

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie
des Fachbereichs Biologie
der Justus-Liebig Universität Giessen
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Trenczek)

**Aktivierung von Hämozyten des Tabakswärmers
Manduca sexta nach bakteriellen Infektionen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig Universität Giessen
Fachbereich Biologie

vorgelegt von
Frank-Rüdiger Scholz
aus Hellersen

Giessen 2002



Gutachter Prof. Dr. T. Trenzcek
Gutachter Prof. Dr. A. Pingoud

Tag der Disputation: 05.Februar.2002



VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ammoniumsulfat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
CRD	Kohlenhydrat-erkennende Domäne (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-Oktan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
DIG	Digoxigenin
DTT	Dithiotreitol
FP-1	Fettkörper Protease-1
FddNTP	Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide
HAIP	Hämozyten-Aggregation-inhibierendes-Protein
Imd	eine <i>D. melanogaster</i> Mutante (<i>immun deficiency</i>)
IML-3	Immunolektin-3
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
LPS	Lipopolysaccharid
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase
MOPS	3-(N-morpholino)-propan-sulfonsäure
MsHc	<i>M. sexta</i> -Hemocytin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ni-NTA-Agarose	Nickel-nitrilotriessigsäure
pBSK	Plasmid <i>blue script</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Struktur (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PAP	Phenoloxidase-aktivierende Protease
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PO	Phenoloxidase
PPO	Pro-Phenoloxidase
PRR	Struktur-Erkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
PFU	Kolonie-formende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
p.I.	post injection
rcf	relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris-gepufferte Saline

Tris

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Anmerkung:

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem "Duden Korrektor" des Bibliographischen Instituts & F. A. Brockhaus AG (ISBN 3-411-06954-6) den Regeln der neuen deutschen Rechtschreibung angepasst.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	11
1.1.	Zelluläre Abwehrreaktionen bei Insekten.....	16
1.1.1.	Hämozyten-Typen	16
1.1.2.	Phagozytose	17
1.1.3.	Knötchenbildung	17
1.1.4.	Einkapselung	18
1.2.	Humorale Abwehrreaktionen bei Insekten.....	20
1.2.1.	Antimikrobielle Proteine	20
1.2.2.	Regulation der Genexpression antimikrobieller Peptide bei Insekten.....	22
1.2.3.	Protease-Kaskaden.....	24
1.3.	Zielsetzung der Arbeit.....	27
2.	MATERIAL	29
2.1.	Geräte	29
2.2.	Chemikalien	29
2.3.	Verwendete Bakterienstämme.....	31
2.4.	Versuchsorganismus.....	31
2.4.1.	Futter.....	32
3.	METHODEN	33
3.1.	Proteinbiochemische Methoden	33
3.1.1.	Präparation von Hämozytenmembranen und Extraktion der Membranproteine	33
3.1.2.	Nachweis und Aufreinigung LPS-bindender Proteine aus Hämozyten-Membranprotein-Präparationen	34
3.1.3.	Ammoniumsulfat-Fällung	35
3.1.4.	Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)	36
3.1.5.	Bestimmung der Kohlenhydratbindungsspezifität	38
3.1.6.	Silberfärbung	39
3.1.7.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
3.1.8.	Deglykosilierungsassay	41
3.2.	Säulenchromatografische Methoden	42
3.2.1.	Gelfiltration	42
3.2.2.	Chromatografie an immobilisiertem Heparin.....	43
3.3.	Immunologische Methoden.....	44
3.3.1.	Western-Blot-Analysen	44

3.3.2.	Indirekte Immundetektion mittels alkalische Phosphatase-konjugiertem sekundären Antikörper	45
3.3.3.	Indirekte Immunfluoreszenz an Hämozyten-Monolayern.....	46
3.3.4.	Indirekte Immunfluoreszenz an Dünnschnitten ganzer Tiere.....	47
3.4.	Molekularbiologische Methoden.....	48
3.4.1.	Präparation von Plasmid-DNA.....	48
3.4.2.	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.4.3.	Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	49
3.4.4.	Dephosphorylierung von verdauten Vektorplasmiden	49
3.4.5.	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation mit Plasmid-DNA	50
3.4.6.	PCR zur Amplifikation von DNA	50
3.4.7.	5'-RACE-PCR.....	51
3.4.8.	Nukleinsäure-Sequenzierung.....	52
3.4.9.	Rekombinante Expression der klonierten cDNAs in <i>Escherichia coli</i>	52
3.4.10.	Gewinnung von Gesamt-RNA.....	56
3.4.11.	Gewinnung von mRNA	57
3.4.12.	Northern-Blot Analysen	58
3.4.13.	Southern-Blot-Analysen	59
3.4.14.	Herstellung Digoxigenin markierter Sonden.....	60
3.4.15.	Hybridisierung.....	60
3.4.16.	Reverse Transkription und Erstellung zweier cDNA-Genbanken.....	61
3.5.	Sonstige Methoden.....	70
3.5.1.	Gewinnung von Hämolymphe-Plasma.....	70
3.5.2.	Präparation von Hämozyten	70
3.5.3.	Kultur von Bakterien	71
3.5.4.	Herstellung einer Affinitätsmatrix mit immobilisiertem LPS	71
3.5.5.	LPS-Bindungstest	73
3.6.	Bioinformatische Methoden.....	73
3.6.1.	Sequenzanalyse.....	73
4.	ERGEBNISSE.....	74
4.1.	Nachweis und Reinigungsversuche LPS-bindender Proteine in der Hämolymphe von <i>M. sexta</i>.....	74
4.2.	Erstellung von Expressions-cDNA-Banken aus induziertem Fettkörper und induzierten Hämozyten	78
4.2.1.	Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone	80
4.2.2.	Sequenz-Analyse der Fettkörper-Protease-1 (FP-1).....	84
4.2.3.	Sequenz-Analyse des Hämozyten-Aggregation-Inhibierenden-Proteins (HAIP)	88
4.2.4.	Sequenz-Analyse des Immunolektin-3 (IML-3).....	91
4.2.5.	Sequenz-Analyse des <i>Manduca sexta</i> Hemocytins (MsHc).....	93
4.3.	Rekombinante Expression der cDNAs zur Produktion von polyklonalen Antikörpern.....	100

4.3.1.	Rekombinante Expression des IML-3 und Reinigung des Proteins aus Bakterien	101
4.3.2.	Rekombinante Expression eines MsHc-Fragments und Reinigung des Proteins aus Bakterien	105
4.3.3.	Rekombinante Expression der FP-1 und Reinigung des Proteins aus Bakterien	106
4.4.	Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen FP-1, MsHc und IML-3	109
4.5.	Kreuzreaktivität der Antiseren mit Hämolymp-Proteinen anderer Insekten	110
4.6.	Charakterisierung einiger Eigenschaften des IML-3.....	113
4.7.	Einfluß bakterieller Infektionen auf die Konzentration von FP-1 und IML-3 in der Hämolymphe	117
4.8.	Prozessierung der FP-1 in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums.....	119
4.9.Einfluß experimenteller Infektionen auf die Expression von HAIP, MsHc und IML-3	121
4.10.	Charakterisierung des HAIP	125
4.10.1.	Chitin-Bindungstest mit HAIP	128
4.10.2.	Bestimmung des Gehalts von HAIP in der Hämolymphe verschiedener Entwicklungsstadien von <i>M. sexta</i>	129
4.11. Immunhistochemische Untersuchungen an Hämozyten und Gewebeschnitten	131
4.11.1.	Fettkörper-Protease 1 (FP-1)	131
4.11.2.	Hämozyten-Aggregation-Inhibierendes-Protein (HAIP)	133
4.11.3.	Immunolektin-3 (IML-3).....	135
4.11.4.	<i>Manduca sexta</i> Hemocytin (MsHc).....	138
5.	DISKUSSION.....	141
5.1.	Nachweis von Bindungsfaktoren in Hämozyten-Membranen von <i>M. sexta</i>	141
5.2.	Herstellung von Expressionsbibliotheken aus Fettkörper und Hämozyten	143
5.3.	Sequenzierung und Charakterisierung des HAIP.....	144
5.4.	Sequenzierung und Charakterisierung der Fettkörper-Protease-1.....	147
5.5.	Sequenzierung und Charakterisierung des Immunolektin-3	153
5.6.	Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung des Hemocytin.....	159

6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	164
7.	LITERATUR	167
8.	ANHANG	180
8.1.	Sequenzen der benutzen Primer	180
8.2.	Sequenz des Immunolektin-3.....	181
8.3.	Vollständige Sequenz des <i>M. sexta</i> Hemocytins.....	183
8.4.	Vollständiges Alignment des Hemocytins von <i>M. sexta</i> mit homologen Proteinen aus <i>B. mori</i> , <i>D. melanogaster</i> und <i>H. sapiens</i> :.....	190
8.5	Alignment der Hemocytin Domänen vom D-Typ.....	194
9.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	196
9.1.	Originalarbeiten.....	196
9.2.	Kurzveröffentlichungen	196

Lebenslauf

Danksagung

Erklärung

DURING MY FIRST YEAR at Naval Postgraduate School in Monterey, Calif., I sat chatting one day with some classmates about the program's difficulty. A professor overheard us and tried to allay our fears. "Don't worry too much about grades," he explained. "When you think you know everything, they give you a Bachelor's degree. Then when you realize that you don't know anything, they give you a Master's. And when you find out that you don't know anything, but neither does anyone else," he continued, "they give you a doctorate."

-unbekannt-

1. Einleitung

Wie andere Organismen besitzen auch Insekten die Fähigkeit, erfolgreich Pathogenen zu widerstehen. Neben einer hohen Reproduktionsrate tragen physikalische Barrieren, wie z. B. der Chitinpanzer, ebenso dazu bei, wie die Reaktionen ihres Immunsystems. Im Gegensatz zu dem vorwiegend auf adaptiven Mechanismen beruhenden Immunsystem der Vertebraten basieren Abwehrreaktionen von Insekten jedoch auf angeborenen Mechanismen (*innate immunity*, ‚natürliche Immunität‘). Diese natürliche Immunität gewährt in der ersten Phase einer Infektion auch in Wirbeltieren Schutz und ist darüber hinaus an der Induktion und Kontrolle adaptiver Mechanismen beteiligt. Ähnlich den komplexen Reaktionen infolge eines Pathogenkontaktes bei Wirbeltieren, umfassen die Reaktionen der angeborenen Immunität bei Insekten humorale und zelluläre Komponenten. Jedoch fehlt hier die klonale Selektion individueller Lymphozyten ebenso wie ein längere Zeit andauerndes ‚immunologisches Gedächtnis‘. Die zellulären Reaktionen umfassen den Wundverschluss, die Phagozytose, die Knötchenbildung von Hämozyten z. B. mit Bakterien oder Pilzen und die Einkapselung von größeren Fremdkörpern in mehrschichtigen Hämozyten-Aggregationen. Im Rahmen der humoralen Immunantwort erfolgt die Freisetzung und Neusynthese antimikrobieller Peptide sowie die Aktivierung konstitutiv in der Hämolymphe vorliegender Komponenten, wie z. B. der Phenoloxidase [Janeway 1992; Hoffmann 1995; Hoffmann et al. 1996; Fearon 1997; Gillespie et al. 1997; Hoffmann et al. 1997; Trenczek 1998; Janeway et al. 1999; Kimbrell et al. 2001].

Die durch klonale Selektion, Expansion und Elimination [Kimbrell et al. 2001] entstehenden hochspezifischen Strukturen zur Unterscheidung von ‚Fremd‘ und ‚Selbst‘ der Wirbeltiere fehlen den Insekten. Daher muss eine Fremd-Erkennung durch das Insekten-Immunsystem auf der Basis hochkonservierter Strukturen der Pathogene (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*) beruhen. Diese werden von Pathogen-erkennenden Rezeptoren erkannt (PRR, *pathogen recognition receptor*) [Janeway 1989; Janeway 1992], worauf verschiedene zelluläre und humorale Reaktionen ausgelöst werden [Gillespie et al. 1997].

Konservierte mikrobielle Strukturen liegen z. B. im Lipopolysaccharid (LPS) in der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien oder im Peptidoglykan (PG) in der Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien vor.

Gram-negative Bakterien unterscheiden sich gegenüber anderen Zellen dadurch, dass sie zusätzlich zur Cytoplasma-Membran von einer weiteren ‚Hülle‘, der äußeren Membran umgeben sind. Zwischen der inneren und äußeren Membranschicht befindet sich ein periplasmatischer Raum, der neben Peptidoglykan verschiedene Kohlenhydrate und Proteine enthält. Sowohl innere als auch äußere Membran bestehen aus Phospholipiden und Proteinen.

Ein weiterer Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist das LPS. Bei Lipopolysacchariden handelt es sich um amphiphile Moleküle, deren Struktur zwischen verschiedenen Bakterienarten größere Variationen aufweisen kann. Gewöhnlich wird LPS in einen hydrophoben Phospholipid-Anteil, über den das Molekül in der äußeren Membran verankert ist, und eine Kohlenhydrat-Seitenkette, die in das umgebende Medium gerichtet ist, charakterisiert. Der auch als Lipid A bezeichnete Lipid-Teil des Moleküls ist in seiner Zusammensetzung relativ konstant. Das kovalent an Lipid A gebundene Polysaccharid wird weiter unterteilt in eine innere und äußere Kernregion und das O-Antigen (s. Abb. 1). Die Kernregion ist in ihrer Zusammensetzung konserviert, der innere Kern besteht gewöhnlich aus den Zuckern 3-Deoxy-D-manno-Octulosonsäure und Heptose. Der äußere Kern enthält mehrere, gewöhnlich fünf Hexosen. Das O-Antigen zeichnet sich durch eine hohe Variabilität hinsichtlich seiner Kettenlänge aus und besteht aus unterschiedlichen Hexosen in wechselnden Anteilen. Bei Vertebraten ist für die Auslösung pathogener Effekte das Lipid A ausreichend [Raetz 1990; Alexander et al. 1999].

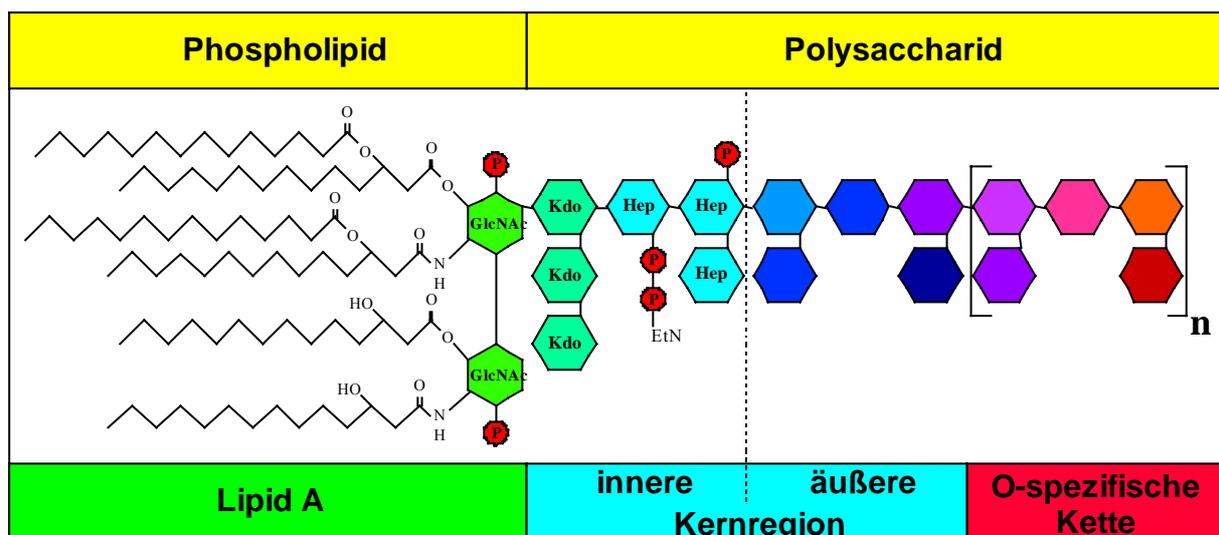


Abb. 1: Molekülstruktur von Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid – ein Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien - besteht aus einem hydrophoben Phospholipid (Lipid A) und einem hydrophilen Polysaccharid. Das Polysaccharid wird in eine innere und äußere Kernregion und eine O-spezifische Kette unterteilt. Während das Lipid A und die innere Kernregion in verschiedenen Bakterienarten eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen, zeigt die äußere Kernregion und die O-spezifische Kette eine hohe Varianz bezüglich der Kettenlänge und –zusammensetzung zwischen verschiedenen Arten.

Gram-positiven Bakterien fehlt diese zusätzliche äußere Membran. Sie tragen auf ihrer Cytoplasma-Membran eine Schicht aus Peptidoglykan, dass sie zum umgebenden Medium abgrenzt. Peptidoglykan besteht aus mehreren durch kurze Peptide vernetzten Polysacchariden. Typische Bestandteile der Peptide sind Aminosäuren wie D- und L-Alanin, D-Glutaminsäure, m-Diamino-Pimilinsäure und L-Lysin. Die Polysaccharide bestehen aus alternierenden N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure Monomeren (s. Abb. 2) [Chetty et al. 1984].

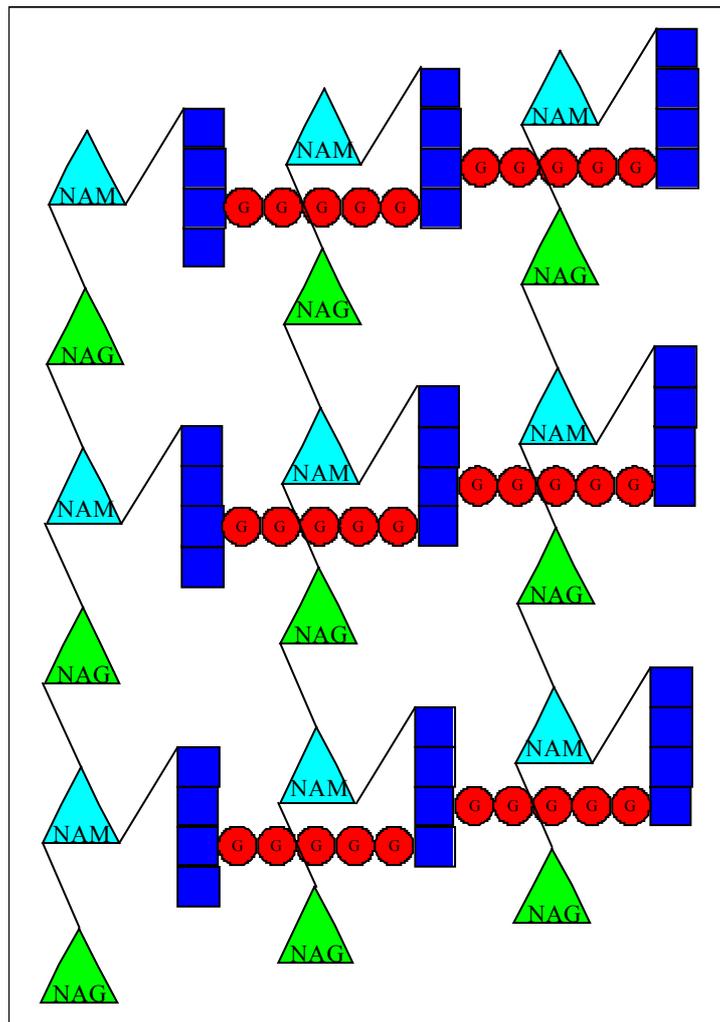


Abb. 2: Stilisierte Darstellung der Molekülstruktur von Peptidoglykan

Peptidoglykan besteht aus mehreren Polysaccharid-Ketten, die aus alternierenden Einheiten von N-Acetylglucosamin (NAG) und N-Acetylmuraminsäure (NAM) bestehen. Die Polysaccharid-Ketten werden durch Glycin-Pentamere (G) und Tetrapeptide (blaue Kästchen) vernetzt. Die Zusammensetzung der Tetrapeptide und das Ausmaß der Vernetzung variieren zwischen verschiedenen Bakterienarten.

Tabelle 1:

Ausgewählte Beispiele von Insekten-Proteinen mit Affinität zu konservierten mikrobiellen Strukturen. Die Bindungsspezifitäten wurden zum Teil mit isolierten Komponenten, wie z. B. LPS durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit wird die Bindungsspezifität hier nur mit G+ (bindet hauptsächlich Gram-positive Bakterien), G- (bindet hauptsächlich Gram-negative Bakterien) und β -1,3 (bindet hauptsächlich Hefen) angegeben. Nicht für alle Proteine wurden alle Bindungsspezifitäten ermittelt.

Insektenart	Name	Vorkommen und Spezifität	Referenz
A: LPS-bindende Proteine			
<i>B. discoidalis</i>	BDL1 - 3	Hämolymphe, G-, G+,	[Wilson et al. 1999]
<i>B. mori</i>	Bm-LBP	Hämolymphe, G-	[Koizumi et al. 1997; Koizumi et al. 1999]
	11 kDa Protein	Hämozyten, G-	[Xu et al. 1995]
	GNBP	Hämolymphe, G-	[Lee et al. 1996]
<i>C. capitata</i>	47 kDa Protein	Hämolymphe, Hämozyten, G-	[Marmaras et al. 1992; Charalambidis et al. 1995]
<i>D. melanogaster</i>	DGNBP-1	Hämolymphe, Hämozyten, β -1,3, G-	[Kim et al. 2000]
<i>H. cunea</i>	Hc-Lektin	Hämolymphe, G-	[Shin et al. 2000]
<i>M. sexta</i>	IML-1 und -2	Hämolymphe, G-, G+, β -1,3	[Yu et al. 1999; Yu et al. 2000]
<i>P. americana</i>	Pa-LBP	Hämolymphe, G-	[Jomori et al. 1990]
B: Peptidoglykan-erkennende Proteine			
<i>B. discoidalis</i>	BDL2	Hämolymphe, G+, G-	[Wilson et al. 1999]
<i>B. mori</i>	PGRP	Hämolymphe, Hämozyten, G+	[Ochiai et al. 1988]
<i>D. melanogaster</i>	SA, SC1B und 10 sehr ähnliche Proteine	Hämolymphe, Hämozyten, SA, SC1B: G+	[Werner et al. 2000]
C: β-1,3-Glukan-bindende Proteine			
<i>B. discoidalis</i>	GSL	Hämolymphe, β -1,3	[Wilson et al. 1999]
<i>B. mori</i>	β -1,3GRP	Hämolymphe, β -1,3	[Yoshida et al. 1986; Ochiai et al. 2000]
<i>M. sexta</i>	GRP	Hämolymphe, β -1,3, G-, G+	[Ma et al. 2000]

Neben LPS und PG können auch β -1,3-Glukan von Pilzen, doppelsträngige RNA verschiedener Viren oder unmethylierte DNA verschiedener Bakterien als PAMP wirken [Janeway 1992].

In jüngerer Zeit wurden mehrere Proteine aus unterschiedlichen Insekten-Arten isoliert, die in Experimenten bakterielle Strukturen wie LPS, PG oder β -1,3-Glukan binden können. Eine Auswahl solcher Proteine ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Für einige der LPS-bindenden Proteine (LBP) gibt es bereits Befunde hinsichtlich einer Beteiligung an der Auslösung nachfolgender Reaktionen. Aus der Hämolymphe von *Periplaneta americana* wurde ein LPS-bindendes Protein isoliert, das zur Familie der Calcium-abhängigen Lektine gehört [Jomori et al. 1990; Jomori et al. 1991]. In anschließenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieses LBP an der Entfernung von *Escherichia coli* aus der Hämolymphe mitwirkt. An dieser Reaktion sind Hämocyten zumindest beteiligt. Ob die Bakterien nach einer Prä-Inkubation mit dem LBP von den Hämocyten nur gebunden oder sogar internalisiert werden, bleibt jedoch bisher unklar [Jomori et al. 1992]. In folgenden molekularbiologischen Untersuchungen wurden weitere, sehr ähnliche Lektine in *P. americana* identifiziert [Kawasaki et al. 1996]. Ein weiteres LBP in Hämocyten wurde mittels eines *in-vitro* Bindungstests bei *Bombyx mori* nachgewiesen. Es handelt sich dabei um ein 11 kDa Protein. Da die Detektion des Proteins Proteinase K sensitiv war, könnte es sich dabei um ein an die äußere Hämocytenmembran gebundenes oder assoziiertes Protein handeln [Xu et al. 1995]. Ferner wurde in der Hämolymphe von *B. mori* ein an Gram-negative Bakterien bindendes Protein (GNBP) gefunden, das mit einem Antikörper gegen CD 14 (*Cluster of differentiation*) kreuzreagiert [Lee et al. 1996]. CD 14 wird bei Vertebraten als ein Bestandteil einer durch LPS ausgelösten Signalkaskade angesehen [Ulevitch et al. 1995]. In *Manduca sexta* [Yu et al. 1999; Yu et al. 2000], *B. mori* [Koizumi et al. 1999] und *Hypanthia cunea* [Shin et al. 2000] wurden mehrere sehr ähnliche Calcium-abhängige Lektine gefunden, die sich durch zwei aufeinander folgende Kohlenhydrat-erkennende Domänen auszeichnen (CRD, *carbohydrate-recognition domain*). Alle diese Lektine zeigten eine Bindung von LPS bzw. *E. coli*. Für die zwei aus *M. sexta* stammenden Proteine Immulektin 1 (das seit der Identifizierung des Immunolektin 2 als Immunolektin 1 bezeichnet wird) und Immunolektin 2 (IML-1 und -2) konnte neben der Bindung an Gram-negative Bakterien in einem *in-vitro* Assay mit zellfreier Hämolymphe in Verbindung mit LPS gezeigt werden, dass sie die Phenoloxidase-(PO)-Kaskade aktivieren [Yu et al. 1999; Yu et al. 2000]. Da die Proteine von *B. mori* und *H. cunea* eine sehr große Ähnlichkeit zu IML-1 und -2 zeigen, besteht die Möglichkeit, dass auch diese Proteine die PO-Kaskade aktivieren können. Eine intrinsische Protease-Aktivität ist bei den vier Lektinen nicht bekannt. Es muss daher postuliert werden, dass eine Bindung der Lektine an Bakterien

eine Protease rekrutiert, die nachfolgend die Aktivierung der PO-Kaskade einleitet. Bisher ist eine solche Protease nicht bekannt.

