

Charakterisierung des
Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls Dscam
in der angeborenen Immunantwort von *Manduca sexta* (L.)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Martin Speckmann

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie

Professur für Zoologie mit dem Schwerpunkt
molekulare Entwicklungsbiologie

**Charakterisierung des
Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls Dscam
in der angeborenen Immunantwort von *Manduca sexta* (L.)**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Martin Speckmann

Gießen, 2025

Mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prüfungskommission:

1. Gutachter: Prof. Dr. Nikola-Michael Prpic-Schäper, JLU Gießen

2. Gutachterin: Prof. Dr. Tina Trenczek, JLU Gießen

Prüfer: Prof. Dr. Andreas Krueger, JLU Gießen

Prüfer: Prof. Dr. Dietmar Schmucker, Uni Bonn

Tag der Disputation: 4. Dezember 2025

„Theories are nets cast to catch what we call ‘the world’: to rationalize, to explain, and to master it. We endeavour to make the mesh ever finer and finer.“

Karl R. Popper (*1902 – †1994), *The Logic of Scientific Discovery*, London, 1959

Vorwort und Danksagung

Eine evolutionäre Historie, die auf die Entwicklung von Bilateral-Symmetrie vor über 600 Millionen Jahren zurückgeht; evolutionär konservierte Funktion in der Entwicklung von Nervensystemen beginnend bei Plattwürmern bis hin zum Menschen; Relevanz in der Pathogenese des Down-Syndrom, der häufigsten autosomalen Chromosomenaberration des Menschen; das Phänomen mehrerer zehntausend von einem Gen kodierten Spleißformen, exklusiv in Insekten und Krebstieren sowie die immer noch nur unvollständig verstandene Relevanz und Regulation dieser extensiven molekularen Diversität in angeborenen Immunmechanismen – all das macht das Down-Syndrom-Zelladhäsionsmolekül (Dscam) zu einem faszinierenden und attraktiven Forschungsthema. Aus diesem Blickwinkel mag es verständlich erscheinen, warum die wissenschaftliche Neugier an der Idee von Dscam und angeborener Immunität stärker wiegt als alle Bedenken um fehlende Vorarbeiten und etablierte gentechnische Werkzeuge für den zur Verfügung stehenden Modellorganismus.

Viele Personen waren beteiligt, bevor sich aus anfänglich vereinzelt Puzzleteilen allmählich das hier vorliegende Bild ergeben hat. Für die Chance an diesem Thema arbeiten zu können, die jahrelange Unterstützung und wissenschaftlichen Beiträge bedanke ich mich allen voran bei Prof. Tina Trenczek, in deren Labor in der Stephanstraße 24 alles begonnen hat. Klassische Methoden der Zellbiologie und Proteinbiochemie und deren praktische Anwendung von dir lernen zu können war nicht nur ein Privileg von unschätzbarem Wert, sondern hat diese Dissertationsarbeit überhaupt erst ermöglicht.

Im Verlauf einer solchen Doktorarbeit häufen sich allerhand Probleme an. Für die Unterstützung beim Finden und Lösen all meiner Probleme von Anfang an geht ein ganz besonderes Dankeschön an Yvette und Dr. Christoph von Bredow. Eure praktische Anleitung zur Durchführung einer RNA-*in-situ*-Hybridisierung per Telefon hat nicht nur zu einer der wichtigsten Erkenntnisse dieser Dissertationsarbeit geführt, sondern stellt gleichzeitig herkömmliche Praktikumsformate in Frage.

Einen Antikörper zur Verfügung zu haben macht in der zellbiologischen und immunologischen Forschung in etwa soviel aus wie der Unterschied von Tag und Nacht. Für die bedingungslose Unterstützung mit Antikörpern richte ich ein großes Dankeschön an Prof. Dietmar Schmucker. Der Weg vom Haupteingang des Universitätshospitals Leuven bis in dein Labor gehört bis heute zu meinen anspruchsvollsten Navigationen. Ohne die Infrastruktur von Prof. Prpic-Schäper und Hilfe von Dr. Felix Quade in den schwierigsten Zeiten der Corona-Pandemie wären meine mikroskopischen Aufnahmen vermutlich weniger aussagekräftig. Für eure Hilfe in der Mikroskopie danke ich euch sehr. Mit *Manduca* zu arbeiten bedeutet immer auch von *Drosophila* zu lernen. Für die kompetente Unterstützung im Umgang mit Fliegen, Larven und Embryonen danke ich Dr. Anne Holz und Dr. Uwe Töpfer. Nach dem Ende der praktischen

Labortätigkeiten gab es allerhand aufzuräumen. Für die bedingungslose Unterstützung in der Beseitigung meiner Hinterlassenschaften und die immer offene Tür geht ein ganz besonderes Dankeschön an Marina Strack.

Jedes neue Labor und jede neu erlernte Methode erweitern den persönlichen Horizont, wovon die Qualität wissenschaftlicher Arbeit maßgeblich profitiert. Ich bedanke mich bei Prof. Dietmar Schmucker, Prof. Katja Becker, Prof. Niko Prpic-Schäper, Prof. Gregor Bein und Prof. Ulrich Sachs für die Möglichkeit meinen methodischen Horizont in neuen Laborumgebungen erweitern zu können. Jede dieser Stationen hat zum hier dargelegten Gesamtbild von Dscam in angeborener Immunität beigetragen. Freies Denken und Kreativität sind von höchstem Wert wenn es darum geht experimentell gewonnene Erkenntnisse in wissenschaftliche Texte zu verpacken. Für all die konstruktiven Gespräche und den wissenschaftlichen Austausch bedanke ich mich beim gesamten Team der Klinischen Immunologie rund um Dr. Behnaz Bayat, Stefanie Jehle, Darvin Preuss, Yannick Waxmann, Jonas Lowack und Silke Schmidt. Besondere Erwähnung gebührt an dieser Stelle Gabriela Michel. Mit dir zu arbeiten bedeutet auch von mehr als 15 Jahren laborpraktischer Erfahrung in Zellbiologie und Durchflusszytometrie profitieren zu können. Für dieses Privileg und die stets verlässliche und kollegiale Zusammenarbeit kann ich dir nicht genug danken.

Die Anfertigung einer Monografie kann sich schnell zu einem unüberwindbaren Berg entwickeln. Der Beitrag meiner Familie am Überwinden der letzten und steilsten Meter ist nicht hoch genug einzuschätzen. Ich danke meinen Schwiegereltern in spe Andreas und Bettina, meiner Verlobten Lydia und nicht zuletzt meiner Tochter Frieda. Ihr wart mir in jeder Phase dieser Doktorarbeit Ansporn und Motivation zugleich. Hervorgehoben sei an dieser Stelle mein größter Kritiker und zukünftiger Schwiegervater Andreas. Ich hoffe, dass ich auch in Zukunft auf deine Kritik aus der Perspektive eines Chemikers und leidenschaftlichen Naturwissenschaftlers zählen kann. Bei aller Kritik, die man im Laufe der Jahre einstecken muss war meine Verlobte mir immer eine große und verlässliche Stütze. Seit Studienbeginn im Wintersemester 2011/12 hast du mich auf diesem Weg begleitet, nie den Glauben an mich und meine Arbeit verloren und mir vor allem auf den letzten Metern den Rücken freigehalten. Mit größter Dankbarkeit und Liebe widme ich dir, meine Lydia, diese Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	II
FORMELVERZEICHNIS	III
1 ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 DIE STELLUNG VON DSCAM INNERHALB DER ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	6
2.2 DSCAM – PROTEINDOMÄNENSTRUKTUR.....	7
2.3 MsDSCAM – GEN-, TRANSKRIPT- UND PROTEINSTRUKTUR.....	8
2.4 ZIELSTELLUNG.....	10
3 MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 VERWENDETE PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	12
3.1.1 <i>Allgemeine Puffer und Lösungen</i>	12
3.1.2 <i>Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie</i>	16
3.1.3 <i>Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie</i>	19
3.1.4 <i>Puffer und Medien für die Zellkultur</i>	24
3.2 ZUCHT UND HALTUNG DES VERSUCHSORGANISMUS <i>MANDUCA SEXTA</i>	29
3.3 PRÄPARATIONSTECHNIKEN	30
3.3.1 <i>Hämozytenpräparation</i>	30
3.3.2 <i>Herstellen von Hämozyten-Monolayern</i>	30
3.3.3 <i>Präparation von zellfreiem Hämolymp plasma</i>	31
3.3.4 <i>Gewebepräparation</i>	31
3.4 ZELLKULTURTECHNIKEN	33
3.4.1 <i>Kultivierung von E. coli K12 D31</i>	33
3.4.2 <i>FITC-Markierung von Bakterien</i>	33
3.4.3 <i>Kultivierung synchronisierter erythrozytärer asexueller Entwicklungsstadien von P. falciparum NF54^{attB}</i>	34
3.4.4 <i>Kultivierung von Hybridoma-Zellkulturen und Gewinnung monoklonaler Antikörper</i>	35
3.4.5 <i>Isolierung humaner Erythrozyten und mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation</i>	37
3.5 <i>E. COLI</i> -INJEKTIONSVERSUCHE.....	38
3.5.1 <i>Kultivierung und Vorbereitung von E. coli K12 D31-Y</i>	38
3.5.2 <i>Vorbereitung der Versuchstiere</i>	39
3.5.3 <i>Durchführung der E. coli-Injektion</i>	39
3.6 BIOINFORMATISCHE METHODEN.....	41
3.6.1 <i>Identifizierung von immunrelevanten Genen in Hämozyten von M. sexta</i>	41
3.6.2 <i>Analyse der Überstimmung verschiedener Polypeptidsequenzen</i>	45
3.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	46
3.7.1 <i>gDNA-Extraktion</i>	46
3.7.2 <i>RNA-Extraktion</i>	47
3.7.3 <i>Reverse Transkription (cDNA-Synthese)</i>	48
3.7.4 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	49
3.7.5 <i>Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)</i>	52
3.7.6 <i>Semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR)</i>	53
3.7.7 <i>cDNA-Klonierung</i>	56
3.7.8 <i>DNA-Sequenzierung</i>	60
3.7.9 <i>RNA-in-situ-Hybridisierung</i>	60
3.8 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	65
3.8.1 <i>Probenvorbereitung</i>	65
3.8.2 <i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	66
3.8.3 <i>Western Blot</i>	69
3.8.4 <i>Microbial Binding Assay</i>	70
3.8.5 <i>Far-Western Blot</i>	75

3.8.6	<i>Ermittlung der relativen molekularen Masse unbekannter Proteine</i>	75
3.9	ZYTO- UND HISTOCHEMISCHE METHODEN	77
3.9.1	<i>Verwendete Antikörper</i>	77
3.9.2	<i>Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von whole-mount Embryonen</i>	79
3.9.3	<i>Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von Hämozyten-Monolayern</i>	80
3.9.4	<i>Oenozytoid-Markierung mittels Nachweis endogener Phenoloxidasen an Hämozyten-Monolayern</i> 81	
3.10	MIKROSKOPISCHE VERFAHREN	83
3.10.1	<i>Lebendzell-Mikroskopie</i>	84
3.10.2	<i>Zellzahlermittlung</i>	84
3.10.3	<i>Imaging von Hämozyten-Monolayer</i>	85
3.10.4	<i>Imaging von whole-mount Embryonen</i>	86
3.11	FOTODOKUMENTATION & BILDBEARBEITUNG	86
3.11.1	<i>Fotodokumentation</i>	86
3.11.2	<i>Bildbearbeitung</i>	87
3.12	ZYTOMETRISCHE METHODEN	88
3.12.1	<i>Ermittlung der differenziellen Hämozytenanzahl</i>	88
3.12.2	<i>Ermittlung des totalen Phagozytoseindex</i>	90
4	ERGEBNISSE	93
4.1	SEKTION I: CHARAKTERISIERUNG VON DSCAM IN DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT LARVALER HÄMOZYTEN	93
4.1.1	<i>Expression von dscam in unbehandelten Larven</i>	93
4.1.2	<i>Expression von dscam und immunrelevanter Gene in Hämozyten bakteriell stimulierter Larven</i>	97
4.1.3	<i>Differenzielle Expression von dscam in Hämozyten bakteriell stimulierter Larven</i>	101
4.1.4	<i>Immunzytochemische Charakterisierung dscam-exprimierender Hämozyten bakteriell stimulierter Larven</i>	104
4.1.5	<i>Charakterisierung MS73-positiver Hämozyten unbehandelter Larven</i>	107
4.1.6	<i>Muster anti-DSCAM-positiver Proteine in bakteriell stimulierten Larven</i>	111
4.1.7	<i>In vitro-Interaktion von Mikroorganismen und αDSCAM-positiven Proteinen</i>	123
4.2	SEKTION II: DIFFERENZIELLE ANALYSE LARVALER HÄMOZYTEN NACH SYSTEMISCHER <i>E. COLI</i> -STIMULATION	126
4.2.1	<i>2D-Analyse: Zell-Bakterien-Kolokalisation</i>	126
4.2.2	<i>3D-Analyse: Intrazelluläre Bakterienaufnahme</i>	132
5	DISKUSSION	134
5.1	SEKTION I: CHARAKTERISIERUNG VON DSCAM IN DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT LARVALER HÄMOZYTEN VON <i>M. SEXTA</i>	134
5.1.1	<i>Expression von dscam in unbehandelten Larven</i>	134
5.1.2	<i>Expression von dscam und immunrelevanter Gene in Hämozyten bakteriell stimulierter Larven</i> 140	
5.1.3	<i>Differenzielle Expression von dscam in Hämozyten bakteriell stimulierter Larven</i>	145
5.1.4	<i>Immunzytochemische Charakterisierung dscam-exprimierender Hämozyten nach bakterieller Stimulation in vivo</i>	147
5.1.5	<i>Charakterisierung MS73-positiver Hämozyten unbehandelter Larven</i>	151
5.1.6	<i>Muster anti-DSCAM positiver Proteine in bakteriell stimulierten Larven</i>	153
5.1.7	<i>In vitro-Interaktion von Mikroorganismen und anti-DSCAM positiven Hämolympmaproteinen</i>	155
5.2	VERGLEICHENDE DISKUSSION.....	157
6	FAZIT UND KONKLUSION	158
7	LITERATURVERZEICHNIS	160
8	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	172
9	APPENDIX	173
9.1	NUKLEOTIDSEQUENZEN UND AMINOSÄURESEQUENZEN	173
9.1.1	<i>Sequenz-ID: Msex2.09537-RA</i>	173
9.1.2	<i>Sequenz-ID: Msex2.09537-RB</i>	185
9.1.3	<i>Aminosäuresequenz-Alignment: Msex2.09537-RA & Msex2.09537-RB</i>	189
9.2	ABBILDUNGEN	192

9.3 TABELLEN 207

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2.1: DSCAM UND DSCAM: EVOLUTIONÄR KONSERVIERTE PROTEINDOMÄNENMUSTER.....	8
ABBILDUNG 2.2: MsDSCAM: GEN-, TRANSKRIPT- UND PROTEINDOMÄNENSTRUKTUR	9
ABBILDUNG 3.1: SCHICHTUNG FÜR FICOLL-DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION	38
ABBILDUNG 3.2: PCR [®] II PLASMID-VEKTORKARTE	57
ABBILDUNG 3.3: AUFBAU EINES SEMI-DRY BLOTTING-SANDWICH	69
ABBILDUNG 4.1: sqRT-PCR-ANALYSE VON MsDSCAM IN GEWEBEN UNBEHANDELTEN LARVEN	94
ABBILDUNG 4.2: sqRT-PCR-ANALYSE VON MsDSCAM UND IMMUNRELEVANTEN GENEN IN HÄMOZYTEN <i>E. COLI</i> -INJIZIERTER LARVEN	100
ABBILDUNG 4.3: <i>IN-SITU</i> -EXPRESSIONSANALYSE VON MsDSCAM IN HÄMOZYTEN <i>E. COLI</i> -INJIZIERTER LARVEN	103
ABBILDUNG 4.4: <i>IN-SITU</i> -EXPRESSIONSANALYSE VON MsDSCAM UND IMMUNFLUORESCENZMARKIERUNG VON HÄMOZYTEN <i>E. COLI</i> -INJIZIERTER LARVEN.....	105
ABBILDUNG 4.5: ENZYM- UND IMMUNZYTOCHEMISCHE MEHRFACHMARKIERUNG VON HÄMOZYTEN UNBEHANDELTEN LARVEN	110
ABBILDUNG 4.6: WESTERN BLOT-ANALYSE LARVALER GEWEBE NACH <i>E. COLI</i> -INJEKTION.....	112
ABBILDUNG 4.7: WESTERN BLOT-ANALYSE VON LARVALEM HÄMOLYMPHPLASMA NACH <i>E. COLI</i> -INJEKTION	113
ABBILDUNG 4.8: WESTERN BLOT-ANALYSE VON LARVALEN HÄMOZYTEN NACH <i>E. COLI</i> -INJEKTION	115
ABBILDUNG 4.9: WESTERN BLOT-ANALYSE DES LARVALEN ZENTRALEN NERVENSYSTEMS NACH <i>E. COLI</i> - INJEKTION	117
ABBILDUNG 4.10: WESTERN BLOT-ANALYSE DES LARVALEN FETTKÖRPERS NACH <i>E. COLI</i> -INJEKTION	119
ABBILDUNG 4.11: WESTERN BLOT-ANALYSE DER LARVALEN LABIALDRÜSEN NACH <i>E. COLI</i> -INJEKTION	121
ABBILDUNG 4.12: WESTERN BLOT-ANALYSE VON MIKROORGANISMEN NACH <i>IN-VITRO</i> -INKUBATION IN HÄMOLYMPHPLASMA	124
ABBILDUNG 4.13: FLUORESCENZMIKROSKOPIE-ANALYSE <i>E. COLI</i> -KOLOKALISierter HÄMOZYTEN IM VERLAUF VON 24 H NACH STIMULATION.....	131
ABBILDUNG 4.14: Z-ACHSEN-PROJEKTION EINER <i>E. COLI</i> -KOLOKALISIERTEN HÄMOZYTE.....	133
ABBILDUNG 12.1: MULTIPLEX-BLAST-ANALYSE MIT DER TRANSKRIPTOM-DATENBANK I5K	192
ABBILDUNG 12.2: MULTIPLEX-BLAST-ANALYSE MIT DER NCBI-DATENBANK TRANSCRIPT REFERENCE SEQUENCES.....	193
ABBILDUNG 12.3: MULTIPLEX-BLAST-ANALYSE MIT DER NCBI-DATENBANK NUCLEOTIDE COLLECTION (NR/NT)	195
ABBILDUNG 12.4: MULTI-SEQUENZ-ALIGNMENT VON MsDSCAM TRANSKRIPT-AMPLIFIKATEN.....	197
ABBILDUNG 12.5: FLUORESCENZMIKROSKOPIE-ANALYSE EINER HÄMOZYTE AUF KOLOKALISATION VON <i>E. COLI</i> - UND MsDSCAM-SIGNAL.....	198
ABBILDUNG 12.6: WHOLE MOUNT IMMUNFLUORESCENZMARKIERUNG VON <i>D. MELANOGASTER</i> UND <i>M. SEXTA</i> EMBRYONEN.....	199
ABBILDUNG 12.7: WESTERN BLOT-ANALYSE MIT SCOLEXIN-PRÄIMMUSERUM	200
ABBILDUNG 12.8: WESTERN BLOT-ANALYSE MIT ALKALISCHE PHOSPHATASE-KONJUGIERTEM SEKUNDÄRANTIKÖRPER	201
ABBILDUNG 12.9: SCHEMA DES <i>IN VITRO</i> MICROBIAL BINDING ASSAY	202
ABBILDUNG 12.10: WESTERN BLOT-ANALYSE HUMANER ERYTHROZYTEN NACH <i>IN VITRO</i> -INKUBATION IN LARVALEM HÄMOLYMPHPLASMA VON <i>M. SEXTA</i>	203
ABBILDUNG 12.11: <i>IN SILICO</i> -PRÄDIKTION VON PHOSPHORYL-MODIFIKATIONSSTELLEN	204
ABBILDUNG 12.12: <i>IN SILICO</i> -PRÄDIKTION VON N-ACETYLGLUCOSAMIN-MODIFIKATIONSSTELLEN	205
ABBILDUNG 12.13: <i>IN SILICO</i> -PRÄDIKTION VON N-GLYKOSYL-MODIFIKATIONSSTELLEN	205
ABBILDUNG 12.14: <i>IN SILICO</i> -PRÄDIKTION VON S-NITROSYL-MODIFIKATIONSSTELLEN	206

Tabellenverzeichnis

TABELLE 3.1: HYBRIDOMA-ZELLKULTURMEDIUM.....	28
TABELLE 3.2: RESISTENZ UND SENSITIVITÄT VON <i>E. COLI</i> K12 D31 SUBSTAMM Y.....	33
TABELLE 3.3: DOSIERUNG DER <i>E. COLI</i> -INJEKTIONSSUSPENSION ZUR IMMUNSTIMULATION	40
TABELLE 3.4: MUSTERERKENNUNGSREZEPTOREN VON INSEKTEN.....	41
TABELLE 3.5: IMMUNRELEVANTE GENE UND GENPRODUKTE IN <i>M. SEXTA</i> -LARVEN	43
TABELLE 3.6: STICHPROBEN- UND TREATMENTGRUPPEN FÜR SQRT-PCR-ANALYSEN	47
TABELLE 3.7: STANDARD-PCR-PIPETTIERSHEMA	49
TABELLE 3.8: STANDARD-PCR-CYCLER-PROGRAMM	49
TABELLE 3.9: OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN (PCR-PRIMER).....	50
TABELLE 3.10: PARAMETER ZUR ERSTELLUNG VON OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN.....	51
TABELLE 3.11: ZUSAMMENSETZUNG EINES 1 % AGAROSE-TAE-GELS.....	52
TABELLE 3.12: REAKTIONSANSATZ EINER <i>IN VITRO</i> -TRANSKRIPTION	61
TABELLE 3.13: TREATMENTGRUPPEN FÜR DIE <i>MsDscam</i> RNA- <i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	63
TABELLE 3.14: WASCHPUFFER FÜR DIE RNA- <i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	64
TABELLE 3.15: TREATMENTGRUPPEN FÜR WESTERN BLOT-ANALYSEN	65
TABELLE 3.16: ANSATZ FÜR ZWEI SDS-PAGE-SAMMELGELE.....	66
TABELLE 3.17: ANSATZ FÜR ZWEI SDS-PAGE-TRENNGELE	67
TABELLE 3.18: KONTROLL- UND EXPERIMENTALTREATMENT BEIM MICROBIAL BINDING ASSAY	71
TABELLE 3.19: TOTALZELLZAHL DER PREY-ORGANISMEN ZUR <i>IN VITRO</i> -INKUBATION.....	71
TABELLE 3.20: PRIMÄRANTIKÖRPER.....	77
TABELLE 3.21: SEKUNDÄRANTIKÖRPER	79
TABELLE 3.22: ZUSAMMENSETZUNG DES PP-ENTWICKLUNGSPUFFERS.....	82
TABELLE 3.23: OPTISCHE SYSTEME ZUR MIKROSKOPISCHEN ANALYSE	83
TABELLE 3.24: IMMUNSTIMULATION UNBEHANDELTEN <i>M. SEXTA</i> L5D2-LARVEN.....	91
TABELLE 4.1: RELATIVE MOLEKULARE MASSES UNBEKANNTER ANTI-DSCAM-POSITIVER PROTEINE IN ZIRKULIERENDEN HÄMOZYTEN.....	116
TABELLE 4.2: RELATIVE MOLEKULARE MASSES UNBEKANNTER ANTI-DSCAM-POSITIVER PROTEINE DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS	118
TABELLE 4.3: RELATIVE MOLEKULARE MASSES UNBEKANNTER ANTI-DSCAM-POSITIVER PROTEINE DES FETTKÖRPERS	120
TABELLE 4.4: RELATIVE MOLEKULARE MASSES UNBEKANNTER ANTI-DSCAM-POSITIVER PROTEINE DER LABIALDRÜSEN	122
TABELLE 12.1: ZUSAMMENSETZUNG DES KUNSTFUTTERS FÜR <i>M. SEXTA</i> -LARVEN.....	207

Formelverzeichnis

FORMEL 1: BERECHNUNG DES NETTOGRAUWERTES.....	53
FORMEL 2: NORMALISIERUNG DES NETTOGRAUWERTES	54
FORMEL 3: RELATIVIERUNG DER NORMALISIERTEN GRAUWERTEINHEITEN DER SALINE-KONTROLLEN.....	54
FORMEL 4: RELATIVIERUNG DER NORMALISIERTEN GRAUWERTEINHEITEN DER <i>E. COLI</i> -PROBEN	55
FORMEL 5: BERECHNUNG EINES LIGATIONSANSATZES	56
FORMEL 6: BERECHNUNG DER RELATIVEN MIGRATIONSDISTANZ R_F	75
FORMEL 7: BERECHNUNG DES LOGARITHMUS DER RELATIVEN MOLEKULAREN MASSE $\log M_R$	76
FORMEL 8: BERECHNUNG DER RELATIVEN MOLEKULAREN MASSE M_R	76
FORMEL 9: BERECHNUNG DER DIFFERENZIELLEN HÄMOZYTENANZAHL.....	89
FORMEL 10: BERECHNUNG DES PHAGOZYTULOSEINDEX	92

1 Zusammenfassung und Abstract

Die Spezifität angeborener Immunmechanismen wird entscheidend von genetischer Diversifizierung und selektiver Anpassung in der Evolution von Wirt-Mikroben-Interaktionen beeinflusst. Angeborene Immunantworten von Insekten werden demnach allgemein als effizient, jedoch bedingt durch Keimbahn-kodierte Mustererkennungsrezeptoren (PRR) als eingeschränkt spezifisch beschrieben. In Zusammenhang mit exklusiver molekularer Diversität des Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls (Dscam) bei Vertretern der Pancrustacea verdichten sich Belege, die für eine Funktion als hypervariabler, Pathogen-spezifischer PRR der Immunoglobulin-Superfamilie sprechen. Obwohl experimentelle Daten erregerspezifische Dscam-Spleißformen in Hämozyten von Insekten und Krebstieren sowie deren Beteiligung an *In-vitro*-Phagozytose von Mikroorganismen zeigen, sind Genexpressionsmuster in Hämozyten und deren Relevanz im Rahmen angeborener Immunantworten *in vivo* noch größtenteils unbekannt. Anhand eines *In-vivo*-Modells bakterieller Stimulation und monoklonaler Antikörper für spezifische Hämozytentypen wurden die Genaktivität und das Proteinmuster von *Manduca sexta* Dscam (*MsDscam*) in zirkulierenden, larvalen Hämozyten charakterisiert. Trotz geringer quantitativer Veränderungen der relativen mRNA-Level konnte eine qualitative Veränderung des differenziellen Transkriptionsmusters von *MsDscam* in Zusammenhang mit Hämocoel-Injektion von fixierten *E. coli* K12 festgestellt werden. In Abwesenheit von Immunstimulation ist *MsDscam*-Transkript ausschließlich in einer seltenen Population sphärischer Hämozyten mit exzentrischen Zellkernen lokalisiert. Prophenoloxidase (proPO) enthaltende Oenozytoide mit gleichen morphologischen Eigenschaften fallen unabhängig als einzige Population in Zirkulation mit membranassoziertem *MsDscam*-Muster auf. Nach *E. coli*-Injektion ist der prozentuale Anteil von Hämozyten mit aktiver *MsDscam*-Transkription hingegen signifikant um das Zehnfache erhöht ($p < 0,001$), darunter auch Subpopulationen von Plasmatozyten und granulären Zellen. Damit vermittelt diese Dissertation zum ersten Mal in zwei Jahrzehnten immunologischer Dscam-Forschung ein fundiertes Bild immunstatusabhängiger Genaktivität in drei distinkten Hämozytentypen. Zusätzlich ergeben sich kumulative Hinweise, die eher für funktionelle Relevanz von *MsDscam* im Rahmen einer zweiten Immunantwort sprechen als in der Akutphase-Immunantwort nach erstmaliger mikrobieller Stimulation. Dementsprechend liefert diese Arbeit erstmals eine Grundlage für die Analyse Dscam-basierter molekularer Diversität in proPO-produzierenden Hämozyten, was zu einem erweiterten Verständnis von Oenozytoide als immunologische Masterregulatoren in *Manduca* beitragen kann. Typspezifische Transkriptomanalyse von *Manduca*-Hämozyten in Homöostase und Immunstimulation kann somit nicht nur zur Validierung der Hypothese von funktioneller Relevanz von Dscam beim Immunpriming in Insekten, sondern auch zur Aufklärung der immer noch unbekanntenen Regulation zellulärer Dscam-Spleißsignaturen beitragen.

Genetic diversification and selective adaptation are major drivers of host-microbe evolution sculpturing specificity of innate immune mechanisms. In this context insect innate immune responses are broadly recognized to be efficient yet restricted by specificity of germline-encoded pattern recognition receptors (PRR). Evidence is accumulating to the hypervariable immunoglobulin superfamily member Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) acting as pathogen-specific PRR due to exclusive molecular diversity with tens of thousands of splice forms in pancrustacean species. Although experimental data show elicitor-specific alternative Dscam splicing in insect and crustacean hemocytes and its implication in phagocytosis of microbes *in vitro* expression pattern in hemocytes and relevance during innate immune response *in vivo* still remains unknown. Using a model of bacterial stimulation *in vivo* and monoclonal antibodies for specific types of hemocytes gene activity and protein pattern of *Manduca sexta* Dscam (*MsDscam*) were characterized in circulating hemocytes of stage five larvae. Despite of low quantitative changes in relative mRNA levels systemic immune stimulation by hemocoel injection of fixed *E. coli* K12 leads to qualitative alteration of differential transcription pattern. In absence of immune stimulation *MsDscam* transcript is exclusively localized within a rare subset of spherical hemocytes with eccentric nuclei addressing the detectable *MsDscam* mRNA level of all circulating hemocytes to a single type. Prophenoloxidase (proPO) containing hemocytes with similar morphological properties are noticeable as the only subset in circulation with membrane-associated *MsDscam* pattern picturing to constitutive gene expression in Oenocytoids. Following *E. coli* injection the percentage of hemocytes with active *MsDscam* transcription is significantly increased by ten fold ($p < 0.001$) including subsets of plasmatocytes and granular cells. Thus, for the first time in two decades of Dscam research in innate immunity, this dissertation draws a profound picture of immune status related gene activity in three distinct types of hemocytes which are present across all major insect taxa. Additionally, temporal pattern of immune-related gene expression and phagocytic uptake of *E. coli* are giving rise to cumulative evidence for functional implication of *MsDscam* as part of second wave rather than acute phase immune response to microbial challenge. Accordingly, this work provides the first basis for analyzing Dscam-based molecular diversity in proPO producing hemocytes, contributing to a deeper understanding of oenocytoids as immunological master regulators of *Manduca*. Type-specific transcriptome analysis of *Manduca* hemocytes in homeostasis and immune challenge can not only contribute to validate the hypothesis of functional implication of Dscam in insect immune priming but also to unravel the still unknown mechanism of Dscam splice signature regulation.

2 Einleitung

Angeborene Immunität stellt in Vertebraten und mehrzelligen Invertebraten eine evolutionär konservierte und im Falle von Infektion eine der ersten Formen antimikrobieller Abwehr dar (Pradeu et al., 2024). Dieser evolutionäre Erfolg beruht auf der Erkennung konservierter molekularer Strukturen, sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (Engl.: pathogen-associated molecular pattern, Abk.: PAMPs), durch Mustererkennungsrezeptoren (Engl.: pattern recognition receptors, Abk.: PRRs) (Silva & Gomes, 2024). Diese Keimbahn-kodierten Rezeptoren erkennen charakteristische Oberflächenstrukturen von Bakterien, Pilzen oder Viren und leiten Signalkaskaden ein, die sowohl humorale als auch zelluläre Effektormechanismen aktivieren. Bei Wirbeltieren umfasst dieses System verschiedene Rezeptorfamilien – darunter Toll-like-, NOD-like-, RIG-I-like-, C-type-Lectin- und AIM2-like-Rezeptoren – deren strukturelle und funktionelle Homologien eine gemeinsame evolutionäre Herkunft nahelegen (Riera Romo et al., 2016; Wicherska-Pawłowska et al., 2021). Auch in Invertebraten erfüllt die PRR-vermittelte Erkennung von PAMPs die grundlegende Aufgabe zwischen körpereigen und körperfremd zu unterscheiden und geeignete Abwehrmaßnahmen einzuleiten (D. Li & Wu, 2021).

In Zusammenhang mit fehlenden adaptiven Immunmechanismen ist angeborene Immunität insbesondere für Invertebraten von zentraler Bedeutung (Pradeu et al., 2024). Immunantworten wirbelloser Tiere wie Insekten und Krebstiere umfassen Effektormechanismen wie Phagozytose, Agglutination, Kapselbildung, Nodulation, Melanisierung und die Synthese antimikrobieller Peptide (Hillyer, 2016; Eleftherianos et al., 2021a). All diese Prozesse werden durch PRRs initiiert, die konservierte mikrobielle Moleküle wie Peptidoglykane, Lipopolysaccharide oder β -1,3-Glukane binden (Lin et al., 2020). Studien an Lepidopteren haben gezeigt, dass eine große Vielfalt solcher PRRs existiert, darunter Erkennungsproteine mit Spezifität für Peptidoglykan (PGRPs), β -1,3-Glukan (β GRPs) beziehungsweise gramnegative Bakterien bindende Proteine (GNBPs), C-Typ-Lektine (CTLs) und Galektine (Zhao et al., 2023). Diese Moleküle fungieren als erste sensorische Ebene des Insektenimmunsystems und aktivieren sowohl zelluläre als auch humorale Signalwege, die in ihrer Gesamtheit eine spezifische, aber genetisch festgelegte Antwort auf mikrobielle Infektion vermitteln (Viljakainen, 2015; Lin et al., 2020).

Im Vergleich zu adaptiver Immunität wird die Erkennung von PAMPs mittels Keimbahn-kodierter PRRs traditionell als funktionell eingeschränkt diskutiert, da diese auf einem festen Rezeptor-Repertoire ohne somatische Diversifizierung beruht (Q. Zhang et al., 2010). Die Entdeckung angeborener molekularer Diversität in Zusammenhang mit der Beschreibung des Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls (Dscam) in Vertretern der Pancrustacea hat dieses

Bild jedoch grundlegend verändert (Cerenius & Söderhäll, 2013). Dscam gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF, vgl. Kapitel 2.2 und Abbildung 2.1) und weist bei Insekten und Krebstieren exklusive molekulare Diversität auf, die durch alternatives Spleißen erzeugt wird (Ng et al., 2014; Ng & Kurtz, 2020). Während Dscam im Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten für die Etablierung neuronaler Netzwerke unerlässlich ist (Schmucker & Chen, 2009; Hizawa et al., 2024a), konnte gezeigt werden, dass Dscam in Arthropoden ebenfalls in immunkompetenten Geweben exprimiert ist (Armitage et al., 2017). Besonders bemerkenswert ist, dass mehrere Zehntausend bis Millionen verschiedene Proteinisoformen von einem einzigen Dscam-Gen kodiert sind – eine Diversität, die funktionell an die Antikörpervielfalt der Vertebraten erinnert (Armitage et al., 2015a; Brites & Du Pasquier, 2015; Apitanyasai et al., 2019).

Die Bildung von Isoformen erfolgt durch kombinatorisches alternatives Spleißen von Exonkassetten, die für variable Immunglobulin-Domänen der Extrazellulärregion kodieren (Graveley, 2005; X. Wang et al., 2012). In Zusammenhang mit Immunstimulation mit Mikroorganismen existieren Nachweise von Expression spezifischer Spleißformen in Vertretern der Insecta (*Drosophila*, *Anopheles*) und Crustacea (*Daphnia*, *Litopenaeus*, *Eriocheir*) (Watson et al., 2005a; Dong et al., 2006a; Brites et al., 2008; Hung et al., 2013; X.-J. Li et al., 2018a). Diese Beobachtungen führten zur Hypothese, Dscam könne in Arthropoden eine adaptive Komponente innerhalb der angeborenen Immunität darstellen – gewissermaßen ein „molekulares Gedächtnis“ ohne somatische Rekombination (Armitage et al., 2015a). Experimentelle Befunde der Weißfußgarnele *Litopenaeus vannamei* sowie der Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis* stützen diese Annahme, indem sie zeigen, dass Hämocyten pathogen-spezifische Dscam-Transkripte exprimieren und dass bestimmte Isoformen selektiv an spezifische Bakterien binden (Hung et al., 2013; X.-J. Li et al., 2018a). Die Bindungseigenschaften der variablen Ig-Domänen zwei und drei (vgl. Abbildung 2.2) deuten darauf hin, dass einzelne Isoformen distinkte PAMPs erkennen können, womit Dscam funktionell als hypervariabler PRR diskutiert wird.

Trotz dieser Erkenntnisse ist das Wissen über die tatsächliche Funktion von Dscam im Rahmen von Immunantworten *in vivo* immer noch begrenzt. Die meisten Studien basieren auf Zellkulturexperimente mit Hämocyten-ähnlichen embryonalen Insektenzellen (Watson et al., 2005a; Dong et al., 2006a) oder auf Krebstiermodellen (Hung et al., 2013; X.-J. Li et al., 2018a), während Untersuchungen an zirkulierenden Hämocyten von Insekten fehlen. Zudem ist immer noch unbekannt, ob Dscam-Expression mit spezifischen Hämocytentypen assoziiert ist und wie sich Transkriptionsmuster räumlich im Zuge von Immunstimulation verändern. Vorhandene Daten deuten zwar auf eine Beteiligung von Dscam an der Phagozytose hin (Watson et al., 2005a; Dong et al., 2006a; X.-J. Li et al., 2018a), doch konnte bisher kein direkter

Nachweis einer funktionellen Rolle in der zellulären Immunabwehr von Insekten *in vivo* erbracht werden (Lin et al., 2020).

Vor diesem Hintergrund gewinnt das Modellsystem *Manduca sexta* besondere Bedeutung. Der Tabakswärmer ist einer der am besten untersuchten Lepidopteren in der Immunologie und verfügt über klar definierte Hämozytentypen (Bredow & Trenczek, 2022), ein gut charakterisiertes humorales Abwehrsystem (Kanost et al., 2004) und eine etablierte Methodik zur Immunstimulation durch bakterielle Injektionen (Hussa & Goodrich-Blair, 2012). Frühere Studien an *M. sexta* beschrieben eine Vielzahl klassischer PRRs, darunter PGRPs, β GRPs und C-Typ-Lektine, die eine koordinierte Aktivierung der Phenoloxidase-Kaskade und antimikrobieller Peptide kodierender Gene vermitteln (Yu et al., 2002). Dennoch ist Dscam in *Manduca* bisher nur im Rahmen einer Bulk-Transkriptomstudie beschrieben (X. Zhang et al., 2015).

Evolutionsbiologische Analysen haben gezeigt, dass die Domänenarchitektur vieler PRRs, darunter auch Ig-Superfamilienmitglieder, wiederholt und unabhängig in unterschiedlichen phylogenetischen Linien entstanden ist (Q. Zhang et al., 2010). Dieses Phänomen der parallelen Evolution weist darauf hin, dass die Kombination bestimmter funktioneller Domänen – wie Ig-Domänen, Leucin-reiche Wiederholungen oder Lektindomänen – durch konvergente Selektionsdrücke bevorzugt wird. Dscam stellt in diesem Zusammenhang ein besonders eindrucksvolles Beispiel dar: Die variable Extrazellulärregion kombiniert klassische Ig-Domänen mit einer transmembranen Verankerung und intrazellulären Signalmotiven, wodurch es sowohl Adhäsions- als auch Rezeptor-Funktionen übernehmen kann (X.-J. Li et al., 2018a). Während diese Eigenschaften im Nervensystem in Rahmen der neuronalen Selbst- und Fremderkennung beschrieben sind (Matthews et al., 2007), könnten sie in angeborenen Immunmechanismen differenzierte und spezifische Erkennung von Mikroorganismen vermitteln und zum Phänomen des Immunpriming in Insekten beitragen (W. Li, 2021).

Die vorliegende Dissertationsarbeit verfolgt das Ziel die Genaktivität und Proteinmuster von *Manduca sexta* Dscam (*MsDscam*) in zirkulierenden Hämozyten während bakterieller Immunstimulation zu charakterisieren. Im Fokus steht die Fragestellung, ob *MsDscam*-Transkripte und -Proteine hämozytenspezifisch exprimiert bzw. präsentiert werden und ob diese Muster durch bakterielle Stimulation moduliert werden. Dazu wurde ein *In-vivo*-Modell etabliert, bei dem *Manduca*-Larven am zweiten Tag des fünften Entwicklungsstadiums (L5d2) mittels Hämo-coel-Injektion mit fixierten *Escherichia coli* K12 injiziert werden. Die Analyse erfolgte auf mehreren Ebenen: (1) Nachweis der *MsDscam*-Transkription in immunrelevanten Geweben und Organen unbehandelter Larven, (2) zeitabhängige Expressionsanalyse von *MsDscam* sowie den immunrelevanten Genen (*eater*, *lysozym*, *attacin*, *gloverin*) in Hämozyten nach bakterieller Stimulation, (3) Lokalisation von Dscam-mRNA in Hämozyten mittels RNA-*in-situ*-

Hybridisierung, (4) Identifikation Dscam-positiver Hämozytentypen durch monoklonale Antikörper, (5) Untersuchung der MsDscam-Proteinmuster in Hämozyten und weiteren immunkompetenten Geweben und Organen mittels Western Blotting, sowie (6) mikroskopische Analyse der Kolokalisation von Hämozyten und Bakterien als Hinweis auf Phagozytose. Mit dieser Vorgehensweise wird erstmalig die Genexpression von Dscam in zentralen Effektorzellen der angeborenen Immunität eines Lepidopteren *in vivo* untersucht. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den Oenozytoiden, einer morphologisch distinkten Hämozytenpopulation, die Prophenoloxidase enthält und bislang vor allem als Mediator humoraler Immunität in Zusammenhang mit Initiierung von Melanisierung beschrieben ist (Lin et al., 2020). Durch die Kombination von molekularbiologischen und zellulären Analysen soll die Arbeit einen Beitrag zur Klärung leisten, ob Dscam im Insektenimmunsystem als funktioneller Mustererkennungsrezeptor agiert. Erkenntnisse über die Dscam-Expression in unterschiedlichen Hämozytentypen und deren dynamische Regulation könnten langfristig zu einem erweiterten Verständnis der zellulären Organisation des Insektenimmunsystems führen.

Insgesamt stellt diese Studie einen entscheidenden Schritt dar, um die Hypothese einer immunologischen Doppelfunktion von Dscam zu prüfen – einerseits als neuronales Adhäsionsmolekül, andererseits als variabler Rezeptor in der angeborenen Immunität.

2.1 Die Stellung von Dscam innerhalb der Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (Engl.: cell adhesion molecules, Abk.: CAMs) sind transmembrane Glykoproteine von hoher struktureller Diversität, die Interaktionen zwischen Zellen und ihrer Umgebung vermitteln (Elangbam et al., 1997; Sierra-Arregui et al., 2020; Moreland & Poulain, 2022). CAMs sind an vielen physiologischen Prozessen wie der Morphogenese, Gewebsentwicklung und -organisation, Zell-Zell-Kommunikation, Zellmigration sowie an der Regulierung der Immunantwort beteiligt, indem sie Adhäsion zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (Engl.: extracellular matrix, Abk.: ECM) ermöglichen (Edelman, 1983; Henricks & Nijkamp, 1998; Harjunpää et al., 2019)(Harjunpää et al., 2019). Auf Grundlage von Struktur und Funktion lässt sich der Großteil der CAMs vier Proteinfamilien zuordnen: Integrine, Selektine, Cadherine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (Elangbam et al., 1997; Joseph-Silverstein & Silverstein, 1998; Petruzzelli et al., 1999; Ren et al., 2011; Harjunpää et al., 2019).

Die funktionelle Vielseitigkeit der Zelladhäsionsmoleküle spiegelt sich in ihrer strukturellen Vielfalt und ihren ligandenbindenden Eigenschaften wieder. Integrine sind hauptsächlich an der Bindung von Komponenten der ECM wie Fibronectin und Kollagen beteiligt und sorgen für strukturelle Stabilität und Signalübertragung zur Regulierung von Zellbewegung und Proliferation (Samanta & Almo, 2015). Eine Ausnahme bilden Immunzellintegrine. Diese können sowohl an lösliche Liganden als auch an Liganden auf anderen Zellen binden, wodurch sie eine

multifunktionale Rolle bei der Immunüberwachung und -antwort einnehmen (Harjunpää et al., 2019). Im Gegensatz dazu vermitteln Selektine, Cadherine und IgSF-Mitglieder Zell-Zell-Adhäsion und zeichnen sich durch unterschiedliche Bindungsmechanismen und zelluläre Funktionen aus (Samanta & Almo, 2015). So binden Selektine kalziumabhängig an Kohlenhydratverbindungen und Cadherine vermitteln kalziumabhängig homophile Bindung während Mitglieder der IgSF sowohl an homophilen als auch heterophilen Interaktionen beteiligt sind (Patel et al., 2003; Sperandio, 2006). In Zusammenhang mit Sequenzhomologie N-terminaler Immunglobulin- bzw. Immunglobulin-ähnlicher Proteindomänen ist Dscam als Mitglied der IgSF klassifiziert (Yamakawa et al., 1998a; Sawaya et al., 2008).

2.2 Dscam – Proteindomänenstruktur

Als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie besteht die Proteindomänenstruktur von Dscam typischerweise aus Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen), Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-like-Domänen) und Fibronectin-Typ-III-Domänen (FNIII-Domänen). Ig- und Ig-like-Domänen sind von molekularer Variabilität gekennzeichnet und in Bindungsfunktionen im Rahmen der Zelladhäsion, Antigenerkennung und -neutralisation sowie Gewebeorganisation und -differenzierung involviert (Halaby & Mornon 1998). Die den Ig-C2-Typ-Domänen ähnlichen FNIII-Domänen sind aufgrund enthaltener RGD-Sequenzen in Interaktionen mit Integrinen sowie in Zelladhäsion assoziiert mit Thrombose, Entzündungen und Tumormetastasierung involviert (Brümmendorf & Rathjen 1994, Leahy et al. 1996). In Bezug auf das Muster der Proteindomänen lassen sich bei Dscam und Dscam-ähnlichen Proteinen unterschiedlicher Vertreter der Vertebrata und Invertebrata eine immer gleiche Sequenz bestehend aus neun Ig-Domänen, vier FNIII-Domänen, einer Ig-Domäne, zwei FNIII-Domänen und einer Trans-membrandomäne *in silico* ermitteln (Abb. 2.1).

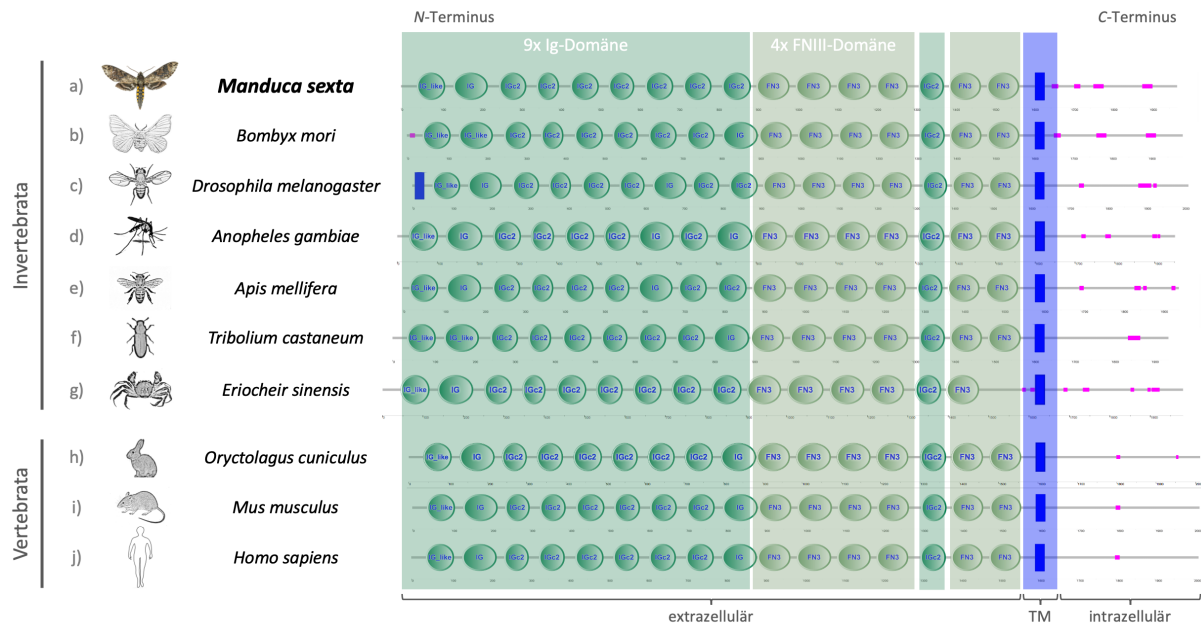


Abbildung 2.1: Dscam und Dscam-ähnliche Proteine bestehen aus einem evolutionär konservierten Proteindomänenmuster (9 Ig – 4 FNIII – 1 Ig – 2 FNIII – 1 TM).

In silico-Vergleich des Domänenmusters von Dscam Proteinen und prognostizierten Dscam-ähnlichen Proteinen unterschiedlicher Vertreter der Invertebrata (a – g) und Vertebrata (h – j). Die Proteindomänen wurden mittels Profile Hidden Markov Model-Sequenzanalyse mit der SMART-Datenbank (EMBL Heidelberg) ermittelt.

Abkürzungen: Ig-Domäne, Immunglobulin- bzw. Immunglobulin-ähnliche Domäne; FNIII, Fibronectin-Typ-III-Domäne; TM, Transmembrandomäne; N-Terminus, Amino-Terminus; C-Terminus, Carboxy-Terminus. Sequenz-/ Protein-ID: a) Msex2.09537-RA; b) XP_012548623.1; c) AAF71926.1; d) XP_309810.4; e) AAT96374.1; f) EFA10759.1; g) AGL39311.1; h) XP_008250120.1; i) AAG28796.1; j) AAF27525.1.

2.3 MsDscam – Gen-, Transkript- und Proteinstruktur

Das für das Down-Syndrom-Zelladhäsionsmolekül kodierende Gen von *M. sexta* (*MsDscam*) mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RA besteht bei einer Länge von 63,7 Kilobasenpaaren aus 98 Exons, darunter vier Exonkassetten mit variablen, alternativen Exons, flankiert von 37 konstanten Exons und intermediären Introns (Abb. 2.2 A). Die Exonkassetten 5 (cyan), 7 (pink), 14 (gelb) und 33 (blau) bestehen aus 15, 27, 17 bzw. 2 alternativen Exons mit variablen Nukleotidsequenzen (Abb. 2.2 B). 36 der 37 konstanten Exons sind konstitutiv (weiß), d. h. Spleißform-unabhängig in jeder reifen Dscam-mRNA-Isoform vorhanden (Abb. 2.2 B & C). Bei dem 37. konstanten Exon, Exon 35 (braun), handelt es sich um ein optionales Exon (Abb. 2.2 B & C). Mit einer Länge von 99 Basen kodiert Exon 35 für 33 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von 3,95 Kilodalton und ist optional vorhanden oder nicht vorhanden. Mittels alternativem prä-mRNA-Spleißen der Exonkassetten (mutually exclusive splicing) und des optionalen Exons (exon skipping) kodiert *MsDscam* für potenziell 27.540 unterschiedliche Transkript- bzw. Proteinspleißformen (Abk. Isoformen, Abb. 2.2 B, Jin et al. 2018). Inklusive Exon 35 besteht jede Transkript-Isoform aus 41 Exons mit einer Spleißform-abhängigen Länge von ca. 8,1 Kilobasen (Abb. 2.2 C). Je Exonkassette ist dabei in jeder reifen Dscam mRNA-Isoform ein alternatives Kassettenexon gespleißt, flankiert von 37 kon-

stanten Exons (Abb. 2.2 C). Dementsprechend kodieren reife Dscam-Transkripte inklusive Exon 35 Spleißform-abhängig für ein Protein bestehend aus ca. 1.970 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von ca. 215,2 Kilodalton und einem kalkulierten isoelektrischen Punkt um pH 6,35 (Abb. 2.2 D). Exklusive Exon 35 bestehen reife Transkripte hingegen aus 40 Exons mit einer Länge von ca. 8,0 Kilobasen und kodieren potenziell für ein Protein bestehend aus 1.937 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von ca. 211,2 Kilodalton und einem kalkulierten isoelektrischen Punkt um pH 6,16. Die variablen Abschnitte der Ig-Domänen 2 und 3 sind von den Exonkassetten 5 bzw. 7 kodiert, während die variable Ig-Domäne 7 und beide Varianten der Transmembrandomäne von den Exonkassetten 14 bzw. 33 kodiert sind (Abb. 2.2 C & D). Das N-terminale Signalpeptid (rot) bzw. die Proteindomänen Ig1, Ig4 – Ig6 und Ig8 – Ig9 – 4x FNIII – Ig10 – 2x FNIII sind von den Exons 2 & 3, 4, 9 – 13 bzw. 15 – 32 kodiert (Abb. 2.2 C & D). Exon 35 kodiert für eine C-terminale, zytoplasmatische Domäne, während Exon 1 (grau) nicht kodierend ist (Abb. 2.2 C & D). Potenzielle posttranslationale Modifikationen sind in Form von Phosphorylierungen an bis zu 206 der 1.970 Residuen der gesamten Proteinsequenz *in silico* prognostizierbar (Abb. 12.11 im Appendix). Potenzielle Glykosylierungen sind an Aminosäureresiduen der Proteindomänen Ig1, Ig5, Ig6, FN3 und FN5 *in silico* prognostizierbar (Abb. 12.12 und 12.13 im Appendix), während potenzielle Nitrosylierungen von Cystein-Residuen im Signalpeptid sowie in den Immunglobulin-Domänen 4, 7 und 10 *in silico* prognostizierbar sind (Abb. 12.14 im Appendix).

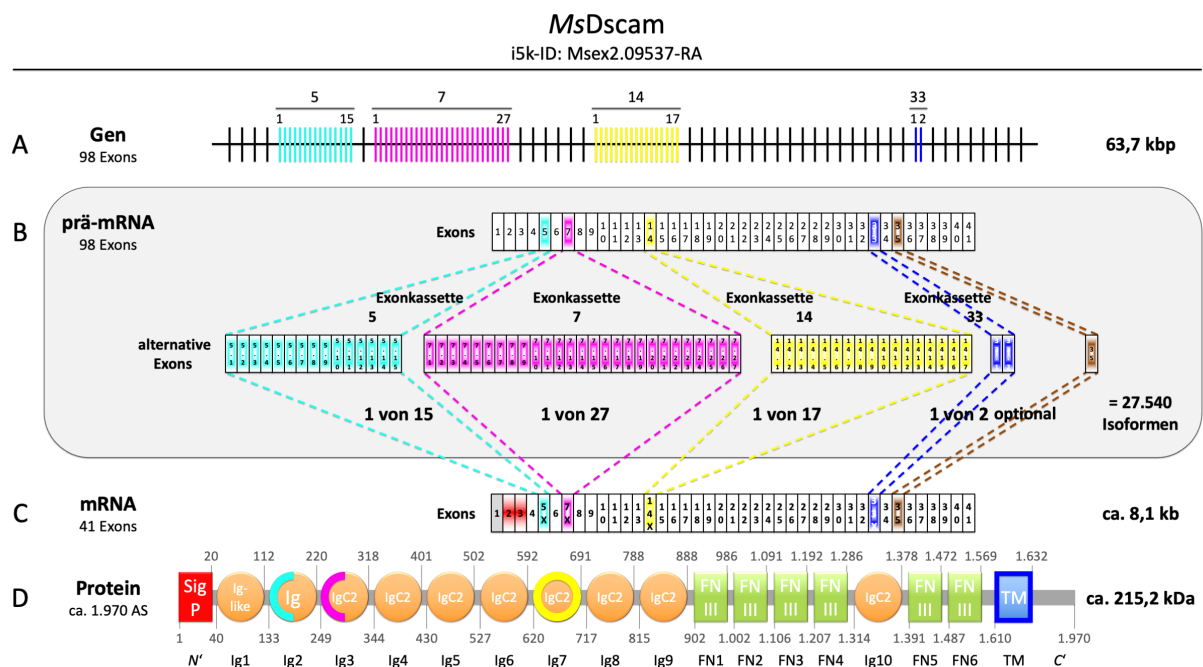


Abbildung 2.2: Gen-, Transkript- und Proteindomänenstruktur von MsDscam, editiert nach Zhang et al. (2015).

A: Das für Dscam kodierende Gen von *M. sexta* (*MsDscam*) mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RA besteht aus vier Exonkassetten mit variablen, alternativen Exons (farbige Balken), flankiert von 37 konstanten Exons (schwarze Balken) und intermediären Introns (schwarze Linie). B: Die Exonkassetten 5 (cyan), 7 (pink), 14 (gelb) und 33 (blau) bestehen aus 15, 27, 17 bzw. 2 alternativen Exons mit variablen Nukleotidsequenzen. Exon 35

(braun) ist optional. Mittels alternativem prä-mRNA-Spleißen der Kassettenexons und des optionalen Exons kodiert *MsDscam* für potenziell 27.540 unterschiedliche Transkript- (C) bzw. Proteinisoformen (D). D: Die variablen Abschnitte der Ig-Domänen 2 und 3 sind von den Exonkassetten 5 bzw. 7 kodiert, während die variable Ig-Domäne 7 und beide Varianten der Transmembrandomäne von den Exonkassetten 14 bzw. 33 kodiert sind. Die Länge der Nukleotidsequenzen ist in Kilobasen (kb) bzw. Kilobasenpaaren (kbp) angegeben. Die kalkulierte molekulare Masse des *MsDscam* Proteins ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

Abkürzungen: SigP, Signalpeptid; Ig-like, Immunglobulin-ähnliche Domäne; Ig, Immunglobulin-Domäne; IgC2, Immunglobulin-C2-Typ-Domäne; FNIII, Fibronectin-Typ-III-Domäne; TM, Transmembrandomäne; N', Amino-Terminus; C', Carboxy-Terminus; AS, Aminosäuren.

Mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RB ist eine Genvariante mit *Dscam*-ähnlicher Nukleotidsequenz *in silico* identifizierbar. Die RB-Variante kodiert *in silico* für ein Transkript mit einer Länge von ca. 8,4 Kilobasen bzw. für ein Protein bestehend aus 2.245 Aminosäuren mit einer kalkulierten, molekularen Masse von 246,13 Kilodalton und einem kalkulierten isoelektrischen Punkt bei pH 5,61 (12.1.2 im Appendix). Das von der RB-Genvariante kodierte, *in silico* translatierte Protein unterscheidet sich von den konstitutiven Sequenzbereichen der RA-Variante durch einen zusätzlichen Aminosäuresequenz-Abschnitt zwischen den Ig-Domänen 1 und 2 (12.1.3 im Appendix). Ungeachtet der variablen, alternativen Exons der RA-Genvariante ist die restliche Aminosäuresequenz der Proteine beider Genvarianten identisch (12.1.3 im Appendix).

2.4 Zielstellung

Gegenstand der vorliegenden Dissertationsarbeit ist die Charakterisierung larvaler Genexpressions- und Proteinmuster des Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls im Rahmen einer experimentell induzierten Immunantwort von *Manduca sexta*. Dazu wird ein *In-vivo*-Modell bakterieller Infektion verwendet, wobei Larven an Tag zwei des fünften Entwicklungsstadiums (L5d2) mittels Hämocoel-Injektion fixierter *E. coli* K12 stimuliert werden (siehe Kapitel 3.5). Der Einfluss systemischer *E. coli*-Stimulation auf die Expression von *MsDscam*-mRNA in Hämozyten wird im zeitlichen Verlauf nach Injektion analysiert (siehe Kapitel 4.1.2). Stimulationserfolg und Verlauf der Immunantwort in Hämozyten werden anhand der immunrelevanten Gene *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* evaluiert. An einem exemplarischen Zeitpunkt im Verlauf der Immunantwort werden Hämozyten mit Genaktivität von *MsDscam* mittels räumlicher Transkriptanalyse identifiziert (siehe Kapitel 4.1.3) und mit typspezifischen Antikörpern phänotypisiert (siehe Kapitel 4.1.4 und 4.1.5). **(1)** Dementsprechend ist das primäre Ziel die Identifizierung und Charakterisierung distinkter Hämozytenpopulationen anhand typspezifischer *MsDscam* Transkriptions- und Proteinmuster. Zusätzlich sollen Transkriptionsmuster zirkulierender Hämozyten (siehe Kapitel 4.1.2) und Proteinmuster immunkompetenter Gewebe und Organe (siehe Kapitel 4.1.6) im Kontext von *In vitro*-Interaktion mit Mikroorganismen (siehe Kapitel 4.1.7) und des zeitlichen Verlaufes der zellulären Immunantwort (Phagozytose, siehe Kapitel 4.2) analysiert werden. **(2)** Sekundär sollen mit diesem ganzheitlichen Ansatz

kumulative Evidenzen für die biologische Relevanz von Dscam in angeborener Immunität von *Manduca sexta* identifiziert werden. Dazu werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- **Genexpression**

- In welchen Geweben und Organen unbehandelter Larven ist *dscam* exprimiert? Ist *dscam* in immunkompetenten Geweben und Organen unbehandelter Larven exprimiert? (4.1.1)
- Ist das Expressionslevel von *dscam* in immunkompetenten Geweben (Bsp.: Hämocyten) nach bakterieller Stimulation verändert? (4.1.2)
- Wann ist das Expressionslevel von *dscam* im Vergleich zu immunrelevanten Genen in immunkompetenten Geweben (Bsp.: Hämocyten) nach bakterieller Stimulation verändert? (4.1.2)
- Ist das Expressionsmuster von *dscam* in immunkompetenten Geweben (Bsp.: Hämocyten) nach bakterieller Stimulation verändert? (4.1.3)
- In welchen Hämocyten-subpopulationen ist *dscam* nach bakterieller Stimulation exprimiert? (4.1.4)

- **Proteinmuster**

- Ist das Muster anti-DSCAM-positiver Proteine in immunkompetenten Geweben und Organen nach bakterieller Stimulation verändert? (4.1.6)

- **Protein-Mikroorganismen-Interaktion**

- Lässt sich eine Interaktion von anti-DSCAM-positiven Proteinen und Mikroorganismen nach *in vitro*-Inkubation nachweisen? (4.1.7)

- **Potenzielle zelluläre Immunantwort (Phagozytose)**

- Wie groß ist der Anteil mit Bakterien kolokalisierter Hämocyten im Verlauf von 24 h nach bakterieller Stimulation? (4.2)

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

3.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tris-gepufferte Salzlösung, isotonisch (TBS isotonisch), pH 7,5 nach Cell Signalling Technology® (2013)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
NaCl	137 mmol/L	1,37 mol/L
Tris	20 mmol/L	0,20 mol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		
pH-Wert-Einstellung mit: HCl	1x: 1 mol/L	10x: 10 mol/L

Tris-gepufferte Salzlösung, hypertonisch (TBS hypertonisch, TBS), pH 7,5

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
NaCl	500 mmol/L	5,0 mol/L
Tris	20 mmol/L	0,2 mol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		
pH-Wert-Einstellung mit: HCl	1x: 1 mol/L	10x: 10 mol/L

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
NaCl	500 mmol/L	
Tris	20 mmol/L	
Tween® 20	896 $\mu\text{mol/L}$	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
NaCl	500 mmol/L	
Tris	20 mmol/L	
Triton™ X-100	1,71 mmol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

3 % BSA in TBS (Antikörperblockierlösung, Block), pH 7,5

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]
<u>Bovines Serumalbumin (BSA)</u>	30 mg/mL
in 1x TBS hypertonisch, pH 7,5	

Bovines Serumalbumin (BSA) wurde in einer Massenkonzentration von 30 mg/mL (entspricht 3 % w/v) abgewogen, unter Rühren in 1x TBS (hypertonisch, pH 7,5) bei RT gelöst, aliquotiert

und bei -20 °C gelagert. Nach Zugabe von zusätzlichen 5 % (v/v) Ziegen Serum wird die Antikörperblockierlösung als Superblock (SB) bezeichnet.

DAPI in TBS (Kernfärbelösung) zur Fluoreszenzmarkierung von DNA

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]	
	Stammlösung: 1000x	Gebrauchslösung: 1x
DAPI (Carl Roth, Kat.-Nr.: 6335.1)	1 mg/mL in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	1 $\mu\text{g/mL}$ in 1x TBS

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
NaCl	137 mmol/L	1,37 mol/L
KCl	2,7 mmol/L	27 mmol/L
Na ₂ HPO ₄	10 mmol/L	100 mmol/L
KH ₂ PO ₄	1,8 mmol/L	18 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween® 20 (Tween-PBS), pH 7,4

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
NaCl	137 mmol/L	
KCl	2,7 mmol/L	
Na ₂ HPO ₄	10 mmol/L	
KH ₂ PO ₄	1,8 mmol/L	
Tween® 20	896 $\mu\text{mol/L}$	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Antikoagulanzsaline (AC-Saline), pH 6,5

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
NaCl	3,9 mmol/L	39 mmol/L
KCl	40,0 mmol/L	400 mmol/L
Saccharose	146,0 mmol/L	1,46 mol/L
Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP40)	1 g/L	10 g/L
EDTA	8,0 mmol/L	80 mmol/L
Citronensäure-Monohydrat	9,5 mmol/L	95 mmol/L
Trinatriumcitrat	27,0 mmol/L	270 mmol/L
PIPES	1,7 mmol/L	17 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

pH-Wert-Einstellung mit: NaOH : KOH (1 : 1) **1x:** 1 mol/L **10x:** 10 mol/L

Ca²⁺/Mg²⁺-freie Manduca sexta-Saline (MS⁻), pH 6,5

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
NaCl	3,9 mmol/L	39 mmol/L
KCl	40,0 mmol/L	400 mmol/L
Saccharose	146,0 mmol/L	1,46 mol/L
Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP40)	1 g/L	10 g/L
PIPES	1,7 mmol/L	17 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		
pH-Wert-Einstellung mit: NaOH : KOH (1 : 1) 1x: 1 mol/L 10x: 10 mol/L		

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

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]
Paraformaldehyd	35 mg/mL
in 1x MS ⁻ , pH 6,5	

Paraformaldehyd (Pulver/granuliert gepresst) wurde entsprechend einer Massenkonzentration von 35 mg/mL gewünschtem Fixanzvolumen abgewogen. Das abgewogene Paraformaldehyd (PFA) wurde unter einem Abzug in 80 % des Soll-Endvolumens MS⁻ unter Rühren in einem Weithals-Erlenmeyerkolben vorsichtig auf 60 °C erhitzt, um das wasserunlösliche PFA (kurzkettiges Formaldehyd-Polymer) in wasserlösliche Formaldehyd (FA)-Monomere aufzuspalten. Trotz Erwärmung auf 60 °C zerfällt PFA bei leicht saurem pH-Wert nicht vollständig. Erst nach schrittweisem Alkalisieren durch Zugabe von einigen Tropfen NaOH (10 mol/L) zerfällt PFA ab einem pH-Wert von 7 und höher vollständig zu Formaldehyd-Monomeren und löst sich in MS⁻ bis die Lösung klar und durchsichtig ist (Aescht et al. 2015). Anschließend wurde die Formaldehydlösung auf RT abgekühlt, filtriert und auf einen pH-Wert von 6,5 durch Titration mit HCl (10 mol/L) eingestellt. Der Soll-Massenanteil von 3,5 % (w/v) Formaldehyd in MS⁻ wurde durch Auffüllen der Fixierlösung bis zum Endvolumen mit MS⁻ (pH 6,5) erreicht, was einer Massenkonzentration von 35 mg Formaldehyd pro mL Fixierlösung entspricht. Zur Abgrenzung von methanolhaltigen, wässrigen Formaldehydlösungen (synonym als Formalin/Formol bezeichnet) wird diese Formaldehydlösung als 3,5 % Paraformaldehyd in MS⁻ (3,5 % PFA-MS⁻) bezeichnet. Zur Lagerung wurde die Formaldehydlösung in 15 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C eingefroren, wodurch die Formaldehyd-Monomere ohne Stabilisatoren für ca. sechs Monate stabil in Lösung bleiben (Aescht et al. 2015). Bei 2 – 8 °C ist die Formaldehydlösung für ca. vier Wochen stabil, bevor die Polymerisierung zu Paraformaldehyd einsetzt, wodurch die Fixierungswirkung abnimmt.

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
	1x
NaCl	100 mmol/L
Tris	100 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
	1x
NaCl	100 mmol/L
Tris	100 mmol/L
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	4,0 mmol/L
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	5,5 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
	1x
NaCl	100 mmol/L
Tris	100 mmol/L
EDTA	50 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Peroxidase-Phenoloxidase-Puffer (PP-Puffer), pH 7,5

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
	1x
Tris	50 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Peroxidase-Phenoloxidase-Entwicklungspuffer (PP-Entwicklungspuffer), pH 7,5 zum Nachweis von (endogenen) Peroxidasen und Phenoloxidasen mittels katalytischer Enzymbio- und Enzymzytochemie nach von Bredow et al. (2021), verändert nach Zufelato et al. (2004)

Chemische Verbindung	Massenkonz. β [g/L]	Stoffmengenkonz. c [mol/L]
	1x	1x
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	0,5 mg/mL	2,33 mmol/L
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	0,3 mg/mL	8,91 mmol/L
Optional: Natriumazid (NaN_3)	3,3 mg/mL	50,00 mmol/L
in PP-Puffer (Tris: 50 mmol/L), pH 7,5		

Je 10 mL PP-Puffer (Tris: 50 mmol/L) wurden 5 mg DAB (chromogenes Substrat (endogener) Peroxidasen und Phenoloxidasen) mittels Vortex-Schüttler gelöst. Unmittelbar vor Reaktionsbeginn des Enzymnachweises wurden 100 μL einer Wasserstoffperoxidlösung mit einem Massenanteil von 3 % (w/v) zugegeben. Zum selektiven Nachweis endogener Phenoloxidasen

wurde optional der Peroxidase-Inhibitor Natriumazid (NaN_3) in einer Massenkonzentration von $\beta_{\text{NaN}_3} = 3,3 \text{ mg/mL}$ ($c_{\text{NaN}_3} = 50 \text{ mmol/L}$) zugegeben (Ortiz de Montellano et al. 1988), was zur vollständigen Inhibition endogener Peroxidasen führt während Tyrosinase-Typ-Phenoloxidasen eine relative Restaktivität von 20 % zeigen (Zufelato et al. 2004).

Bicarbonat-Carbonat-Puffer (Na-Bicarbonatpuffer), pH 9,4 nach AAT Bioquest (2021)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
NaHCO_3 (Natriumbicarbonat)	39,9 mmol/L	
Na_2CO_3 (Natriumcarbonat)	10,1 mmol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Bicarbonat-Carbonat-Puffer wurde stets frisch entsprechend der angegebenen Stoffmengenkonzentration in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$) angesetzt, worunter die resultierende Lösung einen pH-Wert von 9,4 besitzt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: $0,45 \mu\text{m}$) steril filtriert und abgedunkelt in Braunglasflaschen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Fluorescein-Isothiocyanat in Na-Bicarbonatpuffer (FITC-Markierungslösung), pH 9,4 zur FITC-Markierung von Bakterien in Suspension

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. c [mol/L]	Massenkonz. β [g/L]
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) Isomer I, (Sigma [®] , Katalog-Nr.: F7250)	2,6 mmol/L	1 mg/mL
in Na-Bicarbonatpuffer, pH 9,4		

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) Isomer I (Sigma[®], Katalog-Nr.: F7250) wurde entsprechend einer Massenkonzentration von 1 mg/mL in Bicarbonat-Carbonat-Puffer (Na-Bicarbonatpuffer, pH 9,4) gelöst und unmittelbar zur FITC-Markierung von Bakterien in Suspension verwendet (Kapitel 3.4.2).

3.1.2 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

DNase/RNase-inaktiviertes Reinstwasser (DEPC-Reinstwasser)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	6,9 mmol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Zur Inaktivierung von DNasen und RNasen wurde Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$) mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einer Stoffmengenkonzentration von 6,9 mmol/L (entspricht 1 % DEPC v/v, 1 mL DEPC je Liter Reinstwasser) versetzt und unter einem Abzug unter Rühren über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das DEPC-behandelte Reinstwasser bei 20 psi für

20 min autoklaviert, wobei DEPC zu Kohlenstoffdioxid und Ethanol zerfällt (Mülhardt 2009). Puffer und Lösungen, die mit DEPC-Reinstwasser frei von aktiven DNasen & RNasen angesetzt wurden, wurden zusätzlich mit dem Präfix „DEPC-XY“ (Bsp.: DEPC-TBS) beschriftet.

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	50x
Tris	40 mmol/L	2 mol/L
EDTA	1 mmol/L	50 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), pH 8,5

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	50x
Tris	40 mmol/L	2 mol/L
Essigsäure	20 mmol/L	1 mol/L
EDTA	1 mmol/L	50 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Für DNA-Analysen wurden die Komponenten des TAE-Puffers entsprechend der oben genannten Stoffmengenkonzentrationen angesetzt. Für RNA-Analysen wurde 50x TAE-Puffer *molecular biology grade* (Katalog-Nr.: A4686, AppliChem) verwendet.

DNA-Extraktionspuffer, pH 9,0 nach Steller & Pirrotta (1986)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
Tris (Base)	100,00 mmol/L	
EDTA	100,00 mmol/L	
SDS	34,67 mmol/L	
in DEPC-Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

10x DNA-Probenpuffer

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	10x	
Glycerol	5,47 mol/L	
Xylencyanol	1,71 mmol/L	
Tartrazin O	1,87 mmol/L	
in TE-Puffer, pH 8,5		

1x RNA-Probenpuffer nach Masek et al. (2005)

Chemische Verbindung	Volumenanteil φ [%]	
	1x	
Formamid, deionisiert	66 % (v/v)	
10x DNA-Probenpuffer	11 % (v/v)	
in DEPC-Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Plasmid-DNA-Präparationslösung I (Mini I), pH 8,0

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. C [mol/l], Massenkonz. β [g/L]	
	1x	
Tris (Base)	25 mmol/L	
EDTA	10 mmol/L	
Glukose	50 mmol/L	
RNase A	100 mg/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Tris (Base) und EDTA wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt. Im Anschluss wurde die Tris-EDTA-Lösung autoklaviert und abgekühlt, bevor steril filtrierte Glukoselösung in einer finalen Stoffmengenkonzentration von 50 mmol/L zugegeben und die Lösung bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurde. Erst kurz vor der Präparation wurde RNase A in einer finalen Massenkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zugegeben.

Plasmid-DNA-Präparationslösung II (Mini II)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. C [mol/L], Massenkonz. β [g/L]	
	1x	
NaOH	0,2 mol/L	
SDS	10 g/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Mini II-Lösung wurde für jede Plasmid-Minipräparation frisch angesetzt.

Plasmid-DNA-Präparationslösung III (Mini III)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. C [mol/L], Volumenanteil φ [%]	
	1x	
Kaliumacetat	3 mol/L	
Essigsäure	11,5 % (v/v)	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (SSC), pH 7,0 nach Southern (1975)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	20x
NaCl	150 mmol/L	3,0 mol/L
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	15 mmol/L	0,3 mol/L
in DEPC-Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

RNA-Hybridisierungspuffer (HYBE-Puffer)

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L], Volumenanteil φ [%]	
	1x	
Formamid, deionisiert	50 % (v/v)	
20x SSC	25 % (v/v)	
Heparin	1 g/L	
Fischsperma-DNA	1 g/L	
Tween® 20	0,1 % (v/v)	
in DEPC-Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Maleinsäurepuffer, pH 7,5

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
Maleinsäure	0,10 mol/L	
NaCl	0,15 mol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer, pH 7,5

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]	
	1x	10x
Blocking Reagent (Roche)	10 mg/mL	100 mg/mL
in Maleinsäurepuffer, pH 7,5		

Blocking Reagent (Roche Diagnostics, Katalog-Nr.: 11 096 176 001) wurde als 10x Stammlösung in einer Massenkonzentration von 100 mg/mL (entspricht 10 % w/v) unter Schütteln und Erwärmen in der Mikrowelle in 1x Maleinsäurepuffer (pH 7,5) gelöst, autoklaviert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.1.3 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie**Trenngelpuffer für SDS-PAGE, pH 8,8**

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
Tris	636 mmol/L	
Tris-Hydrochlorid	117 mmol/L	
SDS	7 mmol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE, pH 6,8

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
Tris	330 mmol/L	
SDS	7 mmol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung für SDS-PAGE

als gebrauchsfertige, wässrige 30 % Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1; 2,7 % Crosslinking (Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1), Katalog-Nr.: 3029) von Carl Roth GmbH bezogen, Zusammensetzung:

Chemische Verbindung	Volumenanteil φ [%]
30,0 % Acrylamid	97,4 % (v/v)
0,8 % Bisacrylamid	2,6 % (v/v)

Tris-Glycin-Elektrodenpuffer für SDS-PAGE, pH 8,3 zur denaturierenden elektrophoretischen Trennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel modifiziert nach Laemmli (1970)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
Tris	50,0 mmol/L	0,50 mol/L
Glycin	192,0 mmol/L	1,92 mol/L
SDS	3,5 mmol/L	35 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Tris-Glycin-Elektrodenpuffer wurde als zehnfach konzentrierte Stammlösung (10x Tris-Glycin-Elektrodenpuffer) angesetzt. Nach dem Lösen aller Pufferkomponenten in Reinstwasser hat die Stammlösung einen pH-Wert von 8,7 – 8,8, welcher nicht verändert wurde (die Veränderung des pH-Wertes durch Zugabe von Salzsäure (HCl) führt zu einer erhöhten Salzkonzentration im Puffer- und Gelsystem, wodurch die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine im Polyacrylamidgel negativ beeinflusst wird). Zur Verwendung als Elektrophoresepuffer in der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Stammlösung 1 : 10 in Reinstwasser verdünnt. Nach Verdünnung in Reinstwasser hat der 1x Tris-Glycin-Elektrodenpuffer einen pH-Wert von 8,3 und wurde unverändert, ohne weitere Einstellung des pH-Wertes, für die Gelelektrophorese verwendet.

Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC)

als lyophilisierte Pulvermischung von Sigma-Aldrich® (Katalog-Nr.: P2714) bezogen, Zusammensetzung: (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/5/p2714dat.pdf>):

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	10x
AEBSF	2 mmol/L	20 mmol/L
Aprotinin	0,3 $\mu\text{mol/L}$	3 $\mu\text{mol/L}$
Bestatin	116 $\mu\text{mol/L}$	1,16 mmol/L
E-64	14 $\mu\text{mol/L}$	140 $\mu\text{mol/L}$
Leupeptin	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
EDTA	1 mmol/L	10 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Aminopeptidase-Inhibitor: Bestatin

Cysteinprotease-Inhibitor: E-64, Leupeptin

Metalloprotease-Inhibitor: EDTA

Serinprotease-Inhibitor: AEBSF, Aprotinin, Leupeptin

Das lyophilisierte Proteaseinhibitor-Cocktail-Pulver eines Fläschchens wurde als 10x Stamm-lösung in steril autoklaviertem Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$) gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. $0,5 \mu\text{L}$ 10x Proteaseinhibitor-Cocktail sind ausreichend, um die Proteasen in 1 mg Zell- bzw. Gewebeeextrakt oder $4,5 \mu\text{L}$ Serum (zellfreies Hämolymp plasma) zu inhibieren.

Solubilisierungspuffer

Chemische Verbindung	Volumenanteil φ [%], Massenkonzentration β [g/L]
Sammelgelpuffer	77,5 % (v/v)
10x Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich®, P2714)	12,5 % (v/v)
Glycerol	0,1 g/mL

10 mL Solubilisierungspuffer setzen sich entsprechend o. g. Volumenanteil und o. g. Massenkonzentration aus $7,75 \text{ mL}$ Sammelgelpuffer, $1,25 \text{ mL}$ 10x Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich®, Katalog-Nr.: P2714) und 1 g Glycerol zusammen und werden aliquotiert bei -20°C gelagert. $4 \mu\text{L}$ Solubilisierungspuffer sind entsprechend der Herstellerangaben des Proteaseinhibitor-Cocktails (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/5/p2714dat.pdf>) ausreichend für die Lyse von 1 mg Gewebe oder $1 \mu\text{L}$ Serum (zellfreiem Hämolymp plasma).

SDS-PAGE Probenpuffer modifiziert nach Laemmli (1970)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	2x	5x
Tris	$0,075 \text{ mol/L}$	$0,187 \text{ mol/L}$
Glycerol	$1,100 \text{ mol/L}$	$2,700 \text{ mol/L}$
SDS	$0,139 \text{ mol/L}$	$0,347 \text{ mol/L}$
β -Mercaptoethanol	$1,150 \text{ mol/L}$	$2,860 \text{ mol/L}$
Bromphenolblau	$120 \mu\text{mol/L}$	$300 \mu\text{mol/L}$
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Coomassie-R-250-Färbelösung, Detektionsgrenze: $1 \mu\text{g}$ BSA

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
Coomassie Brilliantblau R-250 (CBB-R250)	$3,00 \text{ mmol/L}$
Essigsäure	$1,60 \text{ mol/L}$
Methanol	$11,22 \text{ mol/L}$
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Coomassie Brilliantblau R-250 (CBB-R250) ist ein Triphenylmethanfarbstoff aus der Gruppe der Säurefarbstoffe, welcher sequenzunspezifisch und nichtkovalent an unpolare, hydrophobe und kationische Seitenketten von Aminosäuren bindet. Die Detektionsgrenze von Coomassie-R-250-Färbelösung liegt bei $0,1 - 1 \mu\text{g}$ Bovines Serumalbumin (BSA).

Coomassie-R-250-Entfärbelösung

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
Essigsäure	1,75 mol/L
Ethanol	5,14 mol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Kolloidale Coomassie-Färbelösung nach Dybala & Metzger (2009), Detektionsgrenze: 5 ng BSA

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
Coomassie Brilliantblau G-250 (CBB-G250)	234 $\mu\text{mol/L}$
Aluminiumsulfat-(16)-Hydrat	79 mmol/L
Ethanol	1,71 mol/L
Ortho-Phosphorsäure	384 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Coomassie Brilliantblau G-250 (CBB-G250) ist ein Triphenylmethanfarbstoff aus der Gruppe der Säurefarbstoffe, welcher sequenzunspezifisch und nichtkovalent an unpolare, hydrophobe und kationische Seitenketten von Aminosäuren bindet. In Anwesenheit von dreiwertigen Aluminiumionen (z. B. durch Lösen von Aluminiumsulfat in Wasser) lässt sich CBB-G250 nicht vollständig in Wasser lösen, sondern liegt teilweise als Kolloid vor, wodurch die Bindung von CBB-G250 an Aminosäuren verbessert wird (Kang et al. 2002). Die Detektionsgrenze dieser kolloidalen Coomassie-Färbelösung liegt bei 1 – 5 ng Bovines Serumalbumin (BSA), was mit der Sensitivität der Silberfärbung vergleichbar ist. Bei der Herstellung kolloidaler Coomassie-Färbelösung wurde nach Dybala & Metzger (2009) folgende Reihenfolge eingehalten: (1) Aluminiumsulfat-(16)-Hydrat wurde zunächst in Reinstwasser gelöst. (2) Danach wurde Ethanol zugegeben, die Lösung homogenisiert und (3) CBB-G250 zugegeben und gelöst. (4) Sobald sich das Aluminiumsulfat vollständig gelöst hat wurde Phosphorsäure hinzugegeben und die Färbelösung mit Reinstwasser auf das Endvolumen aufgefüllt. In der resultierenden dunkelgrün-bläulichen Färbelösung sind Coomassie-Farbpartikel im kolloidalen Zustand erkennbar, die nicht abfiltriert werden sollten. In einer dunklen Flasche abgefüllt ist die kolloidale Coomassie-Färbelösung für mindestens sechs Monate stabil. Sobald in der gebrauchten Färbelösung nach Adsorption an Proteine im Polyacrylamidgel keine kolloidalen Coomassie-Farbpartikel mehr sichtbar sind, sollte die Lösung nicht wiederverwendet und entsorgt werden.

Kolloidale Coomassie-Entfärbelösung nach Dybala & Metzger (2009)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
Ethanol	1,71 mol/L
Ortho-Phosphorsäure	384 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

10x Towbin-Stammlösung, pH 8,3 für Western Blotting nach Towbin et al. (1979)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	10x	
Tris (Base)	0,25 mol/L	
Glycin	1,92 mol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Der pH-Wert der Stammlösung wurde nicht eingestellt.

Towbin-Transferpuffer, pH 8,3 für Western Blotting nach Towbin et al. (1979)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. C [mol/L] & Volumenanteil φ [%]	
	1x	
Tris (Base)	25 mmol/L	
Glycin	192 mmol/L	
Methanol (Blotting-Grade)	10 % (v/v)	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Der pH-Wert des Transferpuffers wurde nicht eingestellt.

Denaturierungs- und Renaturierungspuffer (AC-Puffer) für Far-Western Blotting nach Wu et al. (2007)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. C [mol/L] & Massenkonz. β [g/L]				
	1x				
Guanidin-HCl	6 mol/L	3 mol/L	1 mol/L	0,1 mol/L	0 mol/L
NaCl	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L
Tris pH 7,6	20 mmol/L	20 mmol/L	20 mmol/L	20 mmol/L	20 mmol/L
EDTA	0,5 mmol/L	0,5 mmol/L	0,5 mmol/L	0,5 mmol/L	0,5 mmol/L
Glycerol	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
Tween® 20	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Magermilchpulver	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL
DTT	1 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)					

Der AC-Puffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

Proteinbindepuffer für Far-Western Blotting verändert nach Wu et al. (2007)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. C [mol/L] & Massenkonz. β [g/L]	
	1x	
NaCl	100 mmol/L	
Tris pH 7,6	20 mmol/L	
EDTA	0,5 mmol/L	
Glycerol	100 mg/mL	
Tween® 20	0,1 % (v/v)	
Magermilchpulver	20 mg/mL	
DTT	1 mmol/L	
<i>Bait</i> -Protein/-Proteingemisch	40 mg/mL	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Das *Bait*-Protein/-Proteingemisch wurde in einer Massenkonzentration von 40 mg/mL in Proteinbindepuffer gelöst. Der Proteinbindepuffer wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

3.1.4 Puffer und Medien für die Zellkultur

Standard-Nährmedium I, pH 7,5

als Pulvermischung von Carl Roth bezogen, Zusammensetzung:

Chemische Verbindung	Massenkonz. β [g/L] & Stoffmengenkonz. C [mol/L]
Pepton	15 g/L
Hefeextrakt	3 g/L
NaCl	103 mmol/L
Glukose	5,6 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Wurde nach dem Ansetzen autoklaviert, steril verschlossen und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Standard-I-Agar, pH 7,5

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]
Agar-Agar	15 g/L
in Standard-Nährmedium I, pH 7,5	

Wurde nach dem Ansetzen autoklaviert, auf 42 °C abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen. Bis zum Gebrauch wurden die sterilen Standard-I-Agarplatten, mit der Nährbodenunterseite nach oben in einen Plastikbeutel gestapelt, bei 4 °C gelagert.

Standard-I-Selektivmedium, pH 7,5

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 $\mu\text{g/mL}$
in Standard-Nährmedium I, pH 7,5	

Nach Autoklavieren und Abkühlen von Standard-Nährmedium I auf RT wurde Penicillin in einer Massenkonzentration von 100 U/mL und Streptomycin in einer Massenkonzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ (entspricht einer 1 : 100 Verdünnung einer Stammlösung mit einer Massenkonzentration von 10.000 U Penicillin/mL und 10 mg Streptomycin/mL; 1 mL Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (Pen-Strep, Sigma-Aldrich®, Katalog-Nr.: P4333) je 100 mL Standard-Nährmedium I) zugegeben. Bei 37 °C ist Pen-Strep im Standard-I-Selektivmedium für ca. 3 Tage stabil (Gstraunthaler & Lindl 2013).

