994). Biochemical analysis of proteins recognized by anti-HRP antibodies in *Drosophila melanogaster*: Identification and characterization of neuron specific and male specific glycoproteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **24** (3), 233–242.
- WEISS, S. J.** (2012). Peroxidasin: Tying the collagen-sulfilimine knot. *Nat Chem Biol* **8** (9), 740–741.
- WHALON, M. E. & WINGERD, B. A.** (2003). Bt: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol* **54** (4), 200–211.
- WHEELER, W. C., WHITING, M., WHEELER, Q. D. & CARPENTER, J. M.** (2001). The Phylogeny of the Extant Hexapod Orders. *Cladistics* **17** (2), 113–169.
- WIEGAND, C., LEVIN, D., GILLESPIE, J. P., WILLOTT, E., KANOST, M. R. & TRENCZEK, T.** (2000). Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **45** (3), 95–108.
- WIGGLESWORTH, V.** (1973). Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*. *Journal of Insect Physiology* **19** (4), 831–844.
- WILLOTT, E., TRENCZEK, T., THROWER, L. & KANOST, M.** (1994). Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *European Journal of Cell Biology* **65**, 417–423.
- WILSON, L. J., KIM, Y. W. & BAIRD, J. K.** (2002). Lysozyme Self-Association in Aqueous NaCl at pH 4.0 and 20°C. *Crystal Growth & Design* **2** (1), 41–43.
- WÜNSCH, N.** (2009). Charakterisierung des hämatopoetischen Organs von *Manduca sexta* (L.). Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für allgemeine und spezielle Zoologie.
- XIA, Y., MIDOUN, S. Z., XU, Z. & HONG, L.** (2015). Heixuedian (heix), a potential melanotic tumor suppressor gene, exhibits specific spatial and temporal expression pattern during *Drosophila* hematopoiesis. *Dev Biol* **398** (2), 218–230.
- YAMAMOTO, R.** (1969). Mass rearing of the tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation. *J. Econ. Ent.* **62**, 1427–1431.
- YAMASHITA, M. & IWABUCHI, K.** (2001). *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology* **47** (4-5), 325–331.
- YEAGER, J.** (1945). The Blood Picture of the Southern Armyworm (*Prodenia eridania*). *Journal of Agricultural Research* **71**, 1–45.
- YOSHIDA, H., KINOSHITA, K. & ASHIDA, M.** (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **271** (23), 13854–13860.
- YU, X. Q., GAN, H. & KANOST, M. R.** (1999). Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem Mol Biol* **29** (7), 585–597.
- YU, X.-Q., TRACY, M. E., LING, E. SCHOLZ, F. R. & TRENCZEK, T.** (2005). A novel C-type immulectin from *Manduca sexta* is translocated into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 285–295.
- YU, X.-Q., ZHU, Y.-F., MA, C., FABRICK, J. A. & KANOST, M. R.** (2002). Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 1287–1293.

- ZACHARY, D. & HOFFMANN, D.** (1984). Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*. *Journal of Insect Physiology* **30** (5), 405–411.
- ZAIDMAN-RÉMY, A., HERVÉ, M., POIDEVIN, M., PILI-FOURY, S., KIM, M.-S., BLANOT, D., OH, B.-H., UEDA, R., MENGIN-LECREULX, D. & LEMAITRE, B.** (2006). The *Drosophila* Amidase PGRP-LB Modulates the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunity* **24** (4), 463–473.
- ZHANG, S., CLARK, K. D. & STRAND, M. R.** (2011). The protein P23 identifies capsule-forming plasmatocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *Dev Comp Immunol* **35** (4), 501–510.
- ZHANG, X., HE, Y., CAO, X., GUNARATNA, R. T., CHEN, Y., BLISSARD, G., KANOST, M. R. & JIANG, H.** (2015). Phylogenetic analysis and expression profiling of the pattern recognition receptors: Insights into molecular recognition of invading pathogens in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* **62**, 38–50.
- ZHAO, P., LI, J., WANG, Y. & JIANG, H.** (2007). Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem Mol Biol* **37** (9), 952–959.
- ZHOU, Q.-X., SHEN, XING-JIA, YI, YONG-ZHU, XIA, AI-HUA & ZHANG, Z.-f.** (2006). Hemocyte Changes after the Extirpation of the Hemopoietic Organ-wing Disc Complexes in the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *International Journal of Industrial Entomology* **13** (2), 79–83.
- ZHUANG, S., KELO, L., NARDI, J. B. & KANOST, M. R.** (2007). Neuroglial on hemocyte surfaces is involved in homophilic and heterophilic interactions of the innate immune system of *Manduca sexta*. *Developmental & Comparative Immunology* **31** (11), 1159–1167.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Hämozytentypen in <i>Manduca sexta</i> -Larven.	7
Abbildung 2.2:	Lage und Aufbau der hämatopoetischen Organe in <i>Manduca sexta</i> -Larven.	10
Abbildung 3.1:	Vektorkarte des pCR™ II-Plasmids.	49
Abbildung 4.1:	Doppelmarkierung von larvalen (L5d2) Hämozyten mit PNA und hämozytenmarkierenden Antikörpern.	64
Abbildung 4.2:	Identifizierung von Prophenoloxidase (PPO) beinhaltenden Oenozytoiden durch Doppelmarkierung.	68
Abbildung 4.3:	Identifizierung von β GRP-1 beinhaltenden Oenozytoiden durch Doppelmarkierung.	69
Abbildung 4.4:	Zellkernmorphologie verschiedener Hämozytentypen.	73
Abbildung 4.5:	Relative Stärke des DAPI-Signals der Zellkerne verschiedener Hämozytentypen.	74
Abbildung 4.6:	Aufbau des hämatopoetischen Organs und Lokalisation der extrazellulären Matrix.	76
Abbildung 4.7:	Hämatopoetische Organe beinhalten keine Oenozytoide.	78
Abbildung 4.8:	Hämatopoetische Organe beinhalten keine granulären Zellen.	79
Abbildung 4.9:	Verteilung der mit anti-HRP, MS75, MS77 und PNA markierbaren Zellsubpopulationen im hämatopoetischen Organ (HO) einer L5d2-Larve.	81
Abbildung 4.10:	Mehrfachmarkierung der Zellen eines hämatopoetischen Organs einer L5d2-Larve mit MS13, MS75 und MS77.	83
Abbildung 4.11:	Mehrfachmarkierung hämatopoetischer Organe von L5d2-Larven mit MS13, MS77 und NG3B11.	85
Abbildung 4.12:	Mehrfachmarkierung des hämatopoetischen Organs einer L5d2-Larve mit NG3B11, PNA und MS77.	87
Abbildung 4.13:	Mitotische Aktivität verschiedener Hämozytensubpopulationen in hämatopoetischen Organen von L5d2-Larven.	89
Abbildung 4.14:	Prozentualer Anteil verschiedener Hämozytenpopulationen im hämatopoetischen Organ und der mitotischen Aktivität innerhalb der Populationen.	90
Abbildung 4.15:	Hämozyte aus <i>in-vitro</i> -kultiviertem hämatopoetischem Organ in Zytokinese.	91
Abbildung 4.16:	Adhäsion und Formänderung einer dem hämatopoetischen Organ entstammenden Zelle <i>in vitro</i> .	92
Abbildung 4.17:	Markierung von <i>in-vitro</i> -kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs mit verschiedenen Hämozytenmarkern.	94
Abbildung 4.18:	Differentielle Zellzahlermittlung von 48 h <i>in-vitro</i> -kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs.	95
Abbildung 4.19:	Durchmesser und Kern-Zytoplasma-Verhältnis von Hämozytentypen und Zellen des hämatopoetischen Organs.	97
Abbildung 4.20:	Nachweis PNA-positiver Proteine in Hämozyten und hämatopoetischem Organ.	98
Abbildung 4.21:	Multiples Sequenzalignment der SmartBLAST Ergebnisse für Msex2.07580-RB.	102
Abbildung 4.22:	<i>Distance tree of results</i> des SmartBLAST-Ergebnis mit Anfrage von Msex2.07580-RB.	103
Abbildung 4.23:	<i>Distance tree of results</i> des BLAST-Ergebnis mit der Anfrage Msex2.07580-RB.	103

Abbildung 4.24:	Konservierte Domänen in <i>D. melanogaster</i> -Eater-PC- und Msex2.07580-RB-Protein.	104
Abbildung 4.25:	Grafische Darstellung der vorhergesagten Transmembrandomäne der Msex2.07580-RB Aminosäuresequenz.	105
Abbildung 4.26:	Nachweis der Msex2.07580-RB mRNA (Eater-like) mit <i>in-situ</i> -Hybridisierung und RT-PCR.	106
Abbildung 4.27:	Multiples Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen der SmartBLAST Ergebnisse für Msex007423-RA.	108
Abbildung 4.28:	<i>Distance tree of results</i> der SmartBLAST-Analyse mit Msex007423-RA-Protein.	109
Abbildung 4.29:	<i>Distance tree of results</i> einer Auswahl der Ergebnisse der BLAST-Analyse mit Msex007423-RA.	109
Abbildung 4.30:	Konservierte Proteindomänen bei <i>D. melanogaster</i> -Croquemort-PA-Protein und Msex007423-PA-Protein.	110
Abbildung 4.31:	Grafische Darstellung der vorhergesagten Transmembrandomäne der Msex007423-PA Aminosäuresequenz.	111
Abbildung 4.32:	Nachweis der Msex007423-RA-mRNA (<i>croquemort/scavenger receptor class B-like</i> , Crq) in Hämocyten (HC) und hämatopoetischen Organen (HO) mittels RT-PCR.	111
Abbildung 4.33:	Nachweis von Proteinen markiert mit anti- <i>D. melanogaster</i> Croquemort-Immunserum in Hämocyten und hämatopoetischem Organ einer L5d2-Larve.	112
Abbildung 4.34:	Markierung von Hämocyten mit anti- <i>D. melanogaster</i> Croquemort-Immunserum (Crq).	113
Abbildung 4.35:	Multiples Sequenzalignment der SmartBLAST Ergebnisse für Msex010330-RA.	116
Abbildung 4.36:	<i>Distance tree of results</i> der SmartBLAST-Analyse von Msex010330-RA.	117
Abbildung 4.37:	Vergleich der konservierten Proteindomänen in Msex010330-Protein und <i>D. melanogaster</i> -Peroxidasin-PA.	118
Abbildung 4.38:	Markierung von Hämocyten und hämatopoetischem Organ mit anti-PXDN-Immunserum und Nachweis von Msex010330-RA-mRNA in Hämocyten und hämatopoetischem Organ.	119
Abbildung 4.39:	Multiples Sequenzalignment der SmartBLAST Ergebnisse für Msex2.06039-RA.	121
Abbildung 4.40:	<i>Distance tree of results</i> der SmartBLAST-Anfrage von Msex2.06039-RA.	122
Abbildung 4.41:	Vergleich der konservierten Proteindomäne in Msex2.06039-RA-Protein und <i>D. melanogaster</i> -Heixuedian-PA-Protein.	122
Abbildung 4.42:	Grafische Darstellung der vorhergesagten sieben Transmembrandomänen der Msex2.06039-RA Aminosäuresequenz.	123
Abbildung 4.43:	Nachweis der Msex2.06039-RA-mRNA (Heixuedian) in hämatopoetischem Organ (HO) und Hämocyten (HC) von L5d2-Larven mittels semiquantitativer RT-PCR.	123
Abbildung 4.44:	Einfluss von oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Gabe und von <i>E. coli</i> K12-Injektion auf die Wachstumsrate.	126
Abbildung 4.45:	Anzahl koloniebildender Bakterien pro ml Hämolymphe 15 Stunden nach oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Gabe bzw. <i>E. coli</i> K12-Injektion.	127
Abbildung 4.46:	Einfluss von oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Gabe und von <i>E. coli</i> K12-Injektion auf die Lysozymaktivität und die anti- <i>E. coli</i> -Aktivität.	130
Abbildung 4.47:	Relative Veränderung der mRNA-Expression verschiedener immunrelevanter Gene nach oraler <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -Aufnahme (A) bzw. Injektion von <i>E. coli</i> K12 (B).	132

Abbildung 4.48:	Nachweis von Lysozym-mRNA und -Protein in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ.	134
Abbildung 4.49:	Nachweis von Lysozym in Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ mittels Western Blot.	135
Abbildung 4.50:	Nachweis fehlender Endozytose von <i>E. coli</i> -K12 D31 durch das hämatopoetische Organ.	136
Abbildung 5.1:	Verwandtschaftsverhältnisse der Hämozytentypen und mögliche Modelle der Hämatopoese.	178
Abbildung 5.2:	Die Auswirkungen oraler Infektion und systemischer Infektion auf die mRNA-Synthese immunrelevanter Gene in verschiedenen Organen im Vergleich.	187
Abbildung A.1:	Markierung von Hämozyten mit anti-Laminin B2-Immunsersum, PNA, anti-HRP-Immunsersum und MS39.	I
Abbildung A.2:	Markierung der extrazellulären Matrix (ECM) von hämatopoetischen Organen mit verschiedenen Markern.	II
Abbildung A.3:	Inhibition der PNA-Markierung auf Hämozyten durch Galaktose.	II
Abbildung A.4:	Nachweis von β GRP-1, α -HRP-Antigenen und Laminin B2 in hämatopoetischen Organen und/oder Hämozyten mittels Western Blot.	III
Abbildung A.5:	Transmembrandomänenvorhersage der Aminosäuresequenz von <i>M. sexta</i> - β GRP-1 (GenBank Accession: AAF44011.1) mit TMHMM.	IV
Abbildung A.6:	Nachweis der Lysozym-mRNA auf Hämozyten verwundeter L5d2-Larven mittels RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung und Fluoreszenz-RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.	IV
Abbildung A.7:	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Hämozyten und hämatopoetischem Organ mit der Msex07580-RB-sense-Sonde (Negativkontrollsonde).	V
Abbildung A.8:	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Fettkörper und Hämozyten mit der PGRP-1A-RNA Sonde.	V
Abbildung A.9:	Organisation des larvalen hämatopoetischen Organs.	VI
Abbildung A.10:	Lysozym-Nachweis in der Hämolymphe einer L5d2-Larve mit verschiedenen Antikörpern.	VII
Abbildung A.11:	Anteil mitotisch aktiver Hämozytentypen an der Gesamthämozytenpopulation von L5d2-Larven.	VIII
Abbildung A.12:	Mitose in verschiedenen Hämozytentypen.	IX
Abbildung A.13:	Morphometrische Merkmale der Hämozytentypen.	X
Abbildung A.14:	Morphometrische Merkmale der Zellkerne der Hämozytentypen.	XI
Abbildung A.15:	Zonierung des hämatopoetischen Organs exemplarisch für MS75 und PNA.	XII