1.1. Zelluläre Abwehrreaktionen bei Insekten

Zelluläre Abwehrreaktionen wurden erstmals von Metchnikow 1882 bei Invertebraten beobachtet und als Reaktionen gegen ‚Fremd‘ interpretiert [Beck et al. 1997]. Seitdem hat es große Fortschritte bei der Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen bei Wirbeltieren gegeben. Die an zellulären Immunreaktionen beteiligten Zelltypen und Mechanismen sind bei Wirbellosen hingegen in weit geringerem Maße erforscht.

1.1.1. Hämozyten-Typen

Die Klassifizierung in unterschiedliche Typen von Blutzellen (Hämozyten) erfolgt bei Insekten meistens anhand morphologischer Kriterien [Lackie 1988]. Seit einiger Zeit gibt es jedoch Bestrebungen, mittels monoklonaler Antikörper auch molekulare Strukturen der Zelloberflächen, ähnlich dem *Cluster of Differentiation*-System für Vertebraten-Blutzellen, für eine Unterteilung heranzuziehen [Trenczek et al. 1990; Chain et al. 1992; Willott et al. 1994; Strand et al. 1996]. Man unterscheidet, je nach Insektenart, zwischen drei (z. B. *Drosophila melanogaster*) und fünf unterschiedliche Zelltypen (z. B. *Galleria mellonella*) [Lackie 1988; Trenczek 1998]. Aufgrund der noch fehlenden molekularen Charakterisierung der verschiedenen Hämozyten ergibt sich die Problematik eine einheitliche Nomenklatur zu etablieren.

Beim Tabakschwärmer *M. sexta*, der für diese Untersuchung genutzt wurde, werden die Hämozyten als Pro-Hämozyten, Plasmatozyten, granuläre Zellen, Oenozytoide und spherule Zellen bezeichnet [Horohov et al. 1982; Willott et al. 1994].

Etwa 7% der Hämozyten machen bei *M. sexta* Larven des letzten Larvenstadiums Pro-Hämozyten aus [Geng et al. 1989; Willott et al. 1994]. Es handelt sich dabei um rundliche, kleine Zellen mit einem sehr großen Zellkern. Es wird vermutet, dass Pro-Hämozyten zumindest in einige andere Hämozyten-Typen weiter differenzieren [Lackie 1988; Ratcliffe 1993]. Plasmatozyten bilden mit etwa 35% eine weitere Hämozyten-Gruppe. Sie erscheinen oval bis spindelförmig; bei Oberflächen-Kontakt, z. B. auf Objektträgern, heften sie sich an und breiten sich unter Bildung von Pseudopodien aus. In einigen Plasmatozyten können feine vesikuläre Strukturen beobachtet werden. Die zweite große Hämozyten-Gruppe bilden mit 51% die granulären Zellen. Charakteristisches Merkmal der granulären Zellen ist eine Vielzahl zytoplasmatischer, granulärer Strukturen (‚Granulen‘). In Hämozyten-Präparaten von *M. sexta* kann bei granulären Zellen häufig eine Bildung von kleinen, pseudopodien-ähnlichen Fortsätzen (‚Micro-Spikes‘) beobachtet werden. Spherule Zellen bilden mit 5%

einen weiteren Zelltyp. Sie zeigen häufig eine ovale bis spindelförmige, manchmal runde Form. Auffällig sind ihre großen intrazellulären vesikuläre Strukturen („Spherulen“). Diese sind deutlich größer als die Granulen der granulären Zellen [Geng et al. 1989; Willott et al. 1994]. Spherule Zellen beinhalten u. a. Glykoproteine und saure Mucopolysaccharide und sind möglicherweise am Wundverschluss und dem Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt [Crossley 1981]. Die kleinste Gruppe (2%) der Hämocyten sind die Oenozytoide [Geng et al. 1989; Willott et al. 1994]. Charakteristisches Merkmal ist die außergewöhnliche Größe dieser Zellen im Vergleich zu den übrigen Hämocyten. Sie sind der wichtigste Syntheseort der Prophenoloxidase [Sugumaran et al. 1993].

Daneben enthalten oder synthetisieren verschiedene Hämocyten-Typen unterschiedliche Proteine, die Pathogene abtöten können oder an deren Abbau beteiligt sind. Hierzu gehören sowohl Peroxidasen und hydrolytische Enzyme wie auch antimikrobielle Substanzen, wie z. B. Attacin [Trenczek 1998].

1.1.2. Phagozytose

Nach einer Infektion eines Insektes mit Pathogenen wie Bakterien oder Pilzen können diese durch in der Hämolymphe flottierende Hämocyten phagozytiert werden. An der Phagozytose sind meist zwei Hämocyten-Typen beteiligt: Plasmatozyten und granuläre Zellen. Während intakte Bakterien bei Lepidopteren sowohl von granulären Zellen als auch von Plasmatozyten phagozytiert werden, werden bakterielle Zellwand-Fragmente wie z. B. (LPS) nur von granulären Zellen internalisiert. Kleinere Partikel, wie z. B. Pigmente aus Tusche, werden hingegen von beiden Zelltypen aufgenommen [Trenczek 1998]. Die an der Internalisierung beteiligten Mechanismen, wie Erkennung, Bindung bzw. Adhäsion, Veränderungen im Zytoskelett sind gegenwärtig weitgehend unbekannt.

1.1.3. Knötchenbildung

Im Gegensatz zur Phagozytose erfolgt eine Knötchenbildung nach einer Infektion mit so großen Mengen an Bakterien oder Pilzzellen, dass die Hämocyten die Pathogene nicht mehr aufnehmen können. Die Folge ist eine Verklumpung der Erreger mit verschiedenen Hämolymp- Proteinen, Proteinen die von Hämocyten freigesetzt werden und mit Hämocyten selbst [Gillespie et al. 1997]. Am besten untersucht ist dieser Prozess bei *Ceratitidis capitata*. Hier erfolgt die Verklumpung durch die Bindung eines membranassoziierten, aber auch frei in der Hämolymphe vorliegenden Proteins mit einer Masse von 47 kDa. Der Bindung des Proteins folgen Vernetzungen mit anderen Hämolymp- Proteinen und Hämocyten durch reaktive Tyrosin-Derivate, Produkte der aktivierten Phenoloxidase [Marmaras et al. 1992; Marmaras et al. 1993; Marmaras et al. 1994; Charalambidis et al. 1995]. In *M. sexta* konnte

gezeigt werden, dass nach Infektion entstehende Aggregate aus Pathogenen, Proteinen und Hämocyten etwa zwei Stunden später melanisieren und mit umgebendem Gewebe verkleben [Horohov et al. 1983]. Über die beteiligten Proteine ist wenig bekannt. In den Verklumpungen konnten Mucopolysaccharide nachgewiesen werden [Horohov et al. 1983]. Kürzlich wurde mit Scolexin ein weiteres, induzierbares Protein von *M. sexta* in den Knötchen nachgewiesen [Kyriakides et al. 1993]. Scolexin wird, sowohl nach bakteriellen Infektionen als auch nach Verwundungen von der Epidermis gebildet [Kyriakides et al. 1995]. Daneben unterliegt die Scolexin-Expression auch einer entwicklungsstadien-abhängigen Kontrolle [Hurlbert et al. 1985].

1.1.4. Einkapselung

Eine Einkapselung wird häufig bei größeren Fremdkörpern wie z. B. Nematoden oder Schlupfwespeniern beobachtet. Während der Einkapselung werden die Fremdkörper von mehreren Schichten Hämocyten umhüllt. Dieser Prozess kann, abhängig von der Insektenart, mit oder ohne Melanisierung erfolgen [Gillespie et al. 1997]. Der ‚Fremdkontakt‘ erfolgt in solchen mehrschichtigen ‚Kapseln‘ nur durch diejenigen Hämocyten, die in direktem Kontakt mit dem Pathogen stehen. Die weiteren Hämocyten-Schichten lagern sich in der Folge an ‚körpereigene‘ Oberflächen an [Gillespie et al. 1997]. An Einkapselungsreaktionen sind Plasmatozyten und granuläre Zellen beteiligt; allerdings ist gegenwärtig nur wenig über den genauen Ablauf der Kapselbildung bekannt. In *Pseudoplusia includens* wurde der Prozess in drei verschiedenen Phasen unterteilt. Der anfängliche Kontakt zum Fremdkörper erfolgt durch granuläre Zellen. In einer Rekrutierungsphase kommt es zu einer Anlagerung von mehreren Plasmatozyten-Schichten. Die Kapsel wird durch eine einzelne Schicht granulärer Zellen abgeschlossen [Pech et al. 1996]. Bei *M. sexta* erfolgt der erste Kontakt zum Fremdkörper hingegen durch Plasmatozyten. In später aufgelagerten Schichten der Kapsel erfolgt eine Anlagerung sowohl granulärer Zellen aber auch von Plasmatozyten [Wiegand et al. 2001].

Im Gegensatz zur Phagozytose und Knötchenbildung muss während Einkapselungsreaktionen eine Kommunikation zwischen beteiligten Zellen postuliert werden. Bisher ist über diese Vorgänge wenig bekannt. Für *P. includens* konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure-Sequenz RGD für eine erfolgreiche Einkapselungsreaktionen notwendig ist [Pech et al. 1996]. Die RGD-Sequenz ist bei Vertebraten als Konsensus-Motiv für die Bindung an Proteine aus der Familie der Integrine bekannt [D'Souza et al. 1991]. Bei Invertebraten wird eine ähnliche Funktion für das Motiv KGD diskutiert [Johannsson 1999]. Integrin-verwandte Moleküle sind bei Insekten bislang nur bei *Drosophila melanogaster* gefunden worden [Gillespie et al. 1997; Johannsson 1999]. Neben der möglichen Beteiligung Integrin-ähnlicher Proteine

konnte kürzlich mit dem *plasmacyte spreading peptide* (PSP1) ein selektiv auf Plasmatozyten und granuläre Zellen wirkendes Peptid isoliert werden [Clark et al. 1997]. Während das Spreiten von Plasmatozyten durch PSP1 stimuliert wird, supprimiert es das Spreiten granulärer Zellen [Strand et al. 2000]. Weitere PSP1-ähnliche Peptide wurden aus verschiedenen anderen Insektenarten isoliert [Wang et al. 1999]. Der Wirkmechanismus dieser Peptide ist noch unklar.

Neben diesen Faktoren, die die Hämocyten-Aktivität und -Adhäsivität modulieren, sind einige weitere Proteine der Insekten mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben worden. Hemolin, das zuerst bei *H. cecropia* und *M. sexta* nachgewiesen wurde, ist das erste Insektenprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das im Zusammenhang mit Immunreaktionen beschrieben wurde [Ladendorff et al. 1990; Sun et al. 1990]. *In-vitro* Experimente zeigten, dass Hemolin die Aggregation von Hämocyten inhibiert [Ladendorff et al. 1991]. Eine ähnliche Wirkung wurde mit dem Hämocyten Aggregation inhibierenden Protein (HAIP) von *M. sexta* erzielt [Kanost et al. 1994]. Hemocytin, das aus *B. mori* isoliert wurde, zeigt eine große Ähnlichkeit zum von Willebrand Faktor der Vertebraten. Der von Willebrand Faktor ist u. a. an der Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen beteiligt [Perutelli et al. 1997]. Ein rekombinant hergestelltes Hemocytin-Fragment besaß hämagglutinierende Aktivität [Kotani et al. 1995]. In *Blaberus craniifer* wurde ein 90 kDa Protein gefunden, das mit einem Antikörper gegen Peroxinectin kreuzreagiert. Peroxinectin wurde ursprünglich bei *Pacifastacus leniusculus* beschrieben, in welchem es das Spreiten von Blutzellen ebenso stimuliert wie den Phagozytose- und Einkapselungsprozess. Peroxinectin enthält ein KGD-Sequenzmotiv, ein möglicher Bindungspartner in Form einer β -Integrin-Untereinheit, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [Johannsson 1999]. Daneben zeigt auch Lipophorin eine die Hämocyten-Adhäsion modulierende Wirkung [Ladendorff et al. 1991; Kanost et al. 1994; Lanz-Mendoza et al. 1996]. Lipophorin wurde ursprünglich als Lipid-Transportmolekül bei Insekten beschrieben. Es setzt sich aus bis zu drei Apo-Proteinen zusammen [Kanost et al. 1990]. Für die adhäsionsinhibierende Wirkung wird hauptsächlich Apo-Lipophorin Untereinheit I verantwortlich gemacht [Mandato et al. 1996]. Kürzlich wurde mittels des monoklonalen Antikörpers MS-13 bei *M. sexta* ein 90 kDa Hämocyten-Membranprotein identifiziert. Durch Injektion bzw. Prä-Inkubation der Hämocyten mit dem gegen MS-13 gerichteten Antikörper wurde in *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten die Einkapselung von synthetischen Fremdkörpern verhindert [Wiegand et al. 2001].

Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die die Beteiligung verschiedener weiterer endogener Faktoren an der Modulation der Hämocyten-Aktivität belegen [Gillespie et al. 1997]. Besonderer Bedeutung könnte dabei dem Nachweis bekannter Cytokine wie Interleukin-1 (IL-1) [Beck et al. 1996] und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) [Scharrer et al. 1996; Wittwer et al. 1999] zukommen. IL-1 vermittelt bei Vertebraten die Bildung von

verschiedenen Akute-Phase-Proteinen, die Reifung verschiedener Zelltypen, den Transport von Adhäsionsmolekülen an die Zelloberfläche und moduliert deren Aktivität. Im Zusammenspiel mit TNF- α bewirkt IL-1 zudem die Freisetzung verschiedener Arachidonsäure-Metabolite. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch Einsatz verschiedener Inhibitoren des Arachidonsäure-Metabolismus zelluläre Reaktionen wie Phagozytose und Knötchenbildung in *M. sexta* und *Zophobas atratus* beeinträchtigt werden können [Stanley-Samuelson et al. 1991; Bedick et al. 2000].

1.2. Humorale Abwehrreaktionen bei Insekten

Mit der Entdeckung der Antikörper gelang von Behring und Kitasato 1890 erstmalig der Nachweis humoraler Abwehr-Komponenten als Folge einer Infektion von Wirbeltieren [Nossal 1993]. Jahre später gelang Fleming mit der Entdeckung des Lysozyms, erstmalig der Nachweis von antimikrobiell wirkenden humoralen Faktoren, die nicht zur Klasse der Antikörper gehören [Beck et al. 1997]. Während in Insekten keinerlei Antikörper gefunden wurde, gelang 1980 mit der Entdeckung des Cecropins der Nachweis eines weiteren antimikrobiellen Peptids.

1.2.1. Antimikrobielle Proteine

Seit der Entdeckung des Cecropins von *H. cecropia* [Hultmark et al. 1980] konnten zahlreiche verschiedene antimikrobielle Peptide und Proteine in Pflanzen, Wirbellosen und Wirbeltieren identifiziert werden. Gegenwärtig sind über 600 antimikrobielle Peptide eukaryontischer Organismen beschrieben [Tossi 2001]. Gemeinsam ist diesen Peptiden eine kleine Molekülgröße; der überwiegende Teil umfasst 20 bis 40 Aminosäuren [Boman 1998]. Die Expression der Mehrzahl antimikrobieller Peptide wird durch eine Infektion induziert. In Insekten erfolgt ihre Synthese zu einem sehr großen Anteil im Fettkörper, jedoch vermögen auch Hämocyten und andere Gewebe in gewissem Umfang antimikrobielle Peptide zu synthetisieren. In *D. melanogaster* konnte kürzlich mittels eines fluoreszierenden Reporter-gen-Konstrukts gezeigt werden, dass auch in Insekten lokal begrenzte humorale Immunreaktionen vorkommen [Ferrandon et al. 1998]. Trotz der kleinen Molekülgrößen der meisten antibakteriellen Peptide, unterscheiden sie sich in ihrer chemischen und strukturellen Beschaffenheit. Gegenwärtig können die verschiedenen Peptide anhand dieser Eigenschaften in vier verschiedene Gruppen unterteilt werden, einige typische Vertreter der vier verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2:

Ausgewählte Beispiele antimikrobieller Peptide bei Insekten.

Peptid-Klasse	Charakteristika	Spezifität	Beispiele
Cecropin-ähnlich	Größe ca 4 kDa, basisch, ohne Cystein 2 α Helices verbunden durch intermediären Bereich	Vorzugsweise wirksam gegen Gram-negative Bakterien	Bactericidin Cecropin Sarcotoxin I
Cyclische Peptide	1-4 Disulfidbrücken	Bevorzugt wirksam gegen Pilze, aber auch Bakterien	Drosomycin (Insekten) Defensin Thanatin
Glycin-reich	Größe ca. 9-30 kDa, reich an Glycin z. T. O-glykosyliert	Vorzugsweise wirksam gegen Gram-negative Erreger	anti-fungales Peptid Attacin Coleopteracin Diptericin Hymenoptaecin Sarcotoxin II
Prolin-reich	Größe ca. 2-3 kDa Prolingehalt bis zu 25%, ohne Cystein Gruppe a: ohne Modifikation Gruppe b: O-glykosyliert	Überwiegend gegen Gram-negative Bakterien	Abaecin Apidaecin Drosocin Lebocin Metalnikowin Metchnikowin Pyrrhocoricin
Unterschiedl. Charakteristik	Individuelle Charakteristika	Aktiv gegen Bakterien, Erythrozyten und Pilze	Androin Ceratotoxin Lysozym Gallysin-1 Royalisin

*nach Hoffmann et al. (1995, 1996)

1.2.2. Regulation der Genexpression antimikrobieller Peptide bei Insekten

Die Neusynthese antimikrobieller Peptide nach Verwundung oder Infektion ist bei Insekten durchaus kein unspezifischer Vorgang. Neuere Ergebnisse, überwiegend von Experimenten mit *D. melanogaster*, belegen, dass die Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit von den applizierten Pathogenen über unterschiedliche Signaltransduktionswege verläuft und eine gewisse Spezifität für die jeweils genutzte Pathogen-Klasse aufweist [Kimbrell et al. 2001]. In der immun defizienten Mutante *imd* (*immune deficiency*) wird die Expression der Gene für Diptericin und Drosocin, Peptiden mit Wirksamkeit vornehmlich gegen Gram-negative Bakterien, in der Folge einer septischen Verletzung deutlich beeinträchtigt. Die Expression von Cecropin und Drosomycin, Peptiden mit Wirksamkeit vornehmlich gegen Bakterien und Pilze bleibt hingegen nahezu unverändert [Lemaitre et al. 1995]. In einer weiteren Mutante, *18-wheeler*, die ebenfalls die Überlebensfähigkeit von *Drosophila*-Larven nach septischen Verletzungen beeinträchtigt, konnte gezeigt werden, dass der nukleare Import des Transkriptionsfaktors Dif (*dorsal-related immunity factor*) beeinträchtigt wird [Williams et al. 1997]. Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass der zu diesem Immundefekt führende Rezeptor zur Familie der Toll-Rezeptoren gehört [Tauszig et al. 2000].

Der Toll-Rezeptor und die beteiligte Signalkaskade wurde ursprünglich bei Untersuchungen der Embryogenese von *D. melanogaster* beschrieben [Belvin et al. 1996; Means et al. 2000]. Eine extrazelluläre Serin-Protease Kaskade führt zur Aktivierung des Toll-Liganden, dessen Bindung intrazellulär über das Protein Tube und die Kinase Pelle, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Dorsal führt. Dorsal transloziert darauf in den Zellkern und kann dort die Aktivierung seiner Zielgene bewirken [Belvin et al. 1996]. Dorsal und Dif repräsentieren Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Rel-Proteine, zu der auch NF- κ B gehört. NF- κ B ist aus der Vertebraten-Immunologie bekannt. Die Produkte NF- κ B-gesteuerter Gene sind für die B-Zell-Reifung, die T-Zell-Aktivierung und die Modulation der Makrophagen-Aktivität von Bedeutung [Baeuerle et al. 1994; Baeuerle et al. 1996]. Bei der Untersuchung der regulatorischen Elemente der Gene für Attacin, Cecropin und Diptericin fiel ein κ B-ähnliches Motiv auf, für das gezeigt werden konnte, dass es im Diptericin Promotor Dorsal binden kann. In weiterführenden Experimenten konnte auch die Beteiligung der abwärts von Toll gelegenen regulatorischen Gen-Kassette gezeigt werden [Lemaitre et al. 1996; Kimbrell et al. 2001]. Ein auf den bisherigen Befunden basierendes Regulationsschema ist in Abb. 3 dargestellt.

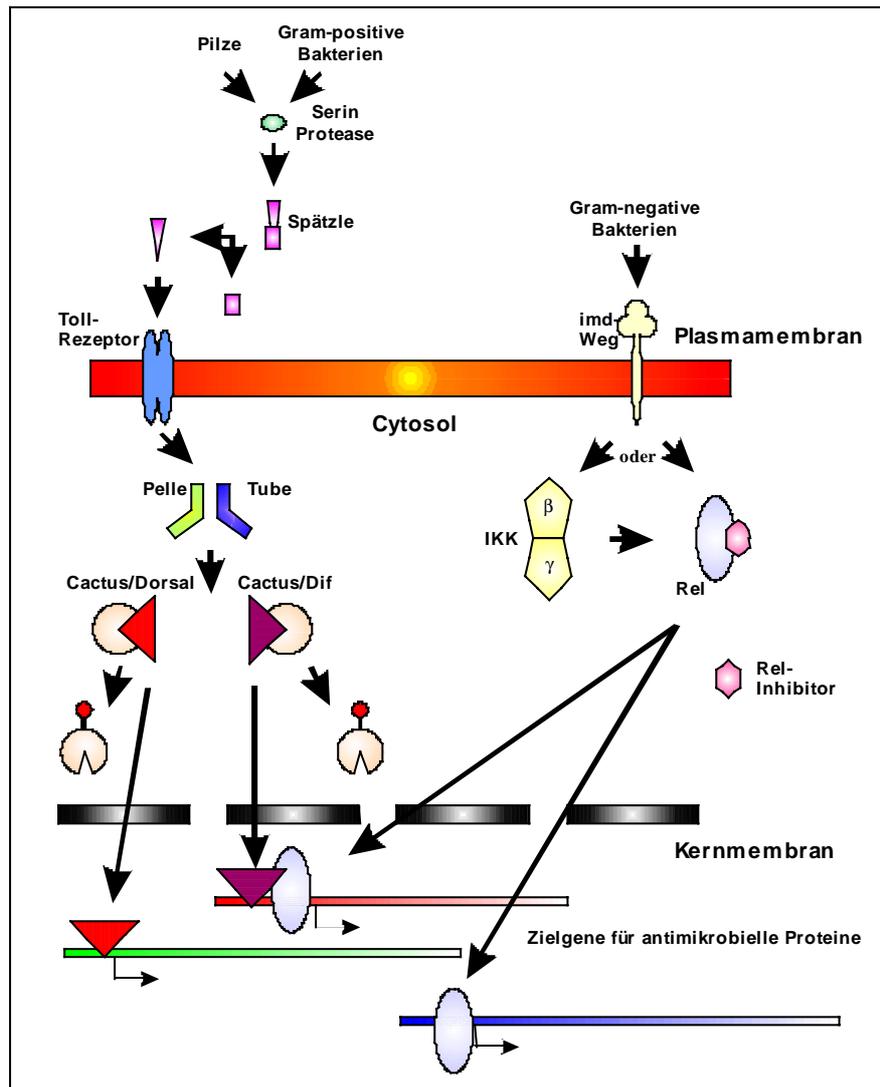


Abb. 3: Intrazelluläre Signalkaskade, die in *Drosophila melanogaster* zur Aktivierung der Gene antimikrobieller Peptide führt.

Die Bindung von Pilzen oder Gram-positiven Bakterien an ein Erkennungsmolekül führt zur Aktivierung einer Protease, die den Toll-Liganden Spätzle aktiviert. Aktiviertes Spätzle bindet an den Toll-Rezeptor, der das erhaltene Signal über eine aus mehreren Proteinen (Tube, Pelle) bestehende Kette an ein Protein der Rel-Familie (hier als Dorsal und Dif gekennzeichnet) weiterleitet. Auf diese Aktivierung hin, fällt ein am Rel-Protein gebundener Inhibitor (hier Cactus) ab. Das Rel-Protein wandert in den Zellkern. Dort bindet es an DNA-Sequenzen und reguliert so die Transkription hauptsächlich gegen Pilze und Gram-positive Bakterien wirkender antimikrobieller Proteine. Eine zweite Signalkette, die von Gram-negativen Bakterien aktiviert wird, löst über ein noch unbekanntes Membranprotein den "imd-Weg" aus. Die Transkription der Gene hauptsächlich gegen Gram-negative Bakterien wirkender antimikrobieller Proteine erfolgt vermutlich auch über ein Protein der Rel-Familie. Einige antimikrobielle Proteine benötigen möglicherweise beide Signalkaskaden zur vollständigen Aktivierung [modifiziert nach Kimbrell et al. 2001].

Während die Beteiligung wichtiger intrazellulärer Komponenten der Toll-Kaskade in *D. melanogaster* damit nachgewiesen ist, liegen über die extrazellulär beteiligten Faktoren noch keine vollständigen Erkenntnisse vor. Bisher konnte nur die Beteiligung von Spätzle an der Aktivierung von Drosomycin gezeigt werden [Levashina et al. 1999]. Bei der Aktivierung antimikrobieller Peptide sprechen Ergebnisse, die mittels Mutanten erzielt wurden, gegenwärtig gegen eine Beteiligung der aus der Embryonalentwicklung bekannten, aufwärts von Spätzle liegenden Proteasen *Gastrulation defective*, *Easter* und *Snake* an der Aktivierung der Toll-Rezeptor-assoziierten Signalkaskade [Jiang et al. 2000].

1.2.3. Protease-Kaskaden

Extrazelluläre Protease-Kaskaden konnten in Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen werden. In Vertebraten vermitteln sie schnelle, räumlich eingeschränkte Antworten auf verschiedene physiologische oder pathologische Reize. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise auf die Existenz ähnlicher Kaskaden bei Invertebraten.