Standard-I-Selektivagar, pH 7,5

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]
Agar-Agar	15 g/L
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 $\mu\text{g/mL}$
in Standard-Nährmedium I, pH 7,5	

Nach Autoklavieren und Abkühlen des Standard-I-Agars auf 42 °C wurde Penicillin in einer Massenkonzentration von 100 U/mL und Streptomycin in einer Massenkonzentration von 100 µg/mL (entspricht einer 1 : 100 Verdünnung einer Stammlösung mit einer Massenkonzentration von 10.000 U Penicillin/mL und 10 mg Streptomycin/mL; 1 mL Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (Pen-Strep, Sigma-Aldrich®, Katalog-Nr.: P4333) je 100 mL Standard-Nährmedium I) zugegeben, bevor der Selektivagar in sterile Petrischalen gegossen wurde. Bis zum Gebrauch wurden die sterilen Standard-I-Selektivagarplatten, mit der Nährbodenunterseite nach oben in einen Plastikbeutel gestapelt, bei 4 °C gelagert. Bei 37 °C ist Pen-Strep im Standard-I-Selektivagar für ca. 3 Tage stabil (Gstraunthaler & Lindl 2013).

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

Chemische Verbindung	Massenkonz. β [g/L] & Stoffmengenkonz. C [mol/L]
Pflanzenpepton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 mmol/L
KCl	2,5 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
MgSO ₄	10 mmol/L
Glukose	20 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Lysogeny broth (LB-Miller-Medium), pH 7,0 nach Bertani (1951) & Miller (1972) als Pulvermischung von Carl Roth bezogen, Zusammensetzung:

Chemische Verbindung	Massenkonz. β [g/L] & Stoffmengenkonz. c [mol/L]
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	172 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Wurde nach dem Ansetzen autoklaviert und steril verschlossen.

LB-Miller-Agar (Lysogeny broth mit Agar), pH 7,0

Chemische Verbindung	Massenkonzentration β [g/L]
Agar-Agar	15 g/L
in LB-Miller-Medium, pH 7,0	

Wurde nach dem Ansetzen autoklaviert, auf 42 °C abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen.

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

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]
Ampicillin	143,1 $\mu\text{mol/L}$
in LB-Miller-Medium, pH 7,0	

Nach Autoklavieren und Abkühlen des LB-Miller-Mediums auf RT wurde Ampicillin in einer Massenkonzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ (entspricht einer 1 : 2000 Verdünnung einer Stammlösung mit einer Massenkonzentration von 100 mg/mL) zugegeben.

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

Chemische Verbindung	Massenkonz. β [g/L] & Stoffmengenkonz. c [mol/L]
Agar-Agar	15 g/L
Ampicillin	143,1 $\mu\text{mol/L}$
Optional: IPTG	200 $\mu\text{mol/L}$
Optional: X-Gal	97,9 $\mu\text{mol/L}$
in LB-Miller-Medium, pH 7,0	

Nach Autoklavieren und Abkühlen des LB-Miller-Agars auf 42 °C wurde Ampicillin in einer Massenkonzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ (entspricht einer 1 : 2000 Verdünnung einer Stammlösung mit einer Massenkonzentration von 100 mg/mL) zugegeben, bevor der Selektivagar in sterile Petrischalen gegossen wurde. Für die Blau-Weiß-Selektion wurde dem Selektivagar vor dem Gießen zusätzlich Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG; 200 $\mu\text{mol/L}$) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal, 97,9 $\mu\text{mol/L}$) zugegeben.

Plasmodien-Zellkulturmedium zur Kultivierung asexueller, erythrozytärer Entwicklungsstadien von *P. falciparum* nach Rahbari et al. (2017) modifiziert nach Trager & Jensen (1976)

Zellulärer Bestandteil/ Chemische Verbindung	Volumenanteil φ [%], Stoffmengenkonzentration c [mol/L] & Massenkonzentration β [g/L]
Humane Erythrozyten Blutgruppe A Rh+	0,033 L/L
HEPES	25 mmol/L
AlbuMAX™ II	0,5 % (w/v)
Glukose	9 mmol/L
Hypoxanthin	0,2 mmol/L
L-Glutamin	2,1 mmol/L
Gentamycin	22 $\mu\text{g/mL}$
in RPMI-1640	

Sorbitol-Lysepuffer, pH 7,4 zur Synchronisierung *in-vitro* kultivierter erythrozytärer, asexueller Entwicklungsstadien von *P. falciparum* nach Lambros & Vanderberg (1979), Osmolalität b_{osm} : 287 mosmol/kg

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. c [mol/L]	Volumenanteil φ [%]
D-Sorbitol	0,27 mol/L	5 % (w/v)
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Nach dem Lösen von 5 % (w/v) D-Sorbitol in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$) und Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 wurde die Lösung steril filtriert.

Phosphat-gepufferte Salzlösung, optimiert für *P. falciparum* (P-PBS), pH 7,4 nach Sturm et al. (2009)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. c [mol/L], Massenkonz. β [g/L]
	1x
NaCl	56 mmol/L
KCl	58 mmol/L
K ₂ HPO ₄	7 mmol/L
NaH ₂ PO ₄	1 mmol/L
NaHCO ₃	11 mmol/L
MgCl ₂	1 mmol/L
Glukose	14 mmol/L
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Nach dem Lösen aller Pufferkomponenten in Reinstwasser wurde die Lösung steril filtriert.

Phosphat-gepufferte Salzlösung, optimiert für *P. falciparum* (P-PBS), pH 7,4 mit 0,02 % (w/v) Saponin (Saponin-Lysepuffer) zur Präparation erythrozytärer asexueller Entwicklungsstadien von *P. falciparum* durch Permeabilisierung infizierter Erythrozyten nach Sturm et al. (2009)

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonz. c [mol/L], Massenkonz. β [g/L]
	1x
NaCl	56 mmol/L
KCl	58 mmol/L
K ₂ HPO ₄	7 mmol/L
NaH ₂ PO ₄	1 mmol/L
NaHCO ₃	11 mmol/L
MgCl ₂	1 mmol/L
Glukose	14 mmol/L
Saponin	0,2 mg/mL
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)	

Nach dem Lösen aller Pufferkomponenten in Reinstwasser wurde die Lösung steril filtriert.

Hanks' Balancierte Salzlösung (HBSS), pH 7,4, mit Ca/Mg, Osmolalität (b_{osm}) = 274 – 290 mosmol/kg, ready-to-use und steril von Carl Roth bezogen (Katalog-Nr.: 9119.1), gepufferte Salzlösung mit einer dem Blutplasma entsprechenden, isotonischen und isoionischen Elektrolytzusammensetzung und physiologischem pH-Wert zum Waschen humaner Zellen vor *in-vitro*-Zellkulturanwendungen, Zusammensetzung:

Chemische Verbindung	Stoffmengenkonzentration c [mol/L]	
	1x	
NaCl	136,9 mmol/L	
KCl	5,4 mmol/L	
CaCl ₂ 2 H ₂ O	1,3 mmol/L	
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,8 mmol/L	
Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	0,3 mmol/L	
KH ₂ PO ₄	0,4 mmol/L	
D-Glukose	5,5 mmol/L	
NaHCO ₃	4,2 mmol/L	
in Reinstwasser ($\leq 0,055 \mu\text{S}$)		

Hybridoma-Zellkulturmedium, pH 7,0 zur Kultivierung muriner Hybridoma-Zellen

Chemische Verbindung	Volumenanteil φ [%] & Stoffmengenkonz. c [mol/L]	
HEPES	1,19 mmol/L	
β -Mercaptoethanol (β -ME)	480 $\mu\text{mol/L}$	
NaHCO ₃	8,93 mmol/L	
Fötale Bovines Serum (FBS)	0 – 10 % (v/v)	
Optional: Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Penicillin:	100 U/mL
	Streptomycin:	100 $\mu\text{g/mL}$
in RPMI-1640 mit L-Glutamin		

RPMI-1640 Säugetier-Zellkulturmedium mit L-Glutamin wurde nach Zugabe von HEPES, β -Mercaptoethanol (β -ME) und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) laborintern als *RPMI-complete* bezeichnet. Der Volumenanteil von *RPMI-complete*, Fötalem Bovinen Serum (FBS), BM Condimed H1 (BMH1, Roche Diagnostics, Katalog-Nr.: 11 088 947 001) und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde je nach Verwendungszweck individuell angepasst (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Volumenanteil φ von *RPMI-complete*, Fötalem Bovinen Serum (FBS, Rinderserumalbumin), BM Condimed H1 (BMH1) und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Hybridoma-Zellkulturmedium.

Medium	$\varphi_{\text{RPMI-complete}}$ [%]	φ_{FBS} [%]	φ_{BMH1} [%]	φ_{DMSO} [%]
Auftaedium	90 % (v/v)	10 % (v/v)	-	-
Ausplattier-/Kloniermedium	80 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	-
Routinemedium	95 - 100 % (v/v)	5 - 0 % (v/v)	-	-
Erntemedium	100 % (v/v)	-	-	-
Einfriermedium	50 % (v/v)	40 % (v/v)	-	10 % (v/v)

Optional wurde Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep, Sigma-Aldrich®, Katalog-Nr.: P4333) in einer Massenkonzentration von 100 U Penicillin/mL und 100 μg Streptomycin/mL zugegeben.

3.2 Zucht und Haltung des Versuchorganismus *Manduca sexta*

Zu Experimentalzwecken wurden Larven des Amerikanischen Tabakschwärmers *Manduca sexta* L. (Sphingidae, Lepidoptera) vom Larvenstadium 1 (L1) bis zum Larvenstadium 5 (L5) in Einzeltierhaltung in Kunststoffgefäßen bei konstant 24 °C im Brutschrank unter Tag-Nacht-Gleiche (12 h hell, 12 h dunkel) gehalten. In regelmäßigen Abständen von zwei bis drei Tagen wurde den Larven entsprechend des Larvenstadiums und des damit einhergehenden Futtermittels frisches Kunstfutter (Zusammensetzung modifiziert nach Yamamoto 1969, Tab. 12.1 im Appendix) angeboten. Phänotypisch kranke Larven (melanisierte Larven, Larven mit Biss Spuren, langsam wachsende Larven) wurden während der Aufzucht von L1 – L4 aussortiert. Die Häutung von L4 zu L5 wurde bei jeder Larve überwacht und der Eintritt in den ersten Tag des fünften Larvenstadiums (L5d0) protokolliert, um den Entwicklungstag jedes Experimentaltieres im fünften Larvenstadium exakt bestimmen zu können. Zur Mitte der Entwicklungstage L5d0, L5d1 und L5d2 wurde das Körpergewicht jeder Larve gewogen und die Gewichtszuwachsraten berechnet. Für Experimente wurden nur Larven verwendet, die in den ersten drei Entwicklungstagen des fünften Larvenstadiums eine Gewichtszuwachsrate von 40 – 60 % hatten. Jedes Experimentaltier hat eine individuelle Identifikationsnummer (Tier-ID) erhalten, unter der das Geschlecht sowie alle Vitalparameter (Körpergewicht, Gewichtszuwachsrate, Kotanzahl, Kotqualität) jedes Entwicklungstages während der Experimentalvorbereitung und -durchführung protokolliert wurden. Bei der Auswahl der Experimentaltiere wurde darauf geachtet, dass die Geschlechter (männlich/weiblich) und Gewichtsklassen (small/medium/large) der Larven gleichmäßig in allen Experimentalgruppen (Treatments) vertreten sind. Larven, die die Probennahme überlebt haben, wurden bis zur Verpuppung in Einzeltierhaltung bei RT gehalten, ggf. Besonderheiten in der Entwicklung protokolliert und kurz vor dem Schlupf durch Einfrieren abgetötet. Nicht verwendete Larven wurden bis zum Ende der Puppenphase in der Allgemeinzucht in Kleingruppen- oder Einzeltierhaltung bei RT gehalten. Kurz vor dem Schlupf wurden männliche und weibliche Puppen in Flugkäfige überführt, in denen die adulten Tabakschwärmer (Imagines) unter Langtagbedingungen bei 25 ± 2 °C gehalten und verpaart wurden. In den Flugkäfigen wurde den Faltern Wasser und gesättigte Saccharoselösung angeboten sowie eine Tabakpflanze (*Nicotiana rustica*) zur Eiablage platziert. *N. rustica* wurde mit Wasserdampf sterilisiertem Substrat (2 Teile Torf, 2 Teile Komposterde, 1 Teil Sand) in Kunststofftöpfen ($\varnothing = 12$ cm) ohne chemische Pflanzenschutzmittel vom Institut für Botanik (Prof. Dr. Wissemann, JLU Gießen) gezüchtet und bereitgestellt. An der Tabakpflanze abgelegte Eier wurden zwei- bis dreimal wöchentlich abgesammelt und im Brutschrank bei 24 °C in Kunststoffgefäßen mit Kunstfutter nach Yamamoto (1969) bis zum Schlupf inkubiert. Aus den Eiern geschlüpfte L1-Larven wurden schnellstmöglich in eine 24-Loch-Zellkulturplatte mit vorgelegtem Kunstfutter vereinzelt (eine L1-Larve je Loch) und bis L5 in Einzeltierhaltung gehalten.

3.3 Präparationstechniken

3.3.1 Hämozytenpräparation

Larven des gewünschten Entwicklungsstadiums wurden unter fließendem Wasser gewaschen, getrocknet und in einer sauberen Petrischale für ca. 30 min auf Eis sediert. Unmittelbar vor der Präparation wurde das Abdomen für 30 Sekunden mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die sedierte, desinfizierte Larve wurde mit dem Kopf- und den Thorakalsegmenten in sauberen Zellstoff gewickelt und zwischen drei Fingern fixiert, bevor vier Abdominalfüße einer Körperhälfte nach und nach mit einer sterilen, chirurgischen Mikroschere zur Gewinnung von Hämolymphe angeschnitten wurden. Austretende Vollhämolymphe (Hämolympheplasma & Hämozyten) wurde in einem sterilen, konischen 15 mL Polypropylen-Röhrchen mit 5 mL vorgelegter, eiskalter, steriler AC-Saline auf Eis aufgefangen und durch sanftes Invertieren gemischt. Ohne Zusatz eines Phenoloxidase-Inhibitors wie Phenylthioharnstoff (engl. phenylthiourea, Abk. PTU) wurde dabei auf zügiges Arbeiten und die durchgehende Einhaltung der Kühlkette geachtet, um die Melanisierung der Hämolymphe zu verhindern (Ryazanova et al. 2011). Die in der Hämolympheprobe enthaltenen Hämozyten wurden anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 500 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand (AC-Saline + Hämolympheplasma) wurde durch Dekantieren verworfen und das Hämozytenpellet in 5 mL frischer, eiskalter, steriler AC-Saline vorsichtig resuspendiert, bevor der Waschvorgang noch zweimal wiederholt wurde. Nach insgesamt dreimaligem Waschen mit AC-Saline ist der Großteil des an den Hämozyten adhärierenden Hämolympheplasmas gewaschen und die Hämozyten sind zur Weiterverarbeitung gereinigt.

3.3.2 Herstellen von Hämozyten-Monolayern

Zur immunzytochemischen Markierung wurden präparierte und gewaschene Hämozyten (Kapitel 3.3.1) in Insektenzellmedium resuspendiert und als einschichtiger Zellrasen auf Mehrkammer-Glasobjektträgern (Hämozyten-Monolayer) aufgetragen. Dazu wurde die AC-Saline nach dem dritten Waschgang der Hämozyten (Kapitel 3.3.1) rückstandslos entfernt und das gewaschene Hämozytenpellet zweimal mit 250 µL sterilem TC-100 Insektenzellmedium überschichtet, um das in der AC-Saline enthaltene EDTA zu verdünnen (EDTA inhibiert das Adhären und Spreiten der Hämozyten). Anschließend wurde das Hämozytenpellet abhängig von der Zellzahl in 1 – 3 mL frischem, sterilem TC-100 Insektenzellmedium vorsichtig resuspendiert, bevor jeweils 13 µL der Hämozytensuspension je Kammer auf Mehrkammer-Glasobjektträger (Diagnostika-Objektträger, Thermo Scientific™, Katalog-Nr.: X1X-ER-308B-CE24) mit Adhäsionsbeschichtung und hydrophoben Epoxy-Farbmasken aufgetragen wurde. Nach einer Absitzzeit von 45 – 60 min in einer Feuchtkammer bei RT wurden die Hämozyten mit 3,5 % PFA-MS⁻ für 5 min bei RT fixiert und dreimal für 10 min mit TBS bei RT mit einer

Vakuumpumpe gewaschen, bevor die Hämozyten-Monolayer bis zur Verwendung halbfeucht bei -20 °C eingefroren und gelagert wurden.

3.3.3 Präparation von zellfreiem Hämolymp plasma

Larven des gewünschten Entwicklungsstadiums wurden unter fließendem Wasser gewaschen, getrocknet und in einer sauberen Petrischale für ca. 30 min auf Eis sediert. Unmittelbar vor der Präparation wurde das Abdomen für 30 Sekunden mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die sedierte, desinfizierte Larve wurde mit dem Kopf- und den Thorakalsegmenten in sauberen Zellstoff gewickelt und zwischen drei Fingern fixiert, bevor vier Abdominalfüße einer Körperhälfte nach und nach mit einer sterilen, chirurgischen Mikroschere zur Gewinnung von Hämolymphe angeschnitten wurden. Die austretende Vollhämolymphe (Hämolymp plasma & Hämozyten) einer Larve wurde in einem abgewogenen, sterilen, konischen 15 mL Polypropylen-Röhrchen mit vorgelegtem Phenylthioharnstoff (PTU) auf Eis aufgefangen. Ohne Zusatz eines Phenoloxidase-Inhibitors wie PTU wurde dabei auf zügiges Arbeiten und die durchgehende Einhaltung der Kühlkette geachtet, um die Melanisierung der Hämolymphe zu verhindern (Ryazanova et al. 2011). Zur Ermittlung des Probengewichtes wurde das 15 mL Röhrchen unmittelbar nach der Hämolymp hentnahme mit einer Feinwaage gewogen. Je mg Hämolymphe wurden 0,5 µL 10x Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC) zugegeben (Kapitel 3.1.3) und durch Invertieren mit der Hämolymphe gemischt. Die in der Hämolympheprobe enthaltenen Hämozyten wurden anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 500 x g und 4 °C sedimentiert. Der klare Überstand wurde in ein steriles, konisches 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert und erneut für 10 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert, um restliche in der Hämolymphe verbliebene Hämozyten zu sedimentieren. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der klare Überstand (= zellfreie Hämolymphe/Hämolymp plasma & PIC) in ein neues steriles, konisches 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert. Bis zur Weiterverwendung wurde das Hämolymp plasma bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Gewebepräparation

Larven des gewünschten Entwicklungsstadiums wurden unter fließendem Wasser gewaschen, getrocknet und in einer sauberen Petrischale für ca. 30 min auf Eis sediert. Unmittelbar vor der Präparation wurde das Abdomen für 30 Sekunden mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die sedierte, desinfizierte Larve wurde mit sterilen Stecknadeln in einer vorgekühlten, mit Parafilm ausgekleideten Präparierschale mit Wachsboden zwischen Kopfkapsel und Prothorax sowie am Nachschieber mit der Ventralseite nach unten fixiert. Zwischen dem siebten und achten Abdominalsegment wurde das Integument der Larve mit einem oberflächlichen, dorsalen Querschnitt mit einer sterilen, chirurgischen Mikroschere geöffnet. Von dort aus wurde die

Larve mit einem Dorsalschnitt längs entlang des Dorsalgefäßes bis zum Prothorax geöffnet. Beide Integumentlappen wurden zur Seite aufgeklappt und mit Stecknadeln im Wachsboden fixiert. Die so eröffnete Larve wurde vollständig unter eiskalte, sterile TBS gesetzt, bevor einzelne Gewebe und Organe mit sterilen Feinpinzetten unter Sicht mit Hilfe eines Stereomikroskops präpariert wurden. Zunächst wurden alle vier im Meso- (T2) und Metathorax (T3) lateral lokalisierten hämatopoetischen Organe (HO) und Flügelanlagen (FA), möglichst ohne Mitnahme umliegender Tracheen, präpariert. Unterhalb des Schlunds wurden die lateral links und rechts vom Darm verlaufenden Labialdrüsen (LBD) abgetrennt. Fettkörperproben (FK) wurden ventrolateral vom Metathorax (drittes Thorakalsegment, T3) sowie vom dritten bis siebten Abdominalsegment (A3-A7) entnommen. Der Darm wurde mit einer chirurgischen Mikroschere geöffnet und die peritrophische Membran samt Darminhalt entnommen, bevor das Epithel von Vorder-, Mittel- und Hinterdarm (VD, MD, HD) präpariert wurde. Abschließend wurde das ventral, unterhalb des Darms lokalisierte zentrale Nervenssystem (ZNS) präpariert, indem die Konnektive oberhalb des Unterschlundganglions durchtrennt wurden und das ZNS vom Ganglion des ersten Thorakalsegmentes (T1) bis zum Ganglion des siebten Abdominalsegmentes (A7) entnommen wurde. Alle präparierten Gewebe und Organe wurden 30 Sekunden in eiskalter, steriler AC-Saline geschwenkt, um potentiell adhärierende Hämozyten abzuwaschen. Anschließend wurden die Proben in ein abgewogenes, konisches, steriles, DNase-/RNase-freies 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und der überschüssige Puffer nach Zentrifugation abgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in Flüssigstickstoff gelagert.

3.4 Zellkulturtechniken

3.4.1 Kultivierung von *E. coli* K12 D31

Zur Kultivierung Streptomycin-resistenter *Escherichia coli* K12 Stamm D31 (*E. coli* K12 D31, Monner et al. 1971) wurde der Substamm Y (laborinterne Bezeichnung: *E. coli* K12 D31-Y, Antibiogramm Tab. 3.2) auf Standard-I-Selektivagar (Penicillin: 100 U/mL, Streptomycin: 100 µg/mL) ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert bis Bakterienkolonien hochgewachsen sind.

Tabelle 3.2: Resistenz und Sensitivität von *E. coli* K12 D31 Substamm Y gegenüber Antibiotika und antimikrobiell wirksamen Peptiden im Hämolymp plasma immunstimulierter *M. sexta* Larven

<i>E. coli</i> K12 D31-Y	
Resistenz	Sensitivität
Streptomycin 1 mg/mL	Ampicillin 100 µg/mL
	Gentamycin 50 µg/mL
	Kanamycin 100 µg/mL
	Hämolymp plasma immunstimulierter <i>M. sexta</i>

Zur weiteren Verwendung von *E. coli* K12 D31-Y zur Immunstimulation unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven oder zur Inkubation im Hämolymp plasma unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven wurden Flüssigübernachtskulturen angesetzt, indem Standard-I-Selektivmedium (Penicillin: 100 U/mL, Streptomycin: 100 µg/mL) mit *E. coli* K12 D31-Y-Kolonien angeimpft und auf einem Rotationsschüttler bei 225 U/min und 37 °C mindestens über Nacht inkubiert wurde.

3.4.2 FITC-Markierung von Bakterien

Zur lichtmikroskopischen *in-situ*-Detektion phagozytierter Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden *S. aureus* und *E. coli* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothio-Cyanat (FITC) markiert. Dazu wurde *E. coli* K12 D31-Y in Flüssigübernachtskulturen kultiviert (Kapitel 3.4.1) und bei ausreichender Bakteriendichte für 10 min bei 1500 x g und 21 °C zentrifugiert. Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde das Medium vollständig abgenommen, das Bakterienpellet in 3,5 % Paraformaldehyd in steril filtrierter MS⁻ resuspendiert und die Bakterien anschließend zur Abtötung (Fixierung) für 45 min auf einem Rotationsschüttler bei 225 U/min und 21 °C inkubiert. Abhängig von der Bakteriendichte wurden 3 – 5 mL der Bakteriensuspension mit abgetöteten Bakterien in ein frisches, steriles 15 mL Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der flüssige Überstand (3,5 % PFA in MS⁻) wurde anschließend vollständig abgenommen, bevor die abgetöteten Bakterien in 10 mL frischen, sterilen Na-Bicarbonatpuffer (pH 9,4) umgepuffert, resuspendiert und

gewaschen wurden. Die Bakteriensuspension wurde danach erneut für 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert und der Waschgang zur Reduktion von PFA in Lösung noch zweimal wiederholt. Nach insgesamt drei Waschgängen wurde der flüssige Überstand voll-ständig abgenommen, bevor die gewaschenen Bakterien zur FITC-Markierung in 3 – 5 mL FITC-Markierungslösung resuspendiert und für 30 min abgedunkelt auf einem Rollschüttler bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert, bevor der flüssige Überstand vollständig abgenommen wurde und die FITC-markierten Bakterien in 10 mL frischen, sterilen Na-Bicarbonatpuffer resuspendiert und gewaschen wurden. Zur Kontrolle der FITC-Markierung wurden 10 µL der Bakteriensuspension auf einem Objektträger ausgestrichen und mit einem Olympus BX60 lichtmikroskopisch mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 460 – 490 nm auf FITC-Signal überprüft. Bei geringer Intensität des Fluoreszenzsignals wurde die FITC-Markierung wiederholt und die Bakterien ein zweites Mal in 3 – 5 mL FITC-Markierungslösung resuspendiert und für 30 min abgedunkelt auf einem Rollschüttler bei RT inkubiert. Bei ausreichender Intensität des Fluoreszenzsignals wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert, bevor der Überstand vollständig abgenommen wurde und die FITC-markierten Bakterien zur Entfernung von nicht gebundenem FITC in 10 mL frischer, steriler MS⁻ gewaschen wurden. Der Waschgang wurde noch mindestens zweimal bzw. solange wiederholt, bis der Waschpuffer (sterile MS⁻) keine Gelbfärbung aufgrund von nicht gebundenem FITC zeigte. Nach insgesamt mindestens drei Waschgängen wurde die Bakterienanzahl der gewaschenen, FITC-markierten Bakterien in einem Milliliter Bakteriensuspension mittels Neubauer-Hämozytometer (Neubauer Improved) nach Herstellerprotokoll ermittelt (Kapitel 3.10.2.1) und durch Zugabe von frischer, steril filtrierter MS⁻ auf eine Bakterienanzahl von $2 \cdot 10^{10}$ Bakterien pro mL MS⁻ (Stammsuspension) eingestellt (Kapitel 3.5.1). Die Lagerung der FITC-markierten Stammsuspension erfolgte in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen abgedunkelt bei 4 °C.

3.4.3 Kultivierung synchronisierter erythrozytärer asexueller Entwicklungsstadien von *P. falciparum* NF54^{attB}

3.4.3.1 Kultivierung

Erythrozytäre, asexuelle Entwicklungsstadien des Chloroquin-sensitiven Stammes NF54^{attB} von *Plasmodium falciparum* wurden in Zusammenarbeit mit der AG Biochemie und Molekularbiologie (Prof. Dr. Becker, Institut für Ernährungswissenschaft, JLU Gießen) in Plasmodien-Zellkulturmedium (humane Erythrozyten der Blutgruppe A Rh+ in RPMI-1640 Säugetier-Zellkulturmedium, supplementiert mit AlbuMAX™ II, Glukose, Hypoxanthin und L-Glutamin) bei 3,3 % Hämatokrit im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und einem Gasgemisch bestehend aus 3 % (v/v) Sauerstoff (O₂), 3 % (v/v) Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 94 % (v/v) Stickstoff (N₂)

kultiviert (Trager & Jensen 1976 modifiziert nach Rahbari et al. 2017). Erythrozytenkonzentrat wurde von der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Prof. Dr. Bein, Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM Gießen) bezogen. Die Parasitämie wurde mittels Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen ermittelt, indem in drei unterschiedlichen Bereichen eines Blutaussstriches jeweils 100 Erythrozyten exemplarisch gezählt wurden und jeweils der prozentuale Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamterthrozytenanzahl berechnet wurde.

3.4.3.2 Sorbitol-Synchronisierung

Zur *in-vitro*-Synchronisierung der erythrozytären Entwicklungsstadien von *P. falciparum* und gezielter Anreicherung von Trophozoitenstadien in Kultur in Vorbereitung des Microbial Binding Assays (Kapitel 3.8.4) wurde eine aus unreifen Ringtrophozoiten (0 – 16 h), reifen Trophozoiten (20 – 32 h), Schizonten (36 – 48 h) und Merozoiten (44 – 48 h) bestehende asynchrone Parasitenkultur bei einer Parasitämie von $\geq 5\%$ nach der Methode von Lambros & Vanderberg (1979) mit 5 % (w/v) D-Sorbitol behandelt, wodurch mit Schizonten und Merozoiten infizierte Erythrozyten selektiv lysiert wurden. Dazu wurden 4 – 5 mL einer asynchronen Parasitenkultur mit einer Parasitämie von $\geq 5\%$ 10 – 12 h post Invasion der Erythrozyten in ein steriles 15 mL Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 600 x g und 21 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand des Plasmodien-Zellkulturmediums abgenommen und die parasitierten Erythrozyten in 4 mL steril filtriertem Sorbitol-Lysepuffer (5 % (w/v) D-Sorbitol in Reinstwasser, $b_{\text{osm}} = 287$ mosmol/kg) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Parasitenkultur dreimal für jeweils 10 min bei 600 x g und 21 °C zentrifugiert und mit Erythrozyten-freiem Plasmodien-Zellkulturmedium gewaschen, bevor die synchronisierte Parasitenkultur in Erythrozyten-haltigem Plasmodien-Zellkulturmedium rekultiviert wurde. Nach abgeschlossener Sorbitol-Lyse benötigen die in der synchronen Parasitenkultur verbleibenden Trophozoiten 48 h zum Durchlaufen eines erythrozytären Schizogonie-Zyklus über Schizonten- und Merozoiten-Stadien bis erneut Trophozoiten-Stadien in Kultur vorliegen. Um die Parasiten in synchronisierter *in-vitro*-Kultur zu halten wurde die Sorbitol-Synchronisation nach einem abgeschlossenen erythrozytären Schizogonie-Zyklus (nach 48 h) und von diesem Zeitpunkt an einmal pro Woche wiederholt.

3.4.4 **Kultivierung von Hybridoma-Zellkulturen und Gewinnung monoklonaler Antikörper**

Zur Gewinnung hämozytenspezifischer monoklonaler Antikörper wurden die Hybridoma-Zelllinien MS2, MS7, MS13, MS73, MS75 und MS77, hergestellt durch Fusion von murinen Myelomzellen (entartete Plasmazellen) und Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten (Plasmazellen) aus BALB/c-Mäusen, die mit intakten *M. sexta* Hämozyten immunisiert wurden

(Willot et al. 1994), als semiadhärente Suspensionszellkultur in Hybridoma-Zellkulturmedium (RPMI-complete + 5 % (v/v) Fötale Bovines Serum (FBS)) im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.4.4.1 Lagerung

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Hybridoma-Zelllinien nach dem Standardverfahren von Harlow & Lane (1988) bei -196 °C in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Bei Bedarf wurden die Hybridoma-Zellen aus der Kryolagerung entnommen und wieder in Kultur genommen.

3.4.4.2 Auftauen von Hybridoma-Zellen

Hybridoma-Zellen wurden aus der Kryolagerung entnommen und durch Zugabe von 0,5 – 1,0 mL frischem, sterilem Auftaumedium (RPMI-complete + 10 % (v/v) FBS) im Kryoröhrchen aufgetaut und vorsichtig resuspendiert. Zur Verdünnung von DMSO im Einfriermedium wurden die aufgetauten Hybridoma-Zellen direkt im Anschluss mit einer sterilen 1,5 mL Transferpipette in ein 15 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 9 mL Auftaumedium überführt, vorsichtig resuspendiert und für 10 min bei 500 x g und 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang noch zweimal mit jeweils frischem, sterilen Auftaumedium wiederholt. Nach abgeschlossenem dritten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,0 mL frischem, sterilen Ausplattiermedium (RPMI-complete + 10 % (v/v) FBS + 10 % (v/v) BMH1) resuspendiert und unter Sichtkontrolle in hoher und niedriger Zelldichte in eine 4-Loch-Zellkulturschale überführt.

3.4.4.3 Kultivierung von Hybridoma-Zellkulturen

Aufgetaute und gewaschene Hybridoma-Zellen (Kapitel 3.4.4.2) wurden zu Beginn in Ausplattiermedium (RPMI-complete + 10 % (v/v) FBS + 10 % (v/v) BMH1) als semiadhärente Suspensionszellkultur im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Stabilisierung der Hybridoma-Zellkultur (vitale Zellmorphologie und stabile Zellproliferationsrate) wurde zunächst der Volumenanteil von BMH1, danach der Volumenanteil von FBS im Medium reduziert bis die Hybridoma-Zellkultur in Routinemedium (RPMI-complete + 0 – 5 % (v/v) FBS) kultiviert wurde. Das Medium wurde zweimal pro Woche im Abstand von 3 Tagen gewechselt.

3.4.4.4 Gewinnung monoklonaler Antikörper

Hämozytenspezifische monoklonale Antikörper wurden gewonnen, indem der Medienüberstand von vitalen Hybridoma-Zellkulturen mit stabiler Zellproliferationsrate nach 3 Tagen in Kultur abgenommen, in ein steriles 15 mL Reaktionsgefäß transferiert und für 10 min bei 500 x g und 21 °C zentrifugiert wurde. Der zellfreie Medienüberstand wurde in ein frisches,

steriles 15 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 0,05 % Natriumazid versetzt und als mono-klonale Antikörperlösung verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.4.4.5 Einfrieren von Hybridoma-Zellkulturen

Zur Vorbereitung einer Zellkultur zum Einfrieren wurde die betreffende Hybridoma-Zellkultur durch Reduktion apoptotischer Zellen und Zugabe frischen Erntemediums (RPMI-complete ohne FBS) in die Wachstumsphase gebracht. Bei ausreichender Zelldichte, hohem Anteil vitaler, abgesetzter Zellen bei gleichzeitig geringem Anteil toter Zellen (in der Regel am Folgetag) wurde das Altmedium abgenommen, 5 mL frisches, steriles Routinemedium (RPMI-complete + 2,5 % FBS) zugegeben und die Hybridoma-Zellen durch luftblasenfreies Spülen mit einer sterilen 1,5 mL Transferpipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, bevor das Reaktionsgefäß samt Hybridoma-Zellpellet zur Verlangsamung des Zellstoffwechsels für 30 – 60 min in Eis gestellt wurde. Anschließend wurde der zellfreie Medienüberstand vollständig abgenommen und das Hybridoma-Zellpellet je nach Zellzahl in 1 – 2 mL Einfriermedium (50 % (v/v) RPMI-complete + 40 % (v/v) FBS + 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde in jeweils 500 µL Aliquots auf Eis in Kryo-Röhrchen aufgeteilt, bevor die Hybridoma-Zellaliquots zur weiteren Verlangsamung des Stoffwechsels für 30 – 60 min in Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Kryo-Röhrchen in eine Isopropanol-Einfrierbox überführt und für 7 Tage in einen -80 °C-Gefrierschrank gestellt, wobei die Hybridoma-Zellen mit einer Einfrierrate von -1 °C/min kontrolliert auf -80 °C heruntergekühlt und eingefroren wurden. Nach 7 Tagen bei -80 °C wurden die Hybridoma-Zellen zur Langzeit-Lagerung in Flüssigstickstoff überführt und kryokonserviert.

3.4.5 Isolierung humaner Erythrozyten und mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Humane Erythrozyten und mononukleäre Zellen (T- und B-Lymphozyten und Monozyten, engl. Abk.: MNCs) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit dem Dichtegradienten-Medium Ficoll nach der Methode von Bøyum (1968) aus peripherem Vollblut isoliert, wobei Erythrozyten unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte aufgrund ihrer höheren Dichte die Ficoll-Phase mit einer Dichte von 1,077 g/mL passieren während sich Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten an der Plasma-Gradientenphase aufgrund ihrer geringeren Dichte sammeln (Bøyum 1968). Dazu wurde mit Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung antikoaguliertes und stabilisiertes Vollblut-Konzentrat (Buffy-Coat) 1 : 1 mit steriler 1x HBSS (alternativ 1x PBS) verdünnt, bevor 20 mL verdünntes Vollblut vorsichtig über ein Kissen aus 20 mL steriler, isotonischer BioColl®-Trennlösung (Ficoll 400® (Polysaccharose 400), Bio&SELL, Katalog-

Nr.: L 6115) in ein steriles, konisches 50 mL Reaktionsgefäß geschichtet wurden und für 30 min bei 500 x g und 20 °C bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert wurden. Nach abgeschlossener Zentrifugation haben sich die Blutbestandteile in eine obere Phase (Blutplasma und Thrombozyten) und eine untere Phase (Erythrozyten und Granulozyten), sowie in die dazwischen-liegende Interphase (MNCs) und Ficoll-Phase (Granulozyten) getrennt (Abb. 3.1). Zur Gewinnung von mononukleären Zellen wurde die oberste Phase zu zwei Drittel abgenommen und verworfen, bevor die in der Interphase als weiße Zellwolke (engl. buffy coat) sichtbaren Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten mit einer sterilen serologischen Pipette abgenommen und in ein steriles, konisches 50 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 25 mL steriler HBSS überführt, resuspendiert und gewaschen wurden. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde anschließend die Ficoll-Phase abgenommen und verworfen, bevor die Erythrozyten in der unteren Phase abgenommen und ebenfalls in ein steriles, konisches 50 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 25 mL steriler HBSS überführt, resuspendiert und gewaschen wurden. Beide Zellpopulationen wurden für 10 min bei 500 x g und 20 °C zentrifugiert und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt. Die gewaschenen Erythrozyten und mononukleären Zellen wurden in frischer, steriler 1x HBSS resuspendiert und für kurze Zeit bis zur Weiterverwendung bei RT gelagert.

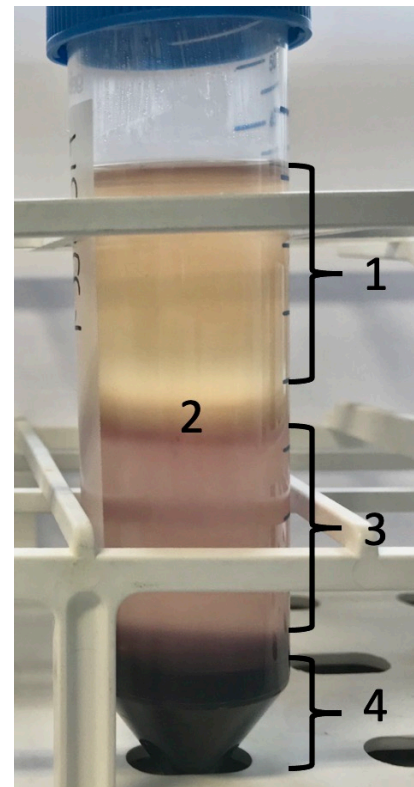


Abbildung 3.1: Trennung von Erythrozyten und mononukleären Zellen aus humanem Vollblutkonzentrat mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

1) Plasma-Phase, 2) Interphase mit weißer Zellwolke bestehend aus mononukleären Leukozyten, 3) Ficoll-Phase, 4) Erythrozyten-Phase.

3.5 *E. coli*-Injektionsversuche

3.5.1 Kultivierung und Vorbereitung von *E. coli* K12 D31-Y

E. coli K12 D31-Y wurde in Flüssigübernachtskulturen kultiviert (Kapitel 3.4.1) und bei ausreichender Bakteriendichte für 10 min bei 1500 x g und 21 °C zentrifugiert. Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde das Medium vollständig abgenommen, das Bakterienpellet in 3,5 % Paraformaldehyd in steril filtrierter MS⁻ (3,5 % PFA in MS⁻) resuspendiert und die Bakterien zur Abtötung (Fixierung) für 45 min auf einem Rotationsschüttler bei 225 U/min und 21 °C inkubiert. Zur Reduktion von PFA in Lösung wurden die abgetöteten Bakterien anschließend durch dreimalige Zentrifugation für jeweils 10 min bei 1500 x g und 21 °C und Resuspension in jeweils 5 mL frischer, steril filtrierter MS⁻ gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift

wurden die gewaschenen Bakterien erneut zentrifugiert und je nach Verwendung zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert (Kapitel 3.4.2), bevor die Bakteriensuspension mit unmarkierten oder FITC-markierten, PFA-abgetöteten *E. coli* K12 D31-Y durch Zugabe von frischer, steril filtrierter MS⁻ auf eine Bakterienanzahl von $2 \cdot 10^{10}$ Bakterien/mL MS⁻ (Stammsuspension) eingestellt und bei 4 °C gelagert wurde. Zur Vorbereitung der Injektionen wurde die Stammsuspension auf eine Bakterienanzahl von $1 \cdot 10^9$ Bakterien/mL MS⁻ (Injektionssuspension) verdünnt, in konische, sterile 2,0 mL Mikro-Schraubröhren aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

3.5.2 Vorbereitung der Versuchstiere

L5d2-Larven wurden unter fließendem Wasser gewaschen, getrocknet, auf einer Feinwaage gewogen und in einer sauberen Petrischale für ca. 30 min auf Eis sediert. Unmittelbar vor der Injektion wurde das Abdomen jeder Larve für 30 Sekunden mit 70 % Ethanol desinfiziert.

3.5.3 Durchführung der *E. coli*-Injektion

Zur Injektion wurde eine 1,0 mL Einmal-Tuberkulinspritze (B. Braun Omnifix[®] - F Luer Solo, Katalog-Nr.: 9161406V) und eine Einmal-Injektions-Kanüle mit einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 0,4 mm (B. Braun Sterican[®] Gr. 20, Katalog-Nr.: 4657705) verwendet. Je Gramm Körpergewicht wurde den sedierten, desinfizierten L5d2-Larven 20 µL Injektionssuspension (PFA-abgetötete *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻) mit einer Bakterienanzahl von $1 \cdot 10^9$ Bakterien/mL in das Hämocoel injiziert, was einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien pro Gramm Körpergewicht entspricht (Tab. 3.3). Zur Kontrolle wurde Larven des gleichen Entwicklungsstadiums ein identisches Volumen (20 µL pro Gramm Körpergewicht) sterile MS⁻ in das Hämocoel injiziert (Tab. 3.3). Die Injektionen erfolgten lateral in die Segmentgrenze zwischen Abdominalsegment vier und fünf. Jede Larve wurde mit einem neuen, sterilen Injektionsbesteck injiziert. Nach der Injektion wurden die Larven in neue, saubere Kunststoffschälchen mit frischem Kunstfutter gesetzt, um Infektionen bedingt durch mit Mikroorganismen belastetem Kot und altem Futter zu vermeiden. Bis zur Präparation wurden die Larven bei 24 °C im Brutschrank gehalten.

Tabelle 3.3: Dosierung der *E. coli*-Injektionssuspension zur Immunstimulation unbehandelter *M. sexta* L5d2 Larven mit PFA-abgetöteten, unmarkierten oder FITC-markierten *E. coli* K12 D31-Y vor der Probenahme.

Injektionslösung / Injektionssuspension				Injektions-dosis (Bakterien/g Körpergewicht der Larve)
Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Injektionsvolumen ($\mu\text{L/g}$ Körpergewicht der Larve)	Bakterienanzahl der Injektionssuspension (Bakterien/mL)	
MS-Injektionslösung	MS ⁻	20	-	-
<i>E. coli</i>-Injektions-suspension	PFA-abgetötete <i>E. coli</i> K12 D31-Y in MS ⁻	20	$1 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$

3.6 Bioinformatische Methoden

3.6.1 Identifizierung von immunrelevanten Genen in Hämozyten von *M. sexta*

Die Auswahl von immunrelevanten Genen zur ganzheitlichen Diskussion möglicher Funktionen des Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls (engl. Down syndrome cell adhesion molecule, Abk. Dscam) in der angeborenen humoralen und zellulären Immunantwort larvaler Hämozyten von *M. sexta* wurde anhand folgender Überlegungen durchgeführt:

1. Welche Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptor, Abk. PRR) bzw. welche für PRRs kodierenden Gene sind in Insekten in der angeborenen humoralen und zellulären Immunantwort von Hämozyten involviert (Kapitel 3.6.1.1)?
2. Welche Gene werden in Hämozyten immunstimulierter *M. sexta*-Larven verstärkt exprimiert (Kapitel 3.6.1.2)?

3.6.1.1 Bekannte PRRs von Insekten

Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) von Insekten bzw. in Insekten für PRRs kodierende Gene, die/deren Genprodukte in der angeborenen humoralen und zellulären Immunantwort von und mit Hämozyten involviert sind, wurden durch Literaturrecherche ermittelt (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors, Abk. PRRs) von Insekten bzw. in Insekten für PRRs kodierende Gene, die/deren Genprodukte in der angeborenen humoralen und zellulären Immunantwort von und mit Hämozyten involviert sind, nach Strand (2008) und Marmaras & Lampropoulou (2009).

PRR ¹	Rezeptortyp ²	Funktion	Nachgewiesen in ³			Referenz
			<i>Drosophila</i>	<i>Anopheles</i>	Lepidoptera	
PGRP (SA, SD)	humoral		+	+	+	Irving et al. 2005
PGRP (Sb1, Sc1a, Sc1b, SC2)		Enzymatischer Peptidoglykan-Abbau, Phagozytose von Bakterien (gram ⁺), Toll-Aktivierung	+	+	+	Bangham et al. 2006, Garver et al. 2006
βGRP	humoral	Bindung an β-1,3-Glucan, proPO-Aktivierung	k. A.	k. A.	+	Wang et al. 1995
GNBP	humoral	Bindung an die Zellwand gram-negativer Bakterien	+	k. A.	+	Lee et al. 1996, Kim et al. 2000, Irving et al. 2005
LPSBP	humoral	Erkennung von Lipid A von LPS, Nodulibildung	k. A.	k. A.	+	Koizumi et al. 1999
Hemolin	humoral	proPO-Aktivierung	-	-	+	Ladendorff & Kanost 1991, Kanost et al. 2004, Eleftherianos et al. 2007, Terenius et al. 2007
IML	humoral	Zelluläre Einkapselung, proPO-Aktivierung, Melanisierung, Phagozytose	+	+	+	Ling & Yu 2006, Yu et al. 2006, Yu & Kanost 2004

LRIM1	humoral	Melanisierung und Abwehr von <i>Plasmodium berghei</i> , Phagozytose von Bakterien (gram ⁻)	k. A.	+	k. A.	Osta et al. 2004, Moita et al. 2005
Dscam	humoral und transmembran	Phagozytose von Bakterien (gram ⁺ /gram ⁻)	+	+	+	Watson et al. 2005, Dong et al. 2006, Zhang et al. 2015
Tep	humoral und transmembran	Phagozytose von Bakterien (gram ⁻)	+	+	+	Christophides et al. 2002, Stroschein-Stevenson et al. 2005, Levashina et al. 2001, Moita et al. 2005, Zhang et al. 2015
PGRP (LC)	zelloberflächen-assoziiert	Phagozytose von Bakterien (gram ⁻), Imd-Aktivierung	+	+	+	Rämet et al. 2002, Moita et al. 2005, Kim & Kim 2005, Zhang et al. 2015
PGRP (LE)	intrazellulär	Erkennung von intrazellulärem DAP-typ PGN (Monomer)	+	k. A.	+	Kaneko et al. 2006, Zhang et al. 2015
Peste (SR-b)	zelloberflächen-assoziiert	Aufnahme von Mycobakterien	+	k. A.	k. A.	Philips et al. 2005
Croquemort (SR-b)	zelloberflächen-assoziiert	Phagozytose apoptotischer Zellen	+	k. A.	k. A.	Franc et al. 1999
dSR-CI (SR-c)	zelloberflächen-assoziiert	Bindung und Phagozytose von Bakterien (gram ⁺ /gram ⁻)	+	k. A.	k. A.	Rämet et al. 2001, Irving et al. 2004
Eater	transmembran	Bindung und Phagozytose von Bakterien (gram ⁺ /gram ⁻)	+	k. A.	+	Kocks et al. 2005, Zhang et al. 2015
Nimrod	transmembran	Phagozytose von Bakterien (gram ⁺ /gram ⁻)	+	+	+	Kurucz et al. 2007, Zhang et al. 2015
Noduler	zelloberflächen-assoziiert	Bindung von LPS, LTS und β -1,3-Glucan, Nodulibildung	k. A.	k. A.	+	Gandhe et al. 2007
Draper	zelloberflächen-assoziiert	Phagozytose apoptotischer Zellen	+	k. A.	+	Manaka et al. 2004, Zhang et al. 2015
LRP1	zelloberflächen-assoziiert	Phagozytose apoptotischer Zellen	k. A.	+	k. A.	Moita et al. 2005
Integrin	transmembran	Einkapselung und Phagozytose von Bakterien (gram ⁺ /gram ⁻)	+	+	+	Foukas et al. 1998, Lavine & Strand 2003, Levin et al. 2005, Irving et al. 2005, Wertheim et al. 2005

1: PRRs bzw. für PRRs kodierende Gene: PGRP, Peptidoglycan recognition protein (S, short; L, long); β GRP, Beta 1,3-glucan recognition protein; GGBP, Gram-negative bacteria-binding protein; LPSBP, Lipopolysaccharide-binding protein; IML, Immulectin; LRIM1, Leucine-rich Repeat Immune Protein 1; Dscam, Down syn-drome cell adhesion molecule; Tep, Thioester-containing protein; SR, Scavenger receptor (b, class B; c, class C); dSR-CI, Drosophila scavenger receptor CI; LRP1, LDL receptor-related protein 1; **2: PRR-Typ:** humoral, im Hämolymp plasma gelöst zirkulierend, als Opsonin fungierend (Marmaras et al. 2009, 188); zelloberflächen-assoziiert, als Zelloberflächenrezeptor von Hämocyten präsentiert; transmembran, transmembraner Zelloberflächenrezeptor; intrazellulär, intrazellulär in Hämocyten nachweisbar; **3: Nachweis des PRRs in *Drosophila*, *Anopheles* und in Lepidopteren** (basierend auf dem Stand der Veröffentlichungen am 22.10.2020): +, PRR ist im Transkriptom/Pro-teom des Organismus nachweisbar; -, PRR ist nicht im Genom des Organismus nachweisbar; k. A., keine Angabe

3.6.1.2 Bekannte immunrelevante Gene in Hämocyten von *M. sexta*

Gene, die in Hämocyten immunstimulierter *M. sexta*-Larven verstärkt exprimiert werden, wurden durch Literaturrecherche bestimmt und in PRRs und Effektormoleküle unterteilt (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Immunrelevante Gene (gDNA) und Genprodukte (immunwirksame Peptide & Proteine), die in immunkompetenten Geweben (Hämocyten & Fettkörper) immunstimulierter *M. sexta*-Larven verstärkt exprimiert bzw. synthetisiert werden, nach Kanost et al. (2004) und Zhang et al. (2015).

irGen ¹	Rezeptor/ Effektor ²	Funktion ³		Induzierbarkeit ⁴			Referenz
				iFK/kFK RNA	iHZ/kHZ RNA	iHZ/kHZ Peptid	
PGRP1	PRR	Bindung an Peptidoglykan	proPO-Aktivierung	x 5,10	x 64,16	x 1,02	Sumathipala & Jiang 2010
PGRP2			Modulierung der Melaninierung	x 1818,46	x 11,66	k. A.	Zhang et al., unpublished data
PGRP3				x 44,02	x 14,58	x 13,88	
PGRP5			x 54,37	x 10,09	x 10,82	Zhang et al. 2015	
βGRP1	PRR	Bindung an β-1,3-Glucan	Agglutination, proPO-Aktivierung	x 0,96	x 11,66	x 0,68	Ma & Kanost 2000
βGRP2			x 9,69	x 9,23	k. A.	Jiang et al. 2004	
MBP	PRR	proPO-Aktivierung, Induktion von AMP-Expression		x 2,05	x 7,12	x 0,97	Wang & Jiang 2017
Hemolin	PRR	Bindung an LPS und LTS, Agglutination von Mikroorg., Nodulation, Phagozytose		x 748,52	x 3,96	x 5,43	Yu & Kanost 2002, Eleftherianos et al. 2007 Jiang et al. 2010
Draper	PRR	Phagozytose apoptotischer Zellen		x 5,61	x 1,69	x 0,92	Zhang et al. 2015, Manaka et al. 2004
reeler1	PRR	Nodulation, proPO-Aktivierung		x 1159,95	x 3,02	x 487,70	Bao et al. 2011
IML-1	PRR	Agglutination, Bindung an LPS, proPO-Aktivierung, zelluläre Einkapselung		+			Yu et al. 1999, Ling & Yu 2006
IML-2		Agglutination, Bindung an LPS, proPO-Aktivierung, zelluläre Einkapselung und Melaninierung		+			Yu & Kanost 2000, Yu & Kanost 2003 Ling & Yu 2006
β-1,3-Glucanase	Effektor	Hydrolyse von β-1,3-Glucan		x 1,27	x 3,56	x 0,40	Zhang et al. 2015
Lysozym	Effektor	bakteriolytisch		+	+	+	Mulnix & Dunn 1994
Attacin	Effektor	antibakteriell			+		Zhu et al. 2003
Gloverin	Effektor	antibakteriell			+		Zhu et al. 2003
Cecropin	Effektor	antibakteriell		+	+	+	Dickinson et al. 1988
Lebocin	Effektor	antibakteriell			+		Zhu et al. 2003
Moricin	Effektor	antibakteriell			+		Zhu et al. 2003

1: Immunrelevantes Gen (irGen): PGRP, Peptidoglycan recognition protein; βGRP, Beta 1,3-glucan recognition protein; MBP, Microbe binding protein; IML, Immulectin; **2:** Genprodukt bindet als **Rezeptor** an Signalmoleküle von Mikroorganismen (engl. pattern recognition receptor, Abk. PRR), wodurch weitere Downstream-Signaltransduktion ausgelöst wird oder wirkt als **Effektor** direkt antimikrobiell; **3: Funktion des Genprodukts:** proPO, Prophenoloxidas; AMP, antimikrobiell wirksame Peptide & Proteine; LPS, Lipopolysaccharid; LTS, Lipoteichonsäure; **4: Induzierbarkeit**, d. h. verstärkte Expression des immunrelevanten Gens (gDNA) bzw. verstärkte Translation des Transkripts (mRNA) zur Synthese des Genproduktes (immunwirksames Peptid/Protein), angegeben als relatives Vielfaches des mRNA-/Protein-Level immunaiver Tiere, rot markiert bei signifikanter Erhöhung des mRNA-/Protein-Level: FK, Fettkörper; iFK, immunstimulierter Fettkörper; kFK, Kontroll-Fettkörper; HZ, Hämocyten; iHZ, immunstimulierte Hämocyten; kHZ, Kontroll-Hämocyten; +, erhöhtes mRNA-/Protein-Level nach Immunstimulation

3.6.1.3 Auswahl immunrelevanter Gene

Zur ganzheitlichen Diskussion der Genexpression von **Dscam** und damit einhergehenden, möglichen Funktionen in der angeborenen humoralen und zellulären Immunantwort larvaler Hämocyten von *M. sexta* wurde auf Grundlage der in Insekten und *M. sexta* bekannten immunrelevanten Gene (Tab. 3.4 & 3.5) eine Auswahl aus folgenden PRRs und antimikrobiellen Effektormolekülen getroffen: Eater, Lysozym, Attacin und Gloverin. Das Gen des transmembranen Zelloberflächenrezeptors **Eater** wird in *Drosophila* von Hämocyten exprimiert und ist in der Phagozytose von grampositiven und gramnegativen Bakterien involviert (Kocks et al. 2005). Die Genexpression von Eater dient damit als Beispiel eines Phagozytose-rezeptors, der in *Drosophila* essentiell an der zellulären Erkennung und Abwehr bakterieller Infektionen beteiligt ist. Stellvertretend für antimikrobiell wirksame Effektormoleküle wird die Genexpression der antimikrobiellen Peptide (AMPs) **Lysozym**, **Attacin** und **Gloverin** untersucht, die nach einer bakteriellen Infektion im Zuge der humoralen Immunantwort verstärkt in immunkompetenten Geweben (Hämocyten, Fettkörper) exprimiert werden (Mulnix & Dunn 1994, Zhu et al. 2003). Attacin und Gloverin gehören zur Familie der Glycin-reichen antimikrobiellen Peptide (Yi et al. 2014). Beide AMPs wirken hauptsächlich gegen gram-negative Bakterien, indem sie die Synthese von Proteinen der äußeren Bakterienmembran inhibieren, was zu einer erhöhten Membranpermeabilität führt (Axén et al. 1997, Lundström et al. 2002). Lysozym bildet hingegen eine eigene AMP-Familie und wirkt direkt bakteriolysisch gegen grampositive Bakterien, indem es β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetyl-muraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosamin (NAG) in Peptidoglykanen hydrolysiert (Zhu et al. 2003, He et al. 2015). Zusammen decken die Gene der drei AMPs Lysozym, Attacin und Gloverin unterschiedliche AMP-Familien mit unterschiedlicher Wirkung ab. Gemeinsam mit dem Gen für den Phagozytoserezeptor Eater bilden sie somit eine Grundlage, um die Genexpression von Dscam anhand bereits bekannter immunrelevanter PRRs und Effektormoleküle zu diskutieren.

3.6.1.4 Recherche von Nukleotidsequenzen

Die Nukleotidsequenz der ausgewählten immunrelevanten Gene (Kapitel 3.6.1.3) wurde mit Hilfe der/des in Veröffentlichungen angegebenen bzw. in Datenbanken (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>; FlyBase, <https://flybase.org>) annotierten Sequenz/Sequenzabschnittes bestimmt.

3.6.1.5 Bestimmung der Ähnlichkeit von Nukleotidsequenzen

Durch Abgleich artgleicher und -fremder Nukleotidsequenzen/-sequenzabschnitte mit dem im i5k Workspace@NAL (<https://i5k.nal.usda.gov/webapp/blast/>; i5K Consortium 2013) hinterlegten Genom (*Manduca sexta* scaffolds) und Transkriptom (*Manduca sexta* OGS_v2.0_

transcript) von *M. sexta* wurden mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul et al. 1990; Altschul et al. 1997) Kandidatengene ermittelt. Alle Kandidaten für immunrelevante Gene bei *M. sexta* wurden mittels BLAST-Analyse mit allen auf NCBI hinterlegten Genomen und Transkriptomen anderer Taxa auf statistisch signifikante, lokal ähnliche Nukleotidsequenzen abgeglichen. Dabei wurde jeweils eine ungefilterte BLAST-Analyse (Abgefragte Datensätze: alle nicht-redundanten GenBank CDS Translationen, PDB, SwissProt, PIR und PRF) sowie eine SmartBLAST-Analyse durchgeführt, die vor allem gut charakterisierte Modellorganismen wie *Drosophila* und *Anopheles* umfasst. Für molekularbiologische Arbeiten wurden diejenigen Nukleotidsequenzen in Betracht gezogen, die folgende Kriterien erfüllen:

1. Statistisch signifikante Ähnlichkeit zwischen einer publizierten bzw. annotierten Nukleotidsequenz und einer Sequenz des *M. sexta*-Genoms/-Transkriptoms
2. Die re-BLAST-Analyse des Kandidatengens vom i5KWorkspace@NAL in NCBI ermittelt orthologe Gene und bestätigt die Sequenzhomologie.

Eine Aminosäuresequenzidentität von > 25 % und ein E-Wert von < 1×10^{-3} galt als Indiz für eine mögliche Homologie zweier Sequenzen. Für die identifizierten Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu Genen anderer Taxa wurde die vollständige, korrespondierende Nukleotidsequenz aus dem in der Datenbank i5KWorkspace@NAL hinterlegten Genom (*Manduca sexta*_scaffolds) und Transkriptom (*Manduca sexta*_OGS_v2.0_transcript) von *M. sexta* ermittelt.

3.6.2 Analyse der Übereinstimmung verschiedener Polypeptidsequenzen

3.6.2.1 Multiple Sequenzalignments

Die in der Datenbank i5KWorkspace@NAL ermittelten Nukleotidsequenzen möglicher immunrelevanter Gene von *M. sexta* wurden mit dem Onlineservice *ExpASy Translate* (<https://web.expasy.org/translate/>, Swiss Institute of Bioinformatics) in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Mit Hilfe des Kommandozeilenprogramms *Clustal Ω* (Sievers et al. 2011; Sievers & Higgins 2014) wurden von den ermittelten Polypeptidsequenzen über den Onlineservice vom European Molecular Biology Laboratory (EMBL, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) multiple Sequenzalignments angefertigt.

3.6.2.2 In-silico-Identifizierung und -Charakterisierung vorhergesagter Proteinsequenzen

Zur Absicherung der Identität der in der Datenbank i5KWorkspace@NAL ermittelten Gene von *M. sexta* wurden der Aufbau, die Struktur und die Eigenschaften der vorhergesagten Proteine über verschiedene Programme ermittelt. Zur Identifizierung funktioneller und konservierter Proteindomänen sowie zur Klassifizierung vorhergesagter Proteine wurden die Datenbank *InterPro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, Mitchell et al. 2019), die *NCBI Conserved Domain*

Database (CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>, Lu et al. 2020) und der *NCBI Conserved Domain Search Service* (CD Search, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Lu et al. 2020) verwendet. Beide Datenbanken gleichen identifizierbare Merkmale bekannter Proteine mit *in-silico* translatierten Aminosäuresequenzen ab und ermöglichen so eine Prognose funktioneller und konservierter Proteindomänen, möglicher biologischer Funktionen des Proteins sowie die Zuordnung in eine Proteinfamilie. Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer Transmembrandomäne wurde zusätzlich mit der Analysesoftware *TMHMM 2.0* (Krogh et al. 2001) über den Onlineservice des Department of Health Technology der Technischen Universität Dänemark (DTU Health Tech, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) bestimmt. Zur Visualisierung der Proteinstruktur wurde der Onlineservice *RaptorX Structure Prediction* (<http://raptorx.uchicago.edu/ContactMap/>, Xu 2019) des Webservers RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>, Källberg et al. 2012) verwendet, der auf Grundlage der Aminosäuresequenz mittels Distanz-basierter Proteinfaltung und ultra-deep convolutional residual neural network-Technologie (ResNet) dreidimensionale Strukturmodelle der Sekundär- und Tertiärstruktur sowie mögliche Proteinbindestellen für Protein-Protein-Interaktionen vorhersagt.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 gDNA-Extraktion

Genomische DNA (gDNA) wurde aus Epidermis, Tracheen, Fett- und Muskelgewebe von unbehandelten *M. sexta* L5d2-Larven extrahiert. Nach Steller & Pirrotta (1986) wurde das präparierte Gewebe lysiert, indem je 1 mg Gewebe in 16 μ L DNA-Extraktionspuffer (Tris pH 9, 0,1 mol/L; EDTA, 0,1 mol/L; SDS, 34,67 mmol/L) mit einem DNase-freien Pistill homogenisiert und zur schnelleren Extraktion der gDNA bei 65 °C für 20 min inkubiert wurde. Je 100 μ L Gewebelysat wurden 14 μ L Kaliumacetat (8 mol/L) zugegeben, durch Invertieren vermischt und 30 min auf Eis inkubiert, um im Lysat gelöste Proteine zu fällen. Anschließend wurde das Lysat bei 21.400 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, die zu einem Pellet sedimentierten Proteine verworfen und der flüssige Überstand in ein neues DNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der im Überstand gelösten gDNA wurden je 100 μ L Überstand 70 μ L Isopropanol (99 %) zugegeben, durch sanftes Pipettieren vermischt und für 10 min bei RT inkubiert, bevor der Überstand bei 21.400 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen, das Pellet (DNA) zweimal mit 70 % Ethanol überspült, getrocknet, in Nuklease-freiem Wasser (HyClone™ Wasser) eluiert und auf eine finale Massenkonzentration_{DNA} von 1 μ g/ μ L eingestellt.

3.7.2 RNA-Extraktion

3.7.2.1 Gewebepräparation zur RNA-Extraktion

Zur Untersuchung der *dscam*-Expression in den Geweben und Organen unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven wurden Hämozyten (HZ), hämatopoetische Organe (HO), Flügelanla-
gen (FA), Fettkörper (FK), Vorderdarm (VD), Mitteldarm (MD), Hinterdarm (HD), Labialdrü-
sen (LBD) und das zentrale Nervenssystem (ZNS) von drei Tierkohorten á jeweils sieben Lar-
ven präpariert (Kap. 4.1.1). Zur Untersuchung der Expression von *dscam*, *eater*, *lyso-* *zym*,
attacin und *gloverin* in Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d2- und L5d3- Larven
(Kap. 4.1.2) wurden unbehandelte Larven des Entwicklungsstadiums L5d2 einer Experimen-
tal- (*E. coli*-Injektion) bzw. einer Kontrollgruppe (Saline-Injektion) zugewiesen, die wiederum
in die Treatment-Gruppen 1 h, 6 h, 10 h, 15 h, 20 h, 24 h und 36 h post Injektion unterteilt
wurden (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Stichproben- und Treatmentgruppen zur Untersuchung der Expression von *dscam*, *eater*, *lysozym*,
attacin und *gloverin* in Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d2- und L5d3-Larven.

		Replikat	Stichprobe	
			MS ⁻ Kontrollgruppe	<i>E. coli</i> Experimentalgruppe
T R E A T M E N T	1 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere
	6 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere
	10 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere
	15 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere
	20 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere
	24 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere
	36 h	1	7 Tiere	7 Tiere
		2	7 Tiere	7 Tiere
		3	7 Tiere	7 Tiere

Larven der Experimentalgruppe haben eine Injektion mit einer Injektionssuspension aus steril
filtrierter MS⁻ und PFA-abgetöteten *E. coli* K12 D31-Y entsprechend einer Injektionsdosis von
 $2 \cdot 10^7$ Bakterien/g Körpergewicht erhalten, während Larven der Kontrollgruppe ausschließlich
steril filtrierte MS⁻ injiziert wurde (Kapitel 3.5.3, Tab. 3.3). Je Treatment wurden Hämozyten
von 3 Tierkohorten á jeweils 7 Larven entsprechend der Treatment-Gruppe 1 h, 6 h, 10 h,
15 h, 20 h, 24 h oder 36 h post Injektion präpariert, wobei die Hämozyten einer Tierkohorte

nach der Präparation als Probenpool vereint weiterverarbeitet und nachfolgend als ein biologisches Replikat betrachtet wurden. Hämozyten wurden entsprechend Kapitel 3.3.1, alle übrigen Organe entsprechend Kapitel 3.3.4 unter Verwendung DNase-/RNase-freier AC-Saline und TBS präpariert. Alle präparierten Gewebe und Organe wurden 30 Sekunden in eiskalter, steriler DEPC-AC-Saline geschwenkt, um potentiell adhärierende Hämozyten abzuwaschen. Anschließend wurden die Proben in ein abgewogenes, konisches, steriles, DNase-/RNase-freies 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, der überschüssige Puffer nach Zen-trifugation abgenommen und bis zur RNA-Extraktion (Kapitel 3.7.2.2) in Flüssigstickstoff gelagert.

3.7.2.2 RNA-Extraktion

Total-RNA wurde mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Katalog-Nr.: 74104) nach Herstellerangaben (<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>) aus dem vereinten (gepoolten) Gewebe einer Gewebeklasse einer Tierkohorte extrahiert, was nachfolgend der RNA eines biologischen Replikates entspricht. Die Qualität und RNA-Konzentration der RNA-Extrakte wurde mittels denaturierender RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.7.4.3) und dem NanoDrop[™] 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt.

3.7.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Vor der Reversen Transkription (RT) wurde eventuell koeluierte gDNA im RNA-Extrakt jedes RT-Reaktionsansatzes durch Inkubation mit 0,1 U/ μ L TURBO[™] DNase (Invitrogen[™] by Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: AM2238) für 30 min bei 37 °C abgebaut und die DNase durch Zugabe von 15 mmol/L EDTA und Erhitzen auf 75 °C für 10 min inaktiviert. Anschließend wurden je Reverse Transkriptase-Reaktion 500 ng Total-RNA eines RNA-Extraktes aus dem gepoolten Gewebe einer Tierkohorte einer Treatment-Gruppe (Kapitel 3.7.2, Tab. 3.6) mit dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics, Katalog-Nr.: 05 081 955 001) nach Herstellerangaben (https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/General_Information/1/transcriptor-high-fidelity-cdna-synthesis-kit.pdf) in einzelsträngige, komplementäre DNA (engl. complementary DNA, Abk. cDNA) umgeschrieben (+ Ansatz = Experimentalansatz, 20 μ L). Zur Kontrolle möglicher gDNA-Kontaminationen wurde je RNA-Extrakt zusätzlich ein halber RT-Reaktionsansatz (10 μ L) ohne Reverse Transkriptase (– Ansatz = Kontrollansatz) angesetzt. Nach erfolgter Reversen Transkription wurden der Experimental- und Kontrollansatz jedes RNA-Extraktes mittels Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, Abk. PCR, Kapitel 3.7.4) unter identischen PCR-Bedingungen, Verwendung spezifischer Primer für den ekaryotischen Elongationsfaktor 1-alpha (*eEF1A*, Haushaltsgen) von *M. sexta* und je 1 μ L Template (+ Ansatz und – Ansatz) auf *eEF1A*-kodierende Nukleinsäuren überprüft (cDNA-Check-PCR). Die Abwesenheit von gDNA

im RNA-Extrakt des + Ansatzes wurde durch Ausbleiben eines PCR-Produktes des entsprechenden – Ansatzes bestätigt. In daran anschließenden RT-PCR Analysen (Kapitel 3.7.5) wurden ausschließlich gDNA-freie cDNAs als Template verwendet. Die maximale Anzahl der RT-PCR-Zyklen war dabei durch die Anzahl der Zyklen der cDNA-Check-PCR begrenzt, unter der in Kontrollansätzen kein PCR-Produkt nachweisbar war.

3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur DNA-Amplifikation wurden die MyTaq™ DNA-Polymerase und der MyTaq™ Reaktionspuffer von Bioline (Meridian Bioscience®, Katalog-Nr.: BIO-21105) nach Herstellerangaben (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2784/>) verwendet. Pro 25 µL PCR-Reaktionsansatz (Tab. 3.7) wurden DNA-Template, 1 Unit (U) DNA-Polymerase, 5 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer (0,2 µmol/L), 25 nmol dNTPs (5 mmol/L) und 75 nmol MgCl₂ (15 mmol/L) unter Standard-PCR-Bedingungen (Tab. 3.8) verwendet.

Tabelle 3.7: Standard-PCR-Pipettierschema für einen einfachen 25 µL PCR-Reaktionsansatz, verändert nach dem Standard MyTaq Protokoll (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2784/>).

Pipettierreihenfolge	PCR-Reagenzien	Volumen (µl)	Stoffmenge/Masse
1.	Reinstwasser (Nuklease-frei)	18,3	
2.	5x MyTaq™ Reaktionspuffer	5,0	
3.	Primer _{Vorwärts}	0,5	5 pmol
4.	Primer _{Rückwärts}	0,5	5 pmol
5.	MyTaq™ DNA-Polymerase	0,2	1 U
6.	Template	0,5	gDNA: 500 ng cDNA: 12,5 ng
Gesamtvolumen		25,0	

Tabelle 3.8: Standard-PCR-Cycler-Programm, verändert nach dem Standard MyTaq Protocol (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2784/>). Die Schritte 2-4 wurden zyklisch wiederholt.

Schritt	Phase	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
1	Initiale Denaturierung	95	120	1 x
2	Denaturierung	95	30	34 x
3	Primer Annealing	Primer-abhängig	30	
4	Elongation	72	Plasmid DNA: 10 s/1-5 kb gDNA/cDNA: 30 s/kb	
5	Finale Elongation	72	600	1 x

3.7.4.1 PCR-Primer

Genspezifische PCR-Primer, die für gDNA-Analysen mittels PCR, mRNA-Analysen mittels RT-PCR sowie zur Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden verwendet wurden, wurden mit der Web-App Primer3 Version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee>; Köressaar & Remm 2007; Untergasser et al. 2012; Köressaar et al. 2018) *in silico* erstellt (Tab. 3.9).

Tabelle 3.9: Genspezifische Primer für die RT-PCR sowie zur Herstellung von RNA-Sonden, erstellt mit Primer3 Version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee>).

Gen ¹ / Genabschnitt	T _A ² [°C]	Exon	Amplicon- Länge [bp]	Primer _{vorwärts} (5' → 3')	Primer _{rückwärts} (5' → 3')	Sequenz- ID ³	Anwen- dung
<i>dscam_{ec}</i> extrazellulär	52,2	9-11	426	CAA TCC CGT TAA GAC TAT TAC CTG G	GTC TTT ACA CTT GCT CTG CTT CTA G	Msex2.09537- RA	RT-PCR
<i>dscam_{tm}</i> transmembran	58,0	31-34	476	GCG GAA ACT TCG TTG TTC TTG	TCA AAC GAC AGG CTG TGA TTA TG	Msex2.09537- RA	RT-PCR, ISH
<i>dscam_{ic}</i> intrazellulär	61,2	33-39	769	ATT ATC GCT ATT GTC GTC GTG TG	CTA GCA TTG GAA CCC GCA AAT	Msex2.09537- RA	RT-PCR
<i>eater-like</i> (C. von Bredow)	49,0	k. A.	k. A.	TTT AAG TCC TGG TAA TTG TCA C	TTG TTA GGT TCT ATA CAC GTT C	Msex2.07580- RB	RT-PCR
<i>lysozym</i> (C. von Bredow)	55,0	k. A.	k. A.	GTG GAG AAT GAG AGC AGC AG	GTA CCA CGC TTG GAA CTT GT	Msex2.04822- RA	RT-PCR
<i>attacin</i> (Dudzic)	55,0	k. A.	k. A.	CCT GTC GTG TCT CTT CCT C	GAG CGA GGT GGT CTT GTC C	Msex2.08545- RF	RT-PCR
<i>gloverin</i> (Dudzic)	50,0	k. A.	k. A.	GAA GGT CTT CGG AAC TCT GG	CTG GAA GAG ACC TTG GAA GC	Msex2.11074- RB	RT-PCR
<i>eEF1a</i> (C. von Bredow)	57,0	k. A.	k. A.	CTT CAC AGC TCA GGT CAT CG	GAA GGA CTC CAC ACA CAT GG	Msex2.03741- RD	RT-PCR
SP6 Promotor	-	k. A.	k. A.	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	-	-	Colony- PCR, ISH, Seq.
T7 Promotor	-	k. A.	k. A.	-	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	-	Colony- PCR, ISH, Seq.
M13 Reverse Priming Site	55,0	k. A.	k. A.	CAG GAA ACA GCT ATG AC	-	-	Colony- PCR, ISH
M13 Forward (-20) Priming Site	55,0	k. A.	k. A.	-	GTA AAA CGA CGG CCA G	-	Colony- PCR, ISH

1: Gen bzw. Genabschnitt, welches/r mit nachstehendem Primerpaar amplifiziert wurde, bei Verwendung genspezifischer Primer anderer Autoren wurde der/die Autor/in unterhalb aufgeführt; 2: Primer-Hybridisierungstemperatur (engl. *annealing temperature*, Abk. T_A), angegeben in °C; 3: Sequenz-Identifikationsnummer (Sequenz-ID) des amplifizierten Gens/Genabschnittes im *Manduca sexta*-Transkriptom, abrufbar unter *i5k Workspace@NAL* (<https://i5k.nal.usda.gov/webapp/blast/>; i5K Consortium 2013)

Bei der Festlegung der Primereigenschaften wurde dabei auf Optimierung der Parameter für die Verwendung der Primer zur Synthese von RNA-Sonden geachtet (Tab. 3.10). Ausgewählte Primerpaare wurden anschließend mit der Web-App OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies, <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?>) auf Ausbildung von Haarna-

delstrukturen, Homo- und Hetero-Dimere analysiert. Bei einer berechneten freien Enthalpie möglicher Haarnadelstrukturen und Primerdimere von $\Delta G < -9$ wurden die Primersequenzen individuell verändert. Der Richtwert der freien Enthalpie möglicher Haarnadel- und Dimerstrukturen liegt bei $\Delta G > -9$. Bei diesem Wert sind mögliche Primer-Dimere (Reaktionsprodukte) weniger stabil als die Primer-Monomere (Ausgangsstoffe), sodass das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Ausgangsstoffe liegt und ausreichend Primer-Monomere mit Nukleinsäurematrizen hybridisieren können.

Tabelle 3.10: Parameter für die Erstellung genspezifischer Primer-Paare mit der Web-App Primer3, optimiert für die Synthese von RNA-Sonden nach Müller & Prange 2016, MyTaq™ DNA Polymerase Product Manual (Meridian Bioscience®, 2020) und MEGAscript® Kit User Guide (Ambion® by Life Technologies™, 2012)

Primer-Parameter	
Primer-Länge	21 – 25 bp
Basenpaarverhältnis G/C : A/T	50 : 50
Schmelztemperatur (T_M)	58 – 64 °C
Max. Differenz der Schmelztemperatur (ΔT_M) von Primer _{vorwärts} & Primer _{rückwärts}	1 °C
Amplifikat-Länge	400 – 700 bp

3.7.4.2 Horizontale DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkten wurden Agarose (Carl Roth, Kat.-Nr.: 2267.4) in einer Massenkonzentration von 10 g/L und Ethidiumbromid (Carl Roth, Kat.-Nr. 2218.1) in einer Stoffmengenkonzentration von 1,3 $\mu\text{mol/L}$ in 1x TAE-Puffer gelöst und zu einem 1 % Agarose-TAE-Gel gegossen (Tab. 3.11). Vor dem Probenauftrag wurde das Agarosegel in der Flachbett-Elektrophorese-Kammer vollständig unter Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) gesetzt, bevor die PCR-Produkte mit 10x DNA-Probenpuffer gemischt wurden (0,11 μL 10x DNA-Probenpuffer pro 1 μL PCR-Produkt) und in die Geldaschen aufgetragen wurden. Bei allen RT-PCR-Analysen wurde das vollständige Probenvolumen von 27,75 μL aufgetragen. Zur relativen Bestimmung der Basenpaargröße und Menge linearer DNA wurde zusätzlich der HyperLadder™ 1kb (Meridian Bioscience®, Katalog-Nr.: BIO-33053) nach Herstellerangaben (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2672/>) verwendet und auf dem Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei konstant 115 V. Während der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte interkaliert das im Agarosegel gelöste Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren der DNA, wodurch sich dessen Anregungsspektrum verändert und die DNA-Banden unter Anregung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) fluoreszieren. Je mehr PCR-Produkte in einer PCR amplifiziert wurden, desto mehr interkaliertes Ethidiumbromid befindet sich in einem PCR-Reaktionsansatz und umso höher ist die Intensität des Fluoreszenzsignals der DNA-Bande unter Anregung mit UV-Licht. Zur Visualisierung und Dokumentation der PCR-Produkte wurde das Geldokumentationssystem Lourmat (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde

mit der Geldokumentationsanlage detektiert und als Graustufenbild dokumentiert, welches anschließend qualitativ und semiquantitativ (Kapitel 3.7.6) ausgewertet wurde.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung eines 1 % Agarose-TAE-Gels

Chemische Verbindung	Massenkonz./ Stoffmengenkonz.	Verwendete/s Menge/Volumen pro 50 mL 1 % Agarose-TAE-Gel
Agarose (Kat.-Nr.: 2267.4)	10 g/L	0,5 g
Ethidiumbromid (Kat.-Nr.: 2218.1) in 1x TAE-Puffer	1,3 µmol/L	2,5 µL einer 1 % Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL)

3.7.4.3 Denaturierende horizontale RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Vor der denaturierenden Agarosegelelektrophorese von RNA wurden die Elektrophoresekammer, der Gelschlitten und die Gelkämme mit RNase AWAY® (Molecular BioProducts, Katalog-Nr.: 7005-11) behandelt und mit DEPC-Reinstwasser gespült, um RNasen zu inaktivieren. Einfach konzentrierter TAE-Puffer sowie das Agarose-TAE-Gel wurden ausgehend von einer DNase-, RNase-, Protease-freien 50x Stammlösung (AppliChem, Katalog-Nr.: A4686) mit RNase-freiem DEPC-Reinstwasser angesetzt und verdünnt. Extrahierte total-RNA-Proben wurden nach Masek et al. (2005) mit 1x RNA-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1 : 10 (1 Teil total-RNA-Probe : 9 Teile 1x RNA-Probenpuffer) gemischt, für 10 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Visualisierung erfolgte wie in Kapitel 3.7.4.2 beschrieben.

3.7.5 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis von Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger RNA, Abk. mRNA) ausgewählter Gene in bestimmten Geweben wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt, bei der Total-RNA vor Vervielfältigung mittels Standard-PCR (Kapitel 3.7.4) in cDNA umgeschrieben wurde (Kapitel 3.7.3). Zur Amplifikation bestimmter Genabschnitte wurden eine definierte Template-Stoffmenge von 12,5 ng cDNA (entspricht 0,5 µL unverdünnte cDNA) pro 25 µL-RT-PCR-Reaktionsansatz sowie spezifische Primer für das ausgewählte Zielgen verwendet. Zusätzlich wurde in jeder RT-PCR zur internen Kontrolle des DNA-Gehaltes jeder verwendeten cDNA-Probe (entspricht dem Total-RNA-Level) das Haushaltsgen *eEF1A* mit einer definierten Template-Stoffmenge von 0,4 ng cDNA (entspricht 0,5 µL 1 : 30 verdünnte cDNA) pro 25 µL-RT-PCR-Reaktionsansatz amplifiziert. Die PCR-Reagenzien (Reinstwasser, Reaktionspuffer, Primer und Taq-Polymerase) wurden entsprechend des Standard-PCR-Pipettierschemas (Kap. 3.7.4, Tab. 3.7) als Mastermix auf Eis angesetzt und in identischen Volumina in einzelne PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert, um mögliche Pipettierfehler zu minimieren und vergleichbare Bedingungen für alle PCR-Reaktionsansätze sicherzustellen. In einem letzten Pipettierschritt wurden die cDNA-Templates der gewünschten Treatments (z. B.

cDNA von Hämozyten *E. coli*-injizierter Larven, 1 – 36 h post Injektion) zu den gekühlten, aliquotierten PCR-Mastermix-Reaktionsansätzen hinzugegeben, bevor alle PCR-Ansätze unter Standard-PCR-Bedingungen (Kapitel 3.7.4, Tab. 3.8) zusammen in einem PCR-Cycler inkubiert wurden. Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert wie in Kapitel 3.7.4.2 beschrieben. Unterschiedliche mRNA-Level eines Gens in verschiedenen Total-RNA-Extrakten sind durch unterschiedliche Signalintensitäten der cDNA-Banden im Agarosegel zu erkennen. Umso größer die Anzahl der cDNA-Matrizen eines Gens in einer cDNA-Probe, desto höher ist die Intensität des Fluoreszenzsignals des cDNA-Amplifikates nach der Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.7.4.2).

3.7.6 Semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR)

Zur Bestimmung der Veränderung des mRNA-Levels der immunrelevanten Gene *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in Hämozyten immunstimulierter *M. sexta* L5d2/3-Larven wurden RT-PCR-Analysen (Kapitel 3.7.5) von insgesamt drei unterschiedlichen Total-RNA-Extrakten (drei biologische Replikate, n = 3) je Treatment (Kapitel 3.7.2.1, Tab. 3.6) durchgeführt und semiquantitativ ausgewertet.

3.7.6.1 Rechenschritt 1: Berechnung des Nettograuwertes

Zur Quantifizierung der mRNA-Level der immunrelevanten Gene *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in allen verwendeten Total-RNA-Proben wurde der Grauwert des Fluoreszenzsignals jedes dokumentierten RT-PCR-Amplifikates (cDNA-Bande) und des umliegenden Gelhintergrundes mit der Measure-Funktion des Open-Source-Bildverarbeitungsprogramms ImageJ2 Version 2.1.0/1.53c (Rueden et al. 2017) *in silico* ermittelt. Zur Differenzierung von Hintergrund- und cDNA-Signal wurde der Nettograuwert ausgehend vom Grauwert eines RT-PCR-Amplifikates durch Subtraktion mit dem Grauwert des entsprechenden Gelhintergrundes berechnet (Formel 1). Der Nettograuwert eines RT-PCR-Amplifikates ist ein Maß für die Intensität des Fluoreszenzsignals eines RT-PCR-Produktes, welches direkt von den in der verwendeten cDNA-Probe enthaltenen cDNA-Matrizen des Zielgens und damit auch vom mRNA-Gehalt des Zielgens in der verwendeten Total-RNA-Probe abhängt. Dementsprechend lässt der Nettograuwert eines RT-PCR-Amplifikates Rückschluss auf das mRNA-Level eines Gens in einer Total-RNA-Probe zu.

Formel 1: Rechenschritt 1 – Berechnung des Nettograuwertes eines RT-PCR-Amplifikates

$$\text{Nettograuwert}_{dscam \ E. coli \ 1h \ Rep \ 1} = \text{Grauwert}_{dscam \ E. coli \ 1h \ Rep \ 1} - \text{Grauwert}_{\text{Gelhintergrund}}$$

3.7.6.2 Rechenschritt 2: Normalisierung

Um potenzielle Unterschiede der cDNA-Proben im DNA-Gehalt auszugleichen, die das mRNA-Level verfälschen könnten, wurde der Nettogruwert jedes RT-PCR-Amplifikates der fünf immunrelevanten Gene im nächsten Rechenschritt mit dem Haushaltsgen *eEF1A* normalisiert. Dazu wurde der Quotient aus dem Nettogruwert eines RT-PCR-Amplifikates eines immunrelevanten Gens eines Treatments (Bsp.: *dscam E. coli* 1h Replik 1) und dem Nettogruwert des mit derselben cDNA-Probe amplifizierten Haushaltsgens *eEF1A* gebildet (Formel 2). Das Ergebnis dieses Quotienten sind normalisierte Grauwerteinheiten (NGE). Potenzielle Unterschiede verschiedener cDNA-Proben im DNA-Gehalt sind in den NGE ausgeglichen, weshalb dieser Wert zur Veranschaulichung des absoluten mRNA-Levels der immunrelevanten Gene *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* der Kontroll- und Experimentalgruppe im Vergleich verwendet wird (Abb. 4.1 C, Abb. 4.2 B – F).

Formel 2: Rechenschritt 2 – Normalisierung des Nettogruwertes eines RT-PCR-Amplifikates eines immunrelevanten Gens mit dem Haushaltsgen *eEF1A*

$$\text{normalisierte Grauwerteinheiten}_{dscam\ E.\ coli\ 1h\ Rep\ 1} = \frac{\text{Nettogruwert}_{dscam\ E.\ coli\ 1h\ Rep\ 1}}{\text{Nettogruwert}_{eEF1A\ E.\ coli\ 1h\ Rep\ 1}}$$

3.7.6.3 Rechenschritt 3: Relativierung

Zur Bestimmung der Veränderung der Genexpression von *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in Hämozyten *E. coli*-injizierter Larven relativ zu Hämozyten Saline (MS⁻)-injizierter Larven wurden die NGE jedes mit Total-RNA der Experimentalgruppe amplifizierten RT-PCR-Produktes der immunrelevanten Gene zur entsprechenden MS⁻-Kontrollgruppe relativiert. Dazu wurde zunächst der Quotient aus den NGE eines mit Total-RNA eines MS⁻-Kontrolltreatments amplifizierten RT-PCR-Produktes eines immunrelevanten Gens (Bsp.: *dscam* MS⁻ 1h Replik 1) und den NGE des mit Total-RNA aus Hämozyten unbehandelter Tiere des gleichen Entwicklungsstadiums amplifizierten RT-PCR-Produktes desselben immunrelevanten Gens (Bsp.: *dscam* L5d2 UB Replik 1) gebildet (Formel 3). Das Ergebnis ist das Relative Vielfache der NGE des MS⁻-Kontrolltreatments gegenüber den NGE des dazugehörigen unbehandelten Treatments. Die NGE der Treatments MS⁻ 1h, -6h und -10h wurden mit den NGE des Treatments L5d2 UB relativiert, während die NGE der Treatments MS⁻15h, -20h, -24h und -36h mit den NGE der Treatments L5d3 UB relativiert wurden.