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Hämozytentypen, deren Charakteristika und Funktion in <i>Manduca sexta</i> .	6
Tabelle 2.2:	Auswahl immunrelevanter Proteine, deren Funktion und Vorkommen in Insektenhämozyten.	8
Tabelle 2.3:	Bekannte hämatopoetische Organe in Lepidoptera und deren anatomische Lage.	11
Tabelle 3.1:	Primäre Antikörper	27
Tabelle 3.2:	Sekundäre Antikörper, <i>Arachis hypogaea</i> Lektin (PNA) und Streptavidin.	28
Tabelle 3.3:	Farbkodierung für multiple Sequenzalignments mit ClustalW oder ClustalX.	42
Tabelle 3.4:	Primer für <i>real-time</i> PCR, RT-PCR und Sondensynthese.	47
Tabelle 4.1:	Doppelmarkierbarkeit von PNA-Zellmembran-positiven Hämozyten mit Antikörpern.	65
Tabelle 4.2:	Differentielle Zellzahlermittlung (DHC) von Hämozyten mit PNA-positiver Zellmembran in L5d2-Larven.	66
Tabelle 4.3:	Differentialdiagnose der <i>Manduca sexta</i> -Hämozyten mittels Antikörpermarkierung, enzymatischer Aktivität und mRNA-Expression.	70
Tabelle 4.4:	Doppelmarkierung von Zellen des hämatopoetischen Organs mit verschiedenen Hämozytenmarkern.	88
Tabelle 4.5:	Identifikation und mRNA-Expression nicht beschriebener Gene in <i>M. sexta</i> .	99
Tabelle 4.6:	Koloniebildende Bakterienisolate aus <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> -gefütterten und <i>E. coli</i> K12-injizierten Tieren.	128
Tabelle A.1:	Antikörperbindung an Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ von <i>Manduca sexta</i> .	XIV
Tabelle A.2:	Hämatopoese Faktoren und hämozytentypisch exprimierte Gene von Arthropoden, für die keine homologen Sequenzen in der ManducaBase-Datenbank hinterlegt sind oder die Übereinstimmung zu niedrig ist.	XV
Tabelle A.3:	Kompetitive Inhibition von primären Antikörpern mit Kohlenhydraten oder Fetuin.	XVI
Tabelle A.4:	DAPI-Intensität der Hämozytentypen in Relation zu granulären Zellen.	XVI
Tabelle A.5:	Statistische Analyse der DAPI-Intensität der Hämozytentypen in Relation zu granulären Zellen.	XVII
Tabelle A.6:	Differentielle Zellzahlermittlung von <i>in-vitro</i> -kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs.	XVII
Tabelle A.7:	Unterschiede der Anteile für verschiedene Marker positive Zellen zwischen adhären und nicht-adhären Zellen des hämatopoetischen Organs <i>in vitro</i> .	XVII
Tabelle A.8:	Subpopulationen adhärenter Zellen des hämatopoetischen Organs <i>in vitro</i> .	XVIII
Tabelle A.9:	Subpopulationen nicht-adhärenter Zellen des hämatopoetischen Organs <i>in vitro</i> .	XVIII
Tabelle A.10:	Statistische Analyse der Durchmesser verschiedener Zelltypen.	XVIII
Tabelle A.11:	Statistische Analyse des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses verschiedener Hämozytentypen und PNA-positiven Zellen des hämatopoetischen Organs.	XIX
Tabelle A.12:	Statistische Auswertung der Wachstumsrate von L5-Larven nach Infektionen.	XIX

Tabelle A.13: Statistische Auswertung der anti- <i>E. coli</i> D31-Aktivität der Hämolymphe nach Infektionen.	XIX
Tabelle A.15: <i>Cycle thresholds</i> (CTs) der <i>real-time</i> qPCR-Analysen von L5d2-Larven.	XX
Tabelle A.16: <i>Cycle thresholds</i> (CTs) der <i>real-time</i> qPCR-Analysen des Mitteldarms von L5d13-Larven (Präpuppe).	XXI
Tabelle A.17: Zusammensetzung des Kunstfutters für <i>Manduca sexta</i> -Larven, modifiziert nach YAMAMOTO (1969).	XXI
Tabelle A.18: Bestimmungsmerkmale für die Hämozytentypen von <i>Manduca sexta</i> -Larven.	XXII
Tabelle A.19: Anteil durch Hämozytenmarker markierter PNA-Zellmembran positiver Hämozyten.	XXIII

10 Versicherung

Versicherung gemäß § 17 (2) der Promotionsordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 04.02.2005.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den _____

Christoph-Rüdiger Hubertus Harald Alexander von Bredow

11 Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Familie und allen Kollegen und Freunden bedanken, die zu dem erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. Tina Trenczek für das Überlassen des Themas, Betreuung, Hilfestellung, Diskussion, Durchsicht des Manuskriptes, ansteckende Begeisterung und „wieder auf den Boden holen“ wenn die Pläne für weitere Untersuchungen doch zu hochtrabend waren, und natürlich für das freundschaftliche Verhältnis.

Weiterer Dank geht an Frau Dr. Ellen Kauschke für die Co-Betreuung, Anregungen und Hilfestellungen und vielen netten Gesprächen.

Herrn Prof. Reinhard Lakes-Harlan danke ich für die Bereitschaft als Prüfer einzutreten und für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Anne Holz danke ich für all die Hilfe, Gespräche, Diskussionen und Analysen meiner Ergebnisvorträge, für großzügige Antikörperspenden und dafür, dass sie das KLSM am Laufen hielt.

Herrn Dr. Martin Bilej und seinem ganzen Laborteam, František Škanta, Jiří Dvořák, Dr. Petra Procházková, Dr. Radka Roubalová, und auch den anderen Forschern der Akademie, die ich kennenlernen durfte, danke ich für die hervorragende Unterstützung bei meinen Aufenthalten in Prag, die leider viel zu kurz und trotzdem sehr prägend und erfolgreich waren. In diesem Zuge möchte ich mich bei dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für die Förderung der Auslandsaufenthalte bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Kanost möchte ich vielmals für die Einführung in die Manduca Base danken. Meinen wackeren Mitstreitern, den Doktoranden und ehemaligen Doktoranden des Instituts, gilt ganz besonderer Dank: Dr. Kathrin Pfeifer und Dr. Georg Wolfstetter für das beibringen so mancher Technik, v. a. im molekularbiologischen Bereich und den teilweise sehr lustigen Nachtschichten (der berühmte Peggy-Bundy-Blot), Daniel Pfeifer („Hier sind also die coolen Kids!“), Ina Dahlitz („...“), Uwe Töpfer („HubiHubiHubi“), ohne euch hätte es nicht halb so viel zu lachen gegeben, außerdem war es immer eine Freude mit euch über gelungene und missglückte Experimente zu diskutieren!

Auch den Kollegen anderer Institute oder Arbeitsgruppen möchte ich danken: Danke (inzwischen Dr.?) Torsten Hauffe, das du dir immer Zeit genommen hast Fragen zur Statistik und anderen Problemen anzuhören und zu beantworten. Danke Sergej Sereda (vielleicht auch schon Dr.?), dass du mit mir immer schon über all die Fragen der Biologie diskutierst, und natürlich auch für die Freundschaft. Danke Tim-Kevin Sobotta (auch hier die Frage: inzwischen Dr.?), für die vielen Paper

und Diskussionen, dass du immer ein offenes Ohr hattest für meine Probleme, die dir als Doktorand ja auch nicht fremd waren.

Dr. Johannes Strauß, danke für die (manchmal in sonderbare Richtungen gehenden) Gespräche, die erfolgreiche Zusammenarbeit, und deinen fachlichen Rat.

Vielen Dank auch an Sabine Wagner für die technische Unterstützung und die gute Laune im Labor und Dietmar Haffer für die stets zuverlässige Tabakzucht.

Yvette, dir als meine Ehefrau, Kollegin und beste Freundin in Personalunion, gilt mein größter Dank. Ohne dich wäre der Kampf gegen die Entropie verloren gewesen. Ich möchte dir von ganzem Herzen danken, dass du mit mir zusammen diese Herausforderung angenommen und mich immer unterstützt hast, im Labor bei Experimenten und deren Planung wie im privaten Leben.

A Appendix

A.1 Abbildungen

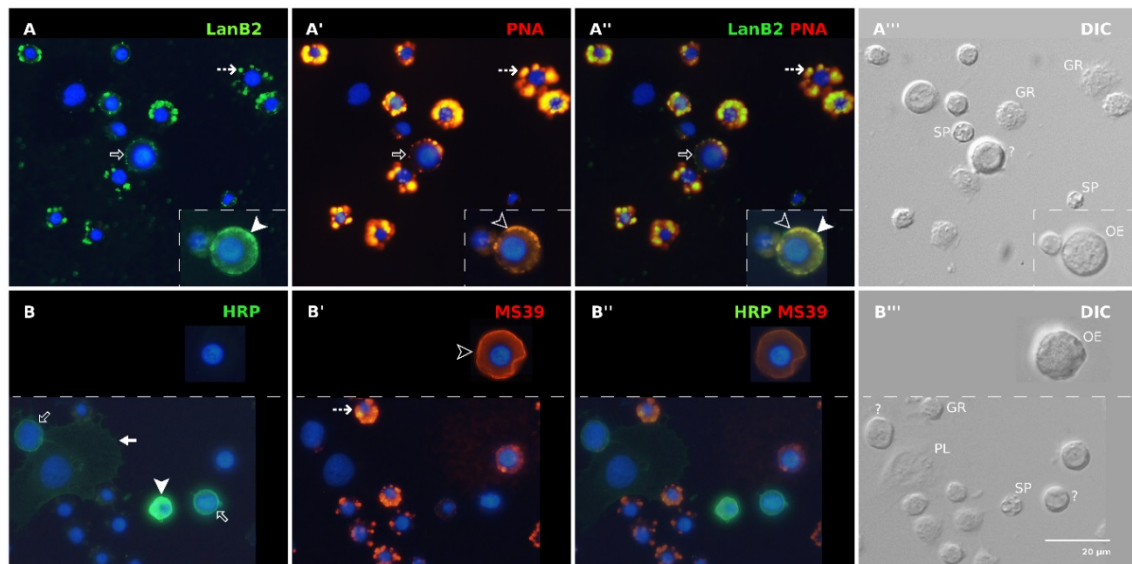


Abbildung A.1: Markierung von Hämozyten mit anti-Laminin B2-Immunsersum, PNA, anti-HRP-Immunsersum und MS39.

A – A''': Doppelmarkierung mit anti-LanB2 Immunsersum und PNA zeigt ein ähnliches Markierungsmuster. Granulen granulärer Zellen sind sowohl LanB2-positiv als auch PNA-positiv (gestrichelter Pfeil in A bis A''). Oenozytoide weisen eine LanB2-positive Umrandung der Zellmembran auf (weiße Pfeilspitze), während PNA kortikal markiert (leere Pfeilspitze). Runde Hämozyten mit großem Zellkern und geringem Zytoplasmaanteil können mit beiden Markern an der Zelloberfläche markiert werden (leerer Pfeil). Sphärule Zellen und Plasmatozyten werden nicht markiert. **B – B'''**: Anti-HRP-Immunsersum markiert gespreitete Plasmatozyten (weißer Pfeil) und sphärule Zellen (weiße Pfeilspitze). Oenozytoide und granuläre Zellen sind HRP-negativ. MS39 markiert Granulen granulärer Zellen (gestrichelter Pfeil) und die Zellmembran von Oenozytoiden (leere Pfeilspitze), die Markierungen durch MS39 und anti-HRP schließen sich aus.

Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, OE = Oenozytoide, PL = Plasmatozyte, SP = sphärule Zelle, ? = runde Hämozyte mit großem Zellkern und geringem Zytoplasmaanteil, evtl. runde Plasmatozyte. Durch gestrichelte weiße Linien abgegrenzte Bereiche sind aus einem anderen Bereich des gleichen Objekts eingefügt. Der Messbalken in B''' gilt für alle Abbildungen.

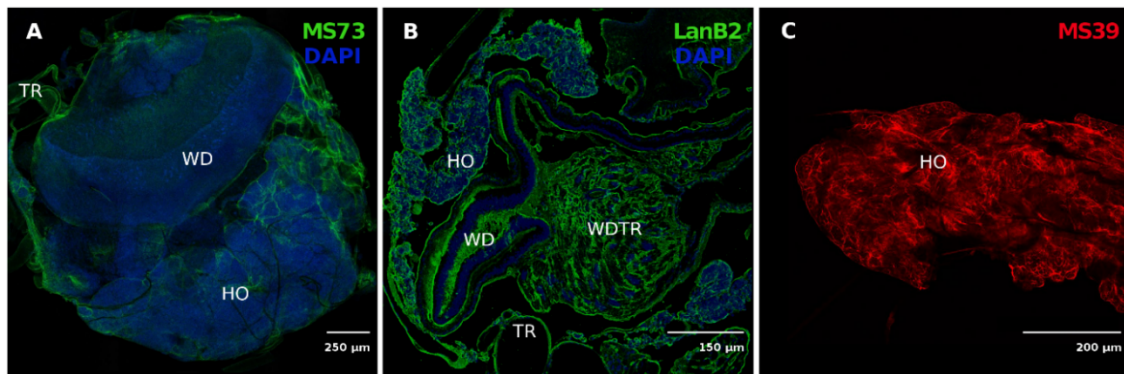


Abbildung A.2: Markierung der extrazellulären Matrix (ECM) von hämatopoetischen Organen mit verschiedenen Markern.

A: *Whole mount* Präparat des hämatopoetischen Organs und der Flügelanlage. Der mAb MS73 markiert die ECM u. a. des hämatopoetischen Organs, der Flügelanlage und der Tracheen. **B:** Paraffinschnitt des hämatopoetischen Organs und der Flügelanlage, 7 μ m Dicke. Gleiches Präparat wie in Abbildung 4.6 B. Anti-*D. melanogaster* Laminin B2-Immunsereum (LanB2) markiert die ECM der Flügelanlage, des hämatopoetischen Organs und der Tracheen. Zellen des hämatopoetischen Organs sind nicht markiert. **C:** *Whole mount* Präparat des hämatopoetischen Organs und der Flügelanlage. Der mAb MS39 markiert die ECM aber keine Zellen des hämatopoetischen Organs.