Neben dem bereits beschriebenen Mechanismus, der zur Aktivierung des Liganden für den Toll-Rezeptor während der Embryogenese von *D. melanogaster* führt, existiert in der Hämolymphe von Insekten mit der Pro-Phenoloxidase-aktivierenden Kaskade eine weitere Protease-Kaskade. Eine Infektion löst hierbei die Aktivierung von Proteasen aus, die als letzte Reaktion die Konversion der inaktiven Pro-Phenoloxidase (PPO) in das aktive Enzym Phenoloxidase (PO) bewirken [Söderhäll et al. 1998]. Die Aktivierung der PO führt neben der Bildung von Melanin ebenfalls zur Generierung von cytotoxischen Metaboliten, die auf Pathogene wirken [Nappi et al. 1993]. Neben der Beteiligung der PO an immunologischen Reaktionen, wie Knötchenbildung und Einkapselung, erfolgt eine Aktivierung auch während der Sklerotisierung der Cuticula [Sugumaran et al. 1993]. Gegenwärtig liegen keine vollständigen Erkenntnisse darüber vor, wieviele Proteasen der Kaskade, die schließlich zur Aktivierung der PO führt, angehören. Auch über die Spezifitäten der verschiedenen Proteasen und über die sie exprimierenden Gewebe liegen keine abschließenden Untersuchungen vor. Bisher sind aus verschiedenen Insekten unterschiedliche PPO-aktivierende Proteasen (PAP) bekannt [Jiang et al. 2000]. Bei *M. sexta* wurden neben einer PAP aus der Cuticula (cPAP) [Jiang et al. 1998] in zwei weiteren Geweben PAPs gefunden, die sich in der Sequenz von der Erstgenannten unterscheiden (persönliche Mitteilung Prof. H. Jiang, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA). Diese werden ihrerseits ebenfalls als Pro-Enzyme synthetisiert und benötigen daher einen Aktivierungsmechanismus. Sowohl die in der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* beteiligten Proteasen *Snake* und *Easter*, wie auch die verschiedenen PAP besitzen ein Serin im reaktiven Zentrum und gehören zur Familie der Clip-Domänen Proteasen [Jiang et al. 2000]. Diese wurden erstmalig mit dem

Proclotting Enzym in der Koagulationskaskade von *Tachypleus tridentatus* beschrieben [Muta et al. 1990]. Da die experimentelle Applikation von PAMPs unterschiedlicher Pathogen-Klassen zu einer Aktivierung der PO-Kaskade führen kann, gibt es möglicherweise mehrere Wege, die diesen Prozess einleiten (Abb. 4).

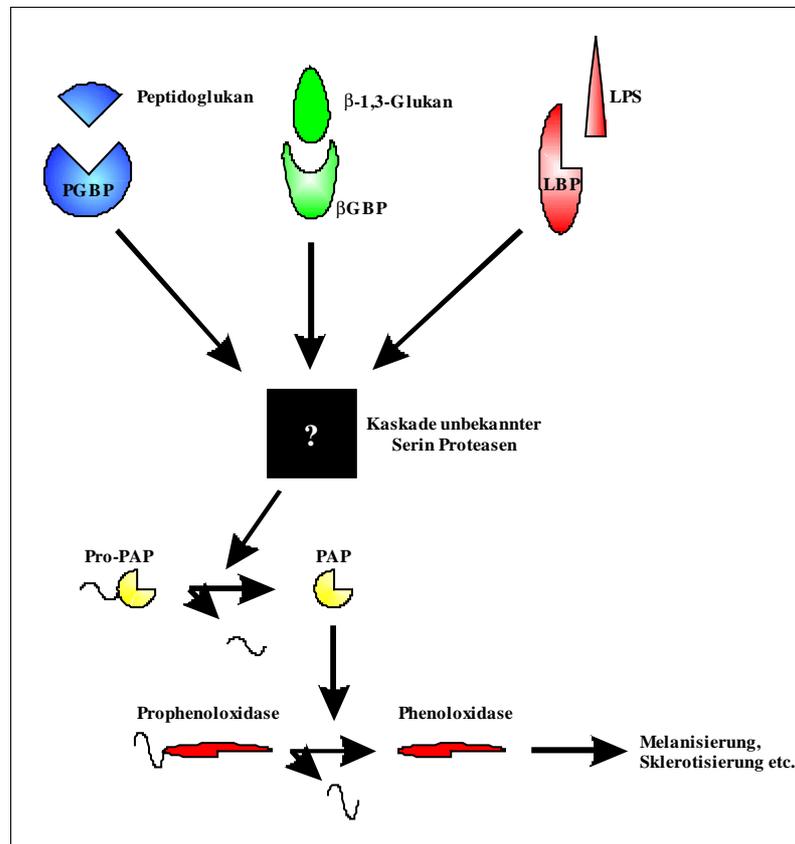


Abb. 4: Hypothetisches Modell der Signalkaskade zur Aktivierung der Phenoloxidase
 Nach einer Infektion mit unterschiedlichen Pathogenklassen erfolgt die Bindung konservierter Strukturen (Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien, β -1,3-Glukan von Pilzen und LPS Gram-negativer Bakterien) der Pathogene durch Erkennungsmoleküle (PGBP, β GBP und LBP). Als Folge der Bindung kommt es zu einer Aktivierung einer Kaskade verschiedener Proteasen. Das Endglied der Kaskade ist die Pro-Phenoloxidase-aktivierende Protease (Pro-PAP), die anschließend die Prophenoloxidase aktiviert. Bisher sind mit Ausnahme der Pro-PAP keine weiteren Proteasen dieser Kaskade bekannt (symbolisiert durch den schwarzen Kasten) [modifiziert nach Jiang et al. 2000].

Neben diesen möglichen Aktivierungswegen erfolgt die Inaktivierung der beteiligten Proteasen wahrscheinlich über sogenannte Serpine (Serin Protease Inhibitoren). Serpine sind in der Hämolymphe von verschiedenen Insekten gefunden worden [Kanost 1999; Fröbuis et al. 2000]. Gegenwärtig sind die Spezifitäten dieser Inhibitoren jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Auch bei Vertebraten ist mit dem Complement-System eine Protease-Kaskade an Abwehr-Reaktionen beteiligt. Die bei der Aktivierung der verschiedenen Komponenten dieser Kaskade freigesetzten Fragmente der Pro-Enzyme vermögen z. B. eine chemotaktische Wirkung auf andere Komponenten des Immunsystems auszuüben [Janeway et al. 1999]. Inwieweit Fragmente der PO-Kaskade eine ähnliche Wirkung ausüben, ist bisher nur in Ansätzen untersucht worden. Interessanterweise konnte in Crustaceen ein Zelladhäsionsmolekül der Hämocyten identifiziert werden, das erst Bindungsaktivität aufweist, wenn die PO-Kaskade aktiviert wurde. Das 76 kDa Zelladhäsionsmolekül, Peroxinectin, ist eine Peroxidase, wobei die Enzymaktivität nicht für die Adhäsion nötig ist. Es funktioniert ebenso als Opsonin [Söderhäll et al. 1998]. Für *D. melanogaster* [Lagueux et al. 2000] und *Anopheles gambiae* [Levashina et al. 2001] konnte durch die Klonierung von cDNAs mit Sequenzähnlichkeit zu der Complement-Komponente C3 ein erster Hinweis auf das Vorliegen des sogenannten Lektin-Weges der Complement-Aktivierung in Insekten gefunden werden. Daneben gibt es neue Befunde, die demonstrieren, dass Abbauprodukte körpereigener Proteine die Neusynthese antimikrobieller Proteine stimulieren. Die Mechanismen dieser Vorgänge und weitere daran beteiligte Moleküle sind bisher noch nicht charakterisiert [Gillespie et al. 2000].

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Die Aktivierung von Hämocyten nach bakteriellen Infektionen ist bei Insekten bisher nur unzureichend untersucht. Genauere Zusammenhänge sind lediglich bei intrazellulären Vorgängen zur Aktivierung einiger Gene in der Folge einer Infektion bekannt. Obwohl bereits mehrere Proteine gefunden wurden, die an einer möglichen Erkennung von Pathogenen und einer anschließenden Aktivierung verschiedener Immunreaktionen, wie der PO-Kaskade und der Phagozytose, beteiligt zu sein scheinen, sind jedoch weitere Proteine, die an einer extrazellulären Signalkaskade mitwirken, unbekannt. Zudem fehlen Kenntnisse über Mediatoren, die andere Hämocyten anlocken oder aktivieren können. Dabei könnte das Wissen über die molekularen Abläufe und daran beteiligter Komponenten aus medizinischer Sicht von großer Bedeutung sein: Wie entgeht z. B. der Erreger der Malaria, *Plasmodium falciparum*, dem Immunsystem seines Zwischenwirtes *A. gambiae*. Es kann aber auch Verbesserungen in ökonomischer oder ökologischer Hinsicht erbringen, z. B. durch Veränderungen in den heute gebräuchlichen Formen der Schädlingsbekämpfung.

Aus den dargestellten Gründen sollen in der vorliegenden Studie Faktoren gesucht werden, die an der Aktivierung von Hämocyten des Tabakswärmers *M. sexta* mitwirken. Da unterschiedlichste Komponenten an den zu Grunde liegenden Prozessen beteiligt sein können, soll die Bearbeitung mit zwei unterschiedlichen Ansätzen erfolgen.

Mittels Bindungsstudien soll nach möglichen Bindungsproteinen bzw. Rezeptoren für Gram-negative Bakterien gesucht werden. Als mögliches PAMP wird LPS eingesetzt. Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen werden in erster Linie Hämocyten-Membranen, bzw. daraus isolierte Proteine eingesetzt. Die für diese Analysen entwickelten Testsysteme werden nachfolgend zur Reinigung der möglichen Bindungsfaktoren eingesetzt. Ziel der Untersuchungen ist, die Bindungsfaktoren selbst sowie ihre Bedeutung für die Hämocyten-Aktivierung zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

Als Ergänzung und mögliche Alternative zu diesen Untersuchungen, soll die Suche nach Rezeptoren oder Mediatoren auch mit molekularbiologischen Methoden bearbeitet werden. Dabei müssen die nötigen Arbeitsmittel, wie z. B. Expressionsbibliotheken, erst hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial für diese Bibliotheken werden Hämocyten und Fettkörper-Gewebe ausgewählt. Durch den Einsatz von Hämocyten können auch von diesen Zellen selbst produzierte, autokrin wirkende Moleküle identifiziert werden. Fettkörper wird gewählt, da dieses Gewebe nach einer Infektion große Mengen von Peptiden und Proteinen produziert, die an Abwehrreaktionen beteiligt sind. Für die Identifizierung der gesuchten Faktoren sollen Antikörper gegen bekannte Proteine oder aus Sequenzen bekannter Proteine entwickelte

Sonden eingesetzt werden. Nach einer Charakterisierung der von den identifizierten Genen kodierten Proteine können mögliche Funktionen näher untersucht und beschrieben werden.

2. Material

Anmerkung: In den Methoden wurde für Zentrifugationen, die mit der Micro Centaur Tischzentrifuge durchgeführt wurden, durchgängig die Bezeichnung rpm (*revolutions per minute*) für die Zentrifugationsgeschwindigkeiten gewählt. Bei Zentrifugationen mit der Hochgeschwindigkeitszentrifuge Super T21 wurde die Zentrifugationsgeschwindigkeit in *relative centrifugal force* angegeben.

2.1. Geräte

Tischzentrifuge Micro Centaur, Sanyo, Leicester, UK.

Kühlbare High-Speed Zentrifuge Sorvall Super T21, Kendro, Newtown, CT, USA.

Insektenzuchtschrank Economic Deluxe, Snijders Scientific, Tilburg, NL.

CTi Semi-dry Blotapparatur, Idstein.

Hybridisierungsöfen OV4, Biometra, Göttingen.

Personalcyclus 20, Biometra, Göttingen.

Mini Protean II Elektrophorese-Apparatur, Automatisches Säulenchromatographiesystem Biologic System, Model 550 Microplate Reader, Agarose-Elektrophorese-Zelle Subcell GT, Dot-Blot Microfilter Apparatus, Spannungsquelle Powerpac 300 und 1000, Biorad, Richmond, CA, USA.

Temperierbares Schüttelwasserbad 3047, Köttermann, Uetze.

Bakterienbrutschrank Memmert, Schwabach.

Vakuumkonzentrator Univapo 100H mit Vakuumpumpe Unijet I, Uni Equip, Martinsried.

US-Reinigungsbad, Elma, Singen/Hohentwiel.

Ultraschallgerät Banson-Sonifier, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd.

Vortexer MS1, IKA, Wilmington, NC, USA.

Orbitalschüttler Rotamax 120, Heidolph, Kelheim.

Wippschüttler Duomax 1030, Heidolph, Kelheim.

Mikroskop Olympus BX-60, Olympus, Hamburg.

UV-Spektrometer Helios, Unicam, Cambridge, UK.

Wiederverwendbarer Flaschenaufsatz-Filter, Nalgene, Rochester, NY, USA.

Sterilbank Heraeus LaminAir™ ELB, Heraeus, Hanau.

2.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht bei den einzelnen Methoden angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Merck-Eurolab, Darmstadt; ICN, Horsham, PA, USA;

Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Fluka, Neu-Ulm; Boehringer, Mannheim und Sigma-Aldrich, München.

Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer, pGem T-Vektor Kit, Wizard™ Plus Miniprep DNA Purification System: Promega, Madison, WI, USA.

ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit, Poly(A) Quik® mRNA Isolation Kit, Cloned PFU: Stratagene, La Jolla, CA, USA.

HotStar™Taq-Polymerase, Reaktionspuffer: Qiagen, Hilden.

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit: Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Sekundäre Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase-Konjugat: Dako, Hamburg und Biorad, Richmond, CA, USA, Schaf-anti-Kaninchen-FITC-Konjugat: Sigma-Aldrich, München.

Westran Blotting Membran und Blotting Filter GB002: Schleicher und Schüll, Dassel.

Nukleinsäure Blotting Membran Hybond N: Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Membranen für Plaquelifts: Schleicher und Schüll, Dassel.

Multiwell slides: ICN, Horsham, PA, USA.

Eingesetzte Reagenzien wurden mit der Waage HG der Firma Drexel Service, Hannover, eingewogen. Für Mengen im Milligrammbereich erfolgte das Wiegen auf der Präzisionswaage 2462 der Firma Sartorius, Göttingen.

Puffer und Lösungen wurden mit Wasser aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-QPF Plus Reagent Grade Water Purification System der Firma Millipore, Bedford, USA angesetzt.

Die Einstellung der pH-Werte erfolgte mit dem pH-Meter 526 der Firma WTW, Weilheim bei RT.

Alle zur Kultur von Zelllinien und Bakterien sowie für molekularbiologische Experimente verwendeten Produkte waren sterile Einmalartikel, oder wurden im Labor in einem Autoklaven Varioklav, Typ 250 T der Firma H + P Labortechnik (Oberschleißheim), bei 120°C und 202,7 kPa für 20 min sterilisiert.

Alle für Arbeiten mit RNA benutzten Gefäße wurden in RNase-freier Qualität als Einmalartikel bezogen oder vor Verwendung mit einer 0,1%igen Lösung von Diethylpyrocarbonat (DEPC) in Milli-Q Wasser über Nacht behandelt und nachfolgend bei 120°C und 202,7 kPa für 20 min autoklaviert. Für Northern-Blots eingesetzte Elektrophorese-Geräte wurden über Nacht mit einer 1%igen SDS-Lösung behandelt.

Sterile Einmalartikel wurden von folgenden Lieferanten bezogen:

Kulturschalen, Zentrifugenröhrchen: Nunc, Wiesbaden.

Spritzen, Kanülen: B. Braun, Melsungen.

Sterilfilter: Schleicher und Schuell, Dassel.

Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen: Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg.

2.3. Verwendete Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue MRF': Genotyp $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1 , supE44 , thi-1 , recA1 , gyrA96 , relA1 , $\text{lac}[F' \text{ proAB lacI}^q\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r)]$ (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

E. coli SOLR: Genotyp $\text{e14}(\text{McrA}^-)$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171$, sbcC , recB , recJ , uvrC , $\text{umuC}::\text{Tn5 (Kan}^r)$, lac , gyrA96 , relA1 , thi-1 , $\text{endA1 [F' proAB lacI}^q\Delta\text{M15]}$, Su^- (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

E. coli JM 109: Genotyp endA1 , recA1 , gyrA96 , thi , $\text{hsdR17 (r}_k^-; \text{m}_k^+)$, relA1 , supE44 , $\Delta(\text{lac-proAB})$, $[F', \text{traD36, proAB, lacI}^q\Delta\text{M15}]$ (Promega, Madison, WI, USA).

E. coli TOP10: Genotyp $F^- \text{ mcrA}$, $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, $\Phi 80\text{lac}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , recA1 , deoR , araD139 , $\Delta(\text{ara-leu})7697$, galU , galK , rpsL , (Str^R) , endA1 , nupG (Invitrogen, Groningen, NL).

Der *E. coli* Stamm M15 wurde von Herrn D. Stüber, Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt [Villarejo et al. 1974]. Zur Expression rekombinanter Proteine wurde dieser Stamm vor der Transformation mit Expressionsvektoren mit dem Plasmid pREP4 (Qiagen, Hilden) transformiert.

2.4. Versuchsorganismus

Zur Untersuchung dienten Larven und adulte Tiere des Tabakswärmer *Manduca sexta*. Die Hälterung erfolgte in belüfteten Kunststoffschalen in einem Zuchtschrank bei 22°C und 70% relativer Luftfeuchte mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h. Als Futter wurde eine synthetische Diät verwendet (s. Abschnitt 2.4.1.). Spätestens zu Beginn des fünften Larvenstadiums (L5) wurden die Tiere einzeln gehalten. In der Regel erfolgte die Hämolymphe-Entnahme am dritten Tag nach der Häutung zur L5, wobei die erfolgte Häutung der Tiere alle 24 h kontrolliert wurde. In einigen Fällen wurden Tiere unter Angabe eines bestimmten Tages eines Entwicklungsstadiums verwendet, z. B. W1 (= 24 h nach Erscheinen des dorsalen Herzschlauchs) oder P2 (= 48 h nach erfolgter Häutung zur Puppe). In diesen Fällen erfolgte die Kontrolle des Entwicklungsstadiums alle 12 h.

In einigen Fällen wurde Hämolymphe anderer Insektenarten zur Ermittlung von Kreuzreaktivitäten verschiedener Antikörper genutzt. Die hierfür verwendeten Tiere stammten aus eta-

blierten Laborzuchten (*Acheta domesticus*, *Bombyx mori*, *Carausius morosus*, *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Hyalophora cecropia*).

2.4.1. Futter

Die Zucht von *M. sexta* erfolgte mit einer synthetischen Diät, die modifiziert nach [Yamamoto 1969] hergestellt wurde.

Benötigte Substanzen:

Grundfutter:

20,0 g	Agar
16,0 g	Bäckerhefe
36,0 g	Casein
3,5 g	Cholesterin
32,0 g	handelsüblicher Zucker
1,0 g	p-Hydroxybenzolsäure-methylester
2,0 g	Sorbinsäure
80,0 g	Weizenkeime
12,0 g	Wesson's Salzmischung

Vitamin-Stammlösung

4,0 mg	Biotin
46,0 mg	Folsäure
200,0 mg	Nicotinsäure
48,0 mg	Pyridoxin
100,0 mg	Riboflavin
46,0 mg	Thiamin
ad 200 ml	mit Aqua bidest.

Durchführung:

Die Zutaten für das Grundfutter wurden gut durchmischt und in 1l deionisiertem Wasser unter ständigem Rühren 30 min gekocht. Nach Abkühlung der Masse auf 70°C erfolgte die Zugabe folgender Substanzen:

4,0 g	Ascorbinsäure
20,0 ml	Formaldehyd (4%)
4,0 g	Leinöl
10,0 ml	Vitamin-Stammlösung

Das Gemisch wurde in Plastischalen ausgegossen und bis zum unmittelbaren Gebrauch bei 8°C gelagert.

3. Methoden

3.1. Proteinbiochemische Methoden

3.1.1. Präparation von Hämocytenmembranen und Extraktion der Membranproteine

Die Präparation von Hämocytenmembranen und Extraktion der enthaltenen Proteine erfolgte in Anlehnung an die von Klünner für *Galleria mellonella* Hämocyten beschriebenen Methode [Klünner 1994]. Dabei wurden die Pufferzusammensetzungen an die physiologischen Bedingungen bei *Manduca sexta* angepasst.

Benötigte Reagenzien:

Solubilisationspuffer A:

- 1,7 mmol/l PIPES (pH 6,5-6,8)
- 4,0 mmol/l NaCl
- 40,0 mmol/l KCl
- 3,0 mmol/l CaCl₂
- 1,0 mmol/l Pefablock[®]
- 5,0 % (v/v) Glycerin

Solubilisationspuffer B:

- wie Solubilisierungspuffer A,
- mit 1,0 % Triton X-114

Durchführung:

Unmittelbar vor der Präparation wurden die Zellen aufgetaut und bei 300 xg pelletiert. Das Pellet wurde in Solubilisationspuffer A aufgenommen, 3 x 10 Sekunden (50 W) auf Eis mit Ultraschall behandelt und nachfolgend 20 Minuten bei 4°C und 10000 xg pelletiert. Das Pellet wurde 3x in Solubilisierungspuffer A gewaschen und anschließend in Solubilisierungspuffer B aufgenommen. Die Extraktion der Membranproteine erfolgte für 1,5 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung. Verbliebene Membranfragmente wurden durch Zentrifugation bei 10000 xg und 4°C für 1 h pelletiert. Die im Überstand angereicherten Membranproteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.2. Nachweis und Aufreinigung LPS-bindender Proteine aus Hämozyten-Membranprotein-Präparationen

Der Nachweis von LPS-bindenden Proteinen aus Hämozyten-Membranpräparationen erfolgte in Anlehnung an eine von Klünner beschriebene Methode [Klünner 1994]. Hierzu wurde das gemäß Abs. 3.5.4.2. an Affigel-HZ kovalent gebundene LPS als Affinitätsmatrix genutzt.

Benötigte Reagenzien:

Saurer Elutionspuffer:

150,0 mmol/l Natriumcitrat (pH 3,0)

chaotropher Elutionspuffer:

6,0 mol/l Harnstoff

1 mg/ml LPS (*E. coli* 0111:B4) in Solubilisierungspuffer A (s. Abs. 3.1.1.)

LPS-Agarose

Kontroll-Agarose

Solubilisierungspuffer A

Durchführung:

Die Bindungsexperimente wurden im 'Batch'-Verfahren durchgeführt. In Eppendorf-Gefäßen wurden jeweils 100 µl der LPS-Agarose vorgelegt. Als Negativ-Kontrolle diente jeweils eine gleiche Menge der Kontroll-Agarose. Zur Entfernung des Lagerpuffers wurden die Agarosen 5x mit jeweils 1 ml Solubilisierungspuffer A gewaschen. Nach Entfernen des letzten Überstandes wurden in 100 µl Solubilisierungspuffer B gelöste Membranproteinextrakte von zehn Larven zugegeben (Volumenverhältnis Agarose : Extrakt = 1 : 1) und 1 h bei 8°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Agarose durch eine Zentrifugation mit 13000 rpm bei RT (3 min) vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde für spätere Kontrollversuche bei -20°C gelagert. Die Agarose wurde 5x mit jeweils 1 ml Solubilisierungspuffer A gewaschen. Anschließend wurden folgende Methoden genutzt, um möglicherweise gebundene Proteine zu eluieren:

- a. Konkurrenz mit freiem LPS
- b. Elution durch Behandlung mit einem sauren Puffer
- c. Elution durch Denaturierung mittels Harnstoff

Hierzu wurden die Agarose Pellets jeweils kurz mit einem gleichen Volumen LPS (1 mg/ml in Solubilisierungspuffer A), 150 mmol/l Natriumcitrat, pH 3,0 oder 6 M Harnstoff gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Zugabe von frischem Kompetitor, bzw. Citrat-Puffer und Harnstoff. Die Elution erfolgte durch Inkubation der verschiedenen Ansätze bei 8°C für 1 h unter ständiger Durchmischung. Durch eine Zentrifugation mit 13000 rpm bei RT (3 min) wurde die Agarose abgetrennt. Die Überstände wurden

abgenommen und mit denen des vorhergehenden Waschschruttes vereinigt. Zur späteren Analyse wurden die Eluate mittels Vakuuzentrifugation auf 50% des Volumens eingeeugt. Als abschließende Kontrolle wurde das verbliebene Pellet aus LPS- bzw. Kontroll-Agarose nach Waschen (5x) mit Solubilisierungspuffer A mit 50 µl 5x SDS-Probenpuffer (s. Abs. 3.1.4.1.) gemischt. Weitere gebundene Proteine wurden durch Kochen (5 min) bei 95°C solubilisiert und gemeinsam mit den Proben der verschiedenen Elutionsversuche auf einer SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung analysiert.

3.1.3. Ammoniumsulfat-Fällung

Eine einfache Methode zur Anreicherung verschiedener Proteine und zur Abtrennung von Lipiden und Aminosäuren ist die Fällung mit Ammoniumsulfat. Bei steigender Konzentration von Ammoniumsulfat wird den in der Lösung enthaltenen Proteinen sukzessive die Hydrathülle entzogen. Ammoniumsulfat hat zwischen 4°C und 25°C eine nahezu konstante Löslichkeit. Eine gesättigte Lösung hat in diesem Temperaturintervall eine Konzentration von 4,1 mol/l.

