

**Untersuchungen zu den immunrelevanten
Hämolympmphproteinen Hämolin und Scolexin
des Amerikanischen Tabakschwärmers
Manduca sexta (L.)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie

Angefertigt am
Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Firat Gökçen

Erstgutachterin: Prof. Dr. T. Trenczek
Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Dorresteyn

Gießen 2010

In der Wissenschaft
beginnt alles Neue damit,
dass jemand brummt:
'Hmmm...ist ja komisch.'

Isaac Asimov

Abkürzungen

ALP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ammoniumsulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG-11-UTP	Digoxigenin-konjugiertes UTP
dsRNA	doppelsträngige RNA
EST	<i>expressed sequence tags</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
kb	Kilobasenpaare
L1	Larven des 1. Entwicklungsstadiums
L5d0	Larven des 5. Entwicklungsstadiums, Tag 1
LB-amp ⁺	Luria-Bertani-Ampicillin
MS ⁻ -Saline	<i>Manduca sexta</i> -Saline
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitro Tetrazolium Blue Chloride
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGRP	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PO	Phenoloxidase
PPO	Prophenoloxidase
PTU	Phenyl-Thio-Urea
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SG	Sammelgel
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Trenngel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
1.1 Scolexin.....	10
1.2 Hämolin.....	12
2 Material & Methoden.....	14
2.1 Zucht des Amerikanischen Tabakschwärmers <i>Manduca sexta</i>	14
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	15
2.2.1 Anzucht der Bakterien.....	15
2.2.2 Anzucht der Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	15
2.2.3 Herstellung von <i>E. coli</i> -Agarplatten.....	16
2.2.4 Hämolymphtest auf Immunaktivität.....	16
2.2.5 Abtöten der Pathogene.....	17
2.2.6 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Markierung von Bakterien.....	17
2.3 Tierexperimentelle Anwendungen.....	18
2.3.1 Injektion von Pathogenen bzw. Saline.....	18
2.3.2 Injektion und orale Verabreichung von dsRNA	19
2.3.3 Hämolymphentnahme	19
2.3.4 Hämozytengewinnung.....	20
2.3.5 Präparation der Larven („Einkapselungsversuch“).....	20
2.4 Immunhistochemische Methoden.....	21
2.4.1 Herstellung von Hämozyten-Monolayern.....	21
2.4.2 Verwendung der Hämozyten-Monolayer für immunhistochemische Nachweise.....	22
2.4.3 Herstellung von Hämozyten-Monolayern/Coagulationsfäden.....	22
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	23
2.5.1 Aufreinigung des Hämolymphproteins Scolexin.....	23
2.5.1.1 Proteinnachweis nach BRADFORD (1976).....	23
2.5.1.2 Fraktionierung durch Ammoniumsulfat.....	24
2.5.1.3 Entfernen des Ammoniumsulfat aus den gefällten Proteinfractionen.....	24
2.5.1.4 Auftrennung der Proben durch Sephacryl-Gelfiltration.....	25
2.5.1.5 Volumenminderung der Scolexinprobe durch Größenausschluss- zentrifugation.....	26
2.5.1.6 Identifizierung der mutmaßlichen Scolexinbande.....	26
2.5.1.7 Isolierung des Scolexin und Aufbereitung als Antigen zur Antikörperherstellung.....	27
2.5.2 Proteinauftrennung und -nachweis durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (verändert nach LÄMMLI 1970).....	27
2.5.2.1 Herstellung der diskontinuierlichen Gradienten-Gele.....	28
2.5.2.2 Herstellung der kontinuierlichen Gradienten-Gele.....	28
2.5.2.3 Probenaufbereitung für die elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel.....	29
2.5.2.4 Konditionen für die elektrophoretische Auftrennung.....	29
2.5.2.5 Coomassie-Färbung.....	29
2.5.2.6 Silberfärbung.....	30

2.5.3 Proteintransfer und -nachweis (Western Blotting) (verändert nach TOWBIN et al. 1979).....	31
2.5.3.1 Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran.....	31
2.5.3.2 Proteinnachweis durch Antikörper	33
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.6.1 Anwendungen zur Expressionsanalyse.....	33
2.6.1.1 RNA-Extraktion (TRI®-Reagenz).....	33
2.6.1.2 RNA-Extraktion aus Hämocyten (<i>High Pure RNA Isolation</i> nach Roche®).....	35
2.6.1.3 DNase I-Behandlung.....	35
2.6.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Proben.....	35
2.6.1.5 cDNA-Synthese.....	36
2.6.1.6 Amplifikation der Zielsequenz.....	36
2.6.1.7 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	37
2.6.2 5'- <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> (RACE) der unvollständigen Scolexin A-Nukleotidsequenz.....	37
2.6.3 Herstellung und Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi)-Reagenzien.....	38
2.6.3.1 Klonierung der Zielsequenz.....	38
2.6.3.2 Plasmidextraktion.....	40
2.6.3.3 Reverse Transkription der Zielsequenz.....	40
2.6.3.4 Herstellung der doppelsträngigen RNA (dsRNA).....	41
2.6.3.5 Anwendung der doppelsträngigen RNA-Reagenzien.....	41
2.6.4 <i>In situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	41
2.6.4.1 Sondensynthese.....	42
2.6.4.2 Hybridisierung der Sonde.....	43
2.6.4.3 Detektion der Sonde.....	44
2.6.5 Verwendete Primer.....	44
2.8 Verwendete Geräte.....	45
2.7 Verwendete Software.....	46
3 Ergebnisse.....	47
3.1 Hämolin.....	47
3.1.1 Expression von Hämolin, Immulectin-2 und PGRP.....	47
3.1.2 Knockdown der Hämolin-Expression durch RNAi.....	48
3.1.3 Effekt des Hämolin-Knockdowns auf die Fähigkeit infizierter Tiere zur Nodulibildung.....	49
3.2 Scolexin.....	50
3.2.1 Aufreinigung des nativen Scolexins aus der Hämolymphe von <i>M. sexta</i>	50
3.2.1.1 Ammoniumsulfatfällung der Hämolympheproteine.....	50
3.2.1.2 Größenaufschluschromatographie der Scolexin-Fraktion durch Sephacryl-200.....	52
3.2.1.3 N-terminale Sequenzierung der mutmaßlichen Scolexin-Bande.....	53
3.2.2 Immunhistochemischer Scolexin-Nachweis mithilfe des Scolexin- Antikörpers.....	56
3.2.2.1 Scolexin-Nachweis an Hämocyten-Monolayern.....	56
3.2.2.2 Scolexin-Nachweis an Coagulationsfasern.....	57

3.2.2.3 Scolexin-Nachweis an einem Gewebeschnitt.....	57
3.2.3 5'-RACE der Scolexin A-Sequenz.....	58
3.2.4 Expressionsanalysen des Scolexin.....	60
3.2.4.1 Expression der Scolexin-Isoformen in Hämozyten von L5d0-Larven nach Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen.....	60
3.2.4.2 Nachweis der Scolexin-A-mRNA in Hämozyten durch <i>in situ</i> - Hybridisierung.....	61
3.2.4.3 Expression der Scolexin-Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von <i>M. sexta</i>	62
3.2.5 Knockdown der Scolexin-A-Expression durch RNAi.....	63
3.2.5.1 Einfluss des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Expression anderer immuninduzierbarer Gene.....	64
3.2.5.2 Orale Verabreichung von dsScoA an L5d0-Versuchstieren.....	64
3.2.5.3 Infektion der L5d0-Versuchstiere mit FITC-markierten <i>E. coli</i>	65
3.2.5.4 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Clearence.....	67
3.2.5.5 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Einkapselungsfähigkeit der Hämozyten.....	68
4 Diskussion.....	71
4.1 Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi) in dieser Arbeit.....	71
4.2 Hämolin.....	72
4.2.1 Expression und Knockdown des Hämolin.....	72
4.2.2 Effekt des Hämolin-Knockdowns auf die Fähigkeit infizierter Tiere zur Nodulibildung.....	73
4.3 Scolexin.....	76
4.3.1 Aufreinigung des nativen Scolexins aus der Hämolymphe von <i>M. sexta</i>	76
4.3.2 Immunhistochemischer Scolexin-Nachweis mithilfe des Scolexin- Antikörpers.....	80
4.3.2.1 Scolexin-Nachweis an Hämozyten-Monolayern.....	80
4.3.2.2 Scolexin-Nachweis an Coagulationsfasern.....	81
4.3.2.3 Scolexin-Nachweis an einem Gewebeschnitt.....	82
4.3.3 5'-RACE der Scolexin-A-Sequenz.....	83
4.3.4 Expressionsanalyse des Scolexin.....	85
4.3.4.1 Expression der Scolexin-Isoformen in Hämozyten von L5d0-Larven nach Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen.....	85
4.3.4.2 Nachweis der Scolexin-A-mRNA in Hämozyten durch <i>in situ</i> - Hybridisierung.....	87
4.3.4.3 Expression der Scolexin-Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von <i>M. sexta</i>	87
4.3.5 Knockdown der Scolexin-A-Expression durch RNAi.....	89
4.3.5.1 Einfluss des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Expression anderer immuninduzierbarer Gene.....	90
4.3.5.2 Orale Verabreichung von dsScoA an L5d0-Versuchstieren.....	91
4.3.5.3 Infektion der L5d0-Versuchstiere mit FITC-markierten <i>E. coli</i>	91
4.3.5.4 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die	

Clearence.....	93
4.3.5.5 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Nodulibildung der Hämozyten.....	94
4.4 Abschließende Betrachtungen.....	94
5 Zusammenfassung.....	96
6 Literaturangaben.....	98
7 Abbildungsverzeichnis.....	107
Danksagung.....	110

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel neue Erkenntnisse über sehr frühe Ereignisse während einer Immunantwort in der Hämolymphe des Amerikanischen Tabakschwärmers *Manduca sexta* (L.) infolge einer Infektion zu gewinnen. Zu den ersten wichtigen Schritten zählen die Coagulation der Hämolymphe, das Markieren von Pathogenstrukturen, und die Aktivierung von Chemotaxis und Adhäsion immunkompetenter Zellen. Diese Zellen, bei Insekten Hämocyten genannt, können zum Wundverschluss beitragen oder pathogene Eindringlinge aus dem Hämocöl durch Phagozytose oder Einkapselung entfernen und somit unschädlich machen. Vermittelt werden solche Aktivitäten durch Proteine mit sehr unterschiedlichen Aufgaben: antimikrobielle Effektoren, wie z.B. Lysozym oder die Attacine wirken unmittelbar auf die Pathogene. Andere Proteine dienen als membrangebundene oder „freie“ Rezeptoren zur Erkennung und Bindung von Fremdstrukturen, wie z.B. das *peptidoglycan recognition protein* PGRP (YOSHIDA et al. 1986) oder der Toll-Rezeptor (Ao et al. 2008).

Eine große Rolle in der Immunreaktion bei Insekten generell spielt die Melanisierung. Dabei wird aus Tyrosin über mehrere Schritte Hydrochinon gebildet, aus dem schließlich das Melanin entsteht. Diese Reaktion wird maßgeblich durch die Phenoloxidase (PO) katalysiert, welche ihrerseits zuvor über eine Enzymkaskade, die aus einer Reihe von Serinproteasen besteht, infolge einer Fremderkennung aktiviert werden muss (KANOST et al. 2004). Sie wird als inaktive Prophenoloxidase (PPO) von den Oenocyten, ein Hämocytentyp, in die Hämolymphe ausgeschüttet (ASHIDA & BREY 1995). Dieses Beispiel von Interaktion zwischen zellulärer und humoraler Aktivität innerhalb derselben Immunantwort ist keine Besonderheit, sondern eher die Regel. Obwohl vornehmlich die Fettkörperzellen als Syntheseort für immunrelevante Proteine bekannt sind, kann man mithilfe molekularbiologischer Techniken nachweisen, dass auch in Hämocyten eine Vielzahl von immunrelevanten Hämolympheproteinen exprimiert und bei Bedarf sezerniert wird (ZOU et al. 2009). Darüber hinaus scheinen Hämocyten aktiv an der Coagulation der Hämolymphe beteiligt zu sein (DUSHAY 2009, JIRAVANICHPAISAL

et al. 2006). *In vitro*-Versuche mit der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* belegen sogar, dass in Abwesenheit von Hämocyten die Coagulation vollständig blockiert sein kann (BREHELIN 1979).

Diese beschriebenen Interaktionen geben jedoch nur einen Teil der Funktionen von Hämocyten wieder. Den größten Beitrag zur Immunabwehr leisten die beiden Hauptvertreter der Hämocyten, die Plasmatozyten und die Granulären Zellen, durch ihre Fähigkeit Fremdpartikel oder Mikroorganismen in der Hämolymphe zu phagozytieren oder größere Eindringlinge einzukapseln.

Die Einkapselung setzt voraus, dass sich das Adhäsionsverhalten der, in diesem Fall, Plasmatozyten verändert, woran maßgeblich die Expression von Hämocyten-spezifischem Integrin und Neuroglian beteiligt ist (LEVIN et al. 2005, NARDI et al. 2006). Induziert wird dieses Verhalten durch Erkennung von Fremdstrukturen mittels sogenannter Mustererkennungsproteine (*pattern recognition proteins*), wie z.B. Immulectin-2 (YU & KANOST 2004). Die eigentliche Formation einer Einkapselung besteht aus Schichten von Plasmatozyten und Granulären Zellen. Einhergehend mit der Einkapselungsreaktion ist meist auch eine lokale Melanisierung, sodass die eingekapselten Fremdkörper fast immer als melanierte Noduli (Einkapselungsknötchen) vorliegen (LING & YU 2005).

Zu den bisher bekannten Hämolympheproteinen, die sowohl die humorale als auch die zelluläre Abwehr beeinflussen, zählen Scolexin und Hämolin, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen. Ihre Bedeutung innerhalb einer Immunantwort kann man daran ablesen, dass ihre Genexpression infolge einer Infektion hochreguliert wird (HOFFMANN et al. 1981). In der Literatur werden ihre Funktionen sehr vielfältig angegeben und reichen vom Verklumpen von Pathogenen bis zur antiviralen Wirkung. Während jedoch über die eigentliche Funktion des Scolexin immer noch keine stringenten Daten vorliegen, wird über Hämolin das Bild eines „Allrounders“ gezeichnet, das in fast allen Abwehrreaktionen in irgendeiner Weise involviert ist, und somit gerade deswegen die Frage aufwirft, ob bis heute die biologische Funktion des Hämolin überhaupt richtig erkannt worden ist. Aus diesem Grund wurden diese beiden unterschiedlichen Proteine ausgewählt und mit neuen, modernen Methoden analysiert. Dabei wurden unterschiedliche

Techniken zur Untersuchung aus den Bereichen Immunhistochemie, Proteinbiochemie und Molekularbiologie eingesetzt. Insbesondere die gezielte Manipulation der Expression der Proteine *in vivo* mithilfe der nicht-transgenen RNA-Interferenz (RNAi) ist eine interessante Möglichkeit zur Untersuchung innerhalb des natürlichen und intakten Systems.

Darüber hinaus sollen die dadurch erlangten Erkenntnisse einer eventuellen Neubewertung der bisherigen Datenlage über die beiden Proteine Scolexin und Hämolin dienen.

Um die Datenlage zu verdeutlichen, empfiehlt sich eine kurze Rekapitulation dessen, was bisher über beide Proteine bekannt ist.

1.1 Scolexin

Die Untersuchungen über induzierbare, immunrelevante Hämolympheproteine begannen bereits in den siebziger Jahren zunächst an Puppen des Riesenseidenspinners *Hyalophora cecropia* und des Götterbaumspinners *Samia cynthia* (BOMAN et al. 1974, FAYE et al. 1975). Die erste umfangreiche Darstellung der Hämolympheproteine von Puppen und Larven von *Manduca sexta* nach elektrophoretischer Auftrennung wurde von HUGHES et al. (1983) veröffentlicht. In dieser Arbeit wird erstmals das Protein M13 beschrieben, welches später den Namen Scolexin bekommen sollte (SPENCE et al. 1992). M13 wurde sowohl in *Enterobacter cloacae*-infizierten Larven als auch in infizierten Puppen nachgewiesen, und zwar als 36 kDa Glykoprotein, welches nativ als Dimer ohne Disulfidbindungen vorliegt. RUPP & SPENCE (1985) beschreiben, dass ebenfalls durch die orale Verabreichung von *Bacillus thuringiensis* HD-1 Endotoxin M13 in der *M. sexta*-Hämolymphe nachweisbar ist, und sie weisen das Mitteldarmepithel als Syntheseort aus. Im selben Jahr zeigten Hurlbert et al. (1985) mittels 2D-Elektrophorese, dass M13 in 3 Isoformen mit unterschiedlichen Ladungseigenschaften vorliegen kann: M13 A (pI 5,0) und M13 C (pI 7,1), deren Synthese in Larven nach einer Infektion induziert wird; außerdem einer konstitutiv in Larven- und Puppenhämolymphe synthetisierten M13 B-Isoform (pI 7,0), die jedoch bei einer herkömmlichen, elektrophoretischen Auftrennung nicht erscheint (einer der oben genannten

Widersprüchlichkeiten in der Literatur). Zudem beschreiben sie als Erste, dass Scolexin nicht antimikrobiell aktiv ist.

Den ersten Hinweis auf die Funktion des Scolexin in der Hämolymphe geben MINNICK et al. (1986), indem sie erklären, dass aufgereinigtes M13 die Coagulation von Hämozyten *in vitro* bewirkt, sowie eine agglutinierende Wirkung auf Schafserythrozyten hat. Die Behandlung mit Trypsin und das Erhitzen des isolierten Scolexin verhindert die Coagulation, beeinträchtigt jedoch nicht die erwähnte Hämagglutinationsfähigkeit, wohingegen die Zugabe von Glukose beide Wirkungen inhibiert. Diese Arbeitsgruppe hatte zum ersten Mal Antikörper gegen M13 hergestellt und im Western Blot-Verfahren eingesetzt. Später untersuchte sie, in welchen Geweben sich das Protein nach einer Infektion nachweisen ließ (MINNICK & SPENCE 1988). Im Gegensatz zu naiven Larven konnten sie Scolexin in der Epidermis und im Mitteldarm infizierter Larven nach einer Aceton-Extraktion nachweisen. Interessanterweise wird postuliert, dass weder im Fettkörper noch in den Hämozyten von naiven und infizierten Tieren Scolexin nachweisbar gewesen sei. Darauf wird im Laufe der Arbeit noch detaillierter eingegangen. BEDOYAN et al. (1992) zeigen, dass durch exzessive Verfütterung von Glukose (10 mal mehr als im herkömmlichen Kunstfutter), und dem dadurch bedingten Anstieg des Glukosespiegels in der Hämolymphe der *M. sexta*-Larven, es offensichtlich zu einer stärkeren Glykosilierung des Scolexin kommt. Diese Aussage basiert auf einem Western Blot, der mit einem entsprechenden Scolexin-spezifischem Antikörper durchgeführt worden ist, und eine positive Bande bei ca. 40 kDa aufweist. In einer späteren Arbeit stellte sich heraus, dass die Scolexin-Expression in der Epidermis, ebenso wie der Scolexingehalt in der Hämolymphe, während der Wanderphase der *M. sexta*-Larven, das bedeutet kurz vor der Verpuppung, abnimmt. Von Bedeutung ist hierbei, dass es sich nicht um einen direkten Expressionsnachweis via PCR handelt, wie man heutzutage vermuten würde, sondern auf einer *in vitro*-Translation epidermaler mRNA nach einer Infektion basiert (SPENCE 1992). Erste *in vivo*-Studien nach radioaktiver Markierung von Scolexin belegen, dass Scolexin nach einer bakteriellen Infektion der Versuchstiere vornehmlich an Hämozyten in Noduli assoziiert vorkommt (KYRIAKIDES 1993). Eine erste Sequenzanalyse wurde von KYRIAKIDES et al. (1995) durchgeführt, wobei

Scolexin aus der Hämolymphe nativ aufgereinigt und N-terminal ansequenziert wurde. Beide Untereinheiten wiesen dabei die identische AS-Sequenz auf. Es wird beschrieben, dass ein Western Blot nativ aufgetrennten Scolexins mit anschließender Immunodetektion zwei Isoformen zeigt, hier benannt als Scolexin-1 und Scolexin-2, die sich nur in ihrer Glykosilierungskomposition unterscheiden. FINNERTY & GRANADOS erweiterten 1997 die Reihe der Scolexin-induzierenden Provokatoren um Granuloseviren von *Erynnis ello*, die sie ebenfalls oral verabreichten, sowie *Saccharomyces cerevisiae* und Lipopolysaccharid (LPS), welche sie in ihren Versuchsreihen den *M. sexta*-Larven injizierten. Zwei Jahre später veröffentlichten sie schließlich 2 unvollständige cDNA-Sequenzen für Scolexin (A und B) aus einer epidermalen *M. sexta*-cDNA-Expressionsbibliothek (FINNERTY et al. 1999), die als Basis für alle molekularbiologischen Experimente dieser vorliegenden Arbeit dient. Beide Untereinheiten werden dort identifiziert als Serinproteasen der Chymotrypsinfamilie mit ausgewiesenen Glykosilierungsstellen. Entgegen den Erwartungen anhand früherer, funktionaler Versuche konnte keine Lektindomäne nachgewiesen werden. Somit bleibt die Hämagglutinationswirkung im Wesentlichen unerklärt. Die letzte funktionale Analyse des Scolexin beschreibt den immunhistochemischen Nachweis von Scolexin in der Epidermis und ihren Derivaten, in Mitteldarmzellen, sowie erstmals in Hämozyten wandernder Larven von *M. sexta* (MOLNAR et al. 2001).

Schließlich wurden 2006 bzw. 2009 jeweils homologe Sequenzen von *Bombyx mori* (NIU et al. 2006) und *Heliothis virescens* (SHELBY & POPHAM 2009) aus *expressed sequence tag* (EST)-Datenbanken veröffentlicht.

1.2 Hämolin

Das Hämolympheprotein Hämolin wurde erstmals als Protein P4 beschrieben und aus infizierten Puppen von *Hyalophora cecropia* isoliert (FAYE et al. 1975, RASMUSON & BOMAN 1979). Später wurde Hämolin auch in der Hämolymphe anderer Lepidopteren nachgewiesen, wie z.B. in *Manduca sexta* und *Lymantria dispar* (LADENDORFF et al. 1990, LEE et al. 2002). Nach heutigem Wissensstand beschränkt sich das Vorkommen ausschließlich auf Vertreter dieser Ordnung.

Erste Untersuchungen des aus *M. sexta* isolierten Hämolin weisen es als ein 47 kDa Molekül aus der Familie der Immunglobuline aus (FAYE & KANOST 1998, YU & KANOST 1999).

In *M. sexta* wird die Expression von Hämolin sowohl hormonell reguliert (YU & KANOST 1999), als auch infolge mikrobieller Infektion induziert (LADENDORFF et al. 1990, WANG et al. 1995). In aktuellen Studien wird eine Rolle von Hämolin in der antivirale Immunantwort diskutiert (TERENIUS 2007, TERENIUS et al. 2009), auf die jedoch hier nicht weiter eingegangen wird.

Hämolin gehört zu den ersten Hämolymphproteinen, bei denen die Eigenschaft entdeckt wurde, an Oberflächenstrukturen von Bakterien zu binden (SUN et al. 1990). Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich dabei um Lipoteichonsäure- sowie zwei LPS-Bindestellen handelt: eine für eine Komponente im O-Antigen und eine für Phosphatgruppen des Lipid A. In vitro-Versuche zeigten, dass Hämolin zur Agglutination von Bakterien führt (YU & KANOST 2002). Eine antimikrobielle Wirkung des Hämolins hingegen war bis jetzt nicht nachweisbar.

Neben diesen Eigenschaften wurde aber zudem gezeigt, dass Hämolin ebenfalls an Hämozyten bindet. In diesem Fall verhindert es jedoch eine Aggregation der Hämozyten (LADENDORFF & KANOST 1991). Aufgrund seiner Bindungseigenschaft an Bakterien und Hämozyten wird eine opsonierende Funktion angenommen (KANOST & ZHAO 1996).

2 Material & Methoden

Für die verschiedenen Experimente dieser Arbeit wurden, sofern nicht ausdrücklich Abweichendes erwähnt, Larven von *Manduca sexta* des fünften Entwicklungsstadiums am Tag ihrer Häutung verwendet (L5d0).

2.1 Zucht des Amerikanischen Tabakschwärmers *Manduca sexta*

Die Larven von *M. sexta* wurden auf künstlichem Futter in Anlehnung an YAMAMOTO (1969) aufgezogen. Die Zuchtbedingungen lagen bei ca. 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %, sowie einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h zu 8 h. Nach Beendigung der Fressphase im fünften (letzten) Larvenstadium und dem Einleiten der Wanderphase, welches durch das Sichtbarwerden des Dorsalgefäßes erkennbar ist, wurde das Futter entfernt. Die anschließende Verpuppung fand im Dauerdunkeln statt. Der Schlupf der Schwärmer erfolgte ca. 20 Tage später in einem Käfig mit einer Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) für die Eiablage und einem Gefäß mit gesättigter Zuckerlösung als Nektarersatz. Die Eier wurden in regelmäßigen Abständen von der Pflanze abgesammelt und mit etwas Kunstfutter der Laborzucht zugeführt. Nach ca. vier Tagen schlüpften die jungen L1-Raupen.

In regelmäßigen Abständen wurden stichprobenhaft Larven aus der Zucht auf Immunaktivität getestet (s. Abschnitt 2.2.4), um auf eventuelle Infektionen innerhalb der Zucht aufmerksam zu werden. Bei einer hohen Infektionsrate ($> 1/3$ der getesteten Larven) wurden Maßnahmen zur Verhinderung der Ausbreitung der Infektion getroffen: die eingesammelten Eier wurden kurzzeitig in 70 %igem Ethanol zur Desinfektion gespült, die verwendeten Zuchtschalen wurden durch neue ersetzt bzw. mit 70 %igem Ethanol gereinigt, das Futter wurde häufiger durch frisches ersetzt und die größeren Larven in den Zuchtschalen wurden samt Futter auf erhöhte Gitter gesetzt, um nicht mit den herabgefallenen Kotkugeln in Kontakt zu kommen. In aller Regel hielten diese Maßnahmen die Infektionsrate in der Zucht gering. Dennoch waren individuelle Infektionen bei Versuchstieren vor Versuchsbeginn nicht auszuschließen, sodass vor allem bei unbehandelten

Kontrolltieren oder bei Versuchstieren, die zu Versuchsbeginn nicht immunaktiv sein durften, immer ein Aktivitätstest durchgeführt worden ist.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Anzucht der Bakterien

Luria-Bertani-(LB-)Medium

3,5 g LB-Pulver (Roth®)
ad 100 ml Milli-Q-H₂O
(autoklavieren)

Standard-1-Medium

2,5 g Standard-1-Nährbouillon (Roth®)
ad 100 ml Milli-Q-H₂O
(autoklavieren)

TBS

20 mM Tris
0,5 M NaCl
pH 7,5

Ein Abstrich einer Kolonie aus der jeweiligen Masterplatte eines Bakterienstammes wurde in je 5 ml LB-Medium bzw. alternativ in Standard-1-Medium suspendiert und über Nacht beim jeweiligen Temperaturoptimum unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden aus den Über-Nacht-Kulturen je 100 µl Suspension in jeweils 5 ml frisches Medium überführt und erneut über Nacht unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die so gewachsenen Bakterien wurden bei 3000 x g 5 min bei 4 °C zentrifugiert und einmal in TBS resuspendiert („Waschen“). Nach erneuter Pelletierung standen sie für die weitere Verwendung zur Verfügung.

2.2.2 Anzucht der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Hefemedium

100 mg Hefeextrakt
200 mg Glukose
50 mg Peptone
ad 100 ml Milli-Q-H₂O

TBS

(s. Abschnitt 2.2.1)

Für die Anzucht der Hefesuspension wurde frische Bäckerhefe verwendet. Die Bäckerhefe wurde in sterilem Hefemedium bei RT für 4 Stunden unter Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert (3000 x g, 4 °C, 5 min). Die Hefezellen wurden dreimal mit TBS gewaschen (s. Abschnitt 2.2.1) und standen nun zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

2.2.3 Herstellung von *E. coli*-Agarplatten

Agarmedium

1 g Oxoid Agar No. 1
2,5 g Standard-1-Nährbouillon (Roth®)
ad 100 ml Milli-Q-H₂O
(autoklavieren)

Bakterien

Escherichia coli D31

Zunächst wurde eine *E. coli*-Suspension angezogen, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase (OD = 0,6 - 1) der Bakterien wurde die Suspension mit flüssigem Agarmedium (ca. 47 °C) durch heftiges Vortexen vermischt (Konzentration 10⁵ Bakterien/ml Agar). Anschließend wurde das Gemisch in nivellierte Petrischalen ausgegossen und nach Abkühlen mit Parafilm versiegelt. Die Platten konnten bis zu zwei Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.4 Hämolymphtest auf Immunaktivität

Gentamycin (Roth®)

Um zu testen, ob die verwendeten Versuchstiere Immunaktivität aufwiesen, wurde ein Aliquot der aufgefangenen Hämolymphe durch Zentrifugation von den Hämozyten befreit (s. Abschnitt 2.3.3) und zusätzlich mit PTU versetzt. In den Agar der vorgefertigten *E. coli*-Platten wurden Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm gestanzt, und je 3 µl der zu testenden Hämolymphe wurden luftblasenfrei in die Löcher pipettiert. Als Referenzprobe konnte Gentamycin (Roth®) in bekannter Konzentration aufgetragen werden. Nach einer Über-Nacht-Inkubation bei 37 °C

wurde geprüft, ob sich Hemmhöfe, d.h. bakterienfreie Höfe um die Löcher herum, gebildet hatten.