Abkürzungen: HO = hämatopoetisches Organ; WD = Flügelanlage; TR = Trachee, WDTR = Tracheenknäuel der Flügelanlage.

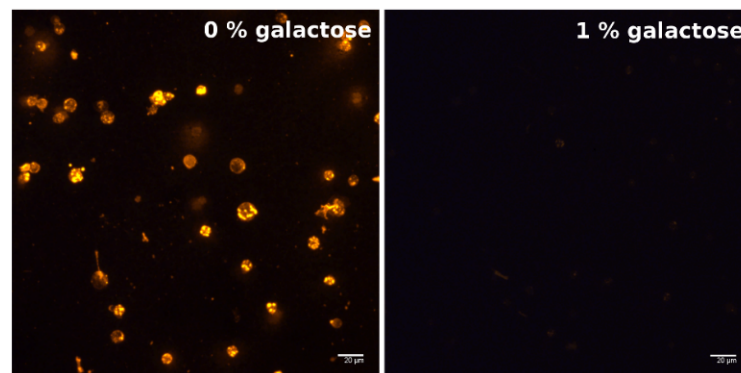


Abbildung A.3: Inhibition der PNA-Markierung auf Hämozyten durch Galaktose.

Die Bilder wurden unter gleichen Bedingungen und gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Die Markierung mit PNA-TRITC (1:2000) konnte durch Zugabe von 1 % Galaktose zuverlässig inhibiert werden.

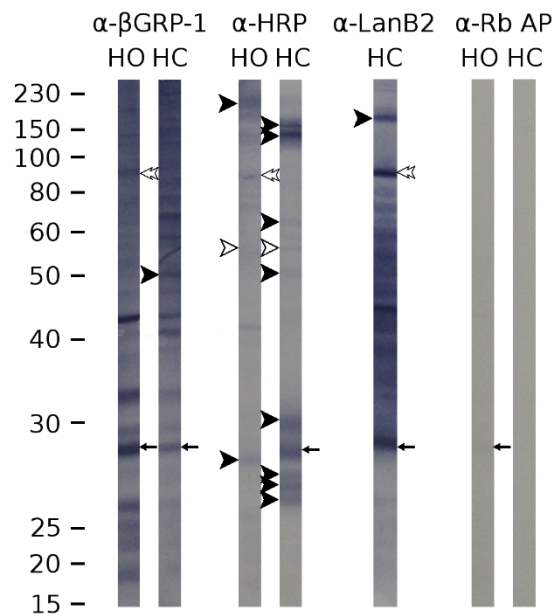


Abbildung A.4: Nachweis von $\beta\text{GRP-1}$, $\alpha\text{-HRP}$ -Antigenen und Laminin B2 in hämatopoetischen Organen und/oder Hämozyten mittels Western Blot.

Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE mit 10 % PA-Trenngel, 1 mg Gewebe pro Spur.

$\alpha\text{-}\beta\text{GRP-1}$: Schwarze Pfeilspitze: Proteinbande markiert in Hämozyten aber nicht im hämatopoetischen Organ, bei ca. 54 kDa. **$\alpha\text{-HRP}$:** Schwarze Pfeilspitzen: positive Proteinbanden, die nur in hämatopoetischem Organ oder Hämozyten markiert werden. Leere Pfeilspitzen: Positive Banden, die in beiden Proben markiert werden. Molekulargewichte der anti-HRP-positiven Banden absteigend: HO: ca. 177 kDa, ca. 85 kDa (doppelte leere Pfeilspitze), ca. 58 kDa (leere Pfeilspitze), ca. 29 kDa (schwarze Pfeilspitze). HC: ca. 155 kDa, ca. 135,5 kDa, ca. 63,5 kDa, ca. 58 kDa (leere Pfeilspitze), ca. 54 kDa, ca. 32 kDa, ca. 28 kDa, ca. 26 kDa, ca. 25,5 kDa. **$\alpha\text{-LanB2}$:** Neben zahlreichen weiteren Banden ist eine prominente Bande bei ca. 160 kDa markiert (schwarze Pfeilspitze).

Doppelte leere Pfeilspitzen: Durch verschiedene Kaninchen-Immunsereen markierte Bande. Die Markierung kann deshalb nicht als spezifisch gewertet werden. Schwarze Pfeile: durch sekundären Antikörper markierte Banden.

Abkürzungen: $\alpha\text{-}\beta\text{GRP-1}$ = anti- $\beta\text{-1,3-glucan recognition protein}$ -Immunsereum; $\alpha\text{-HRP}$ = anti-Meerrettichperoxidase-Immunsereum, $\alpha\text{-LanB2}$ = anti-*D. melanogaster* Laminin B2-Immunsereum; HC = Hämozyten, HO = hämatopoetisches Organ. Molekularmassen der Markerproteine (NEB 7711) sind in kDa angegeben.

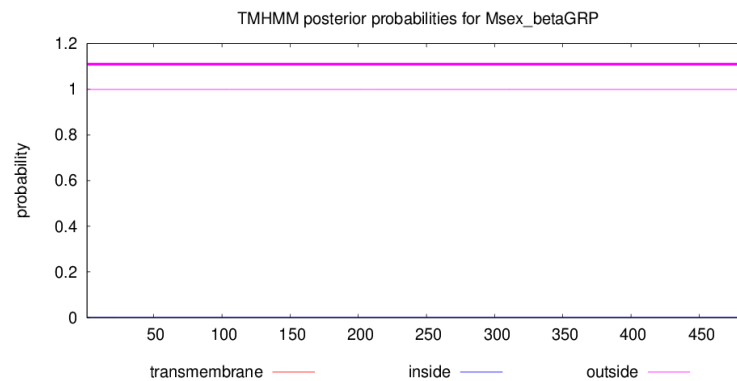


Abbildung A.5: Transmembrandomänenvorhersage der Aminosäuresequenz von *M. sexta*- β GRP-1 (GenBank Accession: AAF44011.1) mit TMHMM.

Es wurde für β GRP-1 keine Transmembrandomäne vorhergesagt, passend zu dem von MA und KANOST (2000) beschriebenen Nachweis im Hämolymp plasma. Zellulär assoziiertes β GRP-1 kann somit an der Zelloberfläche gebunden oder zytoplasmatisch lokalisiert sein.

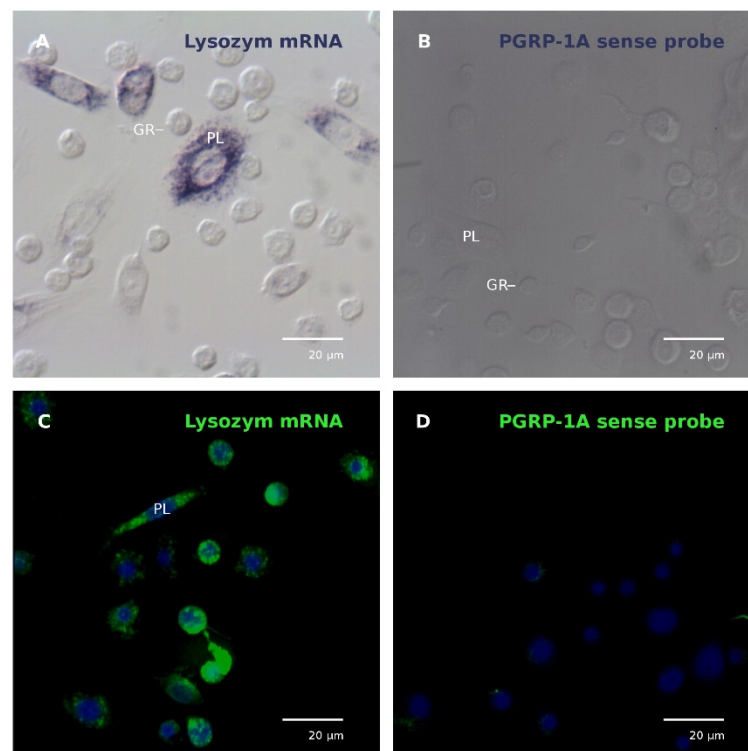


Abbildung A.6: Nachweis der Lysozym-mRNA auf Hämocyten verwundeter L5d2-Larven mittels RNA-*in situ*-Hybridisierung und Fluoreszenz-RNA-*in situ*-Hybridisierung.

Die Tiere wurden 15 Stunden vor der Hämocytenentnahme durch Abschneiden des Horns verwundet (A, B) bzw. mit *E. coli* K12 injiziert (C, D).

A, C: Sowohl mittels ISH als auch mittels FISH wurde Lysozym-mRNA in Plasmatozyten sowie in großen runden Zellen markiert. Granuläre Zellen wurden in verwundeten Tieren (A) nur sehr schwach markiert während bei *E. coli* K12 injizierten Tieren (C) eine schwache aber deutliche Markierung der granulären Zellen nachweisbar war. **B, D:** Die Kontrollsonde (PGRP-1A-sense-RNA-Sonde) markierte keine Hämocyten.

Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, PL = Plasmatozyte.

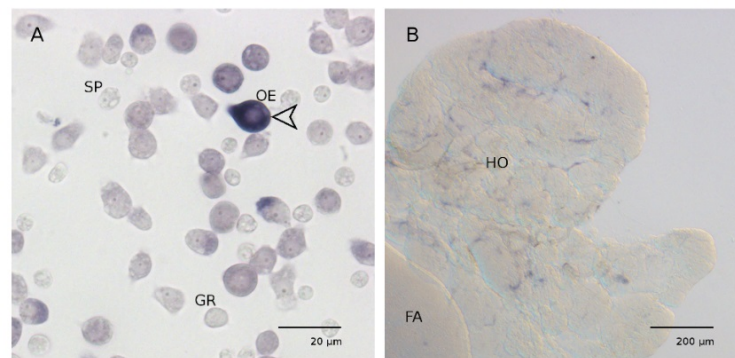


Abbildung A.7: RNA-*in-situ*-Hybridisierung von Hämozyten und hämatopoetischem Organ mit der Msex2.07580-RB-sense-Sonde (Negativkontrollsonde).

A: Oenozytoide werden markiert (OE, leere Pfeilspitze). **B:** Keine Zellen des hämatopoetischen Organs werden markiert.

Die theoretisch möglichen kodierten Polypeptide der komplementären Nukleotidsequenz zur *sense*-Sonde brachten keine Treffer bei NCBI- oder Manduca Base-BLAST-Analysen (nicht gezeigt). Das Binden der Sonde wird deshalb als zufällig gewertet.

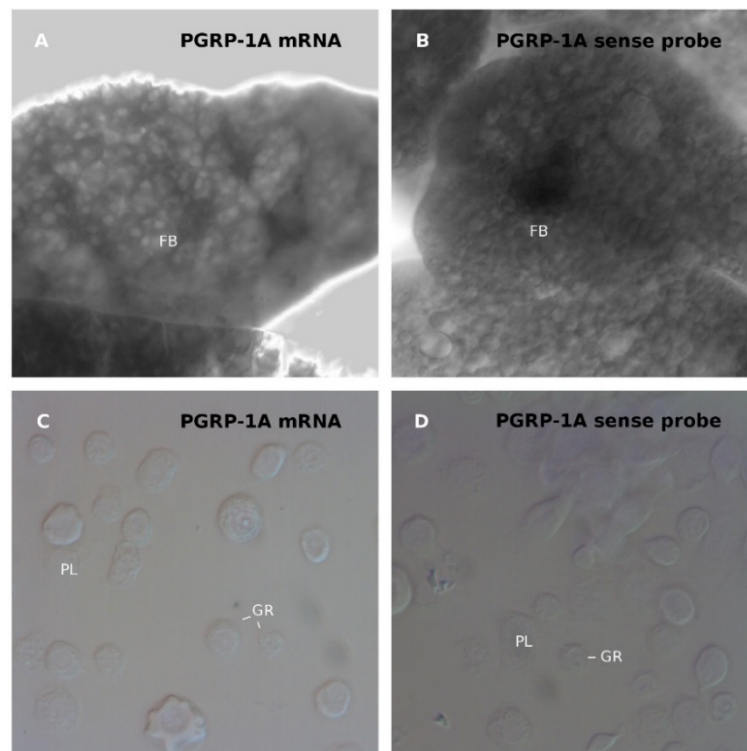


Abbildung A.8: RNA-*In-situ*-Hybridisierung von Fettkörper und Hämozyten mit der PGRP-1A-RNA Sonde.

Die Versuchstiere wurden 15 h vor der Organentnahme mit *E. coli* K12 infiziert.

A: Fettkörper hybridisiert mit PGRP-1A Dig-RNA Sonde. Das Zytoplasma ist schwach markiert. **B:** Fettkörper hybridisiert mit der Negativsonde (PGRP-1A *sense*). Eine schwache Markierung des Zytoplasmas ist zu erkennen. **C, D:** Weder die *antisense*-RNA-Sonde für PGRP-1A (positiv, C) noch die *sense*-RNA-Sonde (negativ, D) markieren Hämozyten.

Abkürzungen: FB = Fettkörper, GR = granuläre Zelle, PL = Plasmatozyte.

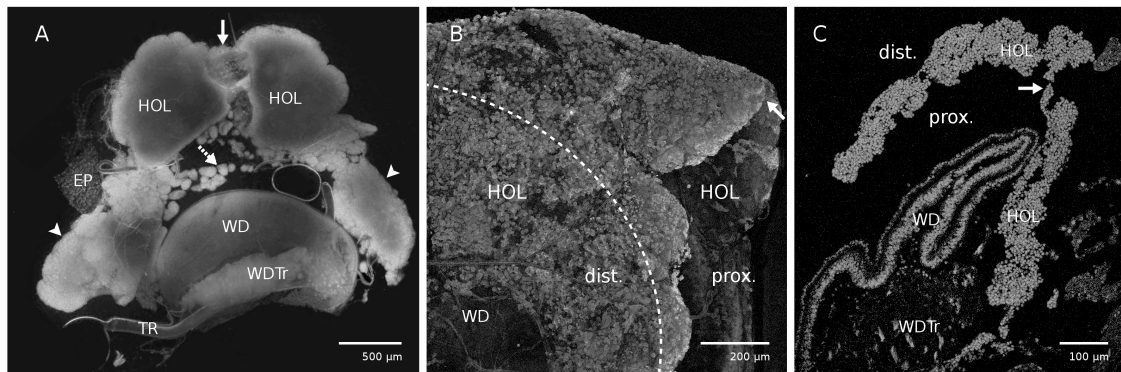


Abbildung A.9: Organisation des larvalen hämatopoetischen Organs.