Benötigte Lösungen:

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung:

4,1 mol/l Ammoniumsulfat (pH 6,5)

Resuspendierungspuffer:

20 mmol/l Tris (Base) pH 7,2
150 mmol/l NaCl

Dialyse-Puffer:

50 mmol/l Tris (Base) pH 7,2
150 mmol/l NaCl

Durchführung:

Die Durchführung der Ammoniumsulfat-Fällung erfolgte auf zwei verschiedene Weisen: als Fällung bei **einer** bestimmten Konzentration oder als **nacheinander** durchgeführte Fällungen bei ansteigenden Konzentrationen von Ammoniumsulfat (fraktionierte Fällung). Im Folgenden ist die Fällung bei einer Endkonzentration von 50% Ammoniumsulfat dargestellt. Zu der Probe wurde unter sanftem Rühren und Eiskühlung über einen Zeitraum von 30 min ein gleiches Volumen gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung pipettiert. Die Probe wurde unter Kühlung für weitere 45 min präzipitiert. Nun erfolgte die Abtrennung des Präzipitats durch Zentrifugation bei 30000 xg und 4°C (30 min). Die ausgefällten Proteine wurden in Resuspendierungspuffer (Zusammensetzung entsprach dem Chromatografie-Puffer für die Gelfiltration) resuspendiert. Für andere Anwendungen erfolgte nach der Resuspendierung eine Dialyse bei 8°C über Nacht gegen das 1000fache Volumen des gewünschten Puffers.

3.1.4. Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)

3.1.4.1. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an die von Laemmli beschriebene Methode durchgeführt [Laemmli 1970].

Benötigte Lösungen:

Lösung A: Acrylamid-Bisacrylamid

60 g Acrylamid
1,6 g N,N'-Methylbisacrylamid
ad 200 ml mit Aqua bidest.

Lösung B: Trenngel-Puffer (4-fach)

91,0 g Tris (Base)
ca. 120,0 ml 1 N HCl
2,0 g SDS
ad 500 ml mit Aqua bidest., pH 8,8

Lösung C: Sammelgel-Puffer (4-fach)

6,0 g Tris (Base)
ca. 48,0 ml 1 N HCl
0,4 g SDS
ad 100 ml mit Aqua bidest., pH 6,8

Laufpuffer (10-fach)

30,3 g Tris (Base)
144,0 g Glycin
10,0 g SDS
ad 1000 ml mit Aqua bidest., pH 8,3

Färbelösung

1 g Coomassie Brilliant Blue R250
250 ml Ethanol, techn.
60 ml Essigsäure
ad 100 ml mit Aqua bidest.

Entfärber

300 ml Ethanol, techn.
100 ml Essigsäure
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Probenpuffer:

	<u>2-fach</u>	<u>5-fach</u>	<u>6-fach</u>
Lösung C [ml]	12,5	12,5	7,0
SDS [g]	2,0	5,0	1,0
2-Mercaptoethanol [ml]	1,0	2,5	-
DTT [g]	-	-	0,93
Glycerin [ml]	10	25	3,0
Bromphenolblau [mg]	2,0	5,0	1,2
Aqua bidest.	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 10 ml

Gel-Ansatz für 2 kleine Gele:

	<u>Trenngel</u>						<u>Sammelgel</u>		
	3%	5%	7,5%	10%	12%	15%	3%	4%	5%
Lösung A [ml]	0,9	1,5	2,25	3,0	3,6	4,5	0,5	0,67	0,85
Lösung B [ml]	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	-	-	-
Lösung C [ml]	-	-	-	-	-	-	1,25	1,25	1,25
Aqua bidest. [ml]	5,85	5,25	4,5	3,75	3,15	2,25	3,25	3,08	2,90
APS [µl]	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	20,0	20,0	20,0
TEMED [µl]	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	5,0	5,0	5,0

Durchführung:

Der Ansatz für das Trenngel wurde in einem Becherglas gemischt. Pro Gel wurden 3-3,5 ml Gelansatz zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche in die zum System gehörende Haltevorrichtung eingespannt waren. Das Gemisch wurde vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach beendeter Polymerisation wurde das Wasser abgegossen und der verbliebene Raum mit 1,5-2,0 ml des Sammelgelansatzes aufgefüllt. In diese Lösung wurde nun ein Probenkamm gesteckt. Dieser Probenkamm hinterlässt nach erfolgter Polymerisation die Taschen, in die die Proben eingefüllt werden. Nach Einsetzen des auspolymerisierten Gels in die Elektrophoresekammer wurde diese mit Laufpuffer gefüllt, so dass Anode und Kathode vom Puffer umspült wurden. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge Probenpuffer versetzt und bei 95°C (5 min) denaturiert. Nachfolgend wurden die Proben vorsichtig in die mit Laufpuffer gefüllten Probenaschen überführt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (Sammelgel: 100 V, Trenngel: 200 V) durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Front das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel zur weiteren Bearbeitung entnommen.

Als Standard-Detektionsmethode wurden die Gele für 30 min in Färbelösung (Coomassie Brilliant Blue R250) inkubiert. Anschließend wurde in Entfärbelösung unter visueller Kontrolle entfärbt. Lag nur wenig Protein in den Gelen vor, wurde eine Silberfärbung (s. Abs.3.1.6.) nach der von Blum und Mitarbeitern beschriebenen Methode durchgeführt [Blum et al. 1987].

Alternativ dazu wurden die Proteine nach der Elektrophorese auf PVDF-Membranen transferriert und einer Immundetektion unterzogen.

3.1.4.2. Diskontinuierliche, native PAGE

Für verschiedene Funktionsuntersuchungen ist es notwendig, Proteine im nativen Zustand aufzutrennen, so dass ihre biologische Aktivität erhalten bleibt. In diesem Fall unterbleibt die Reduzierung der Disulfidbrücken und die vollständige Umhüllung mit negativ geladenem Detergenz. Die Auftrennung der Proteine erfolgt somit nach der räumlichen Faltung der Proteine und nach ihren isoelektrischen Punkten, bzw. der Ladung des Proteins unter gegebenen pH-Bedingungen. Die hier beschriebene Methode nutzt das gleiche Puffersystem, wie bereits bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE (s. Abs. 3.1.4.1.) beschrieben [Ausubel, 1995 #897]. Jedoch wurde den verwendeten Lösungen kein SDS und β -Mercaptoethanol zugegeben und es wurde auf das Erhitzen der Proben verzichtet.

Durchführung:

Die Gele wurden unter Verwendung SDS-freier Lösungen wie in Abs. 3.1.4.1. beschrieben hergestellt. Die Proben wurden mit einer geeigneten Menge Probenpuffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (Sammelgel: 50 V, Trenngel: 100 V) unter Kühlung durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Front das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel zur weiteren Bearbeitung entnommen.

3.1.5. Bestimmung der Kohlenhydratbindungsspezifität

Zur Überprüfung der Hypothese, dass das Hämozyten-Aggregation-inhibierende Protein (HAIP) [Kanost et al. 1994] ein Chitin-bindendes Lektin darstellt und welche Kohlenhydrate diese Bindung kompetieren können, wurde die Bindungsspezifität von HAIP an Chitin in einem Competitionstest untersucht. Nach Kanost und Mitarbeitern gereinigtes HAIP [Kanost et al. 1994] wurde freundlicherweise von Fernando Estrada (Dept. of Biochemistry, Kansas State University, Manhattan, KS, USA) zur Verfügung gestellt. Das gereinigte Protein enthielt als Verunreinigung ein Degradationsprodukt von HAIP. Nach der von Venegas und Mitarbeitern beschriebenen Methode behandeltes Chitin [Venegas et al. 1996] wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. Krishnamorti (Dept. Of Biochemistry, Kansas State University, Manhattan, KS, USA) überlassen. Die eingesetzte Menge der verschiedenen Kohlenhydrate wurde in Anlehnung an die von Ravindranath und Mitarbeitern beschriebenen Methode festgesetzt [Ravindranath et al. 1999].

Benötigte Lösungen:

20 mmol/l MOPS, pH 7,0

20 mg/ml Xylose

20 mg/ml Glucose

20 mg/ml N-Acetyl-Glucosamin

20 mg/ml Glucosamin

20 mg/ml Chitosan (N-Acetyl-Glucosamin-Oligomer)

alle Kohlenhydrat-Stammlösungen wurden mit 20 mmol/l MOPS, pH 7,0 angesetzt.

Durchführung:

Gereinigtes HAIP (5 µg pro Ansatz) wurden mit 4 mg/ml des jeweiligen Kohlenhydrats für 30 min bei RT unter sanftem Schwenken inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde HAIP nur mit 20 mmol/l MOPS, pH 7,0 inkubiert. Zu den verschiedenen Ansätzen wurde in MOPS-Puffer equilibriertes Chitin gegeben (50 mg pro Ansatz). Nach erneuter Inkubation für 1 h bei RT wurde das Chitin durch Zentrifugation (5000 rpm, 2 min) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, bis zu einem Endvolumen von 50 µl eingeeengt, mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C (5 min) denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Chitinpellets wurden 5x mit jeweils 1 ml MOPS-Puffer gewaschen. Die Überstände der Waschschriffe wurden gesammelt, ebenfalls bis zu einem Endvolumen von 50 µl konzentriert und mit Probenpuffer denaturiert. Das Pellet wurde in 5x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Mögliche anhaftende Proteine wurden durch Erhitzen (5 min) auf 95°C denaturiert. Verbliebenes Chitin wurde durch Zentrifugation (10000 rpm, 5 min) abgetrennt. Die Analyse der erhaltenen Proben erfolgte mittels Western-Blot (s. Abs. 3.3.1.).

3.1.6. Silberfärbung

Die hier beschriebene Silberfärbung folgt der von Blum und Mitarbeitern beschriebenen Methode [Blum et al. 1987]. Generell zeichnet sich diese Methode durch eine ungefähr zehnfach höhere Sensitivität im Vergleich zur Färbung mit Coomassie Brilliant Blue aus. Ein Vorzug der Färbung mit Silber liegt darin, dass sie auch im Anschluss an eine Coomassie-Färbung durchgeführt werden kann, wenn sich deren Empfindlichkeit als zu gering erwiesen hat. In einigen Fällen kann so eine noch höhere Empfindlichkeit erzielt werden.

Fixierer:

500 ml Methanol (96%)

120 ml Essigsäure (99%)

0,5 ml Formaldehyd (37%)

ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Waschlösung 1:

500 ml Ethanol (96%)

ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Vorbehandlungslösung:

0,2 g Natriumthiosulfat (x5 H₂O)
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Färbelösung:

2,0 g Silbernitrat
0,75 ml Formaldehyd (37%)
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Stopplösung:

120 ml Essigsäure (99%)
500 ml Methanol (96%)
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Waschlösung 2:

Aqua bidest.

Entwickler:

60,0 g Natriumbicarbonat
0,5 ml Formaldehyd (37%)
4,0 mg Natriumthiosulfat (x5 H₂O)
500 ml Methanol (96%)
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Lagerlösung:

500 ml Methanol (96%)
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Apparatur entnommen und für mindestens eine Stunde in Fixierer geschwenkt. Danach wurde in Waschlösung 1 gewaschen (20 min). Nach einer Inkubation (1 min) in Vorbehandlungslösung wurden die Gele 3x 20 s in Waschlösung 2 gewaschen, gefolgt von einer Inkubation in Färbelösung (20 min). Anschließend wurde erneut 2x 20 s in Waschlösung 2 geschwenkt. Die Entwicklung der Gele erfolgte in Entwicklerlösung unter visueller Kontrolle. Die Reaktion wurde durch Abgießen des Entwicklers und Inkubation der Gele in Stopp-Lösung beendet (10 min). Für längere Lagerung wurden die Gele in Lagerlösung überführt. Da die Gele bei dieser Behandlung schrumpften, wurde vor einer weiteren Verwendung eine 30 minütige Inkubation in Wasser erforderlich.

3.1.7. Proteinbestimmung nach Bradford

Die hier dargestellte Methode wurde nach Bradford zur Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten adaptiert [Bradford 1976]. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Unempfindlichkeit gegenüber zahlreichen Substanzen. Der damit einhergehende Verlust an Sensitivität, im Vergleich zu anderen Methoden, kann durch eine Linearisierung der Messwerte vermindert werden [Zor et al. 1996].

Benötigte Reagenzien:**Bradford-Reagenz**

7,0 mg Brilliant Blue G
5 ml Ethanol (99,8%)
10 ml Orthophosphorsäure (85%)
ad 100 ml mit Aqua bidest.

2 mg/ml BSA-Stammlösung

Durchführung:

Zur Herstellung der Farblösung wurden die Reagenzien gemischt und über Nacht bei RT in einer Braunglas-Flasche gerührt. Am nächsten Morgen wurden unlösliche Bestandteile mit einer Filtration durch zwei Lagen Filterpapier abgetrennt. In einer Mikrotiterplatte wurden nun die Proben der Eichreihe (BSA) sowie die unbekanntenen Proben vorgelegt. Das zu 100 µl fehlende Volumen wurde mit dem Puffer der unbekanntenen Proben aufgefüllt. Der Nullabgleich erfolgte gegen Pufferlösung. Desweiteren wurden 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben und bei RT unter sanftem Schütteln inkubiert (5 min). Abschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm und 450 nm. Durch Vergleich der Messwerte mit der erstellten Eichkurve konnte der Proteingehalt der unbekanntenen Proben ermittelt werden.

3.1.8. Deglykosilierungsassay

Die enzymatische Deglykosilierung N-gebundener Kohlenhydrate erfolgte in Anlehnung an die von Koizumi und Mitarbeitern beschriebene Methode [Koizumi et al. 1999].

Benötigte Lösungen:**Enzymstammlösung:**

100 U N-Glycosidase F (EC 3.2.218)
ad 100 µl mit Aqua bidest.

Dialysepuffer:

10 mmol/l Tris (Base) pH 7,2

10% SDS-Stammlösung

10% CHAPS-Stammlösung

Mercaptoethanol

Durchführung:

Für eine optimale enzymatische Deglykosilierung musste das zuvor mittels Säulenchromatografie partiell gereinigte Substratprotein (8µg) zunächst unter Zugabe von SDS (Endkonzentration 1%) und 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 2%) bei 100°C denaturiert werden (5 min). Anschließend wurde das denaturierte Protein zehnfach verdünnt und das SDS zusätzlich durch Zugabe von CHAPS (Endkonzentration 0,5%) maskiert. Die Deglykosilierung erfolgte durch Zugabe von 2 U rekombinanter N-Glykosidase F (Boehringer, Mannheim) für 24 h bei 37°C. Nach erfolgter Umsetzung wurde das Enzym bei 95°C denaturiert (5 min). Abschließend wurde die Reaktionsmischung konzentriert und über Nacht dialysiert. Zur Analyse wurde ein Western-Blot mit einem Protein-spezifischen Antikörper durchgeführt.

3.2. Säulenchromatografische Methoden**3.2.1. Gelfiltration**

Zur Größenfraktionierung und damit Anreinigung von verschiedenen Proteinen wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Größenfraktionierung mittels einer Sephacryl S-200 HR Gelfiltrationssäule (1,6 x 60 cm; Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) dienten Hämolymp-Probenn, die zuvor bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 50% gefällt wurden.

Benötigte Reagenzien:**Chromatografie-Puffer:**

- 20 mmol/l Tris (Base) pH 7,2
- 150 mmol/l NaCl

Durchführung:

Die Gelfiltration wurde mit Hilfe des Biologic System (Biorad, Richmond, CA, USA) durchgeführt. Vor dem Auftrag der Proteinmischung wurde die Säule mit 150 ml Chromatografie-Puffer equilibriert. Pro Lauf wurde eine Probenmenge von 1 ml resuspendierte Ammoniumsulfat-Fällung in das System injiziert. Die Chromatografie erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von maximal 0,75 ml/min Chromatografie-Puffer. Während der Chromatografie wurde der Proteingehalt des Eluats bei einer Wellenlänge von 280 nm permanent in einer Durchflusszelle gemessen und aufgezeichnet. Eluierende Fraktionen mit einem Volumen von 4 ml wurden zwischen 30 und 120 ml gesammelt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

3.2.2. Chromatografie an immobilisiertem Heparin

Heparin ist ein saures Glykosaminoglykan. Je nach Wahl der Bedingungen kann es als milder Kationentauscher oder als Affinitätsmatrix für Proteine dienen.

Benötigte Reagenzien:

Chromatografie-Puffer A:

20 mmol/l Tris (Base) pH 7,2

Chromatografie-Puffer B:

20 mmol/l Tris (Base) pH 7,2

2 mol/l NaCl

Durchführung:

Heparin Sepharose CL-6B (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde entsprechend den Herstellerangaben in Aqua bidest. rehydriert. Die rehydrierten Partikel wurden im Anschluss zur Herstellung einer kühlbaren Säule (1,0 x 10 cm; Sigma-Aldrich, München) benutzt. Die Säule wurde über Nacht bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min mit 92,5% Puffer A und 7,5% Puffer B equilibriert. Nach dem Auftrag der Probe erfolgte die Elution mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min für 10 min. Anschließend wurde die Flussgeschwindigkeit auf 0,25 ml/min bis zum Ende des Laufes erhöht. Während des gesamten Laufes wurde die Säule auf eine Temperatur von 4°C gekühlt. Die Chromatografie wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Auftrag der Probe

Von 0 - 5 ml linearer Fluss mit	92,5% Puffer A und 7,5% Puffer B.
Von 5 - 20 ml linearer Gradient von	0,75% Puffer B bis 50% Puffer B.
Von 20 - 30 ml linearer Fluss mit	50% Puffer B.
Von 30 - 35 ml linearer Fluss mit	100% Puffer B.
Von 35 - 45 ml linearer Fluss mit	0% Puffer B.

Equilibrieren der Säule mit 92,5% Puffer A und 7,5% Puffer B über Nacht.

Während der Chromatografie wurde der Proteingehalt des Eluats bei einer Wellenlänge von 280 nm permanent in einer Durchflusszelle gemessen und aufgezeichnet. Eluierende Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml wurden während des gesamten Laufs gesammelt. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden anschließend im Western-Blot auf ihren Gehalt an HAIP untersucht.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1. Western-Blot-Analysen

Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine lassen sich im Gel gar nicht oder nur unter Verlust der Auflösung durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion charakterisieren. Dieses Problem kann umgangen werden, indem man die im Gel aufgetrennten Proteine nach Abschluss der Elektrophorese durch ein vertikal zum Gel angeordnetes elektrisches Feld in Anodenrichtung auf einen geeigneten Träger, wie z. B. Polyvinyliden Difluorid (PVDF) oder Nitrozellulose, transferiert. Auf diesem Träger erfolgt anschließend die direkte oder indirekte Immundetektion.

Benötigte Lösungen:

Puffer A:

300,0 mmol/l Tris (Base) pH 10,4

Puffer B:

25,0 mmol/l Tris (Base) pH 10,4

Puffer C:

25,0 mmol/l Tris (Base) pH 9,4

40,0 mmol/l Glycin

Durchführung:

Zunächst wurden die Proteine in einer Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt. Nach der Entnahme aus der Elektrophorese-Apparatur wurde das Gel in Puffer B inkubiert (10 min). Das mit einem Skalpell auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Papier wurde für 1 Minute in Methanol angefeuchtet, in destilliertem Wasser inkubiert (2 min) und abschließend in Puffer B equilibriert (5 min). Ebenso wurden die auf Gelgröße zugeschnittenen Filterpapiere einige Minuten im jeweiligen Puffer equilibriert. Der Transfer erfolgte im Semidry-Verfahren, dabei wurde der Transfersandwich entsprechend Abb. 5 aufgebaut. Im Standard-Verfahren erfolgte der Transfer bei konstanter Stromstärke (0,8 mA/cm² Blotmembran) für 1 h.

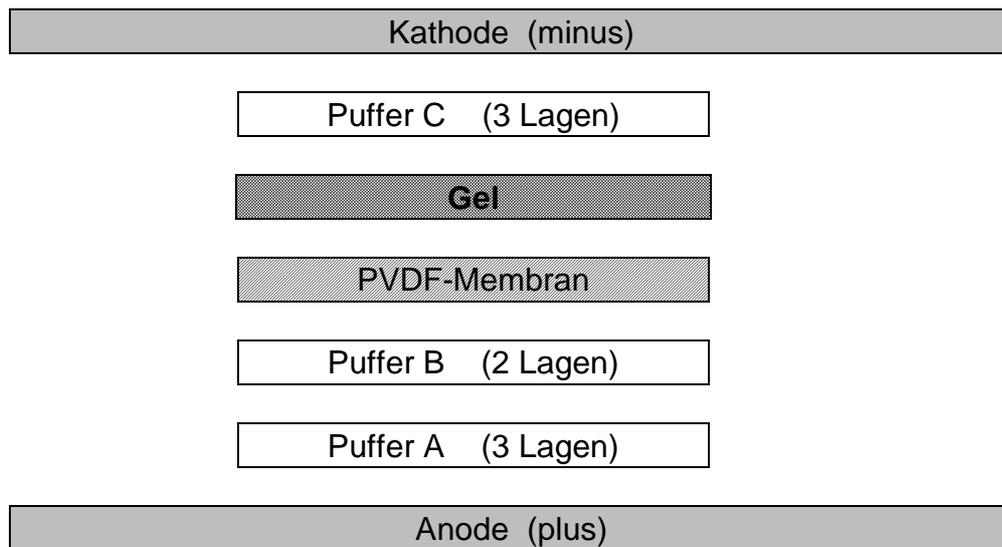


Abb. 5: Aufbau der Western-Blot Apparatur

Zum elektrischen Transfer der mittels PAGE aufgetrennten Proteine wurde ein Transfer-“Sandwich” aufgebaut. Der “Sandwich” bestand, beginnend von der Anode, aus drei Lagen in Puffer A getränktem Blotting Filter und zwei weiteren Filtern, die in Puffer B getränkt wurden. Auf diese Filter wurde die PVDF-Membran, gefolgt vom Polyacrylamid-Gel gelegt. Den Abschluss bildeten drei Lagen in Puffer C getränkter Filter. An der PVDF-Membran verbliebene Gelreste wurden nach dem Transfer in Blockierungspuffer ab gespült.

3.3.2. Indirekte Immundetektion mittels alkalische Phosphatase-konjugiertem sekundären Antikörper

Benötigte Lösungen:

Tris-gepufferte Saline (TBS):

50 mmol/l Tris (Base) pH 7,4
150 mmol/l NaCl

Blockierungspuffer

5 % fettarme Trockenmilch in TBS
oder
3 % BSA in TBS

Inkubationspuffer:

1,0 % BSA
ad 500 ml mit 1x TBS

Waschpuffer (TTBS):

0,05 % Tween 20
in TBS

Alkalische Phosphatase-Puffer

100 mmol/l Tris (Base) pH 9,2-9,4
100 mmol/l NaCl
5 mmol/l MgCl₂

AP-Substrat-Stammlösung A:

0,5 g Nitroblau Tetrazolium (NBT)
in 10 ml 70% DMF

AP-Substrat-Stammlösung B:

0,5 g Bromo-Chloro-Indolylphosphat
(BCIP)
in 10 ml 100% DMF

AP-Substratlösung:

10 ml AP-Puffer
66 µl Substrat A
33 µl Substrat B

Durchführung:

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran nach dem Elektrotransfer für 1 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers (Herkunft: Kaninchen) in Inkubationspuffer für 2 h bei RT. Anschließend wurde der Blot sorgfältig für 20 bis 60 min in TTBS gewaschen, wobei die Waschlösung mehrfach gewechselt wurde. Sodann erfolgte die Inkubation mit einem alkalische Phosphatase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (1:3000 verdünnt in Inkubationspuffer) für 2 h bei RT. Der Blot wurde erneute 20 bis 60 min unter mehrfachem Wechseln der Waschpuffer gespült. Abschließend wurde die Membran in alkalische Phosphatase-Puffer equilibriert (5 min) und unter visueller Kontrolle in AP-Substratlösung entwickelt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen in eiskaltem Wasser beendet und der Blot lichtgeschützt in mehreren Lagen Filterpapier getrocknet.

3.3.3. Indirekte Immunfluoreszenz an Hämozyten-Monolayern**benötigte Lösungen:****Fixierlösung:**

4,0 g Paraformaldehyd
100 ml Ca/Mg-freie Manduca
Saline

DABCO-Glycerin:

10,0 ml Tris (50 mM, pH 7,6)
2,5 ml DABCO
ad 100,0 ml mit Glycerin

Bis zum Auflösen des Paraformaldehyds
auf max. 70°C erwärmen.

Permeabilisierungslösung:

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

Durchführung:

Nach Abs. 3.5.2. präparierte Hämocyten wurden zum Absetzen der Zellen in einer feuchten Kammer inkubiert (10-20 min, RT). Durch Zugabe von einem Tropfen Fixierlösung wurden die Zellen fixiert (10 min). Danach wurde die Flüssigkeit mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe sanft abgesaugt. Die Zellen wurden 2x 15 min in TBS gewaschen. In einigen Fällen wurden die Zellmembranen durch eine Inkubation (5 min, RT) in Permeabilisierungslösung permeabilisiert. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurden die Präparate mit einem Tropfen 3% BSA in TBS überschichtet. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurde eine geeignete Verdünnung des ersten Antikörpers in 0,5% BSA/TBS aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei RT über Nacht. Die Präparate wurden 4x 15 min mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung eines zweiten, markierten Antikörpers in 0,5% BSA/TBS erfolgte für 1 h bei RT. Nach vier weiteren Waschrufen mit TBS (je 15 min) wurde noch anhaftende Flüssigkeit vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt. Abschließend wurden die Präparate mit DABCO/Glycerin überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte mit einem Olympus Mikroskop (BX-60), ausgestattet mit Epifluoreszenz.

3.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz an Dünnschnitten ganzer Tiere**benötigte Lösungen:****Fixierlösung:**

4,0 g	Paraformaldehyd
100 ml	Ca/Mg-freie Manduca-Saline

Bis zum Auflösen des Paraformaldehyds
auf max. 70°C erwärmen.

Durchführung:

Zur Herstellung von Querschnitten wurden Larven von *M. sexta* (L4 D2) nach Kühlung auf Eis vorsichtig Fixierlösung injiziert und nach ca 30 min in Fixierlösung durch Abtrennen des Kopfes und des letzten Teils des Abdomens in kleine Stücke präpariert. Diese Präparate wurden über Nacht in Fixierlösung inkubiert, wobei die Fixierlösung einmal gewechselt wurde. Anschließend wurden die Präparate innerhalb von 24 h viermal in TBS gewaschen. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90% und 96%, v:v in TBS) erfolgte die Dehydrierung.

Zur Einbettung wurden folgende Arbeitsschritte unter Einsatz der angegebenen Medien durchgeführt:

Isopropanol (100%)	3-4 h	
Isopropanol (100%)	1 h,	56-58°C
Isopropanol:Paraffin (1:1)	über Nacht,	56-58°C
Paraffin	über Nacht,	56-58°C

Nach dem Aufblockieren wurden Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt.