2.2.5 Abtöten der Pathogene

MS⁻-Saline

(s. Abschnitt 2.2.6)

TBS

(s. Abschnitt 2.2.1)

4,5 % Paraformaldehyd in MS⁻-Saline

4,5 % Paraformaldehyd in MS⁻-Saline (w/v)

auf 70 °C erhitzen (Abzug!), filtrieren

Die Pathogene in Suspension wurden durch Zentrifugation pelletiert (3000 x g, 10 min, RT) und in reichlich 4,5 %igem Paraformaldehyd in MS⁻-Saline re-suspendiert. Dabei wurden die Pathogene mehrfach durch eine Spritzenkanüle gezogen, um auch kleinste Verklumpungen zu lösen. Die Abtötung erfolgte unter Schwenken bzw. im Roll-over-Verfahren mit einer Inkubationszeit von ca. 20 min. Anschließend wurden sie durch Zentrifugieren pelletiert, zweimal in TBS gewaschen und schließlich in Injektionsmedium auf eine Stammkonzentration von 10⁹ Pathogene/ml Medium eingestellt. Zur Aufbewahrung wurden sie bei -20 °C eingefroren.

2.2.6 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Markierung von Bakterien

0,1 % Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in Natriumbicarbonatpuffer (w/v)

MS⁻-Saline

(s. Abschnitt 2.2.6)

Natriumbicarbonatpuffer (0.05 M)

9 ml 0,2 M Na₂CO₃

41 ml 0,2 M NaHCO₃

ad 200 ml Milli-Q-H₂O

pH 9,4

PBS

14 mM NaCl

3mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Die Markierung der Bakterien mit FITC erfolgte in Anlehnung an die Werksvorgaben der Firma Sigma®. Die abgetöteten Bakterien (s. Abschnitt 2.2.5) wurden pelletiert und in 1 ml Natriumbicarbonatpuffer aufgenommen. Zum Vereinzeln der Bakterien wurden sie mehrfach durch eine Spritzenkanüle gezogen. Anschließend wurden sie mindestens 10 min oder über Nacht im Puffer inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (4000 x g, 5 min, 4 °C) wurde das Bakterienpellet in 1 ml FITC-Lösung resuspendiert und erneut mehrfach durch eine Spritzenkanüle gezogen. Nach 30-minütiger Inkubationszeit im Dunkeln bei RT wurden die Bakterien erneut pelletiert (s.o.) und einmal mit 8 ml Natriumbicarbonatpuffer gewaschen (4000 x g, 5 min, 4 °C). Anschließend wurden die Bakterien so oft in PBS gewaschen (s.o.), bis der Überstand nicht mehr gelblich, sondern farblos war. Abschließend wurden die nun Bakterien in MS⁻-Saline aufgenommen und auf 10⁹ Bakterien/ml eingestellt.

2.3 Tierexperimentelle Anwendungen

2.3.1 Injektion von Pathogenen bzw. Saline

<u>Pathogene</u>	<u>MS⁻-Saline</u>
<i>Escherichia coli</i> D31	(s. Abschnitt 2.2.6)
<i>Bacillus megaterium</i> V	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

Für diverse Versuche wurden die Larven vorab je nach Versuchsanforderung mit den jeweiligen Pathogenen infiziert. Dabei wurden den Versuchstieren jeweils ca. 10⁸ Bakterien bzw. Hefen in MS⁻-Saline/L5d0-Raupe injiziert. Als Versuchskontrolle wurde MS⁻-Saline verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Tiere gesäubert und die zuvor ausgewählte Injektionsstelle mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Tiere ca. 10 min auf Eis gekühlt. Der möglichst flache Einstich erfolgte lateral am vorletzten abdominalen Segment in anteriorer Richtung.

2.3.2 Injektion und orale Verabreichung von dsRNA

doppelsträngige RNA

(s. Abschnitt 2.6.3)

M. sexta-Kunstfutter

nach YAMAMOTO (1969)

Die Injektion von dsRNA erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Es wurden 100 ng/Versuchstier injiziert.

In einem weiteren Versuch wurde die dsRNA verfüttert. Zu diesem Zweck wurde die 10-fache Injektionsmenge, also 1 µg/Versuchstier, auf einen schmalen Streifen Futter aufpipettiert, und den Versuchstieren zu fressen gegeben. Nach 12 Stunden fand die anschließende Infektion statt. Die Inkubationszeit für die RNAi wurde also im Vergleich zu den Injektionsversuchen verdoppelt.

2.3.3 Hämolymphentnahme

Die Larven wurden vor der Hämolymphentnahme zum definierten Zeitpunkt mit A. bidest gesäubert und die Schnittstelle mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde ein hinteres Scheinfüßchen, oder alternativ die Hornspitze, abgeschnitten. Die austretende Hämolymphe wurde in geeigneten Gefäßen, welche ein wenig PTU enthielten, auf Eis aufgefangen. Anschließend wurden die Hämozyten kurz abzentrifugiert (4600 x g, 5 min, RT) und verworfen. Der Hämolympüberstand wurde schließlich bei -20 °C für weitere Verwendung eingefroren.

Zur Entnahme der Hämolymphe bei Puppen wurde nach Desinfektion mit einem Skalpell die Cuticula einer Flügelanlage in Längsrichtung angeschnitten, und die austretende Hämolymphe wie oben beschrieben aufgefangen.

Den Imagines wurden die Schuppen am Thorax und am Abdomen unter fließendem Wasser entfernt. Nach Desinfektion wurde am Thorax in Längsrichtung die Cuticula angeschnitten, und die austretende Hämolymphe wie oben beschrieben aufgefangen.

2.3.4 Hämozytengewinnung

Dieser Abschnitt, sowie Abschnitt 2.4, in denen die Anleitung von der Hämozytengewinnung bis zur immunhistochemischen Behandlung der Hämozyten-Monolayer beschrieben wird, stellt das Standardprotokoll in Anlehnung an WILLOT et al (1994) dar.

Antikoagulan-Saline (Ac-Saline)

4 mM NaCl

40 mM KCl

1,46 M Saccharose

1,7 mM PIPES

8 mM EDTA

9,5 mM Citrat-1-Hydrat

0,27 mM Na-Citrat

0,1 g/l Polyvinylpyrrolidon

pH 6,5

Zur Gewinnung der Hämozyten wurden die Versuchstiere, wie zur Hämolympheentnahme beschrieben, vorbereitet. In geeigneten Gefäßen auf Eis wurden je 5 ml eisgekühlte Ac-Saline mit etwas PTU vorgelegt, in welche die austretende Hämolymphe aufgefangen wurde. Nach sanftem Mischen der gewonnenen Hämolymphe mit der Ac-Saline wurden die Hämozyten bei 400 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die nun pelletierten Hämozyten wurden zweimal mit 5 ml frischer, eiskalter Ac-Saline durch abwechselndes Resuspendieren und Zentrifugieren gewaschen und waren danach für die weitere Verwendung bereit. Wichtig während dieser gesamten Prozedur war es, dass die verwendeten Lösungen, und auch die Hämozyten, immer eisgekühlt gehalten wurden, da die Hämozyten sonst adhäsiv wurden, und zu hohe Verluste an Zellen auftraten.

2.3.5 Präparation der Larven („Einkapselungsversuch“)

Die Larven wurden ca. 10 min auf Eis heruntergekühlt und anschließend ventral

liegend in Wachsschalen am anterioren und posterioren Ende mit Präpariernadeln fixiert. Mit einem flachen, dorsalen Querschnitt des Integuments hinter der Kopfkapsel vom linken Stigma zum rechten Stigma, einem parallelen Schnitt am posterioren Ende vor dem Hörnchen und einem lateralen Längsschnitt, der zwei Schnittenden der Querschnitte auf einer Seite miteinander verbindet, wurden die Tiere aufpräpariert und anschließend unter TBS (s. Abschnitt 2.2.1) gesetzt.

2.4 Immunhistochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Hämozyten-Monolayern

4,5 % Paraformaldehyd in MS⁻-Saline

Grace Insect Medium (Serva®)

(s. Abschnitt 2.2.5)

TBS

(s. Abschnitt 2.2.1)

Am Ende einer Hämozytengewinnung wurde die Ac-Saline so gründlich wie möglich entfernt, und die Hämozytenpellets je nach Größe des Pellets in 200-500 µl eiskühlem *Grace Insect Medium* resuspendiert. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde auf einen Objektträger gegeben, und unter dem Mikroskop die Zelldichte bestimmt, um abschätzen zu können, wieviel Insektenmedium noch hinzugegeben werden musste, um einen gleichmäßigen Zellrasen (Monolayer) auf den Objektträgern zu erhalten. Anschließend wurden je 15-20 µl Hämozytensuspension pro Loch auf 10-well-Objektträger aufgetragen, und die Zellen 30-60 Minuten bei RT in Feuchtekammern absitzen gelassen. Abschließend wurden die Zellen für 10 min mit 4,5 % Paraformaldehyd fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS konnten die Monolayer nun weiterverwendet oder zur Aufbewahrung in -20 °C eingefroren werden.

2.4.2 Verwendung der Hämocyten-Monolayer für immunhistochemische Nachweise

<u>3 % bzw. 1 % BSA-TBS (w/v)</u>	<u>TBS</u>
3 g bzw. 1 g BSA	(Abschnitt 2.2.1)
ad 100 ml TBS	

Fluoromount G (Southern Biotech®)

Scolexin-Antikörper (polyklonal) aus Kaninchen (AB-Service Pineda)

Anti-Kaninchen IgG H+L FITC-konjugiert aus Ziege (Dianova® 111-095-003)

Die eingefrorenen Präparate wurden in Feuchtekammern durch Zugabe von je einem Tropfen TBS aufgetaut. Mit 3 %igem BSA-TBS wurden unspezifische Bindungsstellen der Präparate für mindestens 30 min blockiert. Anschließend wurde für den spezifischen Nachweis der primäre Antikörper, in diesem Fall der polyklonale Scolexin-Antikörper aus Kaninchen (s. Abschnitt 2.5.1), zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 5 min mit 1 %igem BSA-TBS des ungebundenen Scolexin-Antikörpers wurde zur Detektion des gebundenen Scolexin-Antikörpers der sekundäre, (FITC)-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper (1: 200 verdünnt in 1 %igem BSA-TBS) hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit TBS wurden die Präparate in Fluoromount G (Southern Biotech®) eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.4.3 Herstellung von Hämocyten-Monolayern/Coagulationsfäden

Grace Insect Medium (Serva®)

<u>4,5 % Paraformaldehyd in MS⁻-Saline</u>	<u>TBS</u>
(s. Abschnitt 2.2.5)	(Abschnitt 2.2.1)

In Anlehnung an die Arbeiten von Kilic (Diplomarbeit 2009, Arbeitsgruppe Prof. Dr.

T. Trenczek) und Scholz (Dissertation 2002, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Trenczek) wurde auf einen Objektträger ein Tropfen vorgelegt, und ein Aliquot einer frisch gewaschenen Hämozytensuspension hinzugefügt. Anschließend wurde eine Präpariernadel in den Tropfen getaucht und vorsichtig herausgezogen. Der entstandene Coagulationsfaden wurde dann vorsichtig über den Objektträger gelegt, und nach einer halbstündigen Absitzzeit mit 4,5 %igem Paraformaldehyd 10 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS je 5 Minuten wurden die fixierten Präparate bei 20 °C aufbewahrt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Aufreinigung des Hämolympheproteins Scolexin

Die Expression des Scolexin in den Versuchstieren wurde zunächst durch die Infektion mit *E. coli* (s. Abschnitt 2.3.1) stimuliert. Nach 48 Stunden wurden den Larven die Hämolymphe entnommen (s. Abschnitt 2.3.3) und gepoolt. Dabei wurde darauf geachtet, dass ausreichend PTU hinzugegeben wurde. Das Volumen an gesammelter Hämolymphe betrug schließlich ca. 100 ml.

2.5.1.1 Proteinnachweis nach BRADFORD (1976)

Bradford-Reagenz (lichtempfindlich!)

7 mg Coomassie Brilliant Blue G (Sigma®)

5 ml Ethanol

10 ml o-Phosphorsäure (85%)

ad 100 ml Milli-Q-H₂O

Für einen qualitativen Proteinnachweis wurden 4 µl der zu testenden Probe in einem Mikroreaktionsgefäß oder einem Loch einer Mikrotiterplatte vorgelegt, und anschließend 196 µl Bradford-Reagenz hinzugefügt. Bei einem sichtbaren Farbumschlag von Braun zu Blau war der Proteinnachweis positiv. Auf einen quantitativen bzw. photometrischen Nachweis von Proteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

2.5.1.2 Fraktionierung durch Ammoniumsulfat

<u>gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung</u>	<u>0,1 M Tris-Puffer</u>
917 g (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 M Tris
ad 1 l Milli-Q-H ₂ O	pH 7,5

Als ersten Aufreinigungsschritt wurden die Proteine mithilfe einer gestuften Ammoniumsulfat (AS)-Fraktionierung gefällt. Durch das Bestimmen des Mischverhältnisses der gesättigten AS-Lösung, die als 100 % definiert ist, und des Hämolymphepools kann man je nach Löslichkeit der Proteine eine Fraktionierung vornehmen. In diesem Fall wurde gesättigte AS-Lösung (100 %) mit Hämolymphe tropfenweise gemischt. Es wurden folgende Fraktionen erstellt: 0-30 %, 30-45 %, 45-55 %, 55-75 % und 75- 95 %. Dabei galt es für die erste Fraktionierung die zuvor bestimmte Menge gesättigter AS-Lösung tropfenweise zum gesamten Hämolymphepool unterzurühren und weitere 2 Stunden zu inkubieren. Die gesamte Prozedur sollte dabei auf Eis stattfinden. Anschließend wurden die gefällten Proteine bei 3800 x g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Die entstandenen Proteinpellets wurden in möglichst geringem Volumen 0,1 M Tris-Puffer aufgenommen. Der Überstand mit den noch gelösten Proteinen wurde für die nächste Fraktionierungsstufe wie zuvor beschrieben erneut verwendet. Nachdem alle Fraktionierungsstufen hergestellt worden waren, wurde der Überstand nach der letzten Zentrifugation aufgehoben und zum späteren Zeitpunkt per Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) auf Rückstände überprüft (s. Abschnitt 2.5.1.1).

2.5.1.3 Entfernen des Ammoniumsulfat aus den gefällten Proteinfractionen

Sephadex-G50-Matrix (GE Healthcare®)

0,1 M Tris-Puffer

(s. Abschnitt 2.5.1.2)

Trotz des Pelletierens der Proteine und der Aufnahme in Tris-Puffer war die AS-Konzentration in den Fraktionen dennoch hoch. Dies konnte sich störend in der

weiteren Bearbeitung der Fraktionen auswirken. Aus diesem Grund war es notwendig die Proben vom Ammoniumsulfat zu befreien. Hierfür wurden die Proben auf eine Säule mit einer Sephadex-G50-Matrix (GE Healthcare®) aufgetragen, die zuvor mit dem entsprechenden 0,1 Tris-Puffer pH 7,5 equilibriert worden war. Nach dem Prinzip der Größenaufschlusschromatographie wurden die Proteinfractionen vor dem Ammoniumsulfat aus der Matrix eluiert.

2.5.1.4 Auftrennung der Proben durch Sephacryl-Gelfiltration

Hi-PrepSephacryl-S200 (GE Healthcare®)

Blue Dextran (Sigma®)

RNase A (Sigma®)

0,5 M Tris-Puffer

0,5 M Tris

pH 7,5

Nachdem die Fraktionierung durch die AS-Fällung qualitativ mithilfe einer SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.5.2) und einer anschließenden Silberfärbung der Gele nach BLUM (1980) (s. Abschnitt 2.5.2.6) überprüft worden war, wurden die Proteine der sog. Scolexin-Fraktion mithilfe einer Hi-PrepSephacryl-S200 (GE Healthcare®) aufgetrennt und in Aliquots zu je 500 µl aufgefangen. Es wurden je 500 µl der Scolexin-Fraktion auf die zuvor mit 0,5 M Tris-Puffer equilibrierten Säule aufgetragen und bei konstanter Fließgeschwindigkeit die Proteine getrennt. Wegen der besonderen Eigenschaften der Sephacryl-Matrix kam es auf dem Weg durch die Säule zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, sodass zunächst die größeren Proteine, gefolgt von den kleineren Proteinen, heraustropften. Zuvor waren jedoch bereits mehrmals Markerstoffe bei variierten Laufbedingungen durch die Säule geschickt worden, um die optimalen Parametereinstellungen zu finden. Als Marker dienten hierbei das sehr große, dunkelblaue Blue Dextran mit einem MW > 2000000, dessen Weg auch optisch durch die Säule zu verfolgen war, und

die sehr kleine RNase A (ca. 13 kDa), beide je 20 mg/ml konzentriert. Mit diesen Markern ließ sich die Säule für die eigentliche Auftrennung eichen.

Nach der Auftrennung wurden die aufgefangenen Aliquots mithilfe der SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.5.2) analysiert und die Unterfraktionen mit einer sichtbaren, vermuteten Scolexinbande vereint.

2.5.1.5 Volumenminderung der Scolexinprobe durch Größenausschluss-zentrifugation

Vivaspin *cut-off*-Zentrifugationsröhrchen (VWR®)

Ein Nebeneffekt der Auftrennung durch die Sephacryl-Säule war eine starke Verdünnung der Proben. Um sie wieder aufzukonzentrieren wurden Vivaspin *cut-off*-Zentrifugationsröhrchen (10 kDa) verwendet. Die Zentrifugation erfolgte nach Herstelleranleitung. Die Proteine blieben als Retentat bis zu 10-fach konzentriert zurück. Das Filtrat wurde mithilfe Bradford-Assay (s. Abschnitt 2.5.1.1) auf einen möglichen Proteindurchlauf getestet und gegebenenfalls wiederholt eingesetzt.

2.5.1.6 Identifizierung der mutmaßlichen Scolexinbande

Zur Vorbereitung für die N-terminale Aminosäuresequenzierung der vermuteten Scolexinbande wurde ein 5-12 %iges, kontinuierliches Gradienten-PAA-Trenngel (s. Abschnitt 2.5.2) eingesetzt. Ein Aliquot der Scolexinfraktion wurde, wie in Abschnitt 2.5.2.3 beschrieben, vorbereitet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran via Western Blot -Anleitung (s. Abschnitt 2.5.3.1) wurde die Membran mit den gebundenen Proteinen eine Stunde in Coomassie-Fixier-Färbelösung inkubiert und anschließend in Coomassie-Entfärber entfärbt. Die relativen Molekulargewichte der sichtbaren Proteinbanden wurden anhand des ebenfalls transferierten Proteinmarkers (s. Abschnitt 3.2.1.3) identifiziert, die vermutete Scolexinbande ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingesandt. Die Sequenzierung wurde von der Einrichtung „Protein Analytik“ des Biochemischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Giessen übernommen.

2.5.1.7 Isolierung des Scolexin und Aufbereitung als Antigen zur Antikörperherstellung

0,1 M Tris-Puffer

(s. Abschnitt 2.5.1.2)

1 % Triton-Tris-Puffer

1 % Triton in 0,1 M Tris-Puffer

Der letzte Aufreinigungsschritt wurde durchgeführt in Anlehnung an SCZEWGZYCK et al (2009). Zunächst wurde die gesamte restliche Scolexinfraktion in Probenpuffer aufgenommen und denaturiert (s. Abschnitt 2.5.2.3). Anschließend wurde sie elektrophoretisch in einem kontinuierlichem Gradienten-Gel (5-12 % TG) aufgetrennt (s. Abschnitt 2.5.2.4). Schließlich wurden die aufgetrennten Proteine per Western Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 2.5.3.1). Die auf der Membran gebundenen Proteine wurden in einer 0,2 %igen Coomassie-Lösung (s. Abschnitt 2.5.2.5) inkubiert und anschließend in 30 %igem Ethanol entfärbt. Die Scolexinbande wurde ausgeschnitten und der Membranausschnitt über Nacht bei 4 °C in 1 % Triton-haltiger Tris-Lösung inkubiert. Das eluierte Scolexin wurde mit dem vierfachen Volumen eiskaltem Aceton gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach dem Zentrifugieren (11000 x g, 15 min, 4 °C) wurden die Pellets mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen (s.o), in 50 µl 0,1 M Tris-Puffer pH 7,5 aufgenommen und standen nun als Antigen zur Verfügung. Die fertige Probe wurde der Firma Pineda AB-Service® in Berlin zur Antikörperherstellung zugesandt. Nach einem Test von 4 Präimmunseren auf mögliche Reaktion mit Immunisierter Hämolymphe wurde ein geeignetes Kaninchen zur Immunisierung in Auftrag gegeben.

2.5.2 Proteinauftrennung und -nachweis durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (verändert nach LÄMMLI 1970)

Als Molekulargewichtsmarker wurde in elektrophoretischen Proteinauftrennungen der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* der Firma Fermentas® verwendet.

2.5.2.1 Herstellung der diskontinuierlichen Gradienten-Gele

Trenngelpuffer

77 g Tris base
19,6 g Tris acid
2 g SDS
ad 1 l Milli-Q-H₂O
pH 8,8

Sammelgelpuffer

29,4 g Tris base
2,0 g SDS
ad 1 l Milli-Q-H₂O
pH 6,8

Elektrodenpuffer (10x)

60,6 g Tris base
144 g Glycin
10 g SDS
ad 1 l Milli-Q-H₂O

30 %ige Acrylamidstammlösung

300 g Acrylamid
8 g Bis-Acrylamid
ad 1 l Milli-Q-H₂O, filtrieren

Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %

1 g Ammoniumperoxodisulfat
ad 10 ml Milli-Q-H₂O

Für die analytische Verwendung wurden 12 %ige Trenngele hergestellt. Die Komponenten wurden entsprechend gemischt, wobei TEMED und APS kurz vor dem Gießen zugesetzt wurden. Die Gelansätze wurden anschließend mit A. dest überschichtet. Das Sammelgel wurde stets 5 %ig angesetzt.

2.5.2.2 Herstellung der kontinuierlichen Gradienten-Gele

Zur Herstellung kontinuierlicher Gradienten-Gele wurden zwei Methoden genutzt. Für sogenannte „Mini-Gele“ wurden die zwei „Randkonzentrationen“ angesetzt, in dieser Arbeit 5 %ig und 12 %ig. Dann wurde zunächst die Hälfte des Volumens des niedrigerprozentigen Ansatzes, welches für ein Trenngel benötigt wurde, mit einer Glaspipette aufgezogen, und anschließend das gleiche Volumen des höherprozentigen Ansatzes luftblasenfrei in dieselbe Pipette aufgezogen, sodass im Idealfall 2 Phasen verschiedenprozentiger Acrylamidlösungen entstanden.

Durch leichtes Neigen der Pipette entstand eine Luftblase an der unteren Öffnung, die beim Hochperlen durch die Pipette die beiden Phasen gleichmäßig durchzog und einen Gradienten schuf, der sich anschließend einfach in die Gelapparatur auspipettieren ließ.

Für größere Volumina, sogenannte Maxi-Gele, empfahl sich eine Vorrichtung aus 2 hintereinandergeschalteten Kammern für die beiden unterschiedlich prozentigen Lösungen. Nach einem kurzen Vorlauf ließ man die beiden Lösungen durch einen Schlauch zusammen- und direkt in die Gelapparatur hineinfließen, sodass sich nach und nach ein Gradient aufbaute.

2.5.2.3 Probenaufbereitung für die elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel

2x Probenpuffer

2 ml SG-Puffer
2 ml Glycerin
1 ml β -Mercaptoethanol
20 μ l Bromphenolblau (2 %)
0,4 g SDS
4,5 ml Milli-Q-H₂O

5x Probenpuffer

5 ml SG-Puffer
5 ml Glycerin
2,5 ml β -Mercaptoethanol
20 μ l Bromphenolblau (2 %)
1 g SDS

Die Proteine wurden ggf. mit SG-Puffer vorverdünnt und dann in Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt.

2.5.2.4 Konditionen für die elektrophoretische Auftrennung

Falls nicht anders angegeben wurden die Proteine im Sammelgel bei konstanten 50 V fokussiert. Nach Eintreten in das Trenngel wurde die konstante Voltzahl auf 100 erhöht und die Proteine getrennt.

2.5.2.5 Coomassie-Färbung

Coomassie-Fixier-Färbelösung

Coomassie-Entfärber

1,25 g Coomassie Brilliant Blue R250	100 ml Essigsäure
46 ml Essigsäure	300 ml Ethanol
227 ml Ethanol	600 ml Milli-Q-H ₂ O
227 ml Milli-Q-H ₂ O	

Am Ende der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Gele mindestens 1 Stunde in Coomassie-Fixier-Färbelösung gefärbt und anschließend in Coomassie-Entfärber nach Sicht entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

2.5.2.6 Silberfärbung

Fixierlösung

500 ml Methanol
120 ml Essigsäure
0,5 ml Formaldehyd (37 %)
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Waschlösung

500 ml Ethanol
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Vorbehandlungslösung

0,2 g Natriumthiosulfat
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Imprägnier- und Färbelösung

2 g Silbernitrat
0,75 ml Formaldehyd (37 %)
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Entwicklungslösung

4 mg Natriumthiosulfat
60 g Natriumcarbonat
0,5 ml Formaldehyd (37 %)
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Stopplösung

500 ml Methanol
120 ml Essigsäure
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Wasch- und Lagerlösung

500 ml Methanol
ad 1 l Milli-Q-H₂O

Die Silberfärbung nach BLUM (1980) soll hier nur stichpunktartig aufgeführt werden, da es sich um ein reines Wechseln der Inkubationslösungen handelt. Letztendlich wird die Färbung der Proteinbanden nach Sicht (Schritt 7, s.u.) bestimmt und abgestoppt. Die Silberfärbung hat gegenüber der Coomassie-Färbung den Vorteil, dass die Nachweisgrenze bis zu 200-fach empfindlicher ist. Jedoch ist sie nicht reversibel.

- | | |
|---------------------------------|-------------|
| 1. Fixierlösung: | > 1 h |
| 2. Waschlösung: | 20 min. |
| 3. Vorbehandlungslösung: | 1 min. |
| 4. Milli-Q-H ₂ O: | 3 x 20 sec. |
| 5. Imprägnier- und Färbelösung: | 20 min. |
| 6. Milli-Q-H ₂ O: | 3 x 20 sec. |
| 7. Entwicklungslösung: | nach Sicht |
| 8. Stopplösung: | 10 min. |
| 9. Wasch- und Lagerlösung: | > 20 min. |

2.5.3 Proteintransfer und -nachweis (Western Blotting)

(verändert nach TOWBIN et al. 1979)

2.5.3.1 Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran

Transferpuffer A

300 mM Tris base
pH 10,4

Transferpuffer B

25 mM Tris base
pH 10,4

Transferpuffer C

25 mM Tris base
40 mM 6-Amino-n-hexanoic acid
pH 9,4

Amidoschwarz-Färbelösung

0,1 g Amidoschwarz 10 B
25 ml Isopropanol

Amidoschwarz-Entfärber

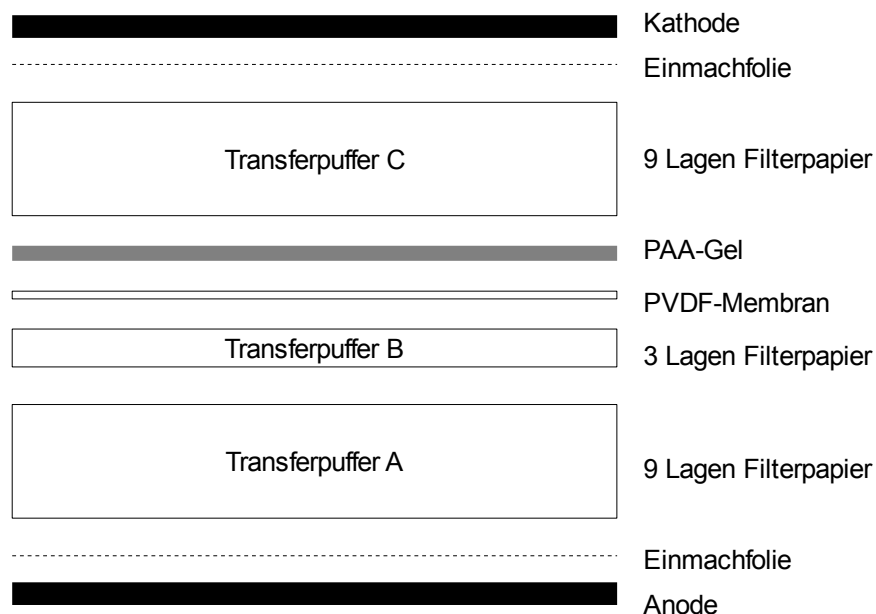
25 ml Isopropanol
10 ml Essigsäure

10 ml Essigsäure

ad 100 ml Milli-Q-H₂O

ad 100 ml Milli-Q-H₂O

Für den Transfer der Proteine durch das Western Blotting wurden Filterpapiere auf Größe des jeweiligen Trenngels zurechtgeschnitten und in den entsprechenden Puffern eingeweicht. Eine ebenso zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde in Methanol 15 s aktiviert und 3 x 2 min in Milli-Q-H₂O gewaschen. Anschließend wurde sie in Transferpuffer B inkubiert. Das Gel wurde kurz in Transferpuffer C geschwenkt, bevor es auf die Membran gelegt wurde (s. Grafik.). Gemäß der sog. „Semi-dry“-Methode wurde der Western Blot wie folgt aufgebaut.