Formel 3: Rechenschritt 3.1 – Relativierung der normalisierten Grauwerteinheiten eines RT-PCR-Amplifikates eines MS⁻-Kontrolltreatments

$$\text{relatives Vielfaches}_{dscam\ MS^-\ 1h\ Rep\ 1} = \frac{\text{normalisierte Grauwerteinheiten}_{dscam\ MS^-\ 1h\ Rep\ 1}}{\text{normalisierte Grauwerteinheiten}_{dscam\ L5d2\ UB\ Rep\ 1}}$$

Anschließend wurde der Quotient aus den NGE eines mit Total-RNA eines *E. coli*-Experimentaltreatments amplifizierten RT-PCR-Produktes eines immunrelevanten Gens (Bsp.: *dscam E. coli* 1h Replikat 1) und den NGE des mit Total-RNA des entsprechenden MS⁻-Kontrolltreatments amplifizierten RT-PCR-Produktes desselben immunrelevanten Gens (Bsp.: *dscam MS⁻* 1h Replikat 1) gebildet (Formel 4). Das Ergebnis ist das Relative Vielfache der NGE des *E. coli*-Experimentaltreatments gegenüber den NGE des entsprechenden MS⁻-Kontrolltreatments.

Formel 4: Rechenschritt 3.2 – Relativierung der normalisierten Grauwerteinheiten eines RT-PCR-Amplifikates eines *E. coli*-Experimentaltreatments

$$\text{relatives Vielfaches}_{dscam E. coli 1h Rep 1} = \frac{\text{normalisierte Grauwerteinheiten}_{dscam E. coli 1h Rep 1}}{\text{normalisierte Grauwerteinheiten}_{dscam MS- 1h Rep 1}}$$

Das relative Vielfache der NGE von RT-PCR-Amplifikaten lässt Rückschluss auf die Veränderung der Expression immunrelevanter Gene der Experimentalgruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu (Kapitel 3.7.6.1). Dementsprechend wurde dieser Wert zur Darstellung der Veränderung des mRNA-Levels von *dscam* in Geweben und Organen in Relation zu einem Referenzgewebe (Abb. 4.1 D) bzw. zur Darstellung der Veränderung des mRNA-Levels der immunrelevanten Gene *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in Hämozyten *E. coli*-injizierter Larven (Experimentalgruppe) relativ zu Hämozyten MS⁻-injizierter Larven (Kontrollgruppe) verwendet (Abb. 4.2 B' – D').

3.7.6.4 Statistische Analyse

Die normalisierten Grauwerteinheiten (mRNA-Level, Kapitel 3.7.6.2) und relativen Vielfache der normalisierten Grauwerteinheiten (Veränderung des mRNA-Levels, Kapitel 3.7.6.3) wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test mit RStudio[®] Version 1.3.1056 (R Core Team 2018) auf Normalverteilung überprüft. Die Werte der drei biologischen Replikate eines Treatments einer Stichprobengruppe (MS⁻ oder *E. coli*) bildeten dabei eine Testgruppe (n = 3), innerhalb derer die Daten auf Normalverteilung getestet wurden. Bei gegebener Normalverteilung aller Daten wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen jedem Experimentaltreatment (z.B. *E. coli* 1h) und dem entsprechenden Kontrolltreatment (z.B. MS⁻ 1h) mittels parametrischem Testverfahren (ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben-*t*-Test bei Varianzinhomogenität) mit Microsoft[®] Excel Version 16.45 ermittelt. Ein *p*-Wert von ≤ 0.05 gilt dabei als statistisch signifikant.

3.7.6.5 Graphische Darstellung

Die statistisch analysierten Daten (Kapitel 3.7.6.4) wurden mit Microsoft[®] Excel Version 16.45 in Form von Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Der arithmetische Mittelwert (MW) eines Treatments einer Stichprobe bestehend aus den Werten von drei biologischen Replikaten

($n = 3$) wird durch einen Balken, die Standardabweichung (SD) der Stichprobe (s) durch eine Antenne (Whisker) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Treatments zweier unterschiedlicher Stichproben sind mit * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) und *** ($p \leq 0.001$) angegeben.

3.7.7 cDNA-Klonierung

3.7.7.1 Ligation von cDNA-Amplifikaten mit Plasmid-DNA

Zur enzymkatalysierten Verknüpfung (Ligation) *Taq*-amplifizierter cDNA mit Plasmid-DNA wurde das TA Cloning® Kit Dual Promoter pCR®II (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: K2070-20) verwendet. Komplementär zum 3'-Desoxythymidin (T)-Überhang am offenen Ende des linearisierten pCR®II Plasmid-Vektors erhalten RT-PCR-Produkte bedingt durch die Amplifikation mittels *Taq*-Polymerase einen 3'-Desoxyadenosin (A)-Überhang, sogenannte klebrige Enden (engl. sticky ends), welche bei der Methode der TA-Klonierung zur Ligation von Klonierungsvektor und PCR-Produkt verwendet werden. RT-PCR-Produkte wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, das passende cDNA-Amplifikat wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem ISOLATE II PCR and Gel Kit (Meridian Bioscience®, Katalog-Nr.: BIO-52059) nach Herstellerangaben (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/878/>) gereinigt. Das gereinigte cDNA-Amplifikat wurde anschließend mittels ExpressLink™ T4 DNA Ligase (TA Cloning® Kit Dual Promoter pCR®II) nach Herstellerangaben (https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/tadual_man.pdf) je 10 µL-Ligationsansatz mit 50 ng (20 fmol) linearisierter pCR®II Plasmid-DNA ligiert. Die benötigte Menge cDNA wurde dabei für jeden Ligationsansatz in Abhängigkeit der Länge des cDNA-Amplifikates individuell berechnet (Formel 5). Plasmid-DNA und cDNA-Amplifikat wurden in der Ligationsreaktion in einem Verhältnis von 1 : 3 (Vektor-DNA : cDNA-Amplifikat) 30 min bei RT inkubiert.

Formel 5: Berechnung der benötigten Menge cDNA pro 10 µL-Ligationsansatz im Verhältnis 1 : 3 (Vektor-DNA : cDNA-Amplifikat). X: Benötigte Menge PCR-Produkt (cDNA) [ng], Y: Größe des PCR-Produktes (cDNA-Amplifikates) [bp]

$$\text{benötigte Menge PCR-Produkt [ng]} = \frac{\text{PCR-Produkt-Größe [bp]} * \text{Vektor-DNA-Menge [ng]}}{\text{Vektor-DNA-Größe [bp]}} * 3$$

$$x \text{ ng cDNA} = \frac{(y \text{ bp cDNA}) * (50 \text{ ng pCR}^{\circledR}\text{II Plasmid-DNA})}{3900 \text{ bp pCR}^{\circledR}\text{II Plasmid-DNA}} * 3$$

3.7.7.2 Verwendeter Klonierungsvektor

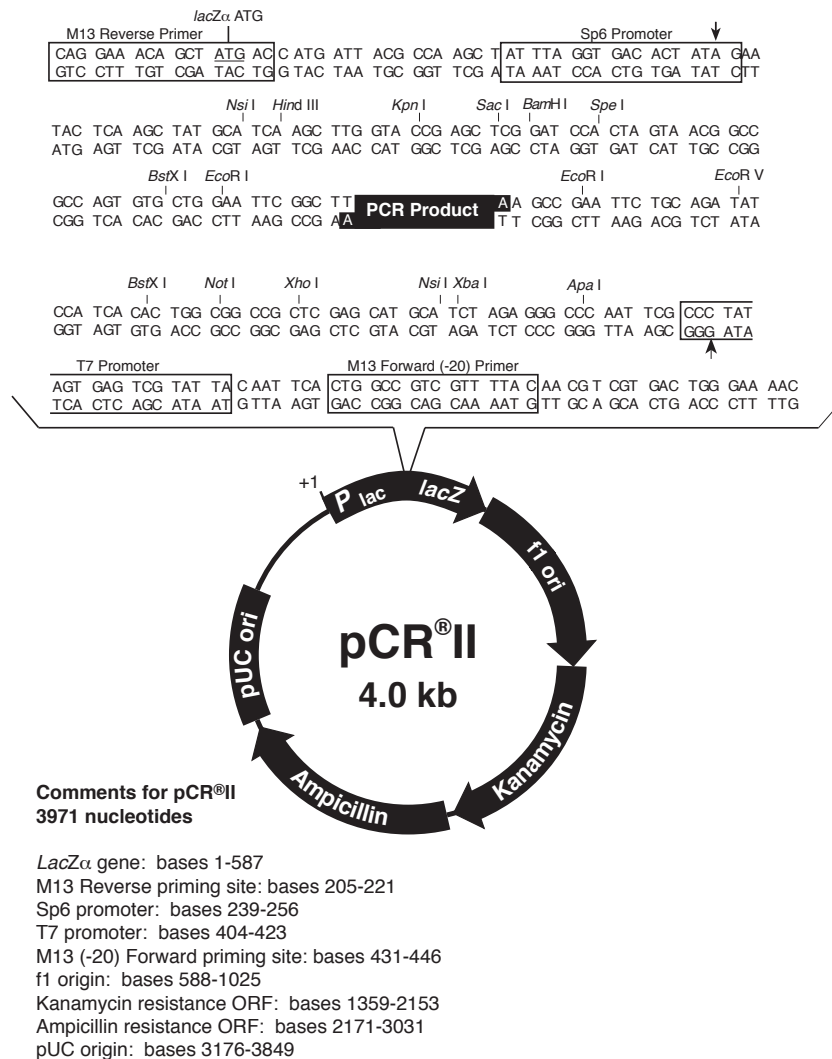


Abbildung 3.2: Vektorkarte des linearisierten pCR®II Plasmid-Vektors.

(Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcr_ii_map.pdf)

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

Chemisch kompetente NEB® 5-alpha *E. coli* (*E. coli* K12 DH5α™-Derivat, New England Biolabs, Katalog-Nr.: C2987H) wurden modifiziert nach Herstellerangaben (<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>) mit rekombinanten pCR®II-Plasmid-Vektoren (Kapitel 3.7.7.1) transformiert. Die Bakterien wurden aus der Kryolagerung bei -80 °C entnommen und 10 min auf Eis aufgetaut. 25 µL aufgetaute Bakteriensuspension (halber Ansatz) wurden mit ca. 10 ng Ligationsprodukt (mit cDNA-Insert ligierte pCR®II-Plasmid-Vektoren) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 s (abweichend von 30 s Hitzeschock nach Original-Herstellerprotokoll) wurden die transformierten Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert, 125 µL 37 °C warmes SOC-

Outgrowth-Medium (New England Biolabs, Katalog-Nr.: B9020S, nach Hanahan 1983) zugegeben und für 60 min bei 37 °C und 225 U/min auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Mit Hilfe steriler Glasbeads wurden jeweils 50 µL und 100 µL der Bakteriensuspension auf 37 °C-warme als Stammplatten bezeichnete LB-Miller-Selektivagar-Platten (Ampicillin: 50 µg/mL) ausgestrichen und zur weiteren Verwendung über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Aufgrund eines für das Enzym β -Lactamase kodierenden Gens für Ampicillin-Resistenz (*bla*) im pCR[®]II-Plasmid-Vektor (Abb. 3.2) konnten transformierte NEB 5-alpha *E. coli* in Anwesenheit des β -Lactam-Antibiotikas Ampicillin wachsen, während das Wachstum nicht-transformierter *E. coli* durch Blockierung der Neusynthese einer Mureinschicht verhindert wurde.

3.7.7.4 Klon-Check-PCR

Nach über-Nacht-Inkubation transformierter NEB[®] 5-alpha *E. coli* bei 37 °C (Kapitel 3.7.7.3) wurden einzelne Bakterienkolonien mittels Klon-Check-PCR auf Vorhandensein des gewünschten cDNA-Inserts getestet. Dazu wurden zufällig ausgesuchte Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern von der Stammplatte aufgenommen, auf einer als Masterrasterplatte bezeichneten frischen LB-Miller-Selektivagar-Platte (Ampicillin: 50 µg/mL) ausgestrichen und die restlichen am Zahnstocher haftenden Bakterien als Template für eine Klon-Check-PCR nach Standard-PCR-Protokoll (Kapitel 3.7.3) verwendet. Dabei wurden spezifische Primer für die die Multiple Cloning Site (MCS) des pCR[®]II-Plasmid-Vektors flankierenden SP6- und T7-Promotoren bzw. für die M13 Forward und -Reverse Priming Sites (Abb. 3.2) verwendet. PCR-Produkte einer Größe entsprechend der Länge der von SP6- und T7-Promotoren flankierten MCS (184 bp) bzw. der von der M13 Priming Site flankierten MCS (241 bp) inklusive der Länge des ligierten cDNA-Amplifikates [bp] wurden als Indiz für die erfolgreiche Klonierung desselben cDNA-Amplifikates gewertet.

3.7.7.5 Minipräparation von Plasmid-DNA (Mini I, II, III)

Am Vorabend der Plasmid-Minipräparation nach Birnboim & Doly (1979) wurde eine in der Klon-Check-PCR (Kapitel 3.7.7.4) auf erfolgreiche Klonierung positiv getestete Bakterienkolonie mit einer sterilen, DNase- & RNase-freien Pipettenspitze mit Filter von der Masterrasterplatte aufgenommen und auf einer als Masterplatte bezeichneten frischen LB-Miller-Selektivagar-Platte (Ampicillin: 50 µg/mL) ausgestrichen. Anschließend wurde die Pipettenspitze mit den restlichen Klonen in ein steriles, DNase- & RNase-freies 15 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 3 mL LB-Miller-Selektivmedium (Ampicillin: 50 µg/mL) abgeworfen und über Nacht bei 37 °C und 225 U/min auf einem Rotationsschüttler im 45°-Winkel inkubiert. Zur Gewährleistung aerober Bedingungen wurde der Deckel des 15 mL Reaktionsgefäßes nicht fest verschraubt, sondern lediglich locker aufgesetzt und mit Klebestreifen am Reaktionsgefäß befestigt. Nach über-Nacht-Inkubation (mind. 14h) wurde das Bakterienwachstum in der

Flüssigkultur optisch überprüft. Bei Trübung des LB-Selektivmediums wurde die Bakterienflüssigkultur resuspendiert, 1,5 mL der Bakteriensuspension in ein steriles, DNase- & RNase-freies 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 4 °C und 22.350 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst restlos abgenommen und verworfen, bevor 100 µL RNase A-haltiger Resuspendierungspuffer (Mini I-Lösung) zum Bakterienpellet hinzugegeben wurde. Durch Vortexen wurde das Bakterienpellet in der Mini I-Lösung resuspendiert und bakterielle RNA durch die enthaltene RNase A abgebaut bis die Bakteriensuspension milchig-trüb wurde. Im nächsten Schritt wurden die resuspendierten Bakterien durch Zugabe von 200 µL Mini II-Lösung und mehrmaligem schnellem Invertieren des Reaktionsgefäßes alkalisch hydrolysiert bis der Bakterienextrakt viskos wurde und auf Eis gestellt wurde. Bakterielle, chromosomale DNA wurde dabei denaturiert, während die kovalenten Bindungen zirkulärer, doppelsträngiger Plasmid-DNA nativ verblieben sind (Birnboim & Doly 1979). Durch Zugabe von 150 µL eiskalter Mini III-Lösung wurde der pH-Wert anschließend neutralisiert, bevor das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert wurde bis Ausflockungen im Bakterienextrakt erkennbar waren und die Reaktion für 3 min auf Eis inkubiert wurde. Während chromosomale DNA infolge der Neutralisation in unlöslicher Form renaturiert und präzipitiert wurde verbleibt Plasmid-DNA gelöst im Überstand (Birnboim & Doly 1979). Zur Trennung der gelösten Plasmid-DNA von ausgefällter bakterieller, chromosomaler DNA und Proteinen wurde der Bakterienextrakt für 10 min bei 4 °C und 22.350 x g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde danach in ein neues steriles, DNase-freies 1,5 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 1000 µL Ethanol (100 % Ethanol, unvergällt, molecular biology grade) überführt und mehrmals invertiert, um die im Überstand gelöste Plasmid-DNA zu präzipitieren. Die Präzipitationsreaktion wurde anschließend für 10 min bei RT inkubiert, bevor das Reaktionsgefäß für 30 min bei 4 °C und 22.350 x g zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation wurde das Reaktionsgefäß auf ein weißes Pellet (Plasmid-DNA) überprüft, bevor der Überstand abgenommen und verworfen wurde und das Pellet zweimal mit jeweils 500 µL 70 % Ethanol gespült wurde. Im Anschluss wurde der 70 % Ethanol vollständig abgenommen und das Reaktionsgefäß mit offenem Deckel bei RT unter der Sterilwerkbank zur Trocknung des DNA-Pellets stehen lassen. Sobald der Rand des Pellets glasig wurde, wurde die Plasmid-DNA 20 min in 20 µL Nuklease-freiem Reinstwasser (HyClone™ HyPure™ Molecular Biology Grade Water, Katalog-Nr.: SH30538.01) bei 4 °C eluiert. Jeweils 1 µL und 0,1 µL der eluierten Plasmid-DNA wurden anschließend mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Abgleich mit dem DNA-Molekulargewichtsmarker HyperLadder™ 1kb (Meridian Bioscience®, Katalog-Nr.: BIO-33053) qualitativ und quantitativ überprüft. Bis zur weiteren Verwendung (Plasmid-Sequenzierung, *in-vitro*-Transkription) wurden die rekombinanten Plasmid-DNA-Isolate bei -20 °C gelagert.

3.7.8 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der Identität amplifizierter RT-PCR-Produkte (Kapitel 3.7.5) oder isolierter, rekombinanter Plasmid-DNA (Kapitel 3.7.7.5) wurde der *Economy Run* Sequenzier-Service (Kettenabbruch-Synthese nach Sanger) von Microsynth SeqLab (Göttingen, Deutschland) genutzt. Während RT-PCR-Produkte zunächst mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, passende cDNA-Amplifikate aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem ISOLATE II PCR and Gel Kit (Meridian Bioscience®, Katalog-Nr.: BIO-52059) nach Herstellerangaben (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/878/>) gereinigt wurden, wurden rekombinante Plasmid-DNA-Isolate direkt für die Sequenzierung verwendet. Beide DNA-Eluat wurden im Anschluss entsprechend der Richtlinien von Microsynth SeqLab für den *Economy Run* Sequenzier-Service (https://www.microsynth.seqlab.de/files/Inhalte/PDFs/Germany/UserGuide_EconomyRun_DE.pdf) vorbereitet und zur Sequenzierung eingeschickt. Zur Identifikation der Orientierung des cDNA-Inserts im pCR®II Plasmid-Vektor wurden zwei identische Aliquots eines rekombinanten Plasmid-DNA-Isolates eingeschickt, wobei ein Aliquot unter Verwendung des SP6-Primers und ein Aliquot unter Verwendung des T7-Primers sequenziert wurde. Die von SeqLab ermittelte Nukleotidsequenz der cDNA-Amplifikate bzw. der Multiple Cloning Site rekombinanter pCR®II Plasmid-Vektoren wurde anschließend mittels BLAST-Analyse mit dem im i5k Workspace@NAL (<https://i5k.nal.usda.gov/webapp/blast/>; i5K Consortium 2013) veröffentlichten Transkriptom von *M. sexta* verglichen, um die Sequenzidentität zu bestätigen und die Orientierung des cDNA-Inserts im pCR®II Plasmid-Vektor zu bestimmen.

3.7.9 RNA-*in-situ*-Hybridisierung

3.7.9.1 Allgemeine Arbeitsvorbereitungen

Zur Inaktivierung von RNasen wurden hitzestabile Materialien wie runde Deckgläser aus Borosilikatglas für 4 h bei 200 °C gebacken, während hitzelabile Materialien, die vom Hersteller nicht zertifiziert frei von RNase-Kontamination waren, mit RNase AWAY® (Molecular BioProducts, Katalog-Nr.: 7005-11) behandelt wurden. Zur Inaktivierung von RNasen in den in der RNA-*in-situ*-Hybridisierung verwendeten Lösungen wurden alle Puffer und Lösungen bis einschließlich zur Stringenzwaschung mit DEPC-behandeltem Reinstwasser und zertifiziert RNase-freien Chemikalien angesetzt.

3.7.9.2 RNA-Sonden-Synthese

RNA-Sonden zur *in-situ*-Detektion von Dscam-mRNA (*dscam*, Transmembrandomäne, Exon 31-34) in Hämozyten wurden mit dem MEGAscript™ SP6 Transcription Kit (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: AM1330) und dem MEGAscript™ T7 Transcription Kit

(Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: AM1334) unter Verwendung von Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat (DIG-11-UTP, Roche Diagnostics, Katalog-Nr.: 03 359 247 910) nach Herstellerangaben (https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/1330M_G.pdf?_ga=2.248337735.1374779477.1606667425-1364052046.1606476329) synthetisiert. Dazu wurde unter Verwendung von sequenzierter, rekombinanter Plasmid-DNA (Kapitel 3.7.7 & 3.7.8) als PCR-Template und Primer für die im pCR®II-Plasmid-Vektor (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: K2070-40) enthaltenen M13 Reverse- und Forward Priming Sites ein PCR-Produkt nach Standard-PCR-Protokoll (Kapitel 3.7.4) amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung des PCR-Produktes (Kapitel 3.7.4.2) wurde das passende PCR-Amplifikat aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem ISOLATE II PCR and Gel Kit (Meridian Bioscience®, Katalog-Nr.: BIO-52059) nach Herstellerangaben (<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/878/>) gereinigt. Qualität und Größe des PCR-Amplifikates wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese analysiert, während die DNA-Konzentration des PCR-Eluates photometrisch mit einem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) ermittelt wurde. Je PCR-Amplifikat wurde anschließend eine SP6- und eine T7-*in-vitro*-Transkriptionsreaktion angesetzt, wobei je 10 µL-Transkriptionsansatz 500 ng PCR-Produkt mit SP6- und T7-Promotoren mit Reaktionspuffer, Ribonukleotiden und SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase für 8h bei 37 °C (T7) bzw. 40 °C (SP6) im PCR-Cycler inkubiert wurden (Tab. 3.12).

Tabelle 3.12: 10 µL-Transkriptionsansatz einer SP6- und T7-*in-vitro*-Transkriptionsreaktion nach Herstellerangaben (https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/1330M_G.pdf?_ga=2.5192179.1374779477.1606667425-1364052046.1606476329 und <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/digutprobul.pdf>)

	<i>in-vitro</i> -Transkriptionsansatz (10 µL)	
	SP6	T7
Nuklease-freies Wasser	up to: 10 µL	up to: 10 µL
ATP	1,00 µL (5,0 mM/L)	1,00 µL (7,5 mM/L)
CTP	1,00 µL (5,0 mM/L)	1,00 µL (7,5 mM/L)
GTP	1,00 µL (5,0 mM/L)	1,00 µL (7,5 mM/L)
UTP	0,68 µL (3,4 mM/L)	0,68 µL (5,1 mM/L)
DIG-11-UTP	2,10 µL (2,1 mM/L)	2,10 µL (2,1 mM/L)
10x Reaktionspuffer	1,00 µL	1,00 µL
PCR-Produkt (mit SP6-/T7-Promotor)	50 ng/µL (Total: 500 ng)	50 ng/µL (Total: 500 ng)
RNA-Polymerase	1,00 µL	1,00 µL

Nach erfolgter *in-vitro*-Transkription setzt sich der Transkriptionsansatz aus den transkribierten, genspezifischen RNA-Sonden mit SP6- bzw. T7-Promotor, DNA-Template (PCR-Produkt) und freien Nukleotiden und Proteinen zusammen. Zum Abbau von DNA im Transkriptionsansatz erfolgte nach der *in-vitro*-Transkription ein DNA-Verdau durch Inkubation des Transkriptionsansatzes mit 0,1 U/µL TURBO™ DNase (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: AM2238) für 15 min bei 37 °C. Die RNA-Sonden wurden danach mittels LiCl-

Fällung ($c_{LiCl} = 2,5 \text{ M/L}$) über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ im Gefrierschrank präzipitiert (Dijkman et al. 1995) und am darauffolgenden Tag bei $22.350 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (nicht eingebaute Nukleotide und Proteine) vollständig abgenommen, das RNA-Pellet zweimal mit $150 \mu\text{L}$ 70 % EtOH (molecular biology grade, RNase-frei) gewaschen, der Ethanol restlos abgenommen und das Reaktionsgefäß mit offenem Deckel bei RT unter der Sterilwerkbank zur Trocknung des RNA-Pellets ca. 5 – 10 min stehen lassen. Sobald der Rand des Pellets glasig wurde, wurde die RNA 20 min in $30 \mu\text{L}$ Nuklease-freiem Reinstwasser (HyClone™ HyPure™ Molecular Biology Grade Water, Katalog-Nr.: SH30538.01) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ eluiert. Mittels denaturierender RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.7.4.3) wurde die Qualität der eluierten RNA-Sonde überprüft. Bei einer sauberen RNA-Bande entsprechend der vorher berechneten Produktgröße wurde die RNA-Konzentration der Sonde photometrisch mit dem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) ermittelt und durch Zugabe von RNA-Hybridisierungspuffer (HYBE-Puffer) auf eine Massenkonzentration von $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ eingestellt, bevor die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde bis zur Hybridisierung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert wurde.

3.7.9.3 Sondenfunktionstest

Zur Feststellung der erfolgreichen Inkorporation von DIG-11-UTP während der RNA-Sendensynthese sowie zur Ermittlung der optimalen Sondenkonzentration während der Hybridisierung erfolgte vor der ersten Verwendung jeder RNA-Sonde ein Sondenfunktionstest mittels Dot-Blot-Analyse, wobei in der RNA inkorporiertes DIG-11-UTP antikörperbasiert nachgewiesen wurde. Dazu wurde die RNA-Sonde seriell ($2x = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $1x = \text{unverdünnt} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $1 : 10$, $1 : 100$, $1 : 1000$) in HYBE-Puffer verdünnt, bevor je Verdünnung $2 \mu\text{L}$ Sonde auf einer positiv geladenen Nylon-Transfermembran (Amersham Hybond™-N⁺, Porengröße: $45 \mu\text{m}$, GE Healthcare, Katalog-Nr.: RPN303B) aufgetragen und durch Bestrahlung mit UV-Licht für 3 min fixiert wurden. Die Membran wurde danach dreimal mit $1x$ TBS gewaschen, für 60 min bei RT mit Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer blockiert und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit alkalische Phosphatase-konjugiertem Schaf-anti-Digoxigenin Fab-Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Wirt: Schaf, Klonalität: polyklonal, Klasse: IgG, Roche Diagnostics, Katalog-Nr.: 1 1 093 274 910), $1 : 1000$ ($0,75 \text{ U/mL}$) in Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer verdünnt, inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde am darauffolgenden Tag durch dreimaliges Waschen der Membran in $1x$ TBS für jeweils 10 min bei RT entfernt. Anschließend wurde die Membran durch dreimaliges Waschen in ALP-Puffer für jeweils 10 min bei RT umgepuffert, bevor die Antikörperbindung durch Inkubation der Membran in ALP-Entwicklungslösung wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben unter Sicht visualisiert wurde. Durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Reinstwasser wurde der Substratumsatz der alkalischen Phosphatase gestoppt

und die Membran zwischen zwei Whatman® Filterpapieren (Gel-Blotting-Papier, GB 002, Dicke: 0,4 mm, Schleicher & Schuell®, Katalog-Nr.: 26 02 26694) getrocknet.

3.7.9.4 Hämozytenpräparation

Hämozyten-Monolayer von unbehandelten L5d2- und L5d3-Larven sowie von Saline- und *E. coli*-injizierten L5d2-Larven 24h post Injektion (Tab. 3.13) wurden unter Verwendung von DEPC-AC-Saline präpariert (Kapitel 3.3.1 & 3.3.2). Die gewaschenen Hämozyten wurden in sterilen, RNase-freien 4-Loch-Zellkulturschalen mit eingelegten, bei 200 °C gebackenen (Kapitel 3.7.9.1), runden Deckgläsern für 45 min bei RT in einer Feuchtkammer absitzen lassen. Nach der Absitzzeit wurden die adhärenen Hämozyten in 3,5 % PFA in DEPC-PBS für 5 min bei RT fixiert und dreimal mit DEPC-PBS für 10 min bei RT gewaschen. Die fixierten, gewaschenen Hämozyten wurden anschließend in aufsteigender Ethanolreihe (30 % – 90 % EtOH in DEPC-PBS in 10 % Schritten, 96 % EtOH) für jeweils 5 min bei RT dehydriert und in absteigender Ethanolreihe (96 %, 90 %, 80 % und 70 % EtOH in DEPC-Reinstwasser) für jeweils 5 min bei RT rehydriert, bevor die Hämozyten in 70 % EtOH in DEPC-Reinstwasser bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert werden konnten.

Tabelle 3.13: Treatmentgruppen zur Untersuchung der Genexpression von *dscam* in Hämozyten immunstimulierter *M. sexta* L5d2/3 Larven mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung.

Treatmentübersicht: RNA-<i>in-situ</i>-Hybridisierung	
Treatment	Entwicklungsstadium
Unbehandelt	L5d2
	L5d3
Saline 24h	L5d3
<i>E. coli</i> 24h	L5d3

3.7.9.5 Prähybridisierung

In 70 % EtOH in DEPC-Reinstwasser gelagerte Hämozyten wurden in 50 % und 30 % EtOH in DEPC-Reinstwasser, 1x DEPC-PBS und 1x DEPC-Tween-PBS für jeweils 5 min bei RT rehydriert. Nach abgeschlossener Rehydrierung wurden positiv geladene Aminogruppen acetyliert, indem die Hämozyten in 1 % (v/v) Triethanolamin-0,3 % (v/v) Essigsäureanhydrid in DEPC-Tween-PBS für 5 min bei RT inkubiert wurden. Die acetylierten Hämozyten wurden danach zweimal in DEPC-Tween-PBS für 5 min bei RT gewaschen, bevor eine zweite Fixierung in 3,5 % PFA in DEPC-PBS und vier Waschriffe in DEPC-Tween-PBS für jeweils 5 min bei RT folgten. Danach wurden die Hämozyten zweimal für 1 min in HYBE-Puffer bei RT gewaschen, bevor sie anschließend in einer Feuchtkammer für 2h in HYBE-Puffer bei 56 °C im Hybridisierungssofen präinkubiert wurden.

3.7.9.6 Hybridisierung

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurden die RNA-Sonden unmittelbar vor der RNA-*in-situ*-Hybridisierung durch Erhitzen für 10 min bei 85 °C im Heizblock linearisiert und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt. Nach abgeschlossener Präinkubation in HYBE-Puffer (Kapitel 3.7.9.5) wurden die Hämozyten in einer abgeschlossenen Feuchtkammer über Nacht bei 56 °C im Hybridisierungsöfen mit den *dscam*_{Exon31-34}-spezifischen, Digoxigenin-markierten RNA-Sonden (Sondenkonzentration: 5 ng/μL) inkubiert. Zum direkten Vergleich von Sense- und Antisense-Sonde wurden je Treatment (Tab. 3.13) die SP6- (Sense-Kontrollsonde) und T7-Sonde (Antisense-Sonde) inkubiert.

3.7.9.7 Posthybridisierung

Nach über-Nacht-Hybridisierung der *dscam*-spezifischen RNA-Sonden (Kapitel 3.7.9.6) erfolgte am darauffolgenden Tag die Stringenzwaschung bei 56 °C mit auf 56 °C temperierten Puffern (Tab. 3.14). Dazu wurden die Hämozyten einmal für 1 min und einmal für 5 min mit HYBE-Puffer gewaschen, gefolgt von fünfminütigen Waschschritten mit 25 % 2x DEPC-SSC in HYBE-Puffer, 50 % 2x DEPC-SSC in HYBE-Puffer, 75 % 2x DEPC-SSC in HYBE-Puffer, 100 % 2x DEPC-SSC, zweimal 0,05x DEPC-SSC, 25 % DEPC-Tween-PBS in 0,05x DEPC-SSC, 50 % DEPC-Tween-PBS in 0,05x DEPC-SSC und 75 % DEPC-Tween-PBS in 0,05x DEPC-SSC.

Tabelle 3.14: Puffer für die Stringenzwaschung während der Posthybridisierung der RNA-*in-situ*-Hybridisierung in Hämozyten von *M. sexta*.

Stringenzwaschung		
Zeit [min]	Temperatur [°C]	Puffer
1	56	HYBE-Puffer
5	56	HYBE-Puffer
5	56	25 % 2x DEPC-SSC in HYBE-Puffer
5	56	50 % 2x DEPC-SSC in HYBE-Puffer
5	56	75 % 2x DEPC-SSC in HYBE-Puffer
5	56	100 % 2x DEPC-SSC
5	56	0,05x DEPC-SSC
5	56	0,05x DEPC-SSC
5	56	25 % DEPC-Tween-PBS in 0,05x DEPC-SSC
5	56	50 % DEPC-Tween-PBS in 0,05x DEPC-SSC
5	56	75 % DEPC-Tween-PBS in 0,05x DEPC-SSC

3.7.9.8 Immunzytochemie

Nach abgeschlossener Stringenzwaschung wurden die Hämozyten dreimal für jeweils 5 min bei RT mit Tween-PBS gewaschen, bevor unspezifische Bindestellen mit Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer für 60 min bei RT blockiert wurden. Im Anschluss wurden die Hämozyten über Nacht bei 4 °C mit 1 : 500 (1,5 U/mL) in Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer verdünntem AP-konjugiertem Schaf-anti-Digoxigenin Fab-Antikörper (Roche Diagnostics, Kat.-Nr.: 11

093 274 910) inkubiert. Nach der Inkubation des Primärantikörpers folgten drei Waschschritte in Tween-TBS für jeweils 15 min bei RT sowie die AP-Puffer-Inkubation durch dreimaliges Waschen der Hämocyten in AP-Puffer für jeweils 10 min bei RT. Zum Nachweis der an den Primärantikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase wurden die Hämocyten in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei RT in AP-Entwicklungslösung inkubiert und die Substrat-Umsatz-Reaktion regelmäßig mittels inverser Hellfeldmikroskopie mit einem Olympus IMT-2 kontrolliert (Kapitel 3.10.3.1). Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität der mit der Antisense-Sonde hybridisierten Hämocyten bei gleichzeitig fehlendem Signal bei den mit der Sense-Kontrollsonde hybridisierten Hämocyten wurde die Substrat-Umsatz-Reaktion der alkalischen Phosphatase durch dreimaliges Waschen mit 1x TBS für 5 min bei RT gestoppt. Im Anschluss wurden die Hämocyten zur Markierung des Zellkerns für 5 min bei RT mit DAPI (360 nmol/L) in 1x TBS inkubiert, dreimal für jeweils 5 min mit 1x TBS bei RT gewaschen und in Fluoromount-G® (SouthernBiotech, Katalog-Nr.: 0100-01) nach Herstellerangaben (<https://www.southernbiotech.com/techbul/0100-01.pdf>) eingebettet. Zur zusätzlichen Mehrfachmarkierung mit Hämocyten-spezifischen primären Antikörpern wurden die Hämocyten nach dem Abstoppen der Substrat-Umsatz-Reaktion der alkalischen Phosphatase entsprechend dem Standard-Protokoll zur Antikörpermarkierung von Hämocyten-Monolayern (Kapitel 3.9.3) weiter behandelt.

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Probenvorbereitung

Für die größenabhängige Trennung von Proteinen mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Kapitel 3.8.2) und dem anschließenden Proteintransfer mittels Western Blot (Kapitel 3.8.3) wurden Hämocyten (Kapitel 3.3.1), Hämolymp plasma (Kapitel 3.3.3) sowie Fettkörper, Labialdrüsen und das zentrale Nervensystem (Kapitel 3.3.4) von unbehandelten *M. sexta* L5d2- und L5d3-Larven sowie von Saline- und *E. coli*-injizierten L5d2-Larven 24h post Injektion (Tab. 3.15) nach Standard-Protokoll (Kapitel 3.3) präpariert und gewogen.

Tabelle 3.15: Treatmentgruppen zur Untersuchung der DSCAM-Proteinmuster in Geweben (Hämocyten, Fettkörper, Labialdrüsen, zentrales Nervensystem) und im Hämolymp plasma immunstimulierter *M. sexta* L5d2/3 Larven mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Treatmentübersicht: SDS-PAGE & WB	
Treatment	Entwicklungsstadium
Unbehandelt	L5d2
	L5d3
Saline 24h	L5d3
<i>E. coli</i> 24h	L5d3

Je Gewebetyp wurde 1 mg Gewebe in 4 μL eiskaltem Solubilisierungspuffer mit einem Pistill auf Eis homogenisiert, bevor das Gewebehomogenat dreimal für jeweils 15 s im eisgekühlten Ultraschallbad sonifiziert wurde und Zellen durch Behandlung mit Ultraschall und Solubilisierungspuffer aufgeschlossen (lysiert) wurden. Das Gewebelysat (löslicher Proteinextrakt + unlösliche Gewebereste) wurde anschließend im Verhältnis 1 : 1 mit 2x SDS-PAGE-Probenpuffer nach Laemmli (1970) zu einer finalen Probenkonzentration von 0,1 mg Gewebe/ μL Probenvolumen gemischt und zur Linearisierung der Proteine durch reduktive Spaltung von Disulfidbrückenbindungen mit β -Mercaptoethanol, Bildung negativ geladener SDS-Protein-Komplexe und Erhitzen für 5 min bei 96 °C im Heizblock denaturiert. Nach dem Aufkochen wurden die Proben auf Eis abgekühlt, zur Sedimentierung unlöslicher Gewebereste bei 20.000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

3.8.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine eines Proteingemisches (Probengewebe, Kapitel 3.8.1) wurden unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (1970) mit dem Mini-PROTEAN® II Elektrophorese-System (Bio-Rad, Katalog-Nr.: 165-2940) nach Herstellerangaben (<https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>) abhängig vom Molekulargewicht in Richtung der Anode getrennt.

3.8.2.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen (PA-Gele) wurden jeweils zwei Glasplatten (innere und äußere Platte), zwei Abstandshalter (Dicke: 0,75 mm) und eine Alignment Card nach Herstellerangaben (<https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>, Section 3) zu einem Glasplatten-Sandwich zusammengebaut, in einem Gelschlitten fixiert und in die Halterung zum Gießen von PA-Gelen eingeklemmt. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele, optimiert für die elektrophoretische Fokussierung und Trennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 50 kDa – 200 kDa und bestehend aus einem 4 % Sammelgel (Tab. 3.16) und einem

Tabelle 3.16: 5 mL-Ansatz für 2 Sammelgele mit 3,0 % – 6,5 % Volumenanteil Acrylamid/Bisacrylamid nach Herstellerangaben (Bio-Rad, <https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>).

Gelkomponenten	Sammelgel: $\varphi_{\text{Acrylamid/Bisacrylamid}}$ [%]						
	3,0 %	4,0 %	4,5 %	5,0 %	5,5 %	6,0 %	6,5 %
Reinstwasser	1,95 mL	1,78 mL	1,70 mL	1,62 mL	1,53 mL	1,45 mL	1,37 mL
Sammelgelpuffer pH 6,8	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stamm-lösung (37,5 : 1)	0,50 mL	0,67 mL	0,75 mL	0,83 mL	0,92 mL	1,00 mL	1,08 mL
TEMED	5,00 μL	5,00 μL	5,00 μL	5,00 μL	5,00 μL	5,00 μL	5,00 μL
10 % (w/v) APS	50,00 μL	40,00 μL	40,00 μL	40,00 μL	40,00 μL	40,00 μL	40,00 μL

7 % Trenngel (Tab. 3.17) wurden in Mini-Gel-Größe von 70 x 80 x 0,75 mm (Höhe x Breite x Dicke) nach Herstellerprotokoll (<https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>, Section 4) gegossen.

Tabelle 3.17: 10 mL-Ansatz für 2 Trenngele mit 6,0 % – 12,0 % Volumenanteil Acrylamid/Bisacrylamid nach Herstellerangaben (Bio-Rad, <https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>).

Gelkomponenten	Trenngel: ϕ Acrylamid/Bisacrylamid [%]						
	6,0 %	7,0 %	7,5 %	8,0 %	9,0 %	10,0 %	12,0 %
Reinstwasser	2,95 mL	2,63 mL	2,45 mL	2,30 mL	1,95 mL	1,63 mL	1,00 mL
Trenngelpuffer pH 8,8	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stamm-lösung (37,5 : 1)	2,00 mL	2,33 mL	2,50 mL	2,65 mL	3,00 mL	3,30 mL	4,00 mL
TEMED	7,50 μ L	5,00 μ L	5,00 μ L	4,00 μ L	4,00 μ L	4,00 μ L	4,00 μ L
10 % (w/v) APS	40,00 μ L	40,00 μ L	40,00 μ L	40,00 μ L	40,00 μ L	40,00 μ L	40,00 μ L

Zur Quervernetzung der Acrylamid- und Bisacrylamid-Ketten (Polymerisation) wurden die Trenngele anschließend durch Überschichtung mit Reinstwasser oder Isopropanol bzw. die Sammelgele durch Einsetzen eines Probenkamms vom Luftsauerstoff (Radikalfänger) abgeschlossen. Der Grad der Polymerisierung der PA-Gele war ausreichend, sobald eine klare Trennlinie zwischen Trenngel und überschichtetem Reinstwasser oder Isopropanol bzw. zwischen Sammelgel und Probenkamm erkennbar war (ca. 30 min).

3.8.2.2 Gelelektrophorese

Nach abgeschlossener Polymerisation der PA-Gele (Kapitel 3.8.2.1) wurde die Elektrophoresekammer nach Herstellerangaben (<https://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf>, Section 5) zusammengesetzt und die innere und äußere Kammer mit 1x Tris-Glycin-Elektrodenpuffer befüllt. Pro Tasche wurde eine Probe mit einem Probenvolumen von 10 μ L (entspricht der Proteinmenge in 1 mg Probengewebe) aufgetragen. Zur Kontrolle der elektrophoretischen Trennung von Proteinen im PA-Gel während der SDS-PAGE, Verifizierung des vollständigen Proteintransfers mittels Western Blot (Kapitel 3.8.3) und zur Berechnung des relativen Molekulargewichts mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennter, denaturierter Proteine (Kapitel 3.8.6) wurde eine Tasche des PA-Gels zusätzlich mit dem ProSieve[®] QuadColor[™] Protein Marker 4,6 kDa – 300 kDa (Lonza Rockland, Katalog-Nr.: 00193838) beladen. Die elektrophoretische Trennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte anschließend bei einer konstanten elektrischen Spannung von 50 V im Sammelgel und 100 V im Trenngel. Sobald die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Rand des Trenngels erreicht hat, wurde die Elektrophorese beendet. Die im PA-Gel entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennten Proteine wurden anschließend entweder mittels Coomassie Blau-Färbung direkt im Poly-acrylamidgel detektiert (Kapitel 3.8.2.3) oder mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 3.8.3).

3.8.2.3 Proteindetektion im PA-Gel mittels Coomassie Blau-Färbung

3.8.2.3.1 Coomassie Blau-Färbung

Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran wurden die nach erfolgtem Western Blot (Kapitel 3.8.3) im Transfergel verbliebenen Proteine mit Coomassie Brilliantblau R-250 (CBB-R250) gefärbt (Detektionsgrenze: 0,1 – 1 µg Bovines Serumalbumin, BSA). Dazu wurden Transfergele nach abgeschlossenem Proteintransfer über Nacht in Coomassie-R-250-Färbelösung unter Schütteln bei RT inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die gefärbten Gele mit Coomassie-R-250-Entfärbelösung bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes bei gleichzeitig verbleibender Bindung des Farbstoffes an Proteinbanden entfärbt. Die Abwesenheit des Großteils aller Proteinbanden bis auf einzelne verbleibende hochmolekulare Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ≥ 200 kDa galt als Indiz für einen erfolgreichen Proteintransfer. In diesem Fall wurde das betreffende Transfergel dokumentiert und verworfen. Die Anwesenheit von Proteinbanden im Bereich der Laufweite von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10 – 200 kDa galt als Indiz für einen unvollständigen Proteintransfer. In diesem Fall wurde das entsprechende Western Blot-Experiment nicht ausgewertet und Transfergel und -membran wurden verworfen.

3.8.2.3.2 Kolloidale Coomassie Blau-Färbung

Zur analytischen Detektion von Proteinen im Polyacrylamidgel wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (Kapitel 3.8.2) entsprechend des Molekulargewichtes getrennte Proteine mit Coomassie Brilliantblau G-250 (CBB-G250) im kolloidalen Zustand nach der Methode von Dyballa & Metzger (2009) gefärbt (Detektionsgrenze: 1 – 5 ng Bovines Serumalbumin, BSA). Dazu wurden Polyacrylamidgele nach abgeschlossener Elektrophorese mindestens zweimal für jeweils 10 min in Reinstwasser unter Schütteln bei RT inkubiert, um im PA-Gel enthaltenes SDS auszuwaschen. Die gewässerten Gele wurden anschließend mindestens für 2h (90 % aller Proteine nach Kang et al. (2002) gefärbt) oder über Nacht in kolloidaler Coomassie-Färbelösung unter Schütteln bei RT inkubiert (Achtung: kolloidale Coomassie-Färbelösung vor Gebrauch schütteln, um kolloidale Farbpartikel gleichmäßig zu verteilen). Am darauffolgenden Tag wurden die gefärbten Gele mit kolloidaler Coomassie-Entfärbelösung unter Schütteln bei RT bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes bei gleichzeitig verbleibender Bindung des Farbstoffes an Proteine entfärbt. Entfärbte Gele wurden abschließend zweimal für jeweils 10 min in Reinstwasser unter Schütteln bei RT inkubiert und rehydriert, bevor die Gele dokumentiert und in Zellophanfolie (Zellulosehydrat) getrocknet wurden.

3.8.3 Western Blot

Zum Transfer der in der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Kapitel 3.8.2) getrennten Proteine eines Proteingemisches (Probengewebe) auf eine hydrophobe Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran; Immobilon[®]-P Transfermembran, Merck Millipore, PVDF-Membran, Porengröße: 45 µm, Katalog-Nr.: IPVH00010) wurden Western Blots im elektrophoretischen Semi-Dry-Verfahren mit kontinuierlichem Tris-Glycin-Puffersystem nach Towbin et al. (1979), modifiziert für Proteine von 20 kDa bis ≥ 200 kDa, durchgeführt. Dazu wurde die PVDF-Transfermembran nach Herstellerangaben unter Schütteln für 15 Sekunden bei RT in 100 % Methanol aktiviert. Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden das Transfergel (70 x 80 0,75 mm) und die Transfermembran (70 x 90 mm) für 15 min bei RT in Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden Whatman[®] Filterpapier-Zuschnitte (Gel-Blotting-Papier, GB 002, Dicke: 0,4 mm, Schleicher & Schuell[®], Katalog-Nr.: 26 02 26694) in einer Größe von 72 x 92 mm und Zellophanfolie (Zellulosehydrat) für 5 min in Towbin-Transferpuffer inkubiert. Die Anode des Semi-Dry-Elektroblotters (Carl Roth, Katalog-Nr.: T788.1) wurde nach Herstellerangaben vollständig mit einer in Transferpuffer eingeweichten Lage Zellophanfolie abgedeckt, bevor je Transfergel ein Blotting-Sandwich bestehend aus 9 mit Transferpuffer durchtränkten Whatman[®] Filterpapier-Zuschnitten, der PVDF-Transfermembran, dem Transfergel und erneut 9 mit Transferpuffer durchtränkten Whatman[®] Filterpapier-Zuschnitten luftblasenfrei auf der Anode zusammengelegt wurde (Abb. 3.3).

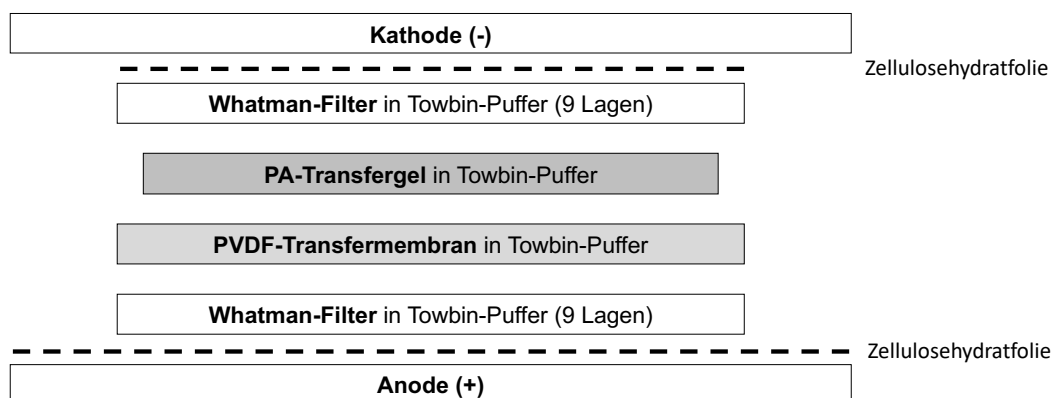


Abbildung 3.3: Aufbau eines Semi-Dry Blotting-Sandwich.

Das Blotting-Sandwich ist modifiziert für den Transfer von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa bis ≥ 200 kDa auf die Immobilon[®]-P Transfermembran (Merck Millipore) mittels Semi-Dry-Elektroblotter mit Edelstahl-Kathode und Platin-beschichteter Anode im kontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem nach Towbin et al. (1979).

Die Kontaktfläche jedes Blotting-Sandwiches mit der Kathode wurde abschließend mit einer in Transferpuffer eingeweichten Lage Zellophanfolie (80 x 100 mm) abgedeckt, bevor die im Transfergel getrennten Proteine mittels Semi-Dry Elektroblot bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Blotmembran für 2,5 h auf die PVDF-Transfermembran übertragen wurden. Zur anschließenden Immundetektion von MsDSCAM wurde die Transfermembran nach abgeschlossenem Elektroblot für

5 min in 1x TBS gewaschen und danach für 60 min in 3 % BSA in TBS blockiert, bevor die Transfermembran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Kaninchen-anti-*DmDSCAM* EC 19545, AG Schmucker, 1 : 1000 in 3 % BSA in TBS verdünnt, Kapitel 3.9.1.1, Tab 3.20) auf einem Kippschüttler inkubiert wurde. Am darauffolgenden Tag wurde die Primärantikörperlösung abgenommen, ungebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen der Transfermembran in Tween-TBS für jeweils 5 min entfernt und anschließend abgedunkelt für 60 min mit alkalische Phosphatase-gekoppeltem Sekundärantikörper (AP-konjugierter Ziegenanti-Kaninchen IgG, Carl Roth, 1 : 4000 in 3 % BSA in TBS, Kapitel 3.9.1.2, Tab 3.21) inkubiert. Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Transfermembran in Tween-TBS für jeweils 5 min entfernt, bevor die Transfermembran durch zweimaliges Waschen in AP-Puffer für jeweils 5 min präinkubiert wurde. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte anschließend durch Inkubation der Transfermembran in AP-Entwicklungslösung für 5 min unter Sicht, wobei der Substratumsatz der an den Sekundärantikörper konjugierten alkalischen Phosphatase durch den Einsatz des chromogenen Substrates 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in Kombination mit dem Farbverstärker Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) nachgewiesen wurde. Während der chromogenen Entwicklung des Western Blots im Zuge des Substratumsatzes der alkalischen Phosphatase wurde darauf geachtet eine Exposition der Transfermembran gegenüber direkter Sonneneinstrahlung zu vermeiden. Bei Erreichen des gewünschten Grades der Farbentwicklung (nach ca. 3 – 7 min) wurde die Enzymreaktion durch dreimaliges Waschen der Transfermembran in Reinstwasser für jeweils 1 min gestoppt. Überschüssiges Reinstwasser wurde mit Whatman® Filterpapier (Gel-Blotting-Papier, GB 002, Dicke: 0,4 mm, Schleicher & Schuell®, Katalog-Nr.: 26 02 2669 4) aufgesaugt und die Transfermembran für 2 h vollständig im Luftstrom eines Abzuges trocknen lassen, bevor der Western Blot dokumentiert und ausgewertet wurde. Alle Wasch- und Inkubationsschritte mit Ausnahme der Inkubation des Primärantikörpers erfolgten unter Schütteln auf einem Kippschüttler bei RT.

3.8.4 Microbial Binding Assay

Zur Detektion der *in-vitro*-Interaktion von löslichem DSCAM im Hämolymp plasma (Köder-Proteingemisch, engl. *Bait*-Proteingemisch) unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven mit unterschiedlichen Gruppen von Mikroorganismen (Beute-Organismen, engl. *Prey*-Organismen) wurden PFA-abgetötete *Staphylococcus aureus* Wood 46 exemplarisch für grampositive Bakterien, PFA-abgetötete *Escherichia coli* K12 D31-Y exemplarisch für gramnegative Bakterien und lebende Trophozitenstadien des Chloroquin-sensitiven *Plasmodium falciparum*-Stammes NF54^{attB} stellvertretend für einzellige, eukaryotische Parasiten im Rahmen eines Microbial Binding Assays *in-vitro* in Hämolymp plasma von *M. sexta* inkubiert und die Bindung von

DSCAM an die Mikroorganismen proteinbiochemisch mittels Semi-Dry Western Blot analysiert.

3.8.4.1 Vorbereitung des *Bait*-Proteingemisches

Vollhämolymphe (Hämolymp plasma + Hämozyten) unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven wurde unter Verwendung von PTU präpariert (Kapitel 3.3.3), je mg mit 0,5 μL 10x Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC) gemischt und mittels Zentrifugation von den Hämozyten getrennt. Das daraus resultierende zellfreie Hämolymp plasma einer unbehandelten L5d2-Larve in einer Massenkonzentration von 0,666 mg Hämolymp plasma/ μL Probenvolumen wurde anschließend in drei sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße zu jeweils 300 μL aliquotiert. Zur *in-vitro*-Interaktion der Hämolymp plasma-Proteine (*Bait*-Proteingemisch) mit *Prey*-Organismen wurde das Hämolymp plasma von Aliquot 3 für 1 h bzw. für 12 h mit einer definierten Anzahl *S. aureus*, *E. coli* oder *P. falciparum*-Trophozoiten auf einem Rotationsschüttler bei RT inkubiert (Tab. 3.18). Das Hämolymp plasma von Aliquot 2 wurde als dazugehörige Leerkontrolle ohne *Prey*-Organismen für dieselbe Zeit auf demselben Rotationsschüttler bei RT inkubiert, während Aliquot 1 zur Proteolyse-Kontrolle während der Inkubation der Hämolymp plasma-Aliquots 2 und 3 bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde (Tab. 3.18).

Tabelle 3.18: Aliquots einer Hämolymp plasma-Probe (*Bait*-Proteingemisch) einer unbehandelten *M. sexta* L5d2-Larve mit Zuweisung von Kontroll- und Experimentaltreatment beim Microbial Binding Assay

Aliquot-Nr.	Treatment	Inkubation mit <i>Prey</i> -Organismus	Erläuterung
1	Kontrolle 1: Proteolyse-Kontrolle	Nein	Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ während der Inkubation von Aliquot 2 & 3 auf dem Rotationsschüttler
2	Kontrolle 2: Leerkontrolle	Nein	Inkubation ohne <i>Prey</i> -Organismus auf einem Rotationsschüttler bei RT
3	<i>Prey</i> -Organismus-Inkubation	Ja	Inkubation mit <i>Prey</i> -Organismus auf einem Rotationsschüttler bei RT

3.8.4.2 Vorbereitung der *Prey*-Organismen

Tabelle 3.19: Totalzellzahl der *Prey*-Organismen zur Inkubation in 300 μL *Bait*-Proteingemisch.

<i>Prey</i> -Organismus	Mikroorganismen-Gruppe	Größe [μm]	Zellzahl pro 300 μL <i>Bait</i> -Protein	Treatment
<i>S. aureus</i> Wood 46	Bakterium, grampositiv	$\varnothing = 0,8 - 1,2\ \mu\text{m}$	$2 \cdot 10^9$	<i>S. aureus</i>
<i>E. coli</i> K12 D31-Y	Bakterium, gramnegativ	$\varnothing = 1,1 - 1,5\ \mu\text{m}$ L = $2,0 - 6,0\ \mu\text{m}$	$1 \cdot 10^9$	<i>E. coli</i>
<i>P. falciparum</i> NF54 ^{attB} Trophozoiten	einzelliger, eukaryotischer Parasit	$\varnothing = 2,0 - 5,0\ \mu\text{m}$ D = $1,0 - 2,0\ \mu\text{m}$	$2,5 \cdot 10^7$	<i>P. falciparum</i>
Erythrozyten	Humane Erythrozyten, A Rh+/0 Rh+	$\varnothing \sim 7,5\ \mu\text{m}$ D = $1,0 - 2,0\ \mu\text{m}$	$1,25 \cdot 10^7$	Kontrolle 1: Plasmodien-Kontrolle
Glas-Beads (Sigma-Aldrich®, Kat.-Nr.: G-3753)	Borosilikatglas-kügelchen	$\varnothing = 75 - 150\ \mu\text{m}$	$1,25 \cdot 10^6$	Kontrolle 2: Leerkontrolle

Abhängig vom Größenverhältnis von *S. aureus*, *E. coli* und *P. falciparum* Trophozoiten zueinander wurden die Zellzahlen der drei *Prey*-Organismen sowie der Kontrollen mit humanen Erythrozyten und Glas-Beads mit dem Ziel vergleichbarer gegenüber dem *Bait*-Proteingemisch (Hämolymp plasma) exponierter Zelloberflächen eingestellt (Tab. 3.19).

3.8.4.2.1 *S. aureus* Wood 46

S. aureus Stamm Wood 46 (Katalog-Nr.: S-2014) wurde als Formalin-fixierte Zellsuspension in Kaliumphosphat-Puffer von Sigma-Aldrich® bezogen. Ein Aliquot von 2,5 mL der Bakterien-suspension wurde in ein steriles 15 mL Reaktionsgefäß überführt, dreimal für jeweils 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit 5 mL frischer, steril filtrierter MS⁻ gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Bakterien erneut zentrifugiert, durch Zugabe von frischer, steril filtrierter MS⁻ auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^{10}$ Bakterien/mL MS⁻ (Stammsuspension) eingestellt und bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung der Inkubation der Bakterien in *Bait*-Proteingemisch wurde ausgehend von der Stammsuspension eine Total-zellzahl von $2 \cdot 10^9$ Bakterien in 1 mL MS⁻ in konische, sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße vorgelegt (Tab. 3.19) und bis zur Inkubation bei 4 °C gelagert.

3.8.4.2.2 *E. coli* K12 D31-Y

E. coli K12 D31-Y wurde in Flüssigübernacht kulturen kultiviert (Kapitel 3.4.1). Bei ausreichender Bakteriendichte wurde die Bakterien-suspension für 10 min bei 1500 x g und 21 °C zentrifugiert, das Medium vollständig abgenommen und die Bakterien mit 3,5 % Paraformaldehyd in steril filtrierter MS⁻ für 45 min auf einem Rotationsschüttler bei RT und 225 U/min abgetötet. Anschließend wurden die Bakterien dreimal für jeweils 10 min bei 1500 x g und 21 °C zentrifugiert und mit 5 mL frischer, steril filtrierter MS⁻ gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Bakterien erneut zentrifugiert, durch Zugabe von frischer, steril filtrierter MS⁻ auf eine Zellzahl von 2×10^{10} Bakterien/mL MS⁻ (Stammsuspension) eingestellt und bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung der Inkubation der Bakterien in *Bait*-Proteingemisch wurde ausgehend von der Stammsuspension eine Totalzellzahl von $1 \cdot 10^9$ Bakterien in 1 mL MS⁻ in konische, sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße vorgelegt (Tab. 3.19) und bis zur Inkubation bei 4 °C gelagert.

3.8.4.2.3 *P. falciparum* NF54^{attB} Trophozoiten

Erythrozytäre, asexuelle Entwicklungsstadien des Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stammes NF54^{attB} wurden *in-vitro* kultiviert (Kapitel 3.5.2.1) und synchronisiert (Kapitel 3.5.2.2). Ausgehend vom Zeitpunkt der Sorbitol-Synchronisation wurde die Parasitenkultur 48 h, 96 h oder 144 h bis zu einer Parasitämie von $\geq 5\%$ kultiviert, bevor die Plasmodien im Trophozoiten-Stadium durch Permeabilisierung der Erythrozyten mittels Saponin-Lyse zur Inkubation

in *Bait*-Proteingemisch nach der Methode von Sturm et al. (2009) präpariert wurden. Dazu wurden die Parasitenkulturen aus vier 25 cm² Zellkulturflaschen in einem sterilen 15 mL Reaktionsgefäß vereint, für 10 min bei 600 x g und 21 °C zentrifugiert und der klare Überstand des Plasmodien-Zellkulturmediums abgenommen. Zur Membranpermeabilisierung und Lyse der Erythrozyten wurde das Erythrozytenpellet anschließend in 10 mL steril filtriertem Saponin-Lysepuffer resuspendiert und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, bevor die intakten Parasiten für 10 min bei 600 x g und 21 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand (Zytosol lysierter Erythrozyten) wurde abgenommen, das Parasitenpellet erneut in 5 mL sterilem Saponin-Lysepuffer resuspendiert und die Saponin-Lyse noch ein- bis zweimal wiederholt bis alle Erythrozyten lysiert wurden. Nach abgeschlossener Saponin-Lyse wurden die lebenden Trophozoiten-Stadien dreimal für jeweils 10 min bei 600 x g und 21 °C zentrifugiert und mit steril filtriertem 1x P-PBS + cOmplete™, Mini-Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics, Katalog-Nr.: 04 693 124 001) gewaschen, bevor die Plasmodien in einer Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Parasiten/mL in sterilem 1x P-PBS (Stammsuspension) resuspendiert wurden. Zur Vorbereitung der Inkubation der Trophozoiten in *Bait*-Proteingemisch wurde ausgehend von der Stammsuspension eine Totalzellzahl von $2,5 \cdot 10^7$ Parasiten in 1 mL steriler 1x P-PBS in konische, sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße vorgelegt (Tab. 3.19) und bis zur Hämolymplassma-Inkubation im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C gelagert.

3.8.4.2.4 Humane Erythrozyten

Erythrozyten wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nach der Methode von Bøyum (1968) aus humanem, antikoaguliertem und stabilisiertem Vollblut-Konzentrat (Buffy-Coat) der Blutgruppen A Rh+ und 0 Rh+, bezogen von der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Prof. Dr. Bein, Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM Gießen), isoliert (Kapitel 3.4.5). Gewaschene Erythrozyten wurden in einer Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen/mL in steriler 1x HBSS (Stammsuspension) resuspendiert. Zur Vorbereitung der Inkubation der Erythrozyten in *Bait*-Proteingemisch wurde ausgehend von der Stammsuspension eine Totalzellzahl von $1,25 \cdot 10^7$ Zellen in 1 mL steriler 1x HBSS in konische, sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße vorgelegt (Tab. 3.19) und bis zur Hämolymplassma-Inkubation im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C gelagert.

3.8.4.2.5 Glas Beads

Glas-Beads aus Borosilikatglas mit einem Durchmesser von 75 – 150 µm (Sigma-Aldrich®, Katalog-Nr.: G-3753) wurden in einer Partikelzahl von $1 \cdot 10^7$ Kügelchen in steriler 1x MS⁻ resuspendiert (Stammsuspension) und mehrfach gewaschen. Zur Vorbereitung der Inkubation der Glas-Beads in *Bait*-Proteingemisch wurde ausgehend von der Stammsuspension eine Totalpartikelzahl von $1,25 \cdot 10^6$ Kügelchen in 1 mL steriler 1x MS⁻ in konische, sterile 1,5 mL

Reaktionsgefäße vorgelegt (Tab. 3.19) und bis zur Hämolympfplasma-Inkubation bei RT gelagert.

3.8.4.3 Prey-Organismus-Inkubation in Bait-Proteingemisch

Vorbereitete Inkubations-Suspensionen (Kapitel 3.8.4.2) mit einer definierten Zellzahl an *Prey*-Organismen (*S. aureus*, *E. coli* und *P. falciparum* Trophozoiten) wurden zur Pelletierung der Mikroorganismen für 5 min bei 500 x g und 21 °C zentrifugiert. Der Pufferüberstand wurde anschließend vollständig abgenommen, bevor die *Prey*-Organismen im vorbereiteten *Bait*-Proteingemisch (Hämolympfplasma-Aliquot Nr. 3, Kap. 3.8.4.1, Tab. 3.18) resuspendiert und für 1 h bzw. für 12 h auf einem Rotationsschüttler bei RT im Hämolympfplasma inkubiert wurden. Zur Kontrolle genereller Bindungseffekte von DSCAM an Oberflächenstrukturen (un-abhängig von organischer oder anorganischer Beschaffenheit) wurden Glas-Beads in *Bait*-Proteingemisch unter gleichen Bedingungen wie die *Prey*-Organismen inkubiert (Leerkontrolle). Zusätzlich wurden humane Erythrozyten, zur Kontrolle falsch positiver Ergebnisse bei der anschließenden proteinbiochemischen Analyse der Trophozoiten nach Inkubation in *Bait*-Proteingemisch, unter den gleichen Bedingungen wie *P. falciparum* im Hämolympfplasma inkubiert (Plasmodien-Kontrolle). Hintergrund der Plasmodien-Kontrolle sind potentielle Bindungen von DSCAM an Membranrückstände von Erythrozyten, die infolge der Präparation der Plasmodien durch Saponin-Lyse der Erythrozyten im Parasitenpellet verbleiben und nach gemeinsamer Inkubation mit den Plasmodien im *Bait*-Proteingemisch zu einem falsch positiven Ergebnis führen könnten. Nach abgeschlossener Inkubation der *Prey*-Organismen und Kontrollen in *Bait*-Proteingemisch wurden die Mikroorganismen bzw. Partikel für 5 min bei 500 x g und 21 °C zentrifugiert, bevor der Hämolympfplasmaüberstand abgenommen und zurück in Aliquot-Reaktionsgefäß Nr. 3 überführt wurde. Die Mikroorganismen bzw. Partikel wurden in hypertonischer 1x TBS resuspendiert, gewaschen und anschließend für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Pufferüberstand abgenommen und verworfen und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt.

3.8.4.4 Western Blot-Analyse

Nach Inkubation der *Prey*-Organismen und Kontrollen in *Bait*-Proteingemisch wurden die gewaschenen Mikroorganismen und Partikel (Kapitel 3.8.4.3) sowie das Hämolympfplasma (Aliquot-Nr. 1 – 3) zur elektrophoretischen Proteintrennung mittels denaturierender SDS-PAGE vorbereitet (Kapitel 3.8.1). Dazu wurden die *Prey*-Organismen und Kontrollen nach dem dritten Waschgang mit hypertonischer 1x TBS für 5 min bei 500 x g zur Pelletierung zentrifugiert, bevor der Pufferüberstand vollständig abgenommen und verworfen wurde und die Mikroorganismen und Kontrollen pauschal in 25 µL Solubilisierungspuffer homogenisiert und mittels Ultraschallbehandlung lysiert wurden. Anschließend wurden sowohl die *Prey*-Organismen und

Kontrollen als auch die entsprechenden drei Hämolymp plasma-Aliquots 1 : 1 mit 2x SDS-PAGE-Probenpuffer nach Laemmli (1970) gemischt (1 μ L SDS-PAGE Pro-benpuffer je 1 μ L Probenvolumen), bevor alle Proben für 5 min im Heizblock bei 96 °C erhitzt wurden. Daraus ergibt sich für die Hämolymp plasma-proben eine finale Massenkonzentra-tion von 0,333 mg Hämolymp plasma/ μ L Probenvolumen. Die anschließende proteinbioche-mische Analyse aller Proben mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (Kapitel 3.8.2) und Wes-tern Blot (Kapitel 3.8.3) wurde durchgeführt wie zuvor beschrieben.

3.8.5 Far-Western Blot

Zur Analyse von *in vitro*-Protein-Protein-Interaktionen von löslichem DSCAM im Hämolymp plasma unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven (*Prey*-Proteingemisch) mit Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl. Abk. PAMPs) von *P. falciparum* Trophozoiten (*Bait*-Protein-gemisch) wurden Far-Western Blot-Experimente nach der Methode von Wu et al. (2007) durchgeführt.

3.8.6 Ermittlung der relativen molekularen Masse unbekannter Proteine

Die relative molekulare Masse unbekannter Proteine wurde in Relation zu Protein-Standards nach der Methode von Hames (1998) ermittelt. Dazu wurden Proteinproben gemeinsam mit Proteinen mit standardisierter molekularer Masse (Protein-Standards) mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt (Kapitel 3.8.2) und mittels Semi-Dry-Elektroblot auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 3.8.3). Nach abgeschlossenem Western Blot wurde die Migra-tionsdistanz der Bromphenolblau-Lauffront sowie jeder Standard-Proteinbande ausgehend vom Trenngeleingang gemessen. Mit den Werten der Migrationsdistanz in Millimeter wurde für jede Standard-Proteinbande die relative Migrationsdistanz (R_f) als Quotient der Migra-tionsdistanz der Proteinbande und der Lauffront berechnet (Formel 6).

Formel 6: Berechnung der relativen Migrationsdistanz (R_f) einer Proteinbande.

$$R_f = \frac{\text{Migrationsdistanz der Proteinbande [mm]}}{\text{Migrationsdistanz der Bromphenolblau-Lauffront [mm]}}$$

Anschließend wurde der Logarithmus der molekularen Masse ($\log m$) aller Protein-Standards als Funktion der relativen Migrationsdistanz der entsprechenden Standard-Proteinbande mit Microsoft® Excel Version 16.45 grafisch dargestellt. Mit der daraus resultierenden linearen Funktionsgleichung vom Typ $y = m \cdot x + b$ wurde durch Einsetzen der fehlenden Variable x (R_f -Wert unbekannter Proteine) der Logarithmus der relativen molekularen Masse ($\log M_R$) un-bekannter Proteine ermittelt, die im selben Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt wur-den (Formel 7).

Formel 7: Berechnung des Logarithmus der relativen molekularen Masse ($\log M_R$) unbekannter Proteine.

$$y = m \cdot x + b$$

$$\log M_R = \text{Steigung} \cdot R_f + y\text{-Achsenabschnitt}$$

Der Zusammenhang zwischen abhängiger ($\log m$) und unabhängiger Variable (R_f) ist dabei umso reliabler durch eine lineare Funktion beschreibbar, je näher der Wert des Bestimmtheitsmaßes (r^2) einem Wert von 1,0 ist. Mittels Exponentialfunktion wurde anschließend die relative molekulare Masse (M_R) unbekannter Proteine als dimensionsloser Zahlenwert ermittelt (Formel 8).

Formel 8: Berechnung der relativen molekularen Masse (M_R) unbekannter Proteine.

$$M_R = 10^{\log M_R}$$

Voraussetzung für die exakte Ermittlung der relativen molekularen Masse unbekannter Proteine ist ein starker linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molekularen Masse der Protein-Standards und der relativen Migrationsdistanz der entsprechenden Standard-Proteinbanden ($0,99 \leq r^2 \leq 1,0$). Bedingt durch die Verwendung vorgefärbter Protein-Standards, die verglichen mit gleichen ungefärbten Protein-Standards aufgrund kovalent gebundener Farbstoffe eine unterschiedliche molekulare Masse haben, und aufgrund von Messungenauigkeiten kann das Bestimmtheitsmaß vom Wert eines idealen linearen Zusammenhangs abweichen. Zusätzlich können sich Proteine hinsichtlich der Proteinstruktur, posttranslationalen Modifikationen (Glykosylierung, Lipidierung, Phosphorylierung) und der Aminosäure-Zusammensetzung (positiv/negativ geladene Aminosäuren) unterscheiden, wodurch die Migration in der SDS-PAGE und damit auch die detektierbare molekulare Masse beeinflusst wird. In der Summe kann sich die mittels SDS-PAGE ermittelte relative molekulare Masse eines Proteins um bis zu $\pm 10\%$ von der absoluten molekularen Masse unterscheiden (Hames 1998). Daher ist die relative molekulare Masse eines Proteins als Schätzwert anzusehen. Zur Steigerung der Reliabilität wurden die Einzelwerte der relativen molekularen Masse gleicher Proteine eines Probenotyps unterschiedlicher Tiere (biologischer Replikate), die im selben Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt wurden, zu einem Mittelwert berechnet.

3.9 Zyto- und histochemische Methoden

3.9.1 Verwendete Antikörper

Als primäre Antikörper wurden monoklonale Antikörper (mAk, engl. Abk. mAb) in zellfreiem Medienüberstand kultivierter Hybridoma-Zellkulturen (Kapitel 3.4.4), polyklonale Immunsereen oder affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper verwendet (Tab. 3.20). Als Sekundärantikörper wurden mit Fluorochromen oder Enzymen konjugierte Antikörper verwendet (Tab. 3.21). Verdünnungen für immunzytochemische (immuncytochemische, Abk. ICC) und immunhistochemische (IHC) Anwendungen wurden standardmäßig mit 5 % Ziegen Serum-3 % BSA in TBS (Superblock, Abk. SB) angesetzt. Bei Mehrfachmarkierungen wurden Primärantikörper unterschiedlicher Wirtsspezies gleichzeitig aufgetragen und entsprechend der angegebenen Zeiten für Einfachmarkierungen inkubiert, bevor die Sekundärantikörper ebenfalls gleichzeitig aufgetragen und entsprechend der Standardzeiten für Einfachmarkierungen inkubiert wurden.

3.9.1.1 Primäre Antikörper

Bei der Markierung von Antigenen außerhalb der publizierten Antikörperspezifität wurden die für den jeweiligen Primärantikörper spezifischen Antigene in Form biologischer Proben (Zellen oder Gewebe) bei jeder Immunmarkierung als Positivkontrolle parallel mitmarkiert.

Tabelle 3.20: Primäre Antikörper. 1) Bezeichnung des Primärantikörpers: *Laborinterne Bezeichnung, †Bezeichnung mit Bezug auf das gebundene Antigen, 2) Reaktivität des Primärantikörpers gegen Antigene einer Zielspezies (Spezies-Reaktivität) / spezifisches Antigen des Primärantikörpers (Antikörperspezifität) / Antikörperbindungsstelle (Epitop) eines Antigens / markierte subzelluläre Struktur (Markierungscharakteristik), 3) Spezies, die zur Herstellung des Primärantikörpers immunisiert wurde (Wirtsspezies), 4) Abstammung von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten-Klonen (Klonalität), 5) Isotyp, Subtyp oder Fragment des Immunglobulins, 6) Hersteller des Primärantikörpers bzw. Referenzpublikation, 7) eingesetzte Arbeitsverdünnung in der Immunzytochemie (ICC), Immunhistochemie (IHC), *in-situ*-Hybridisierung (ISH) oder beim Western Blot (WB).

Primärantikörper ¹	Spezies-Reaktivität/ Spezifität (Antigen)/ Epitop/ Charakteristik ²	Wirtsspezies ³	Klonalität ⁴	Ig-Isotyp/ Ig-Subtyp/ Ig-Fragment ⁵	Hersteller/ Referenz ⁶	Arbeits-Verdünnung ⁷
mAb MS2*	<i>M. sexta</i> / Granuläre Zellen, Oenozytoide/ unbekannt/ Zellmembran	Maus	monoklonal	IgG1	Willot et al. 1994, Beetz et al. 2004	ICC: unverdünnter Hybridoma-Überstand
mAb MS7*	<i>M. sexta</i> / Granuläre Zellen/ unbekannt/ Granulen	Maus	monoklonal	IgG1	Willot et al. 1994	ICC: unverdünnter Hybridoma-Überstand
mAb MS13*	<i>M. sexta</i> / Plasmatozyten/ β-Integrin/ Zellmembran	Maus	monoklonal	IgG2b	Willot et al. 1994, Wiegand et al. 2000, Levin et al. 2005, Beetz et al. 2004	ICC: unverdünnter Hybridoma-Überstand
mAb MS73*	<i>M. sexta</i> / -	Maus	monoklonal	-		ICC: unverdünnter

	Oenozytoide, Granuläre Zellen/ unbekannt/ Zellmembran und Granulen					Hybridoma- Überstand
mAb MS75*	<i>M. sexta</i> / Plasmatozyten/ unbekannt/ Zellmembran	Maus	monoklonal	IgG1	Willot et al. 1994, Beetz et al. 2004	ICC: unver- dünnter Hyb- ridoma-Über- stand
mAb MS77*	<i>M. sexta</i> / Plasmatozyten/ unbekannt/ Zellmembran	Maus	monoklonal	IgM	Willot et al. 1994, Beetz et al. 2004	ICC: unver- dünnter Hyb- ridoma-Über- stand
mAb NG3B11*	<i>M. sexta</i> / Neuroglian	Maus	monoklonal	IgG1	Nardi 1993	ICC: unver- dünnter Hyb- ridoma-Über- stand
mAb 1D4*/ anti-Fasciclin II†	<i>D. melanogas- ter</i> / ZNS & PNS, Fasciclin II	Maus	monoklonal	IgG1	Hummel et al. 2000	ICC: unver- dünnter Hyb- ridoma-Über- stand
anti-Dscam IC† (357*)	<i>D. melanogas- ter</i> / Dscam1/ Intrazellular-do- mäne	Kaninchen	polyklonal	Immunsereum	Schmucker Lab Dascenco et al. 2015	ICC: 1 : 100 IHC: 1 : 100 WB: 1 : 1000
anti-Dscam IC† (358*)	<i>D. melanogas- ter</i> / Dscam1/ Intrazellular-do- mäne	Kaninchen	polyklonal	Immunsereum	Schmucker Lab Dascenco et al. 2015	ICC: 1 : 100 IHC: 1 : 100 WB: 1 : 1000
anti-Dscam EC† (19545*)	<i>D. melanogas- ter</i> / Dscam1/ Ig 1 – 4	Kaninchen	polyklonal	Immunsereum	Schmucker Lab Dascenco et al. 2015	ICC: 1 : 100 IHC: 1 : 100 WB: 1 : 1000
anti-Dscam EC† (19546*)	<i>D. melanogas- ter</i> / Dscam1/ Ig 1 – 4	Kaninchen	polyklonal	Immunsereum	Schmucker Lab Dascenco et al. 2015	ICC: 1 : 100 IHC: 1 : 100 WB: 1 : 1000
anti-proPO	<i>M. sexta</i> / Prophenol-oxi- dase (proPO), Oenozytoide/ proPO/ Cytoplasma	Kaninchen	polyklonal	Immunsereum	Jiang et al. 1997	ICC: 1 : 1000 IHC: 1 : 1000
anti-Digoxi- genin-AP†	Digoxigenin	Schaf	polyklonal	IgG/ Fab-Frag- mente	Roche Diagnos- tics, Kat.-Nr.: 11 093 274 910	ISH: 1 : 500

3.9.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.21: Sekundäre Antikörper. 1) Bezeichnung des Sekundärantikörpers, 2) Reaktivität des Sekundärantikörpers gegen Antigene (Antikörper, sog. Primärantikörper) einer Zielspezies (Spezies-Reaktivität) / spezifisches Antigen des Sekundärantikörpers (Antikörperspezifität), 3) Spezies, die zur Herstellung des Sekundärantikörpers immunisiert wurde (Wirtsspezies) / Ig-Isotyp des Sekundärantikörpers, 4) Abstammung von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten-Klonen (Klonalität), 5) Konjugation des Sekundärantikörpers mit einem Enzym oder Fluorochrom (Konjugat-Typ) / konjugiertes Enzym oder Fluorochrom, 6) Hersteller des Sekundärantikörpers / Katalog-Nummer des Herstellers bzw. des Vertriebsunternehmens, 7) Konzentration des Sekundärantikörpers in unverdünnter Stammlösung / eingesetzte Arbeitsverdünnung in der Immunzytochemie (ICC), Immunhistochemie (IHC) oder beim Western Blot (WB).

Sekundärantikörper ¹	Spezies-Reaktivität/ Spezifität (Antigen) ²	Wirtsspezies/ Ig-Isotyp ³	Klonalität ⁴	Konjugat-Typ/ Konjugation ⁵	Hersteller/ Kat.-Nr. ⁶	Antikörper-Konz./ Arbeits-Verdünnung ⁷
anti-Mouse Alexa Fluor® 488	Maus/ IgG (H&L)	Ziege/ IgG	polyklonal	Fluorochrom/ Alexa Fluor® 488	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific/ A-11001	2,0 mg/mL/ ICC: 1 : 1000 IHC: 1 : 800
anti-Mouse Alexa Fluor® 532	Maus/ IgG (H&L)	Ziege/ IgG	polyklonal	Fluorochrom/ Alexa Fluor® 532	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific/ A-11002	2,0 mg/mL/ ICC: 1 : 1000 IHC: 1 : 800
anti-Mouse Cy3-Affini- Pure	Maus/ IgG & IgM (H&L)	Ziege/ IgG	polyklonal	Fluorochrom/ Cy3	Jackson Immu- noResearch/ 115-165-044	1,5 mg/mL/ ICC: 1 : 600 IHC: 1 : 200
anti-Mouse Cy5-Affini- Pure	Maus/ IgG (H&L)	Ziege/ IgG	polyklonal	Fluorochrom/ Cy5	Jackson Immu- noResearch/ 115-175-146	1,5 mg/mL/ ICC: 1 : 100 IHC: 1 : 80
anti-Mouse AP	Maus/ IgG (H&L)	Ziege/ IgG	polyklonal	Enzym/ alkalische Phosphatase	abcam/ ab97020	1 mg/mL WB: 1 : 5000
anti-Rabbit DyLight® 549	Kaninchen/ IgG (H&L)	Ziege/ IgG	polyklonal	Fluorochrom/ DyLight® 549	Thermo Fisher Scientific/ DI-1549-1.5	1,5 mg/mL/ ICC: 1 : 2500 IHC: 1 : 2000
anti-Rabbit AP	Kaninchen/ IgG	Ziege/ IgG	polyklonal	Enzym/ alkalische Phosphatase	Carl Roth/ 4751.1	1 mg/mL WB: 1 : 5000

3.9.2 Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von *whole-mount* Embryonen

Zur Validierung der Spezifität der polyklonalen anti-DSCAM-Immunsereen (Kapitel 3.9.1.1, Tab. 3.20) wurden Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierungen von *D. melanogaster* (Kapitel 3.9.2.1) und *M. sexta whole-mount* Embryonen (Kapitel 3.9.2.2) durchgeführt und lichtmikroskopisch mittels Differential-Interferenzkontrastmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie auf die spezifische Markierung der embryonalen Konnektive und Kommissuren des zentralen Nervensystems analysiert (Schmucker et al. 2000).

3.9.2.1 Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von *D. melanogaster* Embryonen

Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierungen von *D. melanogaster whole-mount* Embryonen wurden mit beginnender Differenzierung des zentralen Nervensystems im Zuge der axonalen Faszikulierung und Entwicklung von Konnektiven und Kommissuren (Hartenstein & Campos-Ortega 1984, Hartenstein et al. 1987) an Embryonen der Entwicklungsstadien 13 – 17 (Cam-

pos-Ortega & Hartenstein 1997) unter Verwendung der anti-Dscam-Immunsereen (Kapitel 3.9.1.1, Tab. 3.20) und Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper (Kapitel 3.9.1.2, Tab. 3.21) wie von Schmucker et al. (1992) beschrieben durchgeführt.

3.9.2.2 Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von *M. sexta* Embryonen

Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierungen von *M. sexta whole-mount* Embryonen wurden mit beginnender Neurogenese an Embryonen mit einer abgeschlossenen Entwicklungszeit von 25 – 65 % der maximalen Entwicklungszeit unter Verwendung der anti-Dscam-Immunsereen (Kap. 3.9.1.1, Tab. 3.20) und Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper (Kap. 3.9.1.2, Tab. 3.21) wie von von Bredow et al. (2020) beschrieben durchgeführt.

3.9.3 **Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von Hämocyten-Monolayern**

Zur immunzytochemischen Identifizierung larvaler Hämocyten (Plasmatozyten, Granuläre Zellen, Oenocytoide und Sphärule Zellen; von Bredow et al. 2021) und Detektion larvaler Hämocytenantigene wurden Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierungen mittels antigenspezifischer Primärantikörper unterschiedlicher Wirtsspezies und Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper (indirekte Immunfluoreszenz) durchgeführt. Dazu wurden fixierte und eingefrorene Hämocyten nach Entnahme von Hämocyten-Monolayern aus der Lagerung bei -20 °C (Kapitel 3.3.2) zweimal für jeweils 5 min in 1x TBS aufgetaut und gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membran wurden die Hämocyten danach optional für (max.) 5 min in Triton-TBS (0,1 % Triton™ X-100 in 1x TBS) inkubiert und drei- bis viermal für jeweils 5 min mit 1x TBS gewaschen bis die Oberflächenspannung wiederhergestellt wurde. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Hämocyten anschließend für 60 min in Superblock (5 % Ziegen Serum-3 % BSA in TBS) bei RT inkubiert, bevor die Hämocyten über Nacht in 20 µL Primärantikörperlösung (Primärantikörper verdünnt in Superblock, bei Mehrfachmarkierung: Primärantikörper unterschiedlicher Wirtsspezies, Kapitel 3.9.1.1, Tab. 3.20) je Kammer bei 4 °C inkubiert wurden. Ungebundener Primärantikörper wurde am darauffolgenden Tag durch viermaliges Waschen der Hämocyten mit 1x TBS für jeweils 5 min ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers, indem die Hämocyten für 60 min in 20 µL Sekundärantikörperlösung (Sekundärantikörper verdünnt in Superblock, bei Mehrfachmarkierung: unterschiedliche Fluorochrom-Konjugate, Kap. 3.9.1.2, Tab. 3.21) abgedunkelt bei RT inkubiert wurden. Ungebundener Sekundärantikörper wurde danach erneut durch viermaliges Waschen der Hämocyten mit 1x TBS für jeweils 5 min ausgewaschen, bevor die Hämocyten zur Markierung der Zellkerne für 5 min in Kernfärbelösung ($\beta_{\text{Gebrauchslösung}}$: 1 µg DAPI/mL 1x TBS) inkubiert wurden. Nach drei weiteren Waschgängen mit 1x TBS und zwei weiteren Waschgängen mit Reinstwasser für jeweils 5 min wurden die Hämocyten in Fluoromount-G® (SouthernBiotech, Katalog-Nr.: 0100-01) nach

Herstellerangaben (<https://www.southernbiotech.com/techbul/0100-01.pdf>) eingebettet. Vor der lichtmikroskopischen Analyse der Monolayer mittels Differential-Interferenzkontrastmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.10) wurde das Einbettmedium über Nacht bei RT aushärten lassen. Mit Ausnahme der Primärantikörperinkubation wurden alle Arbeitsschritte der Antikörpermarkierung bei RT durchgeführt. Zur Verhinderung der Austrocknung der Hämozyten während der Antikörpermarkierung wurden alle Arbeitsschritte an den Hämozyten-Monolayern in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer mit Deckel unter Verwendung einer Vakuumpumpe durchgeführt. Wenn nicht explizit festgelegt entsprach das Arbeitsvolumen bei allen Arbeitsschritten einem Tropfen einer Pasteurpipette.