Objektträger wurden durch Spülen mit 70% Ethanol entfettet und mit einer Schicht aus 5 g/l Gelatine mit 0,2% Chromalaun (w/v) versehen. Auf einer Wärmeplatte (max. 40°C) wurden die Objektträger mit entgastem Aqua bidest. überschichtet. Die Schnitte wurden auf diese Objektträger aufgebracht und durch Antrocknen befestigt. Die Objekte wurden danach zweimal für jeweils 10 min in Rotihistol[®], anschließend zweimal für jeweils 5 min in Rotihistol[®] : Ethanol (1:1, v:v) sowie in eine Alkoholreihe (96%, 90%, 80% und 70%, v:v in TBS) überführt. Nach Entfernen des Paraffins über eine absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte in reichlich TBS mit 3% BSA rehydriert. Die Blockierung und Immundetektion erfolgte wie im Abs. 3.3.3. beschrieben.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mit kommerziell erhältlichen Kits verschiedener Anbieter entsprechend den aktuellen Anwendungsanleitungen. Vor der Präparation wurden die Bakterien wie in Abs. 3.5.3. beschrieben kultiviert. Der Gehalt an Plasmid-DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm nach folgender Formel bestimmt:

Gehalt DNA [ng/µl] = $A_{260} \cdot 50$ [ng/µl] * Verdünnungsfaktor.

3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

Benötigte Reagenzien:

50x TAE-Puffer:

2,00 mol/l Tris
 0,05 mmol/l EDTA (pH 8,0)
 57,10 ml Essigsäure (100%)
 ad 1000 ml mit Aqua bidest.

6x Proben-Puffer:

0,25 % Bromphenol Blau
 0,25 % Xylene Cyanol FF
 15,0 % Ficoll (Typ 400)

10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung

Durchführung:

Für 1%-ige Gele wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer bis zum vollständigen Schmelzen erhitzt. Sollte später DNA aus dem Gel zurückgewonnen werden, wurde hierzu Agarose mit einem niederen Schmelzpunkt (*low melting*) eingesetzt. Die Agarose wurde auf 50-55°C abgekühlt und Ethidiumbromid wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Das Gel wurde nun in die vorbereitete Elektrophorese-Apparatur gegossen und bis zum Erstarren abgekühlt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer versetzt, bei 95°C denaturiert (5 min), auf Eis gekühlt (5 min) und in die Probenaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TAE-Puffer als Elektrophorese-Puffer bei einer Stromstärke von 50 mA, bis die Bromphenol Blau-Front zwei Drittel des Geles durchlaufen hatte. Das Gel wurde nun der Kammer entnommen und konnte bei UV-Durchlicht dokumentiert werden.

3.4.3. Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Gewinnung der enthaltenen cDNA für spätere analytische oder präparative Zwecke wurden isolierte Plasmide mittels Restriktionsenzymen verdaut. Für analytische Zwecke wurde in der Regel 0,5-1,0 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Für präparative Zwecke erfolgte ein Verdau größerer Mengen Plasmid-DNA. Hierbei wurden die Verhältnisse der eingesetzten Enzyme zur DNA wie auch das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes angeglichen.

Für einen einfachen Verdau wurde Plasmid-DNA mit 1 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers und 5 U Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit sterilem Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Für einen doppelten Verdau wurden von beiden Enzymen jeweils 5 U eingesetzt. In diesem Fall erfolgte die Auswahl des geeigneten Reaktionspuffers nach den Empfehlungen des Herstellers.

3.4.4. Dephosphorylierung von verdauten Vektorplasmiden

Um bei Ligationen die Möglichkeit der Selbstligation einzuschränken, wurden nach Abs. 3.4.3. verdaute Vektorplasmide mittels 'Shrimp Alkalischer Phosphatase' (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) am 5'-Ende dephosphoryliert.

Durchführung:

Im Anschluss an den Restriktionsverdau nach Abs. 3.4.3. wurden die Restriktionsenzyme entsprechend den Herstellerangaben inaktiviert. Es erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen 10x alkalischer Phosphatase Puffer (200 mmol/l Tris-HCL, pH 8,0, 100 mmol/l MgCl₂) und 0,5 U alkalischer Phosphatase pro µg DNA. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37°C für 2 h. Vor der Aufreinigung der Vektor-DNA wurde die alkalische Phosphatase durch Inkubation bei 65°C (15 min) inaktiviert.

3.4.5. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation mit Plasmid-DNA

Benötigte Lösungen:

Luria-Bertani Medium (LB-Medium):

10,0 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl

ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Luria-Bertani Agar (LB-Agar)

15 g Agar
ad 1000 ml mit LB-Medium

Beide Lösungen müssen vor Gebrauch autoklaviert werden.

100 mmol/l CaCl_2 , steril filtriert.

Durchführung:

Die zukünftigen Wirtsbakterien, in der Regel wurden *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet, nur für die Transformation mit Expressionsvektoren wurde auf den *E. coli*-Stamm M15 (Qiagen, Hilden) zurückgegriffen, wurden in LB-Medium mit Antibiotika entsprechend Abs. 3.5.3. in Kultur genommen. Aus einer frischen Übernacht-Kultur wurden am nächsten Morgen 60 μl in 3 ml frisches Medium gegeben. Diese Kultur wurde bei 37°C inkubiert, bis ihre Absorption bei 600 nm 0,4 Einheiten betrug. Die Bakterien wurden bei 2200 xg und 4°C pelletiert (5 min), in 1,5 ml eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 1 h auf Eis gestellt. Das abzentrifugierte Bakterien-Pellet wurde in 300 μl eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Zu jeweils 100 μl dieser Zellen wurden nun 10 ng Plasmid-DNA oder die Hälfte des Ligationsproduktes gegeben und auf Eis inkubiert (30 min). Es folgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C (2 min) und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium eine einstündige Inkubation bei 37°C, um die Expression der Ampicillin-Resistenz zu ermöglichen. Nach dem Abzentrifugieren wurden die transformierten Bakterien in 100 μl frischem LB-Medium resuspendiert, auf zwei Agarplatten im Verhältnis 10 : 90 ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

3.4.6. PCR zur Amplifikation von DNA

Zur Klonierung von cDNA in Expressionsvektoren sowie zur Amplifikation von verschiedenen Genfragmenten wurde die Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) genutzt. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die von Saiki und Mitarbeitern beschriebenen Methode [Saiki et al. 1985]. Für jedes Template und jedes Primer-Paar wurden die Reaktionsbedingungen optimiert.

3.4.7. 5'-RACE-PCR

Die Isolation der kompletten cDNA des *M. sexta* Hemocytins erfolgte mittels zwei aufeinander folgender 5'-RACE-Reaktionen (*rapid amplification of cDNA ends*). Die Synthese der cDNA erfolgte dabei mit dem GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Groningen, NL) entsprechend den Herstellerangaben. Für die Synthese der cDNA wurde dabei nicht der Primer des Kits, sondern ein selbst entwickelter interner Primer (P 776, siehe Anhang) genutzt. Die anschließende Amplifikation erfolgte mit dem HotStarTaq™ DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden) mit verschiedenen Primern (siehe Anhang). Für die PCR-Reaktion wurden in einem autoklavierten Reaktionsgefäß folgende Komponenten gemischt:

2,50	µl	10x Reaktionspuffer
5,00	µl	5x Q-Solution
1,00	µl	dNTP-Mix (enthält je 2,5 mmol/l dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
y	µl	MgCl ₂ (25 mmol/l)
0,50	µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/l)
0,50	µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/l)
0,50	µl	cDNA aus GeneRacer Reaktion
0,33	µl	HotStarTaq (5U/µl)

Autoklaviertes Wasser bis zu einem Endvolumen von 25 µl.

Die eingesetzte Menge an Magnesiumchlorid wurde für jedes Primerpaar in Vorversuchen experimentell ermittelt (symbolisiert durch y). Abschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 35 µl Mineralöl überschichtet.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Einleitende Denaturierung:	15	min	95°C
gefolgt von 30 Zyklen bei:			
Denaturierung:	30	s	94°C
Annealing:	30	s	X°C
Elongation:	4,5	min	72°C
abschließende Elongation:	7,0	min	72°C

Die optimalen Reaktionsbedingungen (Annealing-Temperatur, X°C) wurden für jedes Primerpaar in Vorversuchen experimentell ermittelt.

Die Analyse der erhaltenen Produkte erfolgte mittels Agarose-Elektrophorese (s. Abs. 3.4.2.). Für präparative Zwecke wurden die Reaktionsansätze unter Erhalt der optimierten Konzentrationsverhältnisse vervielfacht. Die Reaktion erfolgte anschließend unter den optimierten Reaktionsbedingungen. Die amplifizierte DNA wurde in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und wie in Abs. 3.4.14. beschrieben gereinigt. Anschließend wurde das isolierte PCR-Produkt entsprechend der Herstellerangaben in den pGEM T-Vektor

(Promega, Madison, WI, USA) oder in den pCR[®]4-TOPO-Vektor (Invitrogen, Groningen, NL) ligiert und zur Transformation entsprechend Abs. 3.4.5. genutzt.

3.4.8. Nukleinsäure-Sequenzierung

Die Nukleinsäure-Sequenzierung erfolgte als Auftragsarbeit bei zwei Anbietern:

Im DNA-Synthese- und Sequenzier-Labor der Iowa State University (Ames, Iowa, USA) oder in der Sequenzierabteilung der Fa. MWG-BIOTECH (Ebersberg). Obwohl in diesen Einrichtungen Geräte unterschiedlicher Hersteller eingesetzt wurden, beruht die Sequenzieretechnik auf der Kettenabbruch-Methode von Sanger [Sanger et al. 1977]. Für die Sequenzierreaktion wurde eine Abwandlung der ursprünglichen Methode von Sanger, die *Cycle-Sequencing*-Methode, genutzt. Dabei wurde in einer PCR unter Zugabe nur eines Primers und eines Gemisches aus dNTPs und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (FddNTP) Matrizen-abhängig neue DNA synthetisiert. Durch den zufälligen Einbau von FddNTP wurde die Synthese terminiert. Dies führte zu einem Gemisch von Fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge, die nach der Entfernung nicht eingebauter FddNTPs, aufgetrennt und analysiert wurden.

3.4.9. Rekombinante Expression der klonierten cDNAs in *Escherichia coli*

3.4.9.1. Konstruktion von Expressionsvektoren

Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine erfolgte durch Klonierung in einen modifizierten pQE-6 Vektor [Lee et al. 1994]. Durch die Modifikation wurde eine Schnittstelle des Restriktionsenzym NcoI eliminiert, so dass die Klonierung der zu exprimierenden cDNA in eine zusätzliche NcoI Schnittstelle direkt im Anschluss an den *Tag* aus sechs Histidin-Resten erfolgen kann. Dieser *Tag* ermöglicht später die einfache Detektion (Immunoblot mit Anti-Histidin Antikörper) und Reinigung (Ni-NTA-Säulenchromatografie). Da der Vektor bereits ein Startcodon trägt, war es erforderlich in einer PCR-Reaktion mit der cDNA als Matrize, zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen (5': NcoI, 3': HindIII) zu generieren. Dies gewährleistete zugleich die korrekte Orientierung der cDNA im Expressionsvektor sowie den Erhalt des Leserasters im Übergangsbereich des *Tags* zur cDNA. Vor der präparativen PCR wurden die Reaktionsbedingungen für jedes Primer-Paar experimentell optimiert. Nach der Reinigung des Reaktionsproduktes, wurde dieses mit NcoI und HindIII verdaut und erneut gereinigt. Zur Ligation wurde ein molares Verhältnis von 1 : 3 des nach Abs. 3.4.4. vorbereiteten Vektors mit der cDNA eingesetzt. Die Berechnung der eingesetzten Mengen erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Vektormenge [ng]} * \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} * \frac{3}{1} = \text{Insertmenge [ng]}$$

In einem sterilen Reaktionsgefäß wurde der Vektor mit der cDNA und 5 µl 2x Rapid Ligation Puffer (Promega, Madison, WI. USA) gemischt. Nach Zugabe von 3 U T4 DNA Ligase (Promega, Madison, WI. USA) wurde die Reaktion mit sterilem Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Hälfte des so hergestellten Ligationsprodukts wurde für die Transformation von kompetenten *E. coli* M15 genutzt. Die Propagation erfolgte unter Antibiotika-Selektion bei 37°C über Nacht.

3.4.9.2. Identifizierung von Transformanden

Zur Identifizierung von Transformanden wurden mehrere unabhängige Kolonien aus allen unter Antibiotika-Selektion gewachsenen Bakterien-Kolonien ausgewählt und in Flüssigkultur genommen. Aus einer frischen Übernacht-Kultur wurden 60 µl in 3 ml frisches Medium überimpft. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Expression des unter Kontrolle des lac-Promotors liegenden Fremdgenes durch Zugabe von 2 mmol/l IPTG induziert und für weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je Kultur 100 µl Bakteriensuspension entnommen und bei 13000 rpm pelletiert (1 min). Das Pellet wurde in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Bakterien bei 95°C lysiert (5 min). Die bakteriellen Proteine wurden in einer SDS-PAGE mit nachfolgendem Western-Blot analysiert. Die Detektion wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen den *Tag* aus fünf aufeinander folgenden Histidin-Resten (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

In einem zweiten Kontrollschritt wurde frisches TB-Medium mit zwei der im Western-Blot positiven Bakterienstämme angeimpft. Nach Wachstum über Nacht wurden die Plasmide entsprechend Abs. 3.4.1. isoliert. Die Plasmide wurden einem Restriktionverdau mit nachfolgender Auftrennung in einem 1%-igen Agarose-Gel unterzogen und ihre Wanderungsgeschwindigkeit mit dem ursprünglich zur Ligation eingesetzten Fragment der PCR-Reaktion verglichen.

3.4.9.3. Optimierung der Expression und Überprüfung der Löslichkeit

Um die Bedingungen für eine Expression des rekombinanten Proteins zu optimieren, wurde die Zeitabhängigkeit des Auftretens des Proteins und die Intensität der Bande in den Bakterien in Abhängigkeit von der Induktionsdauer mittels einer SDS-PAGE bestimmt. Da fremde Proteine in Bakterien häufig in einer nicht löslichen Form, eingelagert in so genannten *inclusion bodies*, synthetisiert werden, wurde parallel die Löslichkeit des Proteins überprüft.

Durchführung:

Aus einer frischen Übernacht-Kultur wurden 60 µl Bakterien-Suspension in frisches Medium überführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde zunächst ein 100 µl Aliquot entnommen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 2 mmol/l IPTG induziert. Während der nächsten Stunden wurde alle 60 min ein 100 µl Aliquot entnommen. Nach 5 h erfolgte die letzte Probenahme, hierbei wurde auch ein 1 ml Aliquot zur Bestimmung der Löslichkeit entnommen. Die Bakterien der Zeitreihe wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert und im gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Bakterien für die Untersuchung der Löslichkeit des Proteins wurden ebenfalls pelletiert und anschließend im gleichen Volumen Lysis-Puffer (s. Abs. 3.4.9.4.) aufgenommen. Diese Bakterien wurden durch 10 s Beschallung (6x, 50 W) lysiert. Die Zelltrümmer und -einschlüsse wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm (5 min) abgetrennt. Sowohl Überstand als auch Pellet wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer für die Analyse mittels SDS-Page vorbereitet und gemeinsam mit den Proben der Zeitreihe bei 95°C lysiert und denaturiert (5 min). Die Analyse erfolgte mittels einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

3.4.9.4. Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine**Benötigte Lösungen:****Lysis-Puffer:**

50 mmol/l NaH₂PO₄, pH 8,0
300 mmol/l NaCl
10 mmol/l Imidazol
32 mmol/l Benzamidin-Hydrochlorid

Denaturierungs-Puffer:

10,0 mmol/l Tris-Cl, pH 8,0
8,0 mol/l Harnstoff
100,0 mmol/l NaH₂PO₄

Wasch-Puffer A:

10,0 mmol/l Tris-Cl, pH 6,3
8,0 mol/l Harnstoff
100,0 mmol/l NaH₂PO₄

Wasch-Puffer B

10,0 mmol/l Tris-Cl, pH 5,9
8,0 mol/l Harnstoff
100,0 mmol/l NaH₂PO₄

Elutions-Puffer:

10,0 mmol/l Tris-Cl, pH 4,5
8,0 mol/l Harnstoff
100,0 mmol/l NaH₂PO₄

Durchführung:

Für präparative Zwecke wurden Bakterien für 2 h kultiviert. Die Expression des Fremdgens wurde durch Zugabe von 2 mmol/l IPTG für den experimentell ermittelten Zeitraum induziert. Anschließend wurden die Bakterien bei 5500 xg für 3 min bei 4°C pelletiert. Die Bakterien wurden in Lysis-Puffer aufgenommen und durch sechsmaliges Beschallen mit 75 W für jeweils 30 s auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden für bei 10000 xg pelletiert (30 min). Das Pellet wurde erneut in Lysis-Puffer resuspendiert. Zur Entfernung von anheftenden bakteriellen Proteinen erfolgte erneut eine Ultraschallbehandlung (6 x 10 s) auf Eis. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 10000 xg abgetrennt (30 min) und erneut nach dem beschriebenen Schema behandelt. Das nach den Waschsritten verbliebene Pellet wurde in Denaturierungs-Puffer resuspendiert und für 1 h bei 8°C leicht gerührt. Nicht gelöste Partikel wurden durch Zentrifugation (30 min, 10000 xg) entfernt. Als abschließender Reinigungsschritt erfolgte eine Affinitätschromatografie an Ni-NTA-Agarose. Zur Bestimmung der benötigten Menge Agarose wurde zunächst der Proteingehalt im Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes bestimmt, nachfolgend wurde anhand eines SDS-Gels die Menge an verunreinigenden Proteinen abgeschätzt. Pro 10 mg geschätztem Histidin-markiertem Protein wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose in Denaturierungs-Puffer equilibriert. Die Agarose wurde mit den denaturierten Proteinen vermischt und unter sanftem Rühren für 2 h bei 8°C inkubiert. Nun wurde die Suspension in eine Econo-Säule (Biorad, Richmond, CA, USA) gefüllt und solange mit Denaturierungs-Puffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm der Nulllinie entsprach (alle folgenden Wasch- und Desorptionsschritte wurden fotometrisch kontrolliert und solange fortgesetzt, bis die Absorption bei 280 nm die Nulllinie erreicht hatte). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch zwei aufeinander folgende Waschschrte mit Waschpuffer A und Waschpuffer B aus der Säule gespült. Abschließend wurden die gebundenen Proteine mit Elutions-Puffer aus der Säule gewaschen. Vor einer weiteren Bearbeitung wurde die Proteinkonzentration der eluierten Fraktionen bestimmt sowie eine SDS-PAGE durchgeführt. Um auszuschließen, dass während der Klonierung das Leseraster verschoben wurde, erfolgte vor einer weiteren Nutzung der gewonnenen Proteine eine N-terminale Sequenzierung. Für die Immunisierung von Kaninchen wurden jeweils 600 µg affinitätsgereinigtes Protein mittels SDS-PAGE (s. Abs. 3.3.1.) aufgetrennt. Die dem rekombinanten Protein entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zur weiteren Bearbeitung eingefroren (-80°C).

3.4.9.5. Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen rekombinant exprimierte Proteine

Die Herstellung polyklonaler Kaninchen-Antiseren gegen die gereinigten Proteine erfolgte als Auftragsarbeit bei den Firmen Cocalico Biologicals (Reamstown, PA, USA) und Davids Biotechnologie (Regensburg). Im Folgenden wird für diese Seren die Bezeichnung ‚Antikörper‘ mit dem Zusatz des zur Immunisierung benutzten Proteins genutzt.

3.4.10. Gewinnung von Gesamt-RNA

Die für die Herstellung von Expressionsbibliotheken und Northern-Blot Analysen benötigte RNA aus Fettkörper wurde mit einer nach Ausubel und Mitarbeitern modifizierten Methode präpariert [Ausubel, et al. 1995]. Die Präparation der Hämocyten-RNA wurde wegen der geringen Menge an Zellmaterial mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Benötigte Reagenzien:

Denaturierungs-Puffer:

- 4 mol/l Guanidiniisothiocyanat
- 25 mmol/l Natriumcitrat (pH 7,0)
- 0,5 % Natrium-N-dodecanoyl-N-methylglycin
- 0,1 mol/l 2-Mercaptoethanol

2 mol/l Natriumacetat (pH 4,0)

Phenol (pH 4,0) : Chloroform : 3-Methyl-1-Butanol (1 : 49 : 1; v : v : v)

Chloroform

100 % 2-Propanol

75 % Ethanol

Durchführung:

Alle für die Präparation und Analyse von RNA benötigten Reagenzien wurden mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. in sterilen Einmalgefäßen oder in mit DEPC-Wasser gespülten, autoklavierten Gefäßen hergestellt. Hierzu wurde 1 l Aqua bidest. über Nacht mit 1 ml DEPC behandelt. Anschließend wurde nicht umgesetztes DEPC durch Autoklavieren (20 min) bei 120°C und 202,7 kPa hydrolysiert. Die Präparation der gesamten RNA des Fettkörpers und der Hämocyten erfolgte von Tieren drei Tage nach der Häutung zum 5. Larvenstadium. Erfolgte die Präparation von experimentell infizierten Tieren, war die Infektion zuvor wie in Abs. 3.5.1. beschrieben ausgelöst worden. Vor der Organentnahme wurden die Tiere für mehrere Minuten im Kühlschrank narkotisiert. Nach Oberflächendesinfektion wurden die

Tiere lateral geöffnet und der Fettkörper entnommen. Durch kurzes Waschen in eiskalter AC-Saline wurden anheftende Hämozyten entfernt. Nun wurden die Fettkörper in 1 ml Denaturierungs-Puffer pro 100 mg Gewebe homogenisiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 2 mol/l Natriumacetat Lösung wurde die Suspension mit dem gleichen Volumen Phenol : Chloroform : 3-Methyl-1-Butanol auf Eis extrahiert (15 min). Die Phasen wurden durch eine Zentrifugation bei 10000 xg und 4°C (20 min) getrennt. Diese Extraktion wurde mit dem wässrigen Überstand bis zur Proteinfreiheit der Interphase wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase zur vollständigen Entfernung von Phenolresten nochmals unter den gleichen Bedingungen mit reinem Chloroform extrahiert. Die im Überstand enthaltene RNA wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens 100% 2-Propanol bei -20°C über Nacht präzipitiert und am nächsten Morgen durch Zentrifugation (10000 xg, 3 min und 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 0,5 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und anschließend in sterilem, DEPC-behandeltem Aqua bidest. resuspendiert. Der Gehalt an Gesamt-RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gehalt RNA [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} * 40 \text{ [ng/}\mu\text{l]} * \text{Verdünnungsfaktor.}$$

3.4.11. Gewinnung von mRNA

Gesamt-RNA besteht zu einem sehr großen Anteil aus rRNA und tRNA. Die genaue Menge der enthaltenen mRNA schwankt in Literaturangaben zwischen 1 - 5%, dabei besteht auch ein Unterschied, aus welchem Gewebe die RNA gewonnen wurde. Dieser Anteil an 'unerwünschter' RNA kann bei der Herstellung von Expressionsbanken u.a. falsche Produkte liefern. Für die Konstruktion der Genbanken erfolgte eine Aufreinigung von mRNA aus den Gesamt-RNA-Proben, die zuvor aus induziertem Fettkörper und Hämozyten gewonnen worden waren, mittels des Poly(A) Quik™ mRNA Isolation Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Benötigte Lösungen:

10x Probenpuffer:

10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5)
1 mmol/l EDTA
500 mmol/l NaCl

High-salt-Puffer

10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5)
1 mmol/l EDTA
500 mmol/l NaCl

Low-salt-Puffer:

10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5)
1 mmol/l EDTA
100 mmol/l NaCl

Elutionspuffer

10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5)
1 mmol/l EDTA

TE-Puffer:

10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5)

1 mmol/l EDTA

Durchführung:

Die im Kit enthaltenen Mini-Säulen wurden entsprechend der Firmenangabe vorbereitet und equilibriert. 500 µg Gesamt-RNA wurde bei 65°C denaturiert (5 min) und nachfolgend 5 min auf Eis abgekühlt. Vor dem Beladen der Säule wurde die RNA-Lösung mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt. Nun wurde die Probe zweimal durch die Säulenmatrix gepresst. Verunreinigungen und unspezifisch an die Matrix gebundene RNAs wurden durch zwei aufeinander folgende Waschschrte mit jeweils 200 µl High-salt-Puffer gefolgt von drei aufeinander folgenden Waschschrten mit jeweils 200 µl Low-salt-Puffer entfernt. Die Elution erfolgte mittels 200 µl Elutionspuffer, der zuvor auf 65°C erwärmt wurde. Die Konzentration der sehr verdünnten mRNA erfolgte mittels einer Ethanol-fällung. Hierzu wurde die mRNA-Lösung erneut mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt, sodann wurden 2,5 Volumenteile 100%-iger Ethanol zugegeben und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem kleinen Volumen Aqua bidest. resuspendiert. Der Gehalt an mRNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm nach folgender Formel bestimmt:

Gehalt RNA [ng/µl] = $A_{260} \cdot 40$ [ng/µl] * Verdünnungsfaktor.

3.4.12. Northern-Blot-Analysen

Die Northern-Blot Analyse wurde in Anlehnung an die von Ausubel und Mitarbeitern beschriebene Methode durchgeführt [Ausubel, et al. 1995].

Benötigte Lösungen:**5x Elektrophorese-Puffer:**

200 mmol/l MOPS (pH 7,0)

50 mmol/l Natriumacetat

5 mmol/l EDTA

20x SSC-Puffer:0,3 mol/l Na₃-Citrat (pH 7,0)

3,0 mol/l NaCl

Beide Lösungen wurden autoklaviert.