Die Transferbedingungen wurden auf 0,8 mA/cm² Blotfläche und eine Stunde Transferzeit eingestellt. Anschließend wurde das Gel zur Transferkontrolle mit Coomassie und ein Kontrollstreifen mit Amidoschwarz für 2 min gefärbt und in den entsprechenden Entfärberlösungen differenziert.

2.5.3.2 Proteinnachweis durch Antikörper

5 %iges Milch-TBS

5 g Milchpulver

ad 100 ml TBS

Tween-BSA-TBS

TBS

0,05 % Tween-20

0,1 % BSA

ALP-Entwicklungspuffer

100 mM Tris base

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

ad 1 l Milli-Q-H₂O

pH 9,5

Nach dem Transfer wurden die freien Bereiche und die unspezifischen Bindestellen auf der Membran in Milch-TBS 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C unter sanftem Schütteln mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Tween-BSA-TBS (10 min) wurde der sekundäre, in diesem Fall alkalische-Phosphatase-gekoppelte Antikörper, hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde zunächst für 10 min in ALP-Entwicklungspuffer vorinkubiert und anschließend die Nachweisreaktion durch Zugabe von Nitro Tetrazolium Blue Chloride (NBT) (66 µl) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) (33 µl) in 10 ml Pufferlösung gestartet. Die Reaktion wurde nach Sicht mit Milli-Q-H₂O gestoppt, und die Membran lichtgeschützt nach dem Trocknen aufbewahrt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Anwendungen zur Expressionsanalyse

2.6.1.1 RNA-Extraktion (TRI[®]-Reagenz)

TRI[®]-Reagenz (Sigma[®])

RNase-freies Wasser

0,1 %iges Diethylpyrocarnbonat (DEPC)-Lösung
autoklavieren

Aus Hämozyten:

Am Ende einer Hämolympheante wurden die Hämozytenpellets in je 500 ml TRI[®]-Reagenz (Sigma[®]) resuspendiert und in RNase-freie Mikroreaktionsgefäße übertragen. Anschließend wurden die Zellen durch abwechselndes Vortexen (je 10 s bei höchster Drehzahl) und Ultraschallbehandlung (je 10 s) zerstört und die Proben bei 11000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Pellets mit den Zelltrümmern wurden verworfen. Die Überstände wurden mit jeweils 200 µl Chloroform gemischt und gründlich gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut zentrifugiert (11000 x g, 15 min, 4 °C). Die oberen, wässrigen Phasen wurden abgenommen, der Rest verworfen. Die wässrigen Phasen wurden gründlich mit je 500 µl Isopropanol gemischt und wieder 10 min bei RT inkubiert. Danach wie im letzten Schritt beschrieben zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (4400 x g, 5 min, 4 °C). Das Ethanol wurde so gut wie möglich entfernt und die RNA-Pellets unter dem Abzug mit geöffneten Gefäßdeckeln luftgetrocknet. Abschließend wurden die Pellets in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Aus Tabakblättern:

Als unspezifische Kontrolle für den Knockdown der Scolexin-Expression durch RNAi und der *in-situ* Hybridisierung wurden dsRNA und ISH-Sonden, spezifisch für das Rieske-Protein in Chloroplasten, synthetisiert (s. auch Abschnitt 2.6.5). Zu diesem Zweck wurde die „Rieske-RNA“ aus Blättern der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*), wie oben beschrieben, extrahiert, nachdem die Blätter zuvor homogenisiert worden waren.

2.6.1.2 RNA-Extraktion aus Hämozyten (*High Pure RNA Isolation* nach Roche®)

RNase-freies Wasser

(s. Abschnitt 2.6.1.1)

PBS

(s. Abschnitt 2.2.6)

High Pure RNA Isolation Kit (Roche®)

Bei der Verwendung des *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche®) zur RNA-Extraktion wurden die Hämozyten nach dem letzten Waschschrift der Ernteprozedur in 200 µl PBS resuspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte bis zur isolierten RNA erfolgten nach der Firmenanweisung. Das Prinzip der Extraktion folgt der Isolierung und Reinigung der RNA durch die Bindung an eine Silica-Matrix über mehrere Behandlungsschritte und der anschließenden Elution mit RNase-freiem Wasser.

2.6.1.3 DNase I-Behandlung

RNase-free DNase Set (Qiagen®)

Um mögliche Reste von genomischer DNA zu entfernen, wurde routinemäßig eine DNase I-Behandlung an die RNA-Extraktion angeschlossen. Hierzu wurde das Kit *RNase-free DNase Set* (Qiagen®) verwendet. Die extrahierte RNA wurde nach Firmenvorgaben mit DNase-Puffer und entsprechender Menge DNase I versetzt und inkubiert. Anschließend wurde die DNase 10 min bei 75 °C inaktiviert.

2.6.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Proben

1-2 %iges Agarosegel

1-2 g Agarose

100 ml TAE-Puffer

0,05 % Ethidiumbromid

Tris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer (50x)

242,2 g Tris base

18,6 g Na₂-EDTA

57,1 ml Eisessig

ad 1 l Milli-Q-H₂O

pH 7,8

Ethidiumbromid (Roth®)

Endkonzentration 0,2 µg/ml

DNA oder RNA der verschiedenen Proben wurde elektrophoretisch in Agarose-Gelen aufgetrennt bzw. aufgereinigt. Für analytische Zwecke wurden je 5 µl Probe in Probenpuffer aufgetragen und bei 100 V unter Verwendung von TAE-Puffer aufgetrennt. Durch Ethidiumbromid, welches sich an die DNA interkalierend lagert, wurden die aufgetrennten Nukleotidfragmente im UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.6.1.5 cDNA-Synthese

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche®)

Die cDNA-Synthese mithilfe von oligo-d(T)-Primern liefert Kopien der gesamten extrahierten RNA in Form von cDNA. Für diesen Zweck wurde das *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* der Firma Roche® verwendet.

Die einzelnen Komponenten wurden nach Herstellervorgaben gemischt und inkubiert.

2.6.1.6 Amplifikation der Zielsequenz

Taq Polymerase (Qiagen®)

Taq PCR Kit (New England Biolabs®)

PCR Purification Kit (Qiagen®)

Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed®)

Der nun synthetisierte cDNA-Pool diente als Vorlage (*template*) für die anschließende Amplifikation durch die *polymerase chain reaction* (PCR) der gesuchten Sequenzen. Hierfür wurden zuvor ausgewählte, spezifische Primer (s. Abschnitt 2.6.5) für die jeweiligen gesuchten Sequenzen eingesetzt. Die PCR

wurde mithilfe der *Taq Polymerase* der Firma Qiagen® bzw. des *Taq PCR Kit* von New England Biolabs® durchgeführt. Für die weitere Verwendung der PCR-Produkte war es wichtig, dass eine Taq-Polymerase zum Einsatz kam, da sie jeweils am Ende jedes Transkriptionsprozesses am 3'-Ende des PCR-Produktes einen Adenin-Überhang schafft, welcher von entscheidender Bedeutung bei der anschließenden Verwendung des *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen®) zum Einbau der PCR-Produkte in einen entsprechenden Vektor (s. Abschnitt 2.6.3.1) ist.

Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt, entweder mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen® oder dem *Jetquick Gel Extraction Spin Kit* (Genomed®). Die Konzentration der PCR-Produkte wurde photospektrometrisch ermittelt.

2.6.1.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Für eine präzise Identifizierung der Sequenz wurden die PCR-Produkte vor ihrer weiteren Verwendung zum Sequenzieren nach den Vorgaben des Sequenzierdienstleisters vorbereitet. Die Sequenzierungen wurden durch die Firma Seqlab GmbH in Göttingen durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.3).

2.6.2 5'-*Rapid amplification of cDNA ends* (RACE) der unvollständigen Scolexin A-Nukleotidsequenz

GeneRacer Kit (Invitrogen®)

Zur Vervollständigung des 5'-Ende der Scolexin A- Nukleotidsequenz wurde aus Hämozyten extrahierte und DNase I-behandelte RNA (s. Abschnitt 2.6.1.1-2.6.1.3) als *template* verwendet. Die Durchführung der 5'-*rapid amplification of cDNA ends* (RACE) erfolgte mithilfe des *GeneRacer Kit* der Firma Invitrogen®. Während der Prozedur wurde schrittweise die gewünschte mRNA in der *template*-Probe gezielt für die folgende Ligation mit einem *GeneRacer RNA Oligo* (Invitrogen®) durch eine RNA-Ligase vorbereitet. Nach der Ligation erfolgte die Erststrangsynthese mithilfe eines *GeneRacer Oligo d(T) Primer* (Invitrogen®). Die anschließende PCR mit *GeneRacer 5' Primer* (Invitrogen®), welches die zuvor angeheftete RNA-

Oligosequenz erkannte, und spezifischen 3'-Scolexin A-Primern lieferte ein ausreichendes Produkt für die Sequenzierung (s. Abschnitt 2.6.1.7).

2.6.3 Herstellung und Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi)-Reagenzien

2.6.3.1 Klonierung der Zielsequenz

Luria-Bertani-Ampicillin (LB-amp⁺)-Agarplatten

3,5 g LB-Pulver (Roth®) in 100 ml Milli-Q-H₂O

(autoklavieren und auf ca. 40 °C abkühlen lassen)

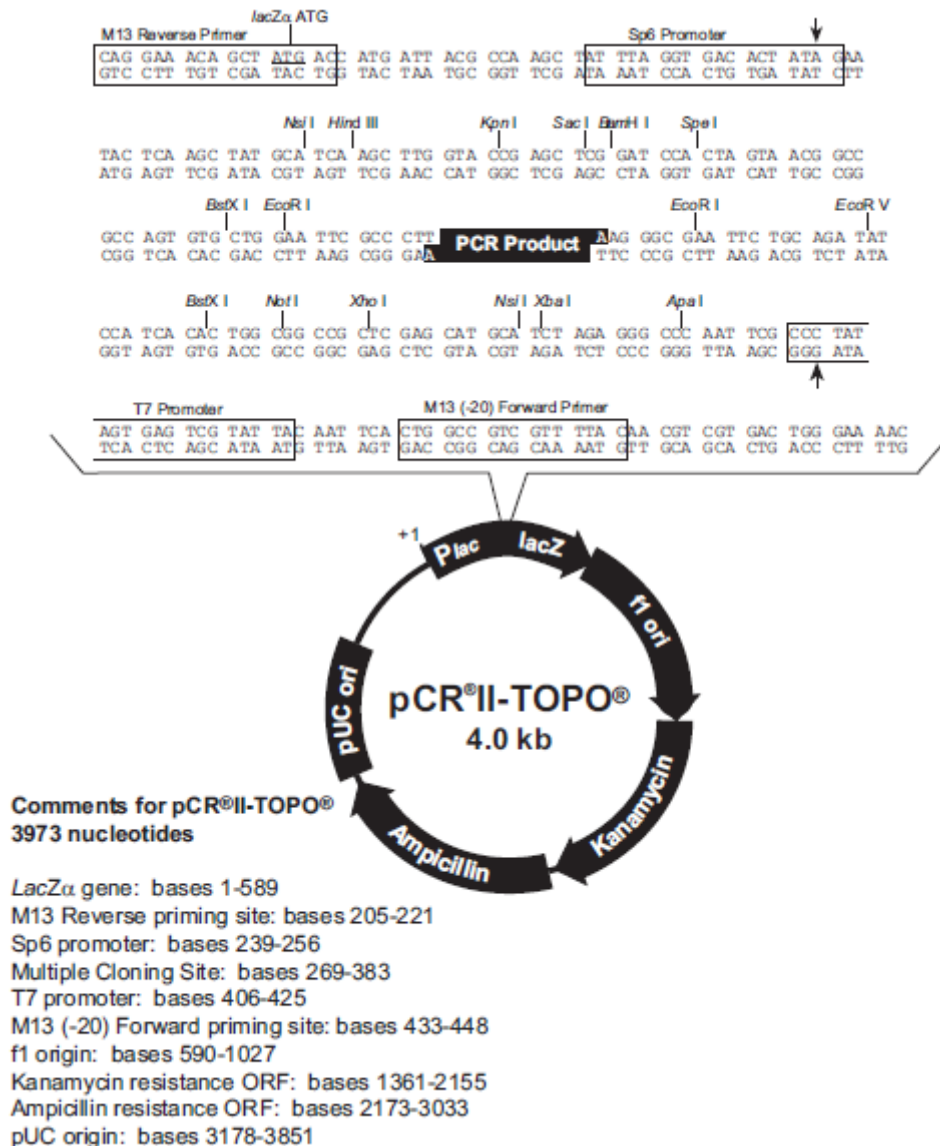
100 mg Ampicillin/ l LB-Agar

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen®)

Bakterienstamm

Escherichia coli DH5α™ (Invitrogen®)

Nach eindeutiger Identifizierung der PCR-Produkte durch die Sequenzierung wurden unter Verwendung des *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen®) und der Befolgung der Firmenanleitung die PCR-Fragmente in den pCR®II-TOPO®-Vektor (unten dargestellt) eingefügt.



Quelle: TOPO TA Manual (Invitrogen®), S. 24

Die dem Kit beiliegenden, kompetenten Bakterien wurden entsprechend vorbereitet und transformiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Bakterien auf zuvor erstellten LB-amp⁺-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden 5 bis 10 nach dem Zufallsprinzip entnommen und jeweils in schon fertig angesetzte PCR-Reaktionslösungen gebracht. Die restlichen Teile der verwendeten Kolonien verblieben zunächst auf der Platte- Die PCR-Reaktionslösungen beinhalteten T3- und T7-Primer entsprechend den Promotoren auf dem Vektor, die die eingebauten

PCR-Fragmente flankieren. In diesem Fall dienten die Plasmide in den Bakterien selbst als *templates* für die PCR, auch *colony pcr* genannt. Die Zyklusbedingungen für die *colony pcr* wurden wie folgt eingestellt:

Initialisierung: 95 °C für 5 min

Schritt 1: 95 °C für 30 s

Schritt 2: 50 °C für 30 s

Schritt 3: 72 °C für 2 min

Finalschritt 4: 72 °C für 10 min

34-malige, zyklische Wiederholung der Schritte 1-3

Die positiven, auf der Platte verbliebenen Teilkolonien wurden entnommen und über Nacht in LB-amp⁺-Medium inkubiert. Ein Teil wurde anschließend für Lagerungszwecke in Agar eingebracht und versiegelt.

2.6.3.2 Plasmidextraktion

Plasmid Purification Kit (Qiagen®)

Der überwiegende Teil der Bakterien zur Gewinnung der Zielsequenz wurde zentrifugiert und der Überstand entfernt. Für die Plasmidextraktion wurde das *Plasmid Purification Kit* von Qiagen® nach Herstellervorgaben verwendet. Die extrahierten Plasmide konnten nun wiederum als *template* für weitere PCRs mit T3-/T7-Primern fungieren, um die Identität der in den Vektor eingefügten Sequenz (*insert*) zu verifizieren.

2.6.3.3 Reverse Transkription der Zielsequenz

T3/T7 Megascript Kit (Ambion®)

Einer reversen Transkription der Zielsequenz wurde immer eine PCR mit T3- und T7-Primern und dem extrahierten Plasmiden vorangestellt. Das entstandene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und als *template* für die reverse Transkription

verwendet. Das jeweilige Umschreiben der komplementären Stränge der PCR-Fragmente erfolgte mithilfe des *T3 Megascript Kit* bzw. *T7 Megascript Kit* von Ambion® nach Herstelleranleitung. Hierbei musste von nun an wieder auf striktes RNase-freies Arbeiten geachtet werden. Das Ergebnis waren jeweils komplementäre RNA-Einzelstränge (ssRNA) mit der gewünschten, spezifischen Zielsequenz.

2.6.3.4 Herstellung der doppelsträngigen RNA (dsRNA)

Zur Erstellung der doppelsträngigen RNA wurden die komplementären ssRNA-Proben im Verhältnis 1:1 gemischt und im Heizblock 10 min auf 70 °C erhitzt, um Dimer- und Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und auf RT ausgekühlt, sodass sich die komplementären Stränge durch *annealing* aneinander anlagern konnten. Die Konzentration der auf diese Weise entstandenen dsRNA wurde photospektrometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte idealerweise auf Eis für bis zu 2 bis 3 Wochen ohne Integritätsverlust, oder bei -20 °C; alternativ auch über längeren Zeitraum im gefällten Zustand in LiCl-Lösung (s. Anleitung *Megascript Kit* von Ambion®).

2.6.3.5 Anwendung der doppelsträngigen RNA-Reagenzien

Die endgültige Injektionsmenge pro Versuchstier (L5d0) betrug 100 ng dsRNA. Das RNAi-Reagenz wurde in MS⁻-Saline (s. Abschnitt 2.2.6) verdünnt und wie bereits in Abschnitt 2.3.2 beschrieben in die Versuchstiere injiziert.

Als Zeitplan für einen Standard-Knockdown-Versuch galt die Injektion des RNAi-Reagenz', eine anschließende 6-stündige Inkubationszeit, dann die Infektion des Tieres mit einem Pathogen bzw. die Behandlung mit einer Kontrollsaline (MS⁻-Saline), einer erneuten, 18-stündigen Inkubationszeit und der letztendlichen Hämolymp- bzw. Hämozytenentnahme.

2.6.4 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Die Durchführung orientiert sich größtenteils an den Vorgaben der Firma Roche

Applied Science®, die die Methode der Digoxigenin-gekoppelten Sondendetektion entwickelt hat.

2.6.4.1 Sondensynthese

Hybridisierungspuffer

50 % Formamid

5 x SSC pH 4,5

0,1 % Tween-20

1 % SDS

50 µg/ml Heparin

100 µg/ml Lachssperma-DNA

T3/T7 Megascript Kit (Ambion®)

pCR®II-TOPO® -Vektor (Invitrogen®)

Digoxigenin-konjugiertes-UTP oder DIG-11-UTP (Roche Applied Science®)

Zunächst wurde die gewünschte Zielsequenz als aufgereinigtes PCR-Produkt in einen pCR®II-TOPO® -Vektor (Invitrogen®) eingebaut (nach Firmenanleitung Invitrogen®). Auf die anschließende Klonierung, wie in Abschnitt 2.6.3.1 beschrieben, wurde in diesem Fall verzichtet. Das Plasmid mit der Zielsequenz, flankiert von den für die spätere reverse Transkription erforderliche T3- und T7-Promotersequenzen, diente nun direkt als *template* für die Amplifikation der Zielsequenz mithilfe von T3- und T7-Primern, welches das erforderliche PCR-Produkt mit T3- und T7-Promotersequenzen liefert. Nach erneuter Aufreinigung (s. Abschnitt 2.6.1.6) des Produkts erfolgte die eigentliche Sondensynthese mithilfe des *Megascript Kits* von Ambion®. Dabei wurde die komplementäre Sequenz der Zielsequenz des *templates* in RNA synthetisiert. Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte nach Kitprotokoll. Durch die Zugabe des DIG-11-UTP in das Nukleotidgemisch wurde das DIG-11-UTP in einem bestimmten Verhältnis in die synthetisierte Sonde eingebaut und konnte mit

entsprechendem Digoxigenin-spezifischem Antikörper detektiert werden. Nach einer Synthesezeit von 4 bis 6 Stunden bei 37 °C wurde das *template* durch DNase-Zugabe degradiert (s. Kitprotokoll). Die Sonde wurde präzipitiert und die Konzentration photospektrometrisch bestimmt. Schließlich wurde die Sonde in Hybridisierungspuffer (50 ng / µl) aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.4.2 Hybridisierung der Sonde

PBT

PBS (s. Abschnitt 2.2.6)

0,1 % Tween-20

Hybridisierungspuffer

(s. Abschnitt 2.6.4.1)

Während der gesamten Prozedur wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet. Sofern nicht anders beschrieben, fanden die einzelnen Schritte bei RT statt.

Die Hämözytenmonolayer wurden, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, hergestellt, jedoch wurden statt 10-Loch-Objektträger runde Deckgläschen in passenden Zellkulturplatten zum Auftropfen der Zellsuspensionen verwendet. Dieses hatte den Vorteil, dass man erstens wegen der erhöhten Verdunstungsgefahr in manchen Inkubationsschritten größere Volumina an Lösungen auf die Deckgläschen geben konnte, und zweitens die Deckgläschen sehr leicht umgedreht auf herkömmliche Objektträger aufbringen und versiegeln konnte.

Nach dem Fixieren und Waschen wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe je 2 min mit 50 %igem, 70 %igem und 100 %igem Ethanol dehydriert und anschließend an der Luft angetrocknet. Daraufhin wurden sie auf dem gleichen Weg zurück in einer absteigenden Reihe rehydriert (angelehnt an JIANG & KANOST 1997) und anschließend 5 min mit Hybridisierungspuffer gewaschen. Die Monolayer wurden dann mit frischem Hybridisierungspuffer 2 Stunden bei 55 °C im Hybridisierungsofen blockiert. Anschließend fand die Hybridisierung mit der DIG-11-UTP-gekoppelten Sonde (100 ng/100ml Hybridisierungspuffer) bei 65 °C über Nacht im versiegeltem Behälter (Verdunstungsschutz) im Hybridisierungsofen statt. Anschließend wurden die Zellen viermal 10 min mit PBT gewaschen, um ungebundene Sonden zu entfernen.

2.6.4.3 Detektion der Sonde

Blockierpuffer (Roche®)

10-fach Blockierlösung (Roche®) verdünnen in Maleinsäurepuffer (1:10)

Maleinsäurepuffer

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

pH 7,5

(E-)PBT

PBS (s. Abschnitt 2.2.6)

0,1 % Tween-20

(50 mM EDTA)

ALP-Puffer

100 mM NaCl

50 mM Mg Cl₂

100 mM Tris base

0,5 % Tween-20

pH 9,5

Für die Detektion des Digoxigenin wurde ein alkalische-Phosphatase-konjugierter-anti-DIG-Antikörper (Roche®) verwendet.

Zuvor wurden die Zellen jedoch 2 Stunden mit Blockierpuffer (Roche®) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bindung des Antikörpers bei 4 °C über Nacht. Der Antikörper wurde nach Herstellervorgaben 1:10000 verdünnt in Blockierlösung (Roche®) verwendet. Danach wurden die ungebundenen Antikörper viermal 10 min mit PBT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit ALP-Puffer inkubiert. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte durch die Zugabe von je 66 µl NBT und 33 µl BCIP in 10 ml ALP-Puffer nach Sichtkontrolle der Farbentwicklung. Die Reaktion wurde gestoppt durch das Waschen mit E-PBT.

2.6.5 Verwendete Primer

Ziel	Sequenz (5'→3')	Produkt / Zweck	NCBI Accession-Nr.
<i>Hemolin 0,8</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: ggtagaagggtcatggctca rev: gtctcagcgtaggcattctcc	-831 bp- cDNA, dsRNA	U11879

<i>Hemolin 1,2</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: acagcaacaacacaggtgaa rev: ttaagcaacaatcacgagcg	-1273 bp- cDNA dsRNA	U11879
<i>PGRP</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: acggtatcacttccgtccac rev: cattctggccatctctgat	-516- cDNA	AF413068
<i>Immulectin-2</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: gactcttcggagtcgtgtga rev: gactgtttggttcctttcg	-953- cDNA	AF242202
<i>Scolexin A</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: tctgcggaggaaccattatc rev: cccaactctccactccgta	-744 bp- cDNA, dsRNA, ISH-Sonde	AF087004
<i>Scolexin B</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: cgaagcagtcggtgtgtt rev: cgtaacaacactgacgagaaatc	-1045 bp- cDNA	AF087005
<i>Lysozym</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: ttgccttcgcatatcacag rev: aatgagccatctcgccaaag	-636 bp- cDNA	S70589
<i>Cecropin</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: ttctcgtcttcgcttgctt rev: cctttgaaaatggcggttg	-161 bp- cDNA	AM293323
<i>rpS3 0,2</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: ctggctgaggatggctactc rev: ttttctcagcgtacagctcca	-186- cDNA	U12708
<i>rpS3 0,25</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: tcaggccgagtccttgagat rev: agcactccttgctgcctgagaag	-246 bp- cDNA	U12708
<i>Catalase 1</i> (<i>M. esculenta</i>)	fwd: div. rev: div.	-var.- cDNA, dsRNA	AF170272
<i>Rieske FeS</i> (<i>N. tabacum</i>)	fwd: tgcttcttttgggtgctctt rev: gttgccaggtggatgagttt	-170 bp- cDNA, dsRNA, ISH-Sonde	X66009
<i>ScoA-RACE-rev</i> (<i>M. sexta</i>)	fwd: cgactggagcacgaggacactga* rev: aggccgctccccgcatagagtatcg	-329 bp- cDNA, RACE-Fragment	AF087004

**GeneRacer Oligo* Primer (Invitrogen®) (s. Abschnitt 2.6.2)

2.8 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte entsprechen der Routineaustattung von histologischen, molekularbiologischen und biochemischen Universitätslaboren. Auf eine detaillierte Auflistung wird hier dementsprechend verzichtet. Erwähnt werden sollen nur einige spezielle Geräte, mit denen die Arbeiten durchgeführt worden sind.

Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus®)

Inversmikroskop SM-Lux (Leitz®)

Proteinaufreinigung und -analyse

Biologic Chromatography System (Biorad®)

Protean II xi Cell (Biorad®)

Mini Protean II (Biorad®)

2.7 Verwendete Software

Bildbearbeitung

IrfanView 4.25

Primerdesign und -analyse

Primer3 Web Interface (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>)

Integrated DNA Technologies Oligo Analyzer 3.1

(<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>)

Sequenzalignment

NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

Boxshader (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

3 Ergebnisse

3.1 Hämolin

3.1.1 Expression von Hämolin, Immulectin-2 und PGRP

Zur Analyse der Expression von Hämolin, Immulectin-2 und PGRP in Hämozyten nach einer *E.coli*-Infektion im Vergleich zu unbehandelten bzw. PBS-injizierten Kontrollarven wurde die RNA nach der TRI-Reagenz-Methode extrahiert (s. Abschnitt 2.6.1.1). Zur Kontrolle des Erfolges der Extraktion und der Integrität der RNA wurde ein Aliquot der RNA-Probe in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Exemplarisch für Kontrollen aller weiteren Versuche ist die Auftrennung in Abb. 2 dargestellt.

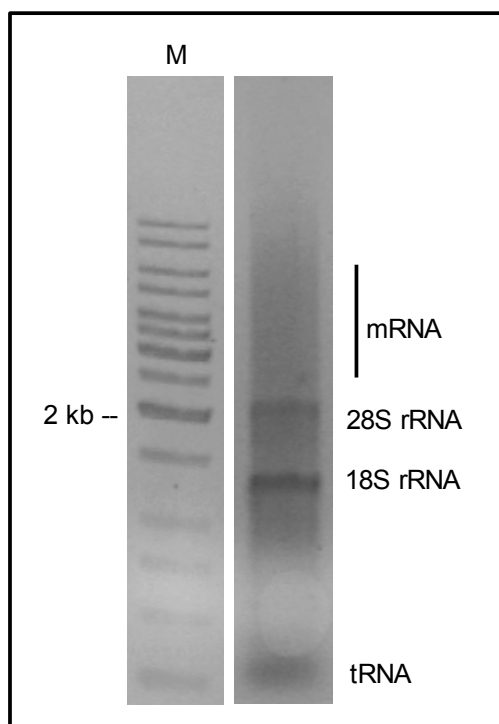


Abb. 1:
Darstellung der elektrophoretischen
Auftrennung extrahierter Gesamt-RNA
nach einer DNase-Behandlung
[M: Marker, kb: Kilobasenpaare]

Nach der erfolgreichen Extraktion und der nachgewiesenen Intaktheit der Gesamt-RNA wurde mithilfe einer RT-PCR die Expression der entsprechenden m-RNA nachgewiesen (s. Abschnitt 2.6.1.5).