3.9.4 Oenozytoid-Markierung mittels Nachweis endogener Phenoloxidasen an Hämozyten-Monolayern

Zur enzymzytochemischen Identifizierung larvaler Oenozytoide wurde endogene Tyrosinase-Typ-Phenoloxidase (PO) in Hämozyten unbehandelter *M. sexta* L5d3-Larven mit dem chromogenen Substrat Diaminobenzidin (DAB) unter Verwendung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Quelle molekularen Sauerstoffs (O_2) und des Peroxidase-Inhibitors Natriumazid (NaN_3 ; Ortiz de Montellano et al. 1988, Zollner 1999) nachgewiesen. Aufgrund der Fähigkeit zur Dehydrierung einer Vielzahl organischer Substrate auf Basis aromatischer Kohlenwasserstoffe mit Amino- oder Hydroxygruppen in *ortho*-Position kann Tyrosinase-Typ-PO unter oxidischen Bedingungen potentiell die Oxidation von DAB anstelle von *ortho*-Diphenolen (L-DOPA, Dopamin und 5,6-Dihydroxyindol) katalysieren (Renwranz et al. 1996, Haavik & Toska 1998). Infolgedessen polymerisiert das oxidierte DAB-Kation zum in wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlöslichen, braunen Indamin-Polymer, wodurch Hämozyten mit endogenen PO (Oenozytoide) selektiv chromogen gefärbt wurden (Hormozi Jangi et al. 2020, von Bredow et al. 2021). Dazu wurden Hämozyten von unbehandelten *M. sexta* L5d3-Larven präpariert (Kapitel 3.3.1) und als Hämozyten-Monolayer auf Mehrkammer-Objektträgern aufgetragen (Kapitel 3.3.2), bevor die endogene Prophenoloxidase (proPO) der Oenozytoide aktiviert und mittels DAB nachgewiesen wurde. Dementsprechend wurden gespreitete und adhärenente Hämozyten nach einer Absitzzeit von 45 – 60 min auf Mehrkammer-Objektträgern für 4 min in 100 % Aceton bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um das endogene Zymogen (inaktive Enzymvorstufe) proPO in den Oenozytoiden in die aktive Form PO zu überführen (von Bredow et al. 2021). Anschließend wurden die Hämozyten dreimal für jeweils 10 min mit PP-Puffer (Tris: 50 mmol/L, pH 7,5) gewaschen, bevor die in Tris-Puffer präinkubierten Hämozyten zum Nachweis endogener PO unter Sicht (Kapitel 3.10.3.1) in PP-Entwicklungspuffer (Tris: 50 mmol/L, DAB: 2,33 mmol/L, H_2O_2 : 8,91 mmol/L, NaN_3 : 50 mmol/L, pH 7,5; Tab. 3.22) inkubiert wurden. Zur vollständigen Inhibition sowohl von Peroxidasen als auch von Phenoloxidasen wurde in der Negativkontrolle zusätzlich Phenylthioharnstoff (PTU), der spezifische Inhibitor kupfer-

haltiger Phenoloxidasen, zugegeben (Ryazanova et al. 2012, Tab. 3.22), was zur vollständigen Inhibition endogener Tyrosinase-Typ-PO führt (Zufelato et al. 2004). Sobald die zytoplasmatische Braunfärbung der Oenozytoide im Zuge der Phenoloxidase-katalysierten Oxidation und Polymerisierung des chromogenen Substrates DAB ohne Verlust der Zellmorphologie deutlich sichtbar war, wurde die Enzymreaktion durch dreimaliges Waschen der Hämocyten mit 1x TBS für jeweils 5 min gestoppt. Nach abgeschlossenem Phenoloxidase-nachweis wurden die Hämocyten durch Inkubation in 3,5 % PFA-MS⁻ für 5 min fixiert und zweimal für jeweils 10 min mit 1x TBS gewaschen, bevor die Hämocyten-Monolayer bis zur Antikörpermarkierung bei -20 °C halbfeucht eingefroren und gelagert wurden. Zur weiteren immunzytochemischen Charakterisierung der Oenozytoide wurden anschließend Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierungen mittels antigenspezifischer Primärantikörper (Kapitel 3.9.1.1, Tab. 3.20) und Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper (Kapitel 3.9.1.2, Tab. 3.21) nach dem Routineprotokoll für Antikörpermarkierungen von Hämocyten-Monolayern durchgeführt (Kapitel 3.9.3).

Tabelle 3.22: Zusatz von Inhibitoren zum PP-Entwicklungspuffer (Tris: 50 mmol/L, DAB: 2,33 mmol/L, H₂O₂: 8,91 mmol/L, pH 7,5) zur Inhibition von Peroxidasen und/oder Phenoloxidasen.

Treatment	proPO-Aktivierung mit Aceton	Inhibitor				Färbung der Oenozytoide
		Name	Stoffmengenkonzentration [mol/L]	Inhibition	Referenz	
Negativkontrolle 1	Nein	Na-Azid	50 mmol/L	Peroxidasen	Ortiz de Montelano et al. 1988, Zufelato et al. 2004	Nein
Positivkontrolle 1	Ja	-	-	-	-	Ja
Positivkontrolle 2	Ja	Na-Azid	50 mmol/L	Peroxidasen	Ortiz de Montelano et al. 1988, Zufelato et al. 2004	Ja
Negativkontrolle 2	Ja	Na-Azid	50 mmol/L	Peroxidasen	Ortiz de Montelano et al. 1988, Zufelato et al. 2004	Nein
		PTU	50 mmol/L	Phenoloxidasen	Ryazanova et al. 2012, Zufelato et al. 2004	

Mit Ausnahme der Aktivierung der proPO und der Primärantikörperinkubation wurden alle Arbeitsschritte bei RT durchgeführt. Zur Verhinderung der Austrocknung der Hämocyten während des Enzymnachweises und der Antikörpermarkierung wurden alle Arbeitsschritte an den Hämocyten-Monolayern in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer mit Deckel unter Verwendung einer Vakuumpumpe durchgeführt. Wenn nicht explizit festgelegt entsprach das Arbeitsvolumen bei allen Arbeitsschritten einem Tropfen einer Pasteurpipette.

3.10 Mikroskopische Verfahren

Abhängig vom Zell- und Gewebetyp, der damit einhergehenden Zellgröße und der verwendeten Färbungs- bzw. Markierungstechnik wurden unterschiedliche lichtmikroskopische Verfahren zur Visualisierung von Präparaten mit dem Ziel bestmöglicher Kontrastverhältnisse eingesetzt (Tab. 3.23).

Tabelle 3.23: Verwendete optische Systeme zur mikroskopischen Analyse von Zellen und Geweben.

Mikros-kopische Anwendung	Präparat/ Komplexität	Auswertung	Mikros-kopisches Verfahren	verwendetes optisches System			
				Mikroskop/ Mikroskoptyp	Objektiv/ Objektivklasse/ Vergrößerung/ N.A./ Immersionsmedium	Software	Hersteller
Lebendzell-Mikroskopie (Kap. 3.10.1)	Hybridomazellkultur/ einzellig	qualitativ	Hellfeld-mikroskopie/ Phasen-kontrast-mikroskopie	Olympus IMT-2/ inverses Mikroskop	Olympus SPlan 10PL/ Achromat für Phasenkontrast/ 10x/0,30/Luft	-	Olympus
Zellzahl-ermittlung (Kap. 3.10.2)	Bakterien, unmarkiert/ einzellig	quantitativ	Phasen-kontrast-mikroskopie	Olympus BX 60/ aufrechtes Mikroskop	Olympus UP- lanFI 40x Ph/ Semi-Apochromat für Phasen-kontrast/ 40x/0,75/Luft	Olympus cellSens Entry 1.14	Olympus
	Bakterien, FITC-markiert/ einzellig	quantitativ	Epifluoreszenz-mikroskopie				
	Hämozyten/ einzellig	quantitativ	Hellfeld-mikroskopie/ Phasen-kontrast-mikroskopie	Olympus IMT-2/ inverses Mikroskop	Olympus SPlan 10PL/ Achromat für Phasenkontrast/ 10x/0,30/Luft	-	Olympus
Beobachtung zytochemischer Enzymreaktionen (Kap. 3.10.3.1)	Hämozyten einzellig	qualitativ	Hellfeld-mikroskopie	Olympus IMT-2/ inverses Mikroskop	Olympus LWD CDPlan 20PL/ Achromat für Phasenkontrast/ 20x/0,40/Luft	-	Olympus
Imaging chromogener Enzymnachweise (Kap. 3.10.3.2)	Hämozyten/ einzellig	quantitativ	Differential-Interferenz-kontrast-mikroskopie	Olympus BX 60/ aufrechtes Mikroskop	Olympus UP- lanXApo 20x/ erweitert kompensiertes Apochromat/ 20x/0,80/Luft	Olympus cellSens Entry 1.14	Olympus
		qualitativ	Differential-Interferenz-kontrast-mikroskopie	Olympus BX 60/ aufrechtes Mikroskop	Olympus UP- lanXApo 40x/ erweitert kompensiertes Apochromat/ 40x/1,40/Öl		
Immun-fluoreszenz-Imaging (Kap. 3.10.3.3 & 3.10.4)	Hämozyten/ einzellig	quantitativ	Epifluoreszenz-mikroskopie	Olympus BX 60/ aufrechtes Mikroskop	Olympus UP- lanXApo 20x/ erweitert kompensiertes Apochromat/ 20x/0,80/Luft	Olympus cellSens Entry 1.14	Olympus
		qualitativ	Epifluoreszenz-mikroskopie	Olympus BX 60/ aufrechtes Mikroskop	Olympus UP- lanXApo 40x/ erweitert kompensiertes Apochromat/ 40x/1,40/Öl		
		qualitativ	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	Leica TCS SP2/ aufrechtes Konfokal-mikroskop	Leica HCX PL APO 63x/ Apochromat/ 63x/1,20/Wasser	Leica Confocal Software 2.61	Leica Micro- systems

	Embryonen/ mehrzellig (whole mount)	qualitativ	konfokale Laser-Scanning-Mikro- skopie	Leica TCS SP2/ aufrechtes Konfokal- mikroskop	Leica HCX PL APO 63x/ Apochromat/ 63x/1,20/Wasser	Leica Confocal Software 2.61	Leica Micro- systems
		qualitativ	Epifluores- zenz-mikro- skopie	Leica DM6 B/ vollauto- matisches, auf- rechtes Mik- roskop	Leica HCX PL APO 63x/ Apochromat/ 63x/1,30/Glycerin	Leica Ap- plica- tion Suite X 4.12.0.86 / THUNDER	

3.10.1 Lebendzell-Mikroskopie

Die Beobachtung lebender Zellen im Zuge der *in-vitro*-Kultivierung von Hybridoma-Zellkulturen zur Gewinnung hämozytenspezifischer, monoklonaler Antikörper (Kapitel 3.5.3) erfolgte lichtmikroskopisch mittels Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie mit einem Olympus IMT-2 (inverses Mikroskop für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) unter Verwendung eines Olympus SPlan 10PL Phasenkontrastobjektivs mit 10-facher Vergrößerung.

3.10.2 Zellzahlermittlung

3.10.2.1 Ermittlung der Bakterienanzahl in Suspension

Die Ermittlung der Bakterienanzahl pro mL zur Einstellung einer definierten Anzahl von Bakterien (*S. aureus*, *E. coli*) zur anschließenden Immunstimulation unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven mittels Hämocoel-Injektion (Kapitel 3.5) oder Inkubation in zellfreiem Hämolymp plasma (Kapitel 3.8.4) erfolgte lichtmikroskopisch mit einem Olympus BX60 (aufrechtes Mikroskop für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) unter Verwendung eines Olympus UPlanFI (Plan-korrigiertes Semi-Apochromat-Objektiv) Phasenkontrastobjektivs mit 40-facher Vergrößerung und eines Neubauer-Hämozytometer (Neubauer Improved). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierte Bakterien wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und gezählt, während nicht markierte Bakterien zur Zählung der Bakterienanzahl mittels Phasenkontrastmikroskopie visualisiert wurden.

3.10.2.2 Ermittlung der totalen Hämozytenanzahl in Suspension

Die Ermittlung der totalen Hämozytenanzahl pro mL Vollhämolymphe (engl. total hemocyte count, Abk. THC) als Vitalparameter zur Beurteilung des Vitalstatus von *M. sexta*-Larven im Zuge der Probennahme erfolgte lichtmikroskopisch mittels Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie mit einem Olympus IMT-2 (inverses Mikroskop für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) unter Verwendung eines Olympus SPlan 10PL Phasenkontrastobjektivs mit 10-facher Vergrößerung und eines Neubauer-Hämozytometer (Neubauer Improved).

3.10.3 Imaging von Hämozyten-Monolayer

3.10.3.1 Beobachtung zytochemischer Enzymreaktionen

Die Färbung von Hämozyten-Monolayern im Zuge des Enzym-katalysierten Umsatzes chromogener Substrate wurde lichtmikroskopisch mittels Hellfeldmikroskopie mit einem Olympus IMT-2 (inverses Mikroskop für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) unter Verwendung der Olympus SPlan 10PL und Olympus LWD CDPlan 20PL Phasenkontrastobjektive mit 10- bzw. 20-facher Vergrößerung kontrolliert.

3.10.3.2 Chromogene Enzymnachweise

Zur Visualisierung chromogen nachgewiesener alkalischer Phosphatase im Rahmen von *in-situ*-Hybridisierungen in Hämozyten mit genspezifischen RNA-Sonden und alkalische Phosphatase-gekoppeltem anti-Digoxigenin-Antikörper (Kapitel 3.7.9) bzw. chromogen nachgewiesener endogener Tyrosinase-Typ-PO (Kapitel 3.9.4) wurden Hämozyten-Monolayer lichtmikroskopisch mittels Differential-Interferenzkontrastmikroskopie mit einem Olympus BX60 (aufrechtes Mikroskop für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) unter Verwendung einer Olympus XC10 CCD-Farbkamera und der Life Science Imaging Software Olympus cellSens Entry 1.14 analysiert. Zur quantitativen Auswertung und anschließenden Berechnung der differentiellen Hämozytenanzahl (Kapitel 3.12.1) wurde ein Olympus UPlanX Apo 20x (Plan-korrigiertes Apochromat-Objektiv) Trockenobjektiv mit 20-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur (NA) von 0,80 verwendet, während zur qualitativen Auswertung ein Olympus UPlanXApo 40x (Plan-korrigiertes Apochromat-Objektiv) mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,40 unter Ölimmersion verwendet wurde.

3.10.3.3 Immunfluoreszenzmarkierungen

Zur Visualisierung von Immunfluoreszenzmarkierungen an Hämozyten und fluoreszierend markierter, phagozytierter Bakterien wurden Hämozyten-Monolayer lichtmikroskopisch mittels Fluoreszenzmikroskopie mit einem Olympus BX60 (aufrechtes Mikroskop für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) unter Verwendung einer Olympus XC10 CCD-Farbkamera und der Life Science Imaging Software Olympus cellSens Entry 1.14 analysiert. Zur quantitativen Auswertung und anschließenden Berechnung der differentiellen Hämozytenanzahl (Kapitel 3.12.1) bzw. des totalen Phagozytoseindex (Kapitel 3.12.2) wurde ein Olympus UPlanXApo 20x (Plan-korrigiertes Apochromat-Objektiv) Trockenobjektiv mit 20-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur (NA) von 0,80 verwendet, während zur qualitativen Auswertung ein Olympus UPlanXApo 40x (Plan-korrigiertes Apochromat-Objektiv) mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,40 unter Ölimmersion verwendet wurde. Die Visualisierung von Immunfluoreszenzmarkierungen an Hämozyten in gezielten Z-Ebenen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit einem Leica TCS SP2 unter Verwendung eines

Leica HCX PL APO 63x mit 63-facher Vergrößerung und einer NA von 1,20 unter Wasserimmersion sowie der Leica Confocal Software (LCS, Leica Microsystems) Version 2.61.

3.10.4 Imaging von *whole-mount* Embryonen

Die Visualisierung von Immunfluoreszenzmarkierungen an *D. melanogaster* und *M. sexta whole mount* Embryonen in gezielten Z-Ebenen (Fokalebene) erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit einem Leica TCS SP2 unter Verwendung eines Leica HCX PL APO (Plan-korrigiertes Apochromat-Objektiv) mit 63-facher Vergrößerung und einer NA von 1,20 unter Wasserimmersion sowie der Leica Confocal Software (LCS, Leica Microsystems) Version 2.61. Die Erstellung einer zusammengesetzten, multidimensionalen Abbildung bestehend aus dem Fluoreszenzsignal aller Fokalebene (Z-Stapel-Maximum-Projektion) in unterschiedlichen Farbkanälen wurde direkt in der LCS durchgeführt. Alternativ wurde das Gesamtsignal der Immunfluoreszenzmarkierung aller Z-Ebenen in unterschiedlichen Farbkanälen mittels Epifluoreszenzmikroskopie mit einem THUNDER Imager 3D Tissue-System bestehend aus einem Leica DM6 B (vollautomatisches aufrechtes Mikroskopsystem für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie) und der Life Science Softwareplattform Leica Application Suite X (LAS X) Version 4.12.0.86 analysiert und aufgenommen. Zur Erstellung einer zusammengesetzten, multidimensionalen Abbildung bestehend aus dem Fluoreszenzsignal aller Fokusebene eines Z-Stapels in unterschiedlichen Farbkanälen (Z-Stapel-Maximum-Projektion) ohne gleichzeitige Darstellung des Hintergrundsignals wurden Fluoreszenzsignale außerhalb der Fokusebene mit der opto-digitalen THUNDER Imaging-Funktion in LAS X mittels Computational Clearing ausgeblendet und das verbleibende Fluoreszenzsignal aller Fokusebene unterschiedlicher Farbkanäle zusammengefügt.

3.11 Fotodokumentation & Bildbearbeitung

3.11.1 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation aller Präparate erfolgte mit der zum verwendeten optischen System kompatiblen Imaging Software des jeweiligen Herstellers (Kapitel 3.10, Tab. 3.23). Zum Vergleich von Bildern innerhalb einer Bildserie wurde bei der Bildaufnahme darauf geachtet alle zu einer Fragestellung gehörenden Bilder unter identischen Parametern (Bildauflösung, Belichtungszeit, Anregungsintensität, Anzeighelligkeit, Anzeigenkontrast, digitale Vergrößerung) aufzunehmen. Zur Weiterverarbeitung wurden alle Bilder im TIFF- und PNG-Format gespeichert.

3.11.2 Bildbearbeitung

3.11.2.1 Erstellung von Mehrkanal-Fluoreszenzbildern

Im Anschluss an die Fotodokumentation (Kapitel 3.11.1) eines mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) mit mehreren Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markierten Hämozyten-Monolayers (Kapitel 3.9.3) unter Verwendung unterschiedlicher Fluorochrom-Konjugate (Kapitel 3.9.1.2, Tab. 3.21) wurden mehrere zweidimensionale Einkanal-Fluoreszenzbilder (Kapitel 3.10.3.3) einer identischen Probe zur Darstellung der Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung und Kollokalisierung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale mit dem Open-Source-Rastergrafik-Editor GIMP Version 2.8.14 (<https://www.gimp.org>) zu einem mehrfarbigen Mehrkanal-Fluoreszenzbild zusammengefügt. Dazu wurden mehrere einfarbige Fluoreszenzbilder einer identischen Probe eines Hämozyten-Monolayers mit jeweils einem abgebildeten Farbkanal (DAPI, TRITC, FITC) in GIMP importiert und unter Entfernung des Bildhintergrundes digital zu einem mehrfarbigen Mehrkanal-Fluoreszenzbild (Overlay) übereinandergelegt.

3.11.2.2 Erstellung multidimensionaler Fluoreszenzbilder

Zur grafischen Darstellung der Mehrfach-Immunfluoreszenzmarkierung von *whole-mount* Embryonen und Kollokalisierung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale wurden zweidimensionale Einkanal-Fluoreszenzbilder einer identischen Probe mit der zum verwendeten optischen System kompatiblen Imaging Software des jeweiligen Herstellers (Kapitel 3.10, Tab. 3.23) zu multidimensionalen Fluoreszenzbildern bestehend aus den Dimensionen X-Position, Y-Position, Z-Position und den verwendeten Farbkanälen zusammengefügt. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommene, einfarbige Einkanal-Fluoreszenzbilder aller Fokalebenen einer Probe in unterschiedlichen Farbkanälen wurden mit der Imaging Software Leica Confocal Software (LCS, Leica Microsystems) zu einer mehrfarbigen, multidimensionalen Abbildung (Z-Stapel-Maximum-Projektion) zusammengesetzt (Kapitel 3.10.4). Alternativ wurde das Hintergrundsignal mittels Epifluoreszenzmikroskopie aufgenommener, einfarbiger Einkanal-Fluoreszenzbilder entfernt, indem Fluoreszenzsignale außerhalb der Fokusebene mit der opto-digitalen THUNDER Imaging-Funktion der Life Science Softwareplattform Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems) mittels Computational Clearing ausgeblendet wurden (Kapitel 3.10.4). Das verbleibende Fluoreszenzsignal der zweidimensionalen Einkanal-Bilder aller Fokusebenen eines Z-Stapels in allen verwendeten Farbkanälen wurde anschließend mit der LAS X Version 4.12.0.86 zu einer zusammengesetzten, mehrfarbigen, multidimensionalen Abbildung (Z-Stapel-Maximum-Projektion) ohne gleichzeitige Darstellung des Hintergrundsignals zusammengesetzt.

3.11.2.3 Erstellung von Bildtafeln

Zum Vergleich dokumentierter Bilder von Hämozyten und *whole-mount* Embryonen (Kapitel 3.10.3 & 3.10.4) unterschiedlicher Treatments, Zeitpunkte und Markierungen wurden Differential-Interferenzkontrastbilder, Ein- und Mehrkanal-Fluoreszenzbilder sowie multidimensionale Fluoreszenzbilder mit dem Open-Source-Rastergrafik-Editor GIMP Version 2.8.14 (<https://www.gimp.org>) beschriftet und zu Bildtafeln zusammengestellt.

3.11.2.4 Erstellung von Schemazeichnungen

Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurden aus zweidimensionalen Vektorgrafiken bestehende Schemazeichnungen mit dem Open-Source-Vektorgrafik-Editor Inkscape Version 0.91 (<https://inkscape.org>) erstellt.

3.12 Zytometrische Methoden

3.12.1 **Ermittlung der differentiellen Hämozytenanzahl**

3.12.1.1 Definition: DHC

Die differentielle Hämozytenanzahl (differential hemocyte count, DHC), definiert als prozentualer Anteil einer definierten Hämozyten-Subpopulation an der Gesamtpopulation der zirkulierenden (durch Hämolymphentnahme analysierbaren) Hämozyten, wurde mittels digitaler Zytometrie durch computergestützte Auswertung chromogen markierter Hämozyten mit dem Open-Source-Bildverarbeitungsprogramm ImageJ2 Version 2.1.0/1.53c (Rueden et al. 2017) und dem ImageJ-Plug-in *Cell Counter* (programmiert von Kurt De Vos, University of Sheffield, abrufbar unter: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>; Abramoff et al. 2004) ermittelt.

3.12.1.2 Mikroskopische Analyse & Fotodokumentation

Dazu wurden Hämozyten-Monolayer im Anschluss an den chromogenen Nachweis alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-Digoxigenin-Antikörper im Rahmen von *in-situ*-Hybridisierungen *dscam*-spezifischer RNA-Sonden (Kapitel 3.7.9) lichtmikroskopisch mittels Differential-Interferenzkontrastmikroskopie (engl. differential interference contrast, Abk. DIC) und Fluoreszenzmikroskopie mit einem Olympus BX60 unter Verwendung eines Olympus UPlanXApo 20x (Plan-korrigiertes Achromat-Objektiv) mit 20-facher Vergrößerung quantitativ analysiert (Kapitel 3.10.3.2, Tab. 3.23). Zur exemplarischen Ermittlung der Anzahl der Hämozyten der zirkulierenden Hämozyten-Gesamtpopulation eines Tieres wurden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markierten Zellkerne der Hämozyten in mindestens drei unterschiedlichen Bereichen des Hämozyten-Monolayers mittels Fluores-

zenzmikroskopie unter Verwendung des Fluoreszenz-Filtermoduls Olympus U-MNU (DAPI-Kanal) visualisiert und als Einkanal-Fluoreszenzbild dokumentiert. Zur exemplarischen Ermittlung der Anzahl der Hämocyten einer definierten Hämocyten-Subpopulation (*dscam* exprimierende Hämocyten) desselben Tieres wurden die identischen (mind. drei) Ausschnitte des Hämocyten-Monolayers mittels DIC-Mikroskopie visualisiert und als DIC-Bild dokumentiert.

3.12.1.3 Quantifizierung: DHC_{dscam}

Die dokumentierten Bildpaare, bestehend aus jeweils einem Fluoreszenzbild und einem DIC-Bild, wurden anschließend unverändert in ImageJ2 importiert und die markierten Hämocyten mit dem Plug-in *Cell Counter* (Kurt De Vos, University of Sheffield; Abramoff et al. 2004) quantifiziert. Die Anzahl der im Fluoreszenzbild sichtbaren, fluoreszierend markierten Zellkerne entspricht dabei der zirkulierenden Hämocyten-Gesamtpopulation, während die Anzahl der im entsprechenden DIC-Bild des identischen Bildausschnittes sichtbaren, chromogen markierten Hämocyten der Subpopulation der *dscam* exprimierenden Hämocyten entsprechen (Kapitel 3.12.1.2). Aus beiden Werten eines Bildpaares wurde anschließend die differenzielle Hämocytenanzahl (DHC) der *dscam* exprimierenden Hämocyten (DHC_{dscam} , Prozentzahl p) mittels Prozentrechnung in Microsoft® Excel Version 16.45 ermittelt, die sich aus dem Quotienten der Anzahl der Hämocyten der Subpopulation der *dscam* exprimierenden Hämocyten (Prozentwert W) und der Anzahl der Hämocyten der zirkulierenden Gesamtpopulation (Grundwert G), multipliziert mit einhundert, ergibt und als DHC_{dscam} -Einzelwert bezeichnet wird (Formel 6a & b).

Formel 9: Berechnung der a) differenziellen Hämocytenanzahl (engl. *differential hemocyte count*, Abk. DHC) mittels Prozentrechnung, angegeben in % und angewendet zur b) Berechnung der differenziellen Hämocytenanzahl der *dscam* exprimierenden Hämocyten (DHC_{dscam}), angegeben in % und bezeichnet als DHC_{dscam} -Einzelwert.

$$\text{a) Differenzielle Hämocytenanzahl [\%]} = \frac{\text{Anzahl der Hämocyten einer Subpopulation } X}{\text{Anzahl der Hämocyten der zirkulierenden Gesamtpopulation}} \cdot 100$$

$$\text{b) } DHC_{dscam} [\%] = \frac{\text{Anzahl der } dscam \text{ exprimierenden Hämocyten}}{\text{Anzahl der Hämocyten der zirkulierenden Gesamtpopulation}} \cdot 100$$

Zur Ermittlung eines für das Hämocytenbild der entsprechenden Larve unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (Aufzucht, Geschlecht, Entwicklungsstadium, Treatment, Immunstatus, Präparationsmethode, etc.) repräsentativen DHC_{dscam} wurde der arithmetische Mittelwert aus den DHC_{dscam} -Einzelwerten der Bildpaare von mindestens drei unterschiedlichen Bildausschnitten berechnet, welcher als tierspezifischer DHC_{dscam} -Mittelwert bezeichnet wird. Zum Ausgleich Tier- und Treatment-bedingter Schwankungen wurde der arithmetische Mittelwert aus den tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerten von jeweils drei unterschiedlichen, gleich behandelten Tieren pro Treatment berechnet, um einen für das jeweilige Treatment (Kapitel 3.7.9.4, Tab. 3.13) reliablen und mit anderen Treatments vergleichbaren Wert (treatment-

spezifischer DHC_{dscam} -Mittelwert) zu erhalten. Insgesamt wurden je Treatment durchschnittlich 1500 Hämozyten von jeweils drei Tieren ($n = 3$) analysiert.

3.12.1.4 Statistische Analyse tierspezifischer DHC_{dscam} -Mittelwerte

Die tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerte jedes Treatments (Kapitel 3.12.1.3) wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test mit RStudio® Version 1.3.1056 (R Core Team 2018) auf Normalverteilung überprüft. Dazu bildeten die tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerte der drei biologischen Replikate eines Treatments (z.B. *E. coli* 24h) eine Testgruppe mit $n = 3$, innerhalb derer die Daten auf Normalverteilung getestet wurden. Bei gegebener Normalverteilung der Daten aller Treatments (Kapitel 3.7.9.4, Tab. 3.13) wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerten des Experimentaltreatments *E. coli* 24h und dem entsprechenden Kontrolltreatment MS 24h mittels parametrischem Testverfahren (ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben-*t*-Test bei Varianzhomogenität) mit Microsoft® Excel Version 16.45 ermittelt. Ein p -Wert von ≤ 0.05 gilt dabei als statistisch signifikant.

3.12.1.5 Graphische Darstellung tierspezifischer DHC_{dscam} -Mittelwerte

Die statistisch analysierten tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerte aller Treatments (Kapitel 3.12.1.4) wurden mit Microsoft® Excel Version 16.45 in Form von Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Der arithmetische Mittelwert (MW) aus den tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerten von jeweils drei biologischen Replikaten ($n = 3$) pro Treatment (treatmentspezifischer DHC_{dscam} -Mittelwert) wurde durch einen Balken, die Standardabweichung (SD, Streuung der tierspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwerte um den treatmentspezifischen DHC_{dscam} -Mittelwert) der Stichprobe (s) durch eine Antenne (Whisker) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Treatments sind mit * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) und *** ($p \leq 0.001$) angegeben.

3.12.2 Ermittlung des totalen Phagozytoseindex

3.12.2.1 Definition: total-PI

Der totale Phagozytoseindex (engl. total phagocytic index, Abk. total-PI), definiert als prozentualer Anteil aller phagozytotisch aktiven Hämozyten an der Gesamtpopulation der zirkulierenden (durch Hämolymphentnahme analysierbaren) Hämozyten, wurde mittels digitaler Zytometrie durch computergestützte Auswertung der Kolo-kalisation fluoreszierend markierter Zellkerne und Bakterien mit dem Open-Source-Bildverarbeitungsprogramm ImageJ2 Version 2.1.0/1.53c (Rueden et al. 2017) und dem ImageJ-Plug-in *Cell Counter* (programmiert von Kurt De Vos, University of Sheffield, abrufbar unter: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-coun>

ter.html; Abràmoff et al. 2004) ermittelt. Dementsprechend ist bei nachfolgender Verwendung des Begriffes Phagozytoseindex der Anteil mit *E. coli*-kolokalisierter Hämocyten an der Gesamtpopulation der zirkulierenden Hämocyten gemeint (Kap. 4.2).

3.12.2.2 Mikroskopische Analyse & Fotodokumentation

Hämocyten-Monolayer von *M. sexta* L5d2/3-Larven nach zeitabhängiger Immunstimulation (Tab. 3.24) durch Injektion FITC-markierter *E. coli* K12 D31-Y (Kapitel 3.4.2 & 3.5) wurden im Anschluss an Immunfluoreszenzmarkierungen (Kapitel 3.9.3) mittels Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (engl. *differential interference contrast*, Abk. DIC) und Fluoreszenzmikroskopie mit einem Olympus BX60 unter Verwendung eines Olympus UPlanXApo 20x mit 20-facher Vergrößerung analysiert (Kapitel 3.10.3.3, Tab. 3.23).

Tabelle 3.24: Immunstimulation unbehandelter *M. sexta* L5d2 Larven durch Hämocoel-Injektion PFA-abgetöteter, FITC-markierter *E. coli* K12 D31-Y vor Präparation und Immunfluoreszenzmarkierung von Hämocyten-Monolayern zur Ermittlung des totalen Phagozytoseindex (engl. *total phagocytic index*, Abk. total-PI) im Verlauf von 24h post Injektion.

Treatment	<i>E. coli</i>					
Immunstimulator	<i>E. coli</i> K12 D31-Y					
Injektions-suspension	PFA-abgetötete FITC-markierte <i>E. coli</i> K12 D31-Y in MS ⁻					
Injektionsdosis (Bakterien/g Körpergewicht der Larve)	2 · 10 ⁷					
Zeit nach Injektion	1h	6h	10h	15h	20h	24h

Zur exemplarischen Ermittlung der Anzahl der Hämocyten der zirkulierenden Hämocyten-Gesamtpopulation eines Tieres wurden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Abk. DAPI) markierten Zellkerne der Hämocyten in mindestens drei unterschiedlichen Bereichen eines Sichtlochs des Hämocyten-Monolayers mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des Fluoreszenz-Filtermoduls Olympus U-MNU (DAPI-Kanal) visualisiert und als Einkanal-Fluoreszenzbild dokumentiert. Zur exemplarischen Ermittlung der Anzahl aller *E. coli*-kolokalisierten Hämocyten desselben Tieres wurden die mit den Hämocyten kolokalisierten, FITC-markierten *E. coli* K12 D31-Y der identischen (mind. drei) Ausschnitte des Hämocyten-Monolayers mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des Fluoreszenz-Filtermoduls Olympus U-MWIB (FITC-Kanal) visualisiert und als Einkanal-Fluoreszenzbild dokumentiert. Zur Kontrolle der anhand der DAPI-markierten Zellkerne ermittelten Hämocytenanzahl der zirkulierenden Hämocyten-Gesamtpopulation und zum Ausschluss falsch positiver Kolokalisationen von *E. coli* und Hämocyten wurden die identischen (mind. drei) Ausschnitte des Hämocyten-Monolayers zusätzlich mittels DIC-Mikroskopie visualisiert und dokumentiert.

3.12.2.3 Quantifizierung: Total-PI_{E. coli}

Die dokumentierten Bildpaare bestehend aus jeweils einem Einkanal-Fluoreszenzbild DAPI-markierter Hämozyten-Zellkerne und FITC-markierter *E. coli* K12 D31-Y wurden anschließend unverändert in ImageJ2 importiert, mit der Overlay-Funktion digital zu einem Zweikanal-Fluoreszenzbild übereinandergelegt und die markierten Zellkerne und Bakterien mit dem Plug-in *Cell Counter* (Kurt De Vos, University of Sheffield; Abramoff et al. 2004) quantifiziert. Die Anzahl der im Zweikanal-Fluoreszenzbild sichtbaren Zellkerne entspricht dabei der zirkulierenden Hämozyten-Gesamtpopulation, während die Anzahl der mit Bakterien kolokalisierten Zellkerne der Population der *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten entspricht (Kapitel 3.12.2.2). Zum Ausschluss falsch positiver Kolokalisationen und Doppel-Kolokalisationen wurden die Zuweisungen der FITC-markierten *E. coli* K12 D31-Y zu Hämozyten-Zellkernen mit dem DIC-Bild des identischen Bildausschnittes kontrolliert. Aus beiden Werten eines Bildpaares wurde anschließend der totale Phagozytoseindex (total-PI) der mit *E. coli* kolokalisierten Hämozyten (total-PI_{E. coli}, Prozentzahl *p*) mittels Prozentrechnung in Microsoft® Excel Version 16.45 ermittelt. Der total-PI_{E. coli} ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl der mit *E. coli* kolokalisierten Hämozyten (Prozentwert *W*) und der Anzahl der Hämozyten der zirkulierenden Gesamtpopulation (Grundwert *G*), multipliziert mit einhundert, und wird als total-PI_{E. coli}-Einzelwert bezeichnet (Formel 7a & b).

Formel 10: Berechnung des a) totalen Phagozytoseindex (engl. total phagocytic index, Abk. total-PI) mittels Prozentrechnung, angegeben in % und angewendet zur Berechnung des b) totalen Phagozytoseindex der mit *E. coli* kolokalisierten Hämozyten (total-PI_{E. coli}), angegeben in % und bezeichnet als total-PI_{E. coli}-Einzelwert.

$$\text{a) Totaler Phagozytoseindex [\%]} = \frac{\text{Anzahl der mit Bakterien kolokalisierten Hämozyten}}{\text{Anzahl der Hämozyten der zirkulierenden Gesamtpopulation}} \cdot 100$$

$$\text{b) Total-PI}_{E. coli} [\%] = \frac{\text{Anzahl der mit } E. coli \text{ K12 D31-Y kolokalisierten Hämozyten}}{\text{Anzahl der Hämozyten der zirkulierenden Gesamtpopulation}} \cdot 100$$

Zur Ermittlung eines für den totalen Phagozytoseindex der Hämozyten der entsprechenden Larve unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (Aufzucht, Geschlecht, Entwicklungsstadium, Treatment, Immunstatus, Präparationsmethode, etc.) repräsentativen total-PI_{E. coli} wurde der arithmetische Mittelwert aus den total-PI_{E. coli}-Einzelwerten der Bildpaare von mindestens drei unterschiedlichen Bildausschnitten berechnet und als tierspezifischer total-PI_{E. coli}-Mittelwert bezeichnet. Zum Ausgleich Tier- und Treatment-bedingter Schwankungen wurde der arithmetische Mittelwert aus den tierspezifischen total-PI_{E. coli}-Mittelwerten von jeweils drei unterschiedlichen, gleich behandelten Tieren pro Treatment berechnet, um einen für das jeweilige Treatment (Tab. 3.24) reliablen und mit anderen Treatments vergleichbaren Wert (treatmentspezifischer total-PI_{E. coli}-Mittelwert) zu erhalten. Insgesamt wurden je Treatment durchschnittlich 1500 Hämozyten von jeweils drei Tieren (*n* = 3) analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Sektion I: Charakterisierung von Dscam in der angeborenen Immunantwort larvaler Hämocyten

4.1.1 Expression von *dscam* in unbehandelten Larven

Fragestellung

In welchen Geweben und Organen unbehandelter Larven ist *dscam* exprimiert?

Die Expression von *dscam* in den Geweben und Organen unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven wurde jeweils zusammen mit der Expression des Haushaltsgens *eEF1A* mittels RT-PCR analysiert (Abb. 4.1). Je Gewebe- bzw. Organtyp wurde total-RNA aus den gepoolten Geweben bzw. Organen von neun Larven (Kohorte) extrahiert. Je Gewebe bzw. Organ wurden drei unabhängige RT-PCR-Replikate durchgeführt (n = 3). Für jedes RT-PCR-Replikat wurde der total-RNA-Extrakt einer unabhängigen Kohorte verwendet. Je RT-PCR-Reaktion wurden 12,5 ng total-RNA-Extrakt zur Amplifikation von Transkript verwendet. Zur Amplifikation von *dscam* wurden Exonkassette 5-flankierende Primer verwendet, die mit spezifischen Bereichen der konstitutiven Exone 4 & 6 von *dscam*-Transkript (i5k@NAL-Sequenz-ID: Msex2.09537-RA) hybridisieren (Tab. 3.9). Zur Ermittlung des absoluten mRNA-Levels von *dscam* wurden die Grauwerte der cDNA-Banden mit ImageJ2 quantifiziert und mit dem *eukaryotischen Elongationsfaktor 1-alpha (eEF1A)* normalisiert (normalisiertes mRNA-Level, Abb. 4.1 C). Zur semiquantitativen Auswertung der *dscam*-Expression wurde das *dscam*-mRNA-Level jedes Gewebes bzw. Organs mit dem niedrigsten, detektierbaren *dscam*-mRNA-Level eines Gewebes bzw. Organs innerhalb einer Replikatserie relativiert. Dazu wurde das (absolute) normalisierte *dscam*-mRNA-Level jedes Gewebes bzw. jedes Organs einer Replikatserie mit dem normalisierten *dscam*-mRNA-Level des Fettkörpers derselben Replikatserie relativiert (relatives mRNA-Level, Abb. 4.1 D).

Nach elektrophoretischer Trennung der mit *dscam*-spezifischen Primern amplifizierten Transkripte konnte in den RT-PCR-Produkten ausgehend von total-RNA-Extrakt von Hämocyten, Flügelanlagen, Fettkörper, Mitteldarm und zentralem Nervensystem eine trennscharfe cDNA-Bande in zwischen der Migrationshöhe standardisierter DNA-Moleküle mit einer Länge von 200 bp und 300 bp detektiert werden (Abb. 4.1 B). Das entspricht der *in silico* zu erwartenden Amplifikatlänge von ca. 245 bp, abhängig vom alternativ gespleißten Exon der Exonkassette 5. Im RT-PCR-Produkt des total-RNA-Extraktes des zentralen Nervensystems konnte eine zweite cDNA-Bande mit geringerer Signalintensität auf Migrationshöhe standardisierter DNA-Moleküle mit einer Länge von 300 bp detektiert werden (Abb. 4.1 B). Dementsprechend konnte die Expression von *dscam* in zirkulierenden Hämocyten, Flügelanlagen, Fettkörper, Mitteldarm sowie im zentralen Nervensystem unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven

nachgewiesen werden (Abb. 4.1 B). Das höchste absolute *dscam*-mRNA-Level war dabei mit $0,60 \pm 0,05$ normalisierten Grauwerteinheiten (NGE) im zentralen Nervensystem (ZNS) detektierbar (Abb. 4.1 C). Im Vergleich zum ZNS waren die absoluten *dscam*-mRNA-Level in allen anderen Geweben bzw. Organen niedriger. So konnte im Mitteldarm ein absolutes mRNA-Level von $0,30 \pm 0,03$ NGE, in den Flügelanlagen von $0,24 \pm 0,02$ NGE und in den zirkulierenden Hämozyten von $0,13 \pm 0,01$ NGE nachgewiesen werden (Abb. 4.1 C). Im Fettkörper wurde mit $0,08 \pm 0,01$ NGE das niedrigste *dscam*-mRNA-Level aller präparierten Gewebe und Organe nachgewiesen (Abb. 4.1 C).

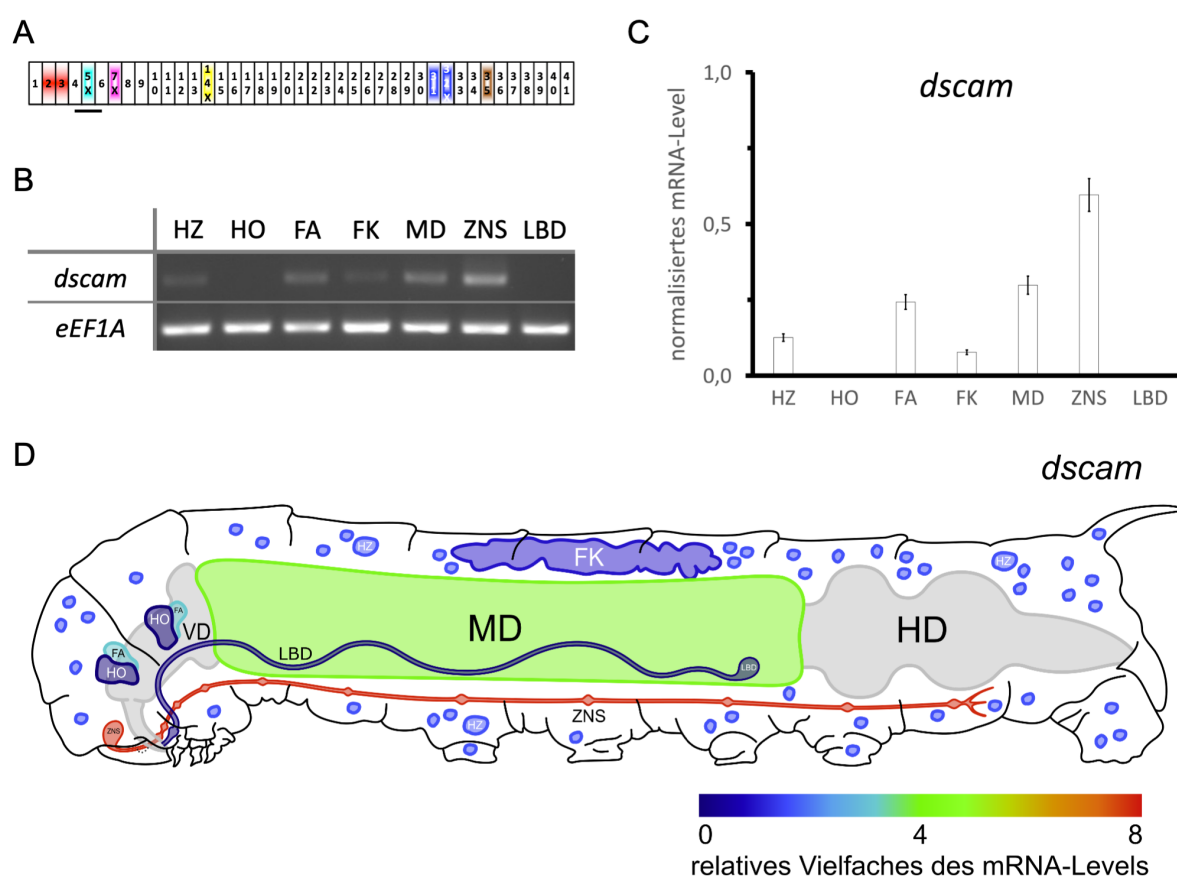


Abbildung 4.1: sqRT-PCR Analyse von *dscam* in Geweben und Organen unbehalteter L5d2-Larven.

A: Exonstruktur der prä-mRNA des Down-Syndrom-Zelladhäsionsmoleküls von *M. sexta* (*MsDscam*, i5k@NAL-Sequenz-ID: Msex2.09537-RA). Exons 2 & 3 (rot) kodieren für das Signalpeptid, die Exonkassetten 5 (blaugrün), 7 (pink), 14 (gelb) und 32 (blau) beinhalten 15, 27, 17 bzw. 2 alternative Exons, Exon 35 (braun) ist ein optionales Exon. Die schwarze Linie zeigt den in der RT-PCR amplifizierte Transkriptbereich an. **B:** Expressionsprofil von *dscam* in larvalen Geweben und Organen unbehalteter L5d2-Larven. Das Expressionslevel von *dscam* in mRNA-Proben präparierter Gewebe und Organe wurde jeweils zusammen mit dem Haushaltgen *eEF1A* mittels RT-PCR analysiert. Je Gewebe- bzw. Organtyp wurde total-RNA aus den gepoolten Geweben bzw. Organen von neun Larven (Kohorte) extrahiert. Je Gewebe bzw. Organ wurden drei unabhängige RT-PCR-Replikate durchgeführt ($n = 3$). **C:** Absolutes mRNA-Level (Mittelwert \pm SD) von *dscam* in larvalen Geweben und Organen, normalisiert mit dem Haushaltgen *eEF1A*. Die Grauwerte der RT-PCR-Banden wurden mit ImageJ2 quantifiziert. **D:** Heatmap des relativen mRNA-Level (Mittelwert) von *dscam* in larvalen Geweben und Organen, innerhalb einer Replikatserie relativiert zum absoluten mRNA-level von *dscam* im Fettkörper. Abkürzungen: HZ, Hämozyte; HO, Hämatopoetisches Organ; FA, Flügelanlage; FK, Fettkörper; VD, Vorderdarm; MD, Mitteldarm; HD, Hinterdarm; ZNS, zentrales Nervensystem; LBD, Labialdrüse.

In den larvalen Hämatopoetischen Organen im Meso- und Metathorax sowie in den Labialdrüsen konnte keine Expression von *dscam* nachgewiesen werden (Abb. 4.1 B & C). In Relation zum *dscam*-mRNA-Level im Fettkörper entsprach das Expressionslevel von *dscam* im zentralen Nervensystem einem $7,79 \pm 0,79$ -fach höheren mRNA-Level (Abb. 4.1 D). Das relative *dscam*-mRNA-Level im Mitteldarm war $3,93 \pm 0,79$ -fach, in den Flügelanlagen $3,21 \pm 0,64$ -fach und in den zirkulierenden Hämozyten $1,66 \pm 0,33$ -fach höher als das *dscam*-mRNA-Level im Fettkörper (Abb. 4.1 D). Aufgrund des Relationsbezuges ergab sich für das relative mRNA-Level von *dscam* im Fettkörper ein Quotient von eins. In Folge der unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht detektierbaren Expression von *dscam* in den Hämatopoetischen Organen und den Labialdrüsen ergab sich für das relative *dscam*-mRNA-Level in beiden Organen ein Quotient von null.

Zur Bestimmung der Sequenzidentität wurden RT-PCR-Amplifikate, die mit total-RNA-Extrakt von zirkulierenden Hämozyten und dem zentralen Nervensystem sowie Msex2.09537-RA-spezifischen Primern amplifiziert wurden, exemplarisch kloniert und sequenziert. Dazu wurde die rekombinante Plasmid-DNA einzelner, zufällig ausgewählter Klone präpariert und die von den Promotoren SP6 und T7 flankierte Multiple Cloning Site (MCS) von Microsynth Seqlab (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Die von Seqlab ermittelten Nukleotidsequenzen der MCS rekombinanter Plasmide wurden anschließend mittels Nukleotid-BLAST-Analyse (blastn) mit dem im i5k Workspace (i5K Consortium 2013) veröffentlichten Transkriptom von *M. sexta* verglichen, um die Transkript-Sequenz-ID der RT-PCR-Amplifikate *in silico* zu ermitteln. Zur wahrscheinlichkeitbasierten *in silico*-Ermittlung der Gen- und Transkriptidentität wurden die Nukleotidsequenzen der RT-PCR-Amplifikate mittels Nukleotid-BLAST-Analyse (blastn) mit bekannten, artgleichen und artfremden Transkriptsequenzen der NCBI-Datenbank Transcript Reference Sequences (cDNA) sowie mit den mit *D. melanogaster* korrespondierenden Sequenzen der NCBI-Datenbank Non-Redundant Nucleotide Collection (mixed DNA) verglichen.

Die BLAST-Analyse der Nukleotidsequenzen aller sequenzierten Klone mit dem *Manduca*-Transkriptom in i5k ergab die Sequenz-IDs Msex2.09537-RA & -RB als Einträge mit den statistisch signifikantesten Erwartungswerten (engl.: Expect-value, Abk.: E-value, Abb. 12.1 im Appendix). Dabei ergab die BLAST-Analyse von Klonen mit *dscam*-Insert, welches mit RNA-Template von Hämozyten amplifiziert wurde, einheitlich die Transkript-Isoform Msex2.09537-RA als Eintrag mit dem gleichzeitig höchsten bit score (Abb. 12.1 A im Appendix). Bei der BLAST-Analyse von Klonen mit *dscam*-Insert, welches mit dem total-RNA-Extrakt des zentralen Nervensystems amplifiziert wurde, waren sowohl die Isoform Msex2.09537-RA als auch die Isoform Msex2.09537-RB unter den Einträgen mit dem gleichzeitig höchsten bit score vertreten (Abb. 12.1 B im Appendix). Die anschließende BLAST-Analyse der Nukleotidsequenzen der RT-PCR-Amplifikate von *dscam* mit der NCBI-Datenbank Transcript Reference

Sequences ergab Transkriptsequenzen, welche für das *in silico* prognostizierte Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 unterschiedlicher Vertreter der Lepidoptera (*Trichoplusia ni*, *Bombyx mori*, *Vanessa tameamea* und *Spodoptera litura*) kodieren, als statistisch signifikanteste Einträge (Abb. 12.2 im Appendix). Bei Beschränkung der Suchanfrage auf mit *D. melanogaster* korrespondierende Sequenzen ergab die BLAST-Analyse mit der NCBI-Datenbank Nucleotide collection Gen- und Transkriptsequenzen, die für unterschiedliche Spleißformen des Down syndrome cell adhesion molecule 1 von *D. melanogaster* kodieren, als statistisch signifikanteste Einträge (Abb. 12.3 im Appendix). Die Sequenz-Alignment-Analyse der Nukleotidsequenzen der RT-PCR-Inserts aller sequenzierten Klone zeigte, dass es sich bei den Transkript-Amplifikaten von *dscam* sowohl in Hämozyten als auch im zentralen Nervensystem um unterschiedliche Spleißformen (Transkriptvarianten) mit unterschiedlichen alternativen Exonen der Exonkassette fünf handelte (Abb. 12.4 im Appendix).

Ergebnisfazit

- In unbehandelten L5d2-Larven ist *dscam* in zirkulierenden Hämozyten, Flügelanlagen, Fettkörper, Mitteldarm und im zentralen Nervensystem exprimiert.
 - Hohes mRNA-Level: Zentrales Nervensystem
 - Mittleres mRNA-Level: Mitteldarm, Flügelanlagen
 - Niedriges mRNA-Level: Hämozyten, Fettkörper
- In den Hämatopoetischen Organen und in den Labialdrüsen unbehandelter L5d2-Larven ist keine Expression von *dscam* nachweisbar.
- BLAST-Analyse der RT-PCR-Amplifikate von *dscam* ergibt:
 - wahrscheinliche i5k-Sequenz-ID: Msex2.09537-RA bzw. -RB
 - ähnliche Nukleotidsequenzen:
 - Lepidoptera: Dscam-like protein Dscam2
 - *D. melanogaster*: *dscam1*
- In mRNA-Proben von Hämozyten und dem zentralen Nervensystem sind jeweils unterschiedliche Spleißformen von *dscam* nachweisbar.

4.1.2 Expression von *dscam* und immunrelevanter Gene in Hämocyten bakteriell stimulierter Larven

Fragestellung

Zu welchen Zeitpunkten im Verlauf von 36 h nach *E. coli*-Injektion ist *dscam* im Vergleich zu den immunrelevanten Genen *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in den zirkulierenden Hämocyten bakteriell stimulierter Larven exprimiert?

Ist das Expressionsniveau von *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in den zirkulierenden Hämocyten bakteriell stimulierter Larven im Verlauf von 36 h nach *E. coli*-Injektion signifikant verändert?

Die Expression von *dscam* sowie der immunrelevanten Gene *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in Hämocyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d2- & L5d3-Larven wurde 1 h – 36 h nach *E. coli*-Injektion unter Verwendung genspezifischer Primer (Tab. 3.9) mittels RT-PCR analysiert (Abb. 4.2). Zur bakteriellen Stimulation wurde unbehandelten L5d2-Larven eine Suspension aus PFA-abgetöteten *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻ in einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien/g Körpergewicht injiziert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Larven des gleichen Entwicklungsstadiums (L5d2/3) mittels Injektion steriler Saline (MS⁻) stimuliert. Je Zeitpunkt wurde total-RNA aus den gepoolten Hämocyten von sieben Larven (= eine Tierkohorte) der Experimental- (*E. coli* injiziert) bzw. Kontrollgruppe (Saline injiziert) extrahiert. Je RT-PCR-Reaktion wurden 12,5 ng total-RNA-Extrakt zur Amplifikation von Transkript verwendet. Zur Amplifikation von *dscam* wurden Primer verwendet, die spezifisch mit einem Sequenzbereich von Exon 31 & 34 (Transmembrandomäne) hybridisieren (Tab. 3.9). Die Grauwerte der RT-PCR-Banden wurden mit ImageJ2 quantifiziert und mit dem *eukaryotischen Elongationsfaktor 1-alpha* (*eEF1A*, Haushaltsgen) normalisiert (normalisiertes mRNA-Level, Abb. 4.2 B – F). Zur Visualisierung des Einflusses der *E. coli*-Injektion auf die Genexpression wurden die normalisierten mRNA-Level zur entsprechenden Saline-Kontrollgruppe relativiert (relatives mRNA-Level, Abb. 4.2 B' – D').

4.1.2.1 *dscam*

In Hämocyten unbehandelter L5d2- (unbehandelt 0 h) und L5d3-Larven (unbehandelt 24 h) konnte *dscam*-Transkript mit einem absoluten mRNA-Level von $0,12 \pm 0,04$ (L5d2) bzw. $0,12 \pm 0,06$ (L5d3) normalisierten Grauwerteinheiten (NGE) in ähnlichen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). In Hämocyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven war das absolute mRNA-Level von *dscam* 24 h nach *E. coli*-Injektion mit $0,26 \pm 0,11$ NGE am höchsten und unterschied sich signifikant vom mRNA-Level Saline-stimulierter Kontrolllarven ($p_{\Delta S, Ec 24 h} = 0,0373$, Abb. 4.2 B). In Relation zur jeweiligen Saline-stimulierten Kontrollgruppe war das relative mRNA-Level von *dscam* dabei 6 h nach *E. coli*-Injektion signifikant um das $10,74 \pm 2,57$ -fache ($p = 0,0189$), 24 h nach Injektion signifikant um das $14,37 \pm 4,79$ -fache

($p = 0,036$) und 36 h nach Injektion signifikant um das $3,71 \pm 1,02$ -fache ($p = 0,0254$) erhöht (Abb. 4.2 B').

4.1.2.2 *eater*

In Hämocyten unbehandelter L5d2- und L5d3-Larven konnte *eater*-Transkript mit einem absoluten mRNA-Level von $0,24 \pm 0,04$ (L5d2) und $0,22 \pm 0,10$ (L5d3) NGE in ähnlichen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). In Hämocyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven war das absolute mRNA-Level von *eater* 6 h nach *E. coli*-Injektion mit $1,00 \pm 0,04$ NGE ($p_{\Delta S, Ec 6 h} < 0,001$) und 20 h nach *E. coli*-Injektion mit $0,96 \pm 0,04$ NGE ($p_{\Delta S, Ec 20 h} < 0,001$) am höchsten (Abb. 4.2 C). In Relation zur entsprechenden Saline-stimulierten Kontrollgruppe war die relative Expression von *eater* 1 h bis 36 h nach *E. coli*-Injektion signifikant erhöht (Abb. 4.2 C'). Das relative mRNA-Level von *eater* war dabei in der Spitze 6 h nach *E. coli*-Injektion um das $10,10 \pm 2,33$ -fache ($p = 0,0188$), 20 h nach Injektion um das $8,62 \pm 2,94$ -fache ($p = 0,0416$) und 24 h nach Injektion um das $7,80 \pm 1,42$ -fache ($p = 0,0103$) erhöht.

4.1.2.3 *lysozym*

In Hämocyten unbehandelter L5d2- und L5d3-Larven konnte *lysozym*-Transkript mit einem absoluten mRNA-Level von $0,44 \pm 0,02$ (L5d2) und $0,41 \pm 0,08$ (L5d3) NGE in ähnlichen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). In Hämocyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven war das absolute mRNA-Level von *lysozym* an allen getesteten Zeitpunkten von 1 h bis 36 h nach *E. coli*-Injektion höher als das mRNA-Level der entsprechenden Saline-stimulierten Kontrolle bzw. als das mRNA-Level unbehandelter Hämocyten (Abb. 4.2 D). Dabei war das mRNA-Level von *lysozym* 6 h bis 36 h nach *E. coli*-Injektion annähernd gleich hoch, mit einem Maximalwert von $1,04 \pm 0,14$ NGE 10 h nach *E. coli*-Injektion ($p_{\Delta S, Ec 10 h} = 0,0201$) und einem Minimalwert von $0,92 \pm 0,11$ NGE 36 h nach *E. coli*-Injektion ($p_{\Delta S, Ec 36 h} = 0,0101$). In Relation zur entsprechenden Saline-stimulierten Kontrollgruppe war die relative Expression von *lysozym* zu keinem Zeitpunkt nach *E. coli*-Injektion signifikant erhöht (Abb. 4.2 D').

4.1.2.4 *attacin*

Attacin-Transkript konnte in Hämocyten unbehandelter und Saline-stimulierter L5d2- und L5d3-Larven zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). Erst 6 h bis 20 h nach *E. coli*-Injektion war *attacin*-Transkript in Hämocyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven nachweisbar. Das höchste absolute mRNA-Level wurde dabei 6 h nach *E. coli*-Injektion mit $0,67 \pm 0,16$ NGE ($p_{\Delta S, Ec 6 h} = 0,0196$) detektiert (Abb. 4.2 E). Die mRNA-Level 10 h, 15 h und 20 h nach Injektion waren zunehmend niedriger.

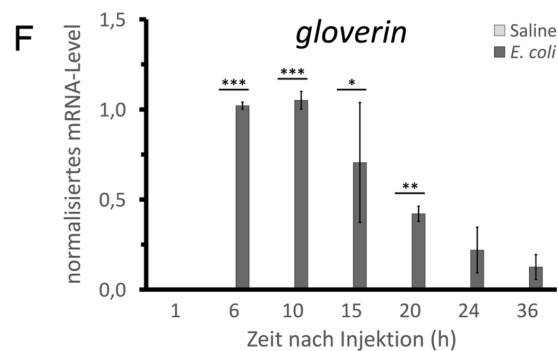
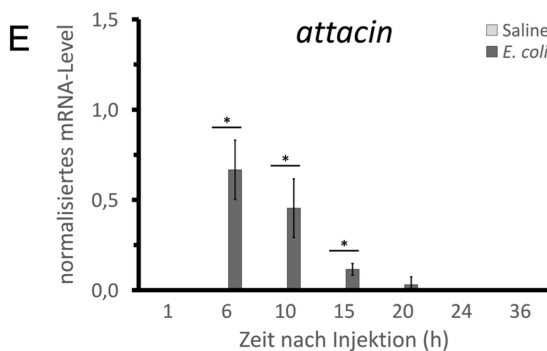
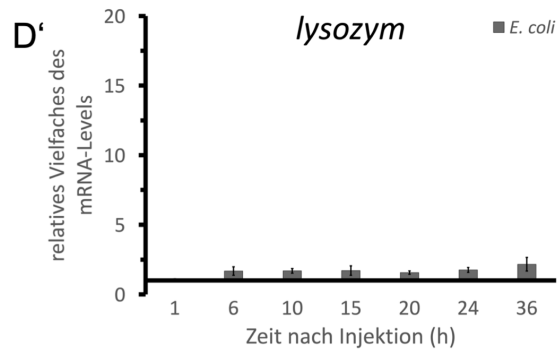
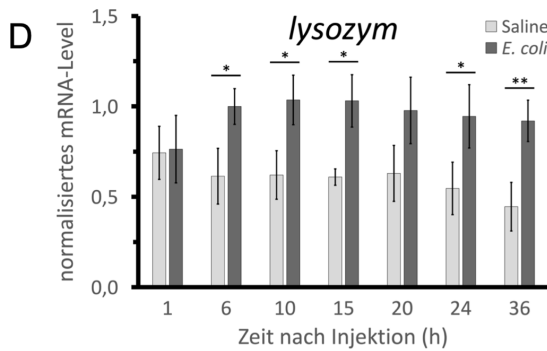
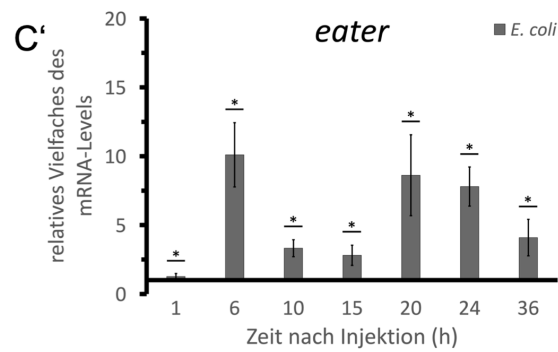
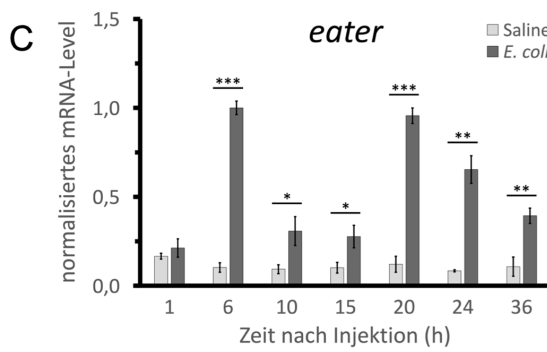
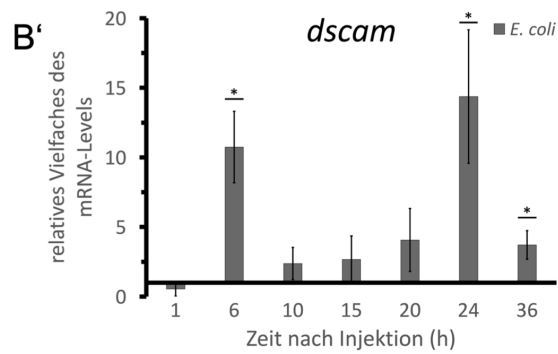
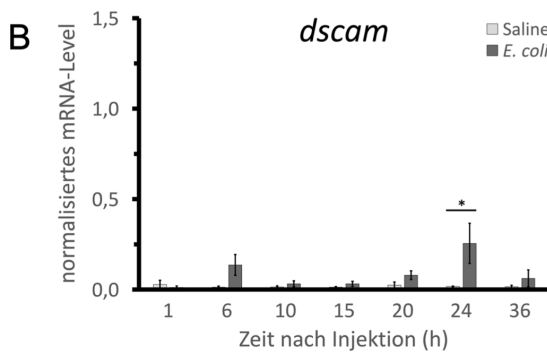
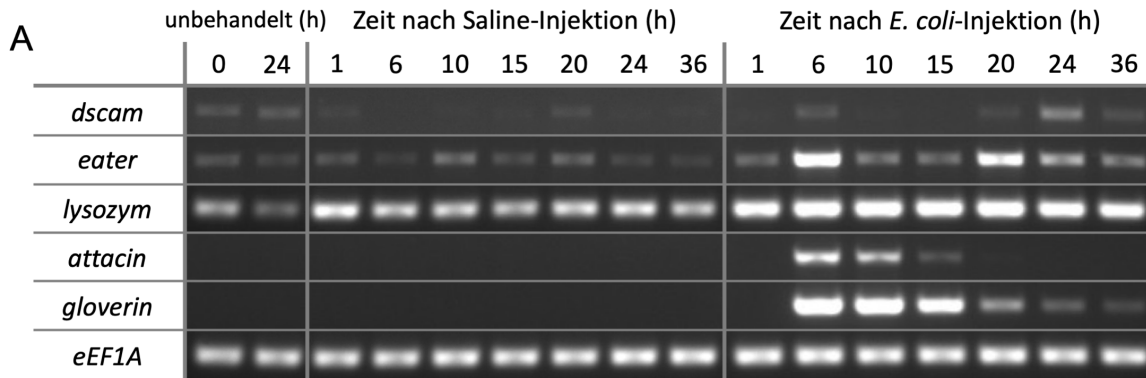


Abbildung 4.2, vorherige Seite: sqRT-PCR Analyse von *dscam* und immunrelevanten Genen in zirkulierenden Hämozyten *E. coli*-injizierter L5d2- & L5d3-Larven.

A: Expressionsprofil von *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in larvalen *M. sexta* Hämozyten unbehandelter L5d2-Larven (unbehandelt 0 h), unbehandelter L5d3-Larven (unbehandelt 24 h) sowie in Saline- (Kontrollgruppe) und *E. coli*-stimulierten (Experimentalgruppe) L5d2- & L5d3-Larven. Das Expressionslevel der Transkripte in mRNA-Proben von Hämozyten wurde jeweils zusammen mit *eEF1A* mittels RT-PCR analysiert. Je Zeitpunkt (Treatment) wurde total-RNA aus den gepoolten Hämozyten von sieben Larven (Kohorte) der Experimental- bzw. Kontrollgruppe extrahiert. Je RT-PCR-Reaktion wurden 12,5 ng total-RNA-Extrakt zur Amplifikation von Transkript verwendet. Die Grauwerte der RT-PCR-Banden wurden mit ImageJ2 quantifiziert und semiquantitativ (B' – D') ausgewertet. Zur bakteriellen Stimulation wurde unbehandelten L5d2-Larven eine Suspension aus PFA-abgetöteten *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻ in einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien/g Körpergewicht injiziert. Zur Kontrolle wurde sterile Saline (MS⁻) injiziert. **B – F:** absolutes mRNA-Level (Mittelwert \pm SD) in Hämozyten, normalisiert mit *eEF1A*. **B' – D':** Relatives mRNA-Level (Mittelwert \pm SD) in Hämozyten *E. coli*-injizierter Larven, relativiert zum mRNA-Level in Hämozyten MS⁻-injizierter Larven des gleichen Treatments. Je Treatment wurden drei unabhängige RT-PCR-Replikate durchgeführt (n = 3). Für jedes RT-PCR-Replikat wurde der total-RNA-Extrakt aus den Hämozyten einer unabhängigen Tierkohorte verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels parametrischem Testverfahren (ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben-*t*-Test bei Varianzhomogenität) ermittelt und sind mit * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) und *** ($p \leq 0.001$) angegeben.

4.1.2.5 *gloverin*

Gloverin-Transkript konnte in Hämozyten unbehandelter und Saline-stimulierter L5d2- und L5d3-Larven zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). Erst 6 h bis 36 h nach *E. coli*-Injektion war *gloverin*-Transkript in Hämozyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven nachweisbar. Die höchsten absoluten mRNA-Level wurden dabei 6 h nach *E. coli*-Injektion mit $1,02 \pm 0,02$ NGE ($p_{\Delta S, Ec\ 6\ h} < 0,001$) bzw. 10 h nach *E. coli*-Injektion mit $1,05 \pm 0,05$ NGE ($p_{\Delta S, Ec\ 10\ h} < 0,001$) detektiert (Abb. 4.2 F). Die mRNA-Level 15 h, 20 h, 24 h und 36 h nach Injektion waren zunehmend niedriger.

Ergebnisfazit

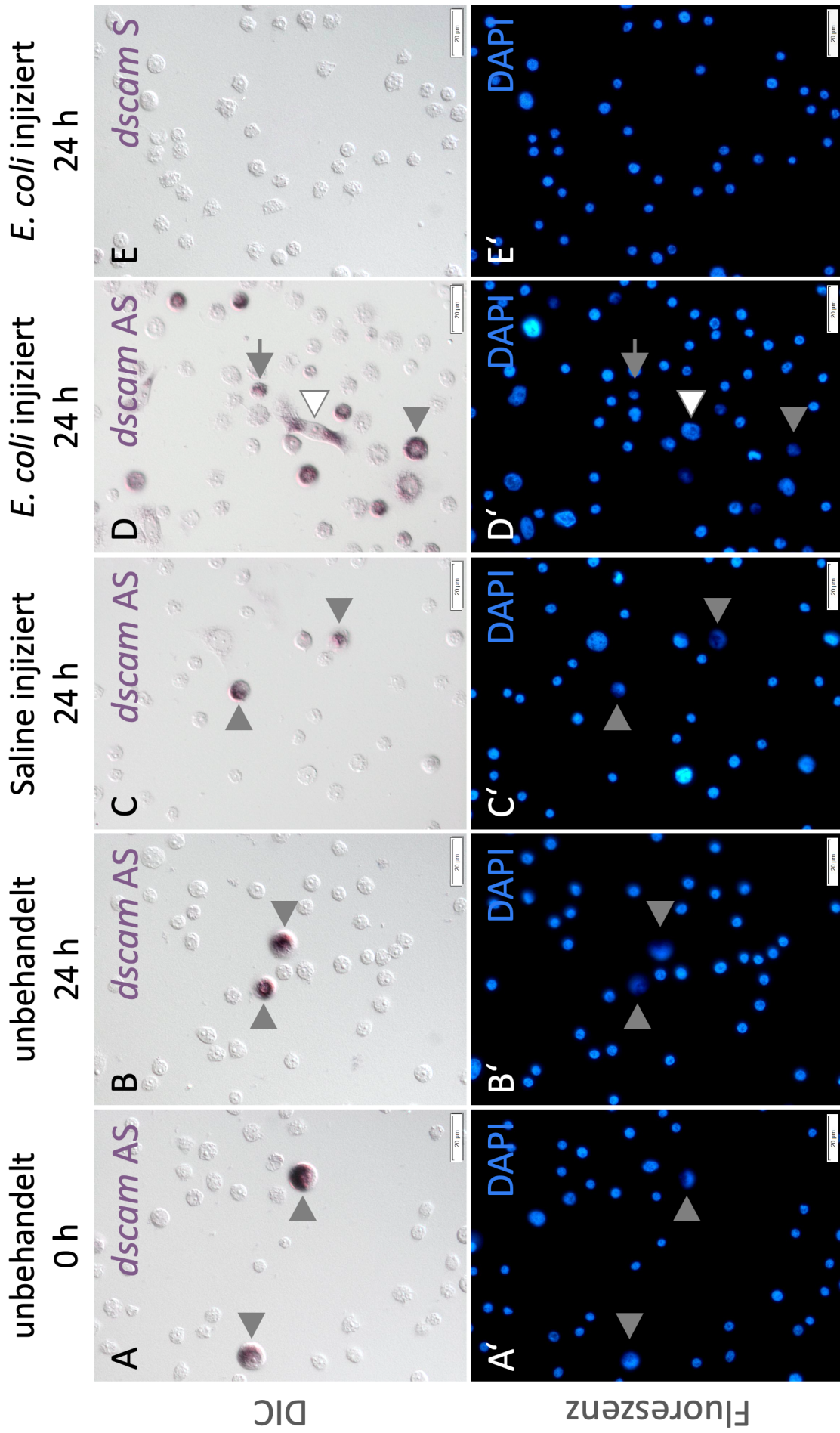
Gen	absolutes mRNA-Level am höchsten [h nach <i>E. coli</i> -Injektion]	relatives mRNA-Level	
		signifikant erhöht [h nach <i>E. coli</i> -Injektion]	am höchsten [h nach <i>E. coli</i> -Injektion]
<i>dscam</i>	24	6, 24, 36	24
<i>eater</i>	6, 20	1 – 36	6
<i>lysozym</i>	6 – 15	-	-
<i>attacin</i>	6	nicht quantifizierbar	
<i>gloverin</i>	6, 10	nicht quantifizierbar	

4.1.3 Differenzielle Expression von *dscam* in Hämozyten bakteriell stimulierter Larven

Fragestellung

Wie groß ist der Anteil zirkulierender, *dscam* exprimierender Hämozyten bakteriell stimulierter Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion?

Auf der Grundlage des Expressionsprofils von *dscam* in Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d2/3-Larven (Abb. 4.2) wurde die Expression von *dscam* zusätzlich mittels chromogener *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *dscam*-antisense-RNA-Sonde (*dscam* Exon 31 – 34, Transmembrandomäne) in Hämozyten unbehandelter, Saline-stimulierter und bakteriell stimulierter *M. sexta* Larven *in situ* analysiert (Abb. 4.3 A – D). Zur Sondenkontrolle wurden die Hämozyten mit einer revers komplementären *dscam*-sense-RNA-Sonde (*dscam* Exon 9 – 11) hybridisiert (Abb. 4.3 E). Anschließend wurde der prozentuale Anteil *dscam* exprimierender Hämozyten (DHC_{dscam}) berechnet (Abb. 4.3 F). Expression von *dscam* wurde in $2,5 \% \pm 0,7 \%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der zirkulierenden Hämozyten unbehandelter L5d2-Larven (unbehandelt 0 h, Abb. 4.3 A – A') und $2,4 \% \pm 0,8 \%$ der zirkulierenden Hämozyten unbehandelter L5d3-Larven (unbehandelt 24 h, Abb. 4.3 B – B') detektiert. 24 h nach Injektion steriler MS^- war *dscam* in $4,1 \% \pm 1,7 \%$ der zirkulierenden Hämozyten Saline-stimulierter L5d3-Larven (Saline injiziert 24 h) exprimiert (Abb. 4.3 C – C'). Morphologisch handelte es sich bei den *dscam* exprimierenden Hämozyten unbehandelter und MS^- -stimulierter L5d2- & L5d3-Larven um große, im Querschnitt kreisrunde Zellen mit mittelgroßem bis großem, rundem Zellkern (Abb. 4.3 A, A' – C, C', graue Pfeilspitze). 24 h nach Injektion PFA-abgetöteter *E. coli* konnte die Expression von *dscam* in $22,1 \% \pm 1,9 \%$ der zirkulierenden Hämozyten bakteriell stimulierter L5d3-Larven (*E. coli* injiziert 24 h) detektiert werden (Abb. 4.3 D – D'). Unter den *dscam* exprimierenden Hämozyten konnten nach *E. coli*-Injektion drei unterschiedliche Subpopulationen aufgrund der Zell- und Zellkernmorphologie identifiziert werden: Große, spindelförmig gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern (Abb. 4.3 D – D', weiße Pfeilspitze); kleine bis mittelgroße Hämozyten mit kleinem, rund bis unregelmäßigem Zellkern (grauer Pfeil) und mittelgroße bis große, runde Hämozyten mit mittelgroßem bis großem, rundem Zellkern (graue Pfeilspitze). Insgesamt war der DHC_{dscam} *E. coli*-stimulierter Larven mit $22,1 \%$ *dscam* exprimierenden Hämozyten signifikant ($p < 0.001$) erhöht verglichen mit der Saline-Kontrolle (Abb. 4.3 F). Zwischen unbehandelten und Saline-stimulierten L5d3-Larven konnte kein signifikanter Unterschied im DHC_{dscam} festgestellt werden ($p = 0.22$).



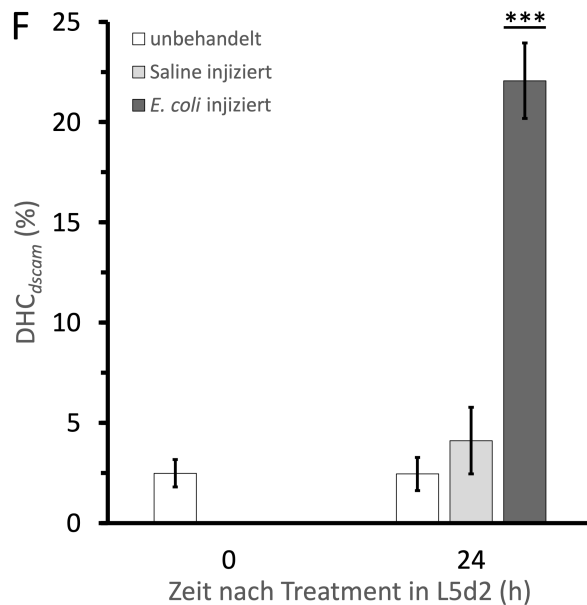


Abbildung 4.3, inkl. vorherige Seite: *In situ* Expressionsanalyse von *dscam* in zirkulierenden Hämozyten *E. coli*-injizierter L5d3-Larven.

A – E: Chromogene *in situ*-Hybridisierung (CISH) larvaler *M. sexta* Hämozyten un behandelter L5d2-Larven (unbehandelt 0 h, A – A'), un behandelter L5d3-Larven (unbehandelt 24 h, B – B'), Saline-stimulierter L5d3-Larven 24 h nach MS-Injektion (Saline injiziert 24 h, C – C') und bakteriell stimulierter L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion (*E. coli* injiziert 24 h, D, D' – E, E'), visualisiert mittels Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (DIC). Zur bakteriellen Stimulation wurde un behandelten *M. sexta* L5d2-Larven eine Suspension aus PFA-abgetöteten *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻ in einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien/g Körpergewicht injiziert. Zur Kontrolle wurden un behandelte Lar-

ven des gleichen Entwicklungsstadiums (L5d2) mittels Injektion steriler Saline (MS⁻) stimuliert. Pfeile: *Dscam* exprimierende Hämozyten. Der Pfeiltyp bezieht sich auf den Hämozytentyp. Der Messbalken entspricht 20 μ m. **A' – E':** Hämozyten-Zellkerne, markiert mit DAPI, visualisiert mittels Fluoreszenzmikroskopie. **F:** Anteil *dscam* exprimierender Hämozyten an der Gesamtpopulation der zirkulierenden Hämozyten (DHC_{dscam}). Je Treatment wurden die Hämozyten von 3 Larven ($n = 3$) analysiert, je Larve wurden 1500 Hämozyten ausgewertet. Die Daten jeder Stichprobe (DHC_{dscam} von 3 Larven je Treatment) sind als Mittelwert (MW, Balken) \pm Standardabweichung der Stichprobe (SD, Whisker) dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels parametrischem Testverfahren (ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben-*t*-Test bei Varianzhomogenität) ermittelt und sind mit * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) und *** ($p \leq 0.001$) angegeben.

Nach Hybridisierung mit der *dscam*-sense-RNA-Sonde konnten bei gleicher Entwicklungszeit keine Hämozyten mit positiver chromogener Markierung detektiert werden (Abb. 4.3 E).

Ergebnisfazit

- Anteil *dscam* exprimierender Hämozyten (DHC_{dscam}):
 - Unbehandelt 0 h (L5d2): 2,5 % \pm 0,7 %
 - Unbehandelt 24 h (L5d3): 2,4 % \pm 0,8 %
 - Saline injiziert 24 h (L5d3): 4,1 % \pm 1,7 % ($p = 0.22$)
 - *E. coli* injiziert 24 h (L5d3): 22,1 % \pm 1,9 % ($p < 0.001$)

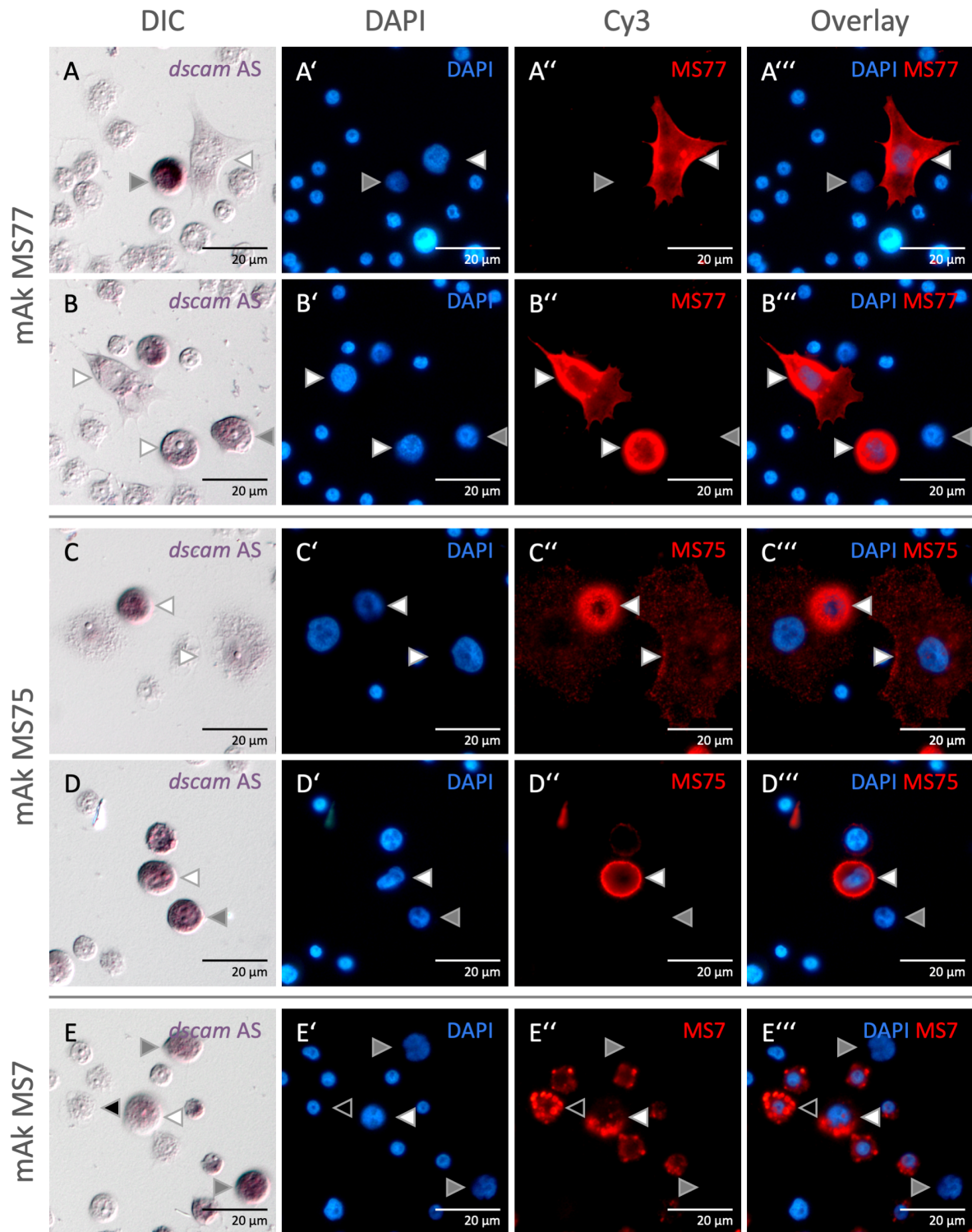
4.1.4 Immunzytochemische Charakterisierung *dscam*-exprimierender Hämozyten bakteriell stimulierter Larven

Fragestellung

In welchen zirkulierenden Hämozyten-Subpopulationen bakteriell stimulierter Larven ist *dscam* 24 h nach *E. coli*-Injektion exprimiert?

Zur Identifizierung der Population der zirkulierenden, *dscam* exprimierenden Hämozyten wurden Hämozyten-Monolayer bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion mittels chromogener *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *dscam*-antisense-RNA-Sonde (Transmembrandomäne: Exon 31 – 34) hybridisiert (Abb. 4.4 A – E). Zur Sondenkontrolle wurden die Hämozyten mit einer *dscam*-sense-RNA-Sonde (Exon 9 – 11) hybridisiert (Abb. 4.3 E). Anschließend wurden die Hämozyten zur Identifizierung von Subpopulationen mittels indirekter Immunmarkierung mit den murinen monoklonalen Antikörpern (mAk) MS77, MS75 und MS7 markiert. Zur bakteriellen Stimulation wurde unbehandelten L5d2-Larven eine Suspension aus PFA-abgetöteten und FITC-markierten *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻ entsprechend einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien/g Körpergewicht injiziert.

Insgesamt konnten in der Population der zirkulierenden, *dscam*-exprimierenden Hämozyten bakteriell stimulierter L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion MS77-, MS75- und MS7-positive Hämozyten detektiert werden (Abb. 4.4). Markierung mit dem mAk MS77 zeigte, dass es sich bei der Subpopulation der MS77-positiven, *dscam*-exprimierenden Hämozyten um große, gespreitete und nicht gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern handelte (Abb. 4.4 A – A^{'''}, B – B^{'''}, weiße Pfeilspitze). MS77-positive Hämozyten, in denen kein chromogenes Signal sichtbar war, das heißt keine Expression von *dscam* nachweisbar war, konnten nicht detektiert werden. Nicht alle *dscam* exprimierenden Hämozyten waren allerdings auch MS77-positiv. So konnten große, runde bis ovale, nicht gespreitete Hämozyten mit mittelgroßem, unregelmäßigem bis rundem Zellkern und stark ausgeprägtem chromogenem Signal als MS77-negativ identifiziert werden (Abb. 4.4 A – A^{'''}, B – B^{'''}, graue Pfeilspitze). Markierung mit dem mAk MS75 zeigte, dass es sich bei der Subpopulation der MS75-positiven, *dscam* exprimierenden Hämozyten um großflächig gespreitete und mittelgroße, runde, nicht gespreitete Hämozyten mit mittelgroßem bis großem, unregelmäßigem Zellkern handelte (Abb. 4.4 C – C^{'''}, D – D^{'''}, weiße Pfeilspitze). MS75-positive Hämozyten, in denen keine Expression von *dscam* nachweisbar war, konnten nicht detektiert werden. Mittelgroße, runde, nicht gespreitete Hämozyten mit mittelgroßem, rundem Zellkern und stark ausgeprägtem chromogenem Signal konnten als MS75-negativ identifiziert werden (Abb. 4.4 D – D^{'''}, graue Pfeilspitze).



Legende

- ◁ Hämozyte ist *dscam*-positiv & mAk-positiv
- ◄ Hämozyte ist *dscam*-positiv & mAk-negativ
- ◼ Hämozyte ist *dscam*-negativ & mAk-positiv

Abbildung 4.4: Kombinierte CISH und Antikörpermarkierung von Hämozyten *E. coli*-injizierter L5d3-Larven. Mehrfachmarkierung zirkulierender Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion. **A – E:** Chromogene *in situ*-Hybridisierung (CISH) larvaler Hämozyten mit einer Digoxigenin-markierten *dscam*-antisense-RNA-Sonde (*dscam* AS, Transmembrandomäne: Exon 31 – 34), visualisiert mittels Differential-Interferenzkontrastmikroskopie (DIC). **A' – E':** Hämozyten-Zellkerne, markiert mit DAPI (blau), visualisiert mittels

Fluoreszenzmikroskopie. **A'' – E''**: Indirekte Immunmarkierung larvaler Hämocyten mit den murinen monoklonalen Antikörpern (mAk) MS77 (A'' – B''), MS75 (C'' – D'') und MS7 (E'') und einem Cy3-konjugierten Sekundäntikörper (rot), visualisiert mittels Fluoreszenzmikroskopie. **A''' – E'''**: Overlay von Kernfärbung und Antikörpermarkierung mit ImageJ2. Weiße Pfeilspitze: Hämocyte ist *dscam*-positiv und mAk-positiv, graue Pfeilspitze: Hämocyte ist *dscam*-positiv und mAk-negativ, schwarze Pfeilspitze: Hämocyte ist *dscam*-negativ und mAk-positiv. Der Messbalken entspricht 20 µm.

Markierung mit dem mAk MS7 zeigte, dass es sich bei der Subpopulation der MS7-positiven, *dscam* exprimierenden Hämocyten um kleine bis große, runde, nicht gespreitete Hämocyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern handelte (Abb. 4.4 E – E'', weiße Pfeilspitze). Nicht in allen MS7-positiven Hämocyten konnte allerdings auch Expression von *dscam* detektiert werden. So konnten mittelgroße, runde, gespreitete und MS7-positive Hämocyten mit kleinem, rundem Zellkern und einer hohen Anzahl markierter Granulen ohne nachweisbare Expression von *dscam* detektiert werden (Abb. 4.4 E – E'', schwarze Pfeilspitze). Mittelgroße, runde bis große, spindelförmige, nicht gespreitete Hämocyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern und stark ausgeprägtem chromogenem Signal konnten als MS7-negativ identifiziert werden (Abb. 4.4 E – E'', graue Pfeilspitze). Das Fluoreszenzsignal der FITC-markierten *E. coli* konnte nicht detektiert werden.