37% Formaldehyd

Durchführung:

Zur Herstellung eines 1%-igen Geles wurden 0,93 g Agar in 18,7 ml 5x Elektrophorese-Puffer und 58,0 ml DEPC-behandeltem Aqua bidest. aufgeschwemmt und in der Mikrowelle unter mehrmaligem Schwenken solange erhitzt, bis der Agar rückstandsfrei aufgelöst war. Nachdem das Gel auf 55-60°C abgekühlt war, wurden 16,7 ml Formaldehyd zugegeben und gut gemischt. Der Gelansatz wurde luftblasenfrei in den vorbereiteten Gelträger mit Probenkamm gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel in die mit 1x Elektrophorese-Puffer gefüllte, horizontale Gelkammer eingesetzt und der Probenkamm entfernt. Vor der eigentlichen Elektrophorese wurde das Gel einem Vorlauf bei einer Spannung von 5V/cm für 10 min unterzogen. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 10 µg RNA mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. auf ein Volumen von 10 µl gebracht, mit 2,5 µl 5x Lade-Puffer (Biorad, Richmond, CA, USA) versetzt, bei 65°C denaturiert (5 min) und für weitere 5 min auf Eis gekühlt. Nun wurden die Proben in die Taschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Gelfläche durchgeführt bis sich die Bromphenolblau-Front im letzten Drittel des Gels befand. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in DEPC-behandeltem Aqua bidest. gewaschen (2x 5 min) und in 20x SSC equilibriert (45 min). Zwischenzeitlich wurden mehrere Filterpapiere und die Blottingmembran auf die Größe des Geles zugeschnitten und ebenfalls in 20x SSC equilibriert. Abschließend erfolgte der Aufbau des Blots (s. Abb.). Dabei erfolgte der Transfer der Nukleinsäuren für 12-18 h durch einen Strom von Pufferflüssigkeit (20x SSC) in Richtung der Blottingmembran, der durch Kapillarkräfte erzeugt wurde. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Entfernung anhaftender Agarose-Reste in 2x SSC gewaschen (2 min).

3.4.13. Southern-Blot-Analysen**Benötigte Lösungen:****Denaturierungs-Lösung:**

0,5 mol/l NaOH

1,5 mol/l NaCl

Neutralisierungs-Lösung:

1,0 mol/l Tris (pH 7,5)

1,5 mol/l NaCl

Durchführung:

Zur Identifizierung von falsch positiven Klonen aus verschiedenen Screens der Genbanken sowie aus verschiedenen PCR-Reaktionen wurden Southern-Blots durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchende DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Denaturierung der DNA zunächst in Denaturierungs-Lösung (45 min) und danach in Neutralisations-Lösung (30 min) inkubiert. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Blottingmembran erfolgte in einem Kapillartransfer (wie für Northern-Blot-Analysen

beschrieben) mit 10x SSC-Laufpuffer über Nacht. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Entfernung anhaftender Agarose-Reste in 2x SSC gewaschen (2 min).

3.4.14. Herstellung Digoxigenin markierter Sonden

Die zur späteren immunologischen Detektion von Hybridisierungsexperimenten erforderliche Markierung von Nukleinsäuren mittels Digoxigenin (DIG) wurde mit dem "DIG-High Prime Labeling and Detection Kit" (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Dieses Kit nutzt den Einbau von DIG-11-dUTP in einen zum Template komplementären Nukleinsäure-Strang in einer 'random primed' Reaktion. Dabei ist das Digoxigenin über eine gegenüber alkalischen Reagenzien labilen Esterbindung an das UTP gekoppelt. Dies erleichtert die Wiederbenutzung der hybridisierten Filter.

Durchführung:

Die als spätere Sonde gewünschte cDNA wurde mittels Restriktionsverdau (s. Abs. 3.4.3.) aus dem Plasmid geschnitten. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht-Kontrolle aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem "GFX™ PCR DNA and gel band purification"-Kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel zurückgewonnen. Für die Markierungs-Reaktion wurden jeweils 1 µg gereinigte cDNA in einem Volumen von 16 µl zunächst durch Erhitzen (10 min) bei 95°C gefolgt von einer Inkubation (5 min) auf Eis denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl DIG-High Prime Mix erfolgte die Markierungs-Reaktion bei 37°C. Nach 20 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 mol/l EDTA (pH 8,0) beendet. Die Konzentration der so hergestellten Sonde wurde mit den im Kit enthaltenen Evaluierungstreifen überprüft. Sie lag gewöhnlich bei etwa 2 µg pro Reaktionsansatz und konnte für Hybridisierungen 1:500 bis 1:2000 verdünnt werden.

3.4.15. Hybridisierung

benötigte Lösungen:

50x Denhardts Reagenz:

5 g Ficoll (Typ 400)
5 g Polyvinylpyrrolidon
15 g BSA (Fraktion V)
ad 500 ml mit Aqua bidest.

Prähybridisierungslösung:

1,0 ml 50x Denhardts Reagenz
0,5 ml 10% SDS
8,4 ml 6x SSC
100 µl 10 mg/ml Fisch-Sperma DNA

20x SSC:

3,0 mol/l NaCl
0,3 mol/l Na₃-Citrat (pH 7,2)

10% SDS

10,0 g SDS
ad 100 ml mit Aqua bidest.

Durchführung:

Die optimalen Hybridisierungsbedingungen wurden für jede Sonde experimentell ermittelt. Die zu hybridisierenden Membranen wurden in 2x SSC gewaschen (10 min, 68°C). In der Zwischenzeit wurden 100 µl Fischsperma-DNA bei 95°C denaturiert (10 min). Die Prähybridisierung erfolgte bei 65°C für 3 h in 10 ml Prähybridisierungslösung. Kurz bevor die Prähybridisierung beendet war, wurde die experimentell optimierte Menge DIG-markierte Sonde bei 95°C denaturiert (5 min) und in einem geeigneten Volumen Prähybridisierungslösung verdünnt. Dieses Gemisch wurde nach Abgießen der Prähybridisierungslösung zu der nun blockierten Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei der zuvor ermittelten optimalen Hybridisierungstemperatur über Nacht. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung erfolgten mehrere Waschstreps zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde nach dem folgenden Schema:

2x 5 min 2x SSC/0,1% SDS bei RT

2x 15 min 0,1x SSC/0,1% SDS bei 65°C.

Die weitere Behandlung der Membran, bis zur Visualisierung der hybridisierten Nukleinsäuren, erfolgte entsprechend den Herstellerangaben zum "DIG-High Prime Labeling and Detection"-Kit.

3.4.16. Reverse Transkription und Erstellung zweier cDNA-Genbanken

Die Synthese der cDNA aus mRNA, die zuvor aus Fettkörper und Hämocyten experimentell infizierter Larven des Tabakschwärmers *M. sexta* gewonnen worden war, erfolgte mittels des "ZAP-cDNA™ Gigapack™ III Gold Cloning"-Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in Anlehnung an die im Kit enthaltenen Herstellerangaben. Mit Ausnahme des Radioisotops (Applied Biosystems/NEN, Boston, MA, USA) und des SM-Puffers waren alle benutzten Lösungen in diesem Kit enthalten. Die dabei gewonnene cDNA wurde nachfolgend in den im Kit enthaltenen Uni-ZAP XR Vektor ligiert.

3.4.16.1. Reverse Transkription der mRNA

In ein DEPC-behandeltes und autoklaviertes Reaktionsgefäß wurden 5 µg mRNA gegeben, bei 65°C denaturiert (10 min) und anschließend auf Eis abgekühlt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden folgende Komponenten gemischt:

5	µl	10x Erststrang-Puffer
3	µl	Erststrang-Nukleotid-Mix (enthält 5-Methyl-dCTP)
2	µl	Linker-Primer (1,4 µg/µl)
1	µl	RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 15 µl gebracht, sorgfältig durchmischt und zur denaturierten mRNA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT inkubiert (10 min), um ein gutes Hybridisieren des Linker-Primers an die RNA zu gewährleisten. Nun erfolgte die Zugabe von 75 U MMLV-RT zum Transkriptionsansatz. Alle Komponenten wurden erneut gut gemischt und durch eine kurze Zentrifugation im Boden des Gefäßes gesammelt. Ein 5 µl Aliquot wurde dem Reaktionsansatz entnommen und in ein zweites Reaktionsgefäß, in welches zuvor 0,5 µl [α -³²P] dATP gegeben worden waren, überführt. Dieser Ansatz diente als Kontrollreaktion. Die Synthese des Erststranges der cDNA erfolgte für 1 h bei 37°C. Die Kontrollreaktion wurde nun bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die synthetisierten Einzelstrang-cDNAs wurden als Matrize für die Zweitstrang-Synthese eingesetzt.

Zweitstrang-Synthese

Zu den 45 µl Erststrang-Reaktionsprodukt wurden die folgenden Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge gegeben:

20	µl	10x Zweitstrang-Puffer
6	µl	Zweitstrang-dNTP-Mix
114	µl	steriles Aqua bidest.
2	µl	[α - ³² P] dATP
2	µl	RNase H (1,5 U/µl)
11	µl	DNA Polymerase I (9,0 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und durch Zentrifugation am Boden des Gefäßes gesammelt. Die nun folgende Inkubation wurde abweichend zur Firmenanleitung für 17 h bei 10-15°C durchgeführt. In ersten Vorversuchen wurde die Synthese von einer großen Anzahl kurzer Fragmente beobachtet, die vermutlich durch eine Bildung von *hair-pin*-Strukturen verursacht wurde. Nach beendeter Reaktion wurde die cDNA nach Zugabe von 23 µl *blunting*-dNTP'-Mix und 2 µl Pfu-DNA Polymerase (2,5 U/µl) für 30 min bei

72°C 'geglättet'. Der Reaktionsansatz wurde nun einmal mit 200 µl Phenol (pH 8,0) : Chloroform (1:1; v/v) und einmal mit 200 µl Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat Lösung und 400 µl Ethanol (100%) wurde die cDNA bei -20°C über Nacht präzipitiert. Durch Zentrifugation (13000 rpm, 60 min und 4°C) wurde das Präzipitat abgetrennt, mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und nachfolgend getrocknet. Das Pellet wurde nun bei 4°C für 30 min in 9 µl EcoRI Adaptern resuspendiert. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von 1 µl 10x Ligase-Puffer, 1 µl 10 mmol/l rATP und 4 U T4 DNA Ligase bei 8°C über Nacht. Dieser Schritt gewährleistet, zusammen mit der im Linker-Primer vorhandenen XhoI Restriktionsschnittstelle, die spätere, direktionale Klonierung der cDNAs in den Uni-ZAP XR Vektor. Nach beendeter Reaktion wurde die Ligase durch Inkubation (30 min) bei 70°C denaturiert. Die Adapter-Enden wurden durch Zugabe von 1 µl 10x Ligase-Puffer, 2 µl 10 mmol/l rATP, 6 µl sterilem Aqua bidest. und 10 U T4 Polynukleotid Kinase bei 37°C phosphoryliert (30 min). Es folgte erneut eine Inkubation (30 min) bei 70°C, um die Kinase zu inaktivieren. Anschließend wurde die Reaktion auf RT abgekühlt (5 min). Als Vorbereitung für die spätere Insertion der cDNAs in den Vektor erfolgte ein Verdau mit XhoI. Hierzu wurde dem Reaktionsansatz 28 µl XhoI Puffer-Supplement zugesetzt, gefolgt von der Zugabe von 120 U XhoI. Der Verdau wurde für 1,5 h bei 37°C durchgeführt. Nun wurden 5 µl 10x STE-Puffer und 125 µl Ethanol (100%) zum Reaktionsgemisch gegeben und die DNA bei -20°C über Nacht präzipitiert. Die ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Mikrozentrifuge, max. Drehzahl, 60 min) und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 14 µl 1x STE-Puffer und 3,5 µl Säulen-Ladepuffer für die Größenfraktionierung resuspendiert.

3.4.16.2. Größenfraktionierung von cDNA

Die Säule für die Größenauffrennung der hergestellten cDNA wurde aus einer sterilen, graduierten 1 ml Pipette, die mit einer 10 ml Spritze als Pufferreservoir verbunden war, hergestellt. Um zu verhindern, dass die Sepharose aus der Säule 'ausläuft', wurde das Ende der Pipette vor dem Packen mit etwas steriler Watte gefüllt. Die Sepharose wurde nun sorgfältig aufgeschwemmt, bis eine einheitliche Suspension entstanden war. Anschließend wurde solange Sepharose in die Säule gefüllt, bis sich die Oberkante des gepackten Säulenbettes knapp oberhalb der 1 ml Graduierung befand. Nun wurde die Säule mit 15 ml 1x STE-Puffer equilibriert. Nachfolgend wurde die cDNA auf die Säule aufgetragen, wobei größte Sorgfalt darauf verwendet wurde, dass Gelbett nicht aufzuwirbeln. Die Elution erfolgte mit 1x STE-Puffer. Nachdem die Farbfront die 0,4 ml Graduierung erreicht hatte, wurde mit dem Sammeln von Fraktionen in einer Größe von jeweils 3 Tropfen begonnen. Dies wurde fortgesetzt, bis der Farbstoff die Säule verlassen hatte. Nach beendeter Elution wurde jeder Fraktion ein Aliquot von 8 µl entnommen. Dieses wurde in einer nicht-denaturierenden Acrylamid-Elektrophorese zur Abschätzung der Fraktionierungsqualität und cDNA-Längen eingesetzt. Nachfolgend wurden die Fraktionen zur Entfernung eventuell verbliebener

Proteine einmal mit 200 µl Phenol:Chloroform (1:1; v/v) und einmal mit 200 µl Chloroform extrahiert. Anschließend wurden jeder Fraktion zwei Volumenteile 100% Ethanol zugesetzt und die DNA über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm (1 h) pelletiert. Nun wurde das Pellet mit 200 µl 80% Ethanol gewaschen und nachfolgend getrocknet. Die Resuspendierung der cDNA erfolgte in Abhängigkeit der enthaltenen Radioaktivität in 3,5 - 5 µl sterilem Aqua bidest.

3.4.16.3. Ligation von cDNA in den Uni-ZAP XR Vektor

Zur Durchführung der Ligation wurden 100 ng der cDNA zusammen mit den folgenden Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in ein Reaktionsgefäß gegeben:

100	ng	cDNA
0,5	µl	10x Ligase Puffer
0,5	µl	10 mmol/l rATP (pH 7,5)
1,0	µl	Uni-ZAP XR Vektor (1 µg/µl)
X	µl	steriles Aqua bidest. bis zu einem Gesamtvolumen von 4,5 µl

Nach sorgfältigem Durchmischen erfolgte die Zugabe von 0,5 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl). Die Ligation wurde 12 h bei 12°C inkubiert.

3.4.16.4. *In-vitro*-Verpackung von rekombinanter Lambda-DNA

Benötigte Reagenzien:

SM-Puffer:

0,050	mol/l	Tris-HCL (pH 7,5)
1,000	mol/l	NaCl
0,008	mol/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,010	%	Gelatine

Durchführung:

Die für die Verpackung rekombinanter Lambda-DNA benötigten Phagenbestandteile waren in dem kommerziell bezogenen "Gigapack™ III Gold Packaging Extract" (Stratagene, La Jolla, CA, USA) enthalten. Für die Verpackungsreaktion wurden zu 25 µl 'packaging extract' 1 µl des Ligations-Ansatzes gegeben, gemischt und für 2 h bei RT inkubiert. Die reifen Phagen wurden mit 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform vermischt. Der phagenhaltige Überstand wurde zur Titration bzw. zur Amplifikation der Expressionsbibliothek eingesetzt.

3.4.16.5. Amplifikation und Titration von Expressionsbibliotheken

Benötigte Reagenzien:

1 mol/l MgSO₄, steril filtriert

10 mmol/l MgSO₄, steril filtriert

10% Maltose, steril filtriert

Durchführung:

Aus einer Übernacht-Kultur von *E. coli* XL1-Blue wurde eine frische Kultur in LB Medium, supplementiert mit 10 mmol/l MgSO₄ und 0,2% Maltose (w/v), angeimpft und bis zu einer Absorption von 0,5 bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation (500 xg, 10 min) wurden die Bakterien pelletiert und nachfolgend im gleichen Volumen 10 mmol/l MgSO₄ resuspendiert. Zur Amplifikation der Bibliothek wurden 600 µl Bakteriensuspension mit 100 µl Überstand der Verpackungsreaktion (ca 5x10⁴ PFU) eingesetzt. Für andere Zwecke (Titration, Plaquelifts) erfolgte die Infektion der Wirtszellen mit geeigneten Verdünnungen der amplifizierten Bibliothek. Während der folgenden Inkubation (15 min, 37°C) wurde den Phagen das Adhären ermöglichen. Anschließend wurden die infizierten *E. coli* Zellen in 7 ml NZYM-Top-Agar auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Amplifikation der Bibliothek wurden die Platten mit jeweils 10 ml SM-Puffer überschichtet und zur Extraktion der Bakteriophagen über Nacht bei 4°C sanft geschwenkt. Die Überstände aller Platten wurden vereinigt und zur Abtrennung von Zelldebris 15 min mit Chloroform (Endkonzentration 5%; v/v) behandelt. Der Überstand wurde mit DMSO auf eine Endkonzentration von 7% gebracht, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Titration der Expressionsbank erfolgte das Auszählen der erhaltenen durchscheinenden Höfe ohne weitere Behandlung. Die Berechnung des Umfangs der Bibliothek erfolgte nach folgender Formel:

Anzahl Plaques x Verdünnungsfaktor x Volumen der Ligations-Reaktion, bzw.

für die Titration der amplifizierten Bank nach:

Anzahl Plaques x Verdünnungsfaktor x 1000 = PFU/ml

3.4.16.6. “Screenen” der Expressionsbank

Benötigte Reagenzien:

Lysis Puffer:

0,5 mol/l NaOH
1,5 mol/l NaCl

Neutralisations-Puffer:

1,0 mol/l Tris-HCl (pH 8,0)
1,5 mol/l NaCl

Durchführung:

Zum “Screenen” der Expressionsbank wurden entsprechend Abs. 3.4.16.5. Platten mit einer Phagendichte von 5×10^4 PFU/Petrischale (15 cm Durchmesser) erstellt. Mittels Nitrocellulose-Membranen wurde von den Platten ein Negativ erstellt. Hierzu wurde die Membran auf den Top-Agar gelegt (2 min). Anschließend wurden die an der Membran heftenden Phagen in Lysis-Puffer lysiert (5 min). Die Membran wurde an der Luft getrocknet und in Neutralisations-Puffer behandelt (5 min). Nach erneuter Lufttrocknung wurde der Debris durch 30 s Schwenken in 2x SSC entfernt. Die Identifizierung von positiven Kolonien erfolgte durch Hybridisierung mit DIG-markierten, spezifischen Sonden wie in Abs. 3.4.14. beschrieben. Die nachfolgende immunologische Detektion erfolgte entsprechend den Hersteller Angaben zum “DIG-High Prime Labeling and Detection Kit” mittels eines monoklonalen, alkalische Phosphatase-konjugierten Fab-Fragments gegen Digoxigenin. Die positiven Plaques wurden durch Vergleich der Platte mit dem Negativ identifiziert, mit einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Extraktion der Phagen erfolgte durch Inkubation der ausgestochenen Agarose mit 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform bei 8°C über Nacht. Der erhaltene Phagen-Stock wurde bis zur Einheitlichkeit der Platten subkloniert.

3.4.16.7. *In-vivo*-Exzision der Phagemide

Durchführung:

Zwei in LB-Medium mit 10 mmol/l MgSO₄ und 0,2% Maltose (w/v) gezogene Übernacht-Kulturen von XL1-Blue- und SOLR-*E. coli*-Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 xg, 5 min, 4°C) pelletiert. Die pelletierten Bakterien wurden getrennt in einer Menge 10 mmol/l MgSO₄ resuspendiert, so dass die Absorption 1,0 betrug. Zu 200 µl der XL1-Blue-Zellen wurden 250 µl rekombinante Phagen (für nach Abs. 3.4.16.6. isolierte einzelne Klone; für Massenexzision ca. 1x10⁵ Phagen) und ca. 1x10⁶ ExAssist-Helfer-Phagen gegeben. Während der folgenden Inkubation (10 min, 37°C) wurde den Phagen die Adhäsion ermöglicht. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde erneut für 2,5-3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erhitzt (20 min, 65-70°C) und der Debris durch Zentrifugation bei 1000 xg (15 min) abgetrennt. Der Überstand, der die als filamentöse Phagen-Partikel verpackten, ausgeschnittenen pBluescript Phagemide enthielt, wurde in ein steriles Gefäß überführt und zur weiteren Propagation in SOLR-*E. coli*-Zellen eingesetzt. Hierzu wurden 200 µl SOLR-*E. coli*-Zellen mit 100 µl pBluescript Phagemid versetzt. Den Phagemiden wurde für 15 min bei 37°C die Adhäsion an die Wirtszellen erlaubt, nachfolgend wurden die infizierten Zellen im Verhältnis 1:9 auf zwei Ampicillin-LB-Agar Platten (50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.16.8. Isolation von rekombinanter Lambda DNA aus den Expressionsbanken

Benötigte Reagenzien:

TE-Puffer:

10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0)

1 mmol/l EDTA

Durchführung:

Ein 50 ml Aliquot der nach Abs. 3.4.16.5. amplifizierten Expressionsbanken wurde zur Entfernung der Wirts-DNA mit 10 ml DEAE-Zellulose (DE-52, Whatman) 25x invertiert. Durch Zentrifugation bei 5000 xg (5 min) wurde die DEAE-Zellulose abgetrennt. Die Extraktion wurde mit frischem Anionentauscher einmal wiederholt. Die im Überstand verbliebenen Phagen wurden mit 1/8 Volumenteil 5 M NaCl und 1 Volumenteil 100% 2-Propanol versetzt und bei -20°C über Nacht gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15000 xg, 20 min) abgetrennt und in 2 ml TE-Puffer resuspendiert. Zur Entfernung von Proteinen wurden die Phagen jeweils 2x mit Phenol, Phenol:Chloroform (1:1, v:v) und Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 2,5 Volumenteilen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) wurde die rekombinante Lambda DNA für 30 min bei -80°C gefällt und das Präzipitat durch Zentrifugation (12000 xg, 15 min)

abgetrennt. Das Pellet wurde getrocknet, in 400 µl sterilem Aqua bidest. resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.16.9. Nicht-denaturierende Acrylamid-Elektrophorese von cDNAs

Benötigte Lösungen:

Lösung A: Acrylamid-Bisacrylamid

29,0 g Acrylamid
1,0 g N,N'-Methylbisacrylamid
ad 100 ml mit Aqua bidest.

Lösung B: 5x TBE

54,0 g Tris (Base)
27,5 g Borsäure
20,0 ml 0,5 mol/l EDTA
ad 1000 ml mit Aqua bidest., pH 8,3

Durchführung:

Um die Qualität der Größenfraktionierung zu überprüfen, wurden 1 µl Aliquots abgenommen und mit 6 µl Probenpuffer für Sequenziergele versetzt. Zur Auftrennung dieser Proben wurde ein 5%iges nicht-denaturierendes Acrylamid-Gel hergestellt. Hierzu wurden 7,8 ml Lösung A mit 10 ml Lösung B und 33,85 ml Aqua bidest. gemischt. Nach Zugabe von 0,35 ml 10% APS-Lösung wurde das Gemisch in eine nach Abs. 3.1.4.1. vorbereitete Gelapparatur gefüllt. Nach erfolgter Polymerisation wurden pro Fraktion 7 µl der vorbereiteten Proben in die Taschen des Geles pipettiert. Die Auftrennung der cDNAs erfolgte bei konstant 30 mA unter Eiskühlung, bis die Bromphenol Blau-Front das Ende des Gels erreicht hatte. Die "Sandwich"-Apparatur wurde vorsichtig geöffnet und das Gel wurde in 10% Essigsäure mit 20% Methanol fixiert (15 min). Anschließend wurde das Gel vorsichtig auf einen Blotting Filter überführt, getrocknet und zur Autoradiografie für 24 h auf einen Röntgenfilm gelegt.

3.4.16.10. Alkalische Agarose-Elektrophorese

Durch die Bildung von Sekundärstrukturen (z.B. *Hairpinning*) kann es während der reversen Transkription, aber auch bei der Synthese des zweiten Stranges der cDNA, zur Bildung von verkürzten cDNAs kommen. Alkalische Agarose Gele erlauben es, Rückschlüsse über die Bildung unerwünschter, verkürzter Bruchstücke zu treffen.

Benötigte Reagenzien:

10x Alkalischer Puffer:

3 ml 5 mol/l NaOH
2 ml 0,5 mol/l EDTA
45 ml Aqua dest.

2x Alkalische Agarose Probenpuffer

200 µl Glycerin
750 µl Aqua dest.
46 µl gesättigte Bromphenol Blau-Lösung
5 µl 5 mol/l NaOH

Durchführung:

In 72 ml Aqua bidest. wurden 800 mg Agarose bis zum vollständigen Schmelzen erhitzt. Die Agarose wurde auf 50-55°C abgekühlt und mit 8 ml zehnfach-konzentriertem alkalischem Puffer versetzt. Das Gel wurde nun möglichst dünn in die vorbereitete Elektrophorese-Apparatur gegossen und bis zum Erstarren abgekühlt. Die Aliquots der Erst- und Zweitstrang-Synthese wurden mit einem gleichen Volumen 2x Probenpuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Geles pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte mit einfach-konzentriertem alkalischem Puffer als Elektrophorese-Puffer bei einer Stromstärke von 50 mA bis die Bromphenol Blau-Front 2/3 des Geles durchlaufen hatte. Das Gel wurde nun der Kammer entnommen und unter größter Vorsicht zwischen mehreren Lagen Blotting Papier trockengetupft und etwas entwässert. Anschließend wurde es für 20-24 h zur Autoradiografie auf einen Röntgenfilm gelegt.

3.4.16.11. Ethidiumbromid-Plattenassay zur Quantifizierung der cDNA

Für die Ligation der cDNA in den Vektor ist es erforderlich, ein ungefähres Maß der Menge an vorhandener cDNA zu besitzen. Zur Abschätzung erfolgte ein Vergleich der erhaltenen Menge cDNA mit bekannten Mengen eines DNA-Standards auf Ethidiumbromid-enthaltenden Agaroseplatten.