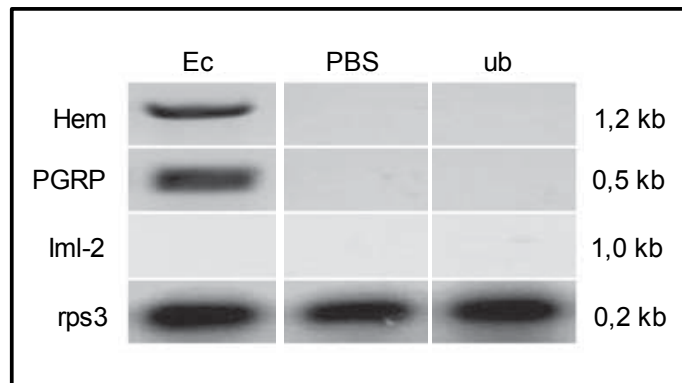


Abb. 2:
Darstellung der Expressionsanalyse von Hämolin, PGRP und Immulectin-2 in Hämocyten von *E. coli*-infizierten, PBS-behandelten und unbehandelten L5d1-Larven durch RT-PCR.
[rpS3: ribosomales Protein S3 (Ladekontrolle), kb: Kilobasenpaare]

Die Expression von Hämolin und PGRP wurde im Gegensatz zu Immulectin-2 durch *E. coli*-Infektion induziert. Die Kontrolltiere wiesen keine Expression der untersuchten Gene auf (Abb. 3).

3.1.2 Knockdown der Hämolin-Expression durch RNAi

Das durch RT-PCR gewonnene PCR-Fragment von Hemolin wurde aufgereinigt und als *template* für die Synthese von Hämolin-spezifischer doppelsträngiger RNA verwendet. Nach dem Klonieren des Fragments wurde über *in-vitro* reverse Transkription das RNAi-Reagenz hergestellt (Abb. 4).

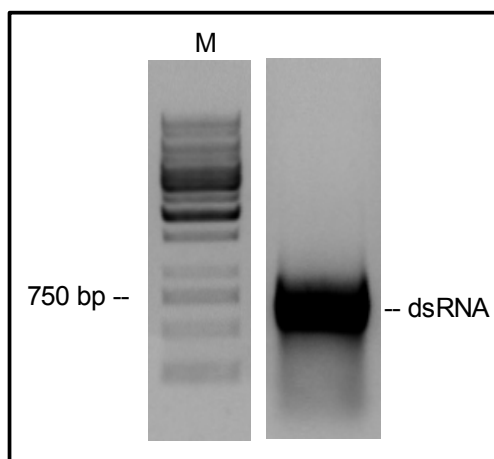


Abb. 3:
Darstellung von aufgereinigter, synthetisierter doppelsträngigen RNA
[M: Marker, dsRNA: doppelsträngige RNA]

Zum Verhindern der Hämolin-Expression wurde je Versuchstier (L5d0) 100 ng Hämolin-spezifische dsRNA injiziert. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden dieselben Tiere mit je 10^8 *E. coli* infiziert. Die RNA-Extraktion erfolgte 18 Stunden nach der Infektion. Der Expressionsgrad wurde per RT-PCR untersucht.

Die Kontrolltiere durchliefen den gleichen Prozess, wobei die dsRNA durch PBS bzw. einer unspezifischen dsRNA (dsCon) mit einem Sequenzabschnitt aus einer pflanzlichen Katalase (s. Abschnitt 2.6.5) und *E. coli* ebenso durch PBS ersetzt wurden.

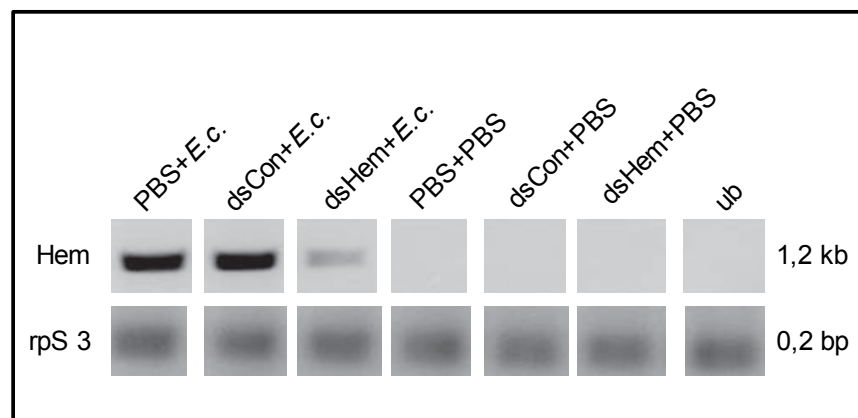


Abb. 4:

Ergebnis der RT-PCR eines Knockdown-Versuches der Hämolin-Expression

[Hem: Hämolin, rpS3: ribosomales Protein S3, PBS: phosphate-buffered saline, *E.c.*: *E. coli*, dsHem: doppelsträngige RNA spezifisch für Hämolin, dsCon: unspezifische, doppelsträngige Kontroll-RNA, ub: unbehandelt, kb: Kilobasenpaare, bp: Basenpaare]

Der spezifische Knockdown der Hämolin-Expression bei den Tieren, die mit dsHem behandelt und anschließend mit *E. coli* infiziert wurden, im Vergleich zu den Kontrolltieren, die vor der Infektion PBS bzw. dsCon injiziert bekommen haben, war erfolgreich (Abb. 5). Desweiteren ist die Induzierbarkeit der Hämolin-expression durch *E. coli*-Infektion deutlich.

3.1.3 Effekt des Hämolin-Knockdowns auf die Fähigkeit infizierter Tiere zur Nodulibildung

Es wurden Versuchstiere mit *E. coli* infiziert. Die Kontrolltiere wurden dabei statt mit dsScoA mit PBS bzw. mit dsCon vorbehandelt. Nach der 18-stündigen

Inkubationszeit wurden die Tiere aufpräpariert und auf Nodulibildung untersucht.

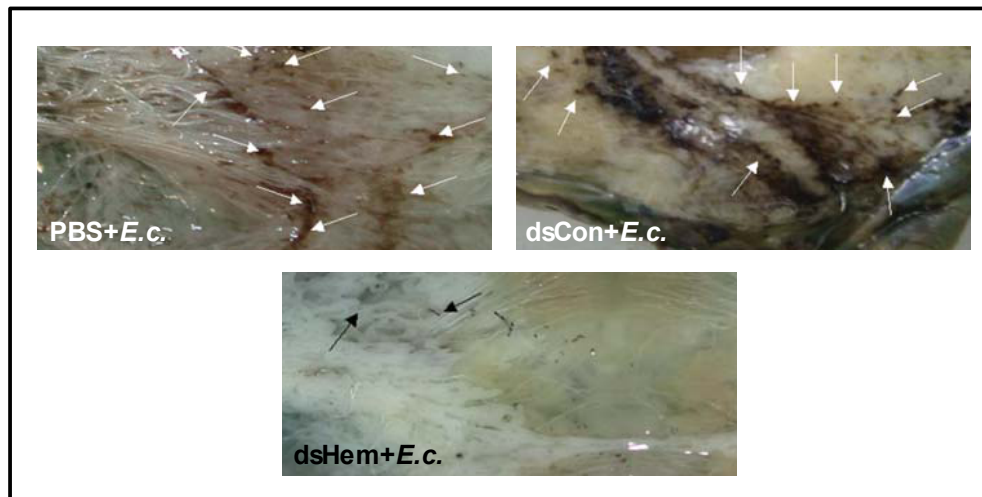


Abb. 5:
Darstellung der Nodulationsaktivität bei Knockdown-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren

[PBS: phosphate-buffered saline, *E.c.*: *E. coli*, dsHem: doppelsträngige RNA spezifisch für Hämolin, dsCon: unspezifische, doppelsträngige Kontroll-RNA]

Während die Kontrolltiere wie erwartet z.T. starke Nodulibildung mit einhergehender Melanisierung aufwiesen, zeigten die Knockdown-Tiere fast keine Nodulibildung (Abb. 6). Die Ansicht der aufpräparierten Tiere glich annähernd den Uninfizierten (hier nicht dargestellt).

3.2 Scolexin

3.2.1 Aufreinigung des nativen Scolexins aus der Hämolymphe von *M. sexta*

3.2.1.1 Ammoniumsulfatfällung der Hämolympheproteine

In Anlehnung an KYRIAKIDES et al. (1996) wurden die Proteine der zuvor vereinigten Hämolympheproben durch eine Ammoniumsulfat-Fällung fraktioniert (s. Abschnitt 2.5.1.2) und anschließend entsalzt (s. Abschnitt 2.5.1.3). Der Proteingehalt der entsalzten Fraktionen wurde nur qualitativ mithilfe des Bradford-Tests kontrolliert (s. Abschnitt 2.5.1.1).

Die Fraktionen unterscheiden sich bezüglich ihrer AS-Prozentigkeit voneinander. Im vorliegenden Fall wurden folgende Fraktionen erstellt:

Fraktion 0-30 %, Fraktion 30-45 %, Fraktion 45-55 %, Fraktion 55-75 %, sowie die Fraktion der noch übrigen Proteine in Lösung (hier >75 % genannt).

Die erste Fraktion 0-35 % und die letzte Fraktion >75 % wurde im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt, da sie keinen nennenswerten Proteingehalt aufwiesen.

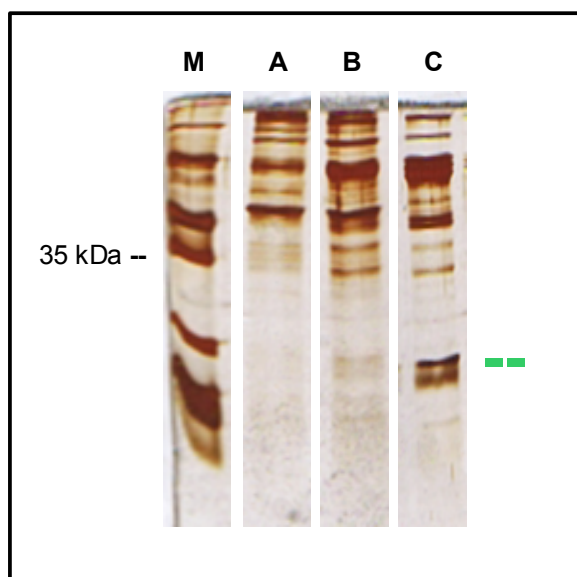


Abb. 6:
Ergebnis der Fraktionierung der
Hämolymphproteine durch Ammonium-
sulfat-Fällung
(silbernitratgefärbte SDS-PAGE/15% TG)
[M Marker, A Fraktion 30-45 %, B Fraktion
45-55 %, C 55-75 %,]

Bereits vor der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine war in den einzelnen Fraktionen die erfolgreiche Fraktionierung zu erkennen, da die Fraktion 55-75 % im Gegensatz zu den anderen Fraktionen eine intensive blaugrüne Färbung aufwies.

Anhand des Fraktionierungsergebnisses (s. Abb. 6) wurde mit der Fraktion 45-55 % weitergearbeitet, da sich der größte Teil des Scolexins in dieser Fraktion befand. Der Einfachheit halber wird in den weiteren Ausführungen diese Fraktion als „Scolexin-Fraktion“ bezeichnet. Abbildung 6 zeigt, dass die Fraktionierung erfolgreich war, vor allem gut zu erkennen an der grün markierten Bande, die fast ausschließlich in der letzten Fraktion auftaucht.

3.2.1.2 Größenaufschlusschromatographie der Scolexin-Fraktion durch Sephacryl-200

Nach der Eichung der Sephacryl-200-Säule (s. Abschnitt 2.5.1.4) wurde die gesamte Scolexin-Fraktion in je 500 µl Aliquots über die Säule aufgetrennt. Abb. 7 zeigt exemplarisch die Auftrennung eines Scolexin-Fraktion-Aliquots. Mit den ersten Proteinen, die die Säule vollständig passiert haben, wurden je 500 µl-Aliquots als Unterfraktionen aufgefangen.

Die Unterfraktionen, die grün unterlegt sind, wurden anschließend separat mithilfe SDS-PAGE analysiert (Abb. 8).

Anhand des Ergebnisses der elektrophoretischen Proteinauftrennung der einzelnen Unterfraktionen konnte man das Erscheinen des Scolexin eingrenzen. Im vorliegenden Beispiel fiel die Entscheidung auf die Unterfraktionen 23 bis 32, welche in der Chromatographieaufzeichnung gelb unterlegt sind.

Diese Unterfraktionen wurden vereint (Abb. 9) und durch *cut-off*-Zentrifugation eingeeengt.

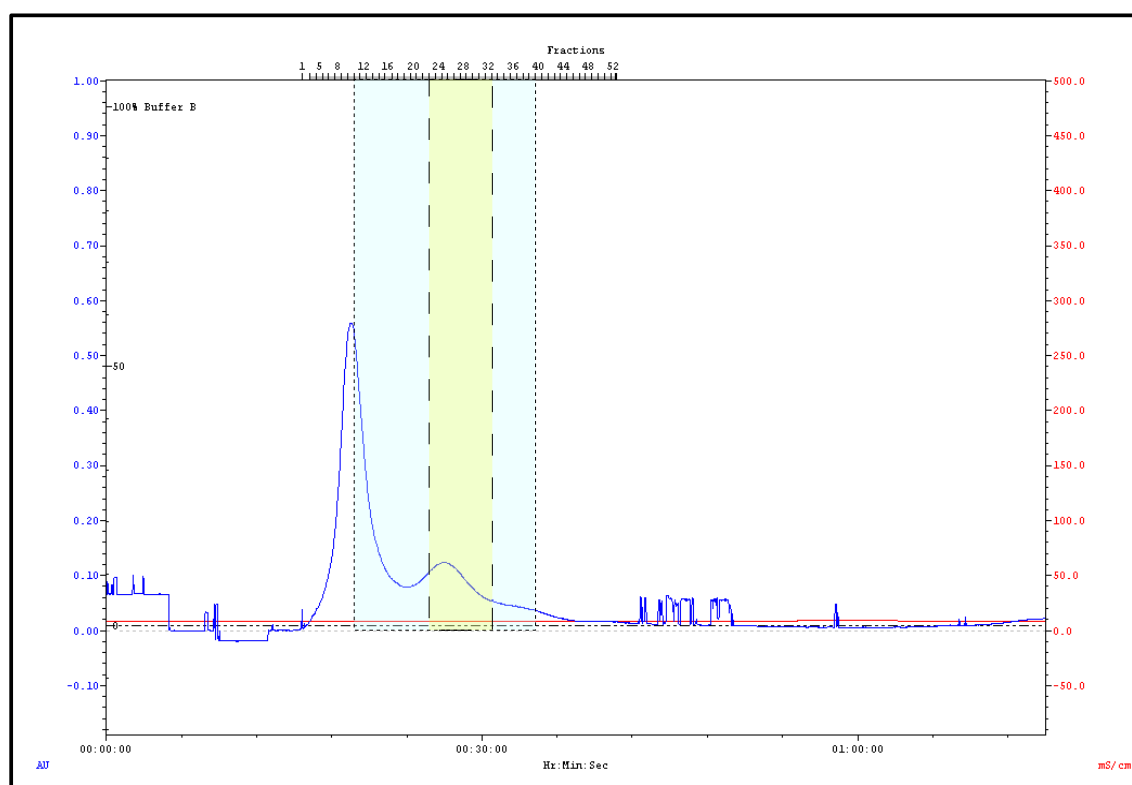


Abb. 7:
Chromatogramm der Größenauftrennung der Scolexin-Fraktion durch eine Sephacryl-200-Säule

[blau: UV-Absorption, rot: elektrische Widerstand, grüne Fläche: durch SDS-PAGE untersuchte Unterfraktionen, gelbe Fläche: weiterverwendete Unterfraktionen]

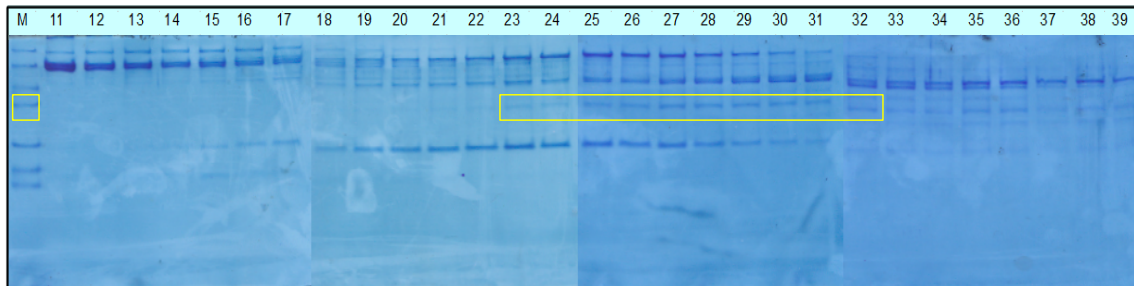


Abb. 8:
Darstellung der elektrophoretische Auftrennung der ausgewählten Unterfraktionen 11-39

[gelb: umrandet Marker- und entsprechende mutmaßliche Scolexin-Bande bei 35 kDa]

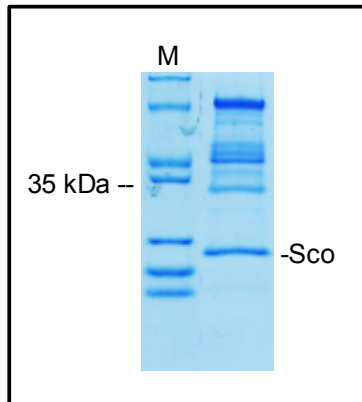


Abb. 9:
Darstellung der elektrophoretische Auftrennung der vereinigten Proben

[M: Marker, Sco: mutmaßliche Scolexin-Bande]

3.2.1.3 N-terminale Sequenzierung der mutmaßlichen Scolexin-Bande

Ein Aliquot der vereinigten und eingengten Probe wurde elektrophoretisch aufgetrennt und per Western Blot auf einer PVDF-Membran gebunden. Die Membran wurde anschließend mit Coomassie-Fixierfärbelösung gefärbt und die mutmaßliche Scolexin-Bande wurde ausgeschnitten. Dieser Streifen wurde anschließend zum Ansequenzieren eingeschickt (s. Abschnitt 2.5.1.7).

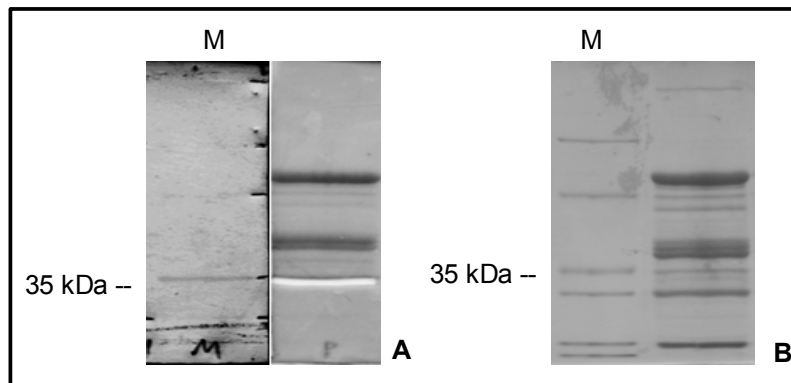


Abb. 10:
Darstellung der Coomassie-Färbung des Western Blottings
der zur Ansequenzierung aufgetrennten Scolexinfraktion (A)
und des entsprechenden Kontrollgels (B)

Die Sequenzierung ergab folgende abgeleitete N-terminale Sequenz der ersten 10 Aminosäuren:

(GT) A N D I Q L N Q K

Das Ergebnis deckt sich zu 100 % mit der von KYRIAKIDES et al. (1995) veröffentlichten N-terminalen Sequenz von Scolexin. Auch der tblast liefert ein eindeutiges Ergebnis (Abb. 11). Nach der Identifikation der mutmaßlichen Scolexinbande wurde das Scolexin aus der aufgereinigten Probe nach SZEWCZYCK et al. (2009) isoliert und für die Antikörperproduktion vorbereitet (s. Abschnitt 2.5.1.7).

Die Spezifität des gelieferten Scolexin-Antikörpers wurde mittels Western Blotting an aufgereinigter Scolexin-Probe bzw. einer Hämolympheprobe nachgewiesen (nicht dargestellt).

Sequences producing significant alignments:		Score	E Value
		(Bits)	
gb AAB35164.1 scolexin-2=immune protein {N-terminal} [Manduc...		32.0	6.5
gb AAD14591.1 scolexin A [Manduca sexta]		32.0	6.5
gb AAD14592.1 scolexin B [Manduca sexta]		32.0	6.5
gb EEQ83526.1 conserved hypothetical protein [Ajellomyces de...		26.5	296
.			
.			
.			
>gb AAB35164.1 scolexin-2=immune protein {N-terminal} [Manduca sexta, larvae, hemolymph, Peptide Partial, 21 aa] Length=21			
Score = 32.0 bits (68), Expect = 6.5 Identities = 9/9 (100%), Positives = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)			
Query	1 ANDIQLNQK 9		
	ANDIQLNQK		
Sbjct	1 ANDIQLNQK 9		
>gb AAD14591.1 scolexin A [Manduca sexta] Length=279			
Score = 32.0 bits (68), Expect = 6.5 Identities = 9/9 (100%), Positives = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)			
Query	1 ANDIQLNQK 9		
	ANDIQLNQK		
Sbjct	24 ANDIQLNQK 32		
>gb AAD14592.1 scolexin B [Manduca sexta] Length=279			
Score = 32.0 bits (68), Expect = 6.5 Identities = 9/9 (100%), Positives = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)			
Query	1 ANDIQLNQK 9		
	ANDIQLNQK		
Sbjct	25 ANDIQLNQK 33		
>gb EEQ83526.1 conserved hypothetical protein [Ajellomyces dermatitidis ER-3] Length=1134			
Score = 26.5 bits (55), Expect = 296 Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%), Gaps = 0/7 (0%)			
Query	2 NDIQLNQ 8		
	NDIQLNQ		
Sbjct	850 NDIQLNQ 856		

Abb. 11:

Ergebnis der Blastanfrage blastp der ersten 10 N-terminalen Aminosäuren der aufgereinigten Scolexinprobe (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.2.2 Immunhistochemischer Scolexin-Nachweis mithilfe des Scolexin-Antikörpers

3.2.2.1 Scolexin-Nachweis an Hämozyten-Monolayern

Zum Nachweis des Scolexins in Hämozyten wurde der Scolexin-Antikörper auf den hergestellten Hämozyten-Monolayern (s. Abschnitt 2.4.1) angewandt. Dabei wurden *E. coli*-infizierte Tiere (MS⁺+*E. coli*) verglichen mit Scolexin-Knockdown-Tieren (dsScoA+*E. coli*). Als Negativ-Kontrolle wurden Präparate ausschließlich mit sekundärem Antikörper behandelt.

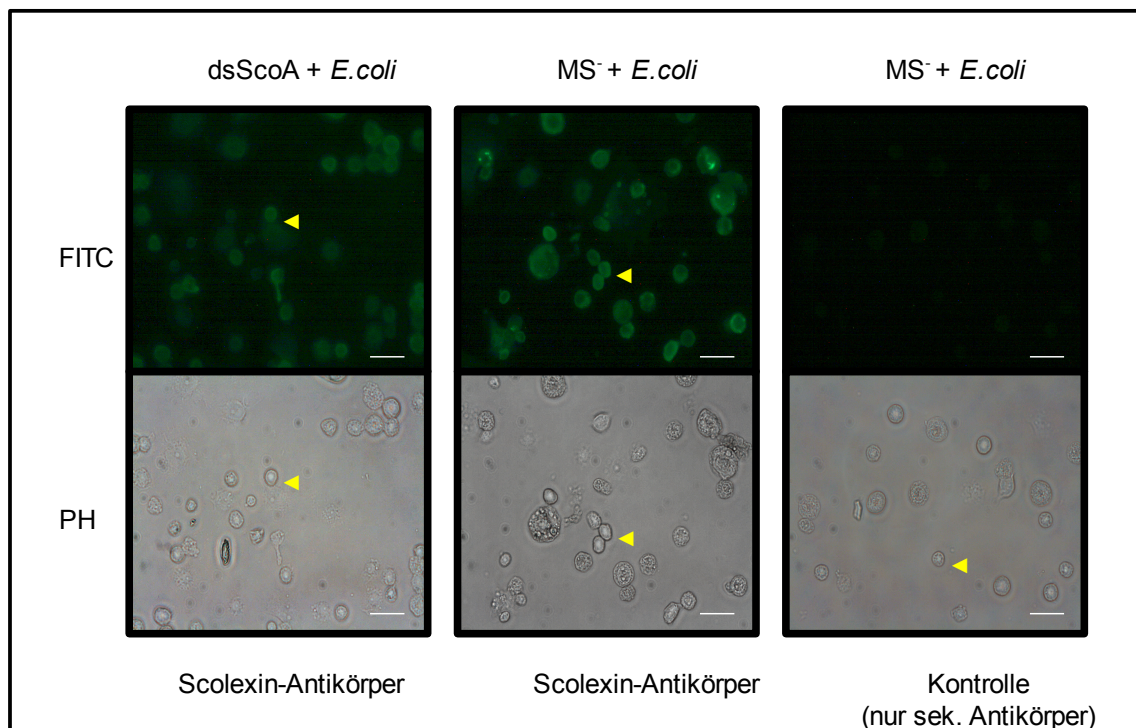


Abb. 12:

Darstellung des Scolexin-Nachweis an Hämozyten-Monolayern

Darstellung der Detektion von Scolexin an fixierten Hämozytenpräparaten mithilfe des polyklonalen Scolexin-Antikörpers. Fluoreszenzmarkierung durch FITC-markierten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova®)

[gelber Pfeil: Hämozyte (exemplarisch), Balken: 15 µm]

Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle ist bei beiden Versuchsansätzen mit Scolexin-Antikörperbehandlung eine deutliche Fluoreszenz zu beobachten, wobei die Intensität der Fluoreszenz marginal schwächer beim Knockdown-Ansatz (dsScoA

+*E. coli*) ist als beim *E. coli*-Ansatz (MS⁻+*E. coli*) (Abb. 12). Eine Differenzierung in Bezug auf die markierten Zelltypen unter Einbeziehung der Phasen-Kontrast-Darstellungen ist nicht auszumachen, da in beiden Ansätzen alle Zellen als Scolexin-positiv zu identifizieren sind.

3.2.2.2 Scolexin-Nachweis an Coagulationsfasern

Der Nachweis des Scolexins an Coagulationsstrukturen in der Hämolymphe erfolgte an *E. coli*-infizierten Larven. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, bindet der Scolexin-Antikörper sowohl an Coagulationsfäden in der Hämolymphe, als auch an assoziierten Hämozyten.

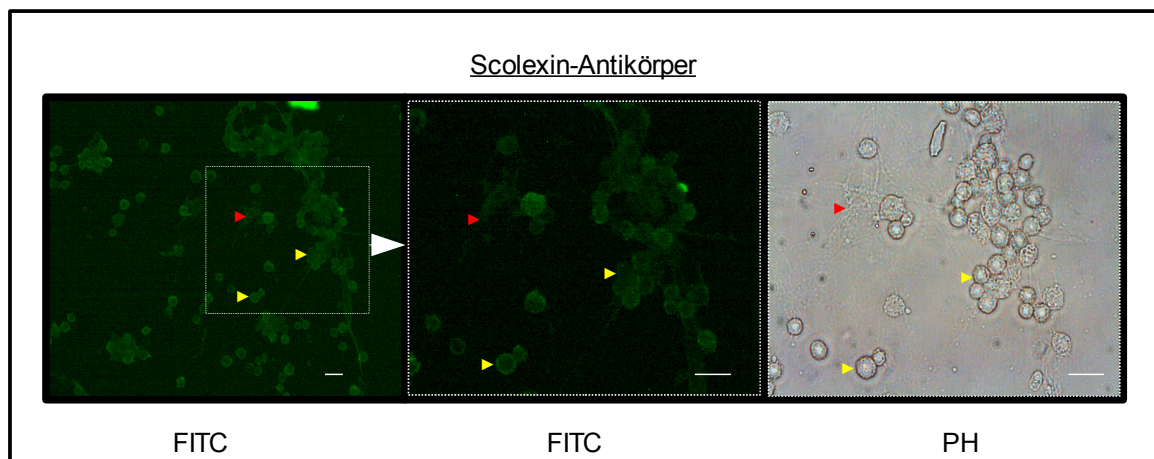


Abb. 13:

Darstellung des Scolexin-Nachweis an Coagulationsfasern

Darstellung der Detektion von Scolexin an fixierten Coagulationspräparaten mithilfe des polyklonalen Scolexin-Antikörpers. Fluoreszenzmarkierung durch FITC-markierten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova®)

[gelbe Pfeile: Hämozyten, roter Pfeil: Coagulationsfaden (exemplarisch), Balken: 15 µm]

3.2.2.3 Scolexin-Nachweis an einem Gewebeschnitt

Um Scolexin an Hämozyten in Paraffin-eingebetteten Ganzkörperquerschnitten nachzuweisen, wurde der Scolexin-Antikörper auf diversen Schnittfolgen des Abdomens von *M. sexta* angewandt.