A – C: Mesothorakale hämatopoetische Organe. A: L5d4-Larve. B, C: L5d2-Larve. A, C: DAPI-Markierung. B: Markierung mit mAbs MS75 und MS13. A, B: *Whole mount*. C: Paraffinschnitt, 7 µm Schnittstärke.

A: Hämatopoetisches Organ partiell von der Flügelanlage gelöst und ausgebreitet. Weiße Pfeilspitzen: Große Loben, die im Situs lateral an der Flügelanlage liegen. Weißer Pfeil: Verbindung zwischen den großen Loben. Leere Pfeilspitzen: Kleinere Loben sind mit den großen Loben verbunden und stärker in kleinere Kompartimente (Lobuli) unterteilt sind. Gestrichelter Pfeil: Peripher liegende kleine Loben (Lobuli). **B:** Das hämatopoetische Organ bedeckt die Flügelanlage. Gestrichelte Linie: Lage der Flügelanlage. Weißer Pfeil: Verbindung zwischen den großen Loben. **C:** Lagebeziehung der Loben zur Flügelanlage. Weißer Pfeil: Verbindung zwischen den großen Loben.

A Verändert aus C. VON BREDOW, 2010 unveröffentlicht; B gleiches Organ wie in Abbildung 4.10; C aus Abbildung 4.9.

Abkürzungen: EP = Epidermis, HOL = Großer Lobus, WD = Flügelanlage, WDTr = Tracheenknäuel der Flügelanlage, TR = Trachee

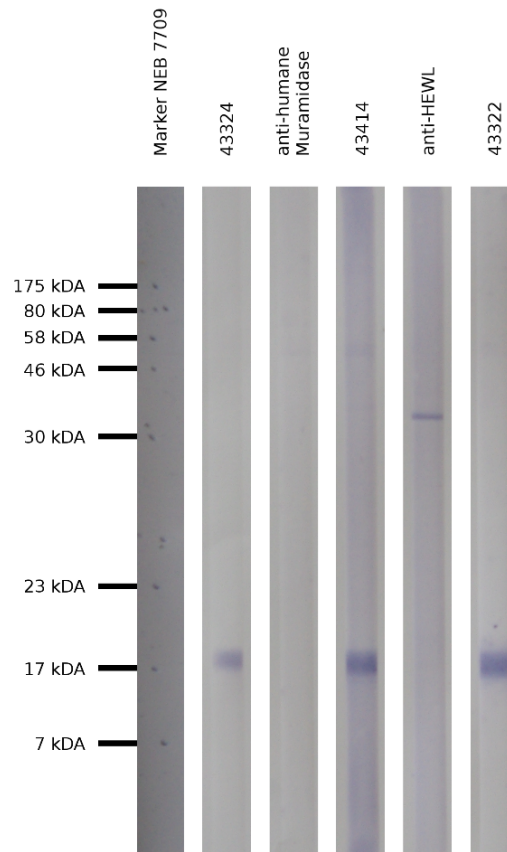


Abbildung A.10: Lysozym-Nachweis in der Hämolymphe einer L5d2-Larve mit verschiedenen Antikörpern.

Western Blot nach denaturierender PAGE mit 10 % PA-Trenngel, 1 mg Hämolymphe pro Spur.

Anti-*H. cecropia* Lysozym-Immunsereen (Chargen #43324, #43414 und #43322) markierten jeweils eine Proteinbande in Höhe von ca. 18 kDa. Anti-humane Muramidase-Immunsereum markierte keine Proteine, anti-Hühnereiweißlysozym (anti-HEWL) markierte eine Bande bei ca. 34 kDa. Die Immunsereen 43324 und 43322 entstammen dem selben immunisierten Kaninchen.

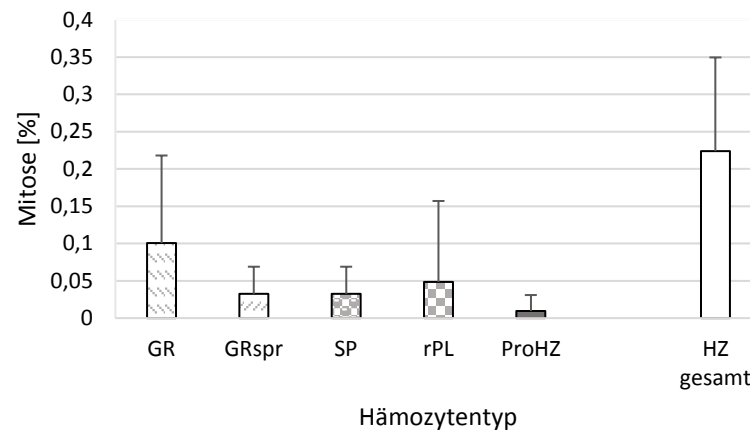


Abbildung A.11: Anteil mitotisch aktiver Hämozytentypen an der Gesamthämozytenpopulation von L5d2-Larven.

Die Werte beruhen auf der mikroskopischen Auswertung DAPI-markierter Zellen ($n = 8.140$) aus $n = 5$ L5d2-Larven. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der mitotischen Aktivität: HZ gesamt $0,3572 \pm 0,2315$ %, GR gesamt (rund + gespreitet) $0,1332 \pm 0,1241$ %, GR $0,1007 \pm 0,1174$ %, GRspr $0,0326 \pm 0,0364$ %, SP $0,0326 \pm 0,0364$ %, rPL $0,0485 \pm 0,1085$ %, ProHZ $0,0096 \pm 0,0214$ %.

Abkürzungen: HZ = Hämozyten, GR = runde granuläre Zellen, GRspr = gespreitete granuläre Zellen, SP = sphärule Zellen, rPL = runde Plasmatozyten, ProHZ = Prohämozyten.

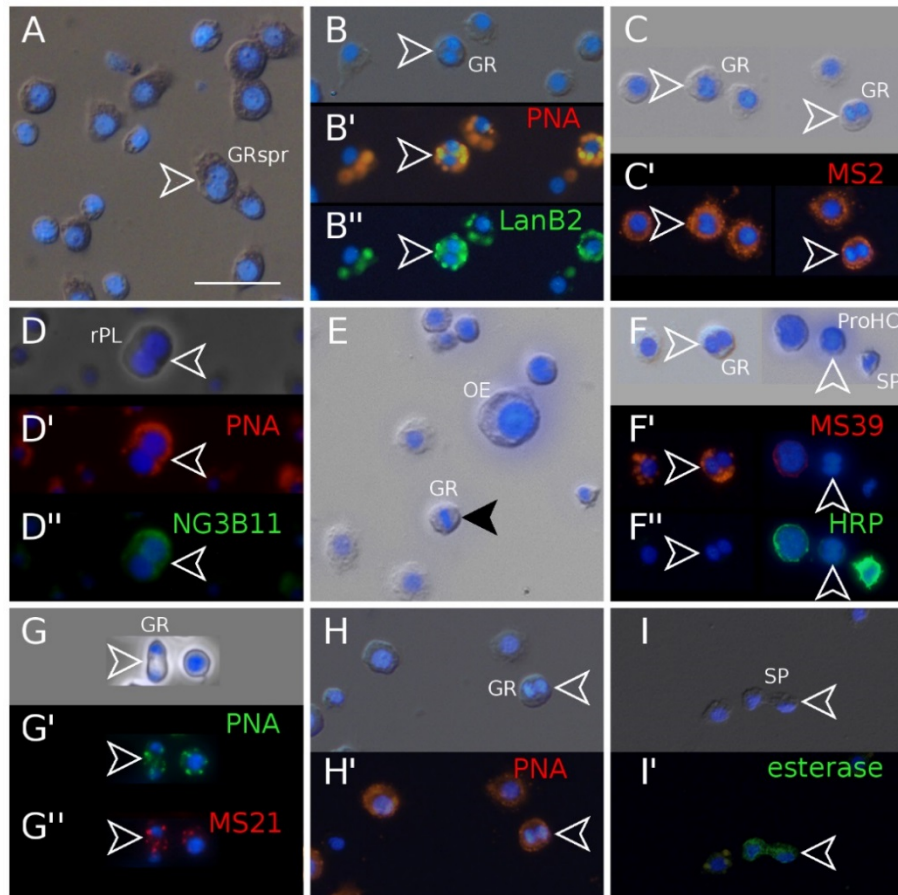


Abbildung A.12: Mitose in verschiedenen Hämozytentypen.

Leere Pfeilspitzen markieren Hämozyten in verschiedenen Phasen der Mitose. Schwarze Pfeilspitze markiert Zelle in Metaphase (E). Antikörper- oder Lektinmarkierungen sind unter den Phasenkontrastaufnahmen angeordnet.

Abkürzungen: GR = granuläre Zelle, GRspr = gespreitete granuläre Zelle, OE = Oenozytoide, ProHC = Prohämozyte, rPL = runde Plasmatozyte, SP = sphärule Zelle.

Messbalken = 20 µm, Messbalken in A gilt für alle Einzelabbildungen.

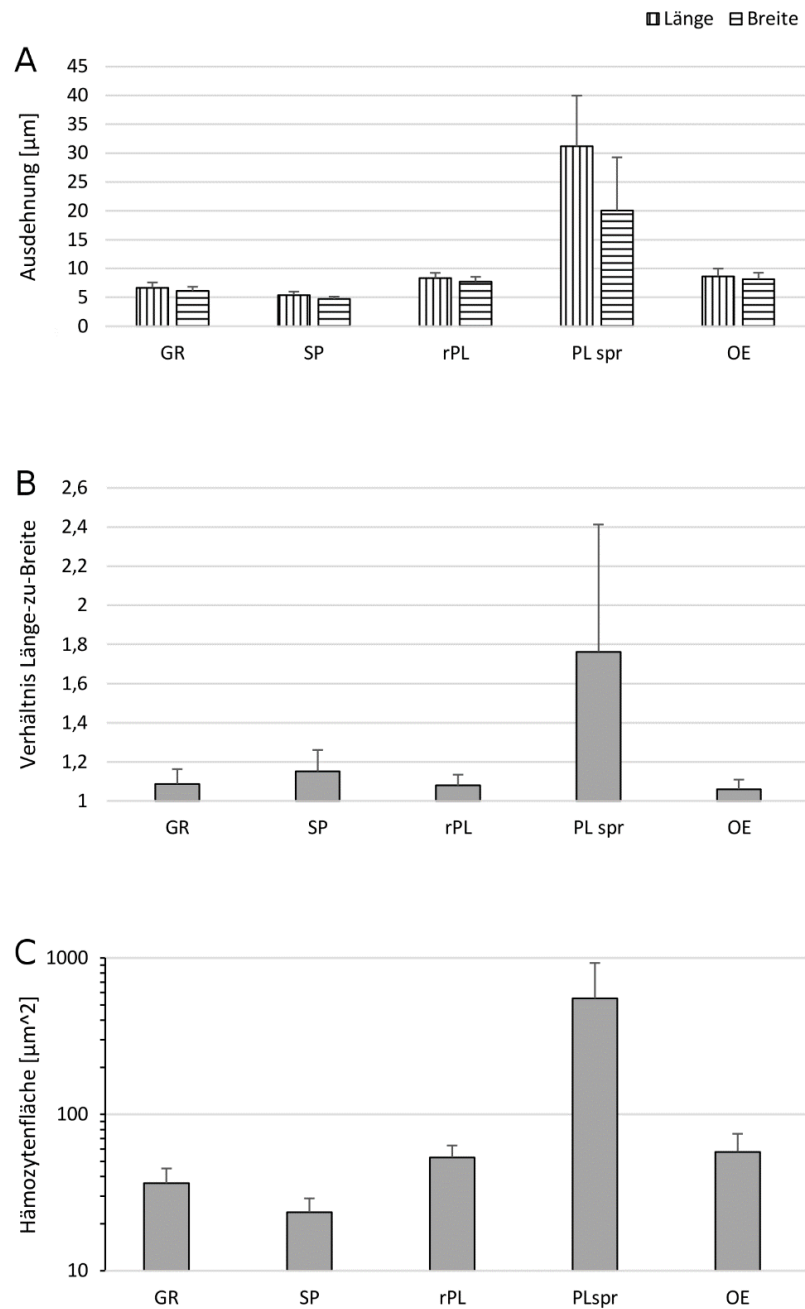


Abbildung A.13: Morphometrische Merkmale der Hämozytentypen.

A: Länge und Breite der Hämozytentypen. **B:** Verhältnis Länge zu Breite. **C:** Fläche der Hämozytentypen. A und B: GR $n = 36$, SP $n = 27$, rPL $n = 33$, PLspr $n = 33$, OE $n = 33$ Zellen analysiert. C: GR $n = 48$, SP $n = 36$, rPL $n = 35$, PLspr $n = 32$, OE $n = 34$ Zellen analysiert. Hämozytenmonolayer von $n = 3$ L5d2-Larven wurden analysiert.

Abkürzungen: GR = granuläre Zellen, SP = sphärule Zellen, rPL = runde Plasmatozyten, PLspr = gespreitete Plasmatozyten, OE = Oenozytoide.