Ergebnisfazit

- Subpopulationen in *dscam* exprimierenden Hämocyten *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven 24 h nach Injektion:
 - MS77+
 - MS75+
 - MS7+

4.1.5 Charakterisierung MS73-positiver Hämozyten unbehandelter Larven

Fragestellung

Um welche Hämozytentypen handelt es sich bei zirkulierenden, MS73-positiven Hämozyten unbehandelter Larven?

Welche Subpopulationen der zirkulierenden, MS73-positiven Hämozyten unbehandelter Larven sind DSCAM-positiv?

Zur Charakterisierung MS73-positiver Hämozyten unstimulierter Larven wurden Monolayer von zirkulierenden Hämozyten unbehandelter *M. sexta* L5d3-Larven präpariert und enzym- und immunzytochemisch markiert (Abb. 4.5). Nach enzymzytochemischem Nachweis endogener Tyrosinase-Typ-Phenoloxidasen (PO) mit dem chromogenem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und molekularem Sauerstoff wurden die Hämozyten von Einzeltieren mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) MS73 (Maus) und polyklonalem anti-*M. sexta*-Prophenoloxidase (proPO)-Immunsereum (Kaninchen, Jiang et al. 1997) doppelmarkiert (Abb. 4.5 1A – E). Die Aktivität endogener Peroxidasen wurde dabei mit Natriumazid inhibiert. Zusätzlich wurden Hämozyten unabhängiger, gleich behandelter Einzeltiere mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem mAk MS73 (Maus) und polyklonalem anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum anti-*DmDSCAM* EC 19545 (Kaninchen, Dascenco et al. 2015), spezifisch für die extrazellulären Ig-Domänen 1 – 4 von *D. melanogaster* *Dscam1*, doppelmarkiert (Abb. 4.5 2A – E & 3A – E). Die Spezifität des Antikörpers anti-*DmDSCAM* EC 19545 wurde vorab mittels indirekter Immunfluoreszenz an *D. melanogaster* und *M. sexta whole-mount* Embryonen validiert (Abb. 12.6 A & 12.6 B im Appendix). Antigenspezifische Primärantikörper wurden mit Alexa Fluor 488- (grün) und DyLight 549-konjugierten Sekundärantikörpern (rot) markiert. Hämozyten-Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. Die mikroskopische Analyse der Fluoreszenzmarkierungen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Abb. 4.5 1 & 2) und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Abb. 4.5 3).

Anhand des zytoplasmatisch lokalisierten chromogenen Signals von oxidiertem und polymerisiertem DAB (braunes Präzipitat) konnten nach enzymzytochemischem Nachweis endogener PO ausschließlich mittelgroße bis große, runde, ungespreitete Hämozyten mit großem Zellkern als PO-positiv identifiziert werden (Abb. 4.5 1A & B, weiße Pfeilspitze). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse PO-positiver Hämozyten zeigte dabei Kolokalisationen der MS73- und proPO-Markierung (Abb. 4.5 1C – E, weiße Pfeilspitze). Vielmehr konnte keine PO-positiv Hämozyte detektiert werden, die nicht auch proPO- und MS73-positiv war (eigene Beobachtung). Bezüglich der Charakteristik der Antikörpermarkierungen konnte infolge der Inkubation mit dem mAk MS73 eine membranständige Markierung mit einzelnen markierten Spots mit hoher Fluoreszenzintensität detektiert werden (Abb. 4.5 1C, weiße Pfeilspitze), während

die Inkubation mit anti-*M. sexta*-proPO-Immunsereum zur zytoplasmatischen Markierung führte (Abb. 4.5 1D, weiße Pfeilspitze). Die Lokalisation (membranständige vs. Zytoplasmatische Markierung) der markierten Spots konnte auf der Grundlage der epifluoreszenzmikroskopischen Analyse nicht ausgewertet werden. Ebenso konnte die Zellkernmorphologie dieser dreifach-positiv markierten Hämocyten-Population aufgrund von Fluoreszenz-Quenching-Effekten zytoplasmatisch lokalisierter chromogener Präzipitate nicht ausgewertet werden (Abb. 4.5 1B, weiße Pfeilspitze).

Außer der Population der PO-, proPO- und MS73-positiven Hämocyten konnten kleine bis mittelgroße, runde, ungespreitete Hämocyten mit kleinem bis mittelgroßem, unregelmäßig rundem Zellkern als MS73-positiv identifiziert werden (Abb. 4.5 1A – C, graue Pfeilspitze). Die Charakteristik der MS73-Markierung unterschied sich allerdings von den zuvor beschriebenen dreifach-positiven Hämocyten, insofern bei Hämocyten dieser Population keine membranständige Markierung, sondern ausschließlich vereinzelte markierte Spots detektierbar waren (Abb. 4.5 1C, graue Pfeilspitze). Hämocyten dieser Population waren weder PO- noch proPO-positiv (Abb. 4.5 1A & D, graue Pfeilspitze).

MS73-Markierungen von Hämocyten unabhängiger, gleich behandelter L5d3-Larven ohne enzymzytochemischen Nachweis endogener PO bestätigten mittelgroße bis große, runde, ungespreitete Hämocyten mit mittelgroßem bis großem, rundem Zellkern als MS73-positiv (Abb. 4.5 2A – C & 3A – C, weiße Pfeilspitze). Hämocyten dieser Population konnten ebenfalls als DSCAM EC-positiv identifiziert werden (Abb. 4.5 2D & 3D, weiße Pfeilspitze). Konfokale Analysen MS73- und DSCAM EC-positiver Hämocyten zeigen, dass es sich sowohl bei MS73 als auch bei DSCAM um eine membranständige Markierung handelte (Abb. 4.5 3C & D, weiße Pfeilspitze). Kleine bis mittelgroße, ungespreitete Hämocyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern konnten erneut als MS73-positiv identifiziert werden (Abb. 4.5 3A – C, graue Pfeilspitze). Konfokale Analysen einzelner Fokusebenen (Z-Ebenen) bestätigen dabei die differente Markierungscharakteristik dieser zweiten MS73-positiven Subpopulation in Form intrazellulär markierter Spots (Abb. 4.5 3C, graue Pfeilspitze). Hämocyten dieser Zellpopulation konnten ebenfalls als DSCAM EC-positiv identifiziert werden (Abb. 4.5 3D, graue Pfeilspitze). Große, gespreitete Hämocyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern konnten hingegen als MS73-negativ identifiziert werden (Abb. 4.5 2A – C, graue Pfeilspitze). Das Signal der DSCAM EC-Markierung von Hämocyten dieser Subpopulation war schwach, weshalb diese Population nicht als eindeutig DSCAM EC-positiv identifiziert werden konnte (Abb. 4.5 2D, graue Pfeilspitze).

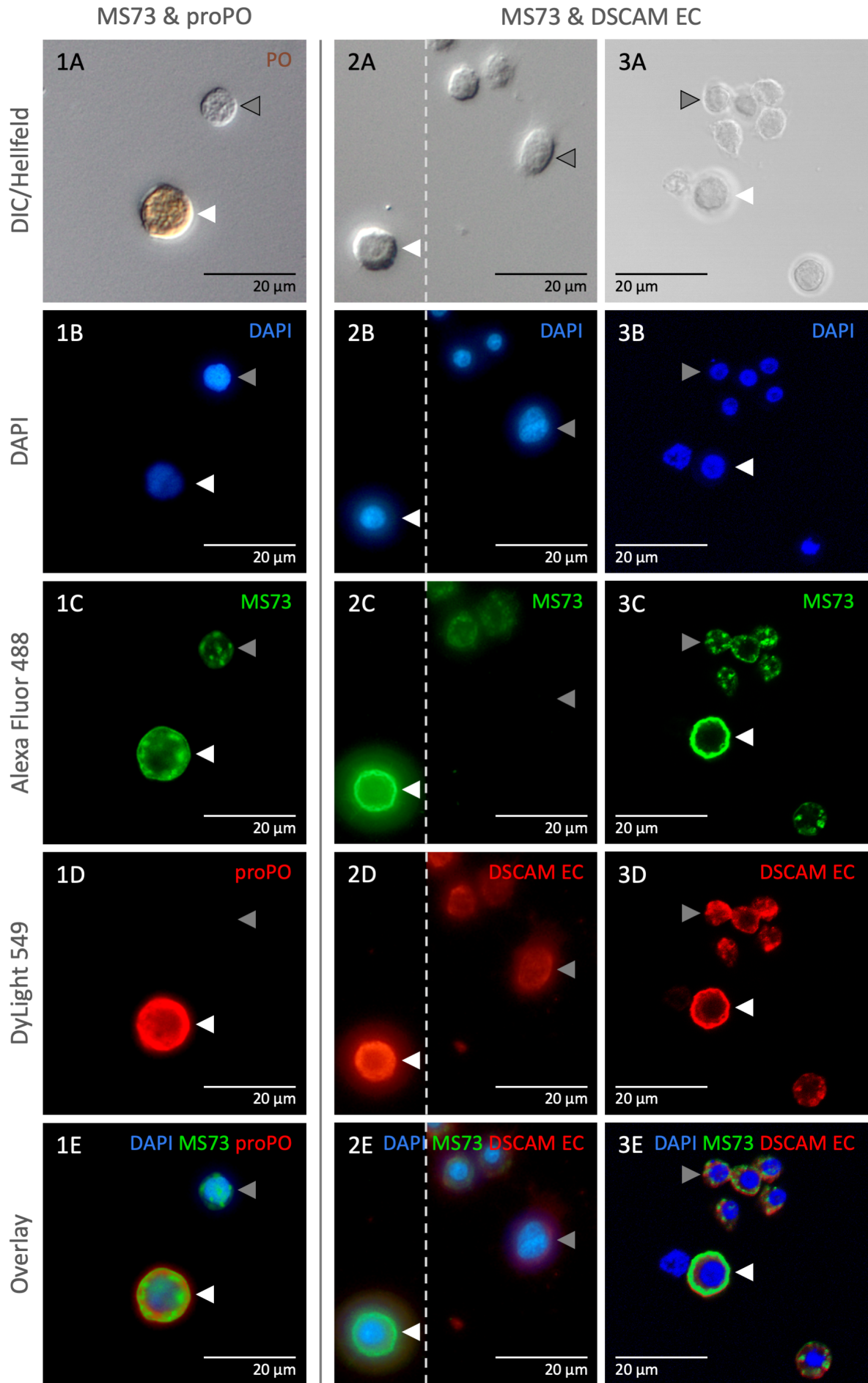


Abbildung 4.5, vorherige Seite: Enzym- und immunzytochemische Mehrfachmarkierung zirkulierender Hämozyten unbehandelter L5d3-Larven.

1: Indirekte Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung larvaler Hämozyten mit dem mAk MS73 und anti-*M. sexta*-Prophenoloxidase-Immunsereum (proPO) nach enzymzytochemischem Nachweis endogener Phenoloxidasen (PO) mit 3,3'-Diaminobenzidin und molekularem Sauerstoff. **2 & 3:** Indirekte Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung larvaler Hämozyten mit dem mAk MS73 und anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*DmDSCAM* EC 19545). **A:** Differenzial-Interferenzkontrast- bzw. Hellfeldbild. **B:** Hämozyten-Zellkerne, markiert mit DAPI (blau). **C & D:** Primäantikörper wurden mit Alexa Fluor 488- (grün) und DyLight 549-konjugierten Sekundäantikörpern (rot) markiert. **E:** Overlay von Kernfärbung und Antikörpermarkierungen mit ImageJ2. Die Analyse der Fluoreszenzmarkierungen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie (1 & 2) und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (3). **3B – E:** Einzelne Fokalebene (Z-Ebene) eines Z-Stapels. Der Messbalken entspricht 20 µm.

Ergebnisfazit

- **MS73-positive Subpopulationen:**
 - 1) große, runde, ungespreitete Hämozyten mit großem, rundem Zellkern (proPO⁺, PO⁺)
 - 2) kleine bis mittelgroße, runde, ungespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, unregelmäßig rundem Zellkern (proPO⁻, PO⁻)
- **MS73- & DSCAM-positive Subpopulationen:**
 - 1) große, runde, ungespreitete Hämozyten mit großem, rundem Zellkern
 - 2) Kleine bis mittelgroße, ungespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern

4.1.6 Muster anti-DSCAM-positiver Proteine in bakteriell stimulierten Larven

Fragestellung

In welchen Geweben und Organen unbehandelter, Saline- und *E. coli*-stimulierter Larven sind anti-DSCAM-positive Proteine nachweisbar?

Ist das Muster anti-DSCAM-positiver Proteine *E. coli*-stimulierter Larven 24 h nach Injektion qualitativ verändert?

Zum Nachweis und Vergleich des Musters anti-DSCAM-positiver Proteine larvaler Gewebe und Organe von *M. sexta* wurden das zellfreie Hämolymp plasma, zirkulierende Hämozyten, das zentrale Nervensystem, der Fettkörper und die Labialdrüsen unbehandelter L5d2- (UB 0 h) und L5d3-Larven (UB 24 h) sowie Saline- (MS⁻ 24 h) und *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven 24 h nach Injektion (EC 24 h) präpariert, die Proteine der entsprechenden Probenlysate mittels SDS-PAGE getrennt und anti-DSCAM-positive Proteine mittels Western Blot nachgewiesen. Zur bakteriellen Stimulation wurde unbehandelten L5d2-Larven eine Suspension aus PFA-abgetöteten *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻ entsprechend einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien/g Körpergewicht injiziert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Larven des gleichen Entwicklungsstadiums mittels Injektion steriler Saline (MS⁻) stimuliert. Im Anschluss an das Treatment wurden die Gewebe und Organe präpariert und entsprechend Kap. 3.8.1 lysiert und vorbereitet. Dabei wurden die Hämozyten, das zentrale Nervensystem, der Fettkörper und die Labialdrüsen von jeweils fünf Larven (Kohorte) sortenrein vereint und als Pool-Probe weiterverarbeitet, während das Hämolymp plasma als Einzeltierprobe verarbeitet wurde. Die denaturierende, elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Je Geltasche wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg Hämolymp plasma bzw. 1 mg lysiertem Gewebe aufgetragen. Als experimentelle Positivkontrolle wurde jedes Polyacrylamidgel (PA-Gel) zusätzlich mit Probenlysat aus *D. melanogaster* Embryonen der Entwicklungsstadien 13 – 17 beladen (Schmucker et al. 2000, Watson et al. 2005), während das larvale zentrale Nervensystem (ZNS) von *M. sexta* als interne Positivkontrolle verwendet wurde (Abb. 12.6 im Appendix). Nach abgeschlossener elektrophoretischer Trennung der Proteine erfolgte der Proteintransfer auf eine hydrophobe PVDF-Membran mittels Semi-Dry-Elektroblot. Zur anschließenden Immunodetektion anti-DSCAM-positiver Proteine wurden transferierte Proteine auf der PVDF-Membran mit polyklonalem anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545, Kaninchen, Dascenco et al. 2015), spezifisch für die extrazellulären Ig-Domänen 1 – 4 von *D. melanogaster* *Dscam1*, sowie mit alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Je Treatment wurden die Gewebe und Organe von drei Einzeltieren bzw. Kohorten (n = 3) analysiert. Potenziell unspezifische Markierungen wurden durch Inkubation mit dem Präimmunsereum eines unabhängigen Spenderorganismus (Abb. 12.7 im Appendix)

und mittels Sekundärantikörperkontrolle (Abb. 12.8 im Appendix) exemplarisch für alle präparierten Gewebe- und Organtypen kontrolliert.

Insgesamt konnten in allen getesteten Geweben und Organen unbehandelter L5d2-Larven sowie unbehandelter und Saline-stimulierter L5d3-Larven anti-DSCAM-positive Proteine mit gleichen Proteinmustern detektiert werden (Abb. 4.6). Unterschiede im Muster anti-DSCAM-positiver Proteine konnten im Hämolymp plasma und im Fettkörper *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven detektiert werden. Im Vergleich zu Saline-stimulierten L5d3-Larven konnten im Hämolymp plasma bakteriell stimulierter L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion keine anti-DSCAM-positiven Proteine detektiert werden (Abb. 4.6 a), während im Fettkörper *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven ein verändertes Muster anti-DSCAM-positiver Proteine nachweisbar war (Abb. 4.6 d). Detaillierte Analysen der vollständigen Muster anti-DSCAM-positiver Proteine der Gewebe und Organe aller Treatments einer Kohorte sind den Kapiteln 4.1.6.1 – 4.1.6.5 zu entnehmen.

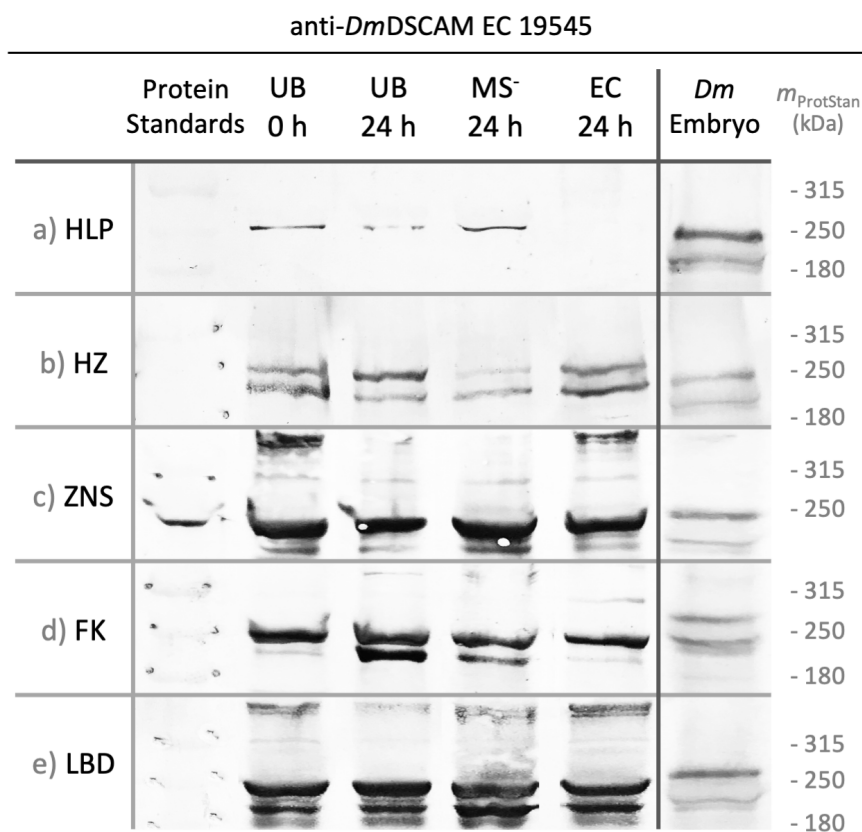


Abbildung 4.6: Western Blot-Analyse anti-DSCAM-positiver Proteinmuster in larvalen Geweben und Organen nach *E. coli*-Stimulation *in vivo*.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Zellfreies Hämolymp plasma (a), zirkulierende Hämocyten (b), das zentrale Nervensystem (c), der Fettkörper (d) und die Labialdrüsen (e) unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven (UB 0 h), unbehandelter L5d3-Larven (UB 24 h), Saline-stimulierter L5d3-Larven 24 h nach MS⁻-Injektion (MS⁻ 24 h) und bakteriell stimulierter L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion (EC 24 h) wurden als Probe verwendet. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg Hämolymp plasma bzw. 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*

Im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 250 kDa konnte im Hämolymp plasma unbehau delter L5d2-Larven sowie unbehau delter und Saline-stimulierter L5d3-Larven jeweils eine Bande mit einer relativen molekularen Masse von 253.017,7 (UB 0 h), 250.816,2 (UB 24 h) und 248.633,9 (MS⁻ 24 h) detektiert werden (Abb. 4.7, weiÙe Pfeilspitze). In äquivalenter Migrationsdistanz konnte im Probenlysat von *D. melanogaster* Embryonen (Positivkontrolle) eine Proteinbande mit einer relativen molekularen Masse von 260.666,8 detektiert werden (Abb. 4.7, schwarze Pfeilspitze). Eine korrespondierende Proteinbande in vergleichbarer Migrationsdistanz konnte im Hämolymp plasma bakteriell stimulierter L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion nicht detektiert werden (Abb. 4.7, weiÙer Pfeil). So konnten im Hämolymp plasma *E. coli*-stimulierter Larven keine anti-DSCAM-positiven Proteine detektiert werden. Im Vergleich zum Bandenmuster im zentralen Nervensystem (interne Positivkontrolle), Fettkörper und Hämozyten unbehau delter L5d3-Larven befanden sich die Hämolymp plasmabanden in vergleichbarer Migrationsdistanz zur oberen Bande der Doppelbanden, die im Bereich des 250 kDa Proteinstandards migrierte (Abb. 4.7, graue Pfeilspitze).

4.1.6.2 Zirkulierende Hämozyten

Nach Semi-Dry-Blotting elektrophoretisch getrennter Proteine larvaler, zirkulierender Hämozyten und Antikörpermarkierung mit anti-*Dm*DSCAM EC 19545 konnte ein Proteinmuster bestehend aus bis zu vier Banden je Hämozytenprobe detektiert werden (Abb. 4.8 a – d). Im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 250 und 180 kDa konnte in Hämozyten unbehau delter L5d2- und L5d3-Larven sowie Saline- und *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven 24 h nach Injektion jeweils eine Doppelbande detektiert werden (Abb. 4.8 a & b, weiÙe Pfeilspitze & weiÙer Pfeil). Die durchschnittliche relative molekulare Masse der Doppelbande betrug 225.173,81 (Abb. 4.8, weiÙe Pfeilspitze; Tab. 4.1a) bzw. 199.296,34 (Abb. 4.8, weiÙer Pfeil; Tab. 4.1b). In äquivalenter Migrationsdistanz konnte in *D. melanogaster* Embryonen (Positivkontrolle) eine Proteindoppelbande mit einer relativen molekularen Masse von 239.355,69 (Abb. 4.8, schwarze Pfeilspitze) und 208.112,78 (Abb. 4.8, schwarzer Pfeil) detektiert werden. Der Migrationsdistanz von Bande a entsprechende Proteine zirkulierender Hämozyten befanden sich in vergleichbarer Migrationsdistanz der Hämolymp plasmabande unbehau delter L5d3-Larven mit einer relativen molekularen Masse von 239.355,69 (Abb. 4.8, grauer Pfeil). Hingegen migrierten anti-DSCAM- positive Proteine von Hämozyten entsprechend Bande b in vergleichbarer Distanz einer Bande des zentralen Nervensystems unbehau delter L5d3-Larven (interne Positivkontrolle) mit einer relativen molekularen Masse von 223.188,21 (Abb. 4.8, graue Pfeilspitze). Im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 72 kDa konnte in Hämozyten unbehau delter L5d3-Larven eine Proteindoppelbande mit relativen molekularen Massen von

72.897,27 und 70.392,27 detektiert werden (Abb. 4.8 c). In vergleichbarer Migrationsdistanz konnte auch in Hämocyten *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven eine relativ schwach gefärbte Einzelbande detektiert werden. Zusätzlich konnte in den Hämocyten unbehandelter L5d3-Larven im Bereich des 42 kDa Proteinstandards eine Bande mit einer relativen molekularen Masse von 43.143,71 detektiert werden (Abb. 4.8 d).

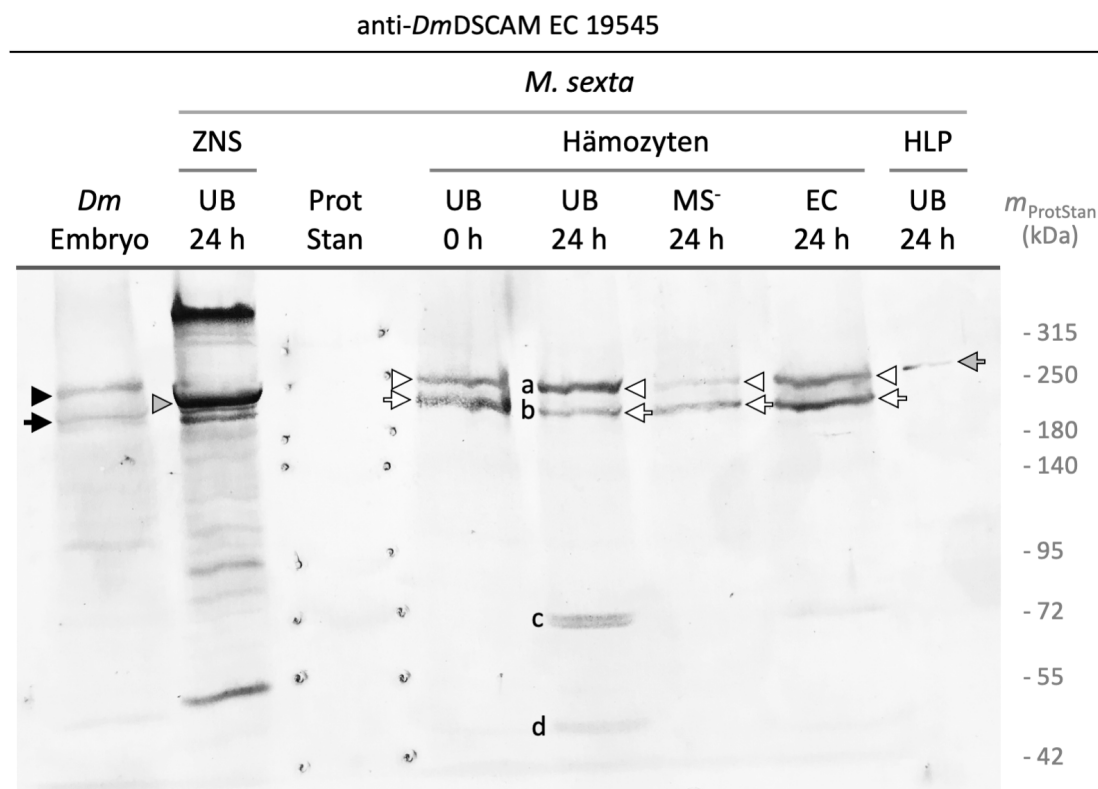


Abbildung 4.8: Western Blot-Analyse anti-DSCAM-positiver Proteinmuster in larvalen Hämocyten nach *E. coli*-Stimulation *in vivo*.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Zirkulierende Hämocyten von jeweils fünf unbehandelten *M. sexta* L5d2-Larven (UB 0 h), unbehandelten L5d3-Larven (UB 24 h), Saline-stimulierten L5d3-Larven 24 h nach MS-Injektion (MS 24 h) und bakteriell stimulierten L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion (EC 24 h) wurden als Pool-Probe verwendet. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundäntikörper inkubiert.

Abkürzungen: *Dm*, *Drosophila melanogaster*; ZNS, zentrales Nervensystem; HZ, zirkulierende Hämocyten; UB, unbehandelt; MS, Stimulation mittels Injektion von Manduca-Saline; EC, bakterielle Stimulation mittels Injektion von *E. coli*; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (*m*), angegeben in Kilodalton (kDa).

Tabelle 4.1: Relative molekulare Massen unbekannter anti-DSCAM-positiver Proteine in zirkulierenden Hämozyten.

Bande	Relative molekulare Masse anti-DSCAM-positiver Proteine: Hämozyten			
	UB 0 h	UB 24 h	MS 24 h	EC 24 h
a	231.130,63	223.188,21	223.188,21	223.188,21
b	208.112,78	200.961,33	194.055,63	194.055,63
c1		72.897,27		
c2		70.392,27		70.392,27
d		43.143,71		

4.1.6.3 Zentrales Nervensystem

Nach Semi-Dry-Blotting elektrophoretisch getrennter Proteine des larvalen zentralen Nervensystems (Abk.: ZNS) und Antikörpermarkierung mit anti-*Dm*DSCAM EC 19545 konnte ein Bandenmuster anti-DSCAM-positiver Proteine bestehend aus bis zu acht Banden je ZNS-Probe detektiert werden (Abb. 4.9 a – h). Im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 250 kDa konnte im ZNS unbehandelter L5d2- und L5d3-Larven sowie Saline- und *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven 24 h nach Injektion die Proteinbande mit dem jeweils deutlichsten Signal detektiert werden (Abb. 4.9 c & weiße Pfeilspitze). Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer durchschnittlichen relativen molekularen Masse von 225.823,76 (Abb. 4.9, weiße Pfeilspitze, Tab. 4.2 c). In vergleichsweise größerer Migrationsdistanz konnte im ZNS unbehandelter, Saline- und *E. coli*-stimulierter Larven eine zweite Proteinbande mit einer durchschnittlichen relativen molekularen Masse von 208.087,44 detektiert werden (Abb. 4.9 d & weißer Pfeil; Tab. 4.2 d). In äquivalenter Migrationsdistanz zu den Banden c & d konnte in *D. melanogaster* Embryonen (Positivkontrolle) eine Proteindoppelbande mit einer relativen molekularen Masse von 236.799,76 (Abb. 4.9, schwarze Pfeilspitze) und 206.621,26 (Abb. 4.9, schwarzer Pfeil) detektiert werden. Oberhalb der Migrationsdistanz des 315 kDa Proteinstandards konnte im ZNS unbehandelter L5d2-Larven eine zweite Proteindoppelbande mit deutlichem chromogenem Signal detektiert werden (Abb. 4.9 a). Eine äquivalente Proteindoppelbande in vergleichbarer Migrationsdistanz konnte im ZNS *E. coli*-stimulierter Larven detektiert werden (Abb. 4.9 Kreis). Im Bereich der Migrationsdistanz des 55 kDa Proteinstandards konnte im ZNS unbehandelter, Saline- und *E. coli*-stimulierter Larven eine dritte Proteinbande mit deutlich ausgeprägtem chromogenem Signal detektiert werden (Abb. 4.9 h & Dreieck). Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer durchschnittlichen relativen molekularen Masse von 50.890,73 (Abb. 4.9 Dreieck; Tab. 4.2 h). Weitere anti-DSCAM-positive Proteine konnten mit einer durch-

schnittlichen relativen molekularen Masse von 278.887,31 (Abb. 4.9 b & Kreuz), 171.892,39 (Abb. 4.9 e), 97.629,48 (Abb. 4.9 f) und 63.113,31 (Abb. 4.9 g) detektiert werden.

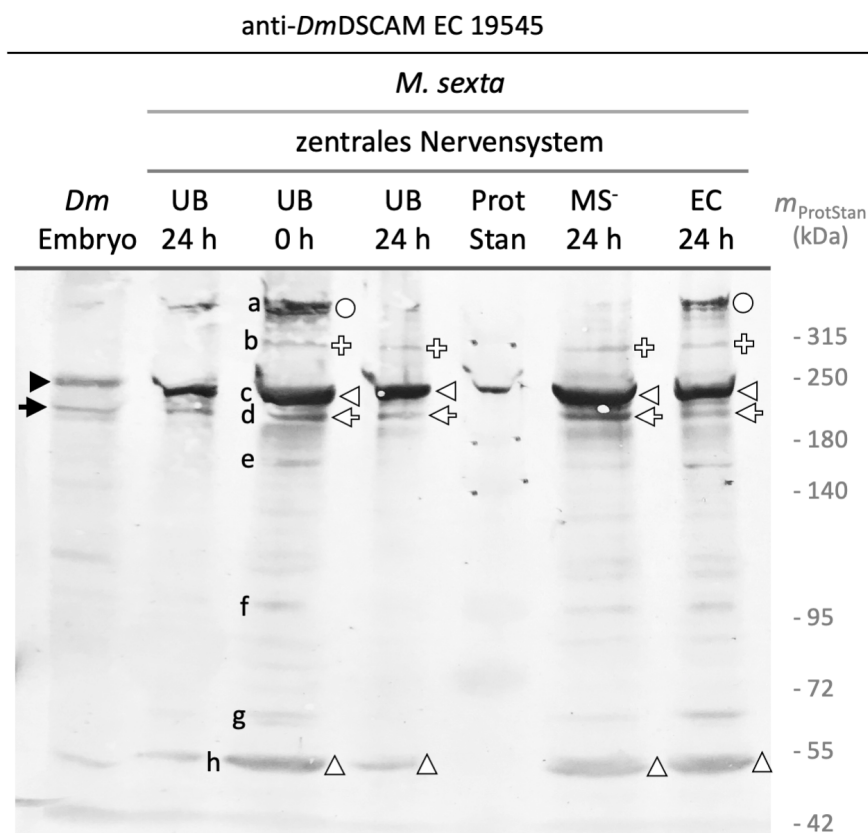


Abbildung 4.9: Western Blot-Analyse anti-DSCAM-positiver Proteinmuster im larvalen zentralen Nervensystem nach *E. coli*-Stimulation *in vivo*.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Das zentrale Nervensystem von jeweils fünf unbehandelten *M. sexta* L5d2-Larven (UB 0 h), unbehandelten L5d3-Larven (UB 24 h), Saline-stimulierten L5d3-Larven 24 h nach MS⁻-Injektion (MS⁻ 24 h) und bakteriell stimulierten L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion (EC 24 h) wurde als Pool-Probe verwendet. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Abkürzungen: *Dm*, *Drosophila melanogaster*; UB, unbehandelt; MS⁻, Stimulation mittels Injektion von Manduca-Saline; EC, bakterielle Stimulation mittels Injektion von *E. coli*; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (*m*), angegeben in Kilodalton (kDa).

Tabelle 4.2: Relative molekulare Massen unbekannter anti-DSCAM-positiver Proteine des zentralen Nervensystems.

Bande	Relative molekulare Masse anti-DSCAM-positiver Proteine: Zentrales Nervensystem			
	UB 0 h	UB 24 h	MS 24 h	EC 24 h
b	278.887,31	278.887,31	278.887,31	278.887,31
c	218.201,38	230.430,52	224.232,60	230.430,52
d	201.063,74	212.332,39	206.621,26	212.332,39
e	170.720,73			173.064,05
f	96.298,61			98.960,36
g/g1	62.252,96			63.973,67
g2	60.578,53			
h/h1	50.052,99	52.858,22	51.436,48	50.052,99
h2			50.052,99	

4.1.6.4 Fettkörper

Nach Semi-Dry-Blotting elektrophoretisch getrennter Proteine des larvalen Fettkörpers und Antikörpermarkierung mit anti-*Dm*DSCAM EC 19545 konnte ein Muster anti-DSCAM-positiver Proteine bestehend aus bis zu zwölf Banden je Fettkörperprobe detektiert werden (Abb. 4.10 a – i). Im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 250 kDa und 180 kDa konnte im Fettkörper unbehandelter, Saline- und *E. coli*-stimulierter Larven eine Proteindoppelbande detektiert werden (Abb. 4.10 b & c, weiße Pfeilspitze & weißer Pfeil). Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer durchschnittlichen relativen molekularen Masse von 222.316,29 (Abb. 4.10, weiße Pfeilspitze, Tab. 4.3 b) und 211.049,46 (Abb. 4.10, weißer Pfeil, Tab. 4.3 c). In äquivalenter Migrationsdistanz zu den Banden b & c konnte in *D. melanogaster* Embryonen (Positivkontrolle) eine Proteindoppelbande mit einer relativen molekularen Masse von 243.658,10 (Abb. 4.10, schwarze Pfeilspitze) und 222.716,36 (Abb. 4.10, schwarzer Pfeil) detektiert werden. Im Bereich des 72 kDa Proteinstandards konnte im Fettkörper unbehandelter L5d2-Larven sowie Saline- und *E. coli*-stimulierter L5d3-Larven eine Mehrfachbande bestehend aus jeweils drei Einzelbanden detektiert werden (Abb. 4.10 f & Kreis). Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer durchschnittlichen relativen molekularen Masse von 83.546,13, 79.407,03 und 75.473,00 (Abb. 4.10 Kreis, Tab. 4.3 f). Eine weitere Mehrfachbande bestehend aus jeweils zwei Einzelbanden konnte im larvalen Fettkörper aller Treatments im Migrationsbereich zwischen dem 72 kDa und 55 kDa Proteinstandard detektiert werden (Abb. 4.10 g & Kreuz). Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer durchschnittlichen relativen

molekularen Masse von 65.754,72 und 62.497,05 (Abb. 4.10 Kreuz, Tab. 4.3 g). Weitere anti-DSCAM-positive Proteine konnten mit einer durchschnittlichen relativen molekularen Masse von 176.005,35 (Abb. 4.10 d & graue Pfeilspitze), 140.053,12 (Abb. 4.10 e & grauer Pfeil), 54.003,82 (Abb. 4.10 h & Dreieck) und 44.071,22 (Abb. 4.10 i & Viereck) detektiert werden. Oberhalb des 315 kDa Proteinstandards konnte im Fettkörper unbehandelter L5d3-Larven zusätzlich eine Einzelbande detektiert werden (Abb. 4.10 a). In vergleichbarer Migrationsdistanz konnten im Fettkörper *E. coli*-stimulierter Larven zwei Einzelbanden detektiert werden, die in keinem anderen Treatment beobachtbar waren. Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine, die jeweils oberhalb (Abb. 4.10 grauer Stern) und unterhalb (Abb. 4.10 schwarzer Stern) des 315 kDa Proteinstandards migrierten.

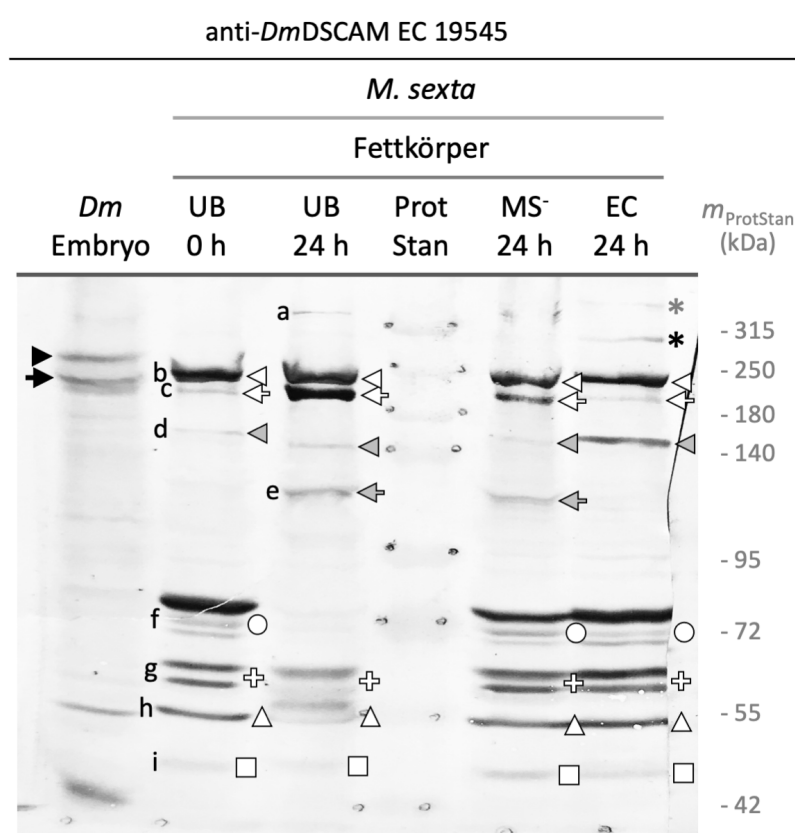


Abbildung 4.10: Western Blot-Analyse anti-DSCAM-positiver Proteinmuster im larvalen Fettkörper nach *E. coli*-Stimulation *in vivo*.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Der Fettkörper von jeweils fünf unbehandelten *M. sexta* L5d2-Larven (UB 0 h), unbehandelten L5d3-Larven (UB 24 h), Saline-stimulierten L5d3-Larven 24 h nach MS⁻-Injektion (MS⁻ 24 h) und bakteriell stimulierten L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion (EC 24 h) wurde als Pool-Probe verwendet. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert.

Abkürzungen: *Dm*, *Drosophila melanogaster*; UB, unbehandelt; MS⁻, Stimulation mittels Injektion von Manduca-Saline; EC, bakterielle Stimulation mittels Injektion von *E. coli*; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (m), angegeben in Kilodalton (kDa).

Tabelle 4.3: Relative molekulare Massen unbekannter anti-DSCAM-positiver Proteine des Fettkörpers.

Bande	Relative molekulare Masse anti-DSCAM-positiver Proteine: Fettkörper			
	UB 0 h	UB 24 h	MS 24 h	EC 24 h
b	223.445,92	223.445,92	221.186,67	221.186,67
c	215.637,98	210.228,49	208.102,89	210.228,49
d	180.505,10	171.562,40	175.976,95	175.976,95
e	-	143.610,54	136.495,69	-
f1	86.399,78	-	82.119,30	82.119,30
f2	82.119,30	-	78.050,90	78.050,90
f3	78.050,90	-	74.184,05	74.184,05
g1	67.015,58	65.334,43	65.334,43	65.334,43
g2	63.695,45	62.097,59	62.097,59	62.097,59
h	54.689,80	54.689,80	53.317,85	53.317,85
i	44.631,02	44.631,02	43.511,41	43.511,41

4.1.6.5 Labialdrüsen

Nach Semi-Dry-Blotting elektrophoretisch getrennter Proteine der larvalen Labialdrüsen und Antikörpermarkierung mit anti-*Dm*DSCAM EC 19545 konnte ein Muster anti-DSCAM-positiver Proteine bestehend aus bis zu sieben Banden je Labialdrüsenprobe detektiert werden (Abb. 4.11 a – f). Im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 250 kDa und 180 kDa konnte in den Labialdrüsen unbehandelter, Saline- und *E. coli*-stimulierter Larven eine Proteindoppelbande detektiert werden (Abb. 4.11 b & c, weiße Pfeilspitze & weißer Pfeil). Dabei handelte es sich um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer relativen molekularen Masse von 230.596,62 (Abb. 4.11 weiße Pfeilspitze) und 211.555,11 (Abb. 4.11 weißer Pfeil). In vergleichbarer Migrationsdistanz konnte im zentralen Nervensystem (interne Positivkontrolle) unbehandelter L5d3-Larven eine Proteindoppelbande bestehend aus anti-DSCAM-positiven Proteinen mit einer relativen molekularen Masse von 224.066,26 (Abb. 4.11 graue Pfeilspitze) und 207.939,81 (Abb. 4.11 grauer Pfeil) detektiert werden. Verglichen mit den Banden b & c konnte im Hämolymp plasma unbehandelter L5d3-Larven eine Bande mit größerer relativer molekularer Masse von 244.233,87 (Abb. 4.11 schwarzer Stern) detektiert werden. In äquivalenter Migrationsdistanz konnte in *D. melanogaster* Embryonen (Positivkontrolle) eine Proteindoppelbande mit relativen molekularen Massen von 251.352 (Abb. 4.11 schwarze Pfeilspitze) und 224.066,3 (Abb. 4.11 schwarzer Pfeil) detektiert werden. Weitere anti-DSCAM-positive Proteine konnten in den Labialdrüsen aller Treatments mit

durchschnittlichen relativen molekularen Massen von 110.056,98 (Abb. 4.11 d & Kreis, Tab. 4.4 d), 78.295,65 (Abb. 4.11 e & Dreieck, Tab. 4.4 e) und 64.223,62 (Abb. 4.11 f & Viereck, Tab. 4.4 f) detektiert werden. Zusätzlich konnte sowohl in den Labialdrüsenproben aller Treatments als auch im ZNS un behandelter L5d3-Larven eine Proteindoppelbande oberhalb des 315 kDa Proteinstandards detektiert werden (Abb. 4.11 a & grauer Stern). Dabei handelte es sich jeweils um anti-DSCAM-positive Proteine mit einer relativen molekularen Masse von 354.813,39 und 344.765,28 (Abb. 4.11 grauer Stern).

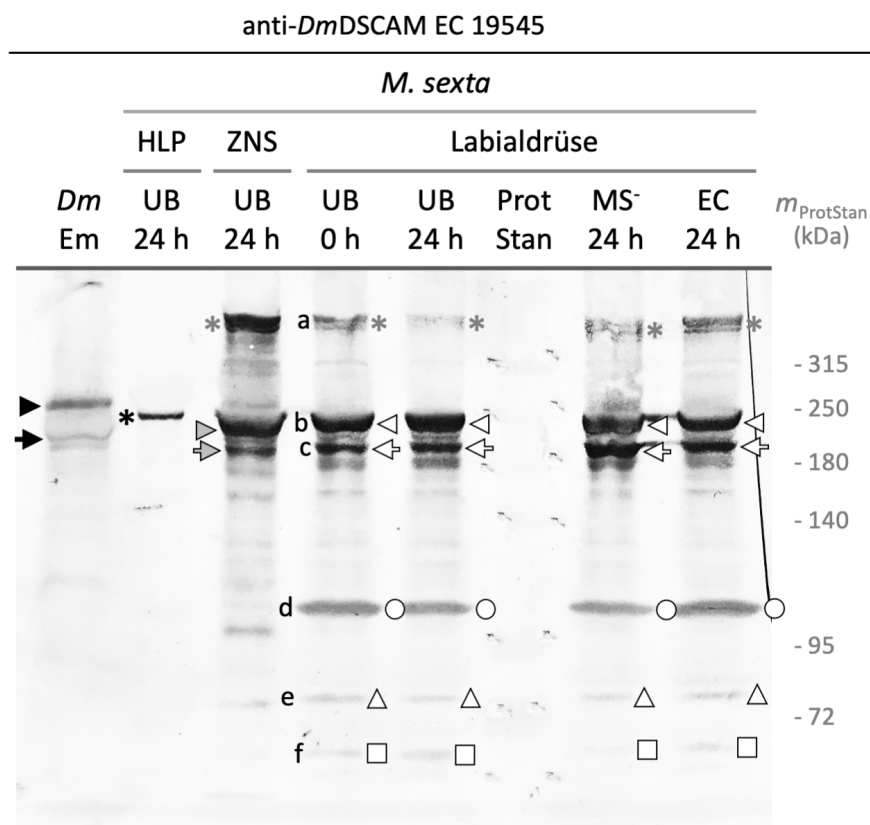


Abbildung 4.11: Western Blot-Analyse anti-DSCAM-positiver Proteinmuster in larvalen Labialdrüsen nach *E. coli*-Stimulation *in vivo*.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Die Labialdrüsen von jeweils fünf un behandelten *M. sexta* L5d2-Larven (UB 0 h), un behandelten L5d3-Larven (UB 24 h), Saline-stimulierten L5d3-Larven 24 h nach MS⁻-Injektion (MS⁻ 24 h) und bakteriell stimulierten L5d3-Larven 24 h nach *E. coli*-Injektion (EC 24 h) wurden als Pool-Probe verwendet. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immuns erum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert.

Abkürzungen: *Dm*, *Drosophila melanogaster*; HLP, zellfreies Hämolymp plasma; ZNS, zentrales Nervensystem; UB, un behandelt; MS⁻, Stimulation mittels Injektion von *Manduca*-Saline; EC, bakterielle Stimulation mittels Injektion von *E. coli*; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (*m*), angegeben in Kilodalton (kDa).

Tabelle 4.4: Relative molekulare Massen unbekannter anti-DSCAM-positiver Proteine der Labialdrüsen.

Bande	Relative molekulare Masse anti-DSCAM-positiver Proteine: Labialdrüse			
	UB 0 h	UB 24 h	MS 24 h	EC 24 h
b	230.596,62	230.596,62	230.596,62	230.596,62
c	211.555,11	211.555,11	211.555,11	211.555,11
d	112.445,27	109.260,88	109.260,88	109.260,88
e	78.295,65	78.295,65	78.295,65	78.295,65
f	63.301,17	63.301,17	65.146,07	65.146,07

Ergebnisfazit

Treatment	anti-DSCAM-positive Proteine in larvalen Geweben und Organen von <i>M. sexta</i>				
	HLP	HZ	ZNS	FK	LBD
UB 0 h	✓	✓	✓	✓	✓
UB 24 h	✓	✓	✓	✓	✓
MS 24 h	✓	✓	✓	✓	✓
EC 24 h	X	✓	✓	✓	✓

Legende: HLP, zellfreies Hämolymp plasma; HZ, zirkulierende Hämocyten; ZNS, zentrales Nervensystem; FK, Fettkörper; LBD, Labialdrüsen; UB 0 h, unbehandelte L5d2-Larven; UB 24 h, unbehandelte L5d3-Larven; MS 24 h, Saline-stimulierte L5d3-Larven 24 h nach Injektion; EC 24 h, *E. coli*-stimulierte L5d3-Larven 24 h nach Injektion; Häkchen, anti-DSCAM-positive Proteine sind nachweisbar; X, anti-DSCAM-positive Proteine sind nicht nachweisbar.

- **Muster anti-DSCAM-positiver Proteine nach *E. coli*-Stimulation**
 - **unverändert:** HZ, ZNS und LBD
 - **verändert:** HLP und FK

4.1.7 *In vitro*-Interaktion von Mikroorganismen und α DSCAM-positiven Proteinen

Fragestellung

Sind anti-DSCAM-positive Plasmaproteine an unterschiedlichen *in vitro* inkubierten Mikroorganismen proteinbiochemisch nachweisbar?

Zur Analyse der Interaktion anti-DSCAM-positiver Proteine und unterschiedlicher Typen von Mikroorganismen wurden Formalin-fixierte *S. aureus* Wood 46 (grampositiv), PFA-abgetötete *E. coli* K12 D31-Y (gramnegativ) bzw. lebende erythrozytäre Trophozoiten von *P. falciparum* NF54^{attB} *in vitro* in zellfreiem Hämolymp plasma unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven inkubiert (Abb. 12.9 im Appendix). Je Inkubationsansatz wurden Mikroorganismen einer Art in einer Plasmaprobe einer einzelnen Larve inkubiert. Abhängig von der Größe der Mikroorganismen wurden $2 \cdot 10^9$ *S. aureus*, $1 \cdot 10^9$ *E. coli* und $2,5 \cdot 10^7$ *P. falciparum* Trophozoiten je Ansatz schüttelnd inkubiert. Zur Ermittlung des Einflusses der Inkubationszeit wurden die Mikroorganismen jeweils 1 h und 12 h im Hämolymp plasma inkubiert. Zur Ermittlung der Abhängigkeit der DSCAM-Interaktion von biologischen Oberflächen wurden in einem Kontrollansatz Glas Beads im Plasma inkubiert. Zur proteinbiochemischen Analyse der DSCAM-Interaktion wurden inkubierte Mikroorganismen und Hämolymp plasmaproben anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und mittels Semi-Dry-Elektroblot auf eine PVDF-Membran transferiert. Je Geltasche wurde ein Probenvolumen entsprechend 3,33 mg Hämolymp plasma aufgetragen. Zur Immundetektion anti-DSCAM-positiver Proteine wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545, polyklonal, Kaninchen, Dascenco et al. 2015), spezifisch für die extrazellulären Ig-Domänen 1 – 4 von *D. melanogaster* Dscam1, sowie mit alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Potenziell unspezifische Markierungen wurden durch Inkubation mit dem Präimmunsereum eines unabhängigen Spenderorganismus (Abb. 12.7 im Appendix) und mittels Sekundärantikörperkontrolle (Abb. 12.8 im Appendix) exemplarisch für alle präparierten Gewebe- und Organtypen kontrolliert. Zur Kontrolle falsch positiver Interaktionen bei der Trophozoiten-Inkubation wurden humane Erythrozyten unbehandelt bzw. nach Saponin-Lyse in Hämolymp plasma inkubiert (Plasmodien-Kontrolle, Abb. 12.10 im Appendix). Je Mikroorganismus und Treatment wurden drei Replikate ($n = 3$) durchgeführt und analysiert.

Nach einstündiger *in vitro*-Inkubation von Mikroorganismen in larvalem Hämolymp plasma konnten anti-DSCAM-positive Proteine im Probenlysat von *P. falciparum* Trophozoiten detektiert werden (Abb. 4.12 c, graue Pfeilspitze). Die Proteinbande war dabei im Bereich der Migrationsdistanz standardisierter Proteine mit einer molekularen Masse von 250 und 180 kDa detektierbar (Abb. 4.12 c, graue Pfeilspitze). In vergleichbarer Migrationsdistanz konnte in den

Probenlysaten inkubierter *S. aureus* und *E. coli* ein schwaches (Abb. 4.12 a, schwarzer Stern) bzw. gar kein chromogenes Signal anti-DSCAM-positiver Proteine detektiert werden (Abb. 4.12 b). Nach *in vitro*-Inkubation für 12 h konnten anti-DSCAM-positive Proteine hingegen in den Probenlysaten aller drei inkubierten Mikroorganismen nachgewiesen werden (Abb. 4.12 a – c, weiße Pfeilspitze).

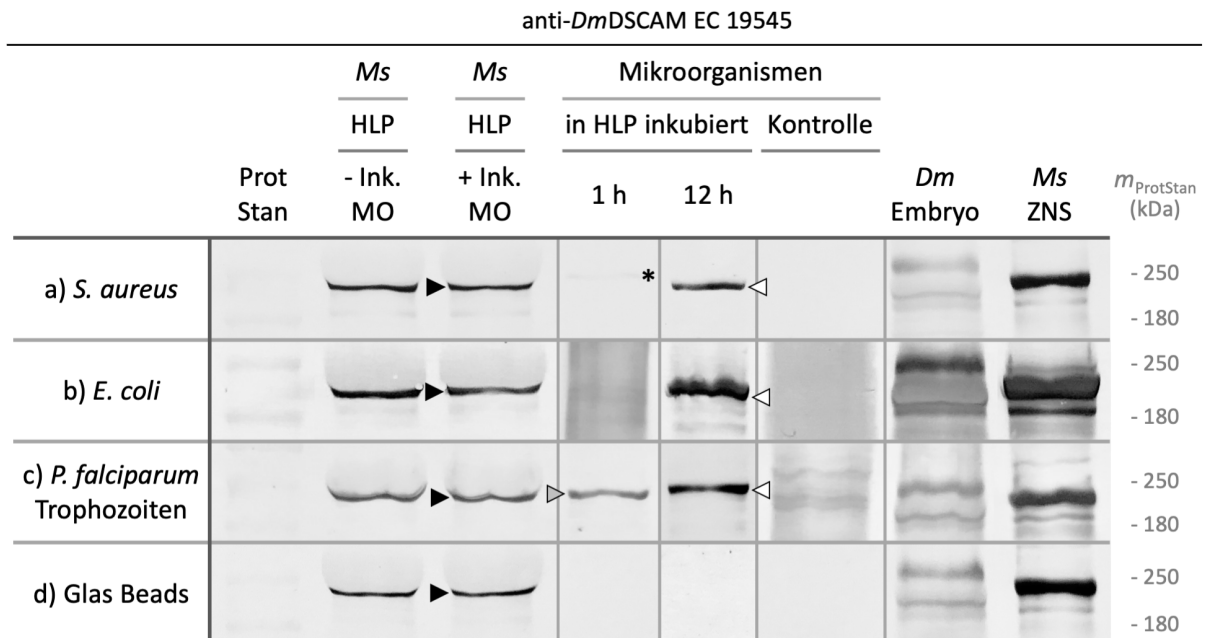


Abbildung 4.12: Western Blot-Analyse von Mikroorganismen nach Hämolympplasmainkubation *in vitro*.

Western Blot nach elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Formalin-fixierte *S. aureus* Wood 46 (a), Formaldehyd-fixierte *E. coli* K12 D31-Y (b), lebende Trophozoiten von *P. falciparum* NF54^{attB} (c) und Glas Beads (d) wurden für jeweils 1 h bzw. 12 h *in vitro* in zellfreiem Hämolympplasma unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven inkubiert. Je Inkubationsansatz wurden Mikroorganismen eines Typs im Plasma einer einzelnen Larve inkubiert. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundäntikörper inkubiert. Anti-DSCAM-positive Proteine sind mit weißen, grauen und schwarzen Pfeilspitzen markiert. Je Treatment wurden drei Replikate ($n = 3$) durchgeführt und analysiert. Abkürzungen: *Ms*, *Manduca sexta*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; HLP, zellfreies Hämolympplasma; ZNS, zentrales Nervensystem; - Ink. MO, ohne *in vitro*-Inkubation von Mikroorganismen (Plasmakontrolle); + Ink. MO, nach *in vitro*-Inkubation von Mikroorganismen (Inkubationskontrolle); ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (m), angegeben in Kilodalton (kDa).

Die Proteinbanden inkubierter *S. aureus*, *E. coli* und *P. falciparum* Trophozoiten waren dabei im Bereich der Migrationsdistanz der 250 kDa und 180 kDa Proteinstandards detektierbar. In vergleichbarer Migrationsdistanz waren in den Hämolympplasmaproben nach *in vitro*-Inkubation derselben Mikroorganismen ebenfalls anti-DSCAM-positive Proteine detektierbar (Inkubationskontrollen, Abb. 4.12 a – c, schwarze Pfeilspitze). Im Vergleich zu anti-DSCAM-positiven Proteinen in Plasmaproben ohne Inkubation von Mikroorganismen (Plasmakontrollen) konnte kein Unterschied in der Migrationsdistanz bzw. der relativen molekularen Masse detektiert werden (*Ms* HLP -Ink. MO). Unter gleichen experimentellen Bedingungen konnten in Probenlysaten nicht inkubierter Kontroll-Mikroorganismen und Glas Beads sowie in Glas

Bead-Kontrollen 1 h bzw. 12 h nach Plasmainkubation keine anti-DSCAM-positiven Proteine detektiert werden (Abb. 4.12 a – d).

Ergebnisfazit

- Nach *in vitro*-Inkubation von Mikroorganismen in larvalem Hämolymp plasma für 12 h sind anti-DSCAM-positive Proteine an inkubierten *S. aureus*, *E. coli* und *P. falciparum* Trophozoiten detektierbar.

4.2 Sektion II: Differenzielle Analyse larvaler Hämozyten nach systemischer *E. coli*-Stimulation

4.2.1 2D-Analyse: Zell-Bakterien-Kolokalisation

Fragestellung

Wie groß ist der Anteil zirkulierender, *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten bakteriell stimulierter Larven im Verlauf von 24 h nach *E. coli*-Injektion?

Welche zirkulierenden Hämozyten-Subpopulationen *E. coli*-stimulierter Larven sind im Verlauf von 24 h nach Injektion als *E. coli*-kolokalisiert detektierbar?

Zur Charakterisierung zirkulierender, *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* Larven wurden Hämozyten-Monolayer von L5d2- und L5d3-Larven an ausgewählten Zeitpunkten im Verlauf von 24 h (1 h, 6 h, 10 h, 15 h, 20 h & 24 h) nach *E. coli*-Injektion präpariert. Zur bakteriellen Stimulation wurde unbehandelten L5d2-Larven eine Suspension aus Formaldehyd-abgetöteten, FITC (grün)-markierten *E. coli* K12 D31-Y in MS⁻ entsprechend einer Dosis von $2 \cdot 10^7$ Bakterien / g Körpergewicht injiziert. Präparierte larvale Hämozyten wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immenserum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545, Kaninchen, Dascenco et al. 2015), spezifisch für die extrazellulären Ig-Domänen 1 – 4 von *D. melanogaster* Dscam1, und Dy Light 549-konjugiertem Sekundärantikörper (rot) markiert (Abb. 4.13 A' – F'). Die Spezifität des Primärantikörpers anti-*Dm*DSCAM EC 19545 wurde vorab mittels indirekter Immunfluoreszenz an *D. melanogaster* und *M. sexta whole-mount* Embryonen validiert (Abb. 12.6 A & B im Appendix). Hämozyten-Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert (Abb. 4.13 A' – F'). Die mikroskopische Analyse der Hämozyten-Monolayer erfolgte mittels Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (DIC, Abb. 4.13 A – F) und Epifluoreszenzmikroskopie (Abb. 4.13 A' – F'). Potenziell phagozytotisch aktive Hämozyten wurden anhand von Kolokalisation mit FITC-markierten *E. coli* identifiziert (weiße Pfeilspitze). Zur Quantifizierung *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten wurde der totale Phagozytoseindex_{*E. coli*} (total-PI_{*E. coli*}) für die Gesamtpopulation der zirkulierenden Hämozyten berechnet (Abb. 4.13 G). Je Larve wurden 1500 Hämozyten mittels digitaler Zytometrie mit dem ImageJ2-Plug-in *Cell Counter* auf Kolokalisation mit FITC-markierten *E. coli* analysiert. Je Treatment wurden die Hämozyten von drei Larven (n = 3) analysiert. Der total-PI_{*E. coli*} wurde als Mittelwert ± Standardabweichung des prozentualen Anteils *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten an der Gesamtpopulation der zirkulierenden Hämozyten dargestellt (Abb. 4.13 G).

Insgesamt war der total-PI_{*E. coli*} von L5d2-Larven 10 h nach *E. coli*-Injektion mit $8,58 \pm 2,88$ % *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten am höchsten (Abb. 4.13 G). Bei der Population der *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten handelte es sich allgemein um große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern (Abb. 4.13 A & A', weiße Pfeilspitze) sowie um kleine bis

mittelgroße Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern (Abb. 4.13 B & B', weiße Pfeilspitze).

4.2.1.1 1 h post Injektion

1 h nach *E. coli*-Injektion konnten in der Population der zirkulierenden Hämozyten stimulierter L5d2-Larven $2,19 \pm 0,17$ % *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten detektiert werden (Abb. 4.13 G). Größtenteils handelte es sich dabei um große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern (Abb. 4.13 A & A', weiße Pfeilspitze). Kolokalisiert mit den wenigen zirkulierenden Hämozyten dieser Subpopulation konnten unbestimmbar große Anzahlen *E. coli* detektiert werden. Die für *E. coli* charakteristische Morphologie in Form gerader, zylindrischer, abgerundeter Stäbchen war in der Bildgebung erkennbar. Bei den Hämozyten dieser Subpopulation waren zusätzliche, kolokalisierte Zellkerne detektierbar (Abb. 4.13 A', weiße Pfeilspitze). Dabei handelte es sich um kleine bis mittelgroße, unregelmäßige Zellkerne. Kleine bis mittelgroße, ungespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern konnten in diesem Treatment als zweite *E. coli*-kolokalisierte Subpopulation identifiziert werden (persönliche Beobachtung). Kolokalisiert mit den Hämozyten dieser Subpopulation waren oft einzelne *E. coli* detektierbar. Allgemein konnten *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten auch als DSCAM-positiv identifiziert werden (Abb. 4.13 A', weiße Pfeilspitze).

4.2.1.2 6 h post Injektion

In der Population der zirkulierenden Hämozyten stimulierter L5d2-Larven 6 h nach *E. coli*-Injektion konnten $3,49 \pm 1,37$ % *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten detektiert werden (Abb. 4.13 G). Größtenteils handelte es sich dabei um kleine bis mittelgroße, leicht gespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, unregelmäßig rundem Zellkern (Abb. 4.13 B & B', weiße Pfeilspitze). Kolokalisiert mit den Hämozyten dieser Subpopulation waren ein bis wenige *E. coli* detektierbar. Die für *E. coli* charakteristische Morphologie in Form gerader, zylindrischer, abgerundeter Stäbchen war erkennbar (Abb. 4.13 B', weiße Pfeilspitze). Allgemein konnten 6 h nach Injektion kaum bis gar keine großen, gespreiteten Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern detektiert werden (persönliche Beobachtung). Die in Hämolymphe-zirkulation detektierbaren *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten konnten auch als DSCAM-positiv identifiziert werden (Abb. 4.13 B', weiße Pfeilspitze).

4.2.1.3 10 h post Injektion

10 h nach *E. coli*-Injektion konnte mit einem total-PI_{*E. coli*} von $8,58 \pm 2,88$ % der im Durchschnitt größte Anteil *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten der Testreihe detektiert werden (Abb. 4.13 G).

Größtenteils handelte es sich dabei um große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern, die 10 h nach *E. coli*-Injektion wieder in Hämolymphezirkulation detektierbar waren (Abb. 4.13 C & C', weiße Pfeilspitze). Kolokalisiert mit den Hämozyten dieser Subpopulation waren oft mehrere voneinander abgegrenzte FITC-Signale markierter *E. coli* erkennbar. Die für *E. coli* charakteristische Morphologie war nicht mehr erkennbar. Das mit den Hämozyten kolokalisierte FITC-Signal war meist ähnlich der Morphologie von Phago lysosomen detektierbar, sodass die Anzahl der kolokalisierten *E. coli* nicht mehr quantifizierbar war (Abb. 4.13 C', weiße Pfeilspitze). Zusätzlich konnte bei vielen Hämozyten dieser Subpopulation eine Kolokalisation von FITC- und DSCAM-Signal in identischer Ausprägung detektiert werden (Abb. 12.5 im Appendix). Kleine bis mittelgroße, ungespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern konnten als zweite *E. coli*-kolokalisierte Subpopulation identifiziert werden (persönliche Beobachtung). Allerdings konnten nur wenige Hämozyten dieser Subpopulation mit einzelnen kolokalisierten *E. coli* identifiziert werden. Allgemein konnten *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten auch als DSCAM-positiv identifiziert werden (Abb. 4.13 C', weiße Pfeilspitze).

4.2.1.4 15 h post Injektion

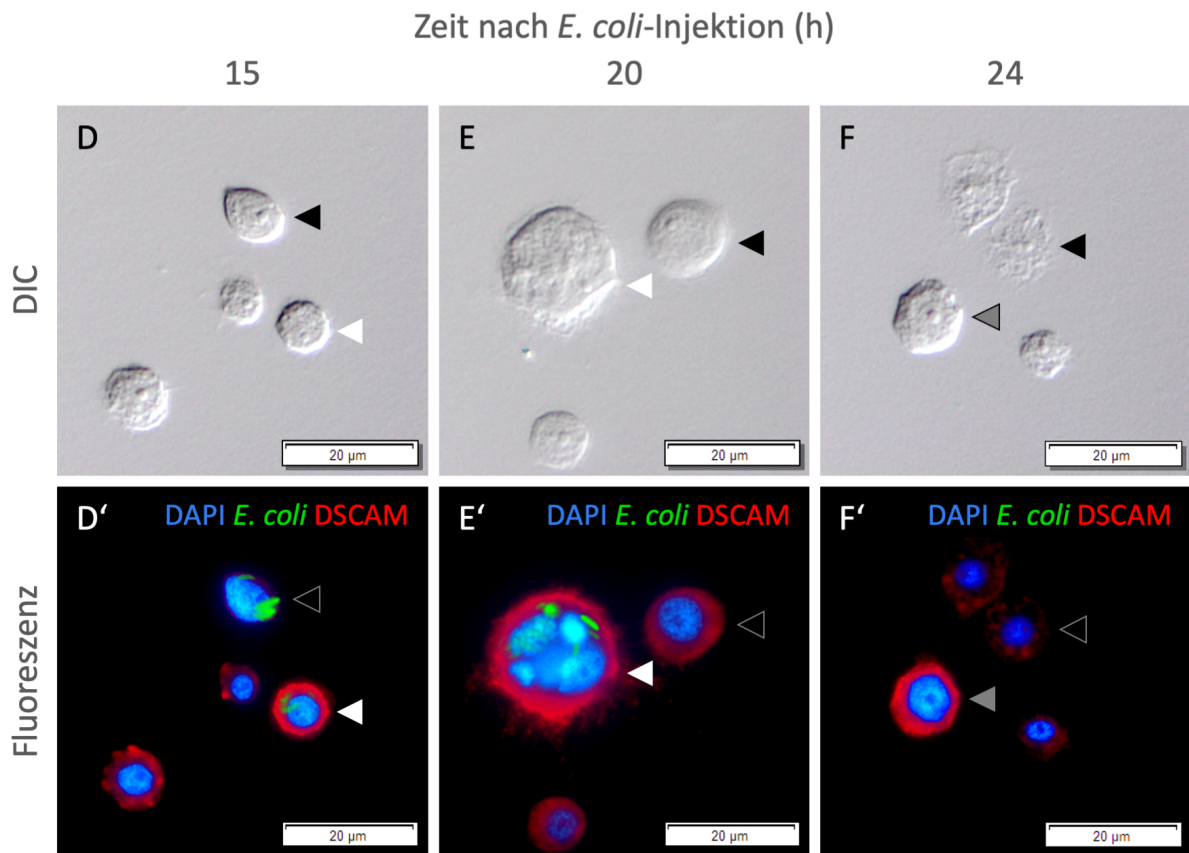
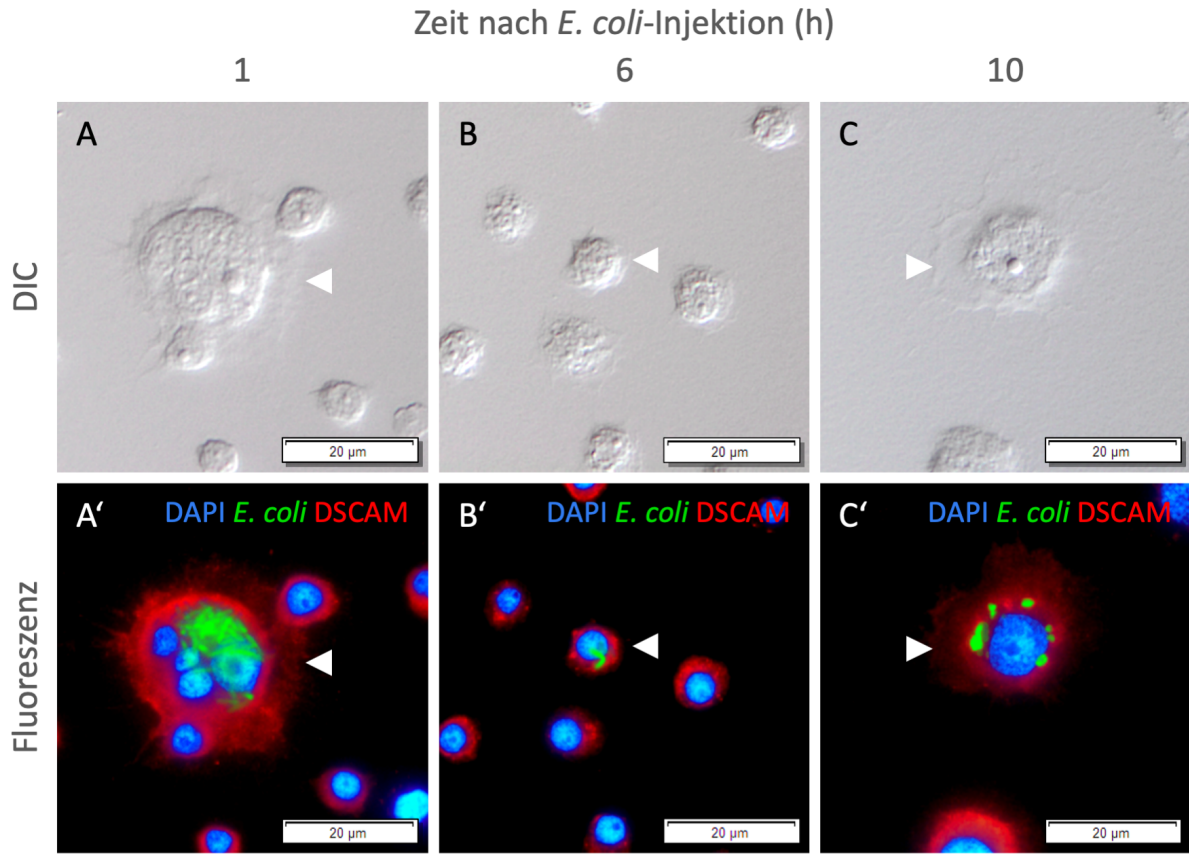
In der Population der zirkulierenden Hämozyten stimulierter L5d3-Larven 15 h nach *E. coli*-Injektion konnten $6,70 \pm 1,09$ % *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten detektiert werden (Abb. 4.13 G). In Relation zum im Durchschnitt größten, detektierbaren total-PI_{*E. coli*} 10 h nach Injektion (Kap. 4.2.1.3) war der detektierbare Anteil *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten 15 h nach Injektion geringer. Qualitativ handelte es sich beim Großteil der *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten um mittelgroße bis große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern (Abb. 4.13 D & D', schwarze Pfeilspitze). Kolokalisiert mit den Hämozyten dieser Subpopulation waren mehrere bis viele *E. coli* bzw. mehrere voneinander abgegrenzte FITC-Signale markierter *E. coli* detektierbar. Die für *E. coli* charakteristische stäbchenförmige Morphologie war teilweise erkennbar. Erstmals konnten auch DSCAM-negative Hämozyten innerhalb der Subpopulation detektiert werden (Abb. 4.13 D', schwarze Pfeilspitze). Kleine bis mittelgroße, ungespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern konnten als zweite *E. coli*-kolokalisierte Subpopulation identifiziert werden (Abb. 4.13 D & D', weiße Pfeilspitze). Nur wenige Hämozyten dieser Subpopulation konnten mit einzelnen kolokalisierten *E. coli* detektiert werden (persönliche Beobachtung). Allgemein konnten *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten auch als DSCAM-positiv identifiziert werden (Abb. 4.13 D', weiße Pfeilspitze).

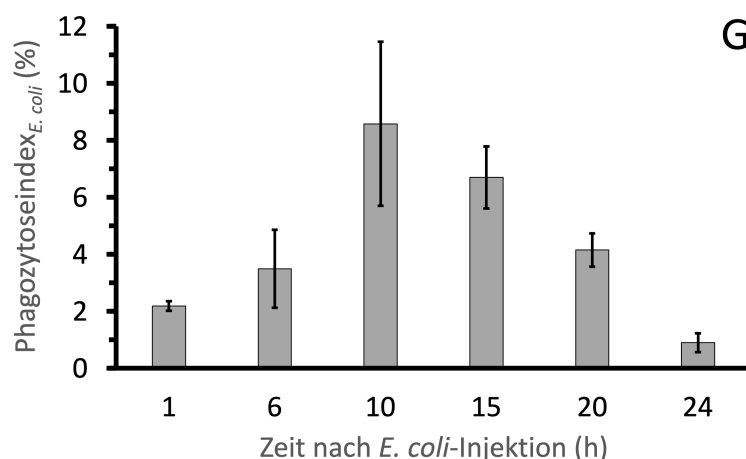
4.2.1.5 20 h post Injektion

20 h nach *E. coli*-Injektion konnten in der Population der zirkulierenden Hämozyten stimulierter L5d3-Larven $4,15 \pm 0,58$ % *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten detektiert werden (Abb. 4.13 G). Damit war der total-PI_{*E. coli*} geringer als 10 bzw. 15 h nach Injektion (Kap. 4.2.1.3 bzw. 4.2.1.4). Beim Großteil der Population der *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten handelte es sich um mittelgroße bis große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern (Abb. 4.13 E & E', weiße Pfeilspitze). Kolokalisiert mit den Hämozyten dieser Subpopulation waren mehrere bis viele *E. coli* bzw. mehrere voneinander abgegrenzte FITC-Signale markierter *E. coli* detektierbar. Die für *E. coli* charakteristische Morphologie in Form gerader, zylindrischer, abgerundeter Stäbchen war in der Bildgebung erkennbar. Bei einigen Hämozyten dieser Subpopulation waren zusätzliche kolokalisierte Fragmente von Zellkernen detektierbar (Abb. 4.13 E', weiße Pfeilspitze). Kleine bis mittelgroße, ungespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, rundem Zellkern konnten als zweite *E. coli*-kolokalisierte Subpopulation identifiziert werden (persönliche Beobachtung). Wenige Hämozyten dieser Subpopulation konnten mit einzelnen kolokalisierten *E. coli* detektiert werden (persönliche Beobachtung). Allgemein konnten *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten auch als DSCAM-positiv identifiziert werden (Abb. 4.13 E', weiße Pfeilspitze). In Relation zu den Treatments 1 h bis 15 h nach Injektion war die Signalintensität der DSCAM-Markierung heterogen ausgeprägt (Abb. 4.13 E', weiße und schwarze Pfeilspitze im Vergleich). So konnten 20 h nach *E. coli*-Injektion erstmals viele Hämozyten mit schwachem DSCAM-Signal detektiert werden (Abb. 4.13 E', schwarze Pfeilspitze).

4.2.1.6 24 h post Injektion

24 h nach *E. coli*-Injektion konnte mit einem total-PI_{*E. coli*} von $0,90 \pm 0,33$ % der im Durchschnitt geringste Anteil *E. coli*-kolokalisierte Hämozyten der Testreihe detektiert werden (Abb. 4.13 G). Dementsprechend konnten nur wenige Hämozyten mit einzelnen kolokalisierten *E. coli* bis gar keine *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten identifiziert werden (Abb. 4.13 F'). Die Signalintensität der DSCAM-Markierung war heterogen ausgeprägt, insofern sowohl DSCAM-positive als auch DSCAM-negative Hämozyten detektiert werden konnten. Bei den DSCAM-positiven Hämozyten handelte es sich größtenteils um mittelgroße, ungespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern (Abb. 4.13 F & F', graue Pfeilspitze). Bei DSCAM-negativen Hämozyten handelte es sich hingegen um kleine bis mittelgroße, ungespreitete und gespreitete Hämozyten mit kleinem bis mittelgroßem, unregelmäßig rundem Zellkern (Abb. 4.13 F & F', schwarze Pfeilspitze).





G Abbildung 4.13, inklusive vorherige Seite: Der Anteil zirkulierender, *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d2-Larven ist 10 h nach *E. coli*-Injektion am höchsten.

Charakterisierung und Quantifizierung zirkulierender, *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten bakteriell stimulierter *Manduca sexta* L5d2- und L5d3-Larven 1 – 24 h nach Injektion PFA-abgetöteter, FITC-markierter *E. coli* K12 D31-Y.

A – F: Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) larvaler Hämozyten.

A' – F': Indirekte Immunmarkierung lar-

valer Hämozyten mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsersum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und DyLight 549-konjugiertem Sekundärantikörper (rot), visualisiert mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Hämozyten-Zellkerne, markiert mit DAPI (blau). FITC-markierte *E. coli* (grün). Der Overlay von Antikörpermarkierung, Kernfärbung und FITC-markierten *E. coli* wurde mit ImageJ2 erstellt. Weiße Pfeilspitze: DSCAM-positive Hämozyte, kolokalisiert mit *E. coli*; graue Pfeilspitze: DSCAM-positive Hämozyte; schwarze Pfeilspitze: DSCAM-negative Hämozyte. Der Messbalken entspricht 20 μ m. **G:** Totaler Phagozytoseindex_{*E. coli*} (Mittelwert \pm SD) larvaler Hämozyten. Je Treatment wurden die Hämozyten von drei Larven ($n = 3$) analysiert. Je Larve wurden 1500 Hämozyten analysiert.

Ergebnisfazit

- Anteil zirkulierender, *E. coli*-kolokalisierter Hämozyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven nach *E. coli*-Injektion:
 - am höchsten: 10 h nach Injektion (total-PI_{*E. coli*}: 8,58 \pm 2,88 %)
 - am niedrigsten: 24 h nach Injektion (total-PI_{*E. coli*}: 0,90 \pm 0,33 %)
- Bei *E. coli*-kolokalisierten Hämozyten bakteriell stimulierter L5d2- und L5d3-Larven im Verlauf von 24 h nach *E. coli*-Injektion handelt es sich um:
 - große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern
 - kleine, ungespreitete Hämozyten mit kleinem, rundem Zellkern

4.2.2 3D-Analyse: Intrazelluläre Bakterienaufnahme

Fragestellung

Wie sind das DSCAM-Signal von Hämozyten und kolokalisierte Zellkern- und *E. coli*-Signale in der z-Ebene angeordnet?

Zur Bestimmung der intra- bzw. extrazellulären Lage kolokalisierter *E. coli* wurden zirkulierende Hämozyten bakteriell stimulierter *M. sexta* L5d2-Larven 1 h nach *E. coli*-Injektion mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. Daraus resultierende zweidimensionale Bildaufnahmen (xy-Ebene, Abb. 4.14 1B & C) wurden mittels z-Ebenen-Rekonstruktion und computergestütztem Clearing (THUNDER Technologie, Leica Microsystems) zu einem dreidimensionalen Bild (xyz) zusammengesetzt (Abb. 4.14 2A). Alle drei Ebenen des 3D-Bildes (xy, xz und yz) wurden separat dargestellt und die Lage der kolokalisierten *E. coli* (FITC) in Relation zum Zellkern (DAPI) und DSCAM-Signal analysiert.

In der Population der mit *E. coli* kolokalisierten Hämozyten konnten hauptsächlich große, gespreitete Hämozyten mit großem, unregelmäßigem Zellkern detektiert werden (Abb. 4.14 1A-C Pfeilspitze). Hämozyten dieser Subpopulation waren kolokalisiert mit nicht quantifizierbaren Anzahlen *E. coli* sowie mit ein, zwei oder mehreren zusätzlichen Zellkernen wie zuvor in Kap. 4.2.1.1 beschrieben (Abb. 4.14 1B Pfeilspitze, vgl. Abb. 4.13 A'). Kolokalisierte *E. coli* waren dabei anhand des FITC-Signals in Form gerader, zylindrischer, abgerundeter Stäbchen detektierbar. Im Querschnitt (xy-Ebene) der 3D-Rekonstruktion sind die *E. coli* an gegenüberliegenden Zellpolen um die Zellkerne herum angeordnet (Abb. 4.14 2B). In der orthogonalen x-Achsen-Ansicht (xz-Ebene) ist die Anordnung des FITC-Signals kolokalisierter *E. coli* (graue und schwarze Pfeilspitze) in derselben z-Ebene des Zellkernsignals (weiße Pfeilspitze) ersichtlich (Abb. 4.14 2C). *E. coli*- und Kernsignal liegen dabei unmittelbar nebeneinander und sind distal von DSCAM-Signal in derselben z-Ebene begrenzt (Abb. 4.14 2C weiße & graue Pfeilspitze). Die gleiche Anordnung zeigt sich ebenfalls in der orthogonalen y-Achsen-Ansicht (yz-Ebene), wobei die FITC-Signale mehrerer *E. coli* beiderseits distal von DSCAM-Signal begrenzt sind (Abb. 4.14 2D graue und gestreifte Pfeilspitze).

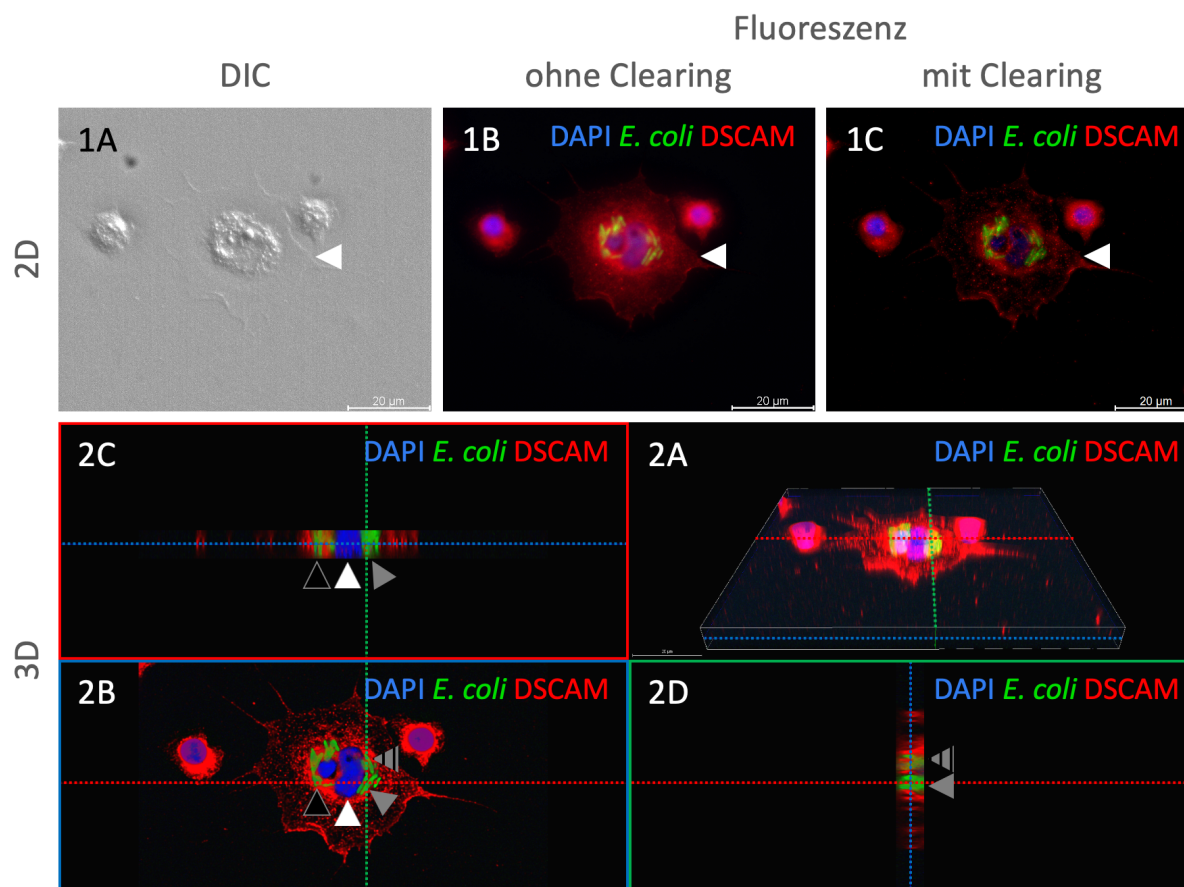


Abbildung 4.14: Vergleichende 3D-Analyse einer *E. coli*-kolokalisierten Hämocyte.

Z-Ebenen-Analyse mikroskopischer 1: 2D-Aufnahmen und 2: 2D- bzw. 3D-Rekonstruktionen einer larvalen Hämocyte und kolokalisierte *E. coli*. **1A**: Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) und **1B & C**: Epifluoreszenzmikroskopie nach Immunmarkierung von Hämocytes bakteriell stimulierter L5d2-Larven mit anti-*DmDSCAM* EC 19545 und DyLight 549-konjugiertem Sekundärantikörper (rot). Hämocytes-Zellkerne, markiert mit DAPI (blau). PFA-abgetötete, FITC (grün) markierte *E. coli* K12 D31-Y wurden zur systemischen Stimulation injiziert. Hämocytes-Monolayer wurden 1 h nach Injektion präpariert. **1B**: Einzelebeneprojektion ohne und **1C**: mit optodigitalem Clearing (THUNDER). **2A**: Z-Ebenen-Rekonstruktion (xyz) von 1C. Xy-Ebene (blaue Linie), xz-Ebene (rote Linie), yz-Ebene (grüne Linie). Einzelebeneprojektionen der **2B**: xy-Ebene, **2C**: xz-Ebene und **2D**: yz-Ebene von 2A. Overlays, THUNDER Clearing und z-Ebenen-Rekonstruktionen wurden mit LAS X erstellt. Der Messbalken entspricht 20 μm .

Ergebnisfazit

- DSCAM-Signal von Hämocytes und kolokalisierte Zellkern- und *E. coli*-Signale sind in derselben z-Ebene angeordnet. Kern- und *E. coli*-Signale sind distal von DSCAM-Signal umschlossen.

5 Diskussion

5.1 Sektion I: Charakterisierung von Dscam in der angeborenen Immunantwort larvaler Hämozyten von *M. sexta*

5.1.1 Expression von *dscam* in unbehandelten Larven

Genexpression in Vertebraten: Maus & Mensch im Vergleich

Trotz struktureller Unterschiede in molekularer Diversität ist *Dscam* sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt und vermittelt neuronale Vernetzung, Bildung von Nervenbahnen und Axonführung (Hizawa et al., 2024b). Gleichmaßen ist auch die Expression von *Dscam* in beiden Organismengruppen hauptsächlich in neuronalem Gewebe dokumentiert (Schmucker & Chen, 2009). In der Maus wie im Mensch ist *Dscam* im embryonalen bzw. fetalen und adulten zentralen Nervensystem exprimiert (Yamakawa et al., 1998b; Barlow et al., 2002). Im Verlauf der Ontogenese zeigt sich in *Mus musculus* ein dynamisches Transkriptmuster. Northern Blotting und *in-situ*-Hybridisierung konnten zeigen, dass *Dscam* ab Woche zwei der murinen Embryogenese konstitutiv in Gehirn und Rückenmark sowie in den Augen exprimiert ist (Agarwala et al., 2001). In einzelnen Entwicklungsstadien konnte *Dscam* Transkript auch in nicht-neuronalen Geweben im fetalen Herz, der Lunge, Leber und in den Extremitätenanlagen nachgewiesen werden. In adulten Mäusen wie auch im Mensch ist die Expression hingegen auf das Gehirn beschränkt (Yamakawa et al., 1998b; Barlow et al., 2002).