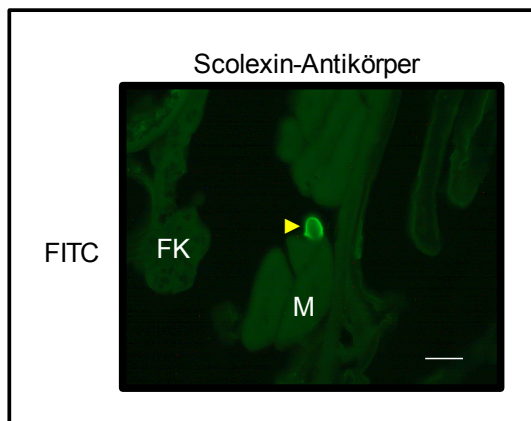


Abb. 14:
Darstellung des Scolexin-Nachweis an einem Gewebeschnitt
 Darstellung der Detektion von Scolexin am paraffineingebetteten Abdomenquerschnitt mithilfe des polyklonalen Scolexin-Antikörpers. Fluoreszenzmarkierung durch FITC-markierten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova®).
 [gelber Pfeil: Hämozyte, FK: Fettkörper; M: Muskel, Balken: 15 µm]

Die exemplarische Darstellung einer deutlich markierten Hämozyte in Abb. 14 belegt die Spezifität des Scolexin-Antikörpers, da die übrigen Gewebe nur autofluoreszierend sichtbar sind. Eine spezifische Markierung von Epidermis oder Mitteldarmepithel war nicht nachweisbar (hier nicht dargestellt).

3.2.3 5'-RACE der Scolexin A-Sequenz

Die Prozedur zur Durchführung der RACE zur Bestimmung des unbekannten 5'-Abschnitts der Scolexin A-Sequenz ist unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben. Die nachfolgende Abb. 15 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung des amplifizierten RACE-Produkts.

```

1  TTCNNCTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAACACTAC
51  AATGTTCAGCTCGAAGCAGTCGGTTGTGTTGGCGGTTGCGGCGGTGCTCTT
101 CGGGTGCGCGTGCGCAGCGCCCAATCCTGGCGCCAACGACATACAACCTTAA
151 TCAAAAATTAAGTATNGAAGCTAAGGGGGCAAAGCAGCCAATTGATNCGAG
151 GGCAGTGAAGGAATCGGTATCCATACGCAGTTCGGAGTTTCGGAGGCTTCT
201 GCGGAGGAACCATTATTTCAGTCCCACCTGATACTNTTNTC . . .
  
```

Abb. 15:
Hot-Shot-Sequenzierungsergebnis der 5'-RACE des Scolexin A aus infizierten L5d0-*M. sexta*-Hämozyten-RNA.
 [unterstrichen: unbekanntes 5'-Ende]

Zur eindeutigen Identifikation der in Abb. 15 erlangten Sequenz wurde diese in der NCBI-Datenbank mit den Scolexin-Sequenzen abgeglichen.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF087004.1	Manduca sexta scolexin A (SCA1) mRNA, partial cds	361	361	73%	9e-97	97%
AF087005.1	Manduca sexta scolexin B (SCB1) mRNA, partial cds	273	273	75%	3e-70	87%
DQ840514.1	Manduca sexta putative octopamine receptor (OAR) mRNA, complete	84.2	84.2	16%	3e-13	96%


```

>gb|AF087004.1|AF087004 Manduca sexta scolexin A (SCA1) mRNA, partial cds
Length=1030

Score = 361 bits (400), Expect = 9e-97
Identities = 212/218 (97%), Gaps = 2/218 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 67 GCAGTCGGTTGTGTTGGCGGTTGCGGCGGTGCTCTTCGGGTGCGCGTGCGCAGCGCCCAA 126
      |||
Sbjct 3 GCAGTCGGTTGTGTTGGCAGTGGCGGCGGTGCTCTTCGGGTGCGCGTGCGCAGCGCCCAA 62

Query 127 TCCTGGCGCCAACGACATACAACCTTAATCAAAAATTAAGTATNGAAGCTAAGGGGGCAAA 186
      |||
Sbjct 63 TCCTGGCGCCAACGACATACAACCTTAATCAAAAATTAAGTATCGAAGCTAAGGGGGCAAA 122

Query 187 GCAGCCAATTGATNCGAGGGCAGTGAAGGAATCGGTATCCATACGCAGTTCGGAGTTTCG 246
      |||
Sbjct 123 GCAGCCAATTGATACGAGGGCAGTGAAGGAA-CGGTATCCATACGCAGTTCGGAGTTTCG 181

Query 247 GAGGCTTCTGCGGAGGAACCATTTATTCAGTCCCACCTG 284
      |||
Sbjct 182 GAGGCTTCTGCGGAGGAACCATTA-TCAGTCCCACCTG 218

```

Abb. 16:
Darstellung des Abgleichs des Hot-Shot-Sequenzierungsergebnisses der 5'-RACE des Scolexin A mit der NCBI-Nukleotiddatenbank

Zur präziseren Einordnung der „geracten“ Sequenz wurde ein Alignment mit dem 5'-Ende der Scolexin-A-Sequenz durchgeführt. Auf diese Weise konnte auch das korrekte Leseraster überprüft werden.

Abb. 17 zeigt, dass 18 Nucleotide (blau), welche auch das Startcodon für die Translation enthalten (unterstrichen), am 5'-Ende der Scolexin-A-Sequenz die von FINNERTY et al. (1999) veröffentlichte Sequenz vervollständigen.

Vorangestellt und rot markiert ist das *Gene Racer Oligo*-Molekül (Invitrogen®).

RACE	1	TT	CNNCTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAA	ACTACAATGTTTCAG
ScoA	1	-----	-----	-----
RACE	61	CTCG	AAGCAGTCGGTTGTGTTGGCGGTTGCGGCGGTGCTCTTCGGGTGCGCGTGCGCAGC	
ScoA	1	----	CGGCAGTCGGTTGTGTTGGCAGTGGCGGCGGTGCTCTTCGGGTGCGCGTGCGCAGC	
RACE	121	GCCCAATCCTGGCGCCAACGACATACAACTTAATCAAAAATTAAGTATNGAAGCTAAGGG		
ScoA	57	GCCCAATCCTGGCGCCAACGACATACAACTTAATCAAAAATTAAGTATCGAAGCTAAGGG		
RACE	181	GGCAAAGCAGCCAATTGATNCGAGGGCAGTGAAGGAATCGGTATCCATACGCAGTTCGGA		
ScoA	117	GGCAAAGCAGCCAATTGATACGAGGGCAGTGAAGGAA-CGGTATCCATACGCAGTTCGGA		
RACE	241	GTTTCGGAGGCTTCTGCGGAGGAACCATTATTTCAGTCCCACCTG-----	..	
ScoA	176	GTTTCGGAGGCTTCTGCGGAGGAACCATTAT-CAGTCCCACCTGGATCCTGACCGCC	..	

Abb. 17:

Alignment der 5'-RACE-Sequenz mit der Scolexin-A-Sequenz (FINNERTY et al. 1999)

[rot: *Gene Racer Oligo*-Sequenz, blau: „gerachte“ 5'-Sequenz]

3.2.4 Expressionsanalysen des Scolexin

Die Expressionsanalysen sind im Folgenden meist als Ergebnisse von reverser Transkription extrahierter mRNA und anschließender Amplifikation mithilfe PCR durch Geldokumentationen dargestellt. Ihre Aussagekraft ist immer relativ zur Signalstärke des rpS3, das als Ladekontrolle zu jedem Versuchsansatz mitgeführt worden ist. Das ribosomale Protein S3 in *M. sexta* wird konstitutiv exprimiert und eignet sich ausgezeichnet als Referenzprobe.

3.2.4.1 Expression der Scolexin-Isoformen in Hämocyten von L5d0-Larven nach Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen

Die Durchführung der Infektion der Versuchstiere und die anschließende Prozedur der Hämocytingewinnung, der RNA-Extraktion und der Amplifikation der Zielsequenzen des Scolexin A und B durch PCR wurde in den Abschnitten 2.3.1, 2.3.4 und 2.6.1 beschrieben. Abb. 18 belegt, dass Scolexin A nach einer Infektion mit *E. coli*, *B. megaterium* und *S. cerevisiae* exprimiert wird, jedoch unbehandelte, sowie verwundete, aber nicht infizierte, und Saline-behandelte Larven keine

Expression von Scolexin A aufweisen. Der Nachweis der Scolexin-Isoform B gelang in keinem der untersuchten Ansätze.

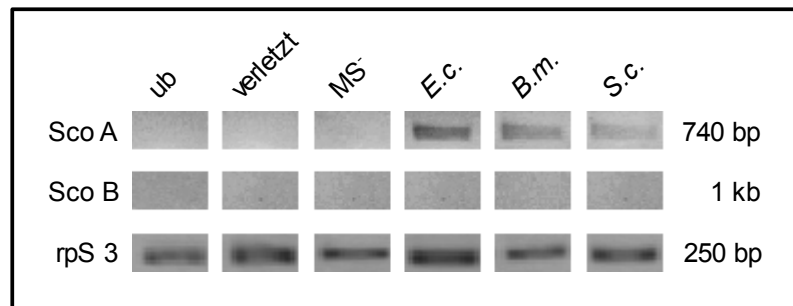


Abb. 18:
Darstellung der Expression der Scolexin-Isoformen in
Hämozyten von L5d0-Larven nach Infektion mit
unterschiedlichen Pathogenen
 [ScoA: Scolexin A, rpS3: ribosomales Protein 3, MS-:
 Manduca-Saline- ub: unbehandelt, E.c.: *E. coli*, B.m.:
Bacillus megaterium, S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*
 bp: Basenpaare]

3.2.4.2 Nachweis der Scolexin-A-mRNA in Hämozyten durch *in situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben durchgeführt an Zellpräparaten von naiven (ub) und von *E. coli*-infizierten Tieren (ScoA). Als Spezifitätskontrolle wurde in einem Kontrollansatz (FeS) eine Sonde eingesetzt, die spezifisch einen Abschnitt der Nukleotidsequenz für das Rieske-FeS-Proteins in Chloroplasten der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* erkennt (s. Abschnitt 2.6.5). Weitere Kontrollen waren ein Ansatz ohne ScoA-Sonde mit Antikörper (KoSmAk) und ein Ansatz ohne ScoA-Sonde ohne Antikörper (KoSoAk). Nur im Versuchsansatz ScoA/*E.coli* konnte die Expression von Scolexin nachgewiesen werden, und zwar in allen Hämozytentypen (Abb. 9).

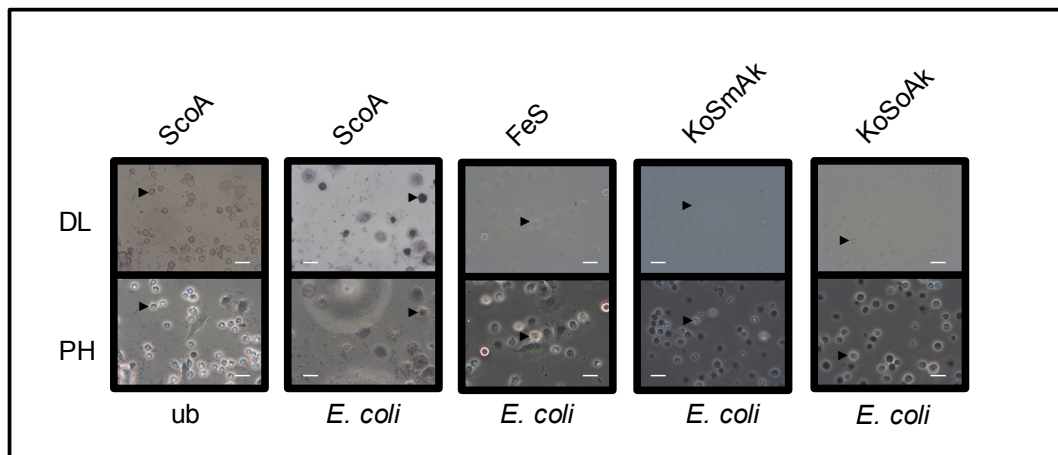


Abb. 19:

Darstellung der Detektion der Scolexin-A-mRNA in Hämocyten durch *in situ*-Hybridisierung

[DL: Durchlicht, PH: Phasen-Kontrast, ub: unbehandelt, ScoA: Scolexin-A-Sonde, FeS: unspezifische Kontrollsonde, KoSmAk: Kontrolle ohne Sonde mit Antikörper, KoSoAk: Kontrolle ohne Sonde ohne Antikörper, Balken: 15 µm]

3.2.4.3 Expression der Scolexin-Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *M. sexta*

Nachdem die Expression von Scolexin im 5. Larvenstadium von *M. sexta* analysiert worden war (Abschnitt 3.2.4.1), wurden auch die übrigen Entwicklungsstadien auf Expression von Scolexin in Hämocyten untersucht. Zu diesem Zweck wurde exemplarisch Hämocyten-RNA von Puppen (d0) und Imagines (d0), sowie RNA von homogenisierten Embryonen unterschiedlichen Alters (48 h, 72 h, 96 h) für die Expressionsanalysen verwendet (Abb. 20).

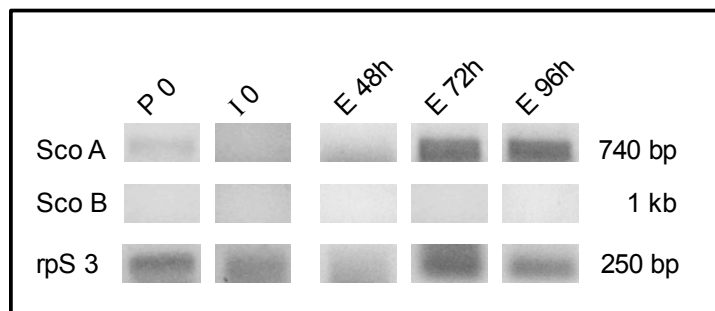


Abb. 20:

Darstellung der Expression der Scolexin-Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *M. sexta*

ScoA: Scolexin A, rpS3: ribosomales Protein 3, P 0: Puppe Tag 0, I 0: Imago Tag 0, E: Embryo, bp: Basenpaare]

Auch in diesem Fall konnte in keinem Stadium eine Expression von Scolexin B nachgewiesen werden.

Die Expression von Scolexin A in Hämocyten von Imagines war nicht nachweisbar, und nur sehr schwach erkennbar in Puppen. Deutlicher konnte sie in 72 h und 96 h alten Embryonen nachgewiesen werden, während sie in den 48 h-Proben nicht erkennbar war.

3.2.5 Knockdown der Scolexin-A-Expression durch RNAi

Den L5d0-Versuchstieren wurde dsScoA, bzw. dsFeS, oder MS⁻-Saline als Kontrolle, injiziert. Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Larven anschließend mit *E. coli* infiziert, bzw. mit Saline behandelt (Kontrolle) und nach Abschnitt 2.6.3 für die Expressionsanalyse vorbereitet.

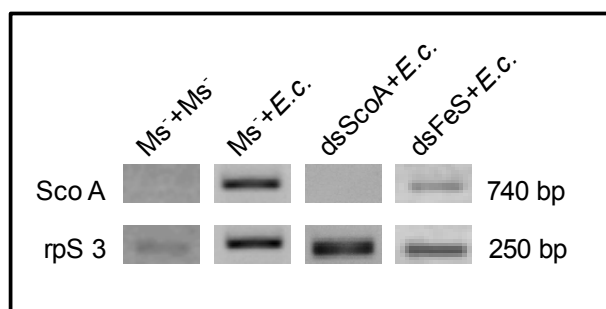


Abb. 21:

Darstellung des Knockdown der Scolexin-A-Expression durch RNAi

[ScoA: Scolexin A, rpS3: ribosomales Protein 3, MS⁻: Manduca-Saline⁻, E.c.: *E. coli*, dsScoA: doppelsträngige RNA mit Scolexin-A-Ziel, dsFeS: doppelsträngige RNA mit unspezifischer Kontroll-Sequenz, bp: Basenpaare]

Wie erwartet, zeigen die doppelt-MS⁻-Saline-behandelten Kontrolltiere keine Scolexin-A-Expression, während die MS⁻-Saline+*E. coli*-infizierten Tiere Scolexin A exprimieren. Ebenso zeigen die dsFeS+*E. coli*-Tiere Scolexin-A-Expression. Der dsScoA+*E.coli*-Ansatz hingegen weist keine Expression auf (Abb. 21).

3.2.5.1 Einfluss des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Expression anderer immuninduzierbarer Gene

Um die Frage zu klären, ob der Knockdown der Scolexin-A-Expression innerhalb der Immunantwort auch die Expression anderer, immuninduzierbarer Gene beeinflusst, wurde exemplarisch die Expression von Lysozym, Hämolin und Cecropin in Hämocyten von L5d0-Knockdown-Versuchstieren untersucht.

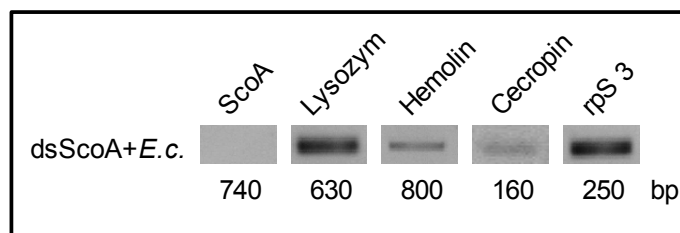


Abb. 22:
Darstellung des Einflusses des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Expression anderer immuninduzierter Gene
 [ScoA: Scolexin A, dsScoA: doppelsträngige RNA mit Scolexin-A-Ziel, *E.c.*: *E. coli*, rpS3: ribosomales Protein 3, bp: Basenpaare]

Die Expression von allen drei Genen konnte in den Scolexin-A-Knockdown-Tieren nachgewiesen werden.

3.2.5.2 Orale Verabreichung von dsScoA an L5d0-Versuchstieren

Um herauszufinden, ob die orale Aufnahme von dsScoA einen ebenso nachweisbaren Knockdown der Scolexin-A-Expression hervorrufen würde, wurde jeweils eine definierte und sterilisierte Kunstfuttermenge mit der entsprechenden Mengeneinheit pro Tier dsScoA-Lösung versetzt und den L5d0-Versuchstieren zu Fressen

gegeben. Nachdem das gesamte Futter aufgenommen worden war ($t=0$), wurden die Tiere nach 6-stündiger Inkubationszeit mit *E. coli* infiziert (s. Abschnitt 2.3.1). Als Kontrolle diente ein paralleler Ansatz mit der herkömmlichen Behandlung mit injizierter dsScoA und anschließender Infektion (Abb. 23).

Die Tiere des „Futteransatz“ zeigen eine, wenn auch schwache, Expression des Scolexin A, während eine Expression in den Kontrolltieren („Injektionsansatz“) nicht nachweisbar ist.

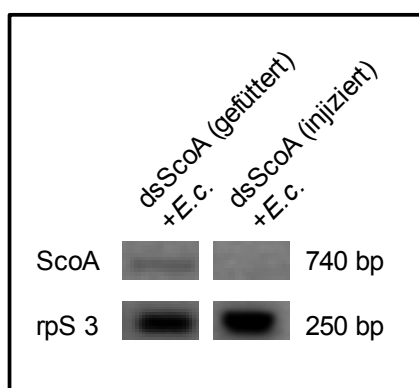


Abb. 23:
Darstellung der Scolexin-A-Expression nach Verabreichung von dsScoA an L5d0-Versuchstiere
ScoA: Scolexin A, dsScoA: doppelsträngige RNA mit Scolexin-A-Ziel, rpS3: ribosomales Protein 3, bp: Basenpaare]

3.2.5.3 Infektion der L5d0-Versuchstiere mit FITC-markierten *E. coli*

Zur Vorbereitung von Untersuchungen über den Einfluss von Scolexin auf die Phagozytoseaktivität von Hämozyten infolge einer Infektion wurden die Versuchstiere mit FITC-markierten *E. coli* infiziert, anstelle von unmarkierten *E. coli* wie bisher (s. Abschnitt 2.3.1). Überraschenderweise zeigten in den Vorversuchen neben den Knockout-Tieren jedoch auch die Kontrolltiere, die mit Saline anstelle von dsScoA behandelt worden sind und anschließend mit FITC-markierten *E. coli* infiziert wurden, keine Scolexin-A-Expression (Abb. 24).

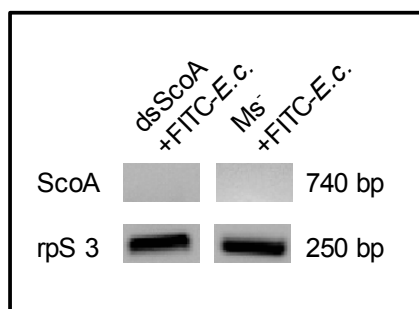


Abb. 24:
Ergebnis der Infektion der L5d0-Versuchstiere mit FITC-markierten *E. coli*
[ScoA: Scolexin A, rpS3: ribosomales Protein 3, dsScoA: doppelsträngige RNA mit Scolexin-A-Ziel, MS-: Manduca-Saline-, FITC-E.c.: FITC-markierte *E. coli*, bp: Basenpaare]

Um ausschließen zu können, dass dieses Ergebnis ein Artefakt war oder aufgrund anderer Fehlerquellen zustande kam, wurde es eingehender analysiert. Dabei wurden in einem Versuchsansatz L5d0-Larven FITC-markierte *E. coli* und in einem Kontrollansatz unmarkierte *E. coli* injiziert. Beide Proben wurden daraufhin auf Scolexin-A-Expression getestet. Darüberhinaus wurden sie ebenso auf Lysozym- und Hämolin-Expression als Positivkontrolle untersucht.

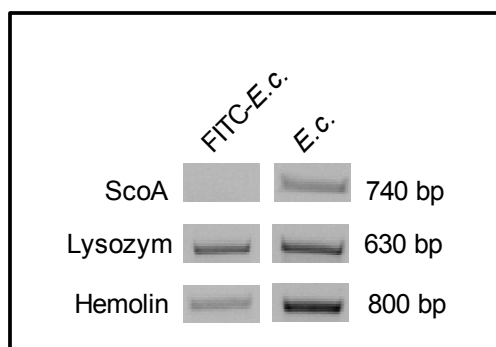


Abb. 25:
Darstellung des Vergleichs von *E. coli*- und FITC-*E.coli*- infizierten Versuchstieren hinsichtlich der Scolexin-, Lysozym- und Hämolin-Expression
[ScoA: Scolexin A, E.c.: *E. coli*, FITC-E.c.: FITC-markierte *E. coli*, bp: Basenpaare]

Wie erwartet, wurden in beiden Ansätzen Lysozym- und Hämolin-Expression nachgewiesen. Die Expression für Scolexin A ließ sich nur beim Kontrollansatz mit den unmarkierten *E. coli*-behandelten Larven nachweisen. Das Ergebnis für die FITC markierten *E. coli*-behandelten Versuchstiere von Abb. 24 wurde bestätigt.

Die Markierung der *E. coli* mit FITC erfolgt in zwei wesentlichen Schritten: erstens die Vorbehandlung der *E. coli* durch Natriumbicarbonatpuffer, zweitens die anschließende Kopplung der Bakterien mit dem Fluoreszenzmolekül FITC.

Um die Frage zu klären, welche dieser Schritte die entscheidende Veränderung der *E. coli* verursacht, sodass nach einer Infektion mit dieser keine Scolexin-A-Expression nachgewiesen werden kann, wurden Versuchstiere sowohl mit Natriumbicarbonatpuffer-behandelten, aber unmarkierten *E. coli*, als auch mit Natriumbicarbonatpuffer-behandelten, und FITC-markierten *E. coli* als Kontrolle infiziert.

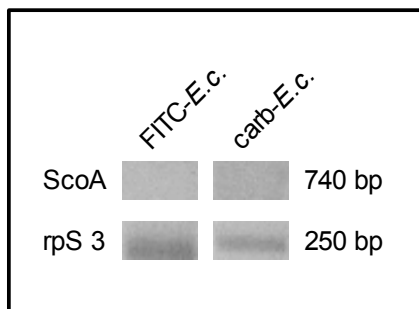


Abb. 26:
Darstellung des Vergleichs von carbonatbehandelten *E.coli*- und FITC-*E. coli*-infizierter Versuchstiere hinsichtlich der Scolexin-Expression

[ScoA: Scolexin A, FITC-*E.c.*: FITC-markierte *E. coli*, carb-*E.c.*: carbonatbehandelte *E.coli*, rpS3: ribosomales Protein 3, bp: Basenpaare]

In beiden Fällen ist keine Scolexin-A-Expression nachweisbar. Somit ist schon die Bicarbonat-Behandlung der entscheidende Faktor für die fehlende Scolexin-Expression (Abb. 26).

Aus diesem Grund waren zudem die geplanten Phagozytose-Untersuchungen nicht mehr durchführbar.

3.2.5.4 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Clearance

Ein Weg, die Fähigkeit der Hämozyten Eindringlinge aus der Hämolymphe zu entfernen, ist die Bestimmung der sogenannten Clearance. Hierbei wird eine ausgezählte Anzahl von lebenden Bakterien in das Versuchstier injiziert. Nach entsprechender Inkubationszeit wird dem Tier die gesamte Hämolymphe entnommen (s. Abschnitt 2.3.3), verdünnt und auf Standard-1-Medium-Agarplatten ausgestrichen. Die Anzahl der entstehenden Kolonien wird hochgerechnet auf die Anzahl der Bakterien im Hämocöl des Versuchstieres zum Zeitpunkt der Hämolymphentnahme, und in Relation zu der Gesamtzahl der injizierten Bakterien gesetzt.

In diesem Fall wurden je Versuchstier 10^8 lebende *E. coli* injiziert, zum einen in zuvor MS⁻-behandelten Tieren (MS⁻+*E. coli*), und zum anderen in zuvor dsScoA-behandelten Tieren (dsScoA+*E. coli*).

Wie in Abb. 27 zu sehen ist, gibt es einen geringen, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der wiedergewonnen Bakterien bei den Knockdown-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Somit kann man festhalten,

dass die Clearance-Kapazität durch den Knockdown der Scolexin-Expression kaum beeinflusst wird.