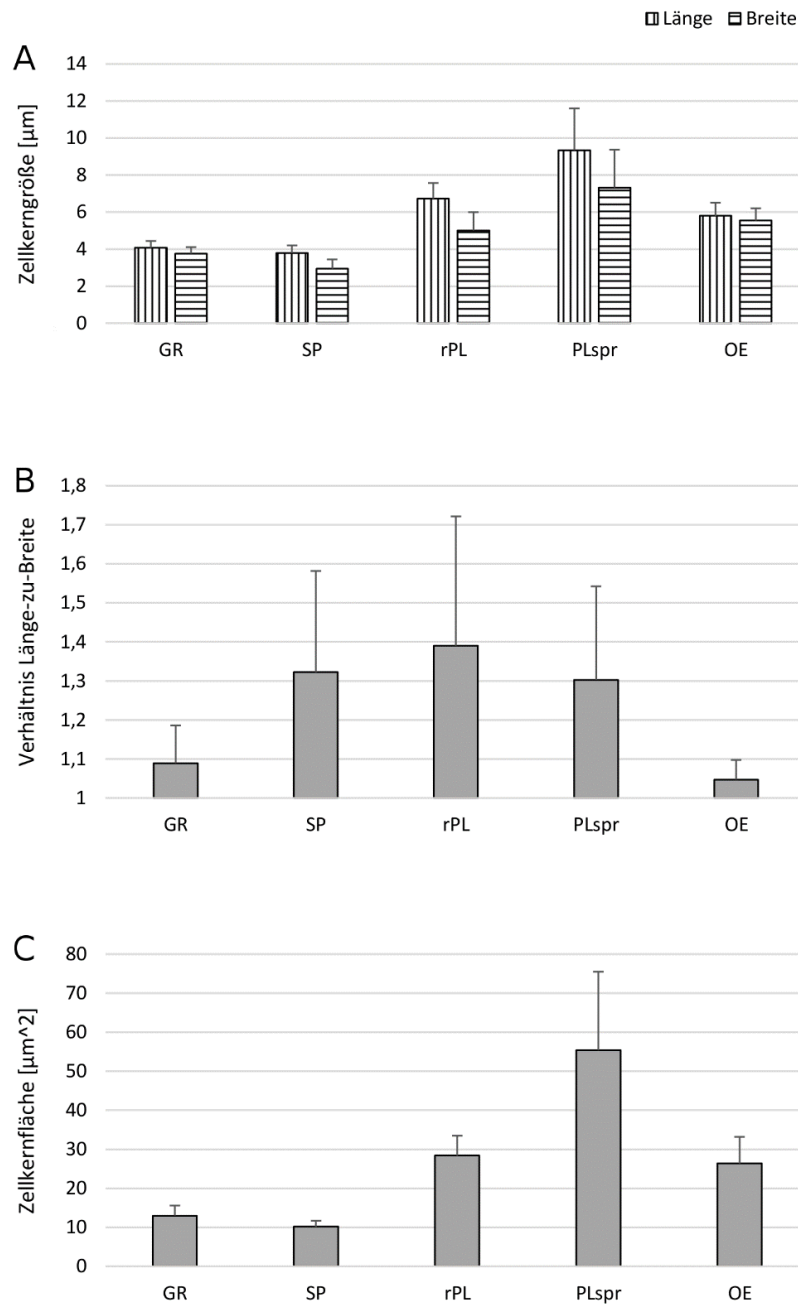


Abbildung A.14: Morphometrische Merkmale der Zellkerne der Hämozytentypen.

A: Länge und Breite der Zellkerne. **B:** Verhältnis Länge zu Breite. **C:** Fläche der Zellkerne.

A und B: GR $n = 35$, SP $n = 34$, rPL $n = 41$, PLspr $n = 31$, OE $n = 35$ Zellen analysiert. C: GR $n = 44$, SP $n = 38$, rPL $n = 33$, PLspr $n = 38$, OE $n = 36$ Zellen analysiert. Hämozytenmonolayer von $n = 3$ L5d2-Larven wurden analysiert.

Abkürzungen: GR = granuläre Zellen, SP = sphärule Zellen, rPL = runde Plasmatozyten, PLspr = gespreitete Plasmatozyten, OE = Oenozytoide.

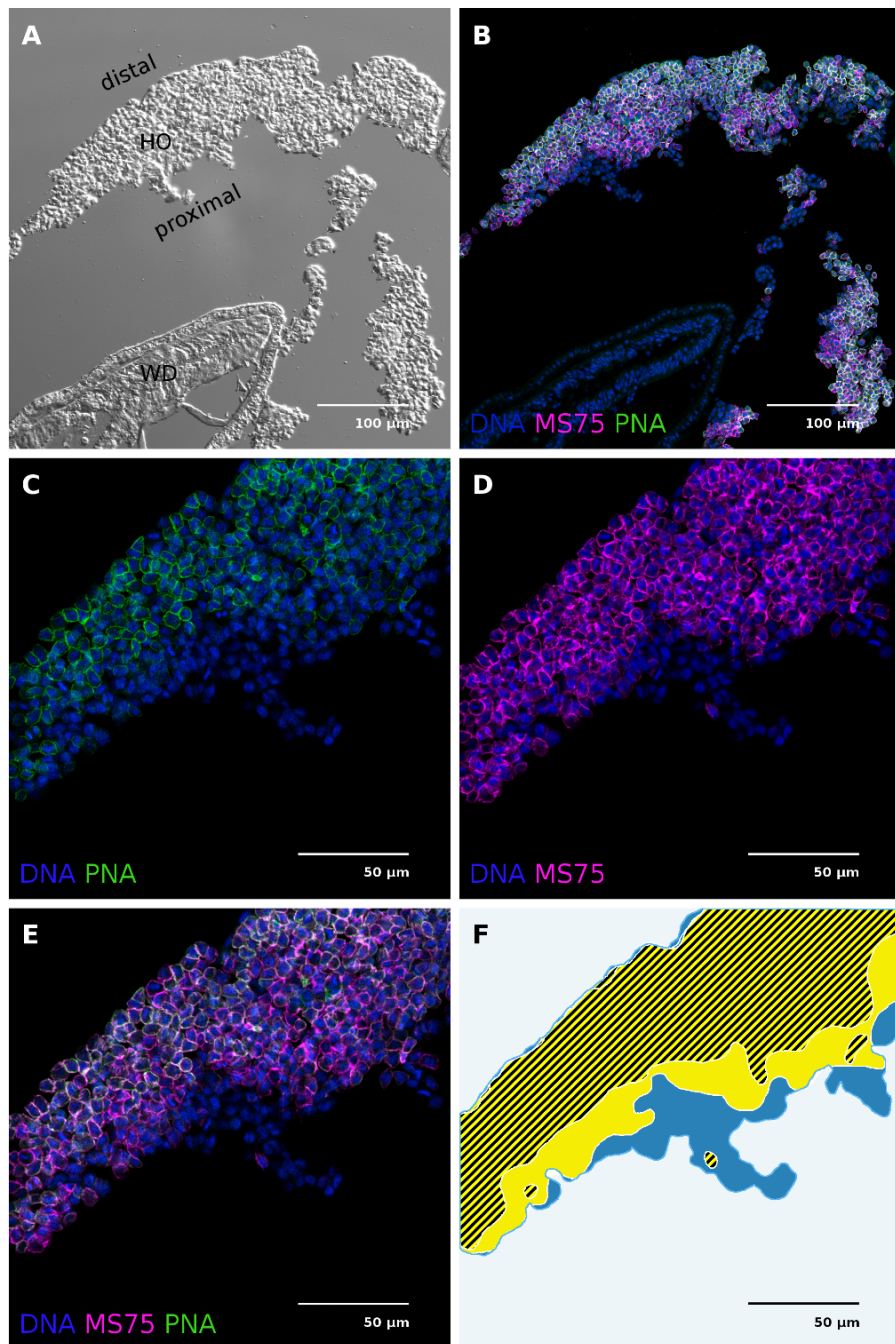


Abbildung A.15: Zonierung des hämatopoetischen Organs exemplarisch für MS75 und PNA.

Ein 7 µm Paraffinschnitt eines mesothorakalen hämatopoetischen Organs und der Flügelanlage wurde mit dem mAb MS75 (magenta) und dem Lektin PNA (grün) markiert. Doppelt markierte Bereiche in Weiß.

A: Übersicht, Transmissions-Scan. **B:** Übersicht, Doppelmarkierung mit PNA und dem mAb MS75. **C:** Detailaufnahme, PNA-markiert. **D:** Detailaufnahme, MS75-markiert. **E:** Detailaufnahme, Überlagerung der MS75- und der PNA-Markierung. **F:** Schematische Darstellung der Zonierung. Blau = keine Markierung durch PNA oder MS75, gelb = Zone positiv für MS75, schwarz-gelb-gestreift = Zone positiv für MS75 und PNA.

A.2 Tabellen

Tabelle A.1 Antikörperbindung an Hämozyten und dem hämatopoetischen Organ von *Manduca sexta*.

Antikörper / Lektin	Epitop / Markierung	Hämozyten L5d2 naiv					HO L5d2 whole mount	HO L5d2 ECM whole mount	HO in vitro	Quelle / Litera- tur
		Pro HZ	GR	PL	OE	SP				
12F6	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	a)
43E9A10	<i>P. inclusens</i> protein P23, Plasmatozyten	-	-	-	- ?	-	-	-	ND	b), c)
45E7B9	<i>P. inclusens</i> GR, SP, OE, PL	-	+	-	- ?	+	-	+	ND	b)
49B8B10	<i>P. inclusens</i> GR, SP	?	+	-	-	+	-	+	ND	b)
anti- <i>A. gambiae</i> Immune Factor	<i>Anopheles gambiae</i> immune factor (NF-κB / rel)	-	-	-	-	-	-	-	ND	d)
anti- <i>B. mori</i> PPO	Prophenoloxidase	?	-	-	+	-	-	-	-	e)
anti- <i>D. melanogaster</i> Croquemort	Croquemort	?	+	+	?	-	-	-	ND	f)
anti- <i>D. melanogaster</i> Laminin B2	Laminin B2	+?	+	-	+	-	-	+	ND	g)
anti- <i>E. kuehniella</i> Esterase	Hämolymphesterase	-	-	(+)	-	+	-	-	-	h)
anti- <i>H. cecropia</i> Hemolin P4	Hemolin	-	-	-	-	-	-	-	ND	i)
anti- <i>H. cecropia</i> Lysozym #43322	Lysozym	?	+	+	?	?	+	-	ND	i)
anti- <i>H. cecropia</i> Lysozym #43414	Lysozym	?	+	+	?	?	+	-	ND	i)
anti- <i>H. sapiens</i> Peroxdasin (PXDN)	Peroxdasin	?	+	+	+	+	-	-	ND	g)
anti-Meerrettich- peroxidase (anti-HRP)	Peroxidase aus <i>Armoracia rusticana</i> (Meerrettich)	+	-	+	-	+	+	-	+	j)
anti- <i>M. sexta</i> βGRP1-3a	β-1,3-glucan recognition protein 1	+?	-	-	+	-	-	-	-	k)
anti- <i>M. sexta</i> βGRP2-3b	β-1,3-glucan recognition protein 2	-	-	-	-	-	-	-	ND	l)
anti- <i>M. sexta</i> IML-2	Immulectin-2	+?	+	+	+	+	-	-	-	m)
anti- <i>M. sexta</i> PGRP-1	peptidoglycan recognition protein 1	-	-	-	-	-	-	-	ND	l)
anti- <i>M. sexta</i> PPO	Prophenoloxidase	?	-	-	+	-	-	-	ND	l)
anti- <i>M. sexta</i> Scolexin	Scolexin	?	+	+	+	+	-	+	ND	a)
MS2	ND	+?	+	-	+	-	-	-	-	n)
MS7	ND	+?	+	-	+?	-	-	-	-	n)
MS8	ND	?	-	+	-	-	+	-	ND	n)
MS13	β-Integrin Untereinheit	+?	-	+	-	-	+	-	+	n), o)
MS21	ND	?	+	-	?	-	-	-	-	n)
MS39	ND	?	+	-	+	-	-	+	-	n)
MS73	ND	?	+	-	+	-	-	+	ND	n)
MS75	ND*	+?	-	+	+	+	+	-	+	n)
MS77	ND	+?	-	+	-	-	+	-	+	n)
MS78	Annexin IX	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	ND	n), p)

a) Prof. T. TRENCZEK; b) STRAND und JOHNSON, 1996, LORET und STRAND, 1998; c) ZHANG *et al.*, 2011; d) BARILLAS-MURY *et al.*, 1996; e) IWAMA und ASHIDA, 1986; f) MANAKA *et al.*, 2004; g) Abcam h) MANN 1992; i) TRENCZEK und FAYE, 1988; j) Sigma Aldrich; k) MA und KANOST, 2000; l) Dr. M. KANOST; m) YU und KANOST 2000; n) WILLOT *et al.*, 1994; o) LEVIN *et al.*, 2005; p) LESCH, 2005; * Y. VON BREDOW *et al.*, in Vorbereitung.

Tabelle A.2 Hämatopoiesefaktoren und hämozytentypisch exprimierte Gene von Arthropoden, für die keine ähnlichen Sequenzen in der Manduca Base-Datenbank hinterlegt sind oder die Übereinstimmung zu niedrig ist.

Gen	Spezies	Funktion	Quelle	Sequenz Manduca Base
P23	<i>Chrysodeixis includens</i> (syn. <i>Pseudoplusia includens</i>)	Marker für kapselbildende Plasmatozyten	ZHANG <i>et al.</i> 2011	Keine Übereinstimmung
<i>atilla</i>	<i>D. melanogaster</i>	Lamellozytenmarker	HONTI <i>et al.</i> , 2009	Msex2.13710-RA E-Wert $5 \cdot 10^{-7}$, Identität 25 %
<i>glial cells missing</i>	<i>D. melanogaster</i>	Differenzierung der Plasmatozytenlinie, Transkriptionsfaktor	BERNARDONI <i>et al.</i> , 1997; ALFONSO und JONES, 2002	Msex2.07726-RA, E-Wert 0,13
<i>glial cells missing 2</i>	<i>D. melanogaster</i>	Differenzierung der Plasmatozytenlinie, Transkriptionsfaktor	ALFONSO und JONES, 2002	Msex2.07415-RA, -RB, E-Wert 1,1
<i>hemese</i> (He-PB und He-PC)	<i>D. melanogaster</i>	Repression der Lamellozyten-differenzierung, Einkapselungsprozess	KURUCZ <i>et al.</i> , 2003; EVANS und BANERJEE, 2003	Keine Übereinstimmung
<i>astakine 1</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Cytokin, Stimulation der Hämatopoese und Hämozytendifferenzierung	LIN und SÖDERHÄLL, 2011	Msex2.09115-RA E-Wert 0,028
<i>crustacean hematopoietic factor</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Ziel von Astakin 1, induziert Astakin 1 Expression in HPT von <i>P. leniusculus</i> , CRIM	LIN <i>et al.</i> , 2011	Msex2.00834-RA, -RB, -RC; E-Wert 0,004

Tabelle A.3: Kompetitive Inhibition von primären Antikörpern mit Kohlenhydraten oder Fetuin.

Antikörper wurden mit dem jeweiligen Kohlenhydrat bzw. Glykoprotein vorinkubiert und danach nach dem Hämozyten-Antikörpermarkierungsprotokoll behandelt.

Antikörper	Kohlenhydrat / Glykoprotein (1 % w/v)	Inhibition
MS77	α -D-Lactose	negativ
MS77	α -Rhamnose	negativ
MS77	D(-)Fructose	negativ
MS77	D-Galactose	negativ
MS77	D(+)-Mannose	negativ
MS77	D(+)-Saccharose	negativ
MS77	D(+)-Trehalose	negativ
MS77	Fetuin, bovin	negativ
MS77	Maltose	negativ
MS77	N-Acetyl-D-Galactosamin	negativ
MS77	N-Acetyl-D-Glucosamin	negativ
anti-HRP	α -D-Lactose	negativ
anti-HRP	α -Rhamnose	negativ
anti-HRP	D(-)Fructose	negativ
anti-HRP	D-Galactose	negativ
anti-HRP	D(+)-Mannose	negativ
anti-HRP	D(+)-Saccharose	negativ
anti-HRP	D(+)-Trehalose	negativ
anti-HRP	Fetuin, bovin	negativ
anti-HRP	Maltose	negativ
anti-HRP	N-Acetyl-D-Galactosamin	negativ
anti-HRP	N-Acetyl-D-Glucosamin	negativ

Tabelle A.4: DAPI-Intensität der Hämozytentypen in Relation zu granulären Zellen.