Genexpression & Funktion in der Wirbeltier-Netzhaut

Auffällig ist die extensive Expression von *Dscam* im embryonalen Auge, die im Stratum ganglionare (Ganglienzellschicht) sowie im Stratum nucleare internum (Innere Körnerschicht) der sich entwickelnden Retina lokalisiert werden konnte (Fuerst et al., 2008). Die Anordnung retinaler Neuronen in zelluläre Schichten, welche wiederum in geordnete Mosaikreihen mit distinkten interzellulären Abständen organisiert sind, ist essentiell für die Struktur und Funktion der Wirbeltiernetzhaut (Galli-Resta et al., 2008). Voraussetzungen dafür sind zelluläre Erkennungsmechanismen und Kommunikation sowie die Homöostase von Zelladhäsion und Zellabstoßung (engl. repulsion). Loss-of-function Studien in *Gallus domesticus* und *Mus musculus* konnten die Beteiligung von *Dscam* insbesondere an letzteren physiologischen Prozessen zeigen. *Dscam* und drei nah verwandte Mitglieder der Ig-Superfamilie (*Dscam11*, *Sidekick-1* und *Sidekick-2*) sind in Amakrin-, Bipolar- und Ganglienzellen in nicht überlappenden Netzhautschichten von Hühnerembryonen exprimiert (Yamagata et al., 2002) und an der Vermittlung von homophiler Zelladhäsion zwischen retinalen Neuronen beteiligt (Yamagata & Sanes, 2008). Funktionsverlust resultierte in veränderter Synapsenbildung und fehlerhafter Vernetzung retinaler Neuronen im Stratum plexiforme internum. Zusätzlich zur Adhäsionsfunktion in

Gallus ist Dscam in *Mus musculus* auch an der Verzweigung, Organisation und Selbstvermeidung retinaler Neuronen beteiligt. Phänotypen mit Funktionsverlust von Dscam zeigten unregelmäßig verzweigte Amakrinzellen mit hyperfaszikulierten Dendriten sowie aggregierte statt in regelmäßigen Mosaiken angeordnete Zellkörper (Fuerst et al., 2008). Diese Ergebnisse liefern Indizien für die Beteiligung von murinem Dscam an iso- (engl. dendrite arborization) und heteroneuraler Selbstvermeidung (engl. axon tiling) bei retinalen Neuronen während der Embryonalentwicklung (Fuerst et al., 2009), was die Funktion von Dscam bei der Synapsenbildung bestätigt und dessen Relevanz für die Netzhautanatomie von Vertebraten unterstreicht (S. Li et al., 2015).

Genexpression & Funktion in Invertebraten: *Drosophila melanogaster*

Im Rahmen der Erstbeschreibung von Dscam in *Drosophila melanogaster* konnten Proteilmuster auf der Oberfläche von Hemiganglien, Kommissuren und Konnektiven des embryonalen ZNS nachgewiesen werden (Schmucker et al., 2000). Nach Funktionsverlustmutation ist eine Bandbreite unterschiedlicher Phänotypen im ZNS detektierbar wie disruptierte Kommissuren und longitudinale Faszikel bis hin zur Abwesenheit von Dscam Protein in homozygoten Dscam-Mutanten mit Heteroallelen. Generell zeigten sich alle Allele als larval letal, was auch bei Invertebraten eine essenzielle Rolle von Dscam bei der Neurogenese vermuten lässt.

Analog zu Vertebraten ist Dscam auch in *Drosophila* an der Innervierung optischer Sinnesorgane beteiligt. Das Bolwig-Organ beschreibt eine larvale Struktur in *Drosophila* bestehend aus zwölf photosensitiven Rezeptorneuronen (Friedrich, 2013), welche vom Bolwig-Nerv innerviert werden, einem optischen Nerv, der auf einem konservierten Pfad mit einem Axonbündel in das larvale Zentralhirn projiziert (Schmucker et al., 1997). In Dscam Mutanten sind Phänotypen mit verfehlter Innervierung detektierbar, was die Funktion von Dscam in der Axonführung unterstreicht (Schmucker et al., 2000).

Mittels RT-PCR mit Exonkassetten flankierenden Primern und anschließender Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Gelelektrophorese (engl.: Single-strand conformation polymorphism gel electrophoresis, Abk.: SSCP-Gelelektrophorese) wurde die Sequenzidentität alternativer Dscam Spleißformen in RNA-Isolaten unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Körperteile von *Drosophila* untersucht. Elektrophoretische Analyse der PCR-Amplifikate ergab distinkte Spleißformenprofile von Exonkassette vier in embryonalen, larvalen und adulten Entwicklungsstadien (Celotto & Graveley, 2001a). Gemessen an der Gesamtheit der Dscam Exon vier Transkripte innerhalb eines Entwicklungsstadiums fiel der Anteil des alternativen Exons 4.8 im Embryo am höchsten aus, während Exon 4.2 das prominenteste in adulten Fliegen war. Ebenso zeigten Körperteil-spezifische RNA-Isolate vom adulten Kopf, den Antennen, Flügeln und thorakalen Extremitäten unterschiedliche Spleißformenprofile. Insgesamt legen die Daten entwicklungs- und körperteilspezifische Expression nahe. Trotz anatomischer Unterschiede der präparierten Proben müssen potenzielle Kontaminationen durch Tracheen, Nerven-, Fett-

und Muskelgewebe berücksichtigt werden, weshalb keine gewebespezifischen Aussagen möglich sind. Die entwicklungsabhängige Expression unterschiedlicher Spleißformenprofile von *Dscam* konnte im Rahmen einer Microarray-Studie bestätigt und um Transkriptionsdaten der Exonkassetten sechs und neun erweitert werden (Neves et al., 2004). Distinkte Expressionsprofile der drei Exonkassetten in embryonalen, larvalen und adulten Fliegen lassen Rückschlüsse auf Regulation im Verlauf der Ontogenese zu, wobei Expressionsunterschiede innerhalb von Kasette neun am größten waren. Mittels spezifischer Organpräparation bzw. Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (engl.: fluorescence activated cell sorting, Abk.: FACS) konnten zusätzlich gewebespezifische Expressionsprofile von Exonkasette neun im larvalen Zentralhirn sowie in distinkten Photorezeptor-Subpopulationen und Hämocyten detektiert werden. Im Unterschied zum Nervengewebe setzt sich der Großteil (80 – 90 %) des Transkript-Repertoires larvaler Hämocyten aus den fünf Spleißvarianten 9.6, 9.9, 9.13, 9.30 und 9.31 zusammen (Neves et al., 2004). Das gleiche Spleißformenprofil konnte auch in Fettkörperzellen unstimulierter Stadium drei Larven detektiert werden (Watson et al., 2005a). Beide Microarray-Studien zeigen, dass sich die im Fettkörper und in Hämocyten exprimierten Exon neun Spleißvarianten ähneln und distinkt vom Zentralhirn unterscheiden (Neves et al., 2004; Watson et al., 2005a). Die Ähnlichkeit der Spleißformenprofile legt nahe, dass die Regulation der Genexpression von *Dscam* in immunkompetenten Geweben und Organen der Insekten wie den Hämocyten und dem Fettkörper zusammenhängt und sich von neuronalem Gewebe unterscheidet (Hillyer, 2016). Einzelzellsortierung zirkulierender Hämocyten und postmitotischer Neuronen von Stadium drei Larven zeigte zudem die Expression multipler Spleißformen einer Exonkasette in einer einzigen Zelle (Neves et al., 2004).

Konstitutive Genexpression in *Tribolium castaneum*

Homolog zu *Drosophila* ist *Dscam1* auch in allen Entwicklungsstadien (Embryo, Larve, Puppe und Adult) von *Tribolium castaneum* exprimiert, wobei das konstitutive Transkriptniveau im larvalen und adulten Gehirn am höchsten war (Peuß et al., 2016). In larvalen und adulten immunkompetenten Geweben (Fettkörper und Hämocyten) sowie in adulten Testis und Ovarien war das konstitutive Expressionsniveau von *Dscam1* niedrig im Vergleich zum Nervengewebe bzw. zu den für antimikrobielle Peptide kodierenden Genen *Attacin2* und *Coleoptericin1* nach Immunstimulation.

Vergleichende Genexpression in Crustaceen

Innerhalb der Pancrustacea stammt ein Großteil der Daten zur gewebespezifischen Expression von *dscam* über das ZNS, den Fettkörper und die Hämocyten hinaus aus Transkriptionsstudien in marinen Vertretern der Crustacea. Quantitative RT-PCR-Analysen von RNA-Isolaten aus Geweben und Organen adulter Chinesischer Wollhandkrabben (*Eriocheir sinensis*) zeigten Expression von *dscam* in allen getesteten Proben des Herz-Kreislauf-, Verdauungs-,

Immun- und Nervensystems sowie in der Muskulatur und Stoffwechsel-, Atem- und Reproduktionsorganen (Jin et al., 2013; J. Wang et al., 2013; X. Zhang et al., 2023). Mit Ausnahme der Expression von *dscam* in den Zerebralganglien und Kiemen unterscheiden sich die detektierten relativen Transkriptniveaus im adulten Herz, Magen, Darm und Hepatopankreas sowie in der Muskulatur und den Hämozyten in allen drei Studien voneinander. Die Fähigkeit der Insecta und Crustaceae zum Aufbau eines Immungedächtnisses, Befunde über signifikant erhöhte *dscam* Expression nach Infektion (Armitage et al., 2015a) und substantielle Expressionsunterschiede in immunkompetenten Geweben und Organen wie dem Darm und den Hämozyten (Jin et al., 2013; X. Zhang et al., 2023) unterstreichen die Relevanz kontrollierter, hygienischer und aseptischer Zuchtbedingungen um immunnaive Expressionsmuster von *Dscam* detektieren zu können. Die prominente Expression von *dscam* im lymphoiden Organ adulter Schwarzer Tigergarnelen (*Penaeus monodon*), einem exklusiv in der Familie der Garnelen (Penaeidae) vorkommenden Immunorgan mit Phagozytosekompetenz (Rusaini & Owens, 2010), legt zudem eine Funktion von *Dscam* im Rahmen der angeborenen Immunantwort nahe (Chou et al., 2011a).

Expression von *dscam* in *Manduca sexta*: Erstbeschreibung & Annotation

Die Erstbeschreibung von *Dscam* im Amerikanischen Tabakswärmer geht auf das „*Manduca sexta* genome and transcriptome project“ zurück. Ziel des Projektes war die Annotation des *Manduca*-Genoms anhand von Transkriptom-Daten aus Geweben und Organen (Kopf, Fettkörper, Mitteldarm, Malpighische Gefäße, Muskulatur, Testis und Ovarien) unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Embryo, Larve, Puppe und Imago) (Cao & Jiang, 2015). Mit Ausnahme der Testis zeigte die Analyse der cDNA-Bibliotheken mittels Illumina-Sequenzierung (Next-Generation Sequencing, Abk.: NGS) niedrige Transkript-Level von *Dscam* in allen getesteten Geweben, Organen und Entwicklungsstadien (X. Zhang et al., 2015), was auf niedrige mRNA-Expression in unstimulierten bzw. immunnaiven Tieren schließen lässt.

Dscam*-Expression in larvalen Geweben und Organen von *Manduca sexta

In allen untersuchten Spezies der Vertebraten und Invertebraten ist *dscam* im **zentralen Nervensystem** unterschiedlicher Entwicklungsstadien konstitutiv mit hohem Transkriptionsniveau exprimiert. Die RT-PCR-Analyse von RNA-Isolaten des ZNS unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven bestätigt die Befunde in artfremden Organismen (siehe Abbildung 4.1 C) und unterstreicht einmal mehr die evolutionär konservierte Expression von *dscam* im Nervensystem. Neben der vielfach bestätigten Funktion von *Dscam* in der Neurogenese wird aufgrund von Befunden in *Drosophila* und *Anopheles* eine zweite Funktion in der angeborenen Immunantwort von Invertebraten extensiv diskutiert (Watson et al., 2005a; Dong et al., 2006a; Armitage et al., 2015a). Trotz einer Vielzahl unterschiedlicher Expressionsdaten ist das Transkriptionsprofil von *Dscam* in immunkompetenten Geweben und Organen der Insekten bis heute nicht

vollständig untersucht und stützt sich hauptsächlich auf Microarray-Daten aus dem Fettkörper und den Hämozyten von *Drosophila*. Hämozyten sind die primären Immunzellen der Insekten, welche im Rahmen der zellulären Immunantwort an Phagozytose sowie an der Sekretion humoraler Immunfaktoren beteiligt sind (Strand, 2008; Hillyer & Strand, 2014a). Beim Fettkörper, Mitteldarm und den Labialdrüsen handelt es sich primär um Verdauungs- und Stoffwechselorgane der Insekten mit sekundär humoralen Immunfunktionen wie der Sekretion von antimikrobiell, lytisch bzw. zytotoxisch wirksamen Molekülen (Hillyer, 2016). Unter den vier immunkompetenten Geweben und Organen unbehandelter L5d2-Larven konnte das höchste relative Dscam mRNA-Level im **Mitteldarm** detektiert werden, während die Expression in zirkulierenden **Hämozyten** und im **Fettkörper** niedriger ist (siehe Abbildung 4.1 C), was Transkriptionsdaten in *Eriocheir* und *Tribolium* bestätigt (Jin et al., 2013; Peuß et al., 2016). In den **Labialdrüsen** unbehandelter Larven konnte auch nach RT-PCR mit 34 Reaktionszyklen (siehe Tabelle 3.8) keine Transkription detektiert werden. Diese distinkten Expressionsmuster von *dscam* können mit einem unterschiedlichen Maß an Exposition gegenüber Mikroorganismen einhergehen, insofern Diversität und Abundanz im Mitteldarm-assoziierten Mikrobiom von Insekten unter physiologischen Bedingungen größer sind als im Hämocoel (Hammer et al., 2017a; Blow & Douglas, 2019a). Ebenso wie in den Labialdrüsen war in den larvalen **hämatopoetischen Organen**, die an der Bildung von Plasmatozyten und Prohämozyten beteiligt sind (Nardi et al., 2003; C.-R. von Bredow et al., 2021), keine Transkription von Dscam nachweisbar (siehe Abbildung 4.1 C). Proximal der hämatopoetischen Organe sind die larvalen **Flügelanlagen** lokalisiert (C.-R. von Bredow et al., 2021), deren relatives Dscam mRNA-Level vergleichbar mit dem Transkriptniveau im Mitteldarm ist (siehe Abbildung 4.1 C). In Imaginalscheiben projizierende Nervenbahnen sowie Expressionsprofile Neuronen-assoziiierter Gene legen nahe (Jan et al., 1985; Klebes et al., 2002), dass die prominente Expression von *dscam* in den Flügelanlagen auf Nervenzellen zurückzuführen ist.

Fazit

Die Transkriptionsdaten von Dscam im **zentralen Nervensystem** unbehandelter *Manduca sexta* L5d2-Larven bestätigen Befunde zur Genexpression in neuronalen Geweben der Insecta (*D. melanogaster*, *A. mellifera*), Crustaceae (*D. pulex*), Chordata (*D. rerio*), Amphibia (*X. laevis*), Aves (*G. gallus*) und Mammalia (*M. musculus*, *H. sapiens*) und betonen eine evolutionär konservierte Funktion von Dscam in der Neurogenese aller Metazoa (Schmucker & Chen, 2009; Hizawa et al., 2024b). Das hohe relative mRNA-Level im ZNS des fünften und letzten Larvenstadiums von *Manduca* legt zudem eine über die Embryonalentwicklung hinaus anhaltende Funktion von Dscam in der Aufrechterhaltung neuronaler Verschaltungen nahe, wie bereits für retinale Synapsen adulter Mäuse beschrieben (Fuerst et al., 2016; Simmons et al., 2016, 2017). Auffällig ist das relative mRNA-Level von Dscam in den larvalen **Flügelanlagen** von *Manduca*, was auf Expression in sensorischen Nervenzellen der Imaginalscheiben

zurückzuführen sein könnte (Edwards et al., 1978; Murray et al., 1984; Huang et al., 1991). In zirkulierenden **Hämozyten**, **Fettkörper** und **Labialdrüsen** unbehandelter Larven sind Dscam Transkripte nur mit niedrigem mRNA-Level bzw. gar nicht nachweisbar. Die Transkriptionsdaten legen nahe, dass *dscam* in immunkompetenten Geweben und Organen immunnaiver Larven nicht bzw. nur schwach exprimiert ist, aktive Expression in diesen Geweben reguliert und abhängig von Entzündung, Infektion oder Immunaktivierung ist (W. Li, 2021). Mit dem höchsten relativen Dscam mRNA-Level unter immunkompetenten Geweben und Organen stellt der **Mitteldarm** eine Ausnahme dar. Die Transkriptionsdaten deuten auf konstitutive Expression von *dscam* in immunnaiven Larven, was mit dem Darm-assoziierten Mikrobiom und der dauerhaften Exposition des Mitteldarms gegenüber Mikroorganismen zusammenhängen könnte (Hammer et al., 2017b; McMillan & Adamo, 2020; Spencer et al., 2025). Orale Infektionsversuche und Dscam-Spleißformenanalyse mittels whole transcriptome sequencing (NGS) könnten neue Erkenntnisse zur Rolle von Dscam in Darm-assoziiierter angeborener Immunität liefern. Insgesamt würden qRT-PCR-Analysen und NGS von RNA-Isolaten immunkompetenter Gewebe und Organe unterschiedlicher Entwicklungsstadien und unter Immunstimulation ein ganzheitliches Bild der organspezifischen Expression von *dscam* in *Manduca* und dessen Funktion in angeborener Immunität ermöglichen.

5.1.2 Expression von *dscam* und immunrelevanter Gene in Hämocyten bakteriell stimulierter Larven

Dscam gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF) der Zelloberflächenrezeptoren und ist in Invertebraten durch hohe molekulare Diversität in Folge extensiven alternativen Spleißens charakterisiert. Strukturell besteht Dscam aus einer extrazellulären Region mit mehreren Immunglobulin- und Fibronectin-Domänen, einer einzelnen Transmembrandomäne sowie einem zytoplasmatischen Abschnitt, der an Signaltransduktion beteiligt ist (vgl. Abbildung 2.2). Ursprünglich in der neuronalen Entwicklung beschrieben, wird Dscam inzwischen in vielen Insekten und Krebstieren mit einer Rolle in der angeborenen Immunität als Pathogenerkennungsrezeptor diskutiert.

Allgemein konnte in Hämocyten immunstimulierter Insekten Hochregulation und Diversifizierung der *dscam*-Expression beobachtet werden. In *Drosophila melanogaster* ist starke Expression in Plasmatozyten in Folge bakterieller Infektion dokumentiert (Celotto & Graveley, 2001b). Nach septischer Infektion ist die Expression membranständiger und löslicher Dscam-Formen beschrieben, die an Opsonisierung und Phagozytose von Bakterien beteiligt sind (Watson et al., 2005b). In *Anopheles gambiae* ist die Transkription von *dscam* als induzierbar beschrieben, insofern Immunstimulation zur Bildung Pathogen-spezifischer Spleißvarianten führt (Dong et al., 2006b). So konnten mittels qRT-PCR-Analysen und Transkriptomsequenzierung distinkte Spleißformenrepertoires gezeigt werden, die jeweils spezifisch nach Stimulation mit Bakterien, Pilzen oder Parasiten nachweisbar sind (Dong et al., 2006b). In zirkulierenden Hämocyten von *Manduca sexta* konnte nach bakterieller Stimulation ein um das 1,5-fach erhöhte mRNA-Level von Dscam nachgewiesen werden (Gunaratna & Jiang, 2013). Damit ergibt sich ein konsistentes Muster erhöhter Dscam-mRNA-Expression nach mikrobieller Stimulation.

Eater ist ein transmembraner Phagozytoserezeptor der Nimrod-Familie, die aufgrund struktureller Homologie der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet wird (Melcarne et al., 2019). Die extrazelluläre Domäne von Eater besteht aus EGF-ähnlichen Motiven (sog. Nimrod-Repeats), die direkte Bindung von Bakterien vermitteln (Kurucz et al., 2007). In *Drosophila melanogaster* ist die Expression von *eater* ausschließlich in Plasmatozyten nachgewiesen (Kocks et al., 2005; Kroeger Jr. et al., 2012). Dementsprechend bilden Eater und Paraloga wie Nimrod C1 eine konservierte Rezeptorfamilie in Dipteren und Coleopteren (Estévez-Lao & Hillyer, 2014). Im Allgemeinen ist die Expression von *eater* in Hämocyten nach mikrobieller Stimulation hochreguliert. In *Drosophila melanogaster* ist eine konstitutiv hohe Expression dokumentiert, die bakterielle Bindung und Phagozytose ermöglicht (Kocks et al., 2005). In *A. gambiae* ist Induktion der Genexpression nach bakterieller Infektion beschrieben (Estévez-Lao & Hillyer, 2014). Somit ergibt sich ein Muster konstitutiv hoher oder induzierter Expression, was eine konservierte Funktion im Rahmen der angeborenen Immunantwort der Insekten nahelegt.

Insbesondere ist für Eater Bindungsaffinität gegenüber Gram-positiven Bakterien dokumentiert (Melcarne et al., 2019).

Lysozyme sind antimikrobielle Proteine der Glykosidase-Familie (Muramidasen) mit enzymatischer Wirkung. Erstmals wurde Lysozym 1922 von Alexander Fleming beschrieben (Fleming, 1997; Wohlkönig et al., 2010). Durch Spaltung β -1,4-glykosidischer Bindungen im Peptidoglykan bakterieller Zellwände entfalten Lysozyme lytische Wirkung primär bei Gram-positiven Bakterien (T. Wu et al., 2019). Im Zuge von Genduplikation und funktioneller Diversifizierung sind in Insekten-Genomen meist mehrere Lysozym-Gene nachweisbar, die für c-Typ-Lysozym codieren und mit Funktionen in Immunität und Verdauung dokumentiert sind (Daffre et al., 1994; Hultmark, 1996; Bachali et al., 2002). Im Genom von *Drosophila* sind 17 potenzielle Lysozym-Gene beschrieben, in *Anopheles gambiae* acht (Zou et al., 2007; Marra et al., 2021). Allgemein ist nach Immunstimulation eine erhöhte Expression von *lysozym* in Hämozyten beschrieben. Transkriptom-Screening mittels RT-PCR zeigte konstitutive Expression von *lysozym* im larvalen Fettkörper, Epidermis und Hämozyten von *Bombyx mori* während nach bakterieller Stimulation durch Hämocoel-Injektion von *Enterobacter cloacae* erhöhte mRNA-Level in allen drei Geweben detektiert werden konnten (Lee & Brey, 1995; Tanaka et al., 2008). Eine Studie zur Expression immunrelevanter Gene im adulten Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* bestätigt diesen Befund. So konnte die Expression von zwei der vier Isoformen im Genom von *Tribolium* (Tc-lysozyme2, Tc-lysozyme3) mittels quantitativer RT-PCR nach mikrobieller Stimulation als stark induzierbar dokumentiert werden (Zou et al., 2007). Mittels Northern Blot-Analyse von Total-RNA-Isolaten aus primären Zellkulturen von *Aedes aegypti* Embryonen (Aag-2 Zellen) wurde die Expression von *lysozym* an unterschiedlichen Zeitpunkten 1 – 72 h nach Stimulation untersucht. Bereits 3 h nach bakterieller Stimulation *in vitro* mit Hitze-inaktivierten *E. coli* und *M. luteus* konnte ein erhöhtes Lysozym-mRNA-Level detektiert werden, während in unstimulierten Kontrollen konstitutive Expression auf niedrigem Niveau nachgewiesen werden konnte (Gao & Fallon, 2000).

Mittels organspezifischer Northern Blot Analysen konnte der larvale Fettkörper von *Manduca sexta* als primäre Quelle konstitutiver Expression von *lysozym* identifiziert werden (Mulnix & Dunn, 1994). 24 h nach Hämocoel-Injektion von Peptidoglykanfragmenten konnten in zirkulierenden Hämozyten sowie im Mitteldarm, Labialdrüsen, abdominaler Muskulatur, Ventralherzgefäß und perikardialen Komplex, Epidermis, Malpighischen Gefäßen und dem Fettkörper erhöhte Lysozym-mRNA-Level detektiert werden.

In Futterexperimenten mit *Bacillus thuringiensis* und *Escherichia coli* konnte gewebsübergreifende Signaltransduktion dokumentiert werden, insofern orale Infektion bei *Manduca*-Larven zu erhöhten Lysozym-mRNA-Levels in zirkulierenden Hämozyten führte (Y. M. von Bredow et al., 2023). Nach Hämocoel-Infektion konnten keine erhöhten mRNA-Level in zirkulierenden Hämozyten detektiert werden. Insgesamt zeigt sich in Hämozyten eine konsistent erhöhte

Expression von *lysozym* nach Immunstimulation, was einen Beitrag von Hämocyten zur humoralen Immunabwehr nahelegt.

Attacine sind antimikrobielle Peptide mit hohem Glycin-Gehalt, die erstmals 1983 in der Hämolymphe von *Hyalophora cecropia* Puppen beschrieben wurden (Hultmark et al., 1983). Attacine zeigen Wirksamkeit gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien durch Destabilisierung der äußeren Membran und Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese (Engström et al., 1984; Buonocore et al., 2021). Basierend auf der Abwesenheit von konstitutiver Genexpression werden Attacine der Gruppe der induzierbaren antimikrobiellen Peptide zugeordnet und sind im Genom von Lepidopteren, Dipteren und Coleopteren codiert (Mylonakis et al., 2016).

In larvalen Hämocyten von *Manduca sexta* zählen vier von sechs Attacin-Genen zu den am stärksten hochregulierten Transkripten (Gunaratna & Jiang, 2013; He et al., 2015). In *Tribolium castaneum* ist insbesondere die Genexpression von Tc-attacin-2 als systemisch induziert dokumentiert (Zou et al., 2007). Insgesamt sind für Attacine konsistent erhöhte mRNA-Level in Hämocyten und Fettkörper nach Immunstimulation dokumentiert, wodurch Attacine als zentrale Effektoren der humoralen Immunität diskutiert werden (Buonocore et al., 2021).

Gloverin codiert für Lepidoptera-spezifische, hitzestabile antimikrobielle Peptide mit hohem Glycin-Gehalt (Yi et al., 2014; Lian et al., 2025), die erstmals 1997 aus der Hämolymphe von *Hyalophora gloveri* Puppen nach Immunstimulation mit *Enterobacter cloacae* isoliert werden konnten (Axén et al., 1997). Das Wirkspektrum der Gloverine unterschiedlicher Vertreter der Lepidoptera umfasst primär Gram-negative Bakterien wie *E. coli* sowie artspezifische, selektive Wirkung gegen Gram-positive Bakterien und Pilze wie *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* und *Candida*-Hefen (Xu et al., 2012; Lian et al., 2025). Der Wirkmechanismus beruht auf Bindung an oberflächlich präsentierte Moleküle und bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan und β -Glukane, wobei es über Destabilisierung und Permeabilisierung zur Lyse bakterieller Zellmembranen kommt (Yi et al., 2013; Lian et al., 2025).

Transkriptionsdaten von *Spodoptera exigua* und *Manduca sexta* zeigen Gloverin-mRNA in zirkulierenden Hämocyten immunnaiver Larven in niedriger, aber nachweisbarer Menge, was konstitutive Expression auf niedrigem Niveau in Hämocyten nahelegt (Hwang & Kim, 2011; Xu et al., 2012). Quantitative RT-PCR Analysen von Total-RNA-Isolaten aus larvalen Hämocyten, Fettkörper, Seidendrüsen, Mitteldarm und Malpighischen Gefäßen von *Bombyx mori* zeigten hingegen erst nach bakterieller Stimulation mit *E. coli* signifikante Transkriptmengen, insbesondere für die Genisoformen *Bmgloverin 4* in Hämocyten und *Bmgloverin 2 & 3* im larvalen Fettkörper, was de novo Expression nach Immunstimulation nahelegt (Kaneko et al., 2007).

Die Transkription von *dscam*, *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* in Hämocyten immunstimulierter *Manduca sexta*-Larven wurde unter Verwendung genspezifischer DNA-Oligonukleotide (vgl. Tabelle 3.9) und Total-RNA-Isolate aus Hämocyten (vgl. 3.7.2) 1 h bis 36 h nach *E. coli*-Injektion (vgl. Tabelle 3.6) mittels RT-PCR (vgl. 3.7.3) untersucht. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Amplifikate (vgl. 3.7.4.2) wurden Grauwerte fokussierter cDNA-Banden aller RNA-Isolate digital bestimmt. Zum Ausgleich potenzieller Variabilität in Quantität und Qualität der RNA sowie in der Effizienz der Reversen Transkription wurden mRNA-Level mit Hilfe des Haushaltsgens eEF1A (Jorgensen et al., 2006; Araya et al., 2008; Morga et al., 2010; Sasikumar et al., 2012) normalisiert (vgl. Formel 2). Mögliche Effekte der Saline-Injektion auf die Genexpression bedingt durch mechanische Verwundung der Epidermis bzw. Störung des physiologischen Ionenhaushalts im Hämolymp plasma wurden mit Hilfe von Saline-Kontrollen korrigiert (vgl. Formel 3). Der isolierte Effekt bakterieller Stimulation mittels *E. coli*-Injektion ist dementsprechend im relativen mRNA-Level abgebildet Formel 4, während das normalisierte mRNA-Level Rückschlüsse auf den Total-Gehalt genspezifischer Transkripte ermöglicht.

In zirkulierenden Hämocyten unbehandelter L5d2- & L5d3-Larven konnte aktive Transkription von *dscam*, *eater* und *lysozym* nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.2 A), was konstitutive Genexpression in Hämocyten immunnaiver Larven in Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung von Mikrobiom-Homöostase nahelegt (Lee & Brey, 1995; Blow & Douglas, 2019b; Y. M. von Bredow et al., 2023; G. Wang et al., 2025). Im Vergleich mit Saline-injizierten Kontrollen konnten nach *E. coli*-Injektion für alle fünf immunrelevanten Gene signifikant höhere normalisierte mRNA-Level detektiert werden (vgl. Abbildung 4.2 B – F). Das Transkriptionsprofil des Phagozytoserezeptors *Eater* zeigt 6 h und 20 h nach *E. coli*-Injektion die quantitativ höchsten und signifikant erhöhten relativen mRNA-Level (vgl. Abbildung 4.2 C'). In Relation zu den jeweiligen Saline-Kontrollen ist nach Stimulation mit *E. coli* ein um das 8- bis 10-fach erhöhte mRNA-Level nachweisbar, was auf einen spezifischen Effekt bakterieller Stimulation und erhöhte Genexpression in Hämocyten nach Immunstimulation schließen lässt. Zeitlich versetzte Höhepunkte im Transkriptionsniveau liefern darüberhinaus einen ersten Hinweis zur Expression von *eater* im zeitlichen Verlauf nach Immunstimulation und legen differenzierte Genexpression während akuter, zellulärer (Minuten – 2 h) und später, humoraler Immunantwort (6 h – 48 h) nahe (Erlor et al., 2011; Johnston et al., 2014; Bruno et al., 2021; Schlamp et al., 2021). Trotz höherer normalisierter mRNA-Level nach *E. coli*-Injektion zeigt das Transkriptionsprofil von *lysozym* in Relation zu Saline-Kontrollen keine signifikant erhöhten relativen mRNA-Level nach bakterieller Stimulation (vgl. Abbildung 4.2 D – D'). Ähnliches konnte mittels Northern Blotting in *Bombyx mori* gezeigt werden, wobei erhöhte Expression von *lysozym* im Fettkörper nach Immunstimulation mit DAP-Typ Peptidoglykan aus *E. coli* detektierbar war (Morishima et al., 1995). Die Wirksamkeit von Lysozym gegen Gram-positive Bakterien sowie Berichte erhöhter Lysozym-mRNA-Level nach Injektion steriler Sephadex-Beads in

Puppenstadien von *Pieris rapae* legen eine niederschwellig erhöhte Genexpression infolge unspezifischer Immunaktivierung nahe (Fang et al., 2016). Charakteristisch für *attacin* und *gloverin* ist die Abwesenheit aktiver Genexpression in immunnaiven Lepidopteren bei Induktion hochaktiver Expression nach Immunstimulation (Sugiyama et al., 1995). Die Analyse der Hämocyten-Isolate aus *Manduca* bestätigt Transkriptionsdaten von *Heliothis*, *Spodoptera* und *Bombyx* (X.-J. Rao & Yu, 2010; Hwang & Kim, 2011; Shelby & Popham, 2012), insofern Transkription von *attacin* und *gloverin* ausschließlich nach bakterieller Stimulation nachweisbar ist. Die quantitativ höchsten normalisierten mRNA-Level beider Gene konnten 6 h bzw. 10 h nach *E. coli*-Injektion detektiert werden (vgl. Abbildung 4.2 E & F). Mit zunehmender Zeit nach Injektion konnten für beide Transkripte progressiv abfallende mRNA-Level detektiert werden, was den Höhepunkt der Genexpression zu Beginn der Spätphase-Antwort humoraler Immunität nahelegt. Eine Berechnung relativer mRNA-Level ist aufgrund nicht nachweisbarer Transkription in Hämocyten-Isolaten unbehandelter und Saline-injizierter Kontrollen weder möglich noch notwendig (vgl. Abbildung 4.2 A). *Dscam*-mRNA ist sowohl in zirkulierenden Hämocyten unbehandelter als auch bakteriell stimulierter *Manduca*-Larven mit niedrigen normalisierten mRNA-Leveln nachweisbar (vgl. Abbildung 4.2 A). Signifikant erhöhte relative mRNA-Level 6 h bzw. 24 h nach *E. coli*-Injektion deuten auf spezifisch erhöhte Genexpression infolge von Immunstimulation (vgl. Abbildung 4.2 B'). Im direkten Vergleich legen die normalisierten mRNA-Level nahe, dass *dscam* auch nach *E. coli*-Injektion auf niedrigerem Niveau exprimiert ist als *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* (vgl. Abbildung 4.2 B – F). Das Transkriptionsprofil von *dscam* ist dementsprechend weder wie im Fall von *eater* durch ein hohes normalisiertes mRNA-Level im Rahmen der Akutphase-Antwort noch wie im Fall von *attacin* und *gloverin* durch Inaktivität bei Immunnaivität und hohe Induzierbarkeit nach Immunstimulation charakterisiert. Die Anwendung von qRT-PCR würde die sensitive Ermittlung quantitativer Unterschiede in der Expression von *MsDscam* im zeitlichen Verlauf nach *E. coli*-Stimulation bzw. den direkten Vergleich zu weiteren immunrelevanten Genen ermöglichen. Vergleichende Immunstimulation mit Gram-positiven und -negativen Bakterien sowie mit Pilzen und Parasiten ließen Rückschlüsse auf Pathogen-spezifische Einflüsse auf die Expression von *MsDscam* zu.

5.1.3 Differenzielle Expression von *dscam* in Hämozyten bakteriell stimulierter Larven

Sowohl in Insekten als auch in Krebstieren sind Hämozyten die primären zellulären Effektoren angeborener Immunität und vermitteln zelluläre und humorale Abwehrreaktionen wie Phagozytose, Einkapselung und Melanisierung (Hillyer & Strand, 2014). In mehreren Transkriptomstudien konnte die Expression von *dscam* in Hämozyten nachgewiesen werden, was auf eine Funktion in zellulärer Immunität hindeutet (Watson et al., 2005; Dong et al., 2006). Methoden wie RT-PCR (vgl. Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2) oder RNA-Sequenzierung liefern zwar Hinweise auf die Expression, können allerdings nicht auflösen, ob und in welchen Hämozytenpopulationen *Dscam*-Transkript räumlich lokalisiert ist. In situ-Hybridisierung hingegen ermöglicht eine direkte Visualisierung der Transkriptverteilung (Levsky & Singer, 2003; Young et al., 2020) und wurde mit unterschiedlicher Intensität in verschiedenen Taxa angewendet.

Watson et al. lieferten den ersten in situ-Nachweis für die Expression von *dscam* in Immunzellen von *Drosophila melanogaster*. *Dscam*-Transkripte konnten in zirkulierenden Hämozyten und im Fettkörper von Larven lokalisiert werden (Watson et al., 2005b). Neben dem Nervensystem konnte Expression von *dscam* dementsprechend auch in immunassoziierten Geweben gezeigt werden. Mittels RNAi konnte bestätigt werden, dass genomisches Silencing von *dscam* Hämozyten-vermittelte Phagozytose von Bakterien reduzierte. Ähnliches konnte für *Anopheles gambiae* beobachtet werden. Dong et al. zeigten, dass Silencing von *Dscam* mittels RNAi in einer als Hämozyten-ähnlich beschriebenen Zelllinie (*Sua5b*) zur Reduktion von *in vitro* Phagozytose führt (Dong et al., 2006b).

In mehreren Vertretern der Crustaceae konnten weitere Belege für die Expression von *dscam* in Hämozyten gezeigt werden. Beim Flusskrebs *Pacifastacus leniusculus* konnte die Expression von *dscam* mittels in situ-Hybridisierung in Hämozyten lokalisiert werden (Watthanasurorot et al., 2011). Ebenso identifizierten Chou et al. bei der Garnele *Penaeus monodon* eine membrangebundene Form von *Dscam* und lokalisierten dessen mRNA in hämozytenreichen Geweben (Chou et al., 2011b). Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass *dscam* in zirkulierenden Hämozyten von Crustaceen exprimiert ist und die räumliche Lokalisierung der Transkripte Beobachtungen bei Dipteren entspricht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die räumliche Verteilung von *Dscam*-Transkript in Hämozyten von Dipteren wie *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* sowie in mehreren Crustaceen mittels in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden konnte. In *Tribolium castaneum* beschränken sich Nachweise auf die Transkript-Detektion in whole-mount Larven (Armitage et al., 2015b). In Vertretern der Lepidoptera wie *Bombyx* und *Manduca* ist die Expression von *dscam* in Hämozyten bisher noch nicht räumlich gezeigt und beschrieben.

Generell liegen für keine Spezies veröffentlichte Berichte zur Phänotypisierung *dscam*-exprimierender Hämozyten vor.

In situ-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden, spezifisch für die Transmembrandomäne (Exon 31 - 34) von *MsDscam*, zeigt Transkription von *Dscam* in unterschiedlichen Hämozytenpopulationen *E. coli*-stimulierter Larven (vgl. Abbildung 4.3 D). Darunter befinden sich kleine bis große, ungespreitete und gespreitete Hämozyten mit kleinen, runden bzw. großen, unregelmäßigen Zellkernen, die im Durchschnitt 22 % der zirkulierenden Hämozyten bakteriell stimulierter L5d3-Larven ausmachen. In unstimulierten bzw. Saline-stimulierten L5d2- und L5d3-Larven konnte *Dscam*-mRNA ausschließlich in einer homogenen Population von großen (10 bis 15 μm), runden ungespreiteten Hämozyten mit großem, rundem Zellkern detektiert werden (vgl. Abbildung 4.3 A - C). Die Markierungsergebnisse legen nahe, dass die differenzielle Expression von *dscam* in zirkulierenden Hämozyten durch bakterielle Stimulation beeinflusst wird. Entsprechend der Klassifizierung von Hämozytentypen nach von Bredow & Trenczek anhand zell- und kernmorphologischer Kriterien (Bredow & Trenczek, 2022) ist *dscam* in immunnaiven Larven ausschließlich in Oenozytoiden aktiv exprimiert. Nach systemischer *E. coli*-Infektion zeigt sich ein verändertes Transkriptionsmuster mit markierten Oenozytoiden, granulären Zellen und Plasmatozyten. Gemessen am prozentualen Anteil *dscam* exprimierender Hämozyten ist dieser Effekt auf die bakterielle Stimulation zurückzuführen, wenn gleich anhand der Saline-Kontrolle Verwundungs-assoziierte Expression von *dscam* in einzelnen Hämozyten sichtbar ist (vgl. Abbildung 4.3 C). Unabhängig von Art und Weise der Stimulation zeigt sich bei allen markierten Hämozyten ein perinukleäres, chromogenes Signal, was auf intrazelluläre Lokalisation des *Dscam*-Transkripts hindeutet. Insgesamt deutet die erhöhte differenzielle Anzahl *dscam* exprimierender Hämozyten nach bakterieller Stimulation auf Hochregulation des Total-mRNA-Levels, was mittels quantitativer RT-PCR validierbar ist. Markierung mit Lineage-spezifischen Hämozytenmarkern (MS7, MS13, MS77, anti- β GRP-1/anti-proPO, anti-esterase) (Bredow & Trenczek, 2022) in Kombination mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Durchflusszytometrie (sog. FISH-Flow-Methode (Baerlocher et al., 2006; Arrigucci et al., 2017)), würde eine reliable Phänotypisierung *dscam* exprimierender Hämozyten ermöglichen. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. Abk. FACS) *dscam* exprimierender Hämozyten und Einzelzell-RNA-Sequenzierung (engl. Abk. scRNAseq) könnte einen Beitrag zum funktionalen Verständnis pathogenspezifischer Spleißformen liefern und bestehende Hypothesen um dedizierte Hämozytentypen erweitern.

5.1.4 Immunzytochemische Charakterisierung *dscam*-exprimierender Hämozyten nach bakterieller Stimulation *in vivo*

Hämozyten sind aus mesodermalen Stammzellen differenzierte Zellen, die in der Hämolymphe von Invertebraten zirkulieren und sowohl zelluläre als auch humorale angeborene Immunantworten vermitteln (Lavine & Strand, 2002). Im Gegensatz zu peripheren Blutzellen von Vertebraten – zu denen sauerstofftransportierende Erythrozyten sowie dedizierte myeloide und lymphoide Immunzellen gehören – sind Hämozyten von Invertebraten sowohl Mediatoren angeborener Immunität als auch teilweise am Sauerstofftransport beteiligt (F. Wu et al., 2019; Shin et al., 2024). Ähnlich wie myeloide Wirbeltierleukozyten sind Hämozyten an angeborener Immunabwehr beteiligt: Sie erkennen und beseitigen Krankheitserreger mittels Phagozytose, kapseln größere Krankheitserreger ein, koagulieren, um Wunden zu verschließen und initiieren Melanisierungsreaktionen (Du Pasquier, 2001; Buchmann, 2014).

Unter Vertretern der **Crustaceae** werden zirkulierende Hämozyten klassischerweise in hyaline, semigranuläre und granuläre Zellen unterteilt (Xin & Zhang, 2023). Hyaline Zellen sind klein, agranulär und weisen ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Sie sind phagozytisch aktiv und nehmen Mikroorganismen und zellulären Debris auf (Bouallegui, 2021). Mittlere, semigranuläre Zellen vermitteln die Einkapselung großer Parasiten und tragen zur Bildung von Noduli bei. Granuläre Zellen sind größer, reich an dichten Granula und speichern Immun-Effektoren wie Prophenoloxidase für die Melanisierung. Zusammen koordinieren semigranuläre und granuläre Zellen die Einkapselung und Melanisierung, während hyaline Zellen für eine kontinuierliche Phagozytose sorgen. Diese dreiteilige Klassifizierung kann bei Zehnfußkrebse wie *Eriocheir sinensis* beobachtet werden und ist repräsentativ für die zelluläre Immunität von Crustaceen mit konservierten morphologischen und funktionellen Rollen. Larvale Hämozyten von ***Drosophila melanogaster*** werden im Wesentlichen in drei Klassen unterteilt. Plasmatozyten (~90 – 95 %) sind kleine, makrophagenähnliche Zellen, die auf die Phagozytose von Mikroorganismen und apoptotischen Körperchen spezialisiert sind und die primäre zelluläre Immunabwehr darstellen (Hultmark & Andó, 2022). Kristallzellen (~5 – 10 %) enthalten kristalline Einschlüsse endogener Prophenoloxidase. Sie ruptieren bei mechanischer Verletzung oder Infektion und setzen Enzyme frei, die Melanisierung und Gerinnung auslösen. Lamellozyten stellen die dritte Hämozyten-Population dar, die erst nach Immunstimulation durch Parasitoiden-Eier oder Mikroorganismen auftreten. Kristallzellen sind durch ihre abgeflachte Morphologie charakterisiert und an Einkapselung von Mikroorganismen beteiligt, die anschließend melanisiert werden. Adulte Fliegen besitzen hauptsächlich Plasmatozyten, während Kristallzellen und Lamellozyten in Zirkulation prozentual abnehmen (Bouallegui, 2021).

Lepidoptera wie der Seidenspinner ***Bombyx mori*** besitzen unter Vertretern der Insecta mit fünf distinkten Zellpopulationen die komplexeste und differenzierteste Zusammensetzung

zirkulierender Hämocyten. Unterschieden werden: Prohämocyten, Plasmatozyten, Granulozyten, Sphärozyten und Oenocytoide (Beaulaton, 1979). Prohämocyten sind Vorläuferzellen mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis, die sich zu anderen Zelllinien differenzieren können. Plasmatozyten sind spindelförmige, multipotente Zellen, die Granulozyten, Sphärozyten und Oenocytoide bilden können. Granulozyten sind die wichtigsten Phagozyten und vermitteln über Degranulation auch Pinozytose, Nodulation und Gerinnung. Sphärozyten enthalten große refraktile Einschlüsse von Mucopolysacchariden oder Glykoproteinen und können die Wundheilung oder Speicherung unterstützen. Oenocytoide, die reich an Prophenoloxidase sind, ruptieren, um Melanisierung auszulösen.

Der Tabakswärmer *Manduca sexta* (Lepidoptera) ist ein Modellorganismus für die Insektenimmunologie und zeigt alle für Lepidopteren typischen Hämocyten-Populationen. Bei Larven und Puppen werden ebenfalls wie bei *Bombyx* fünf zirkulierende Hämocytenklassen unterschieden: Prohämocyten, Plasmatozyten, granuläre Zellen, sphärule Zellen und Oenocytoide (Bredow & Trenczek, 2022). Frühe Klassifizierungen basierten auf Mikroskopie und Ultrastruktur (Price & Ratcliffe, 1974; Ribeiro & Brehélin, 2006), während Bredow & Trenczek die Hämocytenklassifizierung um immunologische Marker ergänzt und validiert hat. **Prohämocyten** sind die kleinsten, runden Hämocyten mit einem großen Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Diese stammzellähnlichen Vorläuferzellen proliferieren und differenzieren zu reifen Hämocyten, die in der Hämolymphe zirkulieren (Bredow & Trenczek, 2022). Unter Homöostase kommen sie in Zirkulation nur selten vor und befinden sich hauptsächlich in hämatopoetischen Organen. **Plasmatozyten** sind mittelgroße bis große, morphologisch plastische und MS13^{pos} bzw. MS77^{pos} Hämocyten. In Suspension erscheinen sie rund oder oval während sie nach Kontakt mit Oberflächen durch Extension von Pseudopodien spreiten. Ihre Zellkerne können oval oder gelappt sein und viele sind polyploid, was auf eine aktive Synthese hindeutet. **Granuläre Zellen** (Granulozyten) sind unter allen zirkulierenden Hämocytenklassen die Population mit höchster Abundanz. Sie zeigen sich morphologisch kugelförmig mit mäßigem Spreitungsverhalten und zahlreichen sichtbaren zytoplasmatischen, MS7^{pos} Granula. Sie enthalten typischerweise runde, zentrale Kerne und sind etwas kleiner als gespreitete Plasmatozyten. **Sphärule Zellen** sind klein (4 – 6 µm) und weisen eine oder mehrere große refraktile Einschlüsse auf, die ihre unregelmäßigen oder sichelförmigen Kerne verdrängen. Verglichen mit gespreiteten granulären Zellen reagieren sphärule Zellen bedingt durch intrazelluläre Esterasen stark positiv auf anti-Esterase-Markierung. **Oenocytoide** gehören zu den größten (10 – 15 µm) runden Hämocyten mit exzentrisch angeordneten Kernen und zytoplasmatischen Vesikeln, die Prophenoloxidase (proPO) und Aktivierungsfaktoren enthalten. Markierung mit βGRP-1 ist monospezifisch für Oenocytoide. Funktionell zeigen die Hämocyten-Populationen von *Manduca sexta* große Ähnlichkeiten mit anderen Insekten wie *Drosophila*, wenngleich sich deren Spezialisierung stark voneinander unterscheidet. **Plasmatozyten** und **granuläre Zellen**

stellen bei *Manduca* den Großteil der zirkulierenden Hämocyten dar und sind beide an zellulärer Immunabwehr beteiligt (Horohov & Dunn, 1983; Ling & Yu, 2006b). Granuläre Zellen sind in der Literatur als professionelle Phagozyten beschrieben und an der Abwehr von Bakterien, Hefen und kleinen Partikeln beteiligt (Hultmark & Andó, 2022). Beide Hämocytenpopulationen sind zusammen an Noduli-Bildung beteiligt (Pech & Strand, 1996). Dabei bilden granuläre Zellen ein Gerüst, welches die Ausbreitung von Plasmatozyten ermöglicht (Levin et al., 2005; Ling & Yu, 2006a; Nardi et al., 2006). **Oenozytoide** spielen eine zentrale Rolle im Rahmen der humoralen Immunantwort. Nach mechanischer Verletzung oder Infektionen ruptieren Oenozytoide und schütten intrazellulär vorliegende Prophenoloxidase (proPO) in die Hämolymphe aus (Bredow & Trenczek, 2022). Aktivierte Phenoloxidase initiiert die Melaninsynthese, was Wundverschluss und Einkapselung fördert, Krankheitserreger immobilisiert und abtötet. Im Rahmen der Melanisierungskaskade entstehen zusätzlich reaktive Sauerstoffspezies und Chinone mit antimikrobieller Wirkung. Trotz der geringen Abundanz in Zirkulation stellen Oenozytoide damit eine potente Immunzellpopulation dar. Der Beitrag von **sphäkulen Zellen** zur angeborenen Immunantwort von *Manduca* ist größtenteils noch ungeklärt. Sie sind weder an Phagozytose noch an der proPO-Synthese beteiligt. Evidenzen legen eine Beteiligung an Gerinnung oder Wundheilung nahe, indem der adhäsive Inhalt der Sphäroide freigesetzt wird (Beaulaton, 1979). Einige Hinweise deuten auf eine Rolle bei der Kutikula-Bildung oder der Gewebsumgestaltung hin. **Prohämocyten** sind an der Aufrechterhaltung und Homöostase zirkulierender Hämocyten beteiligt. Nach Immunstimulation proliferieren Prohämocyten in hämatopoetischen Organen und differenzieren zu Plasmatozyten und granulären Zellen, wodurch die Totalhämocytenanzahl in Hämolymphezirkulation zunimmt (Beetz et al., 2008).

In *Manduca sexta* werden die für Lepidopteren typischen fünf Populationen zirkulierender Hämocyten unterschieden: Plasmatozyten, granuläre Zellen, sphäkulare Zellen, Oenozytoide und Prohämocyten. Trotz Unterschiede in Anzahl, Zusammensetzung und Morphologie ähneln sich die unterschiedlichen Hämocyten-Populationen der Invertebraten funktionell und lassen sich in Phagozyten (granuläre Zellen, Plasmatozyten, hyaline/semigranuläre Zellen), Melanisierungszellen (Oenozytoide, Kristallzellen, granuläre Zellen) und kapselbildende Zellen (Plasmatozyten, Lamellozyten, semigranuläre Hämocyten) unterteilen. Mittels *in-situ* Hybridisierung und Immunphänotypisierung mit *M. sexta*-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Willott et al., 1994) konnten in der Subpopulation *dscam* exprimierender Hämocyten nach systemischer Stimulation mit *E. coli* granuläre Zellen (MS7^{pos}) sowie MS75^{pos} und MS77^{pos} Plasmatozyten identifiziert werden (siehe Abb. 4.4). Gemessen an der Intensität des chromogenen Signals zeigen sich unterschiedliche Signalqualitäten, die auf das zellspezifische Expressionsniveau von *dscam* zurückgeführt werden könnten. Intensive chromogene Markierungen zeigen sich in ungespreiteten, runden MS75^{pos} Plasmatozyten, während sich in granulären Zellen und

gespreiteten Plasmatozyten nur eine schwache Färbung zeigt. Unterschiede im Transkriptionsniveau auf Einzelzellebene müssten mittels single cell qRT-PCR validiert werden.

5.1.5 Charakterisierung MS73-positiver Hämocyten unbehandelter Larven

Oenozytoide bilden eine konservierte Hämocytenpopulation, die in allen Insekten durch die Fähigkeit zur Initiierung von Melanisierung charakterisiert ist. Es handelt sich um große, nicht phagozytotisch aktive Hämocyten, die konstitutiv Prophenoloxidase (PPO) speichern, den Vorläufer der Phenoloxidase (PO), welche die Melaninbildung an Wunden und um Krankheitserreger herum katalysiert (Lavine & Strand, 2002; Eleftherianos et al., 2021a). Im Gegensatz zu granulären Zellen oder Plasmatozyten sind Oenozytoide durch ihre runde, kugelförmige Morphologie gekennzeichnet, nicht adhäsiv und setzen PPO durch Exozytose oder Ruptur frei (Meister & Lagueux, 2003). Bei *Drosophila melanogaster* ist das funktionelle Äquivalent die Kristallzelle, die 5 – 10 % der larvalen Hämocyten ausmacht und kristalline PPO-Einschlüsse enthält (Rizki, 1957; Dudzic et al., 2015, 2019).

Oenozytoide kommen in verschiedenen Taxa der Insekten vor. Beim Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* sind sie Teil des larvalen Hämocytenrepertoires (Martins & Ramalho-Ortigão, 2012). Bei *Anopheles gambiae* machen sie weniger als 10 % der zirkulierenden Hämocyten aus und zeichnen sich durch PPO-Aktivität und fehlende Kompetenz zur Phagozytose aus (Castillo et al., 2006; Bryant & Michel, 2016). Bei *Drosophila* sind Kristallzellen für die Einkapselung von Parasitoideneiern und die Melanisierung von Wunden unerlässlich (Carton et al., 2008). Bei Vertretern der Lepidoptera wie *Bombyx mori* und *Manduca sexta* sind Oenozytoide wichtige PPO-Produzenten, die für die Immunabwehr von zentraler Bedeutung sind (Lavine & Strand, 2002). Vergleichbare Zellen kommen auch bei *Galleria mellonella* (Elmekawy et al., 2023) und *Plodia interpunctella* (Ebrahimi & Ajamhassani, 2020) vor.

Morphologisch gehören Oenozytoide zu den größten Hämocyten und zeichnen sich durch ihre runde, kugelförmige Morphologie, homogenem Zytoplasma und exzentrischen Zellkernen aus (Akai & Sato, 1973; Giulianini et al., 2003). Bedingt durch fehlende Granula ist PPO bei den meisten Insekten diffus gespeichert, während die Kristallzellen von *Drosophila* charakteristische kristalline Einschlüsse enthalten (Rizki, 1957; Dudzic et al., 2015).

Funktionell vermitteln Oenozytoide Melanisierung durch Freisetzung von PPO, was zur Verklumpung von Melanin und Einkapselung von Krankheitserregern führt (Eleftherianos et al., 2021b). Neben Einkapselung sind Oenozytoide auch an Wundheilung beteiligt (Carton et al., 2008; Dudzic et al., 2015). Während alle Hämocytenpopulationen bei *Anopheles gambiae* induzierbar PPO exprimieren können (Bryant & Michel, 2016), bleiben Oenozytoide bei Insekten das primäre PPO-Reservoir.

Neben zell- und kernmorphologischen Kriterien sind Oenozytoide von *Manduca sexta* immunzytochemisch als proPO^{pos}, MS73^{pos} und β GRP-1^{pos} charakterisiert (Jiang et al., 1997; Y. M. von Bredow et al., 2020; Bredow & Trenczek, 2022). Mittels immun- und enzymzytochemischer Mehrfachmarkierung konnten große, runde und ungespreitete MS73^{pos} Hämocyten spezifisch als proPO^{pos}PO^{pos} Oenozytoide identifiziert werden (Abbildung 4.5 1A - E). Sowohl der

Enzymnachweis endogener Phenoloxidase als auch Antikörperfärbung mit anti-*Bombyx mori* proPO (Ashida et al., 1988) zeigen monospezifische Markierung von Oenozytoiden in *Manduca*. Hingegen markiert der monoklonale Antikörper anti-*Manduca sexta* MS73 Oenozytoide und granuläre Zellen (Y. M. von Bredow et al., 2020). Bei granulären Zellen zeigt MS73 eine typische Färbung intrazellulärer Granulen, während bei Oenozytoiden die Zellmembran und exzentrisch um den Zellkern angeordnete Granula gefärbt sind. Mittels Doppelmarkierung mit anti-*Drosophila melanogaster* DSCAM EC 19545 konnten MS73^{pos} Hämozyten mit Membranmarkierung als einzige membranständig markierte DSCAM^{pos} Hämozytenpopulation in Hämolymphezirkulation unstimulierter L5d3-Larven identifiziert werden (Abbildung 4.5 2 & 3A - E). MS73^{pos} Hämozyten mit Granula-Markierung sind hingegen auch bei Markierung mit anti-DSCAM mit selbigem intrazellulären Färbungsmuster aufgefallen. Das Markierungsergebnis legt nahe, dass membranständiges DSCAM in immunnaiven Larven konstitutiv auf der Zelloberfläche von Oenozytoiden präsentiert ist während es in granulären Zellen intrazellulär gespeichert vorliegt. Durchflusszytometrische Analyse von Doppelmarkierungen mit Lineage-spezifischen Hämozytenmarkern (MS7, MS13, MS77, anti-βGRP-1/anti-proPO, anti-esterase) und Antikörpern spezifisch für *Manduca sexta* DSCAM könnte zur Validierung der DSCAM Phänotypisierung von Hämozyten beitragen sowie Quantifizierung ermöglichen. Markierung mit Antikörpern spezifisch für intra- bzw. extrazelluläre Domänen von MsDSCAM würde darüberhinaus funktionelle Erkenntnisse zu Proteinsynthese, -transport und Opsonisierung ermöglichen.

5.1.6 Muster anti-DSCAM positiver Proteine in bakteriell stimulierten Larven

Abhängig von Struktur und Funktion sind zwei kodierte Dscam-Proteinformen beschrieben: eine transmembrane Variante (Engl. membrane-bound Dscam, Abk. mDscam) mit Intrazellularregion und Transmembrandomäne sowie eine lösliche Form (Engl. soluble Dscam, Abk. sDscam), die durch Proteolyse der Transmembranregion entsteht (Schmucker et al., 2000; Schramm et al., 2012). Beide Varianten enthalten die extrazellulären Ig- und FNIII-Domänen, unterscheiden sich jedoch in Lokalisation und Funktion. Watson et al. haben mDscam in larvalen Hämocyten, dem Fettkörper und zentralen Nervensystem von *Drosophila* nachgewiesen, während sDscam in der Hämolymphe zirkuliert. Western Blot-Analysen mit Antikörpern spezifisch für die Extrazellular- bzw. Zytoplasmadomäne nach Immunpräzipitation zeigten membranständige Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 210 kDa und die lösliche Variante mit etwa 160 kDa (Watson et al., 2005a). In der Hämolymphe konnte sDscam unabhängig von Immunstimulation nachgewiesen werden, was mit konstitutiver Sekretion in *Drosophila* diskutiert wird. In der Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis* wurde mDscam auf Hämocytenmembranen und sDscam in Geweben und Hämolymphe beschrieben (X.-J. Li et al., 2018a). Nach Immunstimulation konnten artspezifische Unterschiede festgestellt werden. In Krebstieren stiegen mDscam-Level in Hämocyten nach Injektion von *Staphylococcus aureus* sowie von bakteriellen Komponenten an, während sDscam verstärkt sezerniert wurde (Hung et al., 2013; X.-J. Li et al., 2018b). *De novo* gebildete Proteinisoformen zeigten spezifische Bindung an mikrobielle Erreger; RNAi-vermittelter Funktionsverlust führte zu verringerter antimikrobieller Peptidproduktion und reduzierter Bakterienelimination (X.-J. Li et al., 2018b). Funktionell wird sDscam als Opsonin diskutiert, welches Pathogene binden und die intrazelluläre Aufnahme über mDscam-vermittelte Phagozytose initiieren kann (Watson et al., 2005a; X.-J. Li et al., 2018b).

Zur Charakterisierung von Präsenz und molekularer Masse von gewebesassoziiertem DSCAM in Folge von Immunstimulation wurden anti-DSCAM positive Proteine immunkompetenter Gewebe und Organe von *E. coli*-injizierten L5d3-Larven proteinbiochemisch analysiert (vgl. Kapitel 4.1.6). Dazu wurden Proteingemische aus Probenlysaten von zellfreiem Hämolymp plasma, zirkulierenden Hämocyten, Fettkörper, Labialdrüsen und dem zentralen Nervensystem elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. Kapitel 3.8.2). Nach Western Blotting (vgl. Kapitel 3.8.3) erfolgte der Proteinnachweis unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers, spezifisch für die extrazelluläre Domäne von *Drosophila melanogaster* DSCAM (anti-DmDSCAM EC 19545, vgl. Tabelle 3.20). Änderungen des Proteinmusters in Zusammenhang mit bakterieller Stimulation wurden durch vergleichende Analyse *E. coli*-injizierter Larven sowie unbehandelter und Saline-injizierter Kontrollen identifiziert. Vor kreuzreaktiver Verwendung mit Probenlysaten von *Manduca* wurde die Spezifität der polyklonalen anti-DmDSCAM-Immunsereen (vgl. Tabelle 3.20) mittels immunhistochemischer Markierung von

Drosophila- und *Manduca*-Embryonen validiert (vgl. Kapitel 3.9.2 und Abbildung 9.6). Spezifische Markierung von Konnektiven und Kommissuren des zentralen Nervensystems sowohl in *Drosophila*- als auch in *Manduca*-Embryonen war ausschließlich bei Verwendung des Immunsersums anti-*DmDSCAM* EC 19545 detektierbar (Daten nicht gezeigt). Entsprechend der Spezifität für Epitope in den extrazellulären Immunglobulin-domänen 1 bis 4 ist bei Verwendung des Immunsersums 19545 die Markierung von löslichem und membrangebundenem Dscam-Protein zu erwarten. Auf Grundlage von *in silico*-Prädiktion von *MsDscam* ist bei Vorhandensein von membranständiger und löslicher Proteinvariante mit einem Doppelbandenmuster bestehend aus Proteinen mit molekularen Massen von 215 bzw. 175 kDa zu rechnen (vgl. Abbildung 2.2). Mit Ausnahme des zellfreien Hämolympplasmas konnte in allen immunkompetenten Geweben und Organen unbehandelter, Saline- und *E. coli*-injizierter *Manduca*-Larven ein Doppelbandenmuster in der Nähe der Proteinstandards mit einer molekularen Masse von 250 kDa bzw. 180 kDa detektiert werden (vgl. Abbildung 4.6). Muster und Migrationsdistanz der Doppelbanden entsprechen dem Muster anti-DSCAM positiver Proteine im Probenlysat von *Drosophila*-Embryonen, was durchgehende Präsenz von membrangebundenem und löslichem DSCAM in larvalen Hämozyten sowie im Fettkörper und den Labialdrüsen nahelegt. Das Muster anti-DSCAM positiver Proteine im zentralen Nervensystem bestehend aus einer prominenten Bande im Migrationsbereich des 250 kDa Proteinstandards lässt hingegen primär auf Präsenz der membrangebundenen Proteinform schließen (vgl. Abbildung 4.9). Zellfreies Hämolymp plasma ist als einziges Probenlysat mit nur einer fokussierten Bande in der Nähe des Proteinstandards mit einer molekularen Masse von 250 kDa aufgefallen (vgl. Abbildung 4.7). 24 h nach systemischer *E. coli*-Stimulation konnten keine anti-DSCAM positiven Proteine mehr im Hämolymp plasma nachgewiesen werden, was Interaktion mit *E. coli* nahelegt. Die Hypothese von Interaktion mit Mikroorganismen wird im nachfolgenden Kapitel im Rahmen eines funktionellen *In vitro*-Assays diskutiert (siehe Kapitel 5.1.7). Im Rahmen von Immunpräzipitation berichten Watson et al. von einem verkürzten Protein im larvalen Hämolymp plasma von *Drosophila* mit einer molekularen Masse von ca. 160 kDa (Watson et al., 2005a). Der Unterschied in der molekularen Masse könnte in Zusammenhang mit posttranslationaler Modifikation von löslichem *MsDSCAM* stehen (vgl. Kapitel 2.3).

5.1.7 *In vitro*-Interaktion von Mikroorganismen und anti-DSCAM positiven Hämolympfplasmaproteinen

In Zusammenhang mit der Abwesenheit detektierbarer anti-DSCAM positiver Proteine im Hämolympfplasma *E. coli*-stimulierter Larven (vgl. Abbildung 4.7) wurde die Interaktion von Hämolympfplasma-DSCAM mit Mikroorganismen nach *in vitro*-Inkubation proteinbiochemisch analysiert (vgl. Kapitel 3.8.4). Dazu wurden inaktivierte *E. coli*, *S. aureus* und *P. falciparum* für 1 bzw. 12 h in zellfreiem Hämolympfplasma unbehandelter L5d2-Larven *in vitro* inkubiert (vgl. Abbildung 9.9). Anschließend wurden die sedimentierten und gewaschenen Mikroorganismen mittels Immunoblotting auf Adhäsion bzw. Bindung anti-DSCAM positiver Hämolympfplasmaproteine untersucht. Nach einer Dauer von 1 h waren anti-DSCAM positive Proteine exklusiv im Probenlysat inkubierter *Plasmodium*-Trophozoiten nachweisbar, während der Proteinnachweis 12 h nach Inkubation in den Lysaten aller drei Mikroorganismen positiv ausfiel (vgl. Abbildung 4.12). Muster und Migrationsdistanz anti-DSCAM positiver Proteine an inkubierten Mikroorganismen entsprechen den Plasmakontrollen, was oberflächliche Bindung, Adhäsion bzw. Interaktion von bzw. mit löslichem DSCAM im Hämolympfplasma immunnaiver *Manduca*-Larven nahelegt. Methodisch ähnliche Ansätze sind für aufgereinigte Dscam-Spleißformen aus Hämocyten von *Eriocheir* und *Litopenaeus* beschrieben, wobei der Fokus im Zuge von *in vitro*-Inkubation mit rekombinanten Fragmenten der hypervariablen Ig-Domänen auf Pathogen-Spezifität nachgewiesener Interaktionen liegt (Dong et al., 2006a). Selektive Interaktion rekombinanter Fragmente der Ig-Domänen 2 und 3 wird dementsprechend mit Opsonisierung von Mikroorganismen durch Pathogen-spezifische lösliche Dscam-Isoformen diskutiert, was nachgeschaltet zu erhöhter Phagozytose mittels homophiler Interaktion mit membranständigem Dscam zirkulierender Hämocyten führt (Hung et al., 2013; X.-J. Li et al., 2018b). Bedingt durch die Verwendung von Hämolympfplasma unbehandelter Larven zielt der vorliegende Assay hingegen primär auf die Interaktion mit dem Dscam-Isoformen-Repertoire immunnaiver Larven unter physiologischen Bedingungen ab. Bereits 1 h nach bakterieller Stimulation konnten *E. coli*-kolokalisierte Hämocyten detektiert werden (vgl. Abbildung 4.13), was die Dynamik zellulärer Mustererkennung sowie Zytoskelettmodellierung zur Aktivierung von Phagozytose im Rahmen der Akutphase-Immunantwort unterstreicht (Shandala et al., 2013). Im Kontext von Abwesenheit eines positiven Nachweises anti-DSCAM positiver Plasmaproteine 1 h nach *in vitro*-Inkubation von *E. coli* erscheint eine Beteiligung persistierender, löslicher DSCAM-Isoformen im Rahmen der Akutphase-Immunantwort nach Erstinfektion mit *E. coli* unwahrscheinlich. Die vergleichende Evaluation unabhängiger Beobachtungen zur *in vivo* Phagozytose und *in vitro* Bindung von *E. coli* legt nahe, dass ein Großteil der Bakterien bereits in der ersten Stunde nach Stimulation hocheffektiv und unabhängig von DSCAM-vermittelter Opsonisierung durch hyperphagozytäre Hämocyten aufgenommen werden (Dean et al., 2004). Die Beobachtung von Expression Pathogen-spezifischer Dscam-Spleißformen nach

Erstinfektion und erhöhter *in vitro*-Phagozytose von Bakterien nach Opsonisierung mit rekombinanten Fragmenten Erreger-spezifischer Proteinisoformen (X.-J. Li et al., 2018b) lässt Spielraum für eine mögliche DSCAM-vermittelte Immunantwort nach Zweitinfektion. Damit liefert der vorliegende „physiologische“ *in vitro* Microbial Binding Assay zusätzliche Evidenz für eine funktionelle Verbindung von Dscam und dem Phänomen des „Immunpriming“ in Insekten (Armitage et al., 2015a; W. Li, 2021). Anwendung von Far-Western Blotting (Far WB), Ko-Immünpräzipitation (Co-IP), Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder Massenspektrometrie zur Analyse von Protein-Protein-Interaktion könnte einen Beitrag zur Identifizierung der Bindungspartner und Evaluierung der Bindungsspezifität von löslichem und membranständigem DSCAM leisten (Y. Wu et al., 2007; V. S. Rao et al., 2014; Bonilla & Shrestha, 2024). Analyse der Interaktion von Mikroorganismen und löslichem Hämolymp plasma-DSCAM im Rahmen von Survival Assays mit *Manduca*-Larvenstadien könnte erstmals experimentelle Evidenz für funktionelle Beteiligung von Dscam am Immunpriming liefern.

5.2 Vergleichende Diskussion

Mit Ausnahme des Mitteldarms deutet die Analyse von RNA-Isolaten zirkulierender Hämocyten sowie des Fettkörpers unbehandelter *Manduca*-Larven mittels RT-PCR auf niedrige *dscam* Expression in immunkompetenten Geweben und Organen immunnaiver Larven, während Transkription von *dscam* im larvalen ZNS konstitutiv mit hohem mRNA-Level nachweisbar ist (vgl. Abbildung 4.1). Trotz niedriger bzw. nicht nachweisbarer aktiver Genexpression sind anti-DSCAM positive Proteine im Hämolymp plasma, zentralen Nervensystem und Fettkörper sowie in den Labialdrüsen und zirkulierenden Hämocyten unbehandelter Larven proteinbiochemisch mittels Western Blot detektierbar (vgl. Abbildung 4.6), was Evidenz für konstitutive Präsenz von DSCAM in Geweben und Organen immunnaiver Larven im Zuge langer Proteinhalbwertszeit zeigt. Im Kontext der immunrelevanten Gene *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* zeigt die vergleichende Analyse von RNA-Isolaten zirkulierender Hämocyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach *E. coli*-Stimulation Belege, die gemessen am mRNA-Level für geringfügig veränderte Expression von *dscam* nach Immunstimulation sprechen (vgl. Abbildung 4.2). Unabhängig von quantitativer Veränderung des mRNA-Levels zeigt die räumliche Analyse von *Dscam* Transkript mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung ein qualitativ verändertes Expressionsmuster in zirkulierenden Hämocyten bakteriell stimulierter Larven (vgl. Abbildung 4.3). Differenzierte Analyse des Hämocytenbildes unbehandelter L5d3-Larven mittels Zell- und Kernmorphologie, enzymzytochemischem Nachweis endogener Phenoloxidase und Immunphänotypisierung (vgl. Abbildung 4.5) legt konstitutive Expression von *dscam* exklusiv in Oenocytoiden nahe, die 2 – 3 % der zirkulierenden Hämocyten immunnaiver ausmachen (vgl. Abbildung 4.3). 24 h nach *E. coli*-Injektion ist Transkription von *dscam* hingegen in morphologisch unterschiedlichen Plasmatozyten-Subpopulationen und granulären Zellen nachweisbar (vgl. Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). Damit fällt die aktive Expression von *dscam* in ca. 22 % der zirkulierenden Hämocyten immunstimulierter Larven auf einen Zeitpunkt, der im Zuge niedriger Phagozytoserate (ca. 1 %, vgl. Abbildung 4.13) sowie niedriger bzw. nicht mehr nachweisbarer Hämocyten-assoziiierter Expression von *gloverin* bzw. *attacin* (vgl. Abbildung 4.2) die auslaufende Spätphase-Immunantwort nach *E. coli*-Stimulation darstellt.

6 Fazit und Konklusion

Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten ist Dscam im Rahmen von „Axon Guidance“ und „Neuronal Wiring“ an essenziellen Prozessen der neuronalen Entwicklung beteiligt, indem evolutionär konservierte homophile Interaktion Repulsion zur Vermeidung von Selbstadhäsion sich entwickelnder Neuronen („Self-Avoidance“) auslöst (Schmucker, 2007; Millard & Zipursky, 2008; Zipursky & Grueber, 2013). Entsprechend funktioneller Implikationen in der Entwicklung retinaler Neuronen von *Mus musculus*, *Gallus* und *Xenopus* (Fuerst et al., 2008; Yamagata & Sanes, 2008; Santos et al., 2022) ist die Expression von *dscam* in Vertebraten hauptsächlich in neuronalen Geweben dokumentiert (Hizawa et al., 2024a). Im Zusammenhang mit Genexpression in immunkompetenten Geweben und Organen liegen in unterschiedlichen Vertretern der *Pancrustacea* unabhängige Hinweise über eine Rolle von Dscam in angeborener Immunität vor (Ng & Kurtz, 2020). Hämozyten-spezifischer Funktionsverlust von Dscam nach RNAi, Antikörperblockierung oder homozygoter Mutation in isolierten larvalen Hämozyten bzw. stabilen Hämozyten-ähnlichen Zelllinien S2 (*Drosophila*, Schneider, 1972) und Sua5b (*Anopheles*, Dimopoulos et al., 1997; Müller et al., 1999; Rasgon et al., 2006) ist methodenübergreifend mit reduzierter *in vitro* Phagozytose von Bakterien und Hefen beschrieben (Watson et al., 2005a; Dong et al., 2006a). Zufallsbasierte Sequenzierung klonierter RT-PCR-Amplifikate variabler Exonkassetten zeigte zudem die Expression pathogen-spezifischer Dscam-Spleißformen in zirkulierenden Hämozyten von *Eriocheir sinensis* (Chinesische Wollhandkrabbe) und *Litopenaeus vannamei* (Weißfußgarnele) nach bakterieller Infektion (Hung et al., 2013; X.-J. Li et al., 2018a), was eine spezifische Modulation der angeborenen Immunantwort von *Crustacea* nach Immunstimulation nahelegt. Trotz Progresses in der Deskription von Genaktivität und molekularer Spleißformen-Diversität nach Infektion sowie des funktionellen Beitrages Pathogen-spezifischer, löslicher Isoformen an Hämozyten-vermittelter Phagozytose bleibt die Hämozytentyp-spezifische Expression von *dscam* im Rahmen zellulärer Immunantworten *in vivo* weiterhin unbekannt. Mit molekularbiologischen, proteinbiochemischen und histologischen Methoden wurde MsDscam im Rahmen der zellulären Immunantwort zirkulierender Hämozyten von *Manduca sexta*-Larven nach bakterieller Stimulation *in vivo* charakterisiert. Erstmals konnte mittels Analyse der räumlichen Transkriptverteilung eine distinkte, morphologisch homogene Hämozytenpopulation in unbehandelten Larven identifiziert werden, in der *dscam* in Abwesenheit von Immunstimulation konstitutiv exprimiert ist. Zell- und kernmorphologische Kriterien in Zusammenhang mit immunzytochemischer Phänotypisierung und enzymzytochemischem Nachweis endogener Phenoloxidasen liefern Hinweise, dass es sich bei dieser seltenen Immunzellpopulation um MS73^{pos}DSCAM^{pos}proPO^{pos} Oenozytoide handelt. 24 h nach systemischer *E. coli*-Stimulation *in vivo* zeigt sich ein qualitativ und quantitativ verändertes Transkriptionsmuster, charakterisiert durch aktive *dscam*-Expression in MS75^{pos} und MS77^{pos}

Plasmatozyten sowie in MS7^{pos} granulären Zellen. Insgesamt ist damit nach Hämocoel-Injektion Formaldehyd-inaktivierter *E. coli* K12 D31 ein typspezifisch verändertes Expressionsmuster von MsDscam-mRNA in zirkulierenden Hämozyten detektierbar, während das Muster anti-DSCAM positiver Proteine in larvalen Geweben und Organen mit Ausnahme des Hämolympplasmas unverändert bleibt. In Bezug zu den Transkriptleveln der immunrelevanten Gene *eater*, *lysozym*, *attacin* und *gloverin* nach *E. coli*-Stimulation ist die Expression von *dscam* in Hämozyten nur durch ein geringfügig erhöhtes relatives mRNA-Level charakterisiert. Hingegen ist das differenzielle Transkriptionsmuster nach *E. coli*-Injektion in spezifischen Hämozytenpopulationen verändert, was typspezifische Regulation der Genexpression nahelegt. Die Detektion des höchsten Dscam-mRNA-Leveln in Hämozyten 24 h nach Injektion bei gleichzeitig auslaufender Immunantwort liefert Evidenz für eine mögliche Beteiligung von Dscam am Phänomen des Immunpriming in Insekten und eine potenzielle Rolle Pathogen-spezifischer Dscam-Isoformen im Rahmen einer Zweitinfektion (Cooper & Eleftherianos, 2017; W. Li, 2021; Krejčová & Bajgar, 2025). Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) spezifischer Hämozytentypen von *Manduca sexta* und Einzelzell-Transkriptomsequenzierung (scRNAseq) im Rahmen von Immunpriming- und Survival-Assays (Cabrera et al., 2023; Prakash et al., 2024) könnte weiterführende Einblicke in Spezifität angeborener Immunantworten ermöglichen (Kurtz, 2005; Schulenburg et al., 2007) und einen Beitrag zum tieferen Verständnis des Konzeptes Transgenerationalen Immunprimings bei Insekten leisten (Vilcinskas, 2021). Der selektive Nachweis von Dscam-Transkript in MS73^{pos}proPO^{pos} Hämozyten unbehandelter *Manduca*-Larven bei Abwesenheit von Transkript in allen anderen Hämozytentypen legt nahe, dass konstitutive Expression von *dscam* eine exklusive Kompetenz von Oenozytoiden ist. Damit liefert die vorliegende Dissertationsarbeit erstmals experimentelle Evidenz für eine Beteiligung von larvalen Oenozytoiden an Dscam-vermittelter Mustererkennung in *Manduca sexta*. Die Untersuchung des Beitrages von Dscam an Oenozytoid-vermittelten Immunantworten in Insekten und Crustaceen hat das Potenzial, nicht nur die Regulation spezifischer Dscam-Spleiß-Signaturen aufzudecken (Dong et al., 2012), sondern auch ein tieferes Verständnis von Oenozytoiden als zelluläre Regulatoren angeborener Immunantworten zu ermöglichen (Eleftherianos et al., 2021a; Kwon et al., 2021).