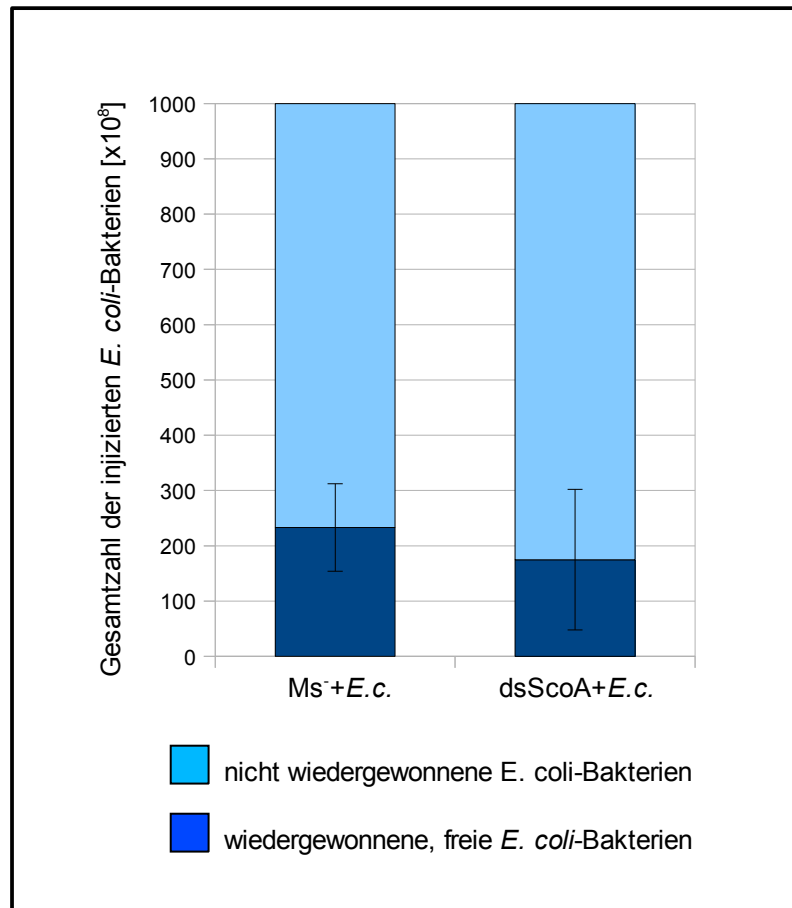


Abb. 27:
Darstellung der „Clearance“ injizierter, lebender *E. coli*
aus der Hämolymphe
 [*E.c.*: *E. coli*, dsScoA: doppelsträngige RNA mit Scolexin-A-Ziel,
 MS⁻: Manduca-Saline]

3.2.5.5 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Einkapselungsfähigkeit der Hämozyten

Da die Einkapselung von Eindringlingen durch Hämozyten meist einhergeht mit der Melanisierung der gebildeten Noduli, wurden nach der Infektion der Knockdown-Versuchstiere (dsScoA+*E.coli*) und die Kontrolltiere (MS⁻+*E.coli*)

aufpräpariert (s. Abschnitt 2.3.5), und die Anzahl der melanisierten Noduli verglichen (Abb. 28). Als Referenz wurden zuvor unbehandelte Tiere (ub) und *E. coli*-infizierte Tiere gegenübergestellt und dokumentiert

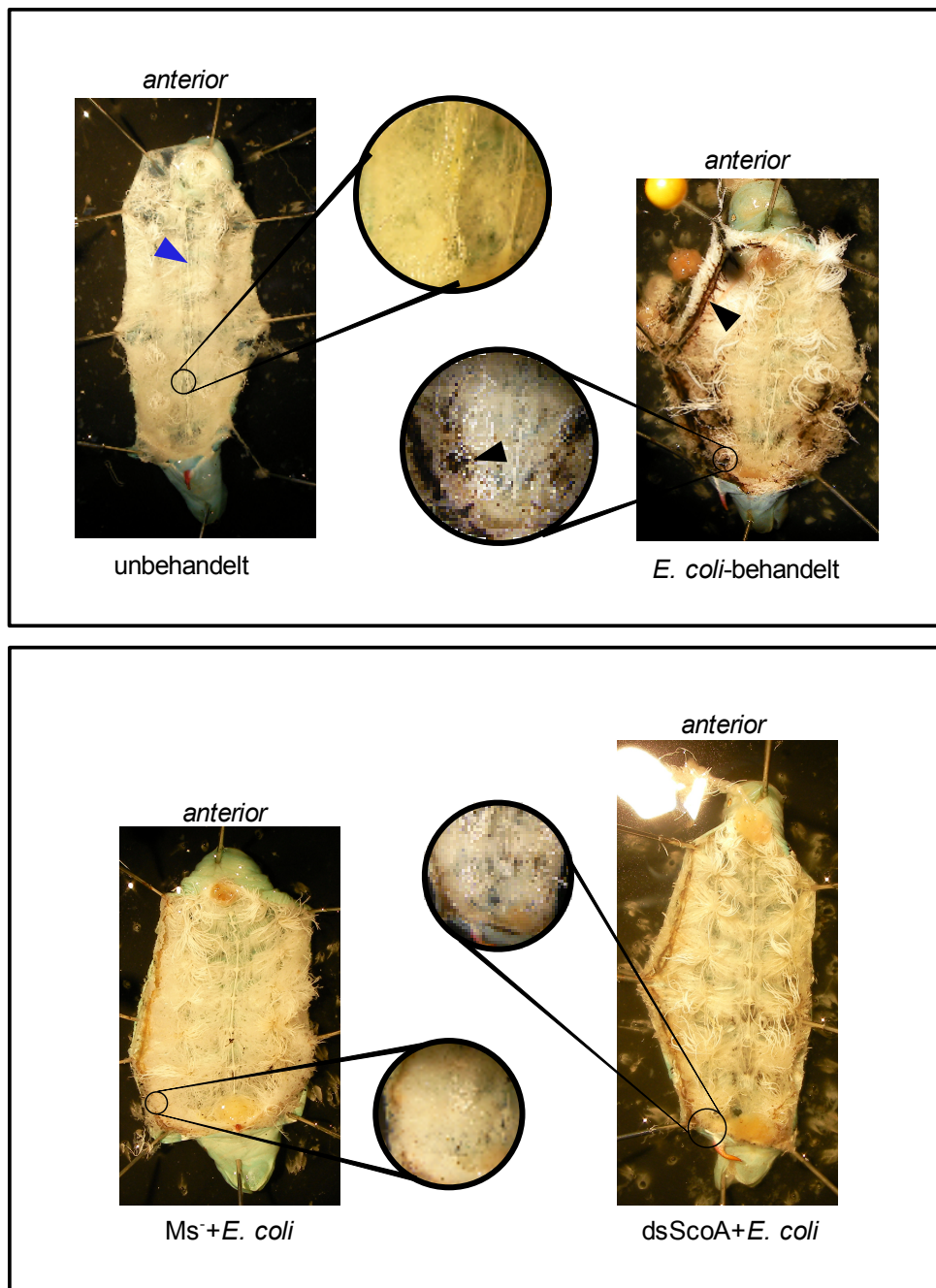


Abb. 28:
Darstellung des Einflusses des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Einkapselungsfähigkeit der Hämozyten

Durch optische Analyse der Knockout-Tiere konnte kein Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Der Knockdown der Scolexin-A-Expression scheint keinen signifikanten Einfluß auf die Einkapselungsfähigkeit der Hämozyten zu haben. Auffällig ist, dass sowohl die Knockdown-Tiere als auch ihre Kontrollansätze eine geringe Melanisierung vor allem des Dorsalgefäßes aufweisen.

4 Diskussion

4.1 Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi) in dieser Arbeit

Die rasante Verbreitung der Anwendung von RNAi in der Forschung innerhalb der letzten zehn Jahre hat vor allem zwei Gründe: Es scheint bei allen Eukaryoten gleichermaßen zu funktionieren, und man kann die Expression eines einzelnen Gens innerhalb eines intakten Systems zu einem bestimmten Zeitpunkt beeinflussen.

Bis zu diesem Zeitpunkt war es nur in transgenen Versuchs- oder Mutationsorganismen möglich, diese Art von punktuelltem Expression-Knockdown zu untersuchen. Es muss jedoch in diesen Versuchsansätzen in Kauf genommen werden, dass solche dauerhaften Knockdowns beispielsweise die Entwicklung dieser Individuen beeinflussen können. Somit ist ein natürliches, intaktes System nicht gegeben, und auch nicht mit den Vorgängen in einem gesunden Organismus vergleichbar.

Die induzierte RNA-Interferenz erlaubt den restriktiven Knockdown eines einzelnen Gens. Dies wurde auch in dieser Arbeit belegt (s. Abschnitt 3.1.2 und 3.2.5). Als Werkzeug diente die *in vitro*-synthetisierte, doppelsträngige RNA, die den Versuchstieren injiziert worden war. Aktuell wären auch kommerziell erhältliche RNAi-Reagenzien von diversen Anbietern einsetzbar, bestehend aus synthetischen siRNA (*small interfering RNA*) oder shRNA (*short hairpin RNA*), die mit der gewünschten Zielsequenz bestellt werden können, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird.

Zum Verständnis soll hier ein kurzer Überblick über den Ablauf der RNAi-Methode gegeben werden (McMANUS & SHARP 2002, SASHITAL & DOUDNA 2010): Nach dem Einbringen der dsRNA-Moleküle in das Versuchstier werden die dsRNA-Moleküle von den Zellen aufgenommen. Die dsRNA wird im Cytoplasma vom sogenannten *Dicer*-Molekül, einer Typ-III-Ribonuclease, erkannt, welche die Bildung des sog. RISC (*RNA-induced silencing complex*) initiiert. In dem RISC, bestehend aus dem erwähnten *Dicer*, einem dsRNA-bindendem Proteinkomplex, und Argonaut-2, einer Endonuklease der Argonaut-Proteinfamilie, wird zunächst die dsRNA durch den

Dicer in 20-25 Nukleotide lange, doppelsträngige RNA-Fragmente geschnitten. Anschließend lösen sich die Einzelstränge der dsRNA, und der zur Ziel-mRNA komplementäre Einzelstrang lagert sich an die passende Sequenz der Ziel-mRNA an. Das Argonaut-2-Protein schneidet nun diese dsRNA bestehend aus Ziel-mRNA und komplementärem Fragment. Die so zerstückelte mRNA wird im Cytoplasma nach Dissoziation des RISC durch Exonucleasen vollständig abgebaut. Somit wird die Translation des Zielgens verhindert, wenn auch nicht vollständig.

Es liegt auf der Hand, dass der Knockdown von diversen Faktoren, wie beispielsweise der Intensität der Genregulation, von der Menge des zugeführten RNAi-Reagenz' und Ähnlichem abhängig sein kann. Ein vollständiger Ausfall wie bei einer Punktmutation oder einer Deletion in einem gentechnisch verändertem Organismus ist nicht zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Erfolg des Knockdowns mittels Nachweis der mRNA in Hämozyten durch Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) überprüft. Auch wenn in den meisten Fällen ein vollständiges Fehlen der mRNAs belegt worden war, so kann dieses nur auf eine so geringe Menge mRNA im extrahierten RNA-Pool zurückzuführen sein, dass diese Menge unterhalb der Nachweisgrenze des RT-PCR-Ansatzes liegt. Somit ist auch in der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass im Rahmen der jeweiligen Knockout-Versuche durchaus Scolexin oder Hämolin synthetisiert worden sein kann, wenn auch in geringsten Mengen.

4.2 Hämolin

4.2.1 Expression und Knockdown des Hämolin

Neben dem Fettkörper als Hauptsyntheseort für Hämolin (FAYE & WYATT 1980) haben speziell für *Manduca sexta* TRENCZEK & FAYE (1988) auch die Hämozyten als Produzenten nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Aussage bestätigt werden (s. Abschnitt 3.1.1). Auch die Ergebnisse zur Expression von PGRP und Immulectin-2 entsprachen den Erwartungen, d.h. wie sie bereits YU & KANOST (2000) beschrieben.

Nach der Synthese des RNAi-Reagenz und des erfolgreichen Knockdowns der

Hämolin-Expression wurde der Effekt des „Hämolin-Knockdowns“ auf die Einkapselungsfähigkeit der Hämozyten getestet. Zunächst sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass die Kontrollen für den erfolgreichen Knockdown allesamt anhand extrahierter Hämozyten-mRNA als *template* für RT-PCR genutzt worden sind. Es wird hierbei vorausgesetzt, dass die doppelsträngige RNA durch das Injizieren in das Hämocöl jedes Gewebe, welches Hämolin synthetisiert (Fettkörper, Hämozyten und andere), erreicht und aufgenommen werden kann. Da seit der Entdeckung des RNA-Interferenz (FIRE et al. 1998) keine Restriktionen bezüglich der unspezifischen Aufnahme von dsRNA durch Zellen bekannt sind, wurde auf den Nachweis des Knockdowns im Fettkörper verzichtet.

4.2.2 Effekt des Hämolin-Knockdowns auf die Fähigkeit infizierter Tiere zur Nodulibildung

Abbildung 5 (Abschnitt 3.1.3) zeigt den Effekt des Hämolin-Knockdowns (dsHem+E.c.) im Vergleich zu den Kontrolltieren (dsCon+E.c. und PBS+E.c.). Deutlich ist die verminderte Einkapselungseffektivität nachgewiesen worden. Eine Melanisierung, die mit der Einkapselung meist einhergeht, ist nicht zu erkennen. Somit ist Hämolin nachweislich entscheidend an der Einkapselungsreaktion beteiligt. Doch welche Funktion nimmt Hämolin im Einkapselungsprozess wahr? Es sind zwei Eigenschaften des Proteins bekannt, die einen Erklärungsansatz erlauben:

Eine bereits erwähnte Eigenschaft des Hämolin ist, dass es *in vitro* an Hämozyten bindet (LADENDORFF & KANOST 1991). Dabei inhibiert es die Aggregation der Hämozyten. Man kann also folgern, dass Hämolin einen unmittelbaren Effekt auf das Adhäsionsverhalten von Hämozyten hat, welcher in gleichem Maße die Einkapselungsreaktion beeinflusst.

Es sind die beiden Hämozytentypen Plasmatozyten und Granuläre Zellen, die für die Einkapselung verantwortlich sind. Um diese Funktion erfüllen zu können, müssen sie bestimmte Oberflächenstrukturen aufweisen, die nur dann zum Tragen kommen, wenn sie benötigt werden. In Plasmatozytenmembranen wurde von WIEGAND et al. (2000) ein durch Antikörper inhibierbares Adhäsionsmolekül

nachgewiesen, das als ein Integrin identifiziert wurde und eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Adhäsion der Zellen innehat (LEVIN et al. 2005). Etwas später beschreiben NARDI und Mitarbeiter (NARDI et al. 2006) anhand von *in vitro*-Untersuchungen über die Expression von Neuroglian, ebenfalls ein Adhäsionsmolekül, die Adhäsionseigenschaften der Hämocyten, und unterscheiden dabei Fremdstruktur-adhäsive, Neuroglian-positive Plasmatozyten, die sie mithilfe spezifischer Antikörpermarkierungen von Neuroglian-negativen Plasmatozyten mit nicht-Fremdstruktur-adhäsiven Eigenschaften unterscheiden können. Diese Neuroglian-positiven Plasmatozyten verhalten sich adhäsiv an fremden Oberflächenstrukturen, allerdings nur in Anwesenheit von Granulären Zellen, während Neuroglian-negative Plasmatozyten an Granuläre Zellen binden, jedoch nicht an fremde Oberflächen adhäreren. Der Einkapselungsprozess wird somit vermutlich durch die Adhäsion Neuroglian-positiver Plasmatozyten an eingedrungenen Fremdkörpern eingeleitet und durch weitere Anlagerung von Neuroglian-negativen Plasmatozyten und Granulären Zellen fortgeführt wird. Einschränkend muss gesagt werden, dass dieses Modell bisher nur für anorganische Oberflächenstrukturen Gültigkeit hat und *in vitro* durchgeführt worden ist. Ob es sich auch vorbehaltlos auf das Geschehen *in vivo* und einer beispielsweise Bakterienoberfläche als Adhäsionsfokus übertragen lässt, bleibt offen.

Die in Abb. 5 dargestellten Ergebnisse lassen zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: entweder beschränkt sich der Einfluss des Hämolin ausschließlich auf das Adhäsionsverhalten der Hämocyten auf die Adhäsivität der Zellen untereinander und der Einfluss des Hämolin auf die Einkapselungsfähigkeit von Fremdkörpern hat keinen Bezug zu diesem Adhäsionsverhalten. Dieses setzt natürlich voraus, dass die Ergebnisse der LADENDORFF'schen Untersuchungen, die ausschließlich *in vitro* durchgeführt worden sind, auch *in vivo* gültig sind, was durchaus mit Vorbehalt zu betrachten ist.

Oder der unmittelbare Einfluss des Hämolin während der Nodulation auf die beteiligten Hämocyten ist ohne Bezug zur Wechselwirkung der Adhäsionsvorgänge. In diesem Fall lässt sich die genaue Funktion des Hämolin nicht ermitteln.

Die andere relevante Eigenschaft des Hämolins wurde von YU und KANOST (2002) beschrieben. Die Zugabe von isoliertem Hämolin in eine *E. coli*-Suspension führt zur Aggregation der *E. coli*-Zellen. Als Ursache für diese Bakterienaggregation wurde der Bindungsnachweis des Hämolins an das Lipopolysaccharid (LPS) angeführt. Eine mögliche Hypothese ist, dass erst die Bindung des Hämolins an die Bakterien den Aggregationsprozess möglich macht. Wie dies im Detail erfolgt, ob eine Hämolin-Hämolin-homophile Bindung wie von FAYE & WYATT (1980) angenommen zugrunde liegt, oder Cofaktoren aus der Hämolymphe die Aggregation vermitteln, ist weiterhin offen. Eine ähnliche Funktion für das Hämolin wurde schon bezüglich der Phagozytose von Bakterien durch Hämozyten diskutiert (KANOST & ZHAO 1996). Die vorliegenden Ergebnisse lassen diese Diskussion auch auf die Nodulation ausweiten. Entsprechend der Opsonierungswirkung von Hämolin bei der Phagozytose von Bakterien (KANOST & ZHAO 1996), könnte die Bindung von Hämolin an *E.coli* von den Hämozyten als Aktivierung oder Verstärkung einer Nodulibildung Grundlage sein. Jedoch sollten einige Punkte dabei bedacht werden: Für das Erkennen des gebundenen Hämolins, genauer gesagt des Hämolin-Bakterien-Komplexes, bedarf es eines weiteren Erkennungssystems, im einfachsten Fall einem membranständigen Rezeptor an den Hämozyten. Bis dato ist in der Literatur, auch trotz moderner Transkriptomanalysen (ZHOU et al. 2008), nichts dergleichen bekannt. Darüberhinaus müsste für die Erkennung des gebundenen Hämolins durch einen hypothetischen Rezeptor das Hämolin selbst eine strukturelle Veränderung erfahren oder es müsste oberflächlich verändert werden, um sich von ungebundenem Hämolin zu unterscheiden. Andernfalls könnte freies, ungebundenes Hämolin, z.B. von den Hämozyten selbst exprimiert und sezerniert, an den Rezeptor binden und die Hämozyten zur Einkapselung aktivieren. Da, wie bereits erwähnt, hierfür keinerlei Indizien existieren, bleiben diese Annahmen spekulativ.

Betrachtet man nicht die Bindung des Hämolins an die Bakterien als maßgeblich, sondern den Aggregationseffekt, vorausgesetzt er findet gleichermaßen *in vivo* statt, so ergibt sich eine einfache, mögliche Erklärung. Da Bakterien (1-2 μm) um ein Vielfaches kleiner sind als Hämozyten (15-25 μm) werden wohl einzelne Bakterien während der Immunabwehr eher phagozytiert als in Noduli geschlossen.

Entstehen jedoch durch das Hämolin Bakterienaggregationen im Hämocöl, könnten diese, weil von größerem Ausmaß, wiederum eingekapselt werden. Verhindert man jedoch durch Knockdown-Versuche die Synthese von Hämolin und infiziert die Tiere anschließend, verbleiben die Bakterien vereinzelt, und es finden keine oder fast keine Einkapselungen statt. Die Annahme, dass Hämolin *in vivo* denselben aggregierenden Effekt auf Mikroorganismen hat wie *in vitro*, erscheint folgerichtig, da auch der Nutzen für den Organismus offensichtlich ist. Durch die Aggregation der eingedrungenen Bakterien wird ihre Ausbreitung und somit ihr pathogenes Potential begrenzt. Sie sind dadurch leichter zu bekämpfen. In Anbetracht der Ausführungen stellt sich diese letzte und einfachste Deutung der Ergebnisse als die wahrscheinlichste dar.

4.3 Scolexin

4.3.1 Aufreinigung des nativen Scolexins aus der Hämolymphe von *M. sexta*

Die Aufreinigung des Scolexins aus der Hämolymphe von L5d0-Raupen von *M. sexta* hatte zum Ziel, das möglichst reine Scolexin als Antigen für die Antikörpergewinnung zu verwenden. Die einzelnen Schritte sollen der Übersichtlichkeit wegen noch einmal kurz dargestellt werden:

- Fraktionierung der Hämolympheproteine durch Ammoniumsulfatfällung
- Auftrennung der Proteine der „Scolexin-Fraktion“ durch Größenausschlusschromatographie
- Identifizierung des Scolexins durch N-terminale Aminosäuresequenzierung
- Isolierung des Gesamt-Scolexins nach SCZEWCZYCK et al. (2009) und Auftrag zur Antikörperentwicklung

Ausgangspunkt der Aufreinigung war zunächst die Darstellung des Scolexins in einem PAA-Gel. Hierbei musste, auch in folgenden Anwendungen der SDS-PAGE als Kontrolle, beachtet werden, dass die Hämolympheproteine während der sonstigen Aufreinigungsprozeduren im nativen Zustand verblieben, jedoch für die

Auftrennung in analytischen Gelen denaturiert wurden. Dieses war notwendig, da das Vorhandensein bzw. die Menge des Scolexins in einer Probe nur über die Darstellung der Untereinheiten mit der bekannten relativen Molekülmasse 36 kDa nachzuweisen war. In diversen Vorversuchen wurden auch andere Möglichkeiten der elektrophoretischen Auftrennung getestet. Sie, und die mit ihnen erhaltenen Ergebnisse, werden in dieser Arbeit nicht näher beschrieben, da sie im Zuge des endgültigen Aufreinigungsprozesses nicht angewandt worden sind. Der Vollständigkeit halber sollen sie hier dennoch kurz beschrieben werden. Neben der bereits erwähnten denaturierenden PAGE als Kontrolle wurde auch die Auftrennung der Proteine in nativer Umgebung, sowohl zur Analyse, als auch präparativ getestet.

Für die sogenannte „native PAGE“ werden die Proteine nicht denaturiert, sondern sie behalten ihre dreidimensionale Struktur und ihre Zusammenlagerung der Untereinheiten bei, was im Falle des Scolexins bedeutet, dass es in seiner Dimerform vorläge. Dieses wiederum lässt keine eindeutige Zuordnung des Scolexins in einem nativen Gel zu, was sich auch in der Praxis gezeigt hat. Aus diesem Grund kam die native Auftrennung nicht zum Einsatz. Jedoch bleibt es eine interessante Methode, da man nun mithilfe des im Anschluss der erfolgten Aufreinigung erworbenen Antikörpers in der Lage ist, das Scolexin auf eine andere Art detektieren zu können als ausschließlich über die relative Molekülmasse. Durch die Western Blot-Methode einer nativ aufgetrennten Scolexinprobe und anschließender Detektion mit dem Antikörper ließe sich für zukünftige, beispielsweise funktionelle, Untersuchungen die Lage des Scolexin in nativen Gelen einordnen und somit viele neue Möglichkeiten eröffnen, die im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

Eine andere Möglichkeit der schnellen Isolierung von Scolexin aus dem Hämolymphepool wäre die Auftrennung mithilfe einer präparativen Gelelektrophorese, welche auch im Vorfeld getestet worden ist. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass sich auch ohne aufwendige Voraufreinigung relativ reine Fraktionen der gewünschten Proteine gewinnen lassen. Dabei erfolgt eine Auftrennung der Proteine so weit, dass sie aus der Gelmatrix als Fraktion herauswandern und in einer Lösung aufgefangen werden können. In den Vorversuchen ergaben sich

jedoch Schwierigkeiten, sodass auch diese Methode keine Berücksichtigung fand. Es kam aus nicht eindeutigen Gründen zu hohen Verlusten der Proteine nach dem Austritt aus dem Gel. Zudem gestattete die verfügbare Apparatur nur eine geringe Auftragsmenge einer Hämolympheprobe, sowie eine stark limitierte Auftragskonzentration für eine saubere Auftrennung.

Bei der Fällung von Proteinen durch Ammoniumsulfat hydratisieren die Ionen des Salzes und entziehen dabei den Proteinen die Hydrathülle. Durch hydrophobe Wechselwirkungen aggregieren und präzipitieren diese. Neben der Fraktionierung hat die AS-Fällung einen weiteren Vorteil für die nachfolgende Aufreinigungsprozedur: es fallen ausschließlich Proteine aus. Lipide, Kohlenhydrate oder Verunreinigungen bleiben in Lösung und werden nicht in den nächsten Aufreinigungsschritt mitgeführt.

Die drei Fraktionen, die aus der AS-Fällung hervorgingen, unterschieden sich bereits optisch voneinander. Während die erste, untersuchte Fraktion (30-45 % AS) farblos war, zeigte die zweite, die später als „Scolexin-Fraktion“ identifizierte Fraktion, einen zarten Türkisstich, während die letzte Fraktion (55-75 % AS) eine starke Türkisfärbung aufwies. Diese Färbung geht auf das Chromoprotein Insecticyanin zurück. Insecticyanin besitzt ein annähernd gleiches Molekulargewicht wie Scolexin, besteht aus drei Untereinheiten mit 23 kDa und ist durch Komplexbildung mit Biliverdin für die charakteristische Türkisfärbung der Hämolymphe und der Epidermis verantwortlich (GOODMAN et al. 1985). In Abb. 6 im Abschnitt 3.2.1.1 stellt das denaturierende Gel in der dritten Fraktion die Untereinheiten des Insecticyanins sehr wahrscheinlich als die unterste, deutlich sichtbare Bande dar.

Es erwies sich während des Entsalzens über die Sephadex-Säule und im Verlauf der weiteren Aufreinigung des Scolexins als äußerst hilfreich, dass auch die Fraktion 45-55 % durch Spuren von Insecticyanin in der Fraktion ebenfalls türkis gefärbt war. Dadurch war es möglich, die Fraktion auch optisch und quasi „in Echtzeit“ zu kontrollieren.

Das Prinzip der Größenausschlusschromatographie funktioniert durch die Beschaffenheit der sphärischen und porösen Gelpartikel der Matrix, in diesem Fall

des Sephacryls. Schickt man ein Proteingemisch durch diese Matrix, so wandern große Proteine an den für sie zu kleinen Poren der Gelpartikel vorbei, während kleinere Moleküle in die Poren diffundieren können und somit einen längeren Weg zurücklegen müssen. Diese Poren können unterschiedliche Größen haben, sodass es letztlich zu einer statistisch gleichmäßigen Auftrennung der großen Proteine, die früher die Matrix passieren, vor den kleinen Proteinen kommt (vgl. Herstellerangaben).

Der Auftrennung über die Hi-Prep Sephacryl-S200-Matrix (GE Healthcare®), dessen linearer Auftrennungsbereich nach Herstellerangaben bei 5-250 kDa für globuläre Proteine liegt, gingen mehrere Testläufe mit dem hochmolekularem Marker Blue Dextran (Roth®) und niedrigmolekularem RNase A (Roth®) voraus. Diese Testläufe dienten der Ermittlung der optimalen Parameter zur exakten Auftrennung der Proteine der „Scolexin-Fraktion“. Unter anderem waren die entscheidenden Faktoren für eine optimale Auftrennung die richtige Fließgeschwindigkeit des Puffers und die korrekte Auftragsmenge der Probe. Durch die Verwendung der Marker ließ sich der Bereich eingrenzen, indem die Proteine der „Scolexin-Fraktion“ bei gleichen Auftrennungsbedingungen zu erwarten waren. Damit wurde der Probenverlust eingeschränkt, da das separate Auffangen der Unterfraktionen praktisch „blind“ geschehen musste und die Unterfraktionen, welche Scolexin enthielten, erst nachträglich mithilfe der SDS-PAGE identifiziert werden konnten (Abb. 8, Abschnitt 3.2.1.2).

Das Chromatogramm in Abb. 7 zeigt die typische Auftrennungskurve der „Scolexin-Fraktion“. Der erste, große Peak repräsentiert die hochmolekularen Speicherproteine, die in Spuren noch in der „Scolexin-Fraktion“ vorhanden sind. Das Scolexin kann in dem nachfolgenden Bereich (grün dargestellt) vermutet werden, was die anschließende Überprüfung mittels SDS-PAGE belegt (Abb. 8). Bemerkenswert ist die noch vor dem Scolexin bei ca. Unterfraktion 19 deutlich auftretende Bande unter dem Scolexin. Hierbei handelt es sich mit Sicherheit mit dem bereits erwähnten Insecticyanin. Während es im nativen Zustand die gleiche Größe wie das Scolexin (ca. 72 kDa) hat, und somit bei der Auftrennung ungefähr in den selben Unterfraktionen vorkommt, werden die Proteine bei der Probenaufbereitung für die PAGE denaturiert, und Scolexin wird als 36 kDa-Bande

sichtbar, während Insecticyanin bei ca. 23 kDa auftritt.

Die positive Identifizierung des Scolexin und die anschließende Isolierung von den restlichen Proteinen der vereinten Fraktionen nach SCZEWCZYCK et al. (2009) lieferte aufgereinigtes Scolexin. Dabei mußte in Kauf genommen werden, dass das Protein seine Aktivität durch die Denaturierung vor dem Transfer auf die PVDF-Membran irreversibel eingebüßt hatte. Da jedoch keine Versuche mit nativem bzw. aktivem Scolexin geplant waren und die isomeren Untereinheiten als Antigene zur Antikörperentwicklung ausreichten, war dieses akzeptabel.

4.3.2 Immunhistochemischer Scolexin-Nachweis mithilfe des Scolexin-Antikörpers

4.3.2.1 Scolexin-Nachweis an Hämozyten-Monolayern

Die Anwendung des Scolexin-Antikörpers sollte zuallererst, auch im Hinblick auf spätere Untersuchungen, bei denen der Antikörper vor allem von anderen Labormitarbeitern verwendet werden würde, die Frage klären, ob die Herstellung der Hämozyten-Monolayer nach WILLOT et al (1994) auch für diesen Antikörper funktioniert. Es besteht bei jeder histologischen Vorbehandlung der Präparate die Möglichkeit, dass das Antigen, in diesem Fall das Scolexin, durch z.B. die Fixans so verändert oder denaturiert wird, dass es der Antikörper anschließend nicht zu erkennen vermag und ein falsch negatives Signal gibt. Dieser Hinweis ist in diesem Zusammenhang insofern relevant, da hier der erste Nachweis überhaupt von Scolexin an Hämozyten-Monolayern dargestellt wurde.