Durchführung:

In 100 ml TAE-Puffer (s. Abs. 3.4.2.) wurden 800 mg Agarose bis zum vollständigen Schmelzen erhitzt. Die Agarose wurde auf 50-55°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1 µg/µl). Anschließend wurde die Agarose auf Petrischalen verteilt (10 ml pro Petrischale) und bis zum Erstarren abgekühlt. Die Lagerung nicht sofort benötigter Schalen erfolgte im Dunkeln bei 4°C. Zur Bestimmung der cDNA-Menge wurde eine Standardreihe aus DNA bekannter Konzentration hergestellt (5-200 ng/µl). Von dieser Standardreihe wurden 0,5 µl Aliquots auf eine Ethidiumbromid-Agarplatte aufgetragen. Ebenso wurde mit den DNA-Proben unbekannter Konzentration verfahren. Um eine gleichmäßige Diffusion der DNA in die Agarplatte zu gewährleisten, wurden die Platten nun bei RT inkubiert (15 min). Die Bestimmung der unbekannt Konzentrationen erfolgte durch visuellen Abgleich der Färbungsintensitäten der unbekannt cDNA-Fractionen mit den Konzentrationen der Eichreihe.

3.5. Sonstige Methoden

3.5.1. Gewinnung von Hämolymp-Plasma

Zur Hämolymp-Gewinnung wurden Tiere des 5. Larvenstadiums (L5) am 3. Tag nach der Häutung eingesetzt. Erfolgte eine experimentelle Infektion der Tiere, wurden die Erreger 24 h zuvor nach Oberflächendesinfektion in einem Volumen von 50 µl Manduca-Saline ventral zwischen dem 4. und 5. Kranzfuß-Paar appliziert. Unmittelbar vor der Hämolympabnahme wurden die Tiere für einige Minuten im Kühlschrank gekühlt. Nach Oberflächendesinfektion erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des ersten Kranzfuß-Paares. Erfolgte die Hämolympabnahme bei Tieren des 3. oder 4. Larvenstadiums, wurde das Horn mit einer desinfizierten Schere angeschnitten. Die austretende Hämolymphe wurde in einem vorgekühlten Gefäß gesammelt, in welches - zur Inaktivierung der Phenoloxidasen - ein Kristall Phenylthioureat (PTU) vorgelegt worden war. Die Abtrennung zellulärer Bestandteile erfolgte nach einer von Beckage und Mitarbeitern beschriebenen Zentrifugation [Beckage et al. 1993]. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.2. Präparation von Hämozyten

Benötigte Lösungen:

Zur Präparation von Hämozyten und Hämolymphe wurden verschiedene physiologische Salinen genutzt. Die Zusammensetzung dieser Salinen ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

			Pro Liter		
			<u>Vollsaline</u>	<u>AC-Saline</u>	<u>Ca/Mg-frei</u>
4,0	mM	NaCl	0,230 g	0,230 g	0,230 g
40,0	mM	KCl	2,980 g	2,980 g	2,980 g
1,7	mM	PIPES	0,514 g	0,514 g	0,514 g
146,0	mM	Saccharose	50,00 g	50,00 g	50,00 g
1,0	g	Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)	1,000 g	1,000 g	1,000 g
18,0	mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3,660 g	--	--
3,0	mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,440 g	--	--
8,0	mM	Na ₂ EDTA	--	2,978 g	--
9,5	mM	Zitronensäure x 1 H ₂ O	--	1,996 g	--
27,0	mM	Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O	--	7,940 g	--

Alle obigen Salinen wurden auf einen pH von 6,5 – 6,8 mit einem Gemisch aus NaOH und KOH (1:1) eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vollsaline und Anti-Coagulanz-

Saline (AC) wurden nach einer von Willot und Mitarbeitern beschriebenen Methode hergestellt [Willott et al. 1994].

Zur Gewinnung von Hämozyten wurden die Tiere wie in Abs. 3.5.1. angegeben vorbereitet. Die Präparation der Hämozyten erfolgte nach einer von Willot und Mitarbeitern beschriebenen Methode [Willott et al. 1994]. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Hämozyten nach zwei Waschschritten in AC-Saline in Vollsaline resuspendiert und auf die Objektträger gebracht. Für Membranpräparationen und nachfolgende Extraktionen von Membranproteinen erfolgte ein zusätzlicher Waschschriff mit 0,21 mol/l NaCl und 50 µmol/l Pefablock. Nach Abnahme des Überstandes wurden diese Hämozyten bei -20°C gelagert.

3.5.3. Kultur von Bakterien

Benötigte Lösungen:

LB Medium

LB Agar

50 mg/ml Ampicillin-Stammlösung

10 mg/ml Kanamycin-Stammlösung

5 mg/ml Tetracyclin-Stammlösung

Glycerin (autoklaviert)

Durchführung:

Zur Kultivierung wurden bei -80°C gelagerte Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Von dieser Platte wurde am nächsten Tag eine einzelne Kolonie entnommen und in flüssiges LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Die Zucht der Flüssigkultur erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien in frisches Medium überimpft und für nachfolgende Anwendungen kultiviert. Sollten die Bakterien für längerfristige Lagerung eingefroren werden, wurden 100 µl Übernacht-Kultur mit einem gleichen Volumen sterilem Glycerin gemischt und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.5.4. Herstellung einer Affinitätsmatrix mit immobilisiertem LPS

Die Immobilisierung von LPS erfolgte nach vorhergehender partieller Oxidation der Kohlenhydrate nach der von Minetti und Mitarbeitern beschriebenen Methode [Minetti et al. 1991]. Zum Vergleich, ob es sich bei später eluierten Proteinen um unspezifische Assoziation an das Gelbett handelt, wurde ein Teil des Affigel HZ nicht mit LPS gekoppelt. Die Behandlung dieses Teils erfolgte ansonsten jedoch auf die gleiche Weise.

3.5.4.1. Oxidation von LPS

Benötigte Reagenzien:

Kopplungs-Puffer:

100 mmol/l Natriumacetat (pH 5,5)

150 mmol/l NaCl

NaIO₄

LPS (*E.coli* Serotyp 0111:B4)

Durchführung:

25 mg Natriumperiodat NaIO₄ wurden in 25 ml Kopplungspuffer für HZ-Gele gelöst. Zu 12,5 ml dieser Lösung wurden 50 mg LPS Serotyp 0111:B4 (Sigma-Aldrich, München) gegeben, gelöst und 1 h bei RT im Dunkeln oxidiert. Zur Entfernung des verbliebenen Oxidationsmittels wurde das oxidierte LPS über Nacht einer Dialyse gegen 4 l Kopplungspuffer bei 8°C unterzogen.

3.5.4.2. Kopplung des oxidierten LPS an eine Hydrazid-Matrix

Benötigte Lösungen:

Lager-Puffer:

20 mmol/l Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0)

500 mmol/l NaCl

0,02 % Natriumazid

Glycerin

Durchführung:

Das in 2-Propanol gelagerte Affigel-HZ (Biorad) wurden zur Entfernung des 2-Propanols intensiv mit reichlich Kopplungspuffer gewaschen (mehrmalige kurze Zentrifugation bei 500 rpm, Abnehmen des Überstandes, Resuspendieren in Kopplungspuffer) und anschließend im selben Puffer aufgenommen. Zu dieser Suspension wurde das oxidierte LPS gegeben. Die Kopplung erfolgt über Nacht bei RT unter ständigem Schütteln auf einem Wippschüttler. Für Kontrollzwecke wurde eine zweite Menge des Affigels nach Entfernung des 2-Propanols in Kopplungspuffer ohne Zugabe von LPS ebenfalls über Nacht geschüttelt (Kontroll-Agarose). Beide Ansätze wurden anschließend mit Lager-Puffer gewaschen und im selben Puffer aufbewahrt. Zur Kontrolle der Kopplung wurde ein SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung durchgeführt.

3.5.5. LPS-Bindungstest

Zum Nachweis der Bindung von LPS durch IML-3 wurde ein Bindungstest mit solubilisiertem LPS durchgeführt. Die Solubilisierung des LPS (*E. coli*, Serotyp 0111:B4, Sigma-Aldrich, München) in Vollsaline erfolgte in Anlehnung an die von Fotiadou beschriebene Methode [Fotiadou 1994]. Die eingesetzte Hämolymphe wurde wie in Abs. 3.5.1. beschrieben gewonnen, jedoch wurde vor der Abtrennung der Zellen Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, München) zugesetzt. Die Hämolymphe wurde mit einem gleichen Volumen Vollsaline verdünnt und mit 10 mg/ml LPS versetzt (Negativ-Kontrolle: Zugabe eines gleichen Volumens Vollsaline) und 2 h bei RT unter sanftem Schwenken inkubiert.

Zur Analyse wurden beide Ansätze mit einem gleichen Volumen nativem Probenpuffer versetzt und einer Acrylamid-Elektrophorese unter nativen Bedingungen unterzogen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde ein Streifen des nativen Gels ausgeschnitten und in einer zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Analyse erfolgte nach Western-Blot mit dem Kaninchen-Antikörper gegen IML-3.

3.6. Bioinformatische Methoden

3.6.1. Sequenzanalyse

Zur Analyse der klonierten Sequenzen wurden verschiedene Datenverarbeitungsprogramme eingesetzt. Für die anfängliche Suche nach ähnlichen Sequenzen wurde das Programm "Blast" des Nationalen Gesundheitsinstituts der Vereinigten Staaten (National Institute of Health, NIH) genutzt [Altschul et al. 1990; Altschul et al. 1997].

Zur Übersetzung der cDNAs in Aminosäure-Sequenzen wurde das Programm "Open reading frame finder" (ORF finder) des NIH eingesetzt.

Alignments der klonierten Gene bzw. der hergeleiteten Aminosäure-Sequenzen erfolgten mit dem Programm "ClustalW" [Thompson et al. 1994].

Die Untersuchung der abgeleiteten Peptide auf mögliche Signalsequenzen erfolgte mit dem Programm "Signal P" [Nielsen et al. 1997].

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis und Reinigungsversuche LPS-bindender Proteine in der Hämolymphe von *M. sexta*

Zum Nachweis LPS-bindender Proteine in Hämozyten von *Manduca sexta* wurde eine Methode angewandt, die ursprünglich von Minetti und Mitarbeitern beschrieben worden war [Minetti et al. 1991]. Diese Methode war bereits von Klünner erfolgreich für den Nachweis LPS-bindender Proteine in Hämolymphe und Hämozyten von *Galleria mellonella* genutzt worden [Klünner 1994]. Hierzu wurde LPS an einer partikulären Matrix aus Agarose immobilisiert und im Folgenden als Affinitätssäule genutzt. Zur Unterscheidung der Proteine, die an das Trägermaterial banden, wurde Liganden-freie Agarose als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Zu Aliquots dieser zwei verschiedenen Materialien wurden Membranproteine, isoliert aus Hämozyten von *M. sexta*, gegeben. Die Versuche erfolgten im ‚Batch‘-Verfahren, da keine Informationen über mögliche Elutionsbedingungen vorlagen.

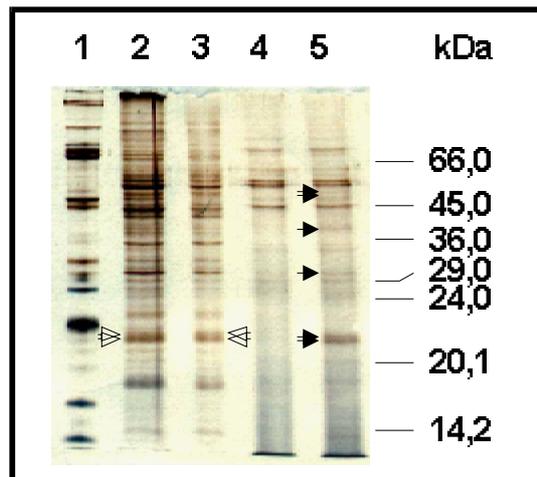


Abb. 6: Nachweis LPS-bindender Proteine in Hämozyten von *M. sexta*

Zum Nachweis LPS-bindender Proteine in Hämozyten von *M. sexta* wurden Proteine aus Hämozyten-Membranpräparationen extrahiert und im ‚Batch‘-Verfahren mit LPS-Agarose oder Liganden-freier Agarose (Negativ-Kontrolle) inkubiert. Die nach ausgiebigem Waschen an den Agarose-Partikeln verbliebenen Proteine wurden durch Denaturierung von der Agarose abgelöst und im SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung visualisiert. Bahn 1: Immunhämolymphe, Bahn 2: solubilisierte Membranproteine, Bahn 3: Überstand der Liganden-freien Matrix, Bahn 4: durch Denaturierung von Liganden-freien Partikeln abgelöste Proteine und Bahn 5: nach Denaturierung von LPS-Agarose eluierende Proteine. Einige differenziell bindende Proteine wurden durch gefüllte Pfeile hervorgehoben. Offene Pfeile markieren ein Banden-Paar, das sowohl in der Membranprotein-Präparation, dem Überstand der Kontroll-Agarose und an die LPS-Partikel bindend identifiziert werden konnte.

Nach einer Inkubationszeit erfolgten ausgiebige Waschschritte. Anschließend wurden noch gebundene Proteine von den Affinitätspartikeln durch Denaturierung mit SDS-Probenpuffer abgelöst. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung (Abb. 6).

Beim Vergleich der Bahnen 4 und 5 konnten sechs Banden identifiziert werden, die an die LPS-Partikel banden, in der Probe der Kontroll-Agarose jedoch nicht gefunden werden konnten. Besonders auffällig war eine Doppelbande bei 21 kDa, da diese auch eindeutig im Überstand der Kontrollmatrix (Bahn 3), also nicht an diese Kontroll-Partikel bindend, zu erkennen war. Außerdem konnten diese beiden Proteine auch in der Präparation der zur Adsorption eingesetzten Membranproteine (Bahn 2) eindeutig erkannt werden. Beide Proteine konnten auch bei Wiederholungsexperimenten mit neuen Protein-Präparationen aus Hämozyten-Membranen und mit neu hergestellter LPS-Agarose nachgewiesen werden. Diese beiden Proteine werden im Folgenden als P21 a und b bezeichnet, wobei P21 a der oberen Bande (21,5 kDa) und P21b der unteren Bande (20,5 kDa) zugeordnet wurde.

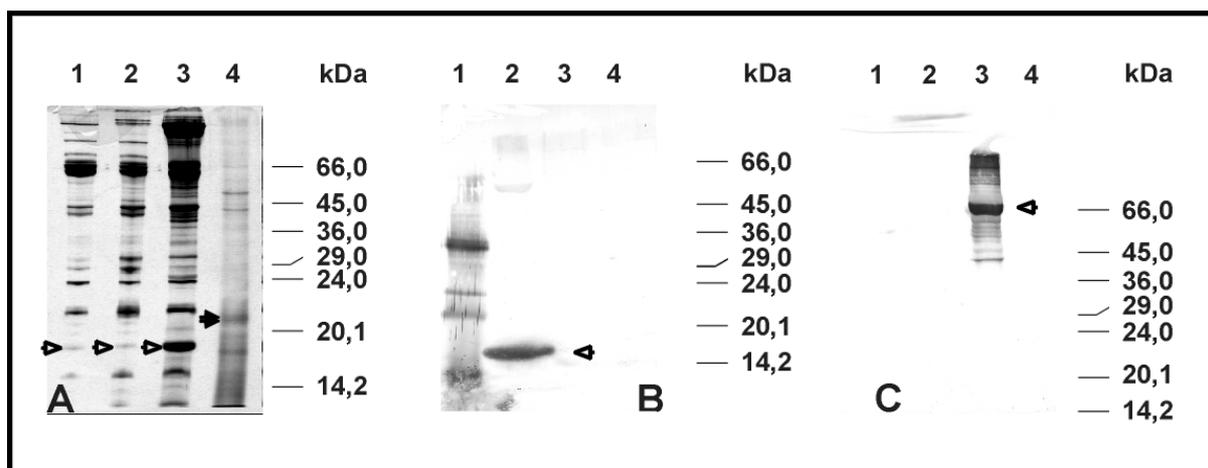


Abb. 7: Vergleich von P21 a und b mit Apo-Lipoprotein III und Lipophorin

Mittels LPS-Agarose bzw. Liganden-freier Agarose isolierte Membranproteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung oder Western-Blot mit Antiseren gegen bekannte LPS-bindende Proteine detektiert. **A:** Silber gefärbtes SDS-Gel. Bahn 1: Hämolymphe naiver Tiere, Bahn 2: Hämolymphe Bakterien-injizierter Tiere, Bahn 3: Hämolymphe adulter Tiere und Bahn 4: durch Denaturierung von LPS-Agarose eluierte Proteine. **B:** Western-Blot mit einem Antiserum gegen Apo III. Bahn 1: LPS, Bahn 2: Hämolymphe eines adulten Tieres (Positiv-Kontrolle für Apo III), Bahn 3: an Liganden-freie Säule bindende Proteine und Bahn 4: Proteine, die an die LPS-Agarose binden. **C:** Western-Blot mit einem Antiserum gegen Lipophorin. Bahn 1: Proteine, die an die LPS-Agarose binden, Bahn 2: an Liganden-freie Säule bindende Proteine, Bahn 3: Hämolymphe eines adulten Tieres und Bahn 4: LPS. P21 a und b sind durch gefüllte Pfeile hervorgehoben. Offene Pfeile markieren Apo III (B) bzw. Lipophorin Untereinheiten (C).

Zum Ausschluss der Möglichkeit, dass P21 a und b mit Apo-Lipoprotein III (Apo III) oder Lipophorin identisch sind, wurde in Western-Blots das Migrationsverhalten von Apo III mit dem Migrationsverhalten der beiden beobachteten Proteine verglichen.

Abb. 7B zeigt den Blot mit dem Antiserum gegen ApoIII und Abb. 7C zeigt den Blot mit dem Antikörper gegen Lipophorin. Die positive Reaktion auf dem Immunoblot B gegen LPS ist auf die Verwendung eines anti-ApoIII-Serums zurückzuführen. Das Serum enthält naturgemäß auch Antikörper gegen bakterielle Komponenten. Wie zu erkennen ist, wurde P21 a und b von keinem der verwendeten Antikörper erkannt. In Abb. 7A wurde außerdem getestet, ob P21 a und b auch in der Hämolymphe gelöst vorliegen, und ob experimentelle Infektionen einen Einfluß auf den Plasma-Gehalt der Proteine haben. Wie in Bahn 1 und 2 zu erkennen ist, konnten beide Proteine weder in der Hämolymphe von naiven Tieren noch in der Hämolymphe von Tieren nach einer experimentellen Infektion beobachtet werden.

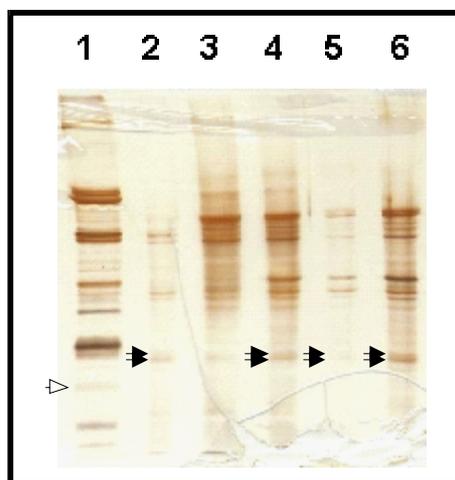


Abb. 8: Elutionsversuche zur Isolierung von P21 a und b

Zur Optimierung der Reinigung von P21 a und b wurden verschiedene Bedingungen zur Elution getestet. Zur Effizienz-Kontrolle erfolgte anschließend eine Ablösung durch Denaturierung der noch an LPS-Agarose anhaftenden Proteine und Analyse im SDS-Gel. Bahn 1: Immunhämolymphe, Bahn 2: Variation der Präparation der Membran-Proteine, Bahn 3: Negativ-Kontrolle, Bahn 4: Positiv-Kontrolle, Bahn 5: nach Elution mit Citrat-Puffer wurden noch an der LPS-Agarose anhaftende Proteine denaturiert und eluiert, Bahn 6: nach Elution mit Harnstoff wurden noch an der LPS-Agarose anhaftende Proteine denaturiert und eluiert. Gefüllte Pfeile zeigen P21 a und b, der offene Pfeil zeigt Apo III.

Zur Vorbereitung der Reinigung der Proteine für eine nachfolgende Sequenzierung wurden verschiedenen Elutionsbedingungen für eine später zu nutzende Säule getestet. Hierzu wurden Membranproteine wie beschrieben mit der Affinitätsmatrix inkubiert und gewaschen. Vor der abschließenden Denaturierung noch anhaftender Proteine erfolgten Waschschritte mit verschiedenen Substanzen. Zunächst wurde ein Konkurrenzexperiment mit freiem LPS durchgeführt. Dieses Experiment war nicht sehr aussagekräftig. Da auch LPS in der

Silberfärbung mit angefärbt wird, war der Hintergrund in den Gelen grundsätzlich sehr hoch, so dass eine Darstellung nicht möglich war. Jedoch entstand der Eindruck, dass freies LPS als Kompetitor nicht in der Lage war, die Bindung von P21 a und b mit den Affinitäts-Partikeln zu lösen. Aus diesem Grund wurde in folgenden Experimenten der Effekt von Citrat-Puffer und Harnstoff auf die Elution getestet. Die nach abschließender Denaturierung noch anhaftender Proteine erhaltenen Proben wurden zur Analyse elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 8).

In Bahn 1 wurde zum Größenvergleich Hämolymphe eines immunisierten Tieres aufgetragen. Bahn 3 zeigt eine Negativ-Kontrolle, Bahn 4 eine Positiv-Kontrolle. In Bahn 5 wurden durch Denaturierung abgelöste Proteine der mit Citrat-Puffer gewaschenen Säule aufgetragen und in Bahn 6 die vergleichbare Probe der Säule, die mit Harnstoff gewaschen wurde. P21 a und b verblieb sowohl an den LPS-Partikeln, die mit Citrat-Puffer gewaschen wurden wie auch an den mit Harnstoff Gewaschenen noch gebunden. Die Färbung der Proteine war in der Bahn mit dem Eluat des Citrat-Puffers schwächer als in der Bahn mit Harnstoff, dies ist offensichtlich auf eine insgesamt größere Verdünnung der Probe zurückzuführen, da dies auf alle Banden in etwa gleichem Umfang zutrifft. In Bahn 2 war außerdem noch eine Variation der Membranprotein-Präparation aufgetragen. Für diese Präparation wurden die Hämozyten vor der Extraktion der Proteine mit einer verdünnten Lösung (0,5%) von Triton-X-100 gewaschen und anschließend eingefroren. Durch die Anwesenheit von Detergenz während des Einfrierens sollten die Hämozyten zu einem großen Teil permeabilisiert sein, so dass auch ein Auswaschen von cytosolischen Proteinen möglich sein sollte. Dieser Schritt wurde im Weiteren nicht mehr angewandt, da damit keine zusätzliche Reinigung erzielt werden konnte.

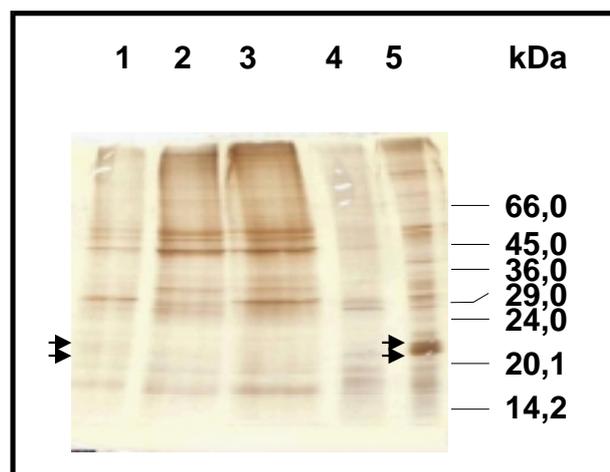


Abb. 9: Optimierung der Reinigung von P21 a und b

Zur weiteren Reinigung wurde der Effekt einer partiellen Ammoniumsulfat-Fällung auf die Reinigung von P21 a und b getestet. Anschließend wurde das aufkonzentrierte Proteingemisch zur Prä-Adsorption über eine Agarose-Säule gegeben. Bahn 1: 25%-ige Ammoniumsulfat-Fällung, Bahn 2: Durchfluss der Prä-Adsorption, Bahn 3: Durchfluss der Säule mit immobilisiertem LPS, Bahn 4: an der Prä-Adsorptionssäule bindende Proteine und Bahn 5: am immobilisiertem LPS bindende Proteine. P21 a und b wurden durch gefüllte Pfeile hervorgehoben.

Die in diesen Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse wurden nachfolgend zur Anreicherung von P21 a und b genutzt. In Abb. 9 ist ein Gel mit den so gewonnenen Proben dargestellt.

Als ein geeigneter Weg, einige verunreinigende Proteine abzureichern, erwies sich eine partielle Präzipitation mit 25% Ammoniumsulfat (Abb. 9, Bahn 1). Das so erhaltene Proteingemisch wurde dann zur Prä-Adsorption mit dem Matrixmaterial ligandenfreier Agarose inkubiert (Abb. 9, Bahn 2). Der Überstand dieser Inkubation wurde nachfolgend an die LPS-Agarose gebunden und gewaschen. Die bindenden Proteine wurden wie beschrieben eluiert. Da das erhaltene Volumen sehr groß war, wurde die Probe durch Vakuum-Zentrifugation konzentriert. Vor dem Blot für eine N-terminale Sequenzierung wurde der Erfolg dieser Reinigung mit einem Aliquot überprüft (Abb. 9, Bahn 5). Für Kontrollzwecke wurden auch der Durchfluss der LPS-Säule (Bahn 3) und die an die Prä-Adsorptions-Säule gebundenen Proteine (Bahn 4) auf das Gel aufgetragen.

4.2. Erstellung von Expressions-cDNA-Banken aus induziertem Fettkörper und induzierten Hämocyten

Zur Erstellung der cDNA-Expressionsbanken aus Fettkörper und Hämocyten wurden Larven von *M. sexta* (L5 D2) durch Injektion von 1×10^8 Formaldehyd-inaktivierten *E. coli* XL1 blue induziert. Die erhaltenen Gesamt-RNAs wurden in Northern-Blots auf die Qualität der Induktion und ihre Integrität überprüft.