7 Literaturverzeichnis

- Agarwala, K. L., Ganesh, S., Amano, K., Suzuki, T., & Yamakawa, K. (2001). DSCAM, a Highly Conserved Gene in Mammals, Expressed in Differentiating Mouse Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(3), 697–705. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4420>
- Akai, H., & Sato, S. (1973). Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 2(3), 207–231. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(73\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0020-7322(73)90029-9)
- Apitanyasai, K., Huang, S.-W., Ng, T. H., He, S.-T., Huang, Y.-H., Chiu, S.-P., Tseng, K.-C., Lin, S.-S., Chang, W.-C., Baldwin-Brown, J. G., Long, A. D., Lo, C.-F., Yu, H.-T., & Wang, H.-C. (2019). The gene structure and hypervariability of the complete *Penaeus monodon* Dscam gene. *Scientific Reports*, 9(1), 16595. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52656-x>
- Araya, M. T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G., & Berthe, F. C. J. (2008). Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.08.002>
- Armitage, S. A. O., Kurtz, J., Brites, D., Dong, Y., Du Pasquier, L., & Wang, H.-C. (2017). Dscam1 in Pancrustacean Immunity: Current Status and a Look to the Future. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00662>
- Armitage, S. A. O., Peuß, R., & Kurtz, J. (2015a). Dscam and pancrustacean immune memory – A review of the evidence. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.004>
- Armitage, S. A. O., Peuß, R., & Kurtz, J. (2015b). Dscam and pancrustacean immune memory – A review of the evidence. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.004>
- Arrigucci, R., Bushkin, Y., Radford, F., Lakehal, K., Vir, P., Pine, R., Martin, D., Sugarman, J., Zhao, Y., Yap, G. S., Lardizabal, A. A., Tyagi, S., & Gennaro, M. L. (2017). FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nature Protocols*, 12(6), 1245–1260. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.039>
- Ashida, M., Ochiai, M., & Niki, T. (1988). Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell*, 20(4), 599–610. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(88\)90061-4](https://doi.org/10.1016/0040-8166(88)90061-4)
- Axén, A., Carlsson, A., Engström, Å., & Bennich, H. (1997). Gloverin, an Antibacterial Protein from the Immune Hemolymph of *Hyalophora* Pupae. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 614–619. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00614.x>
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A., & Deutsch, J. S. (2002). Phylogenetic Analysis of Invertebrate Lysozymes and the Evolution of Lysozyme Function. *Journal of Molecular Evolution*, 54(5), 652–664. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0061-6>
- Baerlocher, G. M., Vulto, I., de Jong, G., & Lansdorp, P. M. (2006). Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nature Protocols*, 1(5), 2365–2376. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.263>
- Barlow, G. M., Micales, B., Lyons, G. E., & Korenberg, J. R. (2002). Down Syndrome Cell Adhesion Molecule is conserved in mouse and highly expressed in the adult mouse brain. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 94(3–4), 155–162. <https://doi.org/10.1159/000048808>
- Beaulaton, J. (1979). Hemocytes and hemocytogenesis in Silkworms. *Biochimie*, 61(2), 157–164. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(79\)80064-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(79)80064-4)
- 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. <https://doi.org/10.1002/arch.20221>

- Blow, F., & Douglas, A. E. (2019a). The hemolymph microbiome of insects. *Journal of Insect Physiology*, *115*, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.04.002>
- Blow, F., & Douglas, A. E. (2019b). The hemolymph microbiome of insects. *Journal of Insect Physiology*, *115*, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.04.002>
- Bonilla, P. A., & Shrestha, R. (2024). FLIM-FRET Protein-Protein Interaction Assay. In A. G. Stephen & D. Esposito (Hrsg.), *KRAS: Methods and Protocols* (S. 261–269). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3822-4_19
- Bouallegui, Y. (2021). A Comprehensive Review on Crustaceans' Immune System With a Focus on Freshwater Crayfish in Relation to Crayfish Plague Disease. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667787>
- Bredow, C. R. von, & Tenczek, T. E. (2022). Distinguishing *Manduca sexta* haemocyte types by cytometric methods. *Invertebrate Survival Journal*, *13*–27. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v19i1.13-27>
- Brites, D., & Du Pasquier, L. (2015). Somatic and Germline Diversification of a Putative Immunoreceptor within One Phylum: Dscam in Arthropods. In E. Hsu & L. Du Pasquier (Hrsg.), *Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations* (S. 131–158). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_6
- Brites, D., McTaggart, S., Morris, K., Anderson, J., Thomas, K., Colson, I., Fabbro, T., Little, T. J., Ebert, D., & Du Pasquier, L. (2008). The Dscam Homologue of the Crustacean *Daphnia* Is Diversified by Alternative Splicing Like in Insects. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(7), 1429–1439. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn087>
- Bruno, D., Montali, A., Mastore, M., Brivio, M. F., Mohamed, A., Tian, L., Grimaldi, A., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2021). Insights Into the Immune Response of the Black Soldier Fly Larvae to Bacteria. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.745160>
- Bryant, W. B., & Michel, K. (2016). *Anopheles gambiae* hemocytes exhibit transient states of activation. *Developmental & Comparative Immunology*, *55*, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.020>
- Buchmann, K. (2014). Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459>
- Buonocore, F., Fausto, A. M., Della Pelle, G., Roncevic, T., Gerdol, M., & Picchietti, S. (2021). Attacins: A Promising Class of Insect Antimicrobial Peptides. *Antibiotics*, *10*(2), 212. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020212>
- Cabrera, K., Hoard, D. S., Gibson, O., Martinez, D. I., & Wunderlich, Z. (2023). *Drosophila* immune priming to *Enterococcus faecalis* relies on immune tolerance rather than resistance. *PLOS Pathogens*, *19*(8), e1011567. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011567>
- Cao, X., & Jiang, H. (2015). Integrated modeling of protein-coding genes in the *Manduca sexta* genome using RNA-Seq data from the biochemical model insect. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *62*, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.007>
- Carton, Y., Poirié, M., & Nappi, A. J. (2008). Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science*, *15*(1), 67–87. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x>
- Castillo, J. C., Robertson, A. E., & Strand, M. R. (2006). Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *36*(12), 891–903. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.010>
- Celotto, A. M., & Graveley, B. R. (2001a). Alternative Splicing of the *Drosophila* Dscam Pre-mRNA Is Both Temporally and Spatially Regulated. *Genetics*, *159*(2), 599–608. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.599>
- Celotto, A. M., & Graveley, B. R. (2001b). Alternative Splicing of the *Drosophila* Dscam Pre-mRNA Is Both Temporally and Spatially Regulated. *Genetics*, *159*(2), 599–608. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.599>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2013). Variable immune molecules in invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, *216*(23), 4313–4319. <https://doi.org/10.1242/jeb.085191>
- Chou, P.-H., Chang, H.-S., Chen, I.-T., Lee, C.-W., Hung, H.-Y., & Han-Ching Wang, K. C. (2011a). *Penaeus monodon* Dscam (PmDscam) has a highly diverse cytoplasmic tail and is the first

- membrane-bound shrimp Dscam to be reported. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(4), 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.009>
- Chou, P.-H., Chang, H.-S., Chen, I.-T., Lee, C.-W., Hung, H.-Y., & Han-Ching Wang, K. C. (2011b). *Penaeus monodon* Dscam (PmDscam) has a highly diverse cytoplasmic tail and is the first membrane-bound shrimp Dscam to be reported. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(4), 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.009>
- Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2017). Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges. *Frontiers in Immunology*, 8, 539. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539>
- Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., & Hultmark, D. (1994). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: An expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular & General Genetics: MGG*, 242(2), 152–162. <https://doi.org/10.1007/BF00391008>
- Dean, P., Potter, U., Richards, E. H., Edwards, J. P., Charnley, A. K., & Reynolds, S. E. (2004). Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 50(11), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.09.003>
- Dimopoulos, G., Richman, A., Müller, H.-M., & Kafatos, F. C. (1997). Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11508–11513. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11508>
- Dong, Y., Cirimotich, C. M., Pike, A., Chandra, R., & Dimopoulos, G. (2012). *Anopheles* NF- κ B-Regulated Splicing Factors Direct Pathogen-Specific Repertoires of the Hypervariable Pattern Recognition Receptor AgDscam. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.004>
- Dong, Y., Taylor, H. E., & Dimopoulos, G. (2006a). AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System. *PLOS Biology*, 4(7), e229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040229>
- Dong, Y., Taylor, H. E., & Dimopoulos, G. (2006b). AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System. *PLOS Biology*, 4(7), e229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040229>
- Du Pasquier, L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00306-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00306-2)
- Dudzic, J. P., Hanson, M. A., Iatsenko, I., Kondo, S., & Lemaitre, B. (2019). More Than Black or White: Melanization and Toll Share Regulatory Serine Proteases in *Drosophila*. *Cell Reports*, 27(4), 1050–1061.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.101>
- 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), 81. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6>
- Ebrahimi, M., & Ajamhassani, M. (2020). Investigating the effect of starvation and various nutritional types on the hemocytic profile and phenoloxidase activity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Invertebrate Survival Journal*, 175–185. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.175-185>
- Edelman, G. M. (1983). Cell Adhesion Molecules. *Science*, 219(4584), 450–457. <https://doi.org/10.1126/science.6823544>
- Edwards, J. S., Milner, M. J., & Chen, S. W. (1978). Integument and sensory nerve differentiation of *Drosophila* leg and wing imaginal discs in vitro. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 185(1), 59–77. <https://doi.org/10.1007/BF00848215>
- Elangbam, C. S., Qualls, C. W., & Dahlgren, R. R. (1997). Cell Adhesion Molecules—Update. *Veterinary Pathology*, 34(1), 61–73. <https://doi.org/10.1177/030098589703400113>
- Eleftherianos, I., Heryanto, C., Bassal, T., Zhang, W., Tettamanti, G., & Mohamed, A. (2021a). Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*, 164(3), 401–432. <https://doi.org/10.1111/imm.13390>
- Eleftherianos, I., Heryanto, C., Bassal, T., Zhang, W., Tettamanti, G., & Mohamed, A. (2021b). Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight

- against pathogens and parasites. *Immunology*, 164(3), 401–432. <https://doi.org/10.1111/imm.13390>
- Elmekawy, A., Elshehaby, M., Saber, S., & Ayaad, T. (2023). Evaluation of *Galleria mellonella* immune response as a key step toward plastic degradation. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 84(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s41936-023-00349-3>
- Engström, P., Carlsson, A., Engström, A., Tao, Z. J., & Bennich, H. (1984). The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 3(13), 3347–3351. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02302.x>
- Erlor, S., Popp, M., & Lattorff, H. M. G. (2011). Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). *PLOS ONE*, 6(3), e18126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018126>
- Estévez-Lao, T. Y., & Hillyer, J. F. (2014). Involvement of the *Anopheles gambiae* Nimrod gene family in mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 44, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.10.008>
- Fang, Q., Wang, B.-B., Ye, X.-H., Wang, F., & Ye, G.-Y. (2016). Venom of Parasitoid *Pteromalus puparum* Impairs Host Humoral Antimicrobial Activity by Decreasing Host Cecropin and Lysozyme Gene Expression. *Toxins*, 8(2), 52. <https://doi.org/10.3390/toxins8020052>
- Fleming, A. (1997). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 93(653), 306–317. <https://doi.org/10.1098/rspb.1922.0023>
- Friedrich, M. (2013). Development and Evolution of the *Drosophila* Bolwig's Organ: A Compound Eye Relict. In A. Singh & M. Kango-Singh (Hrsg.), *Molecular Genetics of Axial Patterning, Growth and Disease in the Drosophila Eye* (S. 329–357). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8232-1_12
- Fuerst, P. G., Bruce, F., Tian, M., Wei, W., Elstrott, J., Feller, M. B., Erskine, L., Singer, J. H., & Burgess, R. W. (2009). DSCAM and DSCAML1 Function in Self-Avoidance in Multiple Cell Types in the Developing Mouse Retina. *Neuron*, 64(4), 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.027>
- Fuerst, P. G., Koizumi, A., Masland, R. H., & Burgess, R. W. (2008). Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM. *Nature*, 451(7177), Article 7177. <https://doi.org/10.1038/nature06514>
- Fuerst, P. G., Simmons, A. B., Bloomsburg, S., Briggs, D., Pecor, E., Young, J., & Hernandez, T. (2016). Dendrite Plasticity in the Adult Retina is Inhibited by DSCAM and Non-canonical Activity of the Cell Death Pathway Protein BAX. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(12), 1788.
- Galli-Resta, L., Leone, P., Bottari, D., Ensini, M., Rigosi, E., & Novelli, E. (2008). The genesis of retinal architecture: An emerging role for mechanical interactions? *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(3), 260–283. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.02.001>
- Gao, Y., & Fallon, A. M. (2000). Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. *Insect Molecular Biology*, 9(6), 553–558. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00216.x>
- Giulianini, P. G., Bertolo, F., Battistella, S., & Amirante, G. A. (2003). Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): Involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. *Tissue and Cell*, 35(4), 243–251. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(03\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(03)00037-5)
- Graveley, B. R. (2005). Mutually Exclusive Splicing of the Insect Dscam Pre-mRNA Directed by Competing Intronic RNA Secondary Structures. *Cell*, 123(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.028>
- Gunaratna, R. T., & Jiang, H. (2013). A comprehensive analysis of the *Manduca sexta* immunotranscriptome. *Developmental and comparative immunology*, 39(4), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.004>
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., & Fierer, N. (2017a). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9641–9646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707186114>

- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., & Fierer, N. (2017b). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(36), 9641–9646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707186114>
- Harjunpää, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01078>
- He, Y., Cao, X., Li, K., Hu, Y., Chen, Y., Blissard, G., Kanost, M. R., & Jiang, H. (2015). A genome-wide analysis of antimicrobial effector genes and their transcription patterns in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *62*, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.015>
- Henricks, P. A. J., & Nijkamp, F. P. (1998). Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. *European Journal of Pharmacology*, *344*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00036-3)
- Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and comparative immunology*, *58*, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Hillyer, J. F., & Strand, M. R. (2014a). Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Current Opinion in Insect Science*, *3*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.002>
- Hillyer, J. F., & Strand, M. R. (2014b). Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Current Opinion in Insect Science*, *3*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.002>
- Hizawa, K., Sasaki, T., & Arimura, N. (2024a). A comparative overview of DSCAM and its multifunctional roles in *Drosophila* and vertebrates. *Neuroscience Research*, *202*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.12.005>
- Hizawa, K., Sasaki, T., & Arimura, N. (2024b). A comparative overview of DSCAM and its multifunctional roles in *Drosophila* and vertebrates. *Neuroscience Research*, *202*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.12.005>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90220-3)
- Huang, F., Dambly-Chaudière, C., & Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development*, *111*(4), 1087–1095. <https://doi.org/10.1242/dev.111.4.1087>
- Hultmark, D. (1996). Insect lysozymes. *EXS*, *75*, 87–102. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9225-4_6
- Hultmark, D., & Andó, I. (2022). Hematopoietic plasticity mapped in *Drosophila* and other insects. *eLife*, *11*, e78906. <https://doi.org/10.7554/eLife.78906>
- Hultmark, D., Engström, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., & Boman, H. G. (1983). Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO Journal*, *2*(4), 571–576. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01465.x>
- Hung, H.-Y., Ng, T. H., Lin, J.-H., Chiang, Y.-A., Chuang, Y.-C., & Wang, H.-C. (2013). Properties of *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) isoforms related to specific pathogen recognition. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(4), 1272–1281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.045>
- Hussa, E., & Goodrich-Blair, H. (2012). Rearing and Injection of *Manduca sexta* Larvae to Assess Bacterial Virulence. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, *70*, e4295. <https://doi.org/10.3791/4295>
- Hwang, J., & Kim, Y. (2011). RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *108*(3), 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.09.003>
- Jan, Y. N., Ghysen, A., Christoph, I., Barbel, S., & Jan, L. Y. (1985). Formation of neuronal pathways in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*, *5*(9), 2453–2464. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.05-09-02453.1985>
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., & Kanost, M. R. (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. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00066-0)
- Jin, X.-K., Li, W.-W., Wu, M.-H., Guo, X.-N., Li, S., Yu, A.-Q., Zhu, Y.-T., He, L., & Wang, Q. (2013). Immunoglobulin superfamily protein Dscam exhibited molecular diversity by alternative splicing in hemocytes of crustacean, *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(3), 900–909. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.029>

- Johnston, P. R., Makarova, O., & Rolff, J. (2014). Inducible Defenses Stay Up Late: Temporal Patterns of Immune Gene Expression in *Tenebrio molitor*. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *4*(6), 947–955. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008516>
- Jorgensen, S. M., Kleveland, E. J., Grimholt, U., & Gjoen, T. (2006). Validation of Reference Genes for Real-Time Polymerase Chain Reaction Studies in Atlantic Salmon. *Marine Biotechnology*, *8*(4), 398–408. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-5164-4>
- Joseph-Silverstein, J., & Silverstein, R. L. (1998). Cell Adhesion Molecules: An Overview. *Cancer Investigation*, *16*(3), 176–182. <https://doi.org/10.3109/07357909809050034>
- Kaneko, Y., Furukawa, S., Tanaka, H., & Yamakawa, M. (2007). Expression of Antimicrobial Peptide Genes Encoding Enbocin and Gloverin Isoforms in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *71*(9), 2233–2241. <https://doi.org/10.1271/bbb.70212>
- Kanost, M. R., Jiang, H., & Yu, X.-Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, *198*(1), 97–105. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0121.x>
- Klebes, A., Biehs, B., Cifuentes, F., & Kornberg, T. B. (2002). Expression profiling of *Drosophila* imaginal discs. *Genome Biology*, *3*(8), research0038.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-8-research0038>
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M., Stehle, T., Hoffmann, J. A., Reichhart, J.-M., Ferrandon, D., Rämét, M., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). Eater, a Transmembrane Protein Mediating Phagocytosis of Bacterial Pathogens in *Drosophila*. *Cell*, *123*(2), 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.034>
- Krejčová, G., & Bajgar, A. (2025). Current insights into insect immune memory. *eLife*, *14*, e105011. <https://doi.org/10.7554/eLife.105011>
- Kroeger Jr., P. T., Tokusumi, T., & Schulz, R. A. (2012). Transcriptional regulation of eater gene expression in *Drosophila* blood cells. *Genesis*, *50*(1), 41–49. <https://doi.org/10.1002/dvg.20787>
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, *26*(4), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>
- Kurucz, É., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradzsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., Zettervall, C.-J., Hultmark, D., & Andó, I. (2007). Nimrod, a Putative Phagocytosis Receptor with EGF Repeats in *Drosophila* Plasmotocytes. *Current Biology*, *17*(7), 649–654. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.041>
- Kwon, H., Hall, D. R., & Smith, R. C. (2021). Prostaglandin E2 Signaling Mediates Oenocytoid Immune Cell Function and Lysis, Limiting Bacteria and Plasmodium Oocyst Survival in *Anopheles gambiae*. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680020>
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*(10), 1295–1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Lee, W.-J., & Brey, P. T. (1995). Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Gene*, *161*(2), 199–203. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00199-G](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00199-G)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.003>
- Levsky, J. M., & Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future. *Journal of Cell Science*, *116*(14), 2833–2838. <https://doi.org/10.1242/jcs.00633>
- Li, D., & Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 291. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
- Li, S., Sukeena, J. M., Simmons, A. B., Hansen, E. J., Nuhn, R. E., Samuels, I. S., & Fuerst, P. G. (2015). DSCAM Promotes Refinement in the Mouse Retina through Cell Death and Restriction of Exploring Dendrites. *Journal of Neuroscience*, *35*(14), 5640–5654. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2202-14.2015>
- Li, W. (2021). Dscam in arthropod immune priming: What is known and what remains unknown. *Developmental and Comparative Immunology*, *125*, 104231. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104231>

- Li, X.-J., Yang, L., Li, D., Zhu, Y.-T., Wang, Q., & Li, W.-W. (2018a). Pathogen-Specific Binding Soluble Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) Regulates Phagocytosis via Membrane-Bound Dscam in Crab. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00801>
- Li, X.-J., Yang, L., Li, D., Zhu, Y.-T., Wang, Q., & Li, W.-W. (2018b). Pathogen-Specific Binding Soluble Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) Regulates Phagocytosis via Membrane-Bound Dscam in Crab. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00801>
- Lian, K., Wang, Y., Jiao, Y., Meng, X., Ma, Z., Zhang, Y., & Zhou, L. (2025). Identification and expression of a novel antimicrobial peptide Gloverin and its antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 25(1), 554. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04197-9>
- Lin, Z., Wang, J.-L., Cheng, Y., Wang, J.-X., & Zou, Z. (2020). Pattern recognition receptors from lepidopteran insects and their biological functions. *Developmental & Comparative Immunology*, 108, 103688. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103688>
- Ling, E., & Yu, X.-Q. (2006a). Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(3), 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.005>
- Ling, E., & Yu, X.-Q. (2006b). 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. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.006>
- Marra, A., Hanson, M. A., Kondo, S., Erkosar, B., & Lemaitre, B. (2021). Drosophila Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. *mBio*, 12(4), 10.1128/mbio.00824-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.00824-21>
- Martins, G. F., & Ramalho-Ortigão, J. M. (2012). Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9(2), 139–152.
- Matthews, B. J., Kim, M. E., Flanagan, J. J., Hattori, D., Clemens, J. C., Zipursky, S. L., & Grueber, W. B. (2007). Dendrite Self-Avoidance Is Controlled by Dscam. *Cell*, 129(3), 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.013>
- McMillan, L. E., & Adamo, S. A. (2020). Friend or foe? Effects of host immune activation on the gut microbiome in the caterpillar *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, 223(19), jeb226662. <https://doi.org/10.1242/jeb.226662>
- Meister, M., & Lagueux, M. (2003). Drosophila blood cells. *Cellular Microbiology*, 5(9), 573–580. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00302.x>
- Melcarne, C., Ramond, E., Dudzic, J., Bretscher, A. J., Kurucz, É., Andó, I., & Lemaitre, B. (2019). Two Nimrod receptors, NimC1 and Eater, synergistically contribute to bacterial phagocytosis in *Drosophila melanogaster*. *The FEBS Journal*, 286(14), 2670–2691. <https://doi.org/10.1111/febs.14857>
- Millard, S. S., & Zipursky, S. L. (2008). Dscam-mediated repulsion controls tiling and self-avoidance. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.005>
- Moreland, T., & Poulain, F. E. (2022). To Stick or Not to Stick: The Multiple Roles of Cell Adhesion Molecules in Neural Circuit Assembly. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 889155. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.889155>
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., & Renault, T. (2010). Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 937–945. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.028>
- Morishima, I., Horiba, T., Iketani, M., Nishioka, E., & Yamano, Y. (1995). Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental & Comparative Immunology*, 19(5), 357–363. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(95\)00019-P](https://doi.org/10.1016/0145-305X(95)00019-P)
- Müller, H.-M., Dimopoulos, G., Blass, C., & Kafatos, F. C. (1999). A Hemocyte-like Cell Line Established from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Expresses Six Prophenoloxidase Genes*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11727–11735. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11727>
- Mulnix, A. B., & Dunn, P. E. (1994). Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(3), 271–281. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)90007-8)

- Murray, M. A., Schubiger, M., & Palka, J. (1984). Neuron differentiation and axon growth in the developing wing of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 104(2), 259–273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90082-4)
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., & Vilcinskas, A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1695), 20150290. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.026>
- Nardi, J. B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K., & Kanost, M. R. (2003). Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Development Genes and Evolution*, 213(10), 477–491. <https://doi.org/10.1007/s00427-003-0352-6>
- Neves, G., Zucker, J., Daly, M., & Chess, A. (2004). Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. *Nature Genetics*, 36(3), 240–246. <https://doi.org/10.1038/ng1299>
- Ng, T. H., Chiang, Y.-A., Yeh, Y.-C., & Wang, H.-C. (2014). Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.002>
- Ng, T. H., & Kurtz, J. (2020). Dscam in immunity: A question of diversity in insects and crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, 105, 103539. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103539>
- Patel, S. D., Chen, C. P., Bahna, F., Honig, B., & Shapiro, L. (2003). Cadherin-mediated cell–cell adhesion: Sticking together as a family. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(6), 690–698. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.10.007>
- Pech, L. L., & Strand, M. R. (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science*, 109(8), 2053–2060. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.8.2053>
- Petruzzelli, L., Takami, M., & Humes, H. D. (1999). Structure and function of cell adhesion molecules. *The American Journal of Medicine*, 106(4), 467–476. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00058-3)
- Peuß, R., Wensing, K. U., Woestmann, L., Eggert, H., Milutinović, B., Sroka, M. G. U., Scharsack, J. P., Kurtz, J., & Armitage, S. A. O. (2016). Down syndrome cell adhesion molecule 1: Testing for a role in insect immunity, behaviour and reproduction. *Royal Society Open Science*. <https://doi.org/10.1098/rsos.160138>
- Pradeu, T., Thomma, B. P. H. J., Girardin, S. E., & Lemaitre, B. (2024). The conceptual foundations of innate immunity: Taking stock 30 years later. *Immunity*, 57(4), 613–631. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.007>
- Prakash, A., Fenner, F., Shit, B., Salminen, T. S., Monteith, K. M., Khan, I., & Vale, P. F. (2024). IMD-mediated innate immune priming increases *Drosophila* survival and reduces pathogen transmission. *PLOS Pathogens*, 20(6), e1012308. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012308>
- Price, C. D., & Ratcliffe, N. A. (1974). A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 147(4), 537–549. <https://doi.org/10.1007/BF00307254>
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014(1), 147648. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>
- Rao, X.-J., & Yu, X.-Q. (2010). Lipoteichoic Acid and Lipopolysaccharide can Activate Antimicrobial Peptide Expression in the Tobacco Hornworm *Manduca sexta*. *Developmental and comparative immunology*, 34(10), 1119–1128. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.007>
- Rasgon, J. L., Ren, X., & Petridis, M. (2006). Can *Anopheles gambiae* Be Infected with *Wolbachia pipiensis*? Insights from an In Vitro System. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7718–7722. <https://doi.org/10.1128/AEM.01578-06>

- Ren, G., Roberts, A. I., & Shi, Y. (2011). Adhesion molecules: Key players in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adhesion & Migration*, 5(1), 20–22. <https://doi.org/10.4161/cam.5.1.13491>
- Ribeiro, C., & Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52(5), 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Rizki, M. T. M. (1957). Tumor formation in relation to metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, 100(3), 459–472. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051000304>
- Rusaini, & Owens, L. (2010). Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(3), 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.011>
- Samanta, D., & Almo, S. C. (2015). Nectin family of cell-adhesion molecules: Structural and molecular aspects of function and specificity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(4), 645–658. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1763-4>
- Santos, R. A., Del Rio, R., Alvarez, A. D., Romero, G., Vo, B. Z., & Cohen-Cory, S. (2022). DSCAM is differentially patterned along the optic axon pathway in the developing *Xenopus* visual system and guides axon termination at the target. *Neural Development*, 17(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13064-022-00161-9>
- Sasikumar, A. N., Perez, W. B., & Kinzy, T. G. (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *WIREs RNA*, 3(4), 543–555. <https://doi.org/10.1002/wrna.1118>
- Sawaya, M. R., Wojtowicz, W. M., Andre, I., Qian, B., Wu, W., Baker, D., Eisenberg, D., & Zipursky, S. L. (2008). A Double S Shape Provides the Structural Basis for the Extraordinary Binding Specificity of Dscam Isoforms. *Cell*, 134(6), 1007–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.042>
- Schlamp, F., Delbare, S. Y. N., Early, A. M., Wells, M. T., Basu, S., & Clark, A. G. (2021). Dense time-course gene expression profiling of the *Drosophila melanogaster* innate immune response. *BMC Genomics*, 22(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07593-3>
- Schmucker, D. (2007). Molecular diversity of Dscam: Recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(12), 915–920. <https://doi.org/10.1038/nrn2256>
- Schmucker, D., & Chen, B. (2009). Dscam and DSCAM: Complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes & Development*, 23(2), 147–156. <https://doi.org/10.1101/gad.1752909>
- Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J. E., & Zipursky, S. L. (2000). *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell*, 101(6), 671–684. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80878-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80878-8)
- Schmucker, D., Jäckle, H., & Gaul, U. (1997). Genetic analysis of the larval optic nerve projection in *Drosophila*. *Development*, 124(5), 937–948. <https://doi.org/10.1242/dev.124.5.937>
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 27(2), 353–365. <https://doi.org/10.1242/dev.27.2.353>
- Schramm, R. D., Li, S., Harris, B. S., Rounds, R. P., Burgess, R. W., Ytreberg, F. M., & Fuerst, P. G. (2012). A Novel Mouse Dscam Mutation Inhibits Localization and Shedding of DSCAM. *PLOS ONE*, 7(12), e52652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052652>
- Schulenburg, H., Boehnisch, C., & Michiels, N. K. (2007). How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Molecular Immunology*, 44(13), 3338–3344. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.019>
- Shandala, T., Lim, C., Sorvina, A., & Brooks, D. A. (2013). A *Drosophila* Model to Image Phagosome Maturation. *Cells*, 2(2), 188–201. <https://doi.org/10.3390/cells2020188>
- Shelby, K. S., & Popham, H. J. R. (2012). RNA-Seq Study of Microbially Induced Hemocyte Transcripts from Larval *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 3(3), 743–762. <https://doi.org/10.3390/insects3030743>
- Shin, M., Chang, E., Lee, D., Kim, N., Cho, B., Cha, N., Koranteng, F., Song, J.-J., & Shim, J. (2024). *Drosophila* immune cells transport oxygen through PPO2 protein phase transition. *Nature*, 631(8020), 350–359. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07583-x>

- Sierra-Arregui, T., Llorente, J., Giménez Minguez, P., Tønnesen, J., & Peñagarikano, O. (2020). Neurobiological Mechanisms of Autism Spectrum Disorder and Epilepsy, Insights from Animal Models. *Neuroscience*, *445*, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.043>
- Silva, R. C. M. C., & Gomes, F. M. (2024). Evolution of the Major Components of Innate Immunity in Animals. *Journal of Molecular Evolution*, *92*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1007/s00239-024-10155-2>
- Simmons, A. B., Bloomsburg, S., Briggs, D., Hix, J., Pecor, E., Billingslea, S., Young, J., & Fuerst, P. G. (2016). Type 4 cone bipolar cell dendrite morphology is maintained by DSCAM and BAX in the adult mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *57*(12).
- Simmons, A. B., Bloomsburg, S. J., Sukeena, J. M., Miller, C. J., Ortega-Burgos, Y., Borghuis, B. G., & Fuerst, P. G. (2017). DSCAM-mediated control of dendritic and axonal arbor outgrowth enforces tiling and inhibits synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(47), E10224–E10233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713548114>
- Spencer, E. K., Miller, C. R., & Bull, J. J. (2025). Standardized methods for rearing a moth larva, *Manduca sexta*, in a laboratory setting. *PLOS ONE*, *20*(4), e0316776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316776>
- Sperandio, M. (2006). Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *The FEBS Journal*, *273*(19), 4377–4389. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05437.x>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Sugiyama, M., Kuniyoshi, H., Kotani, E., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., & Xu, J. (1995). Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *25*(3), 385–392. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00080-2](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00080-2)
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., Sunagawa, T., Yamaji, K., Asaoka, A., Mita, K., & Yamakawa, M. (2008). A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *38*(12), 1087–1110. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.001>
- Vilcinskas, A. (2021). Mechanisms of transgenerational immune priming in insects. *Developmental & Comparative Immunology*, *124*, 104205. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104205>
- Viljakainen, L. (2015). Evolutionary genetics of insect innate immunity. *Briefings in Functional Genomics*, *14*(6), 407–412. <https://doi.org/10.1093/bfpg/14.6.407>
- von Bredow, C.-R., von Bredow, Y. M., & Trenczek, T. E. (2021). The larval haematopoietic organs of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): An insight into plasmatocyte development and larval haematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, *115*, 103858. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103858>
- von Bredow, Y. M., Prochazkova, P., Dvorak, J., Skanta, F., Trenczek, T. E., Bilej, M., & von Bredow, C.-R. (2023). Differential expression of immunity-related genes in larval *Manduca sexta* tissues in response to gut and systemic infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1258142>
- von Bredow, Y. M., von Bredow, C.-R., & Trenczek, T. E. (2020). A novel site of haematopoiesis and appearance and dispersal of distinct haemocyte types in the *Manduca sexta* embryo (Insecta, Lepidoptera). *Developmental & Comparative Immunology*, *111*, 103722. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103722>
- Wang, G., Wang, J., & Liu, X. (2025). A C-type lectin of *Helicoverpa armigera* maintains the stability of the hemolymph microbiota by regulating the expression of lysozyme. *Journal of Insect Physiology*, *163*, 104799. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2025.104799>
- Wang, J., Wang, L., Gao, Y., Jiang, Q., Yi, Q., Zhang, H., Zhou, Z., Qiu, L., & Song, L. (2013). A tailless Dscam from *Eriocheir sinensis* diversified by alternative splicing. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(2), 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.029>
- Wang, X., Li, G., Yang, Y., Wang, W., Zhang, W., Pan, H., Zhang, P., Yue, Y., Lin, H., Liu, B., Bi, J., Shi, F., Mao, J., Meng, Y., Zhan, L., & Jin, Y. (2012). An RNA architectural locus control region

- involved in Dscam mutually exclusive splicing. *Nature Communications*, 3(1), 1255. <https://doi.org/10.1038/ncomms2269>
- Watson, F. L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D. L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V. I., & Schmucker, D. (2005a). Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science*, 309(5742), 1874–1878. <https://doi.org/10.1126/science.1116887>
- Watson, F. L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D. L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V. I., & Schmucker, D. (2005b). Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science*, 309(5742), 1874–1878. <https://doi.org/10.1126/science.1116887>
- Watthanasurorot, A., Jiravanichpaisal, P., Liu, H., Söderhäll, I., & Söderhäll, K. (2011). Bacteria-Induced Dscam Isoforms of the Crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *PLOS Pathogens*, 7(6), e1002062. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002062>
- Wicherska-Pawłowska, K., Wróbel, T., & Rybka, J. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13397. <https://doi.org/10.3390/ijms222413397>
- Willott, E., Trenczek, T., Thrower, L. W., & Kanost, M. R. (1994). Immunochemical identification of insect hemocyte populations: Monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *manduca sexta*. *European Journal of Cell Biology*, 65(2), 417–423.
- Wohlkönig, A., Huet, J., Looze, Y., & Wintjens, R. (2010). Structural Relationships in the Lysozyme Superfamily: Significant Evidence for Glycoside Hydrolase Signature Motifs. *PLOS ONE*, 5(11), e15388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015388>
- Wu, F., Xie, Z., Yan, M., Li, Q., Song, J., Hu, M., & Wang, Y. (2019). Classification and characterization of hemocytes from two Asian horseshoe crab species *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda*. *Scientific Reports*, 9(1), 7095. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43630-8>
- Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Ye, X., Liu, D., & Chen, J. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*, 274, 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>
- Wu, Y., Li, Q., & Chen, X.-Z. (2007). Detecting protein–protein interactions by far western blotting. *Nature Protocols*, 2(12), 3278–3284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.459>
- Xin, F., & Zhang, X. (2023). Hallmarks of crustacean immune hemocytes at single-cell resolution. *Frontiers in Immunology*, 14, 1121528. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1121528>
- Xu, X.-X., Zhong, X., Yi, H.-Y., & Yu, X.-Q. (2012). *Manduca sexta* Gloverin Binds Microbial Components and is Active against Bacteria and Fungi. *Developmental and comparative immunology*, 38(2), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.06.012>
- Yamagata, M., & Sanes, J. R. (2008). Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. *Nature*, 451(7177), 465–469. <https://doi.org/10.1038/nature06469>
- Yamagata, M., Weiner, J. A., & Sanes, J. R. (2002). Sidekicks: Synaptic Adhesion Molecules that Promote Lamina-Specific Connectivity in the Retina. *Cell*, 110(5), 649–660. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00910-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00910-8)
- Yamakawa, K., Huo, Y.-K., Haendel, M. A., Hubert, R., Chen, X.-N., Lyons, G. E., & Korenberg, J. R. (1998a). DSCAM: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Maps in a Down Syndrome Region and is Involved in the Development of the Nervous System. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 227–237. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.227>
- Yamakawa, K., Huo, Y.-K., Haendel, M. A., Hubert, R., Chen, X.-N., Lyons, G. E., & Korenberg, J. R. (1998b). DSCAM: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Maps in a Down Syndrome Region and is Involved in the Development of the Nervous System. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 227–237. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.227>
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., & Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5807–5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Yi, H.-Y., Deng, X.-J., Yang, W.-Y., Zhou, C.-Z., Cao, Y., & Yu, X.-Q. (2013). Gloverins of the silkworm *Bombyx mori*: Structural and binding properties and activities. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(7), 612–625. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.013>

- Young, A. P., Jackson, D. J., & Wyeth, R. C. (2020). A technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization. *PeerJ*, 8, e8806. <https://doi.org/10.7717/peerj.8806>
- Yu, X.-Q., Zhu, Y.-F., Ma, C., Fabrick, J. A., & Kanost, M. R. (2002). Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1287–1293. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00091-7)
- Zhang, Q., Zmasek, C. M., & Godzik, A. (2010). Domain architecture evolution of pattern-recognition receptors. *Immunogenetics*, 62(5), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s00251-010-0428-1>
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 62, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.02.001>
- Zhang, X., Zhang, X., Zong, S., Shen, G., Zhao, Y., Li, W., & Wang, Q. (2023). The extracellular non-variable region of Dscam promotes bacterial clearance by promoting phagocytosis of hemocytes in *Eriocheir sinensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 138, 104541. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104541>
- Zhao, L., Niu, J., Feng, D., Wang, X., & Zhang, R. (2023). Immune functions of pattern recognition receptors in Lepidoptera. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1203061>
- Zipursky, S. L., & Grueber, W. B. (2013). The Molecular Basis of Self-Avoidance. *Annual Review of Neuroscience*, 36(Volume 36, 2013), 547–568. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150414>
- Zou, Z., Evans, J. D., Lu, Z., Zhao, P., Williams, M., Sumathipala, N., Hetru, C., Hultmark, D., & Jiang, H. (2007). Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biology*, 8(8), R177. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r177>

8 Eidesstattliche Versicherung

„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.“

Angaben zu auf künstlicher Intelligenz (KI) basierender Hilfen wie ChatGPT oder SchulKI von OpenAI oder Gemini von Google zur Erstellung meiner Dissertation (Zutreffendes angekreuzt):

Ich habe bei der Erstellung dieses Textes kein KI-Tool verwendet.

Ich habe ein KI-Tool in den folgenden Bereichen eingesetzt (Mehrfachnennungen möglich):

Ideen finden, meine Kreativität anregen

Verstehen von Konzepten, Recherche von Fakten und Definitionen

Optimierung eines von mir verfassten Textes

Erstellen ganzer Textpassagen nach meinen Vorgaben

Folgende KI-Tools habe ich verwendet, damit aufgeführte Teile meines Textes von dem Tool wie folgt profitiert haben:

Im Rahmen der Erstellung der Diskussion (siehe Kapitel 5) wurde **ChatGPT**, Modellversion **GPT-5 Thinking** (OpenAI, San Francisco, Kalifornien, USA) zu folgenden Zwecken verwendet:

- Literaturrecherche
- Exzerption
- Übersetzung
- Validierung, Zusammenfassung und Lektorierung eigener Texte

Eingabeaufforderungen (engl. prompts) und originale Textausgaben durch ChatGPT wurden protokolliert und außerhalb der vorliegenden Dissertationsarbeit gespeichert. Textausgaben wurden im Rahmen eigener Recherche kontrolliert und validiert, bevor einzelne Textpassagen oder Informationen zur Anfertigung der Diskussion verwendet wurden. Alle weiteren Kapitel wurden ohne Verwendung von künstlicher Intelligenz erstellt.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Appendix

9.1 Nukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen

9.1.1 Sequenz-ID: Msex2.09537-RA

9.1.1.1 Nukleotidsequenz (cDNA)

Host: i5k Workspace (i5K Consortium 2013)
Organismus: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)
Datenbank: Transkriptom (Manduca_sexta_OGS_v2.0_transcript, Kanost et al. 2016)
Sequenz-ID: Msex2.09537-RA
Anzahl der Basen: 8.115

```
>gnl|Manduca_sexta_transcript_OGS_v2.0|Msex2.09537-RA
JH668578.1:92198-155888 (-)
TTTCTCGGACGGGTCGGTCGTCGCCGCTCGTCCCTCTCGTGTGTGTTGTGGTTCTAGTGTT
GTGGTGCAGCGCCATACCACCTCTTCATCTCCGCAGATTCCGTCTAATCTCGGCCGCATC
GCGGCCATCTGAGTTTATTTTTTTTGTTCAGTGGAATTTTGTTTTGTGTTGTCCAGTGAC
TCTAGTGATCAGTGAAGTGTCTGACTGTGAATATGGCTTATAAAGGATTCCTCGCCCTC
GTGGCGCTGGCCATTATAGGGTCAGCGCTATGCGAGGACGAACTATCGGCCCGATTTTC
ATGAAGGAACCCCAAACCGAGTTGACTTCAGCAACACGACCGGCGCGACTGTAGAATGT
GCTGCACGTGGATCCCCTGCTCCTGACATCATTTGGGTACGCGCTGATGGAAC TGCCGTT
GGAGATGTCCCTGGACTGCGTCAAGTACAAGCGAATGGAAATCTGTTGTTCCCGCCCTTC
CGTGCCGAGGATTATCGTCAAGAGGTCCACGCTCAGGTGTACGCTTGCCCTTGCCCGTAAC
TCTGTCCGTACCATTCACTCCAAGGACGTTAATGTACGCGCCGTGGTGGCACAGCAATAC
GATACCGACGTGAACAAGGAATATGTTATCATGGGAAACAGCATCATATAAAATGTCAG
GTCCCATCTTTTCGTCGCTGATTTTATAGAAGTACTCTCATGGCACACCGACGAAAAGAA
GACTTCTTCCCTGGCAATAACTATGACGGCAAAATTTTAGTCTTACCATCGGGAGAATTG
CATATCCGTGATGTCGGACCCGAGGACGGTTACAAATCATACCAATGTCGTACTAAGCAC
AGACTCACTGGTGAAACTCGATTATCCGCTACTAAAGGAAGGCTGGTCATTACGGAGCCG
GTGGGTGATGTTCCCTCCGAAGGTTCCCAGTGCGCAGACAACCATTGGCTTCCAGTTTAGC
GAACATACAAGTCTCGCAGTTTTGTGCCCAGCACAGGCTTTTCCCTGCACCTCTTTACCGA
TGGTATAAATTCATTGATGGCACCACCTCGAAAACAACCAGTCACCCTTGACGACAGAGTG
AAACAAGTATCTGGAACCCTGATCATTAAAGGAAGCTAAAGTTGAAGATTCTGGAAAGTAC
TTATGCGTTGTTAAACAATTCCGTTGGAGGTGAATCCGTGGAAACCGTACTGACCGTAACA
GCTCCTCTGAAAGCTACTGTTGAACCAGCCACGCAAACTGTAGACTTTGGACGCCAGCA
GTCTTCACTTGACAGATACGAAGGCAATCCCGTTAAGACTATTACCTGGCTTAAAGACGGA
AAGGATATCAAGCACCACGACACCATTTTAAAGGATTGAATCGGTAAAGAAGGAAGACAAG
GGAATGTACCAATGCTTTATTAGAAACGATCAAGAGAGCGCAGGTGCTAGTGCTGAACTG
AAACTCGGAGGACGATTGCAACCACCCAGATTAGACACAGCTTTGGCGAACAGACCTTC
CGCTCCGGCCCGTCCCTGCGCTTAAAGTGCCTTGCATCTGGAAACCCCACTCCTGACATC
ACATGGCTCTTGACGGTGAGAAGCTGAACAGCGGAGATCGCCTGCAAATTTGGACAATTC
GTTACTGCTGACGGCAACGTGGAATCCCATCTTAACATCTCCTCTGTACACACCAACGAC
GGCGGTCTTTACACTTGCTCTGCTTCTAGCAAGGTCGGAAGTGCATCCCACTCATCTCGC
GTCAACGTTTATGGCCTGCCCTACGTCCGACCCATGAAGAAACGCCCCGTGGTTCGCTGGA
GACACCCTCATCGTGCCTGCCAGTTGCCGGCTACCCGATTGAATCTATTGTTTGGGAA
CGTGATGGACGTGTGCTGCCAATCAACCGCAAACAGAAGGTATTCCCAACGGCACACTG
GTAATCGAGAACGTTGAACGCATGAGCGACGAAGCTACCTACACGTGTGTTGCCAAGAAC
TCCCAGGCCTTCACTCCAAGGGCACACTTGAAGTCAAGTCATGGTGCCACCACAAATC
ACGCCTTTTGAATTTGGAGAAGAAATACTGAATGAAGGAGAACTGCATCAGTGCAATGC
GTAGTAAGCAAGGGGGATCTTCCAATTACATACAAATGGTTATTTAATGGCGAAGAAATC
AAGACACAAAATACACTCGGAATTCATCACAAAAATTAGCAAAAAAACATCCATATTA
```

AACATTGAAGCCGTGAGTGAATTCATCGAGGTTCTACACGTGTGAGATCAAAAATGCA
GCCGGAATGACCAATCACACCACGGTTCTAAGTGTTAACGTACCTCCTCGCTGGATCTTA
GAACCTACTGATAAGGCTTTTGGCTCAAGGTTCCGATGCTAAAAGTTGAATGTAAAGCCGAT
GGCTTCCCCAAGCCCCAAGTCACATGGAAGAGAGCTGAAGGGGATACGCCTGGCGATTAC
AAAGACTTGAAACCCAACAACCCTAATGTAAAGGTTGAGGACGGTACATTGGCTATTACT
AACATCCAGAAAACAAATGAAGGCTATTATCTTTGCGAAGCTGTAAACCGAATTGGATCA
GGATTATCCGCTGTCAATTCTTATTAGTGTACAAGCTCCCCCTCAATTCGAAATTTAAATG
AGGAATCAAACCTGCTCGCCGAAGTGAACCCGCTGTGCTGCAATGTCAAGCTAAAGGAGAA
AAGCCTATTGGAATTATCTGGAACATGAACAACAAACGCCTCGAACCTAAATCCGACCCT
CGTTACACGATCCGCGAAGAAATTTCTGCCCGGTGGAGTTGTCTCTGATCTCAGCATTAGA
AGGACTGAACGTTCCGACAGCGCCCTTTTACCTGTGTTGCGACTAACGCCCTTTGGATCC
GATGATACTAGCATTAAACATGATTATCCAAGAGGTACCCGAAGCACCCCTATGGCTTAAAA
GTATTGGACAAATCTGGAAGGACCGTTTCAGTTGTCGTGGGCTGCACCATAACGACGGAAC
TCGCCTATCAAGAAGTTTCCTCATTGAATACAAACGCGCTAAAGGCAACTGGGAAAAAGAT
ATTGACAGAGTTCTCGTACCAGGAGATGCTACTGAAGCCGGTGTATTTGGACTTAGACCT
GCTACTGCTTACCACATCAGGATTGTTGCTGAAAATGAACTCGGAACCTTCTGAACCCTCT
GAGACTGTTACAATTATCACTGCCGAAGAAGCTCCTACTGGCCCTCCCCAAGACGTGAAA
ATCGATGCTATTGACAAACACACTCTGCGAGTTACCTGGAAACCCCTCCGCCCCAGGAC
TGGAACGGCGAACTGCAAGGATACTACGTTGGGTACAAGCTGGCCTCAAGCAACAAGTCT
TTTGTCTTTGAAACCGTTGATATTTCCAAGGAATCCGGCAAGGAACATCATCTTGACATT
TTGAATCTGAAGACATACCCCAATACGCTGTAGTTGTACAAGCCTTCAACAAAATGGGT
TCCGGACCAGTCTCTGGTGAAGTGCGCGCGTACACTGCTGAAGGTGCCCCCTCTGCCCG
CCTCAAGATGTCTCTGCACTACTCTTACTGCCAGACTATCCGCGTCTCTGGATTTCT
CCGCCTCTTGCCGCTGCCAATGGACTTATCAAGGCTTACAAAAGTTATTTACGGACCTAGC
GAGACCTGGTATGACGAGAAGACAAAAGACACCAAGATCACGGCGAGCAGCGAAACTATT
CTTCACGGACTTAAGAAATTCACCAACTACTCTATGGAAGTACTTGCTACGACTAACGGC
GGAGATGGCGTACGCTCTGCACCAATTCAGTCCAGACTGAACAAGATGTACCCGAAGCC
CCACGTGCCGTGAAAGCTCTCGTCATGGGACAGGACTCGATTTTAGTTTCTTGGAGGCC
CCAGCGCAGCCTAACGGTGTGTGTCACCCATTACAACGTTTATACCCAGGCTCAGAACTCG
GAACCTCATCCTAACAAGGTACCTGCATCTCAAACCAGCTATTCGCAACCGAACTTAAA
GCCGGCCGTTATGACTTCTGGGTACTGCATCCACAATCATCGGTGAAGGCCAACCTTCG
GCAACCGTTTCTGACGCCAAGCGACAAAGTTCTGCTAAAATTGCGTCTTTCGATGAA
TCGTTCACTGCGACCTACAAGGAAGATGTCAAACGCTGCTTGCCTTGCCGTCGGTGTTCCT
CCCCCTAATATTGCTGGAAGGTAAAAGGCCAGCCCCTGGAAGCTTCGGAACGCGTTTCGT
CAACTGCCTGAAGGATCGTTGCAGATTGCTGGAGTAGCACGCGAGGACGCCGGGAATAT
TCTTGCCACGTTGACAACCAATTCGGAACGACACAGTCACTCATAACGCTCTCGGTTCTT
GCTCCTCCCTTCCCCCTCAACTGACTATTGCTTTCGTCTTCTGTTTCTCCTCCCTGACTCTC
CGCTTGAAGCCATCCGTGCAAGTTGACCAATCGCCCGCCGCTGGTTACACTATCCACTAC
AAACAAGAATTCGGAGATTGGGAAACTGTTTCAGATTCCAAGCTCAACTGACACCTACACT
TTGGAAAACCTGTTCTGCGGCTCTAGATATCAGCTCTACGTTACGGCTTACAATGGAATC
GGCACTGGCGAAGCTTCAGACGTAGTGATCGCTCGCACCCGTTGGTTCCAAGCCTCCTGTA
CCTCGCGCCACTGATTTTCAATTGAAGTTGGATCTTCGTCCGTGACCCTCCATCTCAAACAA
TGGCTGGATGGCGGCTGCCCCATGAGCCACTTCGTTGTGCGAAAATAAGAAGAAGGGAGCT
GCTGAATGGAACAGATCTCAAACGCTGTGAAACCTGGCGGAAACTTCGTTGTTCTTGAT
CTCGAACCTGCGACTTGGTATGTCTTGAGGATCACTGCGCACAATAACGCTGGATTTAAC
GTAGCCGAATACGAATTTGCGACTCTTACTATGACTGGAGGTACGATCGCGCCCGCGCGC
GACGTCGGCGGCAACACCCTTACCACCGAACAAACGCTCAAGATAATCCTCACGCACCTC
AACCTTATCGTGCCTGTGCTCGCTCTATTCTCGTCAATTATTATCGCTATTGTGCTCGTG
TGCGTTGTACGAGGAGCAAGGGATCATCAAAAAGATGATGCGGTCTACAACGCGTCCCAG
GCTGCTCTGGGCGGCGGCGGCGGCACTCTCGACAAGCGCGGCGGACTCCGCGACGAACTC
GGCTACATCGCTCCCCCAACCGCAAACCTCCCCCTGTACCCGGCTCCAACCTACAACACT
TGCGACCGCGTCAAACGACAGGCTGTGATTATGGGGGCGCATTCGACGTGGGACCCCCGA
CGCCATCACTACGAGCGCGTGCAGACACCGCGCCTGCGCCGCACCGGCTCTGGTGACACC
ATATCTACAGGCATGGAAGACGAGATCTGCCCTATGCGACCTTCCACCTGCTCGGCTTC
CGCGAAGAGATGGACCCAGCAAGGCCTTGGCGTTCCCCCACCACCACCCAGCGCACGCC
GGCACCTGGCCCACCCTCATCCTCATACCCTGCTCACTCGCGCGCTGGATCTCAGAGC
ATGCCCGTGTAAACAGCCGCTACGCCCCGAAGAACTCCCAGGGAGGACAGAGCGCCATC

TATTCCACTGCCCCGAGTATGATGACCCCGCCACCTGCGCTGAAGAGGACCAATACCGC
GCCCCGCTACTCCCGGCCTATGTACGCTTGCGGCCCCGAGTACGACGAGCCCGCGTGCTGC
GCCCCGTGAGGACGACCAGTACACCGGCGCCTACGGCAGCCCTACTCCGACCCTACGGA
TCTCGCCCTAGCATTTGGAACCCGCAAATGCGGCGGATCCCCCGAGCCTCCCCACCCCCA
CCACGCAACGCGAACAACGACAACAACCTGTTCTTCCTCCTCAATGAGAGCAAGGACTCA
AACGAAATCTCCGAAGCCGAATGCGACCAGCCAGCAACTACCCTGTCAGGGCCCACT
GCCAAGGACGGTTTGCACAGCGAGGAAATGAGGAAACTCATTGACAGACCAGAAGCAAAC
ACCCCAATCCCCCAGCAAGCAGTCCACGGGCGGGGACTCACAGCCTACGATACTGTGGCA
GTGTAACCTGTAAATCGAAAAATGAAATTGCGCTGCGACACACACCTATTATTTGTTTA
TTTAGATGTTATGGTCCATCACCACCTTGCTGAAGTGTGCTCTTTAGCTTGAACGCTGC
TATTTATTTTTGCGCCTTTTATTTAAATTTTTAGCTCCCTCGTCCCAAAGAGCTACTCG
TCCAACAAGATGGTGATACCTGTGCCAAATAATTTTCATCTTGTCTGTGTGTCGCTTTAT
GTTGCTATTTATTTTATAATTACCCCAACTAAGTTGGCTAAATTTGGTCTTTCCTAGTTT
TAATTTCAAACATGCACAATAGTACCATTGTTTCGGTCAAATCTGTGGTAAACTTGACAAG
TTGGGTTATGTACAAATTAGCACTTACCTTCCCAATTTAGCATTATACAACACGTCCTG
AGTAGTGATACAATTACAGAAAATCATGGTTGTGGTAGTCATTCAAATATATATTCCCA
TTATGTGACGTGGAATGAAACCTATCTAATACATGCGTAGTAGGTACCCAACCTTAGCATT
TACTACAGAATTTGCTGTATGTGCAGTTTAAATATAGTTACTTTGTTTTGTCTTATTTGT
TTAGCTTAAATTTAAATATTTTAACTGCTGACGGTTTGGGGTGAATTTTACTCATTCAAT
AAATTAAGCTCAACACGTAGGTAATATGTATGTGATATTTTCTATTTTATCCCATTTTT
ACGTAATAACGTTATTGATACTTGCGTAGGCACACGTACGATAGTAATAACAACCTTT
GAGTTGTAATCATGCTTCCATTTTGATGTTATTAGTTTTTACAATGCTTTTTTACCATTTA
CGTTATTGCCAACTTGTGTCATTAATTTAAGGTTTTTAAATGTTTGATTTGCATTTAATCA
TATACTATTTAGAATAAGACTAGGTATACATTCTTCACTACTAGTAATTAATTTCTTTAAA
AGTGACTATATAATCGATAGTTATTAGTCAGTAATAATGTGTTACACAATATAATAATTA
TTATGAGATTTTAAATCTAATCAATTTTAGCTATAATCTATCTATCTATGGACGCATCGCA
TACAATATACAAAACAAAATAATACTATGATAGTTACCTTCAAACAATATACGTACTTGA
CGTTTGTACCCGTCGCAAAATGAAATAAGTACTATTGACACGGAATTCGAAGTTTTAACA
TTACCTACCTACTATAGGAATTAAGATGCATTTTTAATAATCATTATCGTAACTATATGC
TCCTATATTACACAAATACTAGATTTAAGACACGTGCGTGTCACTTTCTAGATGTTTCCC
TTTATGTGTTGTGATTTGTGGTGAAGCTTGGCAAATTTAGGCTTGTAGCTAGGTTTTCG
CAACTTCCTACCAACCGATATCTTCTCTCAACCTTCCAATTAGGAAATTCGGATTATTAA
GACTTGTTAAAATTAATATGAACAAATATAAACTTTTATTGAAATTATAAAATTTAAAA
TTAATTCAAAAGATTAGATTAATACAGTTTTTATTAGGTAATTATTATTTTTTCGGTTGT
CTGCTTATGTGCATTAGGTTTGCCTAGTTGGAACCTAAGTTTTGTATTACGCTAAGCAAC
ATGTCTACCAACATATTATTAATGTACCAAAGTGTGTTGATTTGTGTTAAATAAACTACT
CCAACATTAAGTGCACATTGCTGTTTCAATGGAACCCCTTATTCCAAACCCAAAAATAAT
TGTTATGAATGATTAATAAAGGATATTTCTATCAGCATGGACCTAAGTTCTTCAGGTCTGC
TTGATATCTTAGAATGTTGTTAATAGATTCTCAGGATATTTTAAAGACATGAAGTGCCTCA
TAAATTTTATTAGAAAAGCATTAAACAGATGCATAATAGTATAGATTTCAAATACGGAATC
TATTTGCATTTAACTTTGCCAGGGTCAATTCAAAGTCAACGCCACCTTGCTTTTTCTTAA
AGCCATGTTGATCAG

9.1.1.2 Aminosäuresequenz (Protein)

Host: i5k Workspace (i5K Consortium 2013)
Organismus: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)
Datenbank: Proteom (*Manduca sexta*_OGS_v2.0_peptide,
 Kanost et al. 2016)
Sequenz-ID: Msex2.09537-RA
Anzahl der Aminosäuren: 1.970

>gnl|Manduca sexta_protein_OGS_v2.0|Msex2.09537-RA JH668578.1:92198-155888 (-)

MAYKGFALVALAIIIGSALCEDETI GPIIFMKEPPNRVDFSN TTGATVECAARGSPAPDII
 WVRADGTAVGDV PGLRQVQANGNLLFPPFRAEDYRQEVHAQVYACLARNSVGTIHSKDVN
 VRAVVAQQYD TDVNKEYVIMGNSIILKQCVP SFVADFIEVLSWHTDEKEDFFPGNNYDGK
 YLVLPSELHIRDVGPEDGYKSYQCRTKHRLTGETRLSATKGR LVITEPVGHVPPKVP
 QTTIGFQFSEHTSLAVLCPAQAFPAPLYRWYKFIDGTTTRKQPVTLDDR VQVSGTLIIKE
 AKVEDSGKYL CVVNSVGGESVETVLTVTAPLKATVEPATQTVDFGRPAVFTCRYEGNPV
 KTITWLKDGKDIKHHDTILRIESVKKEDKGM YQC FIRNDQESAGASAE LKLGGRFEPPI
 RHSFGEQTFRSGPSLR LKCVASGNPTPDITWLLDGEKLN S GDR LQIGQFVTADGNVESH
 NISSVHTNDGGLYTC SASSKVG SASHSSRVNVYGLPYVRPMKKRPV VAGDTLIVHCPVAG
 YPIESIVWERDGRVLPINRKQKVF P NGTLVIENVERMSDEATYTCVAKNSQAFTSKGTLE
 LQVMVPPQITPFEFGEEILNEGETASVQC VVSKGDLPI TYKWL FN GEEIKTQNTLGILIT
 KISKKTSILNIEAVSAIHRGSYTC EIKNAAGMTNHTTVLSVNV PPRWILEPTDKAFAQGS
 DAKVECKADGF PKPQV TWKRAEGDTPGDYKDLK PNNPNVKVEDGTLAITNIQKTNEGYL
 CEAVNGIGSGLSAVILISVQAPPQFEIKMRNQ TARRSEPAVLQCQAKGEKPIGI IWNMNN
 KRLEPKSDPRYTIREEILPGGVVSDLSIRRTERSDSALFTCVATNAFGSDDTSINMI IQE
 VPEAPYGLKVL DKSGR TVQLSWAAPYDGN SPIKKFLIEYKRAKGNWEKDIDRVLVPGDAT
 EAGVFGLRPATAYHIRIVAENELGTSEPSETVTIITAE EAPT GPPQDVKIDAIDKHTLRV
 TWKPPPPQDWN GELQGYVGYKLASSNKS FVFETVDISKESGKEHHL DILNLKTYTQYAV
 VVQAFNKMGS GPVSGEV RAYTAEGAPSAPPQDVLCTTLTAQTIRVSWISPLAAANGLIK
 AYKVIYGPSETWYDEKTKDKITASSETILHGLKFTNYSMEVLATTNGGDGVRSAPIHC
 QTEQDVPEAPRAVKALVMGQDSILVSWRPPAQPNGVVTHY NVYTQAQNSEPHNKPASQ
 TSYSA TELKAGRYDFWVTASTIIGEGQPSATASCSPSDKVPAKIASFDESFTATYKEDVK
 LPCLAVGVPPPNI VWKVKQPLEASERVRQLPEGSLQIAGVARE DAGEYSCHVDNQFGTD
 TVTHTLSVLAPPFP PQLTIASSSVSSLTLRLKPSVEVDQSPAAGYTIHYKQEFGDWETVQ
 IPSSTDYTYTLENLFCGSRYQLYVTAYNGIGTGEASDVVIARTRGSKPPVPRATDFIEVGS
 SSVTLHLKQWLDGGCPMSHFVVENKKKGAAEWNQISNAVKPGGNFVVL DLEPATWYVLR I
 TAHNNAGFNVAEYEFATLTMTGGTIAPARDVGGNTLTTEQTLKIILTHLNLI VPVVASIL
 VIIIAIVVVCVVRGARDHKKDDAVYNASQAALGGGGTLDKRGGLRDELGYIAPPNRKLP
 PVPGSNYNTCDRVKRQAVIMGAHSTWDPRRHHERVRRRPLRRTGSGDTISTGMEDEICP
 YATFHL LGFREEMDPSKALAFPHHPAHAGTLAHPHPHPAHSRAGSQSM PRANSRYARK
 NSQGGQSAIYSTAPEYDDPATCAEEDQYRARYSRPMYACGPEYDEPACCAPEDDQYTGAY
 GTPYSDHYGSRPSIGTRKCGGSPEPPPPPPRANNDNNCSSSFNESKDSNEISEAECQPF
 RNYPVRAHTAKDGLHSEEMRKLIDRPEANTPIPQQAVHGRGLTAYDTVAV*

9.1.1.3 Exonstruktur und konservierte Proteindomänen der alignierten Nukleotid- (cDNA) und Aminosäuresequenz (Protein)

Host: i5k Workspace (i5K Consortium 2013)
Organismus: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)
Datenbank: Transkriptom (Manduca_sexta_OGS_v2.0_transcript, Kanost et al. 2016)
 Proteom (Manduca_sexta_OGS_v2.0_peptide, Kanost et al. 2016)
Sequenz-ID: Msex2.09537-RA
Anzahl der Basen: 8.115
Anzahl der Aminosäuren: 1.970

```

Tttctcggacggggtcgggtcggtcgccgctcgtcctctcgtgtgtgttgtggttctagtgtt      60
  F L G R V G R R R S S S R V C C G S S V      20
Gtgggtcagcggccataccacctcttcatctccgcagattccgtctaatactcggccgcattc      120
  V V Q R H T T S S S P Q I P S N L G R I      40
Gcggccatctgagtttattttttttgttcagtggaattttgttttgtgttgcagtgac      180
  A A I - V Y F F C S V E F C F V L S S D      60
Tctagtgatcagtggaagtgtcgtgactgtgaatatggcttataaaggattcctcgcctc      240
  S S D Q - S V V T V N M A Y K G F L A L      80
Gtggcgtggccattatagggtcagcgtatgcgaggacgaaactatcggcccgattttc      300
V A L A I I G S A L C E D E T I G P I F      100
Atgaaggaacccccaaaccgagttgacttagcaacacgaccggcgcgactgtagaatgt      360
  M K E P P N R V D F S N T T G A T V E C      120
Gctgcacgtggatcccctgctcctgacatcatttgggtacgcgctgatggaactgccgtt      420
  A A R G S P A P D I I W V R A D G T A V      140
Ggagatgtccctggactgcgtcaagtacaagcgaatggaatctgttgttccggcccttc      480
  G D V P G L R Q V Q A N G N L L P P P P      160
Cgtgcgcgaggattatcgtcaagaggtccacgctcaggtgtaacgcttgccttgcocgtaac      540
  R A E D Y R Q E V H A Q V Y A C L A R N      180
Tctgtgggtaccattcactccaaggacgttaatgtacgcgccgttggtggcacagcaatac      600
  S V G T I H S K D V N V R A V V A Q Q Y      200
Gataccgacgtgaacaaggaatatgttatcatgggaacagcatcatattaaaatgtcag      660
  D T D V N K E Y V I M G N S I I L K C Q      220
Gtccatctttcgtcgtgattttatagaagtactctcatggcacaccgacgaaaagaa      720
  V P S F V A D F I E V L S W H T D E K E      240
Gacttcttccctggcaataactatgacggcaaatatttagtcttaccatcgggagaattg      780
  D F F P G N N Y D G K Y L V L P S G E L      260
Catatcctgatgtcggaccgaggacggttacaatcataccaatgtcgtactaagcac      840
  H I R D V G P E D G Y K S Y Q C R T K H      280
Agactcactggtgaaactcgattatccgctactaaaggaaggctggtcattacggagccg      900
  R L T G E T R L S A T K G R L V I T E P      300
Gtgggtcatgttcctccgaagggtccagtgccgcagacaaccattggcttccagtttagc      960
  V G H V P P K V P S A Q T T I G F Q F S      320
Gaacatacaagtcctcgcagttttgtgccagcagcaggttttctcgcacctctttaccga      1020
  E H T S L A V L C P A Q A F P A P L Y R      340
Tggtataaattcattgatggcaccactcgaaaacaaccagtcacccttgacgacagagtg      1080
  W Y K F I D G T T R K Q P V T L D D R V      360
Aaacaagtatctggaaccctgatcattaaggaagctaaagttgaagattctggaagtac      1140
  K Q V S G T L I I K E A K V E D S G K Y      380
Ttatgcgttggttaacaattccggttggaggtgaatccgtggaaccgtactgaccgtaaca      1200
  L C V V N N S V G G E S V E T V L T V T      400
Gctcctctgaaagctactgttgaaccagccacgcaaactgtagactttggacgccagca      1260

```

A P L K A T V E P A T Q T V D F G R P A 420
 Gtcttcacttgcagatacgaaggcaatcccgttaagactattacctggcttaaagacgga 1320
 V F T C R Y E G N P V K T I T W L K D G 440
 Aaggatatcaagcaccacgacaccatttttaaggattgaatcggtaaagaaggaagacaag 1380
 K D I K H H D T I L R I E S V K K E D K 460
 Ggaatgtaccaatgctttattagaaacgatcaagagagcgcaggtgctagtgtgctgaactg 1440
 G M Y Q C F I R N D Q E S A G A S A E L 480
 Aaactcggaggacgattcgaaccaccccagattagacacagccttggcgaacagaccttc 1500
 K L G G R F E P P Q I R H S F G E Q T F 500
 Cgctccggcccgtccctgcgcttaaagtgcggtgcatctggaaacccactcctgacatc 1560
 R S G P S L R L K C V A S G N P T P D I 520
 Acatggctcttggacggtgagaagctgaacacgcggagatcgctgcaaattggacaattc 1620
 T W L L D G E K L N S G D R L Q I G Q F 540
 Gttactgctgacggcaacgtggaatcccatcttaacatctcctctgtacacaccaacgac 1680
 V T A D G N V E S H L N I S S V H T N D 560
 Ggcggtctttacacttgctctgcttctagcaaggctcggaagtgcacccactcatctcgc 1740
 G G L Y T C S A S S K V G S A S H S S R 580
 Gtcaacgtttatggcctgcctacgtccgacccatgaagaaacgccccgtggtcgcctgga 1800
 V N V Y G L P Y V R P M K K R P V V A G 600
 Gacaccctcatcgtgcactgccagttgccggctaccggattgaatctattgtttgggaa 1860
 D T L I V H C P V A G Y P I E S I V W E 620
 Cgtgatggacgtgtgctgccaatcaaccgcaaacagaaggattccccaacggcacactg 1920
 R D G R V L P I N R K Q K V F P N G T L 640
 Gtaatcgagaacggtgaacgcatgagcgcgaagctacctacacgtgtgttgccaagaac 1980
 V I E N V E R M S D E A T Y T C V A K N 660
 Tcccaggccttcacctccaagggcacacttgaactgcaagtcattggtgccaccacaaatc 2040
 S Q A F T S K G T L E L Q V M V P P Q I 680
 Acgccttttgaatttggagaagaaatactggaatgaaggagaaactgcacagtgcaatgc 2100
 T P F E F G E E I L N E G E T A S V Q C 700
 Gtagtaagcaaggggatcttccaattacatacaaattggttatttaatggcgaagaatc 2160
 V V S K G D L P I T Y K W L F N G E E I 720
 Aagacacaaaatacactcgggaattctcatcacaataattagcaaaaaaacatccatatta 2220
 K T Q N T L G I L I T K I S K K T S I L 740
 Aacattgaagccgtgagtgcaattcatcgaggttccctacacgtgtgagatcaaaaatgca 2280
 N I E A V S A I H R G S Y T C E I K N A 760
 Gccggaatgaccaatcacaccacggttctaagtgttaacgtacctcctcgtctggatctta 2340
 A G M T N H T T V L S V N V P P R W I L 780
 Gaacctactgataaggcttttgcctcaagggtccgatgctaaagttgaatgtaaagccgat 2400
 E P T D K A F A Q G S D A K V E C K A D 800
 Ggcttccccaagcccaagtcacatggaagagagctgaaggggatagcctggcgattac 2460
 G F P K P Q V T W K R A E G D T P G D Y 820
 Aaagacttgaaaccaacaaccctaagttaaaggttgaggacggtacattggctattact 2520
 K D L K P N N P N V K V E D G T L A I T 840
 Aacatccagaaaacaaatgaaggctattatctttgcaagctgtaaaccggaattggaatca 2580
 N I Q K T N E G Y Y L C E A V N G I G S 860
 Ggattatccgctgtcattcttattagtgtacaagctccccctcaattcgaatataaaatg 2640
 G L S A V I L I S V Q A P P Q F E I K M 880
 Aggaatcaaactgctcgccgaagtgaacccgctgtgctgcaatgtcaagctaaaggagaa 2700
 R N Q T A R R S E P A V L Q C Q A K G E 900
 Aagcctattggaattatctggaacatgaacaacaacgcctcgaacctaataccgacct 2760
 K P I G I I W N M N N K R L E P K S D P 920
 Cgttacacgatccgcaagaaattctgcccgggtggagttgtctctgatctcagcattaga 2820
 R Y T I R E E I L P G G V V S D L S I R 940
 Aggactgaacgttccgacagcgccttttcacctgtgttgcgactaacgcctttggaatcc 2880
 R T E R S D S A L F T C V A T N A F G S 960
 Gatgatactagcattaacatgattatccaagaggtaccogaagcaccctatggcttaaaa 2940
 D D T S I N M I I Q E V P E A P Y G L K 980

Gtattggacaaatctggaaggaccggttcagttgtcgtgggctgcaccatacgacggaac	3000
V L D K S G R T V Q L S W A A P Y D G N	1000
Tgcctatcaagaagttcctcattgaatacaaacgcgctaaaggcaactgggaaaagat	3060
S P I K K F L I E Y K R A K G N W E K D	1020
Attgacagagttctcgtaccaggagatgctactgaagcoggtgtatttggacttagacct	3120
I D R V L V P G D A T E A G V F G L R P	1040
Gctactgcttaccacatcaggattgttgctgaaaatgaactcgggaacttctgaaccctct	3180
A T A Y H I R I V A E N E L G T S E P S	1060
Gagactgttacaattatcactgcccgaagaagctcctactggccctccccagcgtgaaa	3240
E T V T I I T A E E A P T G P P Q D V K	1080
Atogatgctattgacaacacactctgcgagttacctggaaacccctccgcccaggac	3300
I D A I D K H T L R V T W K P P P P Q D	1100
Tggaacggcgaactgcaaggatactacgttgggtacaagctggcctcaagcaacaagtct	3360
W N G E L Q G Y Y V G Y K L A S S N K S	1120
Tttgtctttgaaaccggttgatatttccaaggaatccggcaaggaacatcatcttgacatt	3420
F V F E T V D I S K E S G K E H H L D I	1140
Ttgaatctgaagacatacoccaatcagctgtagttgtacaagccttcaacaaaatgggt	3480
L N L K T Y T Q Y A V V V Q A F N K M G	1160
Tccggaacagtcctctgggtgaagtgcgcgcgtacactgctgaaggtgccccctctgccccg	3540
S G P V S G E V R A Y T A E G A P S A P	1180
Cctcaagatgtcctctgcactactcttactgccagactatccgcgtctcctggatttct	3600
P Q D V L C T T L T A Q T I R V S W I S	1200
Cgcctcttgccgctgccaatggacttatcaaggcttacaagttatttacggaccttagc	3660
P P L A A A N G L I K A Y K V I Y G P S	1220
Gagacctggatgacgagaagacaaaagacaccaagatcacggcgagcagcgaactatt	3720
E T W Y D E K T K D T K I T A S S E T I	1240
Cttcacggacttaagaaattcaccaactactctatggaagttacttgctacgactaacggc	3780
L H G L K K F T N Y S M E V L A T T N G	1260
Ggagatggcgtacgctctgcaccaattcactgccagactgaacaagatgtacccgaagcc	3840
G D G V R S A P I H C Q T E Q D V P E A	1280
Ccaogtgcogtgaaagctctogtcatgggacaggactcgatttttagttttcttgaggccc	3900
P R A V K A L V M G Q D S I L V S W R P	1300
Ccagcgcagcctaacgggtgttgaccaccattacaacgtttataccaggctcagaactcg	3960
P A Q P N G V V T H Y N V Y T Q A Q N S	1320
Gaacctcatcctaacaaggtacctgcattctcaaaccagctattccgcaaccgaacttaa	4020
E P H P N K V P A S Q T S Y S A T E L K	1340
Gccggccggttatgacttctgggttactgcattccacaatcatcgggtgaaggccaaccttcg	4080
A G R Y D F W V T A S T I I G E G Q P S	1360
Gcaaccgcttcctgcagcccaagcgcacaaagttcctgctaaaattgcgtccttcgatgaa	4140
A T A S C S P S D K V P A K I A S F D E	1380
Tcgttcactgcgacactacaaggaagatgtcaaaactgcctgacctgcccgtcgggttct	4200
S F T A T Y K E D V K L P C L A V G V P	1400
Cccctaataattgtctggaaggtaaaaggccagccctggaagcttcggaacgcggttct	4260
P P N I V W K V K G Q P L E A S E R V R	1420
Caactgctgaaggatcggtgcagattgctggagtagcacgcgaggacgcccggggaatat	4320
Q L P E G S L Q I A G V A R E D A G E Y	1440
Tcttgccacggttgacaaccaattcggaactgacacagtcactcatacgtctcggttctt	4380
S C H V D N Q F G T D T V T H T L S V L	1460
Gctcctcccttccccctcaactgactattgcttcgtcttctgtttcctccctgactctc	4440
A P P F P P Q L T I A S S S V S S L T L	1480
Cgcttgaagccatccgtcgaagttgaccaatcgcccgcogctggttacactatccactac	4500
R L K P S V E V D Q S P A A G Y T I H Y	1500
Aaacaagaattcggagattgggaaactgttcagattccaagctcaactgacacctact	4560
K Q E F G D W E T V Q I P S S T D T Y T	1520
Ttgaaaacttgttctgcccgtctagatatcagctctacggttacgggttacaatggaatc	4620
L E N L F C G S R Y Q L Y V T A Y N G I	1540
Ggcactggcgaagcttcagacgtagtgatcgctcgaccctgggttccaagcctcctgta	4680

G T G E A S D V V I A R T R G S K **P P V** 1560
Cctgcgccactgatttcattgaagttggatcttcgtcogtgaccctccatctcaaaaca 4740
P R A T D F I E V G S S S V T L H L K Q 1580
Tggctggatggcggctgccccatgagccacttcgttgtogaaaataagaagaaggagct 4800
W L D G G C P M S H F V V E N K K K G A 1600
Gctgaatggaaccagatctcaaacgctgtgaaacctggcggaaacttcgttgttcttgat 4860
A E W N Q I S N A V K P G G N F V V L D 1620
Ctcgaacctgagacttggatgtcttgaggatcactgcgcaataacgctggatttaac 4920
L E P A T W Y V L R I T A H N N A G F N 1640
Gtagccgaatacgaatttgcgactcttactatgactggaggtacgatcgcgcccgcgcgc 4980
V A E Y E F A T L T M T G G T I A P A R 1660
Gacgtcggcggcaacacccttaccaccgaacaaacgctcaagataatcctcacgcacctc 5040
D V G G N T L T T E Q T L K I I L T H L 1680
Aacctatcgtgcctgtcgtgcctctattctcgtcattattatcgtattgtcgtcgtg 5100
N L I V P V V A S I L V I I I A I V V V 1700
Tgcgttgtacgaggagcaagggatcacaagaatgatgcggtctacaacgcgtcccag 5160
C V V R G A R D H H K D D A V Y N A S Q 1720
Gctgctctggcggcggcggcggcactctcgacaagcggcggcactccgcgacgaactc 5220
A A L G G G G G T L D K R G G L R D E L 1740
Ggctacatcgetcccccaaccgcaaactccccctgtaccggctccaactacaacact 5280
G Y I A P P N R K L P P V P G S N Y N T 1760
Tgcgaccgcgtcaaacgacaggctgtgattatgggggcgcatcgcagctgggacccccga 5340
C D R V K R Q A V I M G A H S T W D P R 1780
Cgccatcactacgagcgcgtgcgacgaccgcgctgcgcgcaccggctctggtgacacc 5400
R H H Y E R V R R P R L R R T G S G D T 1800
Atatctacaggcatggaagacgagatctgccctatgcgaccttcacctgctcggcttc 5460
I S T G M E D E I C P Y A T F H L L G F 1820
Cgcgaagagatggaccccagcaaggccttggcgttccccaccaccaccagcgcacgcc 5520
R E E M D P S K A L A F P H H H P A H A 1840
Ggcaccctggcccaccctcatcctcatcaccctgctcactcgcgcgctggatctcagagc 5580
G T L A H P H P H H P A H S R A G S Q S 1860
Atgccccgtgctaacagccgctacgcccgaagaactcccagggaggacagagcgcctatc 5640
M P R A N S R Y A R K N S Q G G Q S A I 1880
Tattccactgccccgagatgatgaccccgccacctgcgctgaagaggaccaataaccgc 5700
Y S T A P E Y D D P A T C A E E D Q Y R 1900
Gcccgctactcccggcctatgtacgcttgcggccccgagtagcagcagcccgcgtgctgc 5760
A R Y S R P M Y A C G P E Y D E P A C C 1920
Gcccctgaggacgaccagtagaccggcgcctacggcagcgcctactccgaccactacgga 5820
A P E D D Q Y T G A Y G T P Y S D H Y G 1940
Tctcgccttagcattggaaccgcgcaaatgcggcggatcccccgagcctccccacccccca 5880
S R P S I G T R K C G G S P E P P P P P 1960
Ccagcgaacgcgaacaacgacaacaactgttcttctccttcaatgagagcaaggactca 5940
P R N A N N D N N C S S S F N E S K D S 1980
Aacgaaatctccgaagccgaatgcgaccagccacgcaactaccctgtcagggcccacact 6000
N E I S E A E C D Q P R N Y P V R A H T 2000
Gccaaggacggtttgcacagcggaggaatgaggaaactcattgacagaccagaagcaaac 6060
A K D G L H S E E M R K L I D R P E A N 2020
Accccaatccccagcaagcagtcacggcgggggactcacagcctacgatactgtggca 6120
T P I P Q Q A V H G R G L T A Y D T V A 2040
Gtg**taa**cctgtaaattgaaaaattgaaattgcgctgcgacacacactattattttgttta 6180
V**-** P V N R K I E I A L R H T P I I C L 2060
Tttagatgttatgggtccatcaccaccttgetgaagtgtcgtcttttagcttgaacgctgc 6240
F R C Y G P S P P C - S V A L - L E R C 2080
Tatttatttttgcgccttttatttaaatttttagctccctcgtcccaaagagctactcg 6300
Y L F L P P F I - I F S S L V P K S Y S 2100
Tccaacaagatggtgatacctgtgccaataatttcatcttgtctgtgtgtcgcgtttat 6360
S N K M V I P V P N N F I L S V C R V Y 2120

Gttgctatthttttataattaccccaactaagttggctaaatttgggtctttcctagttt 6420
 V A I Y F I I T P T K L A K F G L S - F 2140
 Taatttcaaacatgcacaatagtagtaccattggttcgggtcaaactctgtggtaaacttgacaag 6480
 - F Q T C T I V P L F G Q I C G K L D K 2160
 ttgggttatgtacaaattagcacttaccttcccaatttagcattatacaaacacgtcactg 6540
 L G Y V Q I S T Y L P N L A L Y N T S L 2180
 Agtagtgatacaattacagaaaatcatgggttggttagtcattcaaaatataatccca 6600
 S S D T I T E N H G C G S H S K Y I F P 2200
 Ttatgtgacgtggaatgaaacctatctaatacatgcgtagtaggtacccaacttagcatt 6660
 L C D V E - N L S N T C V V G T Q L S I 2220
 Tactacagaatthtctgtatgtgcagtttaattatagttactttgttttgcttattttgt 6720
 Y Y R I C C M C S L I I V T L F C L I C 2240
 Ttagcttaatthtaaatthtaactgctgacggtttgggggaattttactcattcattt 6780
 L A - F K Y F N C - R F G V N F T H S F 2260
 Aaattaagctcaacacgtaggtaatatgtatgtgatthttctatthttatccattthtt 6840
 K L S S T R R - Y V C D I F Y F I P F F 2280
 Acgtaaaataacgthatttgatacttgcgtaggcacacgtacgatagtaataacaaccttt 6900
 T - N N V I D T C V G T R T I V I T T F 2300
 Gagttgtaatcatgcttccattthtgatgthattagthtttcacaatgctthttaccattta 6960
 E L - S C F H F D V I S F H N A F Y H L 2320
 Cgthattgccaacttggtgcattaatthtaaggtthtttaagthttgatttgcatthtaataca 7020
 R Y C Q L V S L I - G F - C L I C I - S 2340
 Tatactatthtagaataagacttaggtatacattcttcattactagtaatthtaattctthaaa 7080
 Y T I - N K T R Y T F F I T S N - F F K 2360
 Agtgactatataatcgatagthatttagtcagtaataatgtggttacacaatataataatta 7140
 S D Y I I D S Y - S V I M C Y T I - - L 2380
 Ttatgagatthtaaatctaatcaatthtagctataatctatctatctatggacgcatcgca 7200
 L - D F N L I N F S Y N L S I Y G R I A 2400
 Tacaatatacaaaaataataactatgatagthttaccttcaaaaacaatatacgtacttga 7260
 Y N I Q T K - Y Y D S Y L Q N N I R T - 2420
 Cgthttgtaccgctcgcaaaatgaaataagthactattgacacggaattcgaagthtttaaca 7320
 R L Y P S Q N E I S T I D T E F E V L T 2440
 Ttacctacctactataggaatthaaatgacattthtaataatcattatcgtaactatagc 7380
 L P T Y Y R N - D A F L I I I I V T I C 2460
 Tcctatattacacaaataactagatthtaagacacgtgctgctcactthttctagatgthttccc 7440
 S Y I T Q I L D L R H V R V T F - M F P 2480
 Tthattgtgthttgtattgtggtgtaagctthggcaatthtaggctthtagctaggtthttcg 7500
 F M C C V L W C K L G K F R L V A R F S 2500
 Caaacttctaccaaccgatatctthtctcaaccttccaattaggaatthcggattatthaa 7560
 Q L P T N R Y L L S T F Q L G N S D Y - 2520
 Gacttgthaaaatthaaatgaaacaaatataaactthttatthcgaattataaaaatthaaaa 7620
 D L L K L N M N K Y K L Y S K L - N L K 2540
 Tthattccaaaagattagatthaaacagthtttattaggttaattattthttttcggthttgt 7680
 L I P K D - I N T V L L G N Y Y F F G C 2560
 Ctgcttatgtgcattaggtthtgctagthttggaactaagthtttgattacgctaagcaac 7740
 L L M C I R F A L V G T K F C I T L S N 2580
 Atgtctaccaacatattatthaaatgtaccaaaagthtttgattthgtgthaaataaactact 7800
 M S T N I L L N V P K C L I C V K - T T 2600
 Ccaacatthactgcacattgctgthttcattggaaaccttattccaaacccaaaaataat 7860
 P T L T A H C C F I G N P Y S K P K N N 2620
 Tgthtatgaaatgattaaaaaggatattthctatcagcatggacctaaagthttcttcaggthttgc 7920
 C Y E - L K R I F L S A W T - V L Q V C 2640
 Ttgatattcttagaatgthttgthaaatagattctcaggatattthtaagacatgaagthcctca 7980
 L I S - N V V N R F S G Y F K T - S A S 2660
 Taaatthttattagaaaagcattaacagatgcataatagthattcaaatcggaaatc 8040
 - I L L E K H - Q M H N S I D F K Y G I 2680
 tthttgcatthtaactthtgccaggggtcaattcaagthcaacgccacctthgctthttctthaa 8100

Y L H L T L P G V N S K S T P P C F S - 2700
Agccatggtgatcag 8115
S H V D Q 2705

Legende

- **Start-/Stopp-Kodon**
- **Exonstruktur**
 - Exonkassetten-flankierende Exons (konstitutiv)
 - Exonkassetten 5, 7, 14 & 33 (mit alternativen Exons)
 - Optionales Exon 35
- **Proteindomänen**
 - **Signalpeptid**
 - **Immunoglobulin-ähnlich**
 - **Immunoglobulin**
 - **Immunoglobulin c2-Typ**
 - **Fibronektin Typ-3**
 - **Transmembranhelix**

9.1.1.4 Aminosäuresequenz alternativer Exone der Exonkassetten

Quelle: Prof. Dr. Haobo Jiang
Organismus: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)
Datenbank: Proteom (*Manduca sexta*_OGS_v2.0_peptide,
 Kanost et al. 2016)
Sequenz-ID: Msex2.09537-RA

9.1.1.4.1 Exonkassette 5: 15 alternative Exone

VVAQQYD TDVNKEYVIMGNSIILKCVPSFVAD FIEVLSWHTDEKEDFFPGNNY
 VVQQQY ESEVNNEYVIRGNSAIVKCSIPSFVAD FVNVISWLDESNN SYTSEESKEGD
 VVTQYYEAEV VSEYVIRGNTAVLKCNI PSFVGDFIKVEAWVDSEGG EYLLTDDI
 VVNQFYEA EILTEYVIRGNAA I LKCSIPSFVAD FVKVEEWIDE EETIISYSNEI
 VVSQQYVTEAENEYVIRGNAAIVHCKIPSFVSD FVYVEAWLMDDGEILTINNTNTIK
 VVSQPF EA EADNEYVIRGNAAIMKCEVPSFVSD FVYVEMWMDSEGGTYYPGNGE
 AVLQAYEARVNDEFVLRGNTAILKCI VPSFVAD FVHVVAWIVDNDTVSTEDRVNLD
 VIHQS YEPRVIDEDVLRGNSAIVKCTIPSFVAD YVQVTDWVANGDSL SLSLFSYNSSEIDY
 AVNQFY ESQVYDIYVIRGNAAVFKCHIP SFVSDHVQV VSWHDTDGGEYILNSNY
 VVSQAYTVNLVEENVLRGNAAIFKCLIP SFVTEYVSVASWII SEGDIDEVEIKISDITDNY
 VVSQAYTVNILEESVLRGNAVVLKCHI STFVTEYVSVSSWII SEGETDELEIKADSIDF
 VVRQAYTVNLMEENVLRGNSAVVKCHI PSFVSEYV FVSSWII SEGELDDIEIPLNESSSL
 VVSQSYTVHLWEESVLRGNAAVLKCHI STFVTEYVSVSSWII SEGDKDELEIQADSND S
 VVSQSYTVQFWEESVLRGNAAVLKCL I STFVTEYVSVSSWII SEGDTDELEIKANTNDS
 VVTQLYTVYLWEEMVLRGNSVVLKCHI PSFVTEYVTVTSWII SEGDQDEMEIHLNTSSTL

9.1.1.4.2 Exonkassette 7: 27 alternative Exone

EPVGHVPPKVP SAQTTIGFQFSEHTSLAVLCPAQAF P APPLYR
 EPVGRVPPKFASILTGT MFEVKKGDSYALQCPAQAFPTPLFR
 EPVGRVPPKFASVVMGTMIGIKKDQSLALQCPAQAF PVPIFR
 EPMGKVS PKFPSLEKSRLFNF DANQSFSL LCPAQAF P APMPFR
 EPMGKVS PKFPTGDISRTFI ASSKDSVLLCPAQGF P APAPFR
 EPMGKVS PKFPSMETGRSFTYSSQSCVTMLCPAQAF P SPVFR
 EPVGRVPPKFP SMDSSRSFSAVLNENLTILCPAQAF PVPLFR
 EPVGQVRPKFTTGDKSRAFDTMGGDNVTILCPAQGY P APAPFR
 EPMGSAAPKVATKVIDITEILTNN TVSLLCPAQAF P VPMFR
 EPVGRVSPKFPTMDNVRGFNTFLNTSVTLLCPAQAF PVPLFR
 EPINNAPPKVPSKIEFLEV KMNSSVTLLCLAQAFPI P MPFR
 EPVGLKAPT FSTDFKLAWYVKDVKQGFALLCPAQGY P APPLFR
 EPIGFKSPSFS SSKLAWFEITSRQNFALICPAQAF P VPVFR
 EPIDSKSPTLSTDDKLAWCMRKIGENISLICPAQGHPI P IFR
 EPIGSKSPT FSTDNKFSWYVRNVGQSLNILCPAQGF P VPVFR
 EPVGFKSPTFSNDVQFSGITRKTGQDFALLCQAQAF P VPLFR
 EPIGFKAPSFSMEFKSTTLTKVLDQAI VLLCQAQAHPPPIFK
 EPVTAKAPAFATSASAYNYEIERNSSGSM LCPAQGY P KPMFR
 EPVGAKAPSFSTDSKGSIFIREVGQSFALLCQAQASPI P IFR
 EPVSSKPT FSTDFTL SAVTRYKGHSFTMLCQAQAFPTPIFR
 EPVGSKAPSFSTESALSS LKRHEGQSFALLCQAQAF P VPIFR
 EPVGAKSPTFSSESMGSI FRKRLGQGFALLCQAQSY P APIFR
 EPVGSKAPT FSTDARSITFVRNVGQSFSL LCEA QAS P VPIFR

EPIASAAPSITATPKPTVLSPLQLSPLTLLCPAQGYVPVISR
 EPTNKIAPRKDTSKIFEGWEVFI VPRGDIAYLTCQVAAYPA
 EPSGRTGPKVTGDGLNRQIGRASESLALLCEVQANPAPLTR
 EPTNSLPPKLSSGRLQESQLGFGGETGTMLCLGQGYPVPSFR

9.1.1.4.3 Exonkassette 14: 17 alternative Exone

VPPQITPFEEFGEIILNEGETASVQCVCVSKGDLPIYKWLFNNGEIKTQNTLGLITKISKKTSILNIEAVSAIHRGSYTC EIKNAAGMTNHTTVLSVN
 VPPQISPFEEFGEDEPANAGD TVSVQCVMNKGDL PANFWSLNGKKISQGN TVGIAIGSMSRKMSILNIDS VNGTHR GVYTC HVENFAGQVNHSSTLEVN
 VLPQIHPFTFGEDPANAGD TVGIQCMVTKGDVPVNL TWHLNGKPVNQIQGITVTKIGHKASSLSIDSVASIH TGAYTCSARNQAGHANYSSDLAVN
 VVPQVTPFD FGEIILNQGD TVSLTCTVKGDLPLKIH WQLNGQLLNSGNGV LINRNGKRI SMLSIENVQHEHVGNYTCIAENEAGRSSHSAVLNVN
 VAPQILPFD FGEPLNDQEMAVVIC TASKGDLPLNITWYFNGKPVKSENGI ILSNTRKTSQLTIESVTHHNQGN YFCIVKNQAGMANHTAELYVN
 VAPIIAPFD FDESIFYGEGVQVTCYVPKGDKPLNFKWNFSEEDV SLLAGVNI MNVGDRGSALI IPMVTAKHSGNY SCTASNIVASASHHAMLNVK
 VAPIISPFEEFDDAVFYGESIQVMCHIPKGDMP LTLTWSFRGHILQKSGDIIITKVGHRS SILAIPAVTEKHTGN YCTASNTVASTNHTAILNVQ
 VPPHIVPFVAEEP VFAGESVQLTCHVSKGDP LTIWTFH GKELSSHQGITM KIGERTSLLT ISSATASHSGEYSCHVANQAGLAVHSTTVNVH
 VLPYIVPFEEADESVFAGEPVQLNCHVSKGDLPLDIKW HFGHGFENTSSHLGILTTKMTSRTSFLSIAAATASHSGNYTCVATNSAGSTNHSTVLNVH
 VIPNILPFDVDQALFFGESVQMMCHISKGDTPLEVYWEFNGKKSRELGTFRVGRSSVLM LPSVTD AHSNGNYTCVAKNRAGTTSYTTTLKII
 VAPYIIPFEEVESIFAGESVHLTCHVSKGDRPLQITW SFQAQDI PYHNNMGI TTTKLGEKASVLSIATAMGHHSNGNYTCASN RAGRVNYTATVNVH
 VPPHIMPFEIEESVY YGESVQMTCHASKGDRPMTV TWT FEGKDLLTHTG IKTMKMAEQTSFLS IASVTGAHSGNYTCIAKNRAGEDRYTAILNVQ
 VLPHIKPFELDEAVFAGESVHLDCHVSKGDTPLNISWRFQGP ITHRMGVYTTLSDRVSVLDIASVMGYNSGNYTCIANNKAGTATHTAILNVI
 VPPVVQPF SFGEVAMNSGQVVTAPCSVIEGDHPLRLK WLFNEKPVKNMPGVS VFQIGEKSAI LSIGSVSHNHAGNYTCMAENEAGIHYHTSTLIIN
 VPPHILPFAFGEK PANVGEYLQA ACTVNLGDLPLTITWAFNGQLISQRNNDYVLTNSKRSSLLI IESVNAKHAGAYTCVGENRAGRNTHSADLVVY
 VPPKIAPFVAGPEPAFLGDYFALQCIITHGDQPVRIEWSVNNKSANSFPPIRVSTIDRRSSVLTIESVDAKHAGLYNCTSSNSAGVTSHHTELVVR
 VPPLIMPFSFGDVPSPNGDTAVVNCVATKGDQPLEISWTFSSETIDSSLQRDITMPLGPRASVLTINSVSANHQNYTCIVQNAAGRAEHAATLVVN