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

	rel. DAPI-Inten- sität	Zellen	Tiere
GR	$1,22 \pm 0,38$	$n = 86$	$n = 3$
GRspr	$1,32 \pm 0,84$	$n = 112$	$n = 5$
rPL	$3,11 \pm 0,65$	$n = 76$	$n = 5$
PLspr	$3,86 \pm 0,94$	$n = 60$	$n = 5$
OE	$3,20 \pm 1,28$	$n = 66$	$n = 5$
SP	$0,81 \pm 0,25$	$n = 174$	$n = 5$
PNA ⁺	$1,38 \pm 0,43$	$n = 46$	$n = 5$

Tabelle A.5: Statistische Analyse der DAPI-Intensität der Hämozytentypen in Relation zu granulären Zellen.
Signifikanzanalyse zwischen den einzelnen Hämozytentypen, Mann-Whitney-U-Test.

	GRspr	rPL	PLspr	OE	SP	PNAm+
GR	$p = 0,09747$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$	$p = 0,008607$
GRspr		$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$	$p = 0,437$
rPL			$p = 2,17E-09$	$p = 0,5628$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$
PLspr				$p = 5,04E-06$	$p < 2,2e-16$	$p < 2,2e-16$
OE					$p < 2,2e-16$	$p = 6,66E-16$
SP						$p < 2,2e-16$

Tabelle A.6: Differentielle Zellzahlermittlung von *in-vitro*-kultivierten Zellen des hämatopoetischen Organs.
Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung.

Antikörper/ Lektin	adhärent [%]	nicht-adhärent [%]
MS2	$0,51 \pm 0,89$	$0,00 \pm 0,00$
MS13	$92,81 \pm 11,60$	$92,84 \pm 12,44$
MS75	$98,41 \pm 0,80$	$100,00 \pm 0,00$
MS77	$74,17 \pm 2,88$	$85,20 \pm 11,62$
NG3B11	$76,60 \pm 19,42$	$48,83 \pm 23,60$
PNA	$12,59 \pm 10,00$	$72,37 \pm 19,44$
HRP	$90,61 \pm 10,72$	$61,21 \pm 21,59$
GRP-1	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
PPO	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
GRP-1	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Esterase	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$

Tabelle A.7: Unterschiede der Anteile für verschiedene Marker positive Zellen zwischen adhärenen und nicht-adhärenen Zellen des hämatopoetischen Organs *in vitro*.

Markierte Zellen in % $\pm$ Standardabweichung; signifikante Unterschiede zwischen adhärenen und nicht-adhärenen Zellen, die positiv für den jeweiligen Marker waren, wurden mit einem ungepaarten *t*-Test bestimmt.

	adhärent [%]	nicht-adhärent [%]	<i>p</i>
HRP	$90,61 \pm 10,72$	$61,21 \pm 21,59$	0,086
MS2	$0,51 \pm 0,89$	$0,00 \pm 0,00$	0,374
MS13	$92,81 \pm 11,60$	$92,84 \pm 12,44$	0,998
MS75	$98,41 \pm 0,80$	$100,00 \pm 0,00$	0,006
MS77	$74,17 \pm 2,88$	$85,20 \pm 11,62$	0,119
NG3B11	$76,60 \pm 19,42$	$48,83 \pm 23,60$	0,017
PNA	$12,59 \pm 10,00$	$72,37 \pm 19,43$	0,000
PPO	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	N/A (0%/0%)
β GRP-1	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	N/A (0%/0%)
Esterase	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	N/A (0%/0%)

Tabelle A.8: Subpopulationen adhärenter Zellen des hämatopoetischen Organs *in-vitro*.

Signifikante Unterschiede des prozentualen Anteils zwischen den durch Antikörper- oder Lektinmarkierung identifizierten Subpopulationen wurden mittels ungepaartem t-Test ermittelt.

	MS2	MS13	MS75	MS77	NG3B11	PNA	PPO	βGRP-1	Esterase
HRP	$p = 0,004$	$p = 0,809$	$p = 0,335$	$p = 0,110$	$p = 0,303$	$p = 0,000$	$p = 0,005$	$p = 0,005$	$p = 0,005$
MS2		$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,001$	$p = 0,053$	$p = 0,423$	$p = 0,423$	$p = 0,423$
MS13			$p = 0,406$	$p = 0,021$	$p = 0,187$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
MS75				$p = 0,000$	$p = 0,066$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
MS77					$p = 0,795$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
NG3B11						$p = 0,000$	$p = 0,001$	$p = 0,001$	$p = 0,001$
PNA							$p = 0,048$	$p = 0,048$	$p = 0,048$
PPO								N/A	N/A
βGRP-1									N/A

Tabelle A.9: Subpopulationen nicht-adhärenter Zellen des hämatopoetischen Organs *in-vitro*.

Signifikante Unterschiede des prozentualen Anteils zwischen den durch Antikörper- oder Lektinmarkierung identifizierten Subpopulationen wurden mittels ungepaartem t-Test ermittelt.

	MS2	MS13	MS75	MS77	NG3B11	PNA	PPO	βGRP-1	esterase
HRP	$p = 0,011$	$p = 0,044$	$p = 0,037$	$p = 0,146$	$p = 0,211$	$p = 0,146$	$p = 0,011$	$p = 0,011$	$p = 0,011$
MS2		$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,001$	$p = 0,000$	N/A	N/A	N/A
MS13			$p = 0,333$	$p = 0,447$	$p = 0,001$	$p = 0,153$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
MS75				$p = 0,046$	$p = 0,001$	$p = 0,013$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
MS77					$p = 0,005$	$p = 0,549$	$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
NG3B11						$p = 0,003$	$p = 0,001$	$p = 0,001$	$p = 0,001$
PNA							$p = 0,000$	$p = 0,000$	$p = 0,000$
PPO								N/A	N/A
βGRP-1									N/A

Tabelle A.10: Statistische Analyse der Durchmesser verschiedener Zelltypen.

Zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test.

	rPL	OE	SP	PNAm+ HZ	PNAm+ HOwm	PNAm+ HOiv
GR	$p < 2.2\text{e-}16$	$p < 2.2\text{e-}16$	$p < 2.2\text{e-}16$	$p = 0.08671$	$p = 3.47\text{E-}12$	$p = 5.31\text{E-}16$
rPL		$p = 0.04908$	$p < 2.2\text{e-}16$	$p = 7.53\text{E-}12$	$p = 0.05098$	$p = 3.73\text{E-}06$
OE			$p < 2.2\text{e-}16$	$p = 1.97\text{E-}11$	$p = 0.001157$	$p = 0.5028$
SP				$p < 2.2\text{e-}16$	$p < 2.2\text{e-}16$	$p < 2.2\text{e-}16$
PNAm+ HZ					$p = 2.73\text{E-}07$	$p = 9.71\text{E-}12$
PNAm+ HOwm						$p = 1.19\text{E-}05$

Tabelle A.11 Statistische Analyse des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses verschiedener Hämozytentypen und PNA-positiven Zellen des hämatopoetischen Organs.

Zweiseitiger Mann-Whitney-*U*-Test.

	rPL	OE	SP	PNAm+ HZ	PNAm+ HOwm	PNAm+ HOiv
GR	$p = 5,89\text{E-}16$	$p = 3,48\text{E-}05$	$p = 4,35\text{E-}16$	$p = 3,20\text{E-}15$	$p < 2,2\text{E-}16$	$p < 2,2\text{E-}16$
rPL		$p = 3,76\text{E-}08$	$p = 0,01168$	$p = 1,28\text{E-}06$	$p = 0,1129$	$p = 0,0012$
OE			$p = 2,34\text{E-}05$	$p = 2,02\text{E-}13$	$p = 1,68\text{E-}11$	$p = 1,28\text{E-}01$
SP				$p = 2,31\text{E-}10$	$p = 3,85\text{E-}05$	$p = 9,95\text{E-}06$
PNAm+ HZ					$p = 7,73\text{E-}05$	$p = 0,04877$
PNAm+ HOwm						$p = 0,02692$

Tabelle A.12: Statistische Auswertung der Wachstumsrate von L5-Larven nach Infektionen.

Zweiseitiger Mann-Whitney-*U*-Test.

	Saline injiziert	<i>E. coli</i> K12 injiziert	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> gefüttert
unbehandelt	$p = 0,01107$	$p = 0,0006583$	$p = 0,00003226$
Saline injiziert		$p = 0,2727$	$p = 0,00003226$
<i>E. coli</i> K12 injiziert.			$p = 0,00003226$

Tabelle A.13: Statistische Auswertung der Lysozymaktivität der Hämolymphe nach Infektionen.

Zweiseitiger Mann-Whitney-*U*-Test.

	Saline injiziert	<i>E. coli</i> K12 injiziert	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> gefüttert
unbehandelt	$p = 0,4883$	$p = 0,0001738$	$p = 0,01643$
Saline-injiziert		$p = 0,0006566$	$p = 0,05632$
<i>E. coli</i> K12 injiziert.			$p = 0,01294$

Tabelle A.14: Statistische Auswertung der anti-*E. coli* K12 D31-Aktivität der Hämolymphe nach Infektionen.

Zweiseitiger Mann-Whitney-*U*-Test.

	Saline injiziert	<i>E. coli</i> K12 injiziert	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> gefüttert
unbehandelt	$p = 0,872$	$p = 0,002867$	$p = 0,01292$
Saline injiziert		$p = 0,0004034$	$p = 0,002593$
<i>E. coli</i> K12 injiziert.			$p = 0,06842$

Tabelle A.15: Cycle thresholds (Cts) der real-time qPCR-Analysen von L5d2-Larven.

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von $n = 3$ unabhängigen Analysen von Geweben aus jeweils $n = 4$ Tieren. Niedrigere Werte bedeuten höhere mRNA-Konzentration. N/A = kein Signal nach 40 PCR-Zyklen.

<u>Hämozyten</u>					<u>Hämatopoetisches Organ</u>				
	unbe- handelt	Saline injiziert	<i>B. th. ssp.</i> <i>kurstaki</i> gefüttert	<i>E. coli</i> K12 inj.		unbe- handelt	Saline injiziert	<i>B. th. ssp.</i> <i>kurstaki</i> gefüttert	<i>E. coli</i> K12 inj.
RPS3	19,77 $\pm$ 0,63	19,73 $\pm$ 0,98	19,98 $\pm$ 0,74	19,92 $\pm$ 0,54	RPS3	19,57 $\pm$ 1,48	19,36 $\pm$ 1,56	19,25 $\pm$ 1,31	19,54 $\pm$ 1,22
EF1A	18,29 $\pm$ 0,44	18,12 $\pm$ 0,80	18,07 $\pm$ 0,70	17,96 $\pm$ 0,56	EF1A	17,59 $\pm$ 1,48	17,76 $\pm$ 1,48	17,37 $\pm$ 1,48	17,55 $\pm$ 1,05
Lysozym	21,32 $\pm$ 0,40	20,42 $\pm$ 0,76	20,42 $\pm$ 0,58	18,65 $\pm$ 0,65	Lysozym	25,38 $\pm$ 1,62	25,36 $\pm$ 0,96	22,90 $\pm$ 0,21	22,95 $\pm$ 1,31
PGRP-1A	26,10 $\pm$ 0,51	25,74 $\pm$ 0,94	26,00 $\pm$ 0,71	24,67 $\pm$ 0,41	PGRP-1A	30,88 $\pm$ 1,75	30,33 $\pm$ 0,84	25,89 $\pm$ 0,48	29,03 $\pm$ 0,49
Scolexin A	33,92 $\pm$ 0,40	33,36 $\pm$ 1,43	33,40 $\pm$ 0,51	31,96 $\pm$ 0,87	Scolexin A	33,99 $\pm$ 0,55	32,76 $\pm$ 1,83	32,68 $\pm$ 1,18	28,72 $\pm$ 1,38
IML-3	31,15 $\pm$ 0,39	30,73 $\pm$ 1,17	32,15 $\pm$ 0,98	32,51 $\pm$ 2,38	IML-3	33,84 $\pm$ 2,37	33,19 $\pm$ 2,56	30,69 $\pm$ 1,02	32,27 $\pm$ 2,05

<u>Fettkörper</u>					<u>Mitteldarm</u>				
	unbe- handelt	Saline injiziert	<i>B. th. ssp.</i> <i>kurstaki</i> gefüttert	<i>E. coli</i> K12 inj.		unbe- handelt	Saline injiziert	<i>B. th. ssp.</i> <i>kurstaki</i> gefüttert	<i>E. coli</i> K12 inj.
RPS3	20,28 $\pm$ 1,28	20,87 $\pm$ 0,76	20,60 $\pm$ 1,31	20,99 $\pm$ 0,87	RPS3	21,44 $\pm$ 0,81	21,46 $\pm$ 0,43	20,95 $\pm$ 0,74	21,29 $\pm$ 0,48
EF1A	19,57 $\pm$ 1,03	18,69 $\pm$ 0,77	18,62 $\pm$ 1,05	18,71 $\pm$ 0,74	EF1A	19,63 $\pm$ 0,77	19,70 $\pm$ 0,39	18,97 $\pm$ 0,48	19,52 $\pm$ 0,30
Lysozym	19,60 $\pm$ 0,45	17,99 $\pm$ 0,84	17,42 $\pm$ 0,87	16,75 $\pm$ 0,90	Lysozym	23,86 $\pm$ 0,99	22,66 $\pm$ 0,97	20,07 $\pm$ 0,50	22,30 $\pm$ 0,56
PGRP-1A	23,44 $\pm$ 1,27	22,39 $\pm$ 0,45	19,27 $\pm$ 1,07	22,35 $\pm$ 0,48	PGRP-1A	25,80 $\pm$ 1,04	24,73 $\pm$ 0,57	23,51 $\pm$ 0,60	23,84 $\pm$ 0,46
Scolexin A	29,49 $\pm$ 1,22	26,30 $\pm$ 1,39	25,20 $\pm$ 1,15	20,28 $\pm$ 0,16	Scolexin A	31,35 $\pm$ 2,86	30,98 $\pm$ 1,78	25,74 $\pm$ 1,62	29,93 $\pm$ 1,08
IML-3	24,95 $\pm$ 0,68	24,59 $\pm$ 0,83	23,38 $\pm$ 0,53	23,88 $\pm$ 1,04	IML-3	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabelle A.16: *Cycle thresholds* (Cts) der *real-time* qPCR-Analysen des Mitteldarms von L5d13-Larven (Präpuppe).