Abb. 12 (Abschnitt 3.2.2.1) belegt, dass das Protokoll für den Scolexin-Nachweis funktioniert und der Antikörper die Hämozyten eindeutig markiert. Vergleicht man darüberhinaus die Fluoreszenz-Aufnahmen mit den deckungsgleichen Phasen-Kontrastbildern, so kann man anhand der morphologischen Unterscheidung der Hämozyten im Phasen-Kontrastbild belegen, dass der Antikörper alle Hämozyten markiert. Somit scheint es keine Spezialisierung eines oder mehrerer Zelltypen zur Scolexin-Synthese zu geben. Offensichtlich exprimieren alle Hämozytentypen im Zuge einer Immunantwort Scolexin. Im Vergleich hierzu ist beispielsweise die Hämolin-Expression beschränkt. WANG et al. (1995) haben nachgewiesen, dass

ausschließlich Granuläre Zellen Hämolin synthetisieren.

Dass alle Zellen das synthetisierte Scolexin auch sezernieren erscheint wahrscheinlich, ist jedoch mit diesen Daten nicht zu belegen.

Desweiteren wurde der Anti-Scolexin-Antikörper für einen Vergleich von Hämocyten-Monolayern der Knockdown-Tiere (dsScoA+*E. coli*) und Kontrolltieren (MS+*E. coli*) eingesetzt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Signalstärke. Es ist möglich, dass die Inkubationszeit des Expression-Knockdowns für die Zellen nicht ausgereicht hat, um das bereits vorhandene Scolexin vollständig sezerniert zu haben, und so zum Zeitpunkt der Fixierung die Zellen „scolexinfrei“ waren. Die Erwartung war, dass das eventuell bereits in den Zellen vorhandene Scolexin nach der Infektion sezerniert werden würde, jedoch infolge der dsRNA-Behandlung praktisch kein neues Scolexin nachsynthetisiert werden würde. Es ist auch möglich, dass infolge einer einmaligen Infektion, wie es im Rahmen des Versuches durchgeführt worden ist, von den Hämocyten nicht das gesamte, synthetisierte Scolexin in die Hämolymphe abgegeben wird, und immer ein detektierbarer Rest in den Zellen verbleibt. Diese Frage müssten weitere Untersuchungen klären, insbesondere die Verlängerung der Inkubationszeit bzw. eine mehrfache Behandlung der Knockdown-Tiere mit dsRNA wären aufschlussreich.

4.3.2.2 Scolexin-Nachweis an Coagulationsfasern

Scolexin konnte mittels des Antikörpers ebenfalls an Coagulationsstrukturen nachgewiesen werden (Abb. 13, Abschnitt 3.2.2.2). Er band sowohl an die Coagulationsfäden als auch an die assoziierten Hämocyten.

Die Vorgänge, welche zur Coagulation der Hämolymphe bei Insekten führen, sind am besten bei *Drosophila* und auch bei *Galleria mellonella* beschrieben (ROWLEY & GAGEN 1977, ROWLEY & RATCLIFFE 1978; THEOPOLD et al. 2002, SCHERFER et al. 2004).

Neben Lipophorinen und calciumabhängigen Transglutaminasen ist vor allem die Beteiligung des von-Willebrand-Faktor-Homologs Hemolectin nachgewiesen (LESCH et al. 2007) unter anderem auch mit RNAi-Experimenten (GOTO et al. 2003).

Für *Drosophila* wird also folgendes, stark vereinfachtes Coagulationsmodell angenommen: Aufgrund einer Infektion oder eines anderen Signals sezernieren Hämocyten Coagulationsfaktoren wie Lipophorine in die Hämolymphe. Daraufhin kommt es zur Bildung von Coagulationsfäden und -querverbindungen durch Transglutaminasen und ähnliche „Crosslinker“-Moleküle. Im weiteren Verlauf können sich durch die Aktivierung der Melanisierungskaskade durch assoziierte Oenocytoide weitere, sekundäre Immunreaktionen anschließen (DUSHAY 2009).

MINNICK et al. (1986) zeigten schon, dass die Hämolymphe durch Zugabe von aufgereinigtem nativen Scolexin *in vitro* um das Vielfache schneller coaguliert als ohne externe Zugabe. Da Scolexin unmittelbar als Teil der Coagulationsstrukturen detektiert wurde, liegt die Annahme nahe, dass es ebenfalls eine „crosslinker“-Rolle im Coagulationsprozess spielt, vielleicht sogar diesen Prozess initiiert (s. MINNICK et al. 1986). Eine Lektineigenschaft des Scolexin wurde mehrfach in der Literatur postuliert, vor allem aufgrund der Hämagglutination von Erythrocyten durch aufgereinigtes Scolexin in *in vitro*-Versuchen (MINNICK et al. 1986, BEDOYAN et al. 1992). Molekulare Strukturanalyse ergaben jedoch keine Lektindomäne (Finnerty et al. 1999). Möglicherweise entfaltet das Scolexin seine „Crosslinker“-Funktion erst in Gegenwart eines Co-Faktors.

Nichtsdestotrotz konnte die These über die zentrale Rolle des Scolexins innerhalb der Coagulation mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2.2.2 untermauert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass homologe Sequenzen bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich bei *Bombyx mori* und *Heliothis virescens*, beides weitere Vertreter der Ordnung *Lepidoptera*, gefunden worden sind (s. auch Abschnitt 1.1). Somit lassen sich diese Ergebnisse nicht auf *Drosophila* (s.o.) übertragen.

4.3.2.3 Scolexin-Nachweis an einem Gewebeschnitt

Die verwendeten Präparate waren abdominale Querschnitte von L5d0-Larven von *M. sexta* (Leihgabe des Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Trenczek). Wie bei den Hämocyten-Monolayern sind nach der Paraffineinbettung und Entparaffinierung der Epitope des Scolexin als Antigen für den Antikörper erkennbar geblieben. Die Detektion der Hämocyte in Abb 14 (Abschnitt 3.2.2.3) ist ein Beleg

hierfür. Obwohl die Literatur die Epidermis und das Mitteldarmepithel als die Hauptsyntheseorte des Scolexin in *M. sexta*-Larven angeben (MINNICK & SPENCE 1988, MOLNAR et al. 2001), konnte diese Aussage mit der Anwendung des Scolexin-Antikörpers im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei Larven des 5. (letzten) Stadiums von *M. sexta* unterscheidet man zwischen der sogenannten „Fressphase“, die von der letzten Larvalhäutung bis zu mehrere Tage, je nach äußeren Bedingungen, dauert, und der anschließenden „Wanderphase“, die den Abschnitt, bei dem ein geeigneter Ort zur Verpuppung aufgesucht wird. Da die Expression des Scolexin in der Epidermis naiver Tiere erst gegen Ende der Fressphase abnimmt (KYRIAKIDES et al. 1995), lässt sich die fehlende Expression in der Epidermis nicht erklären.

Nach MOLNAR et al. 2001 fällt in denselben Zeitraum, der Umstellung von der Fress- zur Wanderphase, dass das Scolexin im Mitteldarmepithel zunächst in den Goblet-Zellen, die für die Regeneration des Epithels zuständig sind, später jedoch in den Columnarzellen immunhistochemisch nachweisbar ist. Jedoch war auch im Mitteldarmepithel der Scolexinnachweis negativ. Zur Klärung dieses Phänomens sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4.3.3 5'-RACE der Scolexin-A-Sequenz

Als Grundlage und als Referenz zur Vervollständigung der bekannten Scolexin-Sequenz diene die Arbeit von FINNERTY et al. (1999). Die beiden veröffentlichten Sequenzen für Scolexin A und B (NCBI Accession No. AF087004 und AF087005, s. auch Abschnitt 2.6.5) sind jeweils am 5'-Ende unvollständig. Da im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Isoform B nicht nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 3.2.4.1), konnte mithilfe der 5'-RACE zumindest die Nukleotidsequenz des Scolexin A vervollständigt werden (Abb. 29). Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass die im Ergebnisteil dargestellten und hier diskutierten Sequenzen nicht die genomische Information darstellen, sondern die mRNA-Sequenz repräsentieren, da als *template* für die RACE extrahierte mRNA verwendet worden ist.

RACE	1	<u>ACTACAATGTT</u> <u>CAGCTCG</u> AAGCAGTCGGTTGTGTTGGC GT TGCGGCGGTGCTCTTCGGG
ScOA	1	----- CGG CAGTCGGTTGTGTTGGCAGTGGCGGCGGTGCTCTTCGGG
ScOB	1	-----CGTCGAAGCAGTCGGTTGTGTTGGCAGTGGCGGCGG GCTC TCGCG
		***** ** ***** *
RACE	61	TGCGCGTGCGCAGCGCCCAATCCTGGCGCCAACGACATACAACCTTAATCAAAAATTAAGT
ScOA	43	TGCGCGTGCGCAGCGCCCAATCCTGGCGCCAACGACATACAACCTTAATCAAAAATTAAGT
ScOB	48	TGCGCGTGCGCAGCGCC GACCC GGCGCCAACGAT T ATACAACCTTAATCAAAAATTAAGT
		***** * ** ***** *
RACE	121	...
ScOA	103	...
ScOB	108	...

Abb. 29:**Alignment der 5'-terminalen Scolexin-Nukleotidsequenzen**

blau: „geracete“ 5'-Sequenz, unterstrichen: Startcodon, gelb: übereinstimmende Nukleotide des ersten Triplets (*match*), rot: nicht-übereinstimmende Nukleotide (*mis-match*), *: vollständige Nukleotid-Übereinstimmung]

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 erwähnt, konnten 18 bis dahin unbeschriebene Nukleotide der Scolexin-A-Sequenz identifiziert werden. Ausgehend vom Startcodon (Position 7-9) fügt sich das neue, vervollständigende Fragment nahtlos an das Leseraster der bekannten Sequenz. Auffallend ist, dass das erste Triplett (Position 19-21), welches dem neuen Fragment folgt, und somit wie der Rest der RACE-Sequenz identisch mit der Scolexin-A-Sequenz sein müsste, von der A-Isoform abweicht. Mehr noch, es ist erstaunlicherweise identisch mit der B-Isoform. Vergleicht man die entsprechenden Aminosäuren (Abb. 30), handelt es sich um Lysin (bei der RACE- und Scolexin-B-Sequenz) bzw. Arginin (bei Scolexin A). Funktionell würde sich dieser Unterschied nicht bemerkbar machen, da beide Aminosäuren basischen und polaren Charakter haben, sowie hydrophobe Seitenketten. Theoretisch wäre auch eine zufällige Übereinstimmung durch Fehlsequenzierung möglich, wenn auch wenig wahrscheinlich. Um die Hypothese aufzugreifen, dass Scolexin A und B keine Isoformen sind, sondern allelische Varianten eines Proteins, wie es in Abschnitt 4.3.4.1 detaillierter diskutiert wird, kann man schließen, dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben nicht um *mismatches* handelt, sondern um das zufällige Ergreifen einer der

allelischen Varianzen. Dieses erklärt jedoch nicht die ausschließliche und vollständige Übereinstimmung der restlichen RACE-Sequenz mit der Scolexin-A-Sequenz.

Abgesehen von dieser Unregelmäßigkeit, zeigt der Vergleich der restlichen, exemplarisch aufgeführten Basensequenzen, dass die erwartete Übereinstimmung der RACE-Sequenz mit der Scolexin-A-Sequenz wiedergegeben ist. Die punktuellen Abweichungen an Position 39 und 42 der RACE-Sequenz sind höchstwahrscheinlich auf Fehlsequenzierungen, entweder bei dieser Arbeit oder bei FINNERTY et al. (1999), zurückzuführen. Jedenfalls haben sie keine Auswirkungen auf die AS-Komposition.

Die mögliche Signalpeptidschnittstelle liegt zwischen der AS-Position 24 und 25 (Abb. 30, Quelle: SignalP 3.0 Server, s Abschnitt 2.7). Die „immunrelevante“ Region des reifen Proteins beginnt also erst danach. Die Signalsequenz dient dem Transport des synthetisierten Proteins innerhalb der Zelle. Somit muss die Aussage präziser formuliert werden, dass die Sequenz des immunrelevanten Proteins bereits bekannt war, jedoch durch die 5'-RACE die gesamte mRNA-Sequenz, inklusive des Signalbereichs, offengelegt worden ist.

RACE	1	TTMFSS	QSVVLAVAAVLFGCACAAAPNPGANDIQLNQKL	••
ScoA	1	-----R	QSVVLAVAAVLFGCACAAAPNPGANDIQLNQKL	••
ScoB	1	-----S	QSVVLAVAAALVACACAAPDPGANDIQLNQKL	••
			***** * ***** *****	

Abb. 30:

Alignment der N-terminalen Scolexin-Proteinsequenzen

[blau: „geracte AS-Sequenz“, unterstrichen Start-AS, gelb: übereinstimmende, erste AS (*match*), rot: nicht-übereinstimmende AS (*mis-match*), ▼: Signalpeptidschnittstelle, *: vollständige AS-Übereinstimmung]

4.3.4 Expressionsanalyse des Scolexin

4.3.4.1 Expression der Scolexin-Isoformen in Hämozyten von L5d0-Larven nach Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen

Seit der ersten Beschreibung des Scolexin unter dem alten Namen M13 durch

HUGHES et al. 1983 wurden ausschließlich Epidermis und Mitteldarmepithel als Syntheseorte des Scolexin beschrieben. In dieser Arbeit wurden erstmals per RT-PCR auch die Hämozyten als Scolexin-exprimierend identifiziert. Abb. 18 (Abschnitt 3.2.4.1) zeigt eindeutig die Expression von Scolexin A infolge einer Infektion der Versuchstiere mit Gram-negativen *Escherichia coli*, Gram-positiven *Bacillus megaterium* und dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*. Die Kontrolltiere „unbehandelt“, „steril verletzt“ und „MS-injiziert“ wiesen keine Expression auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zum Nachweis des Scolexin in der Hämolymphe nach Infektion von Versuchstieren mit Gram-negativen *Enterobacter cloacae* (HUGHES et al. 1983), Gram-positiven *Streptococcus faecalis* (KYRIAKIDES et al. 1993) und *S. cerevisiae* (FINNERTY & GRANADOS 1997).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine bloße Verwundung ohne mikrobielle Infektion keine Scolexin-Expression in den Hämozyten hervorruft. Jedoch wäre genau dieses zu erwarten gewesen, sollte das Scolexin die postulierte Rolle im Coagulationsprozess innehaben. Bekanntermaßen setzt die Coagulation nicht nur nach einer Infektion, sondern auch nach einer Verwundung ein. Unter anderem dient sie dem Verschluss der Wundstelle, um dem Austritt von Hämolymphe entgegenzuwirken. Ein mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass bei einer Verwundung im Gegensatz zu einer Infektion nur in dem verwundeten Abschlussgewebe, in diesem Fall der Epidermis, die Scolexin-Expression initiiert wird, sodass die Coagulation an dieser Stelle lokal begrenzt stattfindet. Es müssten weitere Untersuchungen zeigen, insbesondere *in situ*-Hybridisierungen an Gewebeschnitten um die Wunde herum, ob Expression des Scolexin A in den Epidermiszellen nach einer Verwundung nachweisbar wären.

Möglicherweise wird die Scolexin-Expression in den Hämozyten erst induziert, wenn es entweder zum direkten Kontakt mit pathogenen Fremdstrukturen kommt, oder infolge der Ausbreitung der Eindringlinge im Hämocöl metabolische oder physiologische Veränderungen in der Larve stattfinden. Neben den hier eingesetzten Pathogenen sind auch Viren als Initiatoren für die Scolexin-Expression beschrieben worden (FINNERTY & GRANADOS 1997). Eine sehr spezifische, d.h. nur über einen Rezeptor vermittelte, Regulation der Expression scheint daher unwahrscheinlich.

Eine Expression von Scolexin B war in keinem der Versuchsansätze nachzuweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer aktuellen Proteom-Sequenzierungsuntersuchung von Hämolympheproteinen von *M. sexta*-Larven (FURUSAWA et al. 2008), bei der nur die Scolexin A-Isoform nachgewiesen wurde. Außerdem wird die bereits formulierte Hypothese, dass es sich bei Scolexin B um eine allelische Variation handelt, bekräftigt.

4.3.4.2 Nachweis der Scolexin-A-mRNA in Hämocyten durch *in situ*-Hybridisierung

Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung (Abb. 19, Abschnitt 3.2.4.2) bestätigen die vorangegangenen Ergebnisse über die Expression des Scolexin A mittels RT-PCR nach einer *E. coli*-Infektion in Hämocyten von *M. sexta* (vgl. Abschnitt 4.3.4.1). Auch die Tatsache, dass offensichtlich alle Zelltypen expressionsaktiv sind, entspricht dem Nachweis von Scolexin mithilfe des Scolexin-Antikörpers in allen Hämocytentypen. Diese Betrachtungen zusammengefasst erhärten die Annahme, dass das in den Zellen nachgewiesene Scolexin tatsächlich von den Hämocyten synthetisiert und nicht aus der Hämolymphe aufgenommen wird. Somit kann man zur bisherigen Annahme über die Herkunft des Hämolymphe-Scolexins neben der Epidermis und dem Mitteldarmepithel ergänzend auch die Hämocyten hinzufügen.

Der *in situ*-Nachweis der Scolexin-mRNA in den Hämocyten-Monolayern ist spezifisch, wie die Kontrollansätze mit der unspezifischen Sonde FeS, sowie die methodischen Kontrollen mit und ohne Dig-11-UTP-Antikörper (KoSmAK und KoSoAK) belegen. Für eine quantitative Analyse eignet sich die ISH wie durchgeführt nicht. Jedoch könnte es mit einer Optimierung der Methoden-anwendung möglich sein anhand morphologischer Differenzierung und mit einer kürzeren Entwicklungszeit für die Farbreaktion diejenigen Zelltypen zu identifizieren, die eine höhere Rate der Scolexin-Expression besitzen.

4.3.4.3 Expression der Scolexin-Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *M. sexta*

Es konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden, dass Hämozyten von unbehandelten Puppen (Tag 0) und Imagines (Tag 0) von *M. sexta* praktisch keine Scolexin-Expression aufweisen (Abb. 20, Abschnitt 3.2.4.3). Dieses Ergebnis ist erwartet worden, da die Versuchstiere nicht experimentell infiziert wurden, und somit nicht immunaktiv sein sollten. Das schwache Signal bei den Puppen mag durch eine unerkannte Infektion oder dem Abbau von Strukturen hervorgerufen sein. Frühere Untersuchungen des Scolexin ergaben, dass in der Hämolymphe von infizierten, jedoch nicht in naiven Puppen Scolexin nachweisbar ist (HUGHES et al. 1983). Wie schon erwähnt, sinkt die Scolexin-Syntheserate naiver Tiere im Laufe des letzten Larvenstadiums, bis sie vor dem Übergang zur Wanderphase eingestellt wird (MOLNAR et al. 2001). Es wird jedoch ebenso eine hormonelle Steuerung der Scolexin-Expression diskutiert (MOLNAR et al. 2001). Es wäre möglich, dass das Scolexin in der Puppenhämolymphe nicht nur von den Epidermis- oder Mitteldarmepithelzellen stammt, sondern auch von den Hämozyten synthetisiert worden ist. Somit könnten die hormonellen Veränderungen vor und während der Puppenhäutung die Scolexin-Expression beeinflussen.

Vergleicht man 48-, 72- und 96-Stunden alte Embryonen, so erkennt man eine eindeutige Expression von Scolexin A bei den 72- und 96-Stunden-Proben.

Unter den Bedingungen, bei denen die Eier nach der Eiablage ($t = 0$) gehalten wurden, dauerte die embryonale Entwicklung der Tiere 100 Stunden. Die 96-Stunden alten Embryonen waren demnach fast vollständig entwickelte, schlupfbereite Larven. Das Ergebnis der Scolexin-Expression ist insofern interessant, da zum Einen Embryonen als Ganzes zur RNA-Extraktion verwendet wurden. Das bedeutet, von welchem Gewebe oder welchen Zellen dieses Signal stammt, lässt sich nicht zurückverfolgen. Zum Anderen wurden auch hier keine Infektionen der Versuchstiere durchgeführt. Somit stellt sich die Frage nach der Funktion des Scolexin in der Embryonalentwicklung über dessen immunrelevante Rolle hinaus. Ein Beispiel für ein Protein mit funktionsübergreifenden Fähigkeiten ist das Hämolin. YU & KANOST (1999) wiesen es in Embryonen von *M. sexta* nach und postulieren, dass es eine wichtige Rolle in Entwicklungsvorgängen spielt. Ähnliches könnte auch für das Scolexin gelten.

Dieses Phänomen, nämlich der Nachweis der Scolexin-Expression ab dem 72-Stunden-Stadium in der Embryonalentwicklung korreliert sehr präzise mit Ergebnissen einer früheren Studie an *M. sexta*-Embryonen über die Entwicklung der Immunkompetenz von Hämocyten (Diplomarbeit Gökçen 2003, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Trenczek). In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper, welche spezifisch sind gegen larvale Hämocyten-Antigene, auf histologischen Schnitten von Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien getestet. Dabei wurde festgestellt, dass einer der Antikörper (mAK #75, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Trenczek) in den älteren Schnittpräparaten eindeutig frei im Hämocöl vorkommende oder an Organen assoziierte, zelluläre Strukturen erkannte. Ebenso wie die Scolexin-Expression lieferte diese Antikörperbehandlung ein positives Ergebnis erst ab dem 72-Stunden-Stadium. Im Fall des mAK #75, dessen Antigen unbekannt ist, wurde diskutiert, dass die Ausbildung des hämozytenspezifischen Antigens, und dessen Detektion in Embryonen, ein Hinweis ist auf die Differenzierung der Hämocyten und ihre mögliche Immunkompetenz bereits in der Embryonalphase. Wichtiger jedoch, vor allem in Bezug auf die Scolexin-Expression, ist der Zeitpunkt des Auftauchens dieses hämozytenspezifischen Antigens. Für *Manduca sexta* ist der sogenannte Dorsalschluss bei ca. 60 % der Embryonalentwicklung angegeben (BROADIE et al. 1990). Da die Entwicklung der Embryonen in unserer Arbeitsgruppe ca. 100 Stunden dauert, findet der Dorsalschluss nach ca. 60 Stunden statt. Diese Annahme wird durch eigene Beobachtungen bestätigt. Der Dorsalschluss ist ein ontogenetisch wichtiges Ereignis in der Insektenembryogenese, da mit diesem Ereignis eine geschlossene Körperhöhle entsteht, und die Organogenese beginnt (CHAPMAN 1998). Somit kann man festhalten, dass sowohl die Ausdifferenzierung der Hämocyten als auch der Beginn der Scolexin-Expression nach dem Dorsalschluss einsetzt.

4.3.5 Knockdown der Scolexin-A-Expression durch RNAi

Abb. 21 (Abschnitt 3.2.5) zeigt den erfolgreichen Knockdown der Scolexin-Expression in Hämocyten von *M. sexta*- Larven des letzten Stadiums. Diesem Erfolg gingen mehrere erfolglose Versuche des Knockdowns voraus, die hier

Erwähnung finden sollten. Als Ursache konnte nach einigen Tests eine vorangegangene, unspezifische Immunaktivität der Versuchstiere ermittelt werden. Der Grund für diese Immunaktivität war vermutlich eine übergreifende, allgemeine Infektion der Zucht. Es wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass eine Aktivierung des Immunsystems vor der Injektion der dsRNA den RNAi-Effekt egalisiert oder zumindest abschwächt. Diese Hypothese wurde überprüft, indem Knockdown-Versuche mit nachweislich immunaktiven und nicht-immunaktiven Tiere durchgeführt wurden. Der Vergleich der Ergebnisse (hier nicht dargestellt) zeigte einen deutlich höheren Knockdown-Erfolg bei nicht-immunaktiven Tieren. Der Grund für den Misserfolg des Knockdowns bei zuvor immunaktiven Tieren liegt wahrscheinlich darin, dass durch die Zugabe von gleicher Menge dsRNA, wie sie für naive Tiere zum RNAi-Knockdown ausreichend wäre, die vorzeitige Aktivierung der Expression immunrelevanter Gene und somit die Erhöhung der mRNA-Konzentration nicht kompensiert werden kann. Somit war es aus zwei Gründen unabdingbar, dass die Versuchstiere für die Knockdown-Versuche zu Versuchsbeginn nicht-immunaktiv waren: erstens erhöhte sich die Erfolgsquote des Knockdowns signifikant, zweitens mussten die Ergebnisse vergleichbar mit den Kontrolltieren, die z. T. nicht-immunaktiv sind, sein. Damit schloss sich auch eine einfache Erhöhung der dsRNA-Injektionsmenge für eine höhere Erfolgsquote aus.

4.3.5.1 Einfluss des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Expression anderer immuninduzierbarer Gene

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung der Versuchstiere mit dsScoA einen spezifischen Knockdown der Scolexin-A-Expression verursacht, jedoch die Expression der anderen untersuchten, immunrelevanten Proteinen Lysozym, Hämolin und Cecropin nicht beeinflusst wurde (Abb. 22, Abschnitt 3.2.5.1).

Lysozym und Cecropin sind antimikrobielle Effektormoleküle, deren Expression infolge einer Infektion hochreguliert wird (SPIES et al. 1986). Lysozym wurde als erstes antibakterielles Molekül überhaupt bei Insekten beschrieben (MOHRIG &

MESSNER 1968). Cecropin gehört zu einer Familie von basischen, bakteriolytisch wirkenden Peptiden, die zunächst bei *Hyalophora cecropia* beschrieben wurden (STEINER et al. 1981).

Das Ergebnis dieses Versuchs ist erwartet worden. Es war dennoch wichtig zu belegen, dass der Knockdown durch die Scolexin-dsRNA spezifisch die Expression des Zielproteins trifft, jedoch ein eventueller Einfluss auf die Immunreaktion unmittelbar als Auswirkung des Knockdowns zu beobachten ist, und nicht von der dsRNA selbst. Desweiteren ist Scolexin offensichtlich nicht an der Signalkette beteiligt, die zur humoralen Antwort führt.

4.3.5.2 Orale Verabreichung von dsScoA an L5d0-Versuchstieren

Die Verfütterung von dsRNA hat bei den Versuchstieren nicht zu den erwarteten Knockdown-Ergebnissen geführt (Abb. 23, Abschnitt 3.2.5.2).

Das Verfüttern von RNAi-Reagenzien und das erfolgreiche Auslösen von RNA-Interferenz ist bei Insekten mehrfach beschrieben, jedoch nur einmal erfolgreich bei einer Lepidopterenart angewandt worden, nämlich der Apfelmotte *Epiphyas postvittana* (TURNER et al. 2006). Der Expressionsort des Zielgens lag in diesen Untersuchungen in den Antennen. Dies belegt, dass die verabreichte dsRNA durch den Darm aufgenommen wird und den Zielort unbeschadet erreichen kann. Ein wahrscheinlicher Grund für das negative Ergebnis könnte die zu geringe Menge der verabreichten dsRNA gewesen sein. Es wäre auch möglich, dass die dsRNA bis zur vollständigen Aufnahme durch das Tier im Futter stark degradiert worden ist und somit nicht mehr funktionsfähig war.