9.1.1.4.4 Exonkassette 33: 2 alternative Exone

GTIAPARDVGGNTLTTEQTLKII LTHLNLIVPVVASILVII IAIVVVCVVRGARDHHK
 GTIAPLPGNGDDKELPPWVKAWLEPEVLVPILATIVVFIVGVVICLTLARRNTPHRLR

9.1.1.4.5 Optionales Exon 35

MGAHSTWDP RRHHYERVRRPRLRRTGSGDTIST

9.1.2 Sequenz-ID: Msex2.09537-RB

9.1.2.1 Nukleotidsequenz (cDNA)

Host: i5k Workspace (i5K Consortium 2013)
Organismus: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)
Datenbank: Transkriptom (Manduca_sexta_OGS_v2.0_transcript, Kanost et al. 2016)
Sequenz-ID: Msex2.09537-RB
Anzahl der Basen: 8.391

```
>gnl|Manduca_sexta_transcript_OGS_v2.0|Msex2.09537-RB
JH668578.1:96073-149166 (-)
TAGAAGTGTATTTTTATTTTCAGACGAACCGACTTAAATTCGGTCTAATCTCGGCCGCATC
GCGGCCATCTGAGTTTATTTTTTTTGTTCAGTGGAATTTTGTGTTGTGTTGTCCAGTGAC
TCTAGTGATCAGTGAAGTGTCTGTGACTGTGAATATGGCTTATAAAGGATTCCTCGCCCTC
GTGGCGCTGGCCATTATAGGGTCAGCGCTATGCGAGGACGAAACTATCGGCCCGATTTTC
ATGAAGGAACCCCCAAACCGAGTTGACTTCAGCAACACGACCGGCGCGACTGTAGAATGT
GCTGCACGTGGATCCCCTGCTCCTGACATCATTGGGTACGCGCTGATGGAAC TGCCGTT
GGAGATGTCCCTGGACTGCGTCAAGTACAAGCGAATGGAAATCTGTTGTTCCCGCCCTTC
CGTGCCGAGGATTATCGTCAAGAGGTCCACGCTCAGGTGTACGCTTGCCCTTGCCCGTAAC
TCTGTGCGTACCATTCACTCCAAGGACGTTAATGTACGCGCCGTAATACATCAAAGTTAT
GAACCTCGGGTTATTGATGAGGATGTTTTGCGCGGAATTCTGCCATTGTTAAATGTACG
ATCCCCTCGTTTGTAGCTGACTACGTTCAAGTTACAGATTGGGTGGCGAATGGAGATTCA
CTGTCTCTGTTTTCTACAACAGCTCCGAGATAGATTATGCTGTTAATCAGTTCTATGAA
TCGCAAGTCTATGACATATACGTGATACGAGGTAATGCTGCTGTGTTCAAGTGTCATATA
CCTTCTTTTCGTATCAGATCACGTGCAAGTAGTTTCGTGGCATGATACTGACGGTGGCGAA
TACATTTTAAATAGCAATTATGTTGTATCACAAGCATATACCGTAAACTTGGTAGAGGAA
AATGTATTGCGAGGAAACGCCGCTATTTTCAAGTGTCTTATCCCAAGTTTCGTAACCGAA
TATGTGTCAGTAGCATCTTGATAATATCTGAAGGAGATATAGATGAGGTGCAAATCAAA
ATTAGCGACATAACTGATAATTATGTCGTATCTCAGGCTTACACGGTCAATATTTTGGAA
GAAAGTGTGTTGCGAGGAAACGCAGTAGTTCTCAAATGTCATATATCTACTTTTGTAAACG
GAATATGTTAGTGTTTCCCTCTTGATTATCTCCGAAGGAGAAACAGATGAGTTGGAAATC
AAGGCCGACTCCATTGATTTTCGTTGTTAGACAAGCTTATACAGTGAACCTAATGGAAGAA
AATGTTCTCCGTGGCAACTCCGCTGTAGTAAAGTGTACATACCAAGTTTGTGTCAGAA
TATGTTCTTGTATCATCATGGATAATAAGTGAAGGAGAGCTAGACGACATAGAAATCCCA
TTAAACGAATCCTCCAGCTTAATGGTATCTCAGTCATATACAGTACATCTTTGGGAAGAG
AGCGTGTACGGGGAAATGCAGCAGTTCTCAAATGTCATATCTCTACTTTTGTAAACGGAA
TACGTTAGCGTCTCCTCTTGATTATATCTGAAGGAGATAAAGATGAACTAGAAATCCAG
GCAGATTCTAATGATTCGGTGGTAACTCAACTGTACACTGTATATCTTTGGGAGGAAATG
GTGTTGCGCGGTAATTCGGTAGTACTGAAATGTCACATACCGAGTTTCGTCACTGAGTAC
GTCACGGTACATCCTGGATTATTTCTGAAGGGGACCAAGACGAAATGGAAATACATTTA
AATACTAGTTCCACTTTAGTCGTATCTCAGGCTTACGATGTAAAATTTTGGGAAGAATAT
GTTTTGCGAGGAAACGCCGCCATATTGAAATGTCAAATCCCAAGTTTCGTCCTGAATAC
GTTTCGGTTAGCTCTTGATAAATTTCTGAAGATGAAAACGAACAAGAAATCAAATTAAT
TCGTCCTCAAGTTTAGTGGTTTTCTCAGTCGTACGCAGTCAATCTAATGGAGGAGTACGTT
CTGAGAGGAAATAGTGCTATTTTAAAATGCCACATTCAGGTTTCGTCCTCTGAATATGTT
TTCGTCACCTTCGTGGATCATCAGTGAGGGCGAGACGGATCTTGATGAGATCAAACCTCGAT
TCAAATCAAATTTAAACGACGGCAAATATTTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCATATC
CGTGATGTCGGACCCGAGGACGGTTACAAATCATACCAATGTCGTAATAAGCACAGACTC
ACTGGTGAACCTCGATTATCCGCTACTAAAGGAAGGCTGGTCATTACGGAGCCGGTGGGT
CATGTTCCCTCCGAAGGTTCCAGTGCGCAGACAACCATTGGCTTCCAGTTTAGCGAACAT
ACAAGTCTCGCAGTTTTGTGCCAGCACAGGCTTTTCTGCACCTCTTTACCGATGGTAT
AAATTCATTGATGGCACCCTCGAAAACAACCAGTCACCCTTGACGACAGAGTGAACAA
GTATCTGGAACCTGATCATTAAGGAAGCTAAAGTTGAAGATCTGGAAAGTACTTATGC
GTTGTTAACAATTCCGTTGGAGGTGAATCCGTGGAACCGTACTGACCGTAACAGCTCCT
```

CTGAAAGCTACTGTTGAACCAGCCACGCAAACCTGTAGACTTTGGACGCCAGCAGTCTTC
ACTTGCAGATACGAAGGCAATCCCGTTAAGACTATTACCTGGCTTAAAGACGGAAAGGAT
ATCAAGCACCACGACACCATTTTAAGGATTGAATCGGTAAAGAAGGAAGACAAGGGAATG
TACCAATGCTTTATTAGAAACGATCAAGAGAGCGCAGGTGCTAGTGCTGAACTGAACTC
GGAGGACGATTGGAACCACCCAGATTAGACACAGCTTTGGCGAACAGACCTTCCGCTCC
GGCCCGTCCCTGCGCTTAAAGTGCCTTGCATCTGGAAACCCCACTCCTGACATCACATGG
CTCTTGGACGGTGAGAAGCTGAACAGCGGAGATCGCCTGCAAATTGGACAATTCGTTACT
GCTGACGGCAACGTGGAATCCCATCTTAACATCTCCTCTGTACACACCAACGACGGCGGT
CTTTTACACTTGCTCTGCTTCTAGCAAGGTGCGAAGTGCATCCCACTCATCTCGCGTCAAC
GTTTATGGCCTGCCCTACGTCCGACCCATGAAGAAACGCCCCGTGGTTCGCTGGAGACACC
CTCATCGTGCCTGCCCAGTTGCCGGCTACCCGATTGAATCTATTGTTTGGGAACGTGAT
GGACGTGTGCTGCCAATCAACCACAAACAGAAGGTATTCCCCAACGGCACACTGGTAATC
GAGAACGTTGAACGCATGAGCGACGAAGCTACCTACACGTGTGTTGCCAAGAACTCCCAG
GCCTTACCTCCAAGGGCACACTTGAAGTCAAGTGCATGGTGGCACCAATTATAGCTCCC
TTTGATTTTCGACGAATCAATATTTTACGGCGAAGGAGTCAAGTAACATGCTACGTTCCCT
AAAGGAGACAAACCTTTAAATTTCAAGTGAAGTCTTAGTGAAGAAGATGTGAGTTTACTA
GCCGGGGTGAACATCATGAATGTTGGGGACAGGGGTTTACGCTCTTATTATACCTATGGTG
ACGGCCAAACATTCTGGCAATTACTCATGCACCGCCTCCAATATTGTTCGCCAGTGCTAGT
CATCACGCCATGCTCAATGTCAAGGTACCTCCTCGCTGGATCTTAGAACCTACTGATAAG
GCTTTTGTCTAAGGTTCCGATGCTAAAGTTGAATGTAAAGCCGATGGCTTCCCCAAGCCC
CAAGTACATGGAAGAGAGCTGAAGGGGATACGCCTGGCGATTACAAAGACTTGAAACCC
AACAACCCTAATGTAAAGGTTGAGGACGGTACATTGGCTATTACTAACATCCAGAAAACA
AATGAAGGCTATTATCTTTGCGAAGCTGTAAACGGAATTGGATCAGGATTATCCGCTGTC
ATTCTTATTAGTGTACAAGCTCCCCCTCAATTCGAAATTTAAATGAGGAATCAAACCTGCT
CGCCGAAGTGAACCCGCTGTGCTGCAATGTCAAGCTAAAGGAGAAAAGCCTATTGGAATT
ATCTGGAACATGAACAACAACGCCTCGAACCTAAATCCGACCCTCGTTACACGATCCGC
GAAGAAATTTCTGCCCGGTGGAGTTGTCTCTGATCTCAGCATTAGAAGGACTGAACGTTCC
GACAGCGCCCTTTTACCTGTGTTGCGACTAACGCCTTTGGATCCGATGATACTAGCATT
AACATGATTATCCAAGAGGTACCCGAAGCACCTATGGCTTAAAAGTATTGGACAATCT
GGAAGGACCGTTTCAAGTTGTGCTGGGCTGCACCATACGACGGAACTCGCCTATCAAGAAG
TTCTCATTTGAATACAACGCGCTAAAGGCAACTGGGAAAAAGATATTGACAGAGTTCTC
GTACCAGGAGATGCTACTGAAGCCGGTGTATTTGGACTTAGACCTGCTACTGCTTACCAC
ATCAGGATTGTTGCTGAAAATGAACTCGGAACTTCTGAACCTCTGAGACTGTTACAATT
ATCACTGCCGAAGAAGCTCCTACTGGCCCTCCCCAAGACGTGAAAATCGATGCTATTGAC
AAACACACTCTGCGAGTTACCTGGAACCCCTCCGCCCCAGGACTGGAACGGCGAACTG
CAAGGATACTACGTTGGGTACAAGCTGGCCTCAAGCAACAAGTCTTTTGTCTTTGAAACC
GTTGATATTTCCAAGGAATCCGGCAAGGAACATCATCTTGACATTTTGAATCTGAAGACA
TACACCAATACGCTGTAGTTGTACAAGCCTTCAACAAAATGGGTTCGGGACCAGTCTCT
GGTGAAGTGCAGCGGTACACTGCTGAAGGTGCCCCCTCTGCCCGCCTCAAGATGTCTC
TGCACTACTCTTACTGCCAGACTATCCGCGTCTCCTGGATTTCTCCGCCTCTTGCCGCT
GCCAATGGACTTATCAAGGCTTACAAAGTTATTTACGGACCTAGCGAGACCTGGTATGAC
GAGAAGACAAAAGACACCAAGATCACGGCGAGCAGCGAAACTATTCTTACGACTTAAAG
AAATTCACCAACTACTCTATGGAAGTACTTGTACTGACTAACGGCGGAGATGGCGTACGC
TCTGCACCAATTCCTGCCAGACTGAACAAGATGTACCCGAAGCCCCACGTGCCGTGAAA
GCTCTCGTCATGGGACAGGACTCGATTTTAGTCTTGGAGGCCCCCAGCGCAGCCTAAC
GGTGTGTACCCATTACAACGTTTATACCCAGGCTCAGAACTCGGAACCTCATCCTAAC
AAGGTACCTGCATCTCAAACCAGCTATTCCGCAACCGAACTTAAAGCCGGCCGTTATGAC
TTCTGGGTTACTGCATCCACAATCATCGGTGAAGGCCAACCTTCGGCAACCGCTTCCCTGC
AGCCAAGCGACAAAAGTTCCCTGCTAAAATTCGCTCCTTCGATGAATCGTTCACTGCGACC
TACAAGGAAGATGTCAAACCTGCCCTGCCTTGCCGTGGTTCCTCCCCCTAATATTGTC
TGGAAGGTAAAAGGCCAGCCCTGGAAGCTTCGGAACGCGTTCGTCAACTGCCTGAAGGA
TCGTTGACAGATTGCTGGAGTAGCACGCGAGGACGCCGGGGAATATTCTTGCCACGTTGAC
AACCAATTCGGAACCTGACACAGTCACTCATAACGCTCTCGGTTCTTGCTCCTCCCTTCCCC
CCTCAACTGACTATTGCTTCGTCTTCTGTTTCTCCCTGACTCTCCGCTTGAAGCCATCC
GTCGAAGTTGACCAATCGCCCGCGTGGTTACACTATCCACTACAACAAGAATTCGGA
GATTGGGAAACTGTTTCAAGTCCAAGCTCAACTGACACCTACACTTTGGAAAACCTGTTT
TGCGGCTCTAGATATCAGCTCTACGTTACGGCTTACAATGGAATCGGCACTGGCGAAGCT

TCAGACGTAGTGATCGCTCGCACCCGTGGTTCCAAGCCTCCTGTACCTCGCGCCACTGAT
TTCATTGAAGTTGGATCTTCGTCCGTGACCCTCCATCTCAAACAATGGCTGGATGGCGGC
TGCCCCATGAGCCACTTCGTTGTGCGAAAATAAGAAGAAGGGAGCTGCTGAATGGAACCAG
ATCTCAAACGCTGTGAAACCTGGCGGAAACTTCGTTGTTCTTGATCTCGAACCTGCGACT
TGGTATGTCTTGAGGATCACTGCGCACAATAACGCTGGATTTAACGTAGCCGAATACGAA
TTTGCGACTCTTACTATGACTGGAGGTACGATCGCGCCCGCGCGGACGTGCGCGGCAAC
ACCCTTACCACCGAACAACGCTCAAGATAATCCTCACGCACCTCAACCTTATCGTGCCT
GTCGTGCGCTCTATTCTCGTCATTATTATCGCTATTGTCGTGCTGTGCGTTGTACGAGGA
GCAAGGGATCATCACAAAGATGATGCGGTCTACAACGCGTCCCAGGCTGCTCTGGGCGGC
GGCGGCGGCACTCTCGACAAGCGCGGCGGACTCCGCGACGAACTCGGCTACATCGCTCCC
CCCAACCGCAAACCTCCCCCTGTACCCGGCTCCAACCTACAACACTTGCGACCGCGTCAAA
CGACAGGCTGTGATTAGCATGGAAGACGAGATCTGCCCTATGCGACCTTCCACCTGCTC
GGCTTCCGCGAAGAGATGGACCCCAGCAAGGCCCTTGGCGTTCCCCACCACCACCAGCG
CACGCCGGCACCCCTGGCCACCCTCATCTCATCACCTGCTCACTCGCGCGCTGGATCT
CAGAGCATGGTTTCGTTTGAATATTTCTACGGTTGATGGTATCCGACTTTAACTGACTCCA
CCTAATAACCGCACTGAAGTTGTAGTGTGTTGAACAGACGTCCAATAAAAAGTATTTGTC
CATCCATCGGAAACGAAGTCTGTTCGCCAAAGAAGTTTAAACGAATTTGAACAGGCCACCG
TATTAGGTGAAAGTTCCTCCGTGGAATTTAATTTTAAAGTCAGCGTAGAACTATATTGGT
TTAAAGCGTCAACCTTCTAAATTTCTGGATCTGCTGAATCTGAATTCATGCAAGAGCTAC
TAATATTGTGTTTCAAATTACCTAAATAACATGTAGCAAATTAATATTATGCAATTAATA
CTTTTAAAAACTACGCTTGGTACGGCAGCCCCGTGCTAACAGCCGCTACGCCCCGAAGAA
CTCCCAGGGAGGACAGAGCGCCATCTATTCCACTGCCCCCGAGTATGATGACCCCGCCAC
CTGCGCTGAAGAGGACCAATACCGCGCCCGCTACTCCCGGCCATGTACGCTTGCAGCCCC
CGAGTACGACGAGCCCGCGTGTGCGCCCCCTGAGGACGACCAGTACACCGGCGCCTACGG
CACGCCCTACTCCGACCACTACGGATCTCGCCCTAGCATTGGTAATACACATTACACACA
TACATGCTGCCACGCGCTACTCAAGCAAACAACAACCTCGCTCAATGTCACCGGCTTTTGA
ATATTTAATTGCTGATGGTAAAAAACGATAAATTTATAATATGATTTAAAAGACAAAATGG
ATAATTGATGATAATACGTACGACGTATTCAATCTTTCGCCTCCGCAATTCGTTTTCGCG
TTGCTACTAAAAAACCGACCGAAACTTAGTTCGATATTTACTAAAGTGATGCATTTGAA
GTAAATCTGCAGGAACCCGCAAATGCGGCGGATCCCCGAGCCTCCCCACCCCCACCA
CGCAACGCGAACAACGACAACAACCTGTTCTTCTCCTTCAATGAGAGCAAGGACTCAAAC
GAAATCTCCGAAGCCGAATGCGACCAGCCACGCAACTACCCTGATATATTCAGCAGCCAA
CAAACAAGAACCCTAGAGGATTATACATTGTATTTGCACGTTACCCGCTCTTTACGTGAC
ACTTGGAGTTTTACTTGAAAAAATACAAGCACTTAAATACATGAAAAAATAGTATACTA
TGAAAAACATTTATTAGGTTAGTAACATACCTGTTTGCGCATAATTCATATTTACAATTC
ACATAAAATCCATTGTGGCTCCTTACCATTTATCTATGAACTCATGACGATATTACAAA
TTCTAAATTAATAATAATACCCAAATTGGTCCATGCGTACTTTGGGTGTCAACTGAACA
GAAGACGGTAATAATATTTTTTAATAAAGTATTACTTAAACCTTTTATGTTTATAATAAT
TGTGACTGACCGCATGCAACATTTGTATCAGTTATAACAAATTTTAAATCAAGCTTCAA
AATTAGATCTTCTGCAATTGGCTTACCTACTCTTATTTTTCAAATTTAAA

9.1.2.2 Aminosäuresequenz (Protein)

Host: i5k Workspace (i5K Consortium 2013)
Organismus: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)
Datenbank: Proteom (Manduca_sexta_OGS_v2.0_peptide,
 Kanost et al. 2016)
Sequenz-ID: Msex2.09537-RB
Anzahl der Aminosäuren: 2.245

>gnl|Manduca_sexta_protein_OGS_v2.0|Msex2.09537-RB JH668578.1:96073-149166 (-)

MAYKGFALVALAIIGSALCEDETIGPIFMKEPPNRVDFSNNTGATVECAARGSPAPDII
 WVRADGTAVGDVPGLRQVQANGNLLFPPFRAEDYRQEVHAQVYACLARNSVGTIHSKDVN
 VRAVIHQSYEPRVIDEDVLRGNSAIVKCTIPSFVADYVQVTDWVANGDSLFLSYNSSEI
 DYAVNQFYESQVYDIYVIRGNAAVFKCHIPSFVSDHVQVVSWHDTDGGEYILNSNYVVSQ
 AYTIVNLVEENVLRGNAAIFKCLIPSFVTEYVSVASWIIISEGDIDEVEIKISDITDNVVS
 QAYTVNILEESVLRGNAVVLKCHISTFVTEYVSVSSWIIISEGETDELEIKADSIDFVVRQ
 AYTIVNLMEENVLRGNSAVVKCHIPSFVSEYVSVSSWIIISEGELDDIEIPLNESSSLMVSQ
 SYTVHLWEESVLRGNAAVLKCHISTFVTEYVSVSSWIIISEGDKDELEIQADSNDSVVTQL
 YTVYLWEEMVLRGNSVVLKCHIPSFVTEYVTVTSWIIISEGDQDEMEIHLNTSSTLVVSQA
 YDVKFWEEYVLRGNAAILKCHIPSFVSEYVSVSSWIIISEDENEQEIKLNSSSSLVVSQSY
 AVNLMEEYVLRGNSAILKCHIPSFVSEYVSVTSWIIISEGETDLDEIKLDSNQNLDGKYL
 VLPSGELHIRDVGPEDEGYSYQCRTRKHLRGTGETRLSATKGRVITEPVGHVPPKVPQAQT
 TIGFQFSEHTSLAVLCPAQAFAPPLYRWFYKIDGTTRKQPVTLDDRQVSGTLLIKEAK
 VEDSGKYLVCVNNVSGGESVETVLTVTAPLKATVEPATQTVDFGRPAVFTCRYEGNPVKT
 ITWLKDGKDIKHHDTILRIESVKKEDKGMVQCFIRNDQESAGASAEKLGGRFEPPIRH
 SFGEQTFRSGPSRLKCVASGNPTPDITWLLDGEKLNNGDRLQIGQFVTADGNVESHINI
 SSVHTNDGGLYTCASASKVGSASHSSRVNVYGLPYVRPMKKRPVAGDTLIVHCPVAGYP
 IESIVWERDGRVLPINRQKQVFPNGTLVIENVERMSDEATYTCVAKNSQAFVSKGTLELQ
 VMVAPIIAPFDDESIFYGEGVQVTCYVPGDKPLNFKWNFSEEDVSLLAGVNIIMVNGDR
 GSALIIIPMVTAKHSGNYSCTASNIVASASHHMLNVKVPWRWILEPTDKAFAQGSADAVE
 CKADGFPKQVTKRAEGDTPGDYKDLKPNPNVQVEDGTLAITNIQKTNEGYLLCEAVN
 GIGSGLSAVILISVQAPPQFEIKMRNQTARRSEPAVLQCAKGEKPIGI IWNMNNKRLEP
 KSDPRYTIREEILPGGVSDLSIRRTERSDSALFTCVATNAFGSDDT SINMI IQEVPEAP
 YGLKVLKSGRTVQLSWAAPYDGNSPIKFLIEYKRAKGNWEKIDRVLVPGDATEAGVF
 GLRPATAYHIRIVAENELGTSEPSETVTIITAEAEPTGPPQDVKIDAIDKHTLRVTWKPP
 PPQDWNDELQGYVGYKLASSNKS FVFETVDISKESGKEHLLDILNLKTYTQYAVVVQAF
 NKMGS GPVSGEVRAYTAEGAPSAPPQDVLCTTLTAQTIRVSWISPPLAAANGLIKAYKVI
 YGPSETWYDEKTKDKITASSETILHGLKKFTNYSMEVLATTNGGDGVRSAPIHCQTEQD
 VPEAPRAVKALVMGQDSILVSWRPPAQPNGVVTHYNVYTQAQNSEPHPNKVPASQTSYSA
 TELKAGRYDFWVTASTIIGEGQPSATASCSPDKVPAKIASFDESFTATYKEDVKLPCLA
 VGVPPPNIWVKVKGQPLEASERVRLPEGLQIAGVAREDA GEYSCHVDNQFGTDTVTHT
 LSVLAPPFPPLTIASSVSSLTLRLKPSVEVDQSPAAGYTIHYKQEFQDWETVQIPSS
 DTYTLENLFCGSRYQLYVTAYNGIGTGEASDVVIARTRGSKPPVPRATDFIEVGS SVTL
 HLKQWLDGGCPMSHFVVENKKKGAAEWNQISNAVKPGGNFVVDLEPATWYVLRITAHNN
 AGFNVAEYEFATLTMTGGTIAPARDVGGNTLTTEQTLKIILTHLNLIVPVVASILV IIA
 IVVVV CVVRGARDHHKDDAVYNASQAALGGGGTLDKRGGLRDELGYIAPPNRKLPVPGS
 NYNTCDRVKRQAVISMEDEICPYATFHLLGFREEMDPSKALAFPHHPAHAGTLAHPHPH
 HPAHSRAGSQSMVRLKYSTVDGIRL*

9.1.3 Aminosäuresequenz-Alignment: Msex2.09537-RA & Msex2.09537-RB

Msex2.09537-RA	MAYKGF LALVALAIIGSALC ED ETIGPIFMKEPPNRVDF SNTT GATVECAAR GS PAPDII	60
Msex2.09537-RB	MAYKGF LALVALAIIGSALC ED ETIGPIFMKEPPNRVDF SNTT GATVECAAR GS PAPDII	60

Msex2.09537-RA	WVRADG TAVGDV PGLRQ VQANGNLL FPP FR AEDYRQ EVHAQVYA CLARN SVGTIHSKDVN	120
Msex2.09537-RB	WVRADG TAVGDV PGLRQ VQANGNLL FPP FR AEDYRQ EVHAQVYA CLARN SVGTIHSKDVN	120

Msex2.09537-RA	VRA VVAQQY DT VNKEY VIMGNSI ILKQ VPSF VADF -----	157
Msex2.09537-RB	VRAVIHQSYEPRVIDEDVLRGNSAIVKCTIPSFVADYVQVTDWVANGDSLFLSYNSSEI	180
: *.*: * . * *: *** *: ** :**:		
Msex2.09537-RA	-----	157
Msex2.09537-RB	DYAVNQFYESQVYDIYVIRGNAAVFKCHIPSFVSDHVQVVSWHDTDGGEYILNSNYVVSQ	240
Msex2.09537-RA	-----	157
Msex2.09537-RB	AYTVNLVEENVLRGNAAIFKCLIPSFVTEYVSVASWIISEGDIDEVEIKISDITDNYVVS	300
Msex2.09537-RA	-----	157
Msex2.09537-RB	QAYTVNILEESVLRGNAVVLKCHISTFVTEYVSVSSWIISEGETDELEIKADSIDFVVRQ	360
Msex2.09537-RA	-----	157
Msex2.09537-RB	AYTVNLMEENVLRGNSAVVKCHIPSFVSEYVSVSSWIISEGELDDIEIPLNESSLMVSQ	420
Msex2.09537-RA	-----	157
Msex2.09537-RB	SYTVHLWEESVLRGNAAVLKCHISTFVTEYVSVSSWIISEGDKDELEIQADSNDVSVVTQL	480
Msex2.09537-RA	-----	157
Msex2.09537-RB	YTVYLVWEEMVLRGNSVVLKCHIPSFVTEYVVTVTSWIISEGDQDEMEIHLNTSSTLVVSQA	540
Msex2.09537-RA	-----	170
Msex2.09537-RB	YDVKFWEYVLRGNAAILKQIPSFVSEYVSVSSWIISEDENEQEIKLNSSSSLVVSQSY	600
:.* ** .*.:		
Msex2.09537-RA	-----	182
Msex2.09537-RB	AVNLMEEYVLRGNSAAILKCHIPSFVSEYVSVTSWIISEGETDLDEIKLDSNQNL NDGKYL	660
* ****		
Msex2.09537-RA	VLPSGEL HIRDVGPEDGYKSY QCRT KHRLT GET RLSAT KGRLVIT EPVGHV PPK VPSAQ T	242
Msex2.09537-RB	VLPSGEL HIRDVGPEDGYKSY QCRT KHRLT GET RLSAT KGRLVIT EPVGHV PPK VPSAQ T	720

Msex2.09537-RA	TIGFQF SEHTSLAVLCPAQ AFP APLYRWYKFIDG TRK QPVTLDDRVKQVSG TLI KEAK	302
Msex2.09537-RB	TIGFQF SEHTSLAVLCPAQ AFP APLYRWYKFIDG TRK QPVTLDDRVKQVSG TLI KEAK	780

Msex2.09537-RA	VEDSGKYL CVVNSV SG GESVETVLTVTAPLKATVEPATQTVDFGRPAVFTCRYEGNPVK T	362
Msex2.09537-RB	VEDSGKYL CVVNSV SG GESVETVLTVTAPLKATVEPATQTVDFGRPAVFTCRYEGNPVK T	840

Msex2.09537-RA	ITWLKDGKDIKHHD TIL RIESVKKEDKGM YQC FIRNDQESAGASAE LKLG RFEP QIR H	422
Msex2.09537-RB	ITWLKDGKDIKHHD TIL RIESVKKEDKGM YQC FIRNDQESAGASAE LKLG RFEP QIR H	900

Msex2.09537-RA	SFGE Q TFRSGPSLRLKCVASGN PT PDITWLLDGEKLN SGD RLQIGQFVTADGN VESH LN I	482
Msex2.09537-RB	SFGE Q TFRSGPSLRLKCVASGN PT PDITWLLDGEKLN SGD RLQIGQFVTADGN VESH LN I	960

Msex2.09537-RA	SSVHTNDGGLYTCSASSK VGS ASHSSRVNVYGLPYVR PMK KRPV VAG DTLIVHCP VAG Y P	542
Msex2.09537-RB	SSVHTNDGGLYTCSASSK VGS ASHSSRVNVYGLPYVR PMK KRPV VAG DTLIVHCP VAG Y P	1020

Msex2.09537-RA	IESIVWERDGRVLPINRKQ KV FPNGTLVIENVERMSDEATYTC VAK NSQA FT SKGT L EL Q	602
Msex2.09537-RB	IESIVWERDGRVLPINRKQ KV FPNGTLVIENVERMSDEATYTC VAK NSQA FT SKGT L EL Q	1080

Msex2.09537-RA	VMVPPQITPF EF GEEILNEGETAS VQ CVSKGDL P ITYK W LFNGEEIK TQ NTLGILIT K	662
Msex2.09537-RB	VMVAPIIA PF DFDESIF-YGEGVQ TC Y PK GD PL N FK WN F SEEDV S LLA--G V NIM N V	1137
*** * * : ** : * . * . : * * . . * * * * : . : * * . * : . : * : * : :		

Msex2.09537-RA	QGGQSAIYSTAPEYDDPATCAEEDQYRARYSRPMYACGPYDEPACCAPEDDQYTGAYGT	1862
Msex2.09537-RB	L-----	2245
Msex2.09537-RA	PYSDHYGSRPSIGTRKCGGSPEPPPPPRNANNNDNCSSEFNESKDSNEISEAECDQPRN	1922
Msex2.09537-RB	-----	2245
Msex2.09537-RA	YPVRAHTAKDGLHSEEMRKLIDRPEANTPIPQQAVHGRGLTAYDTVAV	1970
Msex2.09537-RB	-----	2245

Legende

- Signalpeptid
- Ig-Domäne 1 (Ig-ähnlich)
- Ig-Domäne 2 (Ig)
- Ig-Domäne 3 (IgC2)
- Variable Aminosäuresequenz, kodiert von alternativen Exons der Exonkassetten
- Konstante Aminosäuresequenz

9.2 Abbildungen

A

Showing 1 to 25 of 146 entries

blastdb	qseqid	sseqid	pident	length	mismatch	gapopen	qstart	qend	sstart	send	evalue	bitscore
mansex	HZ_dscam5_Klon8_RC	Msex2.09537-RA	99.187	246	2	0	762	1007	537	782	4.59e-121	435
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.09537-RA	74	250	57	5	736	981	537	782	3.94e-33	143
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.09537-RA	74	250	57	5	764	1009	537	782	4.05e-33	143
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.09537-RB	100	48	0	0	736	783	477	524	2.66e-16	87.8
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.09537-RB	100	48	0	0	764	811	477	524	2.73e-16	87.8
mansex	HZ_dscam5_Klon8_RC	Msex2.09537-RB	97.917	48	1	0	762	809	477	524	1.16e-14	83.3
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.09537-RB	100	38	0	0	944	981	2119	2156	7.13e-11	69.8
mansex	HZ_dscam5_Klon8_RC	Msex2.09537-RB	100	38	0	0	970	1007	2119	2156	7.32e-11	69.8
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.09537-RB	100	38	0	0	972	1009	2119	2156	7.32e-11	69.8
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.09537-RB	81.429	70	13	0	818	887	1795	1864	2.49e-10	68.9
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.09537-RB	81.429	70	13	0	846	915	1795	1864	2.56e-10	68.9
mansex	HZ_dscam5_Klon8_RC	Msex2.01506-RC	80.952	42	8	0	455	496	4286	4245	0.035	41
mansex	HZ_dscam5_Klon8_RC	Msex2.01506-RA	80.952	42	8	0	455	496	3203	3162	0.035	41
mansex	HZ_dscam5_Klon8_RC	Msex2.01506-RB	80.952	42	8	0	455	496	4332	4291	0.035	41
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.01506-RC	80.952	42	8	0	429	470	4286	4245	0.035	41
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.01506-RA	80.952	42	8	0	429	470	3203	3162	0.035	41
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.01506-RB	80.952	42	8	0	429	470	4332	4291	0.035	41
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.01506-RC	80.952	42	8	0	457	498	4286	4245	0.036	41
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.01506-RA	80.952	42	8	0	457	498	3203	3162	0.036	41
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.01506-RB	80.952	42	8	0	457	498	4332	4291	0.036	41
mansex	HZ_dscam5_Klon7_RC	Msex2.09537-RB	75	56	14	0	846	901	898	953	0.12	39.2
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.09537-RB	75	56	14	0	818	873	898	953	0.12	39.2
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.13323-RK	92	25	2	0	373	397	2304	2328	0.42	37.4
mansex	HZ_dscam5_Klon6_RC	Msex2.13323-RF	92	25	2	0	373	397	3152	3176	0.42	37.4

Download

2021 - National Agricultural Library

B

Showing 1 to 25 of 95 entries

blastdb	qseqid	sseqid	pident	length	mismatch	gapopen	qstart	qend	sstart	send	evalue	bitscore
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.09537-RA	99.593	246	1	0	781	1026	537	782	3.83e-122	440
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	82.036	334	60	0	693	1026	1045	1378	4.31e-90	333
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	80.516	349	65	1	702	1047	1231	1579	7.8e-87	322
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	76.946	334	73	2	696	1027	1405	1736	4.04e-65	251
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	74.792	361	85	2	693	1047	862	1222	2.55e-61	238
mansex	ZNS_Dscam5_Klon12_RC	Msex2.09537-RA	73.359	259	52	8	427	681	537	782	4.09e-31	136
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	67.83	401	117	5	693	1084	1759	2156	2.73e-29	131
mansex	ZNS_Dscam5_Klon12_RC	Msex2.09537-RB	76.351	148	31	2	427	572	477	622	2.42e-21	104
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RA	96.078	51	2	0	647	697	537	587	3.55e-15	84.2
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.09537-RB	97.917	48	1	0	781	828	477	524	1.18e-14	83.3
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	97.917	48	1	0	647	694	477	524	1.24e-14	83.3
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RB	72.789	147	38	2	870	1015	862	1007	1.51e-13	78.8
mansex	ZNS_Dscam5_Klon12_RC	Msex2.09537-RB	100	38	0	0	644	681	2119	2156	4.99e-11	69.8
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.09537-RB	100	38	0	0	989	1026	2119	2156	7.44e-11	69.8
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.09537-RA	100	38	0	0	1047	1084	745	782	7.83e-11	69.8
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.01506-RC	80.952	42	8	0	474	515	4286	4245	0.036	41
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.01506-RA	80.952	42	8	0	474	515	3203	3162	0.036	41
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.01506-RB	80.952	42	8	0	474	515	4332	4291	0.036	41
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.01506-RC	80.952	42	8	0	340	381	4286	4245	0.038	41
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.01506-RA	80.952	42	8	0	340	381	3203	3162	0.038	41
mansex	ZNS_Dscam5_Klon16_RC	Msex2.01506-RB	80.952	42	8	0	340	381	4332	4291	0.038	41
mansex	ZNS_Dscam5_Klon12_RC	Msex2.00809-RB	85.294	34	5	0	516	549	493	460	0.084	40.1
mansex	ZNS_Dscam5_Klon12_RC	Msex2.00809-RA	85.294	34	5	0	516	549	4931	4898	0.084	40.1
mansex	ZNS_Dscam5_Klon11_RC	Msex2.13323-RK	92	25	2	0	418	442	2304	2328	0.44	37.4

Download

2021 - National Agricultural Library

Abbildung 9.1: Multiplex-BLAST-Analyse von Transkript-Amplifikaten von *dscam* mit dem im i5k Work-space@NAL (i5k Consortium 2013) veröffentlichten Transkriptom von *M. sexta*.

BLAST-Analyse (blastn) von Nukleotidsequenzen der Multiple Cloning Site rekombinanter Plasmide mit RT-PCR-Insert von *dscam* (Exon 4 – 6), amplifiziert mit total-RNA-Extrakt aus **A**: den zirkulierenden Hämocyten und **B**: dem zentralen Nervensystem unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven. Je RT-PCR-Amplifikat wurden die rekombinanten Plasmide von drei Klonen sequenziert und mittels Multiplex-BLAST analysiert. Alle Einträge sind nach aufsteigendem *E*-value, d. h. nach absteigender statistischer Wahrscheinlichkeit, sortiert. Grün markiert sind Einträge mit der Transkript-Sequenz-ID *Msex2.09537-RA*.

A Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Trichoplusia ni</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC113497647), tran...	Trichoplusia ni	238	238	99%	5e-59	81.56%	8346	XM_026877907.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Trichoplusia ni</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC113497647), tran...	Trichoplusia ni	238	238	99%	5e-59	81.56%	8385	XM_028677283.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Ostrinia furnacalis</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC114364220), t...	Ostrinia furnacalis	202	202	99%	4e-48	78.28%	7904	XM_028320292.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zerene cesonia Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 transcript variant X22 (LOC1198341...	Zerene cesonia	193	193	99%	2e-45	77.46%	7824	XM_038358471.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Bombyx mori</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC101735614), trans...	Bombyx mori	183	183	87%	1e-42	78.90%	7835	XM_038014709.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Bombyx mori</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC101735614), trans...	Bombyx mori	183	183	87%	1e-42	78.90%	7859	XM_038014692.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera frugiperda</i> hemiceitin-2-like (LOC118265102), mRNA	Spodoptera frugi...	173	293	84%	2e-39	83.44%	6069	XM_035577816.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Amyelois transitella</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106141029), ...	Amyelois transitella	163	163	81%	9e-37	78.00%	937	XM_013342684.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Sipha flava</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC112686514), transcri...	Sipha flava	112	112	92%	5e-21	71.49%	6460	XM_025558850.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Sipha flava</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC112686514), transcri...	Sipha flava	112	112	92%	5e-21	71.49%	6460	XM_025558846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Sipha flava</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC112686514), transcri...	Sipha flava	112	112	92%	5e-21	71.49%	6469	XM_025558837.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Sipha flava</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC112686514), transcri...	Sipha flava	112	112	92%	5e-21	71.49%	6484	XM_025558816.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Halyomorpha halys</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106678542), ...	Halyomorpha halys	104	104	97%	7e-19	70.29%	6448	XM_024358422.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Halyomorpha halys</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106678542), ...	Halyomorpha halys	104	104	97%	7e-19	70.29%	6454	XM_024358413.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera frugiperda</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC1182651...	Spodoptera frugi...	104	104	48%	7e-19	79.17%	7948	XM_035577933.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera frugiperda</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC1182651...	Spodoptera frugi...	104	104	48%	7e-19	79.17%	7951	XM_035577928.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera frugiperda</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC1182651...	Spodoptera frugi...	104	104	48%	7e-19	79.17%	7957	XM_035577927.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera frugiperda</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC1182651...	Spodoptera frugi...	104	104	48%	7e-19	79.17%	7957	XM_035577926.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Nilaparvata lugens</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111045692), ...	Nilaparvata lugens	98.7	98.7	99%	3e-17	68.85%	9675	XM_039427606.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Manduca sexta</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC115448741), mR...	Manduca sexta	98.7	235	67%	3e-17	96.61%	8293	XM_037442338.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7874	XM_022959366.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7874	XM_022959363.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7874	XM_022959360.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7895	XM_022959355.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7898	XM_022959349.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7898	XM_022959346.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), tr...	Spodoptera litura	97.8	97.8	99%	1e-16	69.39%	7913	XM_022959331.1

B Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6095	XM_026631775.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6095	XM_026631539.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6095	XM_026631471.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6095	XM_026631391.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6098	XM_026631252.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6113	XM_026630624.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6113	XM_026630465.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6113	XM_026630376.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6113	XM_026630137.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6119	XM_026629816.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Vanessa tameamea</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC11339209...	Vanessa tamea...	240	240	97%	1e-59	82.08%	6119	XM_026629747.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Bicyclus anynana</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC112055815), ...	Bicyclus anynana	233	233	99%	6e-58	81.15%	4912	XM_024096054.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zerene cesonia Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 transcript variant X26 (LOC119834...	Zerene cesonia	229	229	99%	3e-56	80.74%	7800	XM_038358475.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Zerene cesonia Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 transcript variant X17 (LOC119834...	Zerene cesonia	229	229	99%	3e-56	80.74%	7824	XM_038358466.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7871	XM_022959365.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7874	XM_022959361.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7874	XM_022959359.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7874	XM_022959358.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7895	XM_022959354.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7898	XM_022959348.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7898	XM_022959347.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7898	XM_022959345.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7901	XM_022959339.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7904	XM_022959338.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7904	XM_022959337.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7904	XM_022959336.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC111348630), t...	Spodoptera litura	224	224	99%	3e-55	80.33%	7913	XM_022959330.1

Abbildung 9.2: Multiplex-BLAST-Analyse von Transkript-Amplifikaten von *dscam* (i5k@NAL-Sequenz-ID: Msex2.09537-RA) mit der NCBI-Datenbank Transcript Reference Sequences.

BLAST-Analyse (blastn) der Nukleotidsequenzen von RT-PCR-Amplifikaten von *dscam* (Exon 4 – 6), amplifiziert mit total-RNA-Extrakt aus **A**: den zirkulierenden Hämocyten und **B**: dem zentralen Nervensystem unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven. Je RT-PCR-Amplifikat wurden die rekombinanten Plasmide von drei Klonen sequenziert und mittels Multiplex-BLAST (Datenbank: NCBI Transcript Reference Sequences (cDNA), BLAST-Algorithmus: Somewhat similar sequences (blastn), Expect threshold: 0,05, Word size: 11) analysiert. Alle Einträge sind nach aufsteigendem *E*-value, d. h. nach absteigender statistischer Wahrscheinlichkeit, sortiert.

A Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 27 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BP (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	55.4	55.4	80%	4e-06	66.83%	7708	NM_001259246.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant AU (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	55.4	55.4	80%	4e-06	66.83%	7705	NM_001043037.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CD (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	9145	NM_001273835.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BW (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7699	NM_001259252.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BT (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7699	NM_001259249.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BS (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7699	NM_165515.2
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BQ (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7762	NM_001259247.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BI (Dscam1), mR...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7741	NM_001259239.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BX (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7764	NM_001259233.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant L (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7744	NM_001043055.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant M (Dscam1), mR...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7702	NM_001043044.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BY (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7710	NM_001259234.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant O (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7744	NM_001043033.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BZ (Dscam1), mR...	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7755	NM_001259235.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster IP15231 full insert cDNA	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	4312	BT025950.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant C (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	46.4	46.4	46%	0.002	68.70%	7699	NM_165513.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BR (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7747	NM_001259248.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CB (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7710	NM_001259237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CC (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7755	NM_001259238.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CA (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7755	NM_001259236.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant T (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7747	NM_001043035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant R (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7690	NM_001043028.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant V (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7699	NM_001043018.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant E (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	7717	NM_206047.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster SD11109 full insert cDNA	Drosophila melanoga...	45.5	45.5	57%	0.007	66.90%	2360	BT001877.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster chromosome 2L	Drosophila melanoga...	42.8	42.8	18%	0.024	82.22%	23513712	AE014134.6
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster clone BACR07G13, complete sequence	Drosophila melanoga...	42.8	42.8	18%	0.024	82.22%	183723	AC009341.7

B Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 22 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant G (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7747	NM_001043060.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant J (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7699	NM_001043058.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant F (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7744	NM_001043049.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant H (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7702	NM_001043047.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BF (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7744	NM_001043029.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant I (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7702	NM_001043022.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant A (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	78.8	78.8	94%	3e-13	68.09%	7699	NM_165514.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster strain rover (forR) chromosome 2R	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	62%	1e-06	69.23%	21146568	CP023338.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster strain siltter (forS) chromosome 2R	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	62%	1e-06	69.23%	21146707	CP023332.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster chromosome 2R	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	62%	1e-06	69.23%	25286936	AE013599.5
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant BR (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7747	NM_001259248.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CB (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7710	NM_001259237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CC (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7755	NM_001259238.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant CA (Dscam1), m...	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7755	NM_001259236.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant T (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7747	NM_001043035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant R (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7690	NM_001043028.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant V (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7699	NM_001043018.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster clone BACR26B18, complete sequence	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	62%	1e-06	69.23%	173641	AC009739.4
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster down syndrome cell adhesion molecule 1, transcript variant E (Dscam1), mRNA	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	7717	NM_206047.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster Dscam gene, complete cds	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	62%	1e-06	69.23%	69145	AF280530.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster SD11109 full insert cDNA	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	94%	1e-06	66.09%	2360	BT001877.1
<input checked="" type="checkbox"/> Drosophila melanogaster, chromosome 2R, region 43B2-43C2, P1 clone DS07185, complete sequence	Drosophila melanoga...	58.1	58.1	62%	1e-06	69.23%	79333	AC005452.1

Abbildung 9.3: Multiplex-BLAST-Analyse von Transkript-Amplifikaten von *dscam* (i5k@NAL-Sequenz-ID: Msex2.09537-RA) mit der NCBI-Datenbank Nucleotide collection (nr/nt), spezifisch für mit *D. melanogaster* korrespondierende Sequenzen.

BLAST-Analyse (blastn) der Nukleotidsequenzen von RT-PCR-Amplifikaten von *dscam* (Exon 4 – 6), amplifiziert mit total-RNA-Extrakt aus **A**: den zirkulierenden Hämocyten und **B**: dem zentralen Nervensystem unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven. Je RT-PCR-Amplifikat wurden die rekombinanten Plasmide von drei Klonen sequenziert und mittels Multiplex-Nukleotid-BLAST (BLAST-Algorithmus: Somewhat similar sequences (blastn), Expect

threshold: 0,05, Word size: 7) mit den Nukleotidsequenzen der NCBI-Datenbank Nucleotide collection (nr/nt) verglichen. Die Suchanfrage wurde auf die mit *D. melanogaster* korrespondierenden Sequenzen beschränkt. Alle Einträge sind nach aufsteigendem *E*-value, d. h. nach absteigender statistischer Wahrscheinlichkeit, sortiert.

```

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert ----- 0
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert ----- 0
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert ----- 0
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert ----- 0
Msex2.09537-RA_Exon4-6 GTACAAGCGAATGGAAATCTGTTGTTCCCGCCCTTCGGTGCCGAGGATTATCGTCAAGAG 60
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert ----- 0
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert ----- 0

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert -----TAACTCTGTCGGTACCATTCACTCTAAG 29
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert -----TAACTCTGTCGGTACCATTCACTCCAAG 29
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert -----TAACTCTGTCGGTACCATTCACTCCAAG 29
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert -----TAACTCTGTCGGTACCATTCACTCCAAG 29
Msex2.09537-RA_Exon4-6 GTCCACGCTCAGGTGTACGCTTGCCCTTGCCCTAACTCTGTCGGTACCATTCACTCCAAG 120
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert -----TAACTCTGTCGGTACCATTCACTCTAAG 29
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert -----TAACTCTGTCGGTACCATTCACTCTAAG 29
*****

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert GACGTTAATGTACGCGCGTGTATCTCAGGCTTACACGGTCAATATTTTGAAGAAAGT 89
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert GACGTTAATGTACGCGCGTGTATCTCAGGCTTACACGGTCAATATTTTGAAGAAAGT 89
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert GACGTTAATGTACGCGCGTGTATCTCAGGCTTACACGGTCAATATTTTGAAGAAAGT 89
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert GACGTTAATGTACGCGCGTGTATCTCAGGCTTACACGGTCAATATTTTGAAGAAAGT 89
Msex2.09537-RA_Exon4-6 GACGTTAATGTACGCGCGTGTGTGGCACAGCAATACGATACCGACGTGAACAAGGAATAT 180
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert GACGTTAATGTACGCGCGTGTGTGGCACAGCAATACGATACCGACGTGAACAAGGAATAT 89
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert GACGTTAATGTACGCGCGTGTGTGGCACAGCAATACGATACCGACGTGAACAAGGAATAT 89
*****

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert GTGTTGCGAGGAAACGAGTAGTCTCAAATGTCATATATCTACTTTTGTAAACGGAATAT 149
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert GTGATTTCGTTGAAACTCTGCTATAGTCAAATGCTCAATTCGTCATTGTGGCGGACTTT 149
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert GTAATTCGAGGCAACGCGCGGATAATGAAATGTGAAGTGCCAAAGTTTCGCTCAGATTTT 149
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert GTAATTCGAGGCAACGCGCGGATAATGAAATGTGAAGTGCCAAAGTTTCGCTCAGATTTT 149
Msex2.09537-RA_Exon4-6 GTTATCATGGGAAACAGCATCATATTAATAATGTCAGGTCACCATCTTTCGTCGCTGATTTT 240
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert GTTATCATGGGAAACAGCATCATATTAATAATGTCAGGTCACCATCTTTCGTCGCTGATTTT 149
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert GTTATCATGGGAAACAGCATCATATTAATAATGTCAGGTCACCATCTTTCGTCGCTGATTTT 149
** * ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert GTTAGTGTTCCTACTTGGATTATCTCCGAAGGAGAAACAGATGAGTTGGAATCAAGGCC 209
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert GTTAATGTAATTTTCATGGCTGGATGAATCTAACAACCTTATACATCTGAGGAATCTAAA 209
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert GTTTATGTTGAAATGTGGATGGACAGTGAAGGTGGCA-----CATACTACCTGGC 200
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert GTTTATGTTGAAATGTGGATGGACAGTGAAGGTGGCA-----CATACTACCTGGC 200
Msex2.09537-RA_Exon4-6 ATAGAAGTACTCTCATGGCACACCGACGAAAAAGAAG-----ACTTCTCCCTGGC 291
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert ATAGAAGTACTCTCATGGCACACCGACGAAAAAGAAG-----ACTTCTCCCTGGC 200
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert ATAGAAGTACTCTCATGGCACACCGACGAAAAAGAAG-----ACTTCTCCCTGGC 200
* ** * * *

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert GAC-----TTCATTGATTTGTTGTTATCTCAGTCTACAGTACATCTTTGGGAAGAG 263
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert GAAGGCGATGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCA----- 256
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert AATGGCGAGGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCA----- 247
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert AATGGCGAGGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCA----- 247
Msex2.09537-RA_Exon4-6 AATAACTATGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCAATCCGATGTC 351
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert AATAACTATGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCA----- 247
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert AATAACTATGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCA----- 247
* * * * *

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert AGCGTGTTCACGGGAAATGACGAGTCTCAAATGTCATATCTCTACTTTTGTAAACGGAA 323
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert ----- 256
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert ----- 247
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert ----- 247
Msex2.09537-RA_Exon4-6 GGAC-----CCGAGGACGGTTACAA--ATCATACCAATGTCGACTAAGCACA 397
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert ----- 247
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert ----- 247

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert TACGTTAGCGTCTCCTCTTGGATTATATCTGAAGGAGATAAAGATGAACCAGAAATCCAG 383
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert ----- 256
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert ----- 247
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert ----- 247
Msex2.09537-RA_Exon4-6 G--ACTCACTGGTGAAACTCGATTATCCGCTACTAAGGAAGGCT-----GG----- 442
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert ----- 247
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert ----- 247

ZNS_dscam5_Klon16_RC_insert GCAGATTCTAATGATCCGACGGCAAAATATTAGTCTTACCATCGGGAGAATTGCA 439
ZNS_dscam5_Klon12_RC_insert ----- 256
HZ_dscam5_Klon6_RC_insert ----- 247
HZ_dscam5_Klon7_RC_insert ----- 247
Msex2.09537-RA_Exon4-6 -----TCATTACGG----- 451
HZ_dscam5_Klon8_RC_insert ----- 247
ZNS_dscam5_Klon11_RC_insert ----- 247

```

Legende

Msex2.09537-RA_Exon4-6

Primer

Abbildung 9.4: Multi-Sequenz-Alignment der Nukleotidsequenzen von Transkript-Amplifikaten von *dscam* (i5k@NAL-Sequenz-ID: Msex2.09537-RA) mittels Clustal Omega.

Sequenz-Alignment der Nukleotidsequenzen von RT-PCR-Amplifikaten von *dscam* (Exon 4 – 6), amplifiziert mit total-RNA-Extrakt aus zirkulierenden Hämozyten (HZ) und dem zentralen Nervensystem (ZNS) unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven, mit der Nukleotidsequenz der Exone 4 – 6 der i5k-Transkriptsequenz Msex2.09537-RA (i5K Consortium 2013, Kanost et al. 2016).

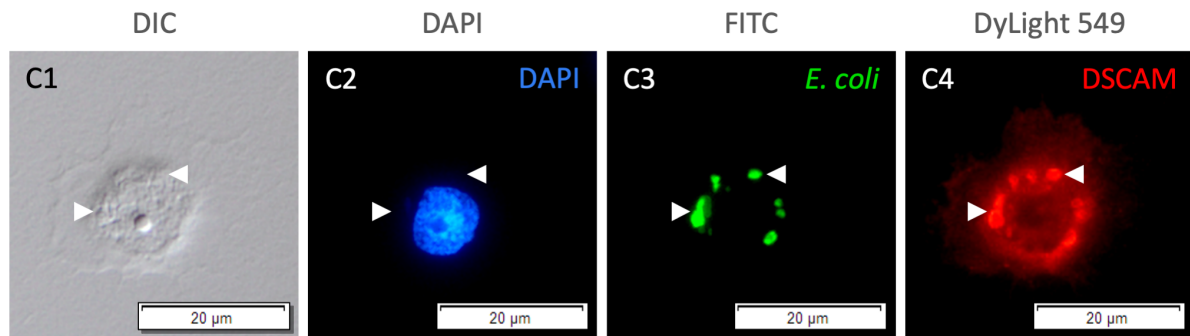


Abbildung 9.5: Intrazelluläre Kolokalisation von FITC- und DSCAM-Signal in zirkulierenden, phagozytisch aktiven Hämocyten detektierbar.

Lichtmikroskopische Analyse einer zirkulierenden, phagozytotisch aktiven Hämocyte einer bakteriell stimulierten *M. sexta* L5d2-Larve 10 h nach Injektion PFA-abgetöteter, FITC-markierter *E. coli* K12 D31-Y mittels **C1**: Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) und **C2 – C4**: Epifluoreszenzmikroskopie. **C2**: Hämocyten-Zellkern, markiert mit DAPI (blau). **C3**: Phagozytierte, FITC-markierte *E. coli* (grün). **C4**: Indirekte Immunmarkierung der larvalen Hämocyte mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*DmDSCAM* EC 19545) und DyLight 549-konjugiertem Sekundäntikörper (rot). Weiße Pfeilspitze: Kolokalisierte Fluoreszenzsignale phagozytierter, FITC-markierter *E. coli* und DSCAM. Der Messbalken entspricht 20 µm.

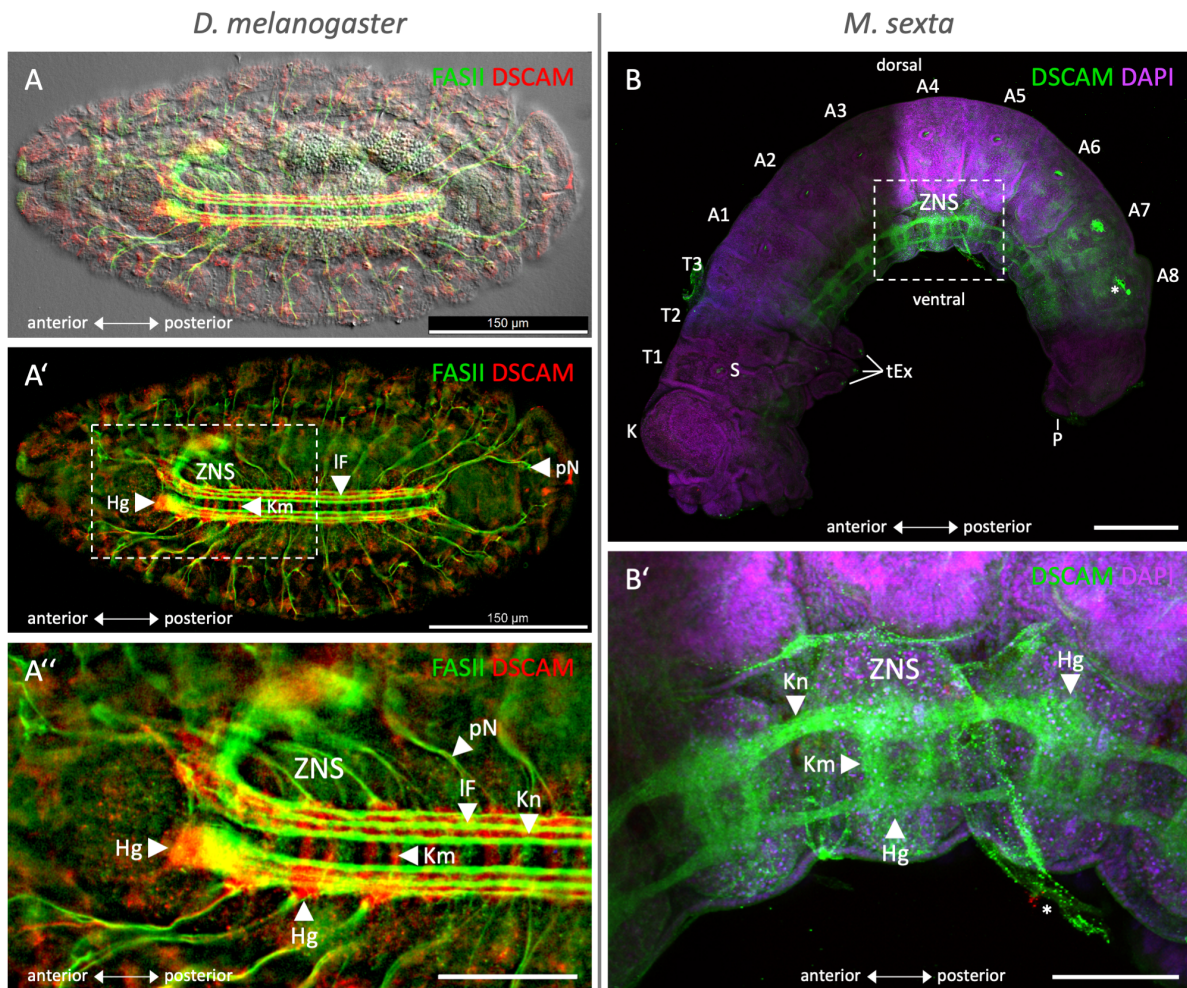


Abbildung 9.6: Hemiganglien, Kommissuren und Konnektive des embryonalen Zentralnervensystems von *D. melanogaster* und *M. sexta* sind α -DSCAM-positiv.

A – A'': Dorsalansicht eines *D. melanogaster* Embryos nach indirekter Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545, rot) und anti-Fasciclin II (grün). **A'':** Detailansicht des zentralen Nervensystems im Bereich der gestrichelten Box (A') in höherer Vergrößerung. **B & B':** Ventrolaterale Ansicht eines *M. sexta* Embryos nach indirekter Immunfluoreszenzmarkierung mit anti-*Dm*DSCAM EC 19545 (grün). Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (violett). **B':** Detailansicht des zentralen Nervensystems im Bereich der gestrichelten Box (B) in höherer Vergrößerung. Die mikroskopische Analyse erfolgte mittels Differenzial-Interferenzkontrastmikroskopie (A), Epifluoreszenzmikroskopie (A' & A'') und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (B & B').

Abkürzungen: ZNS, zentrales Nervensystem; Hg, Hemiganglion; Km, Kommissur; Kn, Konnektiv; IF, longitudinaler Faszikel; pN, peripherer Nerv; K, Kopf; T, Thoraxsegment; A, Abdominalsegment; S, Stigma; tEx, thorakale Extremität; P, Pygopodium; *, Artefakt. Messbalken entsprechen: A, A', 150 μ m; A'', 50 μ m; B, 300 μ m; B', 100 μ m.

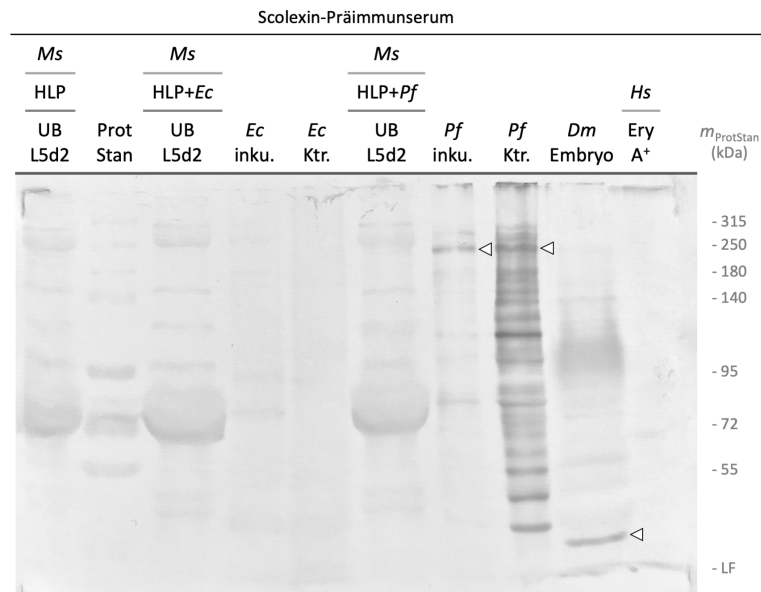


Abbildung 9.7: Inkubation mit Scolexin-Präimmunserum führt zu keiner Markierung anti-DSCAM-spezifischer Proteinmuster.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit Scolexin-Präimmunserum eines unabhängigen Spenderorganismus (Kaninchen) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Ausgewählte Scolexin-Präimmunserum-positive Proteine sind mit einer weißen Pfeilspitze markiert.

Abkürzungen: *Ms*, *Manduca sexta*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Ec*, *Escherichia coli* K12 D31-Y; *Pf*, *Plasmodium falciparum* NF54^{attB} Trophozoiten; HLP, zellfreies Hämolymp plasma; HLP+*Ec*/*Pf*, zellfreies Hämolymp plasma nach Inkubation mit *E. coli*/*P. falciparum*; *Ec*/*Pf* inku., in zellfreiem Hämolymp plasma inkubierte und gewaschene *E. coli*/*P. falciparum*; *Ec*/*Pf* Ktr., nicht in Hämolymp plasma inkubierte *E. coli*/*P. falciparum* (Kontrolle); Ery A⁺, Erythrozyten der Blutgruppe A Rhesus-positiv; UB, unbehandelt; L5d2, Larvenstadium fünf, Entwicklungstag zwei; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (*m*), angegeben in Kilodalton (kDa); LF, Lauffront.

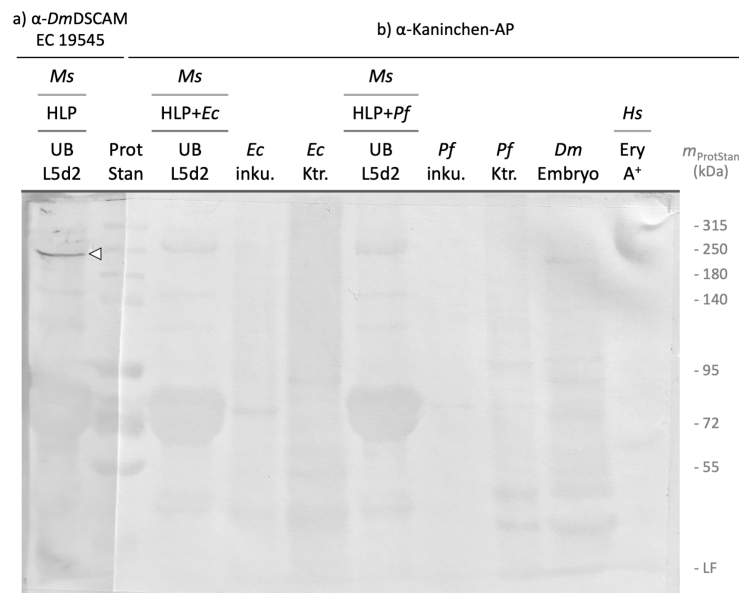


Abbildung 9.8: Inkubation mit alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper führt zu keiner Markierung anti-DSCAM-spezifischer Proteinmuster.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 1 mg lysiertem Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit a) anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (α -*DmDSCAM* EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper (α -Kaninchen-AP) sowie b) ausschließlich mit α -Kaninchen-AP inkubiert. Anti-DSCAM-positive Proteine sind mit einer weißen Pfeilspitze markiert.

Abkürzungen: *Ms*, *Manduca sexta*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Ec*, *Escherichia coli* K12 D31-Y; *Pf*, *Plasmodium falciparum* NF54^{attB} Trophozoiten; HLP, zellfreies Hämolymp plasma; HLP+*Ec*/*Pf*, zellfreies Hämolymp plasma nach Inkubation mit *E. coli*/*P. falciparum*; *Ec*/*Pf* inku., in zellfreiem Hämolymp plasma inkubierte und gewaschene *E. coli*/*P. falciparum*; *Ec*/*Pf* Ktr., nicht in Hämolymp plasma inkubierte *E. coli*/*P. falciparum* (Kontrolle); Ery A⁺, Erythrozyten der Blutgruppe A Rhesus-positiv; UB, unbehandelt; L5d2, Larvenstadium fünf, Entwicklungstag zwei; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (*m*), angegeben in Kilodalton (kDa); LF, Lauffront.

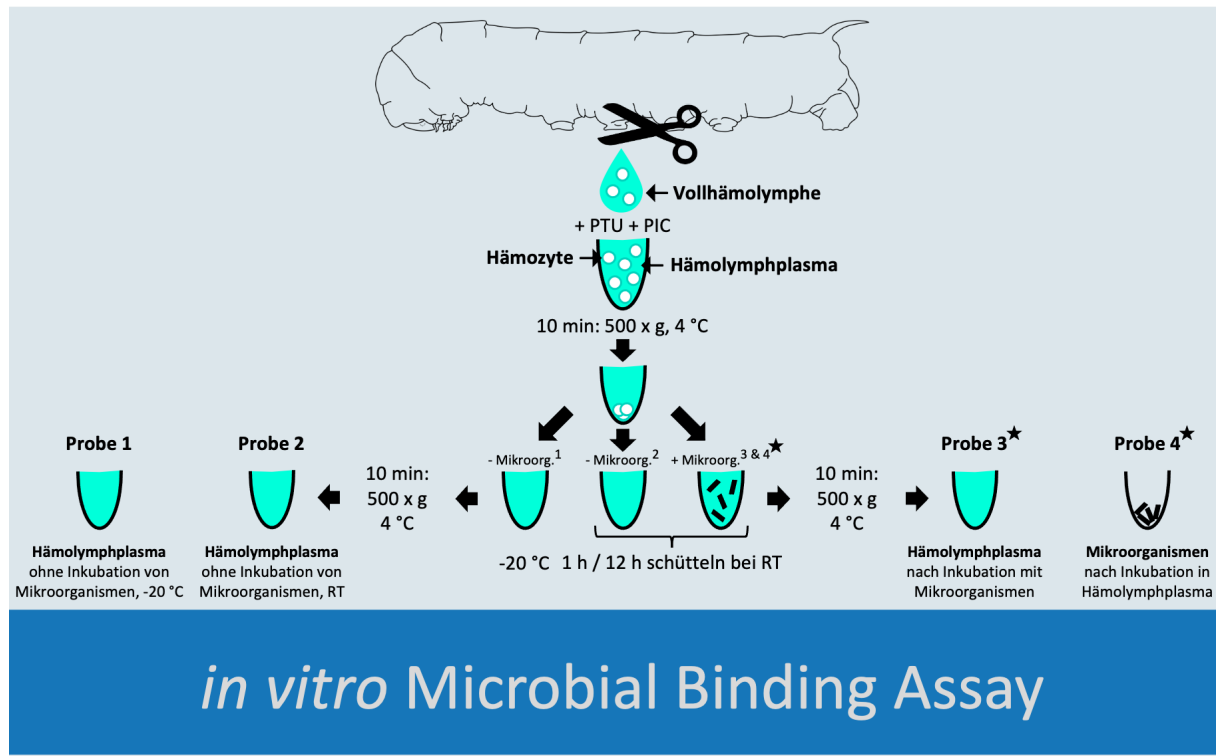


Abbildung 9.9: Durchführung des *in vitro* Microbial Binding Assay.

Abkürzungen: PTU, Phenylthioharnstoff; PIC, Proteaseinhibitor-Cocktail; Mikroorg., Mikroorganismus; RT, Raumtemperatur.

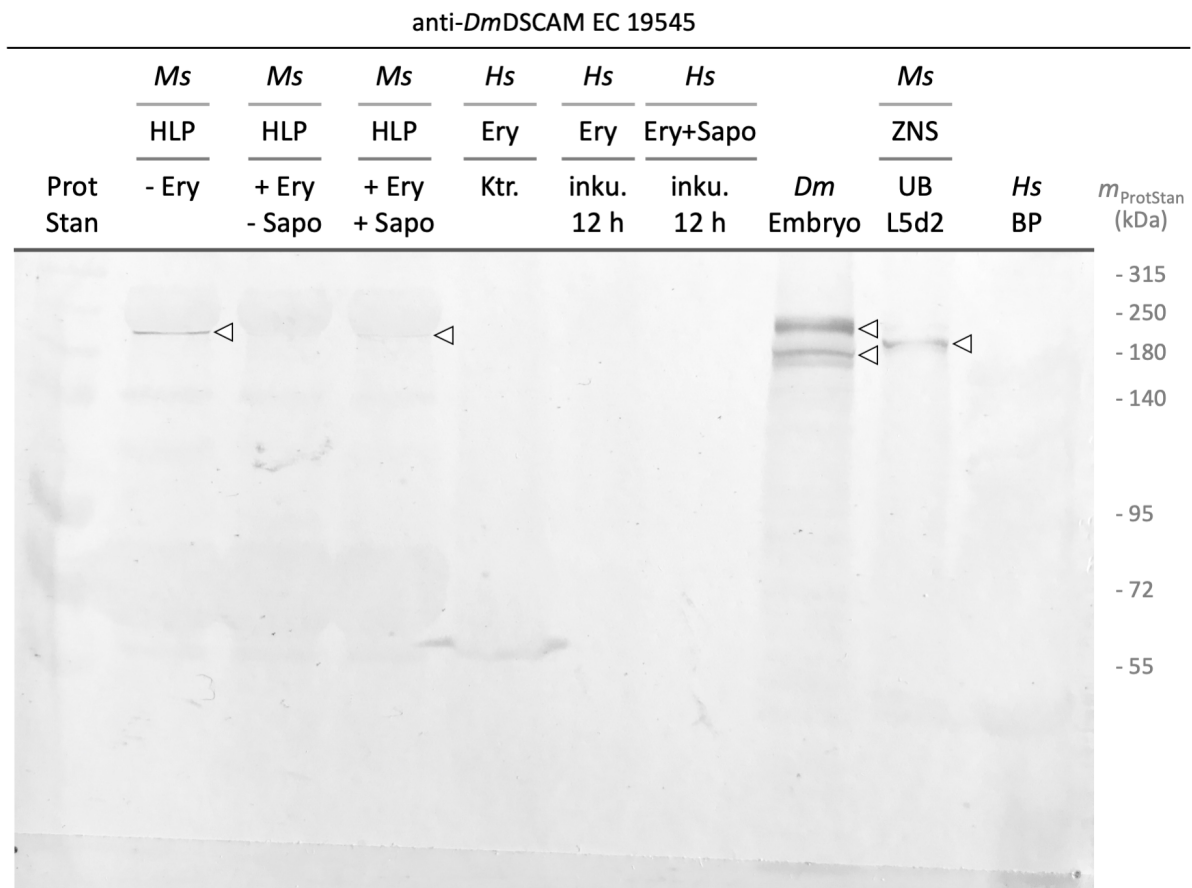


Abbildung 9.10: An/in humanen Erythrozyten/Erythrozytenbestandteilen sind nach *in vitro*-Inkubation in Hämolymp plasma von *M. sexta* keine α -DSCAM-positiven Proteine detektierbar.

Western Blot nach denaturierender, elektrophoretischer Trennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit einem 4 % Sammelgel und 7 % Trenngel. Zirkulierende humane Erythrozyten der Blutgruppe A Rh⁺ wurden unbehandelt und nach Saponin-Lyse für 12 h *in vitro* in zellfreiem Hämolymp plasma unbehandelter *M. sexta* L5d2-Larven inkubiert. Je Spur wurde ein Volumen Probenlysat entsprechend 3,33 mg Hämolymp plasma bzw. Gewebe verwendet. Zur Immundetektion wurden transferierte Proteine auf einer PVDF-Membran mit anti-*D. melanogaster*-DSCAM-Immunsereum (anti-*Dm*DSCAM EC 19545) und alkalische Phosphatase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Anti-DSCAM-positive Proteine sind mit einer weißen Pfeilspitze markiert.

Abkürzungen: *Ms*, *Manduca sexta*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Hs*, *Homo sapiens*; HLP, zellfreies Hämolymp plasma; Ery, Erythrozyten; Ery + Sapo, Saponin-lysierte Erythrozyten; - Ery, ohne Inkubation humaner Erythrozyten; + Ery - Sapo, nach *in vitro*-Inkubation humaner Erythrozyten; + Ery + Sapo, nach *in vitro*-Inkubation Saponin-lysiertes humaner Erythrozyten; Ktr., Kontrolle; inku. 12 h, 12 h inkubiert; ZNS, zentrales Nervensystem; UB, unbehandelt; L5d2, Larvenstadium fünf, Entwicklungstag zwei; BP, Blutplasma; ProtStan, Proteine mit standardisierter molekularer Masse (*m*), angegeben in Kilodalton (kDa).

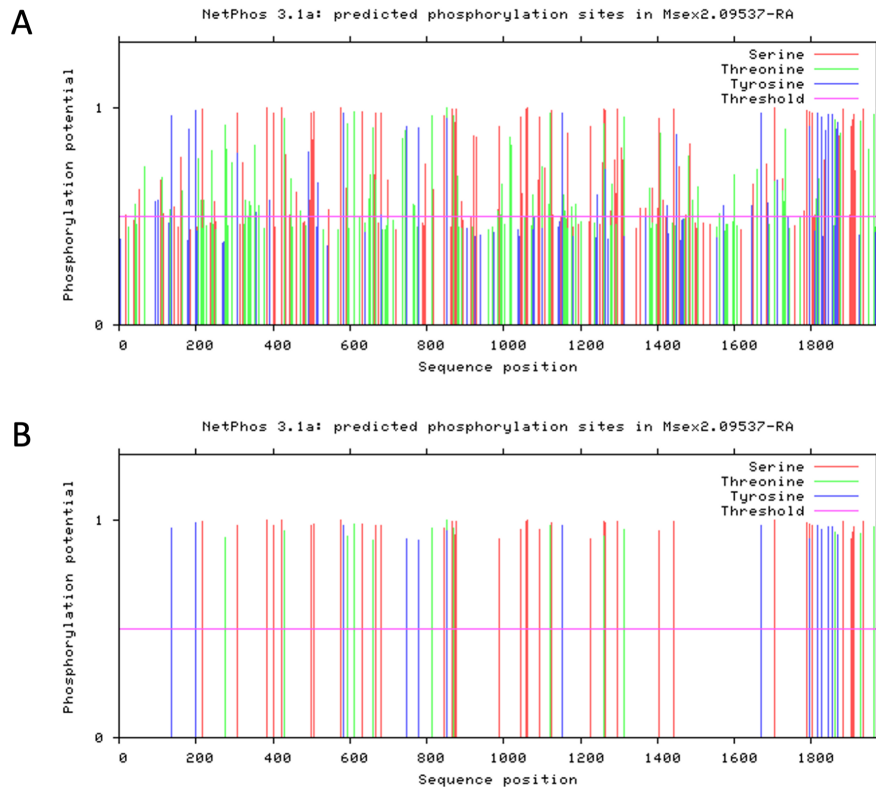


Abbildung 9.11: *In silico*-Prädiktion posttranslationaler Phosphoryl-Modifikationsstellen der Proteinsequenz Msex2.09537-RA.

Potenzielle posttranslationale Phosphorylierungen des Proteins mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RA in Form reversibel kovalent gebundener Phosphoryl-Modifikationen an Serin- (rote Balken), Threonin- (grüne Balken) und Tyrosin-Residuen (blaue Balken) wurden mittels der Web-Applikation NetPhos 3.1 (Blom et al. 1999, Blom et al. 2004) *in silico* für alle 1.970 Aminosäuren von *N*-terminal (Sequence position 1) bis *C*-terminal (Sequence position 1.970) ermittelt. *Y*-Werte (Phosphorylation potential) oberhalb des Threshold von 0.50 (pinke Linie) repräsentieren prognostizierte Phosphorylierungsstellen. A) Insgesamt sind 206 potenzielle Phosphoryl-Modifikationsstellen (Phosphorylation potential > 0.50) *in silico* prognostizierbar. B) Mit hoher Wahrscheinlichkeit (Phosphorylation potential > 0.90) sind 65 potenzielle Phosphorylierungsstellen *in silico* prognostizierbar.

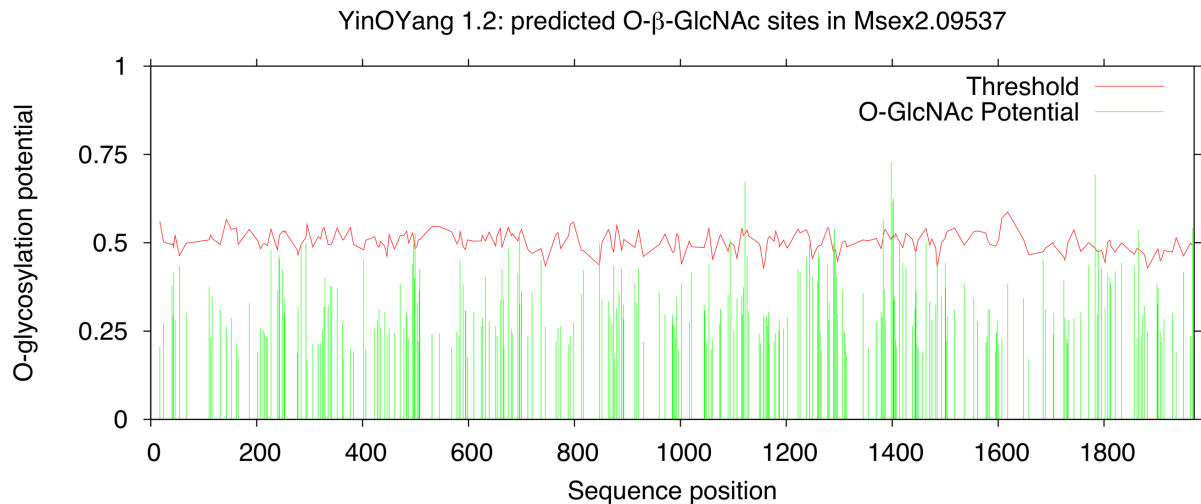


Abbildung 9.12: *In silico*-Prädiktion posttranslationaler *N*-Acetylglucosamin-Modifikationsstellen der Proteinsequenz Msex2.09537-RA.

Potenzielle posttranslationale Glykosylierungen des Proteins mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RA in Form β -glykosidisch gebundener *N*-Acetylglucosamin-Modifikationen (O-GlcNAc Potential, grüne Balken) wurden mittels der Web-Applikation YinOYang 1.2 (Gupta & Brunak 2002) *in silico* für alle 1.970 Aminosäuren von *N*-terminal (Sequence position 1) bis *C*-terminal (Sequence position 1.970) ermittelt. Werte (O-glycosylation potential) oberhalb des Threshold (rote Linie) gelten als statistisch signifikant und lassen eine positive Prognose zu. Mit hoher Wahrscheinlichkeit (O-GlcNAc Potential > Threshold – 2) sind *N*-Acetylglucosamin-Modifikationen der Aminosäuren an den Sequenzpositionen 1.122 (FN3), 1.398 (FN5) und 1.783 (intrazellulärer Bereich) *in silico* prognostizierbar. Abkürzungen: FN, Fibronectin-Typ-III-Domäne.

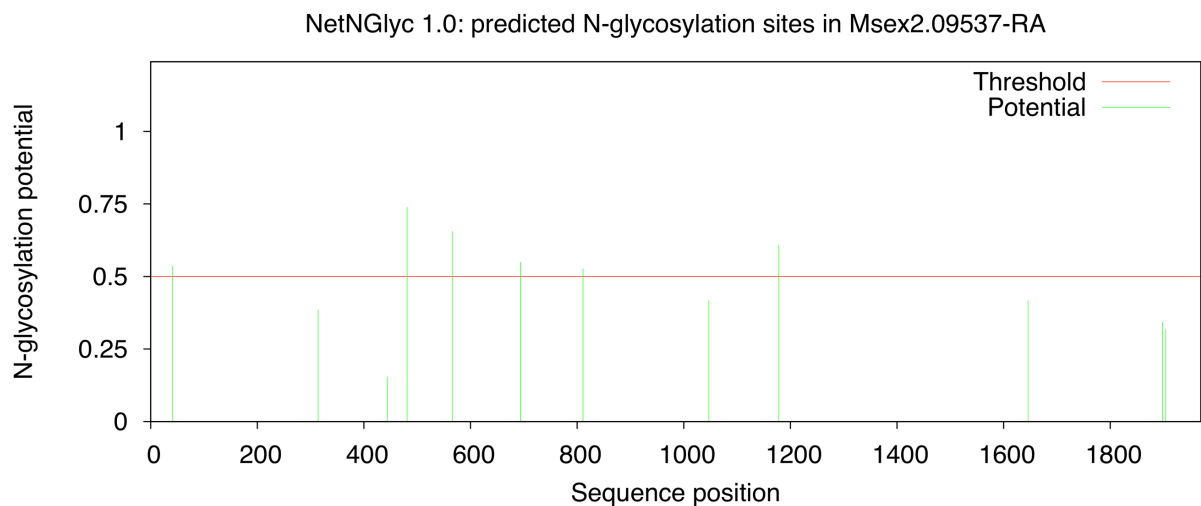


Abbildung 9.13: *In silico*-Prädiktion posttranslationaler *N*-Glykosyl-Modifikationsstellen der Proteinsequenz Msex2.09537-RA.

Potenzielle posttranslationale Glykosylierungen des Proteins mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RA in Form kovalent an Asparagin gebundener *N*-Glykosyl-Modifikationen (Potential, grüne Balken) wurden mittels der Web-Applikation NetNGlyc 1.0 (Gupta & Brunak 2002) *in silico* für alle 1.970 Aminosäuren von *N*-terminal (Sequence position 1) bis *C*-terminal (Sequence position 1.970) ermittelt. Y-Werte (N-glycosylation potential) oberhalb des Threshold von 0.5 (rote Linie) repräsentieren prognostizierte *N*-Glykosylierungen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit (Potential > 0.5 + Übereinstimmung bei 9/9 neuronalen Netzwerken oder Potential > 0.75) sind Glykosyl-Modifikationen der Asparagin-Residuen an den Sequenzpositionen 481 (Ig5) und 1.178 (FN3) *in silico* prognostizierbar. Weitere potenzielle *N*-Glykosylierungsstellen (Potential > 0.5) sind an den Sequenzpositionen 41 (Ig1), 566 (Ig6), 694 & 811 *in silico* prognostizierbar.

Abkürzungen: Ig, Immunglobulin-Domäne; FN, Fibronectin-Typ-III-Domäne.

GPS-SNO 1.0

File Tools Help

Predicted Sites

Position	Peptide	Score	Cutoff	Cluster
20	AIIGSAL C EDE T IGP	2,717	2,454	Cluster B
394	EDKGM Y Q C FIRND Q E	21,38	20,743	Cluster C
629	GETAS V Q C VVSK G D L	22,088	20,743	Cluster C
1371	EDAGE Y S C HVDN Q FG	22,555	20,743	Cluster C

Enter sequence(s) in FASTA format

```
>Msex2.09537-RA
MAYKGFALVALAIIGSALCEDETIQPIFMKEPPNRVDFSNITGATVECAARGSPAPDIWVRADGTA VGDVPLRQVQANGNLLFPFRAEDRYRQEVHAQVYAQLARN
SVGTHISKD VNVRAVAQQYD TDVNKEYVIMGN SIIK CQVPSFVAD FIEVLSWHTDEKEDFFPGNNYDGKYLVLPSGELHIRDVGPEDEGYKSYQCRTHRLTGETRLSA
TKGRLVITEPVGHVPPKVP SAQTITIGFQFSEHTSLAVLCPAQAFAPPLYRWYK FIDGTTTRKQPVTLDDRVKQVSGTLIIKEAKVEDSGKYLCVNNNSVGGESVETVLTAP
LKATVEPATQTVDFGRPAVFTCRYEGNPVKITITWLDGKDIKHHD TILRIESVKKEDKGM YQCFIRNDQESAGASAE LKGGRFEPQJRH SFGQETFRSGPSLR LKCVAS
GNPTPDITWLLDGEKLSNGDR LQIQQFVTADGNVESH LNISSVHTNDGGLYTCSASSKVG SASHSSRVNVYGLPYVRPMKKRPVAGDTLIVHCPVAGYPIESIWVERDG
RVLPINRKQKVFPNGTLVIENVERMSDEATYTCVAKNSQAFTSKGTLELQVMVPPQITPFEEGEEILNEGETASVQC VVSKGDLPTIYKWLFGN GEEIKQNTLGLITKISKKT
SILNIEAVSAIHRG SYTCEIKNAAGMTNH TTVLSVNVPPRWILEPTDKAFAQGS DAKVECKADGF PKQVTWKRAEGDTPGDYKDLKPNPNVKVEDGTLAITNIQKTN
EGYYLCEAVNGIGSGLSAVILISVQAPPQFEIKMRNQTARRSEPAVLQ CQAKGEKPIGIWNNMNNKRLPKSDPRYTIREILPGCVVSDLSIRRTERSDSALFTCVATNAFG
SDDT SINMIIQEVPEAPYGLKVL DKSGRTVQLSWAAPYDGN SPIKFLIEYKRAKGNWEKIDRVLVPGDATEAGVFLRPATAYHIRVAENELGTSEPSETVITITAEAEAP
TGPPQDVKID AIDKHLRVTWKPPPQDWN GELQGYVYGYKLASSNKSFVETVDISKESGKEHLDILNLKTYTQYAVVQAFNKMGS GPVSGEVRAYTAE GAPSAPP
QDVLCTTLTAQTIRVSWISPLAAANGLIKAYKVIYGPSETWYDEKTDKITASSETILHGLKKFTNYSMEVLATTNGGDGVRSAPIHCQTEQDVPEAPRAVKALVMGQ
DSILVSWRPPAQPNQVGVTHYVYTAQNSEPHPNKVPASQTSYSATELKAGRYDFWV TASTIIEGEGQPSATASCSPSDKVPKIASFDESFTA TYKEDVKLPCLAVGVPPP
NIWVKVKGQPLEASERVRLPEGLQJAGVAREDA GEYSCHVDNQFGTDTVHTLSVLAPFPFQ LTIASSVSSLTLRLKPSVEVDQSPAAGYTIHYKQEFGDWETVQIP
SSTDYTLNLF CGSRYQLYVTAYNGIGTGEASDVVIARTRGS KPPVPRATDFIEVGS SVTLHLKQWLDGCGPMSHFVENKKGA AEWNQISNAVKPGGNFVLDLEP
ATWYVLRITAHNNAGFNVAEYEFATLMTGGTIAPARDVGGNTLTTEQTLKILHLNLIVPVASILVIIIIVVVCVVRGARDHHKDDAVYNASQAALGGGGTLDKR
CGLRDELGYIAPPNRKLPVPGSNYNTCDRVKRQAVIMGAHSTWDP RRRHHYERVRRPRLRRTGSGDTISTGMEDEICPYATFHLLGFREEMDPSKALAFPHHHHPAHAG
TLAHPHHPHAPHSRAGSQSMPRANSRYARKNSQGGQSAIYSTAPEYDDPATCAEEDQYRARS RPYACGPEYDEPACCAPEDDQYT GAYGTPYSDHYGSRPSIGTR
KCGGSEPPPPPPRANNDNNCCSSSFNESKDSNEISEAEC DQPRNYPVRAHTAKDGLHSEMRKLIDRPEANTPIPQAVHGRGLTAYDTVAV
```

Threshold

High Medium Low All

Console

Abbildung 9.14: *In silico*-Prädiktion posttranslati onaler S-Nitrosyl-Modifikationsstellen in der Proteinsequenz Msex2.09537-RA.

Potenzielle posttranslationale S-Nitrosylierungen des Proteins mit der i5k-Sequenz-ID Msex2.09537-RA in Form kovalent an Cystein-Residuen gebundener Stickstoffmonoxid-Gruppen (S-Nitrosyl-Modifikation, SNO-Modifikation) wurden mittels GPS-SNO 1.0 (Xue et al. 2010) für alle 1.970 Aminosäuren *in silico* ermittelt. Bei auf Medium eingestelltem Threshold sind potenzielle S-Nitrosyl-Modifikationsstellen an Cystein-Residuen (C) in Sequenzposition 20 (SigP), 394 (Ig4), 629 (Ig7) und 1.371 (Ig10) *in silico* prognostizierbar. Abkürzungen: SigP, Signalpeptid; Ig, Immunglobulin-Domäne.

9.3 Tabellen

Tabelle 9.1: Zusammensetzung des Kunstfutters für *Manduca sexta*-Larven, modifiziert nach Yamamoto (1969).

Zutaten	Volumenanteil φ [%], Stoffmengen- konzentration c [mol/L]
Vollkornmehl (Roggenmehl : 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 mmol/L
Methylparaben	11,54 mmol/L
Sorbinsäure	15,66 mmol/L
Formaldehyd	5,33 mmol/L
Calciumcarbonat	5,28 mmol/L
Kochsalz	9,03 mmol/L
Nikotinsäure	97,47 μ mol/L
Riboflavin	15,94 μ mol/L
Folsäure	6,34 μ mol/L
Pyridoxin	16,55 μ mol/L
Thiaminhydrochlorid	9,31 μ mol/L
Biotin	9,28 μ mol/L