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von $n = 3$ unabhängigen Analysen von Mitteldarmgewebe aus jeweils $n = 1$ Larve. Niedrigere Werte bedeuten höhere mRNA-Konzentration. N/A = Kein Signal nach 40 PCR-Zyklen.

RPS3	21,57 $\pm$ 0,77
EF1A	19,86 $\pm$ 0,80
Lysozym	15,16 $\pm$ 0,76
PGRP-1A	22,14 $\pm$ 0,29
Scolexin A	34,13 $\pm$ 1,40
IML-3	N/A

Appendix

Tabelle A.17: Bestimmungsmerkmale für die Hämozytentypen von *Manduca sexta*-Larven.

Hämozytentyp	Monospezi- fische Marker	Zellmorphologie	Pseudopodien	Zelldurchmesser [µm] c)	relative DAPI- Intensität	N:C-Ratio	Kernmorphologie	Kerndurchmesser (Länge / Breite) [µm] d)
granuläre Zellen rund	MS7	rund, regelmäßig	selten Mikropikes	6,55 ± 0,99 µm	1,22 ± 0,38	0,63 ± 0,22	rund	4,07 ± 0,37 / 3,75 ± 1,09
granuläre Zellen gespreitet	MS7	gespreitet	Lamellopodien, saumartig	ND b)	1,32 ± 0,84	ND b)	rund-oval	4,29 ± 0,41 / 3,72 ± 0,44
Plasmatozyten rund	MS13, MS77	rund, regelmäßig a)	Nein a)	8,26 ± 0,89 µm	3,20 ± 1,28	1,21 ± 0,42	groß, unregelmäßig bis oval, groß	6,73 ± 0,84 / 5,01 ± 0,99
Plasmatozyten gespreitet	MS13, MS77	gespreitet	Filopodien, Lamellopodien	ND b)	3,85 ± 0,95	ND b)	groß, unregelmäßig	9,35 ± 2,25 / 7,33 ± 2,05
sphärule Zellen	anti-Esterase	rund, unregelmäßig rund oder langgestreckt	Nein e)	5,35 ± 0,53 µm	0,81 ± 0,25	1,09 ± 0,44	unregelmäßig rund, dreieckig, halbmondförmig	3,79 ± 0,41 / 2,95 ± 0,50
Oenozytoide	anti-PPO, anti- βGRP-1	rund bis oval	Nein	9,25 ± 1,98 µm	3,20 ± 1,28	0,82 ± 0,25	rund	5,80 ± 0,71 / 5,54 ± 0,66
PNAm+-HZ	-	rund	Nein	6,89 ± 1,17 µm	1,38 ± 0,43	1,77 ± 0,56	rund	4,44 ± 0,71 / 4,11 ± 0,59

a) Übergänge von runden zu gespreiteten Plasmatozyten weisen feine Filopodien oder kleine Lamellopodien auf, die häufig nur in eine Richtung weisen. In nicht fixierten Präparaten sind auch spindelförmige PL zu finden.

b) Aufgrund der gespreiteten, abgeflachten Form sind diese Werte nicht mit runden Hämozyten vergleichbar und wurden deshalb nicht gemessen.

c) Länge und Breite sind Abbildung A.13 zu entnehmen.

d) Siehe auch Abbildung A.14.

e) In nicht fixierten Präparaten können einzelne, unidirektional ausgeprägte Zytoplasmaausstülpungen auftreten (pers. Mitteilung TRENCZEK).

Tabelle A.18: Anteil durch Hämozytenmarker markierter PNA-Zellmembran positiver Hämozyten.

	Anteil der doppelmarkierten Zellen (PNAm ⁺ und Hämozytenmarker) an den Gesamthämozyten [%]	Anteil der doppelmarkierten Zellen an den PNAm ⁺ Hämozyten [%]	Anteil der PNAm ⁺ Hämozyten an den Gesamthämozyten [%]
MS75	1,35 ± 1,42	82,5 ± 23,63	1,41 ± 1,36
MS77	0,57 ± 0,43	49,86 ± 36,77	0,97 ± 0,38
MS13	0,06 ± 0,09	5,40 ± 6,39	1,16 ± 0,21
MS7	0,44 ± 0,15	59,72 ± 8,33	0,77 ± 0,34
anti-βGRP-1	1,29 ± 0,68	60,21 ± 7,09	2,10 ± 0,86

Analyse $n = 3659$ Zellen (MS75), $n = 2569$ Zellen (MS77), $n = 3533$ Zellen (MS13), $n = 3230$ Zellen (MS7), $n = 2175$ Zellen (anti-βGRP-1) aus $n = 4$ L5d2-Larven. Ausschließlich kleine PNAm⁺ Hämozyten (ca. Größe von granulären Zellen, vergl. Abbildung 4.19 A) wurden ausgewertet, typische sphärule Zellen, Oenozytoide und runde Plasmatozyten wurden nicht in die Analyse miteinbezogen.

Tabelle A.19: Zusammensetzung des Kunstfutters für *Manduca sexta*-Larven, modifiziert nach YAMAMOTO (1969).

Vollkornmehl (Roggen- und Weizenmehl 1 + 1)	5,27 % (w/v)
Sojamehl	5,70 % (w/v)
Agar-Agar Kobe I	2,55 % (w/v)
Casein	1,40 % (w/v)
Pflanzenöl	0,16 % (v/v)
Ascorbinsäure	30,02 mM
Methylparaben	11,54 mM
Sorbinsäure	15,66 mM
Formaldehyd	5,33 mM
CaCO ₃	5,28 mM
NaCl	9,03 mM
Nikotinsäure	97,47 µM
Riboflavin	15,94 µM
Folsäure	6,34 µM
Pyridoxin	16,55 µM
Thiaminhydrochlorid	9,31 µM
Biotin	9,28 µM

A.3 Nukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen

Msex2.07580-RB (Eater-like-Protein) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des größten offenen Leserasters. ZHANG *et al.* (2015) beschreiben ein Eater-Protein für *M. sexta*. Die Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz sowie Manduca Base oder Genbank Identifizierungsnummern sind in dieser Arbeit nicht hinterlegt.

```

atggtgttaattaaagtgagtggtgtgtgtatattcctgttttgtgttttattggactgt
M V L I K V S V L C I F L F C V L L D C
gaagcgctcagagatggtgatagaggtgtcatcgcggtttatataacaaaacctagagtt
E A L R D G D R G V I A V Y I T K P R V
ataaccagaaaggcttacacatggagggaatgtaagaagaaaccgccatgcatattaaga
I T R K A Y T W R E C K K K P P C I L R
agtacaataacatatcaacagaagacgttcaaatgtgacagcggttgggtgtacaatagt
S T I T Y Q Q K T F K C D S G W V Y N S
ggaaggacatctgcggccgatttgcggctcaggttgtctcaacggcagctgtttaagt
G K D I C R P I C G S G C L N G T C L S
cctggtaattgtcactgcgagccgctgaggttgcggaacggcgctgtgtccagcct
P G N C H C E P P L R L R N G A C V Q P
gtttgcgcaccggtctgtgtgccccaacagcgactgcacagaaaccgatacttgcacctgc
V C A P V C G P N S D C T E T D T C T C
cggaaggattcctggctatcaacacacccactgcgcaccgctgtccgctggctac
R E G F L A I N T T H C A P R C P P G Y
ttcaacgatcccatagaatgcaagcccaagtgcgaaagatgcattaacggattttgtctc
F N D P I E C K P K C E R C I N G F C S
gcccagaagtatgcgaatgcaaatgggatacacagttatagacaaccacacatgcggc
A P E V C E C K M G Y T V I D N H T C G
ccggtgtgcacgccctcttgcgagaacgctgattgcatcgaacccaactcctgtcctgc
P V C T P S C E N A D C I E P N S C S C
catgaaggttttactaaaaataatccatggaaatgtgcaccagtttgtgcaaattgtaac
H E G F T K I N P W K C A P V C A N C N
catggggactgcgtagctcctgttaattgtaaatgccatgaagggtatgagatacgtggc
H G D C V A P G N C K C H E G Y E I R G
ggtgtatgtgaaccagtggtgtaagaccatgcgctaacggaacgtgtatagaacctaac
G V C E P V C E R P C A N G T C I E P N
aaatgtcgggtgtaatgtaggttacgacttagacccccataatcaatttaattgtttgcca
K C R C N V G Y D L D P H N Q F N C L P
atttgcgacccgaatgtggaatgcttctgtgtttctccaaatacgtgctccttgccat
I C D P K C V N A S C V S P N T C S C H
aacgggtacgaaacgacaggaaataactggacatgcaaaccctagatgcgaccaatgcgac
N G Y E T T G N N W T C K P R C D Q C D
aatggagattgtatagaacctaaacaaatgccaatgttatcatggatacagagatgggtcac
N G D C I E P N K C Q C Y H G Y E M V H
ggccgatgcgagccgaagtgcagtcgcacttgtgtgaatggcttatgttcgcaacccgaa
G R C E P K C S R T C V N G L C S Q P E
gaatgcacatgttttgacgggtacaccattagtttaaacgaccaatatacttgtatgcg
E C T C F D G Y T I S L N D Q Y T C S P
atttgtgaaccagatgcgttaactcttcatgcgtcgcaccagggaatgcaaatgtttt
I C E P E C V N S S C V A P G Q C K C F
ccaaattatgagtcacggaggtgagacacgagtgcaagccgcactgcgagaaatgcgtt
P N Y E S T E V R H E C K P H C E K C V
aatggtgactgtgtcgctcctgatgtgtgtgtgtgtcacgcgggtacaacggcacgcag
N G D C V A P D V C V C H A G Y N G T Q
ggggcatgcacgccgatttgcgttggctgcgtgaacgggtgactgcgtgcacctgaa
G A C T P I C S V G C V N G D C V A P E
gagtgcgtgtgtcacgcgggatacaaccgcacgcaggcgggtttgcacgccagctgtcatg
E C V C H A G Y N R T Q A V C T P V C M
gatggctgcgtgaacgggtgactgcgtgcacctgaagagtgcgtgtgtcacgcgggtacac
D G C V N G D C V A P E E C V C H A G Y
aaccgcacgcaggaggtttgcacaccagtcctgcatggctggctgcgtgaacggcgactgc
N R T Q E V C T P V C M A G C V N G D C
gtcgctcctgacgagtgctgtgtgcacttgggtacaatcgtaacgcagggggcttgcgtg
V A P D E C V C H L G Y N R T Q G A C M
ccggtctgctcggctggttgcgtcgatcctgatgtgtgcgttttgcacggtgtacaac
P V C S A G C V D P D V C V C H A G Y N
agcacgcaggagtttgcacgtcccgctcgtcggctggctgtgcaaatggagattgcgtc
S T Q G V C M P V C S A G C A N G D C V
gtcctgacgaatgtgtgtgtcacgcagggtacaacctacccaggagcttgcacaccg
A P D E C V C H A G Y N L T Q G A C T P

```

gtctgttcggctggctgcgcgaaacggtgactgcggttgctcctaacgagtgcgtgtgtcac
V C S A G C A N G D C V A P N E C V C H
gcaggggtacaacgacgggcagggggtttgcacgccggtctgctcggctggctgcgtaat
A G Y N D G Q G V C T P V C S A G C V N
agccgatgcacgtccctgaaacttgcaacttgaccttgacggctacataaagaatttgaca
S R C T L P E T C T C L D G Y I K N L T
acccctaattgtgtgctacaaagaatgctcggtccttgcgagcacggtgctgtgatcta
T P N V C Y K E C V G P C E H G A C D L
tatgggaactgtgactgcgaccctggacatatgctgctgaacggcacatgccatgttatt
Y G N C D C D P G H M L L N G T C H V I
gatcccatggactgcagtcctatgttccagtaactgcactgaaggcagttgttggtgtgcc
D P M D C S L C S S N C T E G S C W C A
agtggacagccttgctttttcaacccaacaaaagatgcttcttcgaccagcttggccggc
S G Q P C F F N P T K D A S S T S L A G
ctggagctatcgtggatgctgggagccgggtaggggttccttctcatcgtgctactgctg
L E L S W M L G A G V G F L L I V L L L
gtggtcatcgtgcatcggaagaacaaacaaaatgagagcaaggcgctgacgacgga
V V I V R I G K N K Q N E S K A P D D G
ccttatgggagtggtgttccactgttcccgaactcctaatgcaacgccaacatccacgc
P Y G S V V F T V P E T L M Q R Q H P R
aatggggatagtcaggagcagttctacgaagaagtagctttggacgggagcgagcgag
N G D S Q E Q F Y E E V A L D G R R R E
gagagagatatttcgcagcatctgttagagggcccagccgacgaacgatta
E R D I S Q H L L E G P A D E R L