4.3.5.3 Infektion der L5d0-Versuchstiere mit FITC-markierten *E. coli*

Die Verwendung von FITC-markierten *E. coli* für einen Knockdown-Versuchsansatz sollte nur als Vorbereitung zu anschließenden Phagozytosestudien dienen, in denen der Einfluss des Scolexin auf das Phagozytoseverhalten der Hämözyten untersucht werden sollte. FITC-markierte *E. coli* werden routinemässig innerhalb der Arbeitsgruppe für Phagozytose-Assays wegen ihrer einfachen Herstellung und Handhabung verwendet. Zudem eignen sie sich als zuverlässige Provokatoren,

um eine Immunantwort in den Versuchstieren auszulösen (DEAN et al. 2004). Das Ausbleiben der Scolexin-Expression im Kontrollansatz (MS⁻+FITC-*E.c.*) (s. Abb. 24, Abschnitt 3.2.5.3) ist somit ein unerwartetes Ergebnis. Weitere Wiederholungen konnten dieses Ergebnis bestätigen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass dieses Phänomen nicht die Expression der als Kontrolle ebenfalls untersuchten, immunrelevanten Proteine Lysozym und Hämolin beeinträchtigt hat (Abb. 25). Fasst man nun die Fakten zusammen, so zeichnet sich ab, dass die Verwendung von FITC-markierten *E. coli* speziell die Scolexin-Expression beeinträchtigt, während die Verwendung unmarkierter *E. coli* zur Expression führt. Offensichtlich liegt die Ursache dieses Phänomens in der veränderten Oberfläche der Bakterien nach der Markierung mit dem Fluoreszenzmolekül. Nun stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit dieses Moleküls selbst oder die Markierungsprozedur in irgendeiner Form für die Oberflächenveränderung verantwortlich ist, sodass FITC-markierte *E. coli* keine Scolexin-Expression provozieren. Zur Beantwortung dieser Frage wurden *E. coli* der FITC-Markierungsprozedur unterzogen, wobei ein Aliquot vorzeitig, nämlich nach der Über-Nacht-Inkubation im Bicarbonatpuffer, entnommen wurden (carb.-*E.c.*), während die übrigen *E. coli* die Prozedur bis zum Ende durchliefen und mit FITC markiert wurden (FITC-*E.c.*). Abb. 26 zeigt eindeutig, dass nicht die FITC-Markierung, sondern bereits die Behandlung mit Bicarbonatpuffer für die Nicht-Expression des Scolexin verantwortlich ist. Daraus lässt sich folgern, dass die Bicarbonat-Behandlung in irgendeiner Form die Oberfläche der *E. coli* verändert. Tatsächlich besteht die Möglichkeit, dass Proteine durch das Bicarbonat aus der Oberfläche herausgelöst werden. Eine Eigenschaft, die man sich bei bestimmten Proteinaufreinigungsprozeduren zunutze macht, bei denen ebenfalls alkalische Carbonatpuffer verwendet werden. Sollte dieses der Fall sein, so kann man eine rezeptorvermittelte Initiation der Scolexin-Expression zumindest nicht ausschließen. Darüberhinaus muss die Oberflächenveränderung äußerst spezifisch sein, da es scheinbar keinen Einfluß auf andere Signalwege zum Auslösen einer Immunantwort zu haben scheint. Dieses Phänomen bedarf einer näheren Untersuchung, die nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden konnte. Jedenfalls deutet die Tatsache, dass Bicarbonat-behandelte *E. coli* keine

Scolexin-Expression auslösen, darauf hin, dass Scolexin in die Phagozytose-reaktion nicht involviert ist, da bekanntermaßen *FITC-E. coli* sehr wohl phagozytiert werden. Für Hämolin im Vergleich dazu wurde in ähnlichen Knockdown-Experimenten dessen Einfluss auf die Phagozytose nachgewiesen (ELEFThERIANOS et al. 2007).

Als alternativen Provokator, um dennoch Phagozytose-Untersuchungen in Bezug auf den Einfluss des Scolexin durchführen zu können empfehlen sich andere Markierungsmethoden, wie zum Beispiel BacLight (Molecular Probes®) (ELEFThERIANOS et al. 2007) oder der Einsatz von gentechnisch-veränderten *green fluorescent protein* (GFP)-*E. coli*.

4.3.5.4 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Clearance

Der sogenannte Clearance-Versuch soll die Fähigkeit der Versuchstiere dokumentieren, die injizierten Bakterien aus der Hämolymphe zu entfernen. Anhand der Ergebnisse des Clearance-Versuchs lassen sich Rückschlüsse auf die Phagozytose- und Einkapselungsaktivität ziehen. Abgesehen von humoralen Verteidigungsmöglichkeiten, wie dem Einsatz von antimikrobiellen Peptiden (KANOST et al. 2004), stehen den Tieren zu diesem Zweck zwei zelluläre Abwehrmechanismen zur Verfügung: die Phagozytose und die Einkapselung. Der Aspekt Phagozytose wurde bereits im vorangegangenen Kapitel behandelt, während in Bezug auf die Einkapselung auf das nächste Kapitel verwiesen werden soll.

Es sei hier darauf hingewiesen, dass im Gegensatz zu den bisherigen Versuchsansätzen notwendigerweise lebende *E. coli* eingesetzt wurden, da nach der Rückgewinnung der verbliebenen Bakterien aus der Hämolymphe ihre Anzahl durch das Anwachsen und Ausbilden von Kolonien bestimmt werden sollte.

Der Vergleich der Anzahl der wiedergewonnenen Bakterien aus den Knockdown-Tieren und den infizierten Kontrolltieren zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abb. 27, Abschnitt 3.2.5.4). Unter Berücksichtigung der Fehlertoleranz kann man festhalten, dass der Knockdown der Scolexin-Expression die Clearance nicht beeinflusst. Scolexin scheint somit nicht in die Prozesse der Phagozytose

und/oder der Einkapselung involviert zu sein, wie dies im Gegensatz dazu für Hämolin gezeigt wurde (s. Abschnitt 4.2.2).

4.3.5.5 Einfluss des Knockdown der Scolexin-A-Expression auf die Nodulibildung der Hämozyten

Abb. 28 (Abschnitt 3.2.5.5) belegt, dass der Knockdown der Scolexin-Expression im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren keinen signifikanten Einfluss auf die Nodulibildung der Hämozyten hat. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis des Clearance-Versuchs (Abschnitt 3.2.5.4).

Es wurde bereits erwähnt, dass die wichtigsten Eliminierungsmechanismen von Bakterien oder anderen Eindringlingen aus dem Hämocöl die Phagozytose und die Einkapselung sind. Vernachlässigt man die übrigen humoralen Immunfaktoren, so kann man das Verhältnis von Phagozytose, Einkapselung und Clearance zueinander am anschaulichsten in einer stark vereinfachten Gleichung beschreiben:

Phagozytose + Einkapselung = 100 % Clearance

Der jeweilige Anteil von Phagozytose und Einkapselung an der Clearance kann stark variieren, und ist zudem für die weitere Diskussion nicht relevant. Da in beiden Versuchen keine Beteiligung des Scolexin nachgewiesen werden konnte, kann man rückschließen, dass ein Knockdown des Scolexin im Vergleich zu infizierten Kontrolltieren auch keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose haben würde.

4.4 Abschließende Betrachtungen

Die Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden über die beiden untersuchten Proteine Hämolin und Scolexin erweitern die bereits bekannten Daten. Nichtsdestotrotz bleiben viele Erklärungsmodelle über die genaue Rolle beider Proteine fragmentarisch und unvollständig, was vor allem der Komplexität des untersuchten Systems, nämlich der molekularen Vorgänge während einer Immunantwort in der Hämolymphe, geschuldet ist. Unter anderem der außerordentliche Einfluss des Hämolin auf die Einkapselung von Bakterien durch die

Hämozyten, welches in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, spiegelt die vielseitige Rolle des Hämolin im Immungeschehen wieder, die in Anbetracht des heutigen Kenntnisstands für das Hämolin gefordert werden muss. Dagegen spricht jedoch die vermeintliche Beliebigkeit in den zahlreichen Funktionen an fast allen Schaltstellen des Immungeschehens, die in der Literatur beschrieben sind, wodurch das Bild des „Allrounders“ unglaublich erscheint. Bei näherer Betrachtung ist es wahrscheinlicher, dass die Interpretation des Kenntnisstands nicht vollständig erfasst ist.

Etwas anders stellen sich die Umstände bezüglich des Scolexin dar. Mit dieser Arbeit ist es gelungen, neue Erkenntnisse über das bisher nur fragmentarisch untersuchte Protein zu erlangen, welche darüber hinaus interessante Ansätze für weitere Untersuchungen liefern. Ein sehr interessanter Ansatz ist das Phänomen, dass FITC-markierte bzw. carbonatbehandelte *E. coli* keine Expression von Scolexin verursachen. Untersuchungen auf molekularer Ebene über die Ursache dieses Phänomens könnten Grundlage für Erkenntnisse bezüglich der Spezifität der Scolexin-Expression sein, und somit wertvolle Hinweise über die Rolle des Scolexin im Immungeschehen liefern. Obwohl diese Arbeit mehrere Erkenntnisse der bisherigen Datenlage hinzufügt, bleibt die Rolle des Scolexin schwer zu bestimmen. Eine Neubewertung des Kenntnisstands, in der die Rolle eines Modulators innerhalb der Immunantwort für das Scolexin angenommen wird, könnte wichtige Impulse in der Konzeption weiterer Untersuchungen geben.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Proteine Hämolin und Scolexin auf ausgewählte Vorgänge des Immungeschehens in der Hämolymphe des Tabakschwärmers *Manduca sexta* untersucht. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische, proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden eingesetzt. Die Expression von Hämolin in den Hämozyten infizierter *M. sexta*-Larven wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Im Anschluss wurde RNA-Interferenz durch die Behandlung der Tiere mit spezifischer, doppelsträngiger RNA induziert, und somit die Expression des Hämolin unterbunden. Die darauffolgenden Infektionsversuche mit *E. coli* zeigten eine nahezu vollständig ausgeschaltete Nodulationsfähigkeit der Kockdown-Tiere.

Der Fokus der Untersuchungen an Scolexin lag auf dessen Einfluss auf die Hämozyten während einer Immunantwort. Scolexin wurde aus einem Hämolymphepool infizierter Tiere aufgereinigt und isoliert, welches anschließend für die Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen Scolexin eingesetzt wurde. Unter Verwendung des Antikörpers konnte an Hämozyten-Monolayern von infizierten Larven Scolexin in allen Hämozytentypen nachgewiesen werden. Auch in Gewebeschnitten konnten auf diese Weise Hämozyten sichtbar gemacht werden. Entgegen der Erwartung aus dem bisherigen Kenntnisstand konnte man jedoch keine Markierung von Epidermis und Mitteldarmepithel, welche als Hauptsyntheseorte des Scolexin postuliert sind, nachweisen. Darüber hinaus markierte der Antikörper auch Coagulationsfäden und Hämozyten von Frischzellpräparaten. Die Expression der beiden Isoformen A und B von Scolexin wurde per RT-PCR in Hämozyten von Larven nach Infektion mit *E. coli*, *B. megaterium* und *S. cerevisiae* nachgewiesen, wobei ausschließlich die Expression der Isoform A nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurde auf weitere Untersuchungen des Scolexin B verzichtet.

Mittels *in situ*-Hybridisierung unter Einsatz spezifischer Sonden konnte zusätzlich gezeigt werden, dass alle Hämozyten-Typen Scolexin exprimieren. Der Nachweis

gelang ebenso in Embryonen-Homogenaten von *M. sexta* ab dem Entwicklungsalter von 72 Stunden, welches der Zeit nach dem Dorsalschluss entspricht. Mumaßlich in Puppen, jedoch sicher in Imagines, konnte keine Expression nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde die Expression von Scolexin, wie bei den Untersuchungen zu Hämolin, durch RNAi unterdrückt. Die Spezifität des Knockdowns wurde bestätigt, indem die Expression anderer immunrelevanter Proteine Lysozym und Cecropin in denselben Tieren nachgewiesen werden konnte. Es wurde auch ein anderer Ansatz zum Knockdown der Expression getestet, nämlich durch das Verfüttern von dsRNA an die Versuchstiere. Dieser Ansatz war nicht erfolgreich.

Abschließend wurde der Einfluss des Knockdowns der Expression auf die Nodulationsfähigkeit und die Clearance untersucht. Dabei wurde kein signifikanter Effekt auf beide Vorgänge nach einer Infektion von Larven beobachtet. Der Ansatz zur Untersuchung der Phagozytosefähigkeit der Hämozyten in Knockdown-Tieren konnte nicht durchgeführt werden, da die Verwendung von FITC-markierten *E. coli* überraschenderweise erst gar keine Expression des Scolexin verursacht hatte. Abschließend wurde mittels 5'-RACE das 5'-Ende der bekannten Scolexin A-Sequenz bestimmt. Das Ergebnis der 5'-RACE und das Fehlen der Scolexin B-Expression in den Hämozyten ist Anlass für die Hypothese, dass es sich bei den Scolexin-Isoformen eher um allelische Variationen handelt.

6 Literaturangaben

Ao J.Q., Ling E., Yu X.Q.

A Toll receptor from *Manduca sexta* is in response to *Escherichia coli* infection.
Mol. Immunol. 2008 (45) 2, 543-552

Ashida M. & Brey P.T.

Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992 (23) 10698-10702

Bedoyan J. K., Patil C. S., Kyriakides T. R., Spence K. D.

Effect Of Excess Dietary Glucose On Growth And Immune Response Of *Manduca Sexta*.
J. Insect Physiol. 1992 (38) 7, 525-532

Blum H., Beier H. Gross H.J.

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 1987 (8) 93-99

Boman H. G., Nilsson-Faye I., Paul K. and Rasmuson T.

Insect Immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in haemolymph of *Samia cynthia* pupae.
Infect. Immun. 1974 (10) 136-145

Bradford M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 1976 (72) 248-254

Brehelin M.

Mise en evidence de l'induction de la coagulation plasmatique par les hemocytes chez *Locusta migratoria*.
Experientia 1979 (35) 270-271

Broadie K., Bate M., Tublitz N.J.

Quantitative staging of embryonic development of the tobacco hawkmoth,

Manduca sexta

Roux's Arch. Dev. Biol. 1990 (199) 327-334

Chapman R.F.

The Insects: Structure and Function.

Cambridge University Press 1998 4th Edition

Dean P., Potter U., Richards E.H., Edwards J.P., Charnley A.K., Reynolds S.E.

Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*.

J. Insect Physiol. 2004 (50) 11, 1027-1036

Dushay M.S.

Insect hemolymph clotting.

Cell. Mol. Life Sci. 2009 (66) 2643–2650

Faye I., Pye A., Rasmusson T., Boman H.G. & Boman I.A.

Insect immunity II. Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*.

Infect. Immun. 1975 (12) 1426-1438.

Faye I., Wyatt G.R.

The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia* silkworm pupae.

Experientia 1980 (36) 11, 1325-1326

Finnerty C. M. & Granados R. R.

The Plasma Protein from *Manduca sexta* is Induced by Baculovirus Infection and Other Immune Challenges.

Insect Biochem. Mol. Biol. 1997 (27) 1, 1-7

Finnerty C. M., Karplus P. A., Granados R. R.

The insect immune protein scolexin is a novel serine proteinase homolog.

Prot. Sci. 1999 (8) 242-248

Furusawa T., Rakwal R., Nam H.W., Hirano M., Shibato J., Kim Y.S., Ogawa Y., Yoshida Y., Kramer K.J., Kouzuma Y., Agrawal G.K., Yonekura M.

Systematic investigation of the hemolymph proteome of *Manduca sexta* at the fifth instar larvae stage using one- and two-dimensional proteomics platforms.
J. Proteome Res. 2008 (7) 3, 938-959

Goodman W.G., Adams B., Trost J.T.

Purification and characterization of a biliverdin-associated protein from the hemolymph of *Manduca sexta*.
Biochemistry 1985 (24) 5, 1168-1175

Goto A., Kadowaki T., Kitagawa Y.

Drosophila hemolymph gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects.
Dev. Biol. 2003 (264) 582–591

Hoffmann D., Hultmark D., Boman H. G.

Insect Immunity: *Galleria mellonella* and other lepidoptera have cecropia-P9-like factors active against gram negative bacteria.
Insect Biochem., 1981 (11) 5, 537-548

Hughes J.A., Hurlbert R.E., Rupp R.A., Spence K.D.

Bacteria-Induced Haemolymph Proteins of *Manduca sexta* Pupae and Larvae.
J. Insect. Physiol. 1983 29 (8) 625-632

Jiang H., Wang Y., Ma C., Kanost M.R.

Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1.
Insect Biochem. Mol. Biol. 1997 (10) 27, 835-50

Jiravanichpaisala P., Leeb B.L., Soderhall K.

Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization.
Immunobiology 2006 (211) 213–236

Kanost M.R. & Zhao L.

Insect hemolymph proteins from the Ig superfamily.
Adv. Comp. Environ. Physiol. 1996 (23) 185–197

Kanost M.R., Jiang H., Yu X.Q.

Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*.
Immunol. Rev. 2004 (198) 97-105

Kyriakides T. R., C.S.Patil, Bedoyan J. K., Spence K. D.

In Vivo Distribution of immune Protein Scolexin in bacteria-injected *Manduca sexta* Larvae.
Tissue and Cell 1993 (3) 25, 423-434

Kyriakides T. R., Killip J. L., Spence K. D.

Biochemical Characterization, Developmental Expression, and Induction of the Immune Protein Scolexin From *Manduca sexta*.
Arch Biochem Physiol 1995 (29) 269-280

Ladendorff N.E. & Kanost M.R.

Bacteria induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily, which can inhibit hemocyte aggregation.
Arch. Insect Biochem. Physiol. 1991 (18) 285-300

Ladendorff N.E. & Kanost M.R.

Isolation and characterization of bacteria-induced protein P4 from hemolymph of *Manduca sexta*.
Arch. Insect Biochem. Physiol. 1990 (15) 33-41

Lämmli U.K.

Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 1970 (227) 680-685

Lee K.Y., Horodyski F.M., Valaitis A.P., Denlinger D.L.

Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*.
Insect Biochem. Mol. Biol. 2002 (32) 1457–1467

Lesch C., Goto A., Lindgren M., Bidla G., Dushay M.S., Theopold U.

A role for hemolectin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*.
Dev. Comp. Immuno. 2007 (31) 1255–1263

Levin D.M., Breuer L.N., Zhuang S., Anderson S.A., Nardi J.B., Kanost M.R.

A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco

hornworm, *Manduca sexta*.

Insect Biochem. Mol. Biol. 2005 (35) 5, 369-380

Ling E & Yu X.Q.

Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*.

Insect Biochem. Mol. Biol. 2005 (35) 12, 1356-1366

McManus M.T. & Sharp P.A

Gene silencing in mammals by small interfering RNAs.

Nature Rev. Genet. 2002 (3) 737-747

Minnick M. F. & Spence K. D.

Tissue Site And Modification of A Bacteria-Induced Coagulation Protein From *Manduca Sexta*.

Insect Biochem. 1988 (18) 637-644

Minnick M. F., Rupp R. A., Spence K. D.

A Bacterial-Induced Lectin Which Triggers Hemocyte Coagulation In *Manduca Sexta*.

Biochem. and Biophys. Res. Comm. 1986 729-735

Mohrig W. & Messner B.

Lysozyme as antibacterial agent in honey and bees venom.

Acta Biol. Med. Ger. 1968 (21) 1, 85-95

Molnar K., Noemi H. B., Csikos Gy., Sass M.

The Immunoprotein Scolexin And Its Synthesizing Sites - The Midgut Epithelium And The Epidermis.

Acta Biol. Hung. 2001 52 v

Nardi J.B., Pilas B., Bee C.M., Zhuang S., Garsha K., Kanost M.R.

Neuroglial-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces.

Dev. Comp. Immunol. 2006 (30) 5, 447-62

Nardi J.B., Pilas B., Bee C.M., Zhuang S., Garsha K., Kanost M.R.

Neuroglial-positive plasmatocytes of *Manduca sexta*.

Dev. Comp. Immunol. 2006 (30) 5, 447-462

Niu B.L., Meng Z.Q., Weng H.B., Shen W.F., He L.H., Zheng K.F., Ye S.T., Lin T.B. Chen J.E.

„Blast silkworm EST database for functional genes.“

Accession: DQ443267, Version DQ443267.1 GI:95102829

Rasmuson T. & Boman H.G.

Insect immunity V. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae.

Insect Biochem. 1979 (9) 259-264

Rowley A.F. & Ratcliffe N.A.

A histological study of wound healing and hemocyte function in the wax-moth *Galleria mellonella*.

J. Morphol. 1978 (157) 181–200

Rowley A.F. & Ratcliffe N.A.

The granular cells of *Galleria mellonella* during clotting and phagocytic reactions in vitro.

Tissue Cell 1976 (8) 437–446

Russell V.W. & Dunn P.E.

Lysozyme in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis.

Arch. Insect Biochem. Physiol. 1991 (17) 2-3, 67-80

Sashital D.G & Doudna J.A.

Structural insights into RNA interference.

Curr. Opin. Struct. Biol. 2010 (20) 1, 90-97

Scherfer C., Karlsson C., Loseva O., Bidla G., Goto A., Havemann J., Dushay M.S., Theopold U.

Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a novel pull-out assay.

Curr Biol 2004 (14) 625–629

Szczewczyk B. & Summers D.F.

Use of Proteins Blotted to Polyvinylidene Difluoride Membranes as Immunogens.

Meth. Mol. Biol. 2009 (80) 81-85

Shelby K.S. & Popham H.J.

Analysis of ESTs generated from immune-stimulated hemocytes of larval *Heliothis virescens*.

J. Invertebr. Pathol. 2009 (101) 2, 86-95

Spence K. D., . Karlinsey J. E., Kyriakides T. R., C.S.Patil, Minnick M. F.

Regulation and Synthesis of Selected Bacteria-Induced Proteins In *Manduca Sexta*.

Insect Biochem. Molec. Biol. 1992 (22) 4, 321-331

Spies A.G., Karlinsey J.E., Spence K.D.

Antibacterial hemolymph proteins of *Manduca sexta*.

Comp. Biochem. Physiol. B. 1986 (83) 1, 125-133

Steiner H., Hultmark D., Engström A., Bennich H., Boman H.G.

Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity.

Nature 1981 (292) 5820, 246-248

Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O.

The coagulation of insect hemolymph.

Cell Mol. Life Sci. 2002 (59) 363–372

Towbin H., Staehelin T., Gordon J.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979 (76) 9, 4350-4354

Trenczek T. & Faye I.

Synthesis of immune proteins in primary cultures of fat body from *Hyalophora cecropia*.

Insect Biochem. 1988 (18) 3, 299-312

Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P., Newcomb, R.D.

RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding.

Insect Mol. Biol. 2006 (15) 383-391

Wang Y., Willott E., Kanost M.R.

Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*.

Insect Mol. Biol. 1995 (4) 113–123

Wang Y., Willott E., Kanost M.R.

Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*.

Insect Mol. Biol. 1995 (4) 113–123

Wiegand C., Levin D., Gillespie J., Willott E., Kanost M., Tenczek T.

Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes.

Arch. Insect Biochem. Physiol. 2000 (45) 3, 95-108

Willott E., Tenczek T., Thrower L.W., Kanost M.R.

Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*.

Eur. J. Cell. Biol. 1994 (65) 2, 417-23

Yamamoto R. T.

Mass rearing of the tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation.

J. Econ. Entomol. 1969 (62) 6, 1427-1431

Yoshida H, Ochiai M, Ashida M.

Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986 (141) 3, 1177-84

Yu X.Q. & Kanost M.R.

Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin.

Arch. Insect Biochem. Physiol. 1999 (42) 3, 198-212

Yu X.Q. & Kanost M.R.

Immunelectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Dev. Comp. Immunol. 2004 (28) 9, 891-900

Zou Z., Najar F., Wang Y., Roe B., Jiang H.

Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses.

Insect Biochem. Mol. Biol. 2008 (38) 6, 677-682

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung extrahierter Gesamt-RNA nach einer DNase-Behandlung.....	S. 47
Abb. 2: Darstellung der Expressionsanalyse von Hämolin, PGRP und Immulectin-2 in Hämozyten von <i>E. coli</i> -infizierten, PBS-behandelten und unbehandelten L5d1- Larven durch RT-PCR.....	S. 48
Abb. 3: Darstellung von aufgereinigter, synthetisierter doppelsträngigen RNAs.....	S. 48
Abb. 4: Ergebnis der RT-PCR eines Knockdown-Versuches der Hämolin-Expression	S. 49
Abb. 5: Darstellung der Nodulationsaktivität bei Knockdown-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren.....	S. 50
Abb. 6: Ergebnis der Fraktionierung der Hämolympheproteine durch Ammoniumsulfat- Fällung.....	S. 51
Abb. 7: Chromatogramm der Größenauftrennung der Scolexin-Fraktion durch eine Sephacryl-200-Säule.....	S. 52
Abb. 8: Darstellung der elektrophoretische Auftrennung der ausgewählten Unterfraktionen 11-39.....	S. 53
Abb. 9: Darstellung der elektrophoretische Auftrennung der vereinigten Proben.....	S. 53
Abb. 10: Darstellung der Coomassie-Färbung des Western Blotting der zur An- sequenzierung aufgetrennten Scolexinfraktion (A) und des entsprechenden Kontrollgels (B).....	S. 54
Abb. 11: Ergebnis der Blastanfrage blastp der ersten 10 N-terminalen Aminosäuren der aufgereinigten Scolexinprobe (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).....	S. 55

Abb. 12:	
Darstellung der Scolexin-Nachweis an Hämozyten-Monolayern.....	S. 56
Abb. 13:	
Darstellung des Scolexin-Nachweis an Coagulationsfasern.....	S. 57
Abb. 14:	
Darstellung des Scolexin-Nachweis an einem Gewebeschnitt.....	S. 58
Abb. 15:	
Hot-Shot-Sequenzierungsergebnis der 5'-RACE des Scolexin A aus infizierten L5d0- <i>M. sexta</i> -Hämozyten-RNA.....	S. 58
Abb. 16:	
Darstellung des Abgleichs des Hot-Shot-Sequenzierungsergebnisses der 5'-RACE des Scolexin A mit der NCBI-Nukleotiddatenbank.....	S. 59
Abb. 17:	
Alignment der 5'-RACE-Sequenz mit der Scolexin-A-Sequenz (FINNERTY et al. 1999).....	S. 60
Abb. 18:	
Darstellung der Expression der Scolexin-Isoformen in Hämozyten von L5d0- Larven nach Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen.....	S. 61
Abb. 19:	
Darstellung der Detektion der Scolexin-A-mRNA in Hämozyten durch <i>in situ</i> -Hybridisierung...	S. 62
Abb. 20:	
Darstellung der Expression der Scolexin-Isoformen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von <i>M. sexta</i>	S. 63
Abb. 21:	
Darstellung des Knockdown der Scolexin-A-Expression durch RNAi.....	S. 63
Abb. 22:	
Darstellung des Einflusses des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Expression anderer immuninduzierter Gene.....	S. 64
Abb. 23:	
Darstellung der Scolexin-A-Expression nach Verabreichung von dsScoA an L5d0-Versuchstiere.....	S. 65
Abb. 24:	
Ergebnis der Infektion der L5d0-Versuchstiere mit FITC-markierten <i>E. coli</i>	S. 65

- Abb. 25:
Darstellung des Vergleichs von *E. coli*- und FITC-*E.coli*- infizierten Versuchstieren hinsichtlich der Scolexin-, Lysozym- und Hämolin-Expression..... S. 66
- Abb. 26:
Darstellung des Vergleichs von carbonatbehandelten *E.coli*- und FITC-*E. coli*- infizierter Versuchstiere hinsichtlich der Scolexin-Expression..... S. 67
- Abb. 27:
Darstellung der Clearance injizierter, lebender *E. coli* aus der Hämolymphe S. 68
- Abb. 28:
Darstellung des Einflusses des Knockdowns der Scolexin-A-Expression auf die Einkapselungsfähigkeit der Hämozyten.....S. 69
- Abb. 29:
Alignment der 5'-terminalen Scolexin-Nukleotidsequenzen..... S. 84
- Abb. 30:
Alignment der N-terminalen Scolexin-Proteinsequenzen..... S. 85

Danksagung

An erster Stelle steht mein Dank an Prof. Dr. Tina Trenczek, die mir die Möglichkeit zur Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe geboten hat. Während der gesamten Zeit konnte ich Ihrer Unterstützung in meiner wissenschaftlichen Arbeit sicher sein. Darüber hinaus bin ich dankbar für das freundschaftliche Verhältnis zwischen uns, welches im Laufe der Zeit entwickelt hat, die ich nicht missen möchten.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn, der sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat. Die Zusammenarbeit und der freundliche Umgang wird mir in sehr angenehmer Erinnerung bleiben.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Stuart E. Reynolds von der University of Bath (UK), der mir die Gelegenheit gab als Marie-Curie-Stipendiat für drei Monate in seiner Gruppe zu arbeiten. Im gleichen Atemzug möchte ich Yannis, seinen Post-Doc nennen, der mich in dieser Zeit angeleitet hat. Die gemeinsame Arbeit gehört zu meinem persönlichen Highlight der Promotionszeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Anita, die mir mit vielen Hilfen das Laborleben leichter gemacht hat. Janine möchte ich danken für die unzähligen Agarplatten, die Sie für mich gegossen hat.

Andreas danke ich für seine unverzichtbare Hilfe in Sachen ISH, die diese Arbeit bereichert haben.

Danke Henni, für all den Rat, die Chemikalien und die anregenden Gespräche, die den Laboralltag angenehmer gemacht haben.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Hauses bedanken für die sehr kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Anke, die zunächst im Labor, dann in meinem Leben zur wichtigsten Person für mich geworden ist.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die nie an mir gezweifelt hat.

Aileme sevgi ve saygı ile...

Eidesstattliche Erklärung

(nach §17, Abs. 2 der Promotionsordnung
der Gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften
für die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen
vom 4. Februar 2005)

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

Gießen, August 2010