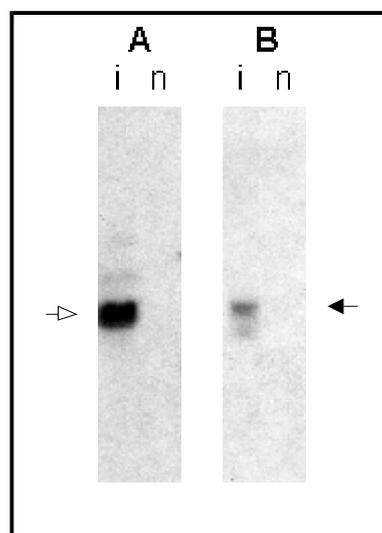


Abb. 10: Induktionskontrolle der isolierten RNA

Zur Verifizierung der gelungenen Induktion wurde die gereinigte RNA im Northern-Blot mit Sonden gegen **A**: Hemolin (Hämocyten-RNA, offener Pfeil) und **B**: Immunolektin-1 (Fettkörper-RNA, schwarzer Pfeil) hybridisiert. Diese RNAs waren in naivem Gewebe (**n**) nur äußerst schwach detektierbar. In RNA aus induziertem (**i**) Gewebe markierten die eingesetzten Sonden deutlich.

Hierzu wurde der Northern-Blot der Fettkörper-RNA mit einer für Immunolektin-1 spezifischen Sonde [Yu et al. 1999], der Blot mit der Hämozyten-RNA mit einer für Hemolin spezifischen Sonde [Ladendorff et al. 1990] hybridisiert. Immunolektin-1 wird in naivem Fettkörpergewebe nicht exprimiert. Hemolin wird in naiven Hämozyten nur sehr schwach über die Nachweisgrenze hinaus exprimiert. In Abb. 10 ist das Ergebnis der Blots gezeigt. Die Fettkörper-RNA zeigte eine deutliche Bande des Immunolektins-1. Desweiteren konnten auf dem Blot noch zwei weitere schwach hybridisierende RNAs nachgewiesen werden (Abb. 10A). Auch der Blot mit der Hämozyten-RNA zeigte eine gelungene Induktion einer Immunantwort (Abb. 10B). Die Bande des Hemolins war hier deutlich zu erkennen. Beide RNA-Präparationen zeigten nur eine sehr schwache Degradation der RNA. Mittels einer Oligo-dT-Säule erfolgte die Aufreinigung der für die cDNA-Synthese eingesetzten mRNA. Die so aufgereinigte mRNA wurde für die Synthese der cDNA entsprechend den Angaben von Stratagene eingesetzt. Im Kontrollgel zeigte sich, dass nach der Synthese des komplementären Stranges überwiegend verkürzte cDNAs nachweisbar waren. Möglich wäre, dass sich während der Synthese des zweiten Stranges der cDNA *Hair-pin*-Strukturen ausgebildet hatten, die zu einem Abbruch der Synthese führten. Aus diesem Grund wurde die Reaktionstemperatur für die Synthese des zweiten Stranges der cDNA im Wiederholungsexperiment herabgesetzt (10-12°C) und die Reaktionszeit verlängert (16 h).

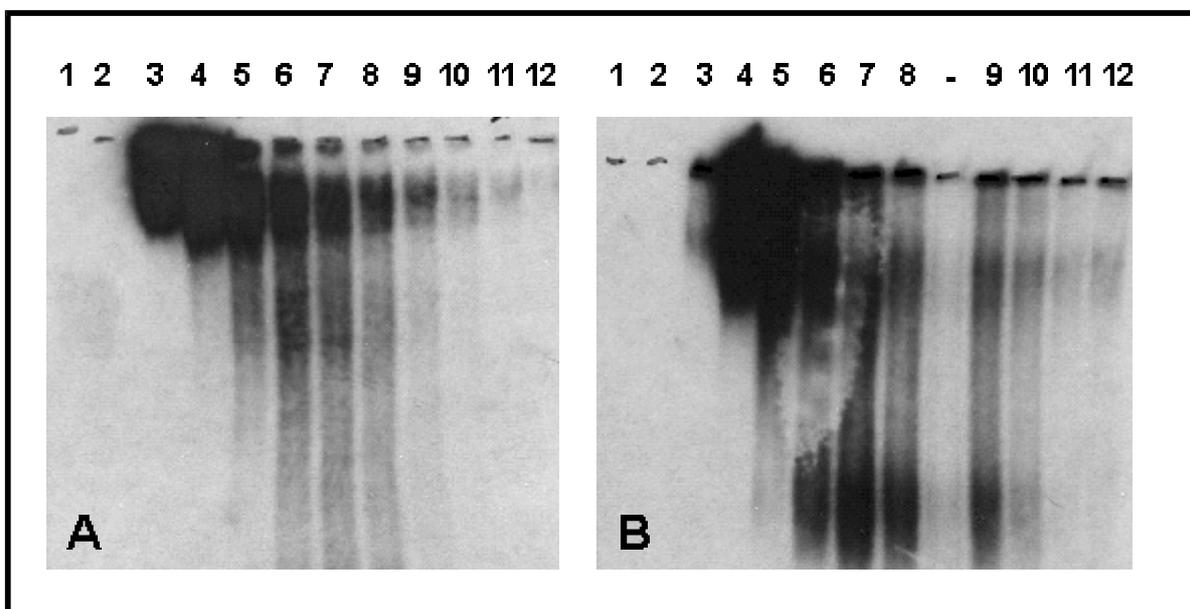


Abb. 11: Größenfraktionierung der cDNA

Für die Erstellung der Expressionsbibliotheken sollten nur möglichst große cDNAs eingesetzt werden. Zur Auswahl der Fraktionen mit möglichst großen cDNAs wurde daher eine nicht-denaturierende Acrylamid-Elektrophorese der größenfraktionierten cDNAs durchgeführt. **A:** Autoradiogramm von größenfraktionierten cDNAs aus Fettkörper-RNA. **B:** Autoradiogramm größenfraktionierter cDNAs aus Hämozyten-RNA.

Diese Veränderungen führten zu der erwarteten Größenverteilung der cDNAs. Nachfolgend wurden die cDNAs für die Ligation in den Vektor vorbereitet. Für diese Ligation wurde jeweils nur die Fraktion mit den längsten cDNAs eingesetzt (Abb. 11). Für die Fettkörper-Expressionsbibliothek fiel die Wahl auf Fraktion 3. Im Falle der Hämozyten-Expressionsbibliothek wurde die weitere Erstellung mit der Fraktion 4 durchgeführt.

Die ausgewählten Fraktionen wurden quantifiziert. Die *in-vitro* Verpackung in infektiöse Phagenpartikel erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Zur Ermittlung des Umfangs wurden die Bibliotheken titriert. Anschließend erfolgte die Amplifikation und erneute Titration der Expressionsbanken. Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der Daten.

Tabelle 3:

Charakteristika der erstellten Expressionsbanken aus induziertem Fettkörper und induzierten Hämozyten.

	Fettkörper-Bibliothek	Hämozyten-Bibliothek
Induktionszeit:	24-25 h	15-16 h
Eingesetzte Menge mRNA	5,0 µg	5,0 µg
Für Ligation eingesetzte Fraktion:	3	4
Umfang der Bibliothek (Anzahl unabhängiger Klone)	7×10^5 PFU/100 ng cDNA	2×10^6 PFU/100 ng cDNA
Titer nach Amplifikation	2×10^9 PFU/ml	$9,5 \times 10^9$ PFU/ml

4.2.1. Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone

Um die Qualität der erstellten Expressionsbibliotheken zu überprüfen, wurde ein Aliquot beider Expressionsbanken durch Massenexzision in eine Plasmid-Bibliothek überführt. Anschließend wurden nach dem Zufallsprinzip aus der Fettkörper-Bibliothek 12 Klone und aus der Hämozyten-Bibliothek 14 Klone ausgewählt. Nach der Präparation der Plasmide wurden diese mittels XhoI und EcoRI verdaut, um die Größen der enthaltenen cDNAs zu überprüfen (Abb. 12).

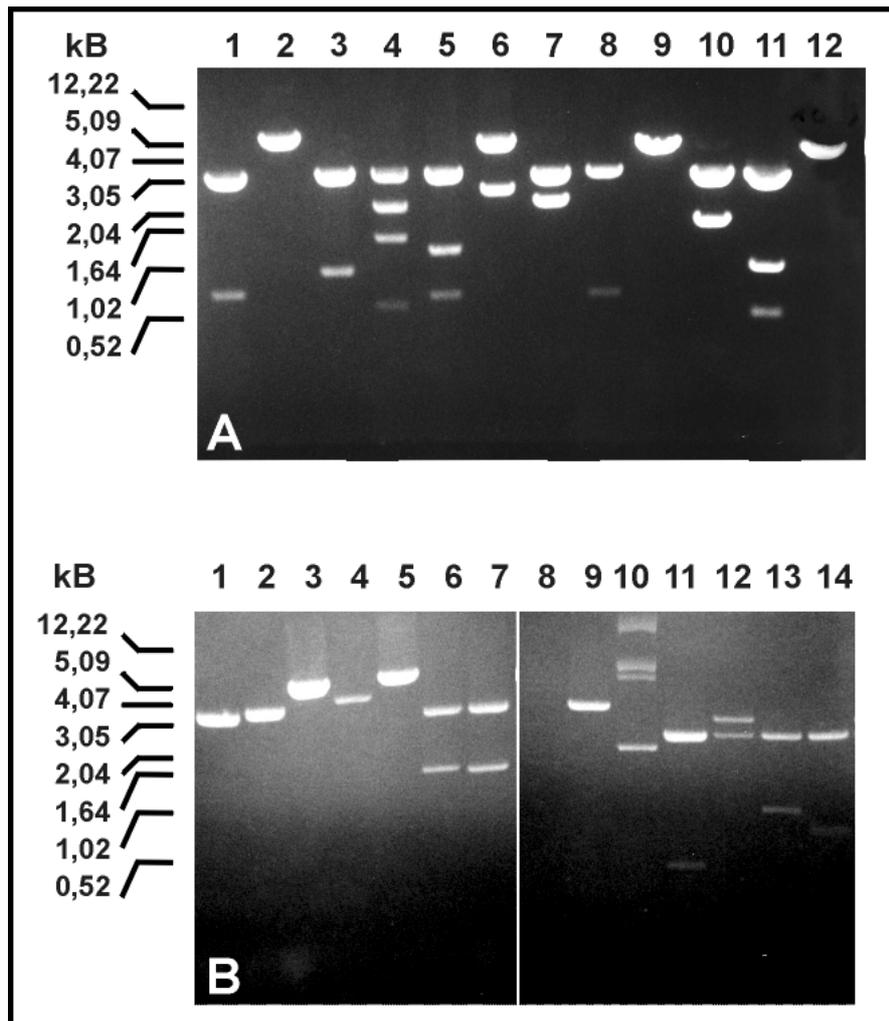


Abb. 12: Restriktionsverdau der nach dem Zufallsprinzip für die spätere Sequenzierung isolierten Klone

Zur Kontrolle der hergestellten Bibliotheken wurden aus der Fettkörper-Bibliothek (A) die Plasmide von 12 Klonen und aus der Hämocyten-Expressionsbank (B) die Plasmide von 14 Klonen isoliert. Die DNA der Plasmide wurde mittels EcoRI und XhoI verdaut und zur Ermittlung der Größe der enthaltenen cDNAs im Agarose-Gel aufgetrennt.

Die Auftrennung der erhaltenen Restriktionsfragmente ergab bei den aus der Fettkörper-Bank isolierten Klonen 2, 9 und 12 das Fehlen von Restriktionsschnittstellen. Diese Beobachtung wurde auch bei den Klonen 1 bis 5 und 9 der Hämocyten-Bibliothek gemacht. Bei diesen Plasmiden traten zusätzlich noch weitere Besonderheiten auf: die Klone 1 und 2 enthielten vermutlich nur extrem kurze cDNAs. Der Klon 10 enthielt keine Restriktionsschnittstelle der verwendeten Enzyme. Auf dem Gel waren zwar mehrere Banden zu erkennen, diese waren aber identisch mit den Banden des unverdauten Plasmids, und sind daher auf unterschiedliche Konformationen der Plasmid-DNA (entspannt, superspiralisiert) zurückzuführen. Der Klon 8 hatte erst verspätet die blaue Färbung für die Selektion entwickelt. Aufgrund dieser Unregelmäßigkeiten wurden die Klone 1, 2, 8 und 10 nicht zur Sequenzierung ausgewählt. Im Fall der Fettkörper-Bibliothek wurde auf die Sequenzierung der Klone 8 und 12 verzichtet.

Die übrigen jeweils 10 Plasmide wurden ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST2-Programms nach Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen in der Genbank des Nationalen Gesundheitsinstituts der USA (National Institute of Health, NIH) untersucht. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tabelle 4:

Zusammenfassung der nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Klone zur Kontrolle der Qualität der Expressionsbanken. In **Teil A** sind die Ergebnisse aus der Fettkörper-Expressionsbank dargestellt. IFb 1-7 und 9-11 (*induced fatbody*, induzierter Fettkörper) stellt die ursprüngliche Bezeichnung der verschiedenen Klone dar. **Teil B** zeigt die Ergebnisse aus der Hämocyten-Expressionsbank. IHc 3-7, 9 und 11-14 (*induced hemocytes*, induzierte Hämocyten) ist die ursprüngliche Bezeichnung der verschiedenen Klone.

A					
	Neue Bezeichnung	Größe des Inserts	Ähnlich zu	Besonderheiten	Genbank Accession-Nr.
IFb-1	---	~ 0.7 kB	Cytochrom C-Oxidase Va	Startcodon vorhanden	AF060794
IFb-2	Immunolektin-3 (IML-3)	~ 2.0 kB	Versch. Insektenlektine mit Tandem CRD	Unvollständig, Startcodon fehlt	---
IFb-3	---	~ 0.9 kB	Lysozym	Volle Länge	---
IFb-4	---	~ 4.0 kB	RCA-1	Nicht bestimmt	---
IFb-5	Fettkörper-Protease 1 (FP)	~ 1.9 kB	Hämocyten-Protease-2	Volle Länge	---
IFb-6	---	~ 4.0 kB	Tyrosin-Kinase FPS	Volle Länge	---
IFb-7	---	~ 2.0 kB	Juvenilhormon Esterase	Volle Länge	AF060795
IFb-9	---	~ 1.0 kB	Multifunktionelles Protein ADE2	Startcodon vorhanden	AF060796
IFb-10	HAIP	~ 1.6 kB	47 kDa-Glykoprotein IDGF 1-4	Volle Länge	---
IFb-11	---	~ 1.6 kB	β-Alanin-Synthase	Startcodon fehlt	AF060797

B					
	Neue Bezeichnung	Größe des Inserts	Ähnlich zu	Besonderheiten	Genbank Accession-Nr.
IHc-3	---	~1,0 kB	NADH-Dehydrogenase	Startcodon vorhanden	AF091036
IHc-4	---	~0,9kB	Lysozym	Volle Länge	
IHc-5	---	~1,1 kB	keine Ähnlichkeiten	Nicht bestimmt.	
IHc-6	---	~1,6 kB	GAG, ORF1	Nicht bestimmt.	AF091037
IHc-7	<i>M. sexta</i> - Hemocytin (MsHc)	~1,6 kB	Hemocytin (<i>B. mori</i>) Hemolectin (<i>D. melanogaster</i>) von Willebrand-Faktor	Kurzes Fragment, enthält Poly-A- Bereich	
IHc-9	---	~2,0 kB	60S-Ribosomales Protein XL1a	Volle Länge	AF091038
IHc-11	---	~0,7 kB	keine Ähnlichkeiten	Nicht bestimmt.	
IHc-12	---	~3,0kB	Nicht-funktionelles Folat-Bindungsprotein	Startcodon vorhanden	AF091041
IHc-13	---	~1,4 kB	Tubulin α	Volle Länge	AF091039
IHc-14	---	~1,2 kB	ORF2, POL	Nicht bestimmt.	AF091040

Die Ergebnisse des Vergleichs der erhaltenen Sequenzen mit der NIH-Genbank einiger ansequenzierter Klone legte die Vermutung nahe, dass die von diesen cDNAs kodierten Proteine eine Bedeutung für die Hämocytenaktivierung nach Infektionen besitzen könnten. Um diese Klone näher zu charakterisieren, wurde die vollständige Sequenz der **Fettkörper-Protease-1** (FP-1), des **Immunolektin-3** (IML-3), des **Hämocyten-Aggregation-Inhibierenden-Proteins** (HAIP) und des *M. sexta* **Hemocytins** (MsHc) ermittelt.

4.2.2. Sequenz-Analyse der Fettkörper-Protease-1 (FP-1)

Die weitere Analyse der verschiedenen Klone zeigte, dass nur für FP-1 und HAIP die komplette kodierende Sequenz in den isolierten cDNAs enthalten war. Die Sequenzierstrategie zum Erhalt der vollständigen Sequenz der FP-1 ist in Abb. 13 dargestellt.

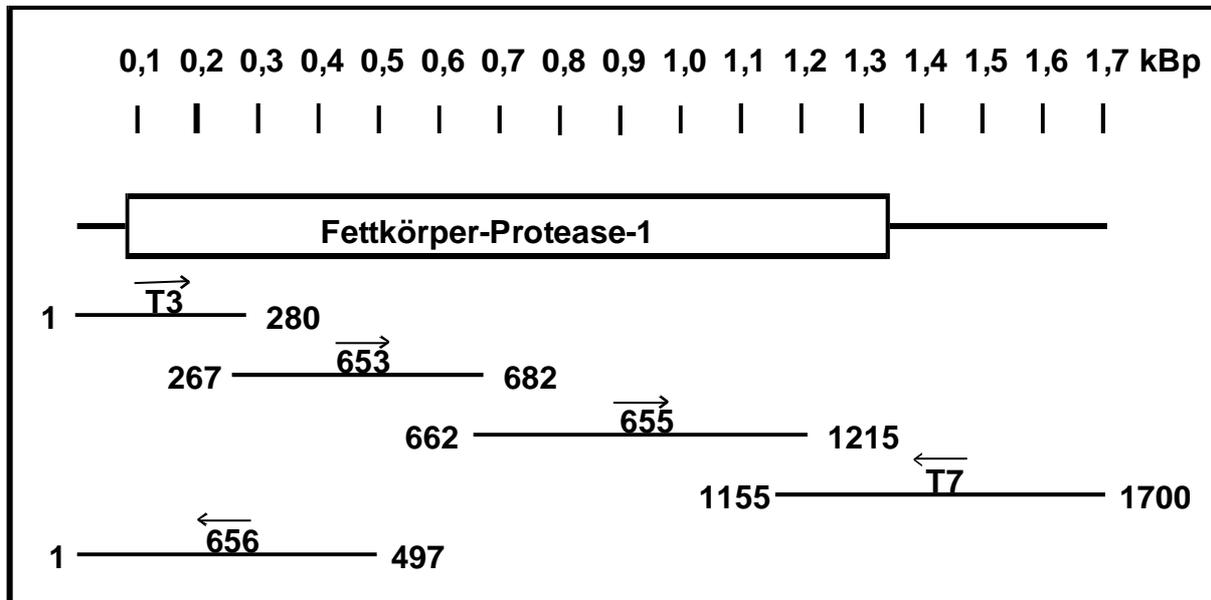


Abb. 13: Strategie zur Sequenzierung der FP-1

Zur Ermittlung der vollständigen Sequenz der FP-1 wurden neben den vektorinternen Primern, T3 und T7, drei zusätzliche Primer P653, P655 und P656 synthetisiert. Die Leserichtung der Primer ist über deren Namen durch einen Pfeil symbolisiert. Der kodierende Bereich der cDNA ist als Kasten dargestellt, der nicht kodierende Bereich ist durch einen einfachen Strich symbolisiert.

Die vollständige Sequenz von FP-1, mit der hergeleiteten Aminosäure-Zusammensetzung, ist in Abb. 14 dargestellt. Die gesamte cDNA umfasst 1700 Nukleotide. Der kodierende Bereich startet mit Nukleotid 81. Das Stoppcodon beginnt mit Nukleotid 1340. Ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) befindet sich an Position 1584-1589. Die cDNA kodiert für ein Polypeptid von 413 Aminosäuren und enthält ein 16 Aminosäuren umfassendes potentiell Signalpeptid (berechnet mit Signal-P). Das reife Protein beginnt daher mit A-17. Mehrere mögliche N-Glykosilierungsmotive (N-X-S/T) konnten in der Sequenz der FP-1 identifiziert werden. FP-1 gehört zu der Familie der CLIP-Domänen Proteasen. Die Spaltungsstelle zwischen der CLIP-Domäne und der aktiven Protease liegt hinter L-168. In CLIP-Domänen Proteasen wird die katalytische Aktivität durch eine so genannte katalytische Triade hervorgerufen. In FP-1 wird diese katalytische Triade aus den Aminosäuren H-213, D-261 und S-361 gebildet.

1		ga	
3	acaatg	tattgattgtgttttaacgtgttttaacgggcag	tatttgg
63	agagg	tcaagtagataaaaaatgcttcgggaagtg	tgttgggtgcattgtgcattgtcgtg
		<u>M L R E V L L V A L C I V V</u>	14
123	agagcagctg	atgagaatgaaacatgtaatatgaaaaatggagaag	tgcggaatatgtaaa
	<u>R A A D E N E T</u>	C N M K N G E V G I C K	34
183	aatatccg	aaactgtccgtcagcactcgaaaacctaagaaagc	gtatacaaccacagcta
	N I R N C P S A L E N L R K R I Q P Q L		54
243	tgtggattc	gacaagtctgatcccattgtctgttgtgtggagag	cgttaccacgccggcg
	C G F D K S D P I V C C V E S V T T P A		74
303	cctacgcagc	ctcccactcgccactaccaccaaactcgcgaggtg	acaacgacgacagag
	P T Q P P I A T T T K R P Q V T T T T E		94
363	tacgagcc	ccccctgtatgagtacgagacggtagaccgtcaag	gctccggctgtccacc
	Y E P P L Y E Y E T V D R Q G S G C P P		114
423	attgatgcca	acttgacttcgccgaaaataggacggaaagcatggg	acaaatgtttggag
	I D A N L T S P K I G R K A W D K C L E		134
483	taccaggaga	actagtatatccttgcgagaagccttctctcttag	tttaaatgacgct
	Y Q E K L V Y P C E K S F S L S L N D A		154
543	atgaaagg	aaagtcaagtgccataataatgcagatgatcttatt	tattggagggcagaat
	M E R K V K C H N N A D D L I I G G Q N		174
		*	
603	gcatcaaga	aaacgaatctcctcacatggcgctgctcggttac	ggagaggagccggacgtg
	<u>A S R N E F P H M A L L G Y G E E P D V</u>		194
663	cagtgggt	tgtgtggggaactcttatcagcgaacttctc	acagccggccattgc
	Q W L C G G T L I S E N F I L T A G H C		214
		1	
723	atatcaagc	agagacattaatttaacgtatgtgtatttgggag	ccttagcgaggagcgaa
	I S S R D I N L T Y V Y L G A L A R S E		234
783	gtcacagac	cccttcgaaacagtacaggattaaaaagatccaca	aacacccagagtttgca
	V T D P S K Q Y R I K K I H K H P E F A		254
843	ccgccagt	gagatacaacgacatcgcgcttgtggagttagag	aggaatgtaccattggac
	P P V R Y N D I A L V E L E R N V P L D		274
		*	
903	gagtgggt	tgaagccagcgtgcctgcacatgggcgacgagacc	gcagacgacagagtg
	E W L K P A C L H M G D E T A D D R V W		294
963	gcgacggg	ctgggactcaccgaatataaagcatcgtcgggcg	ctaactactgcagaag
	A T G W G L T E Y K A S S G A N I L Q K		314
1023	gtggatta	aaacaagtctctacattcgaatgtatactgcagt	atccgccgcacaggctg
	V V L N K F S T F E C I L Q Y P P H R L		334
		2	
1083	atgagtca	aggggttgacgtgaattcgcagatgtgctacggg	gacaggagtcagtctaaa
	M S Q G F D V N S Q M C Y G D R S Q S K		354
		2	
1143	gatacttg	ccagggtgacagcggcggcccttgcagattaaac	acaagaagatcaactgc
	D T C Q G D S G G P L Q I K H K K I N C		374
		3	
1203	atgtgggt	aattatcgggtgacgtcgttcggtaaagccttgc	gggttcacgcgagccg
	M W L I I G V T S F G K A C G F I G E P		394
		3	
1263	ggaatata	cactaaggtgtcacattatataccctggataga	aaagtgtcgtgtggccttag
	G I Y T K V T S H Y I P W I E S V V P -		413
1343	aagactgac	gggatctttgtaacgttcagaaaatagactgata	aaagggttttcatttaatat
1403	gatgtcgg	gtgacagggcaagctagttcctcgtgagaaaagg	aaacgtgataactaaaat
1463	ttctcgata	aattcttgttttacttgttttattataatagta	catttatcctgtgtctta
1523	aatagga	atatttgcctatatggaatgcatgattaatgtg	aaatatacaactttaataga
1583	gaataaa	attacttttaataactgaaatcctcatgtttct	tttaagtatattttattgtaataa
1643	atataat	cgaaagtataattcaacattttattttttata	aattttacaaaaaaaaa

Abb. 14: Sequenz der cDNA der FP-1 und der daraus abgeleiteten Aminosäure-Sequenz
Das potentielle Signalpeptid ist doppelt unterstrichen. Mehrere mögliche N-Glykosilierungsmotive sind unterstrichen. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind mit 'S' gekennzeichnet. Die Aminosäure vor der Aktivierungsspaltstelle ist mit * markiert. In der cDNA-Sequenz ist das Polyadenylierungssignal (AATAAA) unterstrichen. Sechs konservierte Cysteine sind durch Ziffern (1 bis 3) hervorgehoben.

Mehrere Proteasen mit einer Clip-Domäne sind bisher kloniert worden. Ein Alignment der katalytischen Domäne der FP-1 mit einigen bekannten Sequenzen anderer Clip-Domänen Proteasen, beginnend mit der letzten Aminosäure vor der Aktivierungsschnittstelle, ist in Abb. 15 dargestellt.