Msex007423-PA / Msex2.06403-RA (Croquemort-like Protein) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des größten offenen Leserasters. Grau markiert = C-terminale Sequenz, die in der für Msex007423-PA hinterlegten Aminosäuresequenz fehlt.

```
atggtgtcatcaggattaaagagtggccttttcatgggcttcggggccgggctggtggtg
M V S S G L K S G L F M G F G A G L V V
gtcggggccgtcatggtggtttatggcctcctctatttatgtcacaactgcagaggcac
V G A V M V V Y W P P L F M S Q L Q R H
ggtctagttaggtcactgcacatgatgatggtgctgtccccgacttccatgtcgttc
G L V R S L H M M M M V L S P T S M S F
gaaatthggcgagacgccgatcccgatgtatcttgagtggttcatgttcaacatatcg
E I W R E T P I P M Y L E C F M F N I S
aatgtggatgatatthggcggaagaacgtctctttgcaagtcacgcagatggggccg
N V D D I L A G K N V S L Q V T Q M G P
tatgtgttcgggagacgcatagcaaggtgaacctgtcatggaacgataactctacgatt
Y V F R E T H S K V N L S W N D N S T I
acgtactacaaccaacggttttggtagtactacgagccggagctgtccaacggcagctatct
T Y Y N Q R F W Y Y E P E L S N G S L S
gacgagattaccaccatcaaccccatcatcgcgacggtagcctacacgatgcgtaacgag
D E I T T I N P I I A T V A Y T M R N E
cggatgatcatcaagatccctgtagacgtgttccgtgcggtgtaccacagcaacatgttc
R M I I K I P V D V F L R L Y H S N M F
cttaccgccaacgtgtcgtcgtggtgtgtcgacggtatcgatgacccagtggttgacatc
L T A N V S S W L F D G I D D P V L D I
gcgtcgcaattccccaatctcgccatggagataccgtacgacaagttcggatggttttat
A S Q F P N L P M E I P Y D K F G W F Y
gagcgcaacggctccgtagagtttgacggttcgttcataatgagcacgggcgcgcgggac
E R N G S V E F D G S F I M S T G A A D
ttctcacagctcggcaacattcagaagtggcggtattccacacgcacgcggttttagggc
F S Q L G N I Q K W R Y S T R T P F R G
gagtgcggggaggtgaagggtgcacggggagctgtgggccccagagatgggacagccg
E C G E V K G S T G E L W A P E M G Q P
gaggtgtacatatctcgctcggtatatttgacgtacatgataactggccaaggatttgac
E V Y I F A S D I C T Y M I L A K D S D
gtcaccatcgagggtattgacggtgtgacgtacggcggaacgactcgtgttcgacaac
V T I E G I D G V Q Y A A N D S V F D N
ggacatcgataccctcatacggcgtgttactgcgacgaggtgacgacagcagctgcctg
G H R Y P H T A C Y C D E V R D S S C L
ccgccgggcgcgctcaacgtgtcgggtgtgccggttcggagccccggccttcgtctccatg
P P G A L N V S V C R F G A P A F V S M
ccgcacttcctgcacgcccgaacctactacccagcaagatcgacgggctggaccctaaa
P H F L H A D P Y Y P S K I D G L D P K
gaggagtacaaaattccgcctgtcgttgagatgttcacgggcatgccgctcagcgtcgcc
E E Y K F R L S L E M F T G M P L S V A
gcgcagctgcagatcaacctgctggtccgacacgtcagcgggatcagcttgaacaaccag
A Q L Q I N L L V R H V S G I S L N N Q
ctgccgacccccgacacgtggtgccgatgttctggttcggcaggagatgcagacgacg
L P D P D T L V P M F W F R Q E M Q T T
ccggagtacgcccctatggcgctacgctctgcgcctgcgctactgggtgccctacgca
P E Y A A M A R Y A L R L R Y W V P Y A
ctctacgcgtcagcgtaatcggtgtagctctacttatagtagcggtgacagtcctcatc
L Y A L S V I G V A L L I V G V T V L I
aggaggctgctgaagtctcctgaaacaacaccgatcctcgaggagtcgtcatcccaagag
R R L L K S P E T T P I L E E S S S Q E
aaccag
N Q
```

Msex.007423-RA / Msex2.09018-RA (Peroxidasin-like Protein) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des größten offenen Leserasters. ZHANG *et al.* (2015) beschreiben ein Peroxidase-Protein für *M. sexta*. Die Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz sowie Manduca Base oder Genbank Identifizierungsnummern sind in dieser Arbeit nicht hinterlegt.

```
atgccgaagttacgtaaattacgcctggacagcaacgctctgtgctgcgattgctccatg
M P K L R K L R L D S N A L V C D C S M
ctgtgggttggttcggatgctcgccagcacagcgatatgaatgttgccgccacgtgctac
L W L V R M L A Q H S D M N V A A T C Y
caacctgccagcgtcactggaactgcattggcatccatgagcgaaaacgattttaattgt
Q P A S V T G T A L A S M S E N D F N C
cgacatcccgagattaaaactgatccacaagatgtacaagtaagttttggaaatgatgcc
R H P E I K T D P Q D V Q V S F G N D A
acgttcacatgcgttgcaagtggcgaaccggaacctgatattatttggttgctgattcgcg
T F T C V A S G E P E P D I I W L R D S
actgcggtacctttggacggaagcogttatgaacttcttgataatggaactcttatggtt
T A V P L D G S R Y E L L D N G T L M V
catgaacctgatgaaaatgatgtcggagtcttcgaatgtatggctgtaaatcctgctggt
H E P D E N D V G V F E C M A V N P A G
gctgcacattccaaaccggccaaaatgatagttcaacgtgatgcgcaaggagaaagtagt
A A H S K P A K M I V Q R D A Q G E S S
gtacctgaatttacgctcttgccaggagacagattgccaaagtaaaccaaccatttgta
V P E F T L L P R R Q I A K V N Q P F V
agtttcgattgtgtagcaagtggcttcccaatgcctcatctaattgtggcttcttaacggt
S F D C V A S G F P M P H L M W L L N G
gaaagaatttttataactgaacggatgtctattcatcgcaatggcactttgtcgataaag
E R I L L T E R M S I H R N G T L S I K
aatgttcaagaagcagatgcagcgcaatatacatgccaaagctgaaaataggcacggaaaa
N V Q E D D A G E Y T C Q A E N R H G K
gttgcacatcagtttccactgaagtgaagctgctccatcatttattgttgcgaac
V A T S V S L E V K A A P S F I V V P N
aatgaaactgttgctctcgagataacgctgaatttatgtgttcgctaggggcatctcct
N E T V A L G D N A E F M C S A R G I P
aggcctatactgaaatgttccgaaacactttaatcttacccgagcgcaaaatgtaata
R P I L K W F R N T L I L P P G E N V I
tttaatgacgattatcaaaacttgacactagtcgcagtaacgaatgaagacgaaggaatt
F N D D Y Q N L T L V A V T N E D E G I
tatcactgttagggcagaaaaacactgaggggcaaatagaagcttcggctatattaaagtc
Y H C R A E N T E G Q I E A S A I L K V
caagatatcaaggaattcctcctaagatcgattgaagcctgaagataccgacgcttat
Q D I K V I P P K I V L K P E D T D A Y
aaagaacatctgtacaaattaccgtgtgaggtagaaaagcgagcctccagcaacagtaga
K E T S V Q L P C E V E S E P P A T V E
tgagcgaaggatggttctcgatatttgataacgaaagaatttctataacacttattgga
W T K D G S R I L D N E R I S I T L I G
agccttattattagaacgtatcagtgactgacagcggtcggtatgaatgttctagctttt
S L I I R N V S V T D S G R Y E C S A F
aacgaatatggtcgtagactacttctgttttcttaacagtaaaagatcatgtgcttcca
N E Y G R D T T S V F L T V K D H V L P
ggagacgagtatgttaatatcgctttaacacaaagctactcgtagcgttgtagcggccatt
G D E Y V N I A L T Q A T R D V D Q A I
gcacgaacaattgaagaaatgtttaaaaataacagttctaaggtagatatccatgatctc
A R T I E E M F K N N S A K V D I H D L
tacagaatgaccagatttccgaatgccctgcgagagaaattgcacgcgcagcgaatt
Y R M T R F P N A P A R E I A R A A E I
tacgaaaggaccttgataaagttaaagaatatatccaaaatggccagaaaattaattca
Y E R T L D K V K E Y I Q N G Q K I N S
gcagaaccatttaattatcagaatgttctaacaacgaacacttgacattatcgctaga
A E P F N Y Q N V L T N E H L D I I A R
ctgtctggatgtgtggccacagagaatctaagattgctctgatatgtgttatcacagt
L S G C V A H R E S K D C S D M C Y H S
aaatcgtactgttgacggcagttgcaataacttcgcgcacatccacctggggaagttct
K Y R T V D G S C N N F A H P T W G S S
ctgactggatttagacgtattctatatcccatctacgaaatggtttcagccaaactgta
L T G F R R I L Y P I Y E N G F S Q P V
ggatggaaataaagattttaaataaacgggttttgctttaccgcccgcagcgttagtaca
G W N K D L K Y N G F A L P P A R L V S
acatctattataactactaaagacatatcccaagatgtagaatcactcatatggctatg
T S I I T T K D I S Q D V E I T H M A M
caatggggtcaatgggttagaccatgacttagatcacgcattgccttcagttagttcgcag
Q W G Q W L D H D L D H A L P S V S S Q
```

acatgggatggagtagattgcaaaaaacttgtagctacgcgccaccttgttttcctatc
T W D G V D C K K T C D Y A P P C F P I
gatattccgccgaagatccgcgagtcactaatcgaagtgtagcgttttattcgaaca
D I P P K D P R V T N R R C I D F I R T
agtgcagtttggatctggtatgacatcagttcttttcggaacattacagccgagagag
S A V C G S G M T S V L F G T L Q P R E
caaattaaccagttaacttctttcattgatgcatacacaagtttatggttttgaagaagct
Q I N Q L T S F I D A S Q V Y G F E E A
gtcgtgaagatctacgagatttaacaaacaacaatggactattacgagtgggtgctaca
V A E D L R D L T N N N G L L R V G A T
tttccaggtaggaacctctgctgcctacagtggaataaatggcatggattgcagactt
F P G R K P L L P T V G I N G M D C R L
aacctagcagaaagtaatcgaaactgttttgcgtggtgatcagagctaatagaacaa
N L A E S N R N C F V A G D I R A N E Q
attggttagcagaatgcatactatttggtgagagagcataaccgaattgctttgcag
I G L A A M H T I W M R E H N R I A L Q
ttaaagctttaaatccgttttgggacggcgacaaagtatatcaagaagccagaaaaata
L K A L N P F W D G D K V Y Q E A R K I
gtaggtgcagaaatacatacataacttacgagcactggcttctctatcattttggggcct
V G A E I Q Y I T Y E H W L P I I L G P
gaaggttataaacaactaggaaaataaagaatatgattcgtatataaatccctctgtt
E G Y K Q L G K Y K E Y D S Y I N P S V
tcaaattgttttgcactgctgctttgagatttgacattctatgattaacctgtcctg
S N V F A T A A L R F G H S M I N P V L
catcgctatgacgaaaatttcgagccaatcccacaaggccacactactccttcgacatgcc
H R Y D E N F E P I P Q G H L L L R H A
tttttctcaccatggcggttagtgatgaaggaggagttgatcccttattaaggggcatg
F F S P W R L V D E G G V D P L L R G M
tttacgacacccgctaaattgaagactccaactcaaaatctgaattccgaactgactgaa
F T T P A K L K T P T Q N L N S E L T E
aaacttttctatagcgctcacgctgttgctcttgacttggctgcgataaatattcagagg
K L F Y S A H A V A L D L A A I N I Q R
ggtcgcgatcacggtataccaccttacacaaaatggcgagaattctgtaacatgactgaa
G R D H G I P P Y T K W R E F C N M T E
gtagatgattttgacgacttagctggcgaaataagtgataaaacaatcagagacaaatta
V D D F D D L A G E I S D K T I R D K L
aaggagctttatggttccgtacacaatatcgatgtttgggtaggtggcatcctcgaagac
K E L Y G S V H N I D V W V G G I L E D
caagtccaagggcgcaaaaataggaccactgttcagggtgtttgctgattgaacaattcacc
Q V E G G K I G P L F R C L L I E Q F T
cggttacgagatggtgatagattgtggtacgaaaatcctagtgtatttaagatggatcag
R L R D G D R L W Y E N P S V F K M D Q
ctgcgacaaaataaaagaacaagcttagctcgggttttatgcgataatggtgacaatatt
L R Q I K E T S L A R V L C D N G D N I
gatacaattggagaaaatgtctttttattaccggaagtccaagatggactctcttcttgc
D T I G E N V F L L P E V Q D G L S S C
gaagaccttccctcgatggatttacgggttttgggctgattgcgaatcatgcgctgacaat
E D L P S M D L R F W A D C E S C A D N
gacggttacagcaagaaaagccacgtcttcgaagggaacaaatgattatctatttact
D G Y S K E K P R L R R E T N D Y L F T
cttgatacagacgaagaagatcgtttaagtaatctggaaaagatacagaaaatatctgttg
L D T D E E D R L S N L E K I Q K Y L L
aatactatcgatcagatgcagaaaaaaattaacattctcgaacaaaattgtaaatcgggc
N T I D Q M Q K K I N I L E Q N C K S G

Msex2.06039-RA (Heixuedian-like-Protein) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des größten offenen Leserasters.

```
atggataacaacacaaaaatggaagaagatatgttagtcgaaggaaacctactcgaacag
M D N N T K M E E D I V V E G N L L E Q
ccgaaagagaagacaataaccgactcggaaccccttgatgaaagtgcgcacgtacgtagtg
P K E K T I P T R N P L M K V R T Y V V
gcgttgccggccgtggctgctgagtgcgagcctgctgccgacgctgttaggggctgcgctt
A L R P W S L S A S L L P T L L G A A L
gcgtaccggttgcccggcgacactggcttcagctgggtgcacactactgctgacattatgc
A Y R L P G D T G F S W C T L L L T Y V
accgtagtgcccgtacacggcgccggcaatattgtcaacacttacttcgactttgtcaag
T V V P V H G A G N I V N T Y F D F V K
ggaattgataaccggaaatcggacgacagaacttttagtcgaccatattttgagtatagac
G I D N R K S D D R T L V D H I L S I D
gaagtggtttcgcttggtgctttactgtacttggcaggggtgtgcattcttcgtcccactg
E V V S L G A L L Y L A G C A F F V P L
gtgatactgtcacctgcacgcatggagcacttggccctcgtgtacttcggaggactatca
V I L S P A R M E H L A L V Y F G G L S
tcaccttcctgtacacgggtggcattggtttaaagtatatagcattagggtgatatttta
S S F L Y T G G I G L K Y I A L G D I L
gttctagtcacatttggcctgtttcagtagtgtttgccttccttagcacagacaggcaga
V L V T F G P V S V V F A F L A Q T G R
gtggactggtaataattttattacgccatacccctggcattaaacacagaggctattctc
V D W S I I Y Y A I P L A L N T E A I L
catagtaataacacaagagacttagagattgacagcaaagctgaaattgtaactctagca
H S N N T R D L E I D S K A E I V T L A
atattaataggaagaacttcctcatacttactgtatgcttctctgttatttactccatat
I L I G R T S S Y L L Y A F L L F T P Y
attgtgtttgtggtggcatcagtgcggtgttctctgtggttcttactgccaatgttgacc
I V F V V A S V R C S L W F L L P M L T
ttacctagagcatttgaatatgaaaggagggttagaagtcctgaaacaatgacttatgtg
L P R A F E I E R R F R S P E T M T Y V
ccgcggcaaaactgcaagactcaatttctattttggaatgctatatatgatttctgtttg
P R Q T A R L N F Y F G M L Y M I S C L
ttcgctagtagacttccttttcttctttgg
F A S R L P F L L W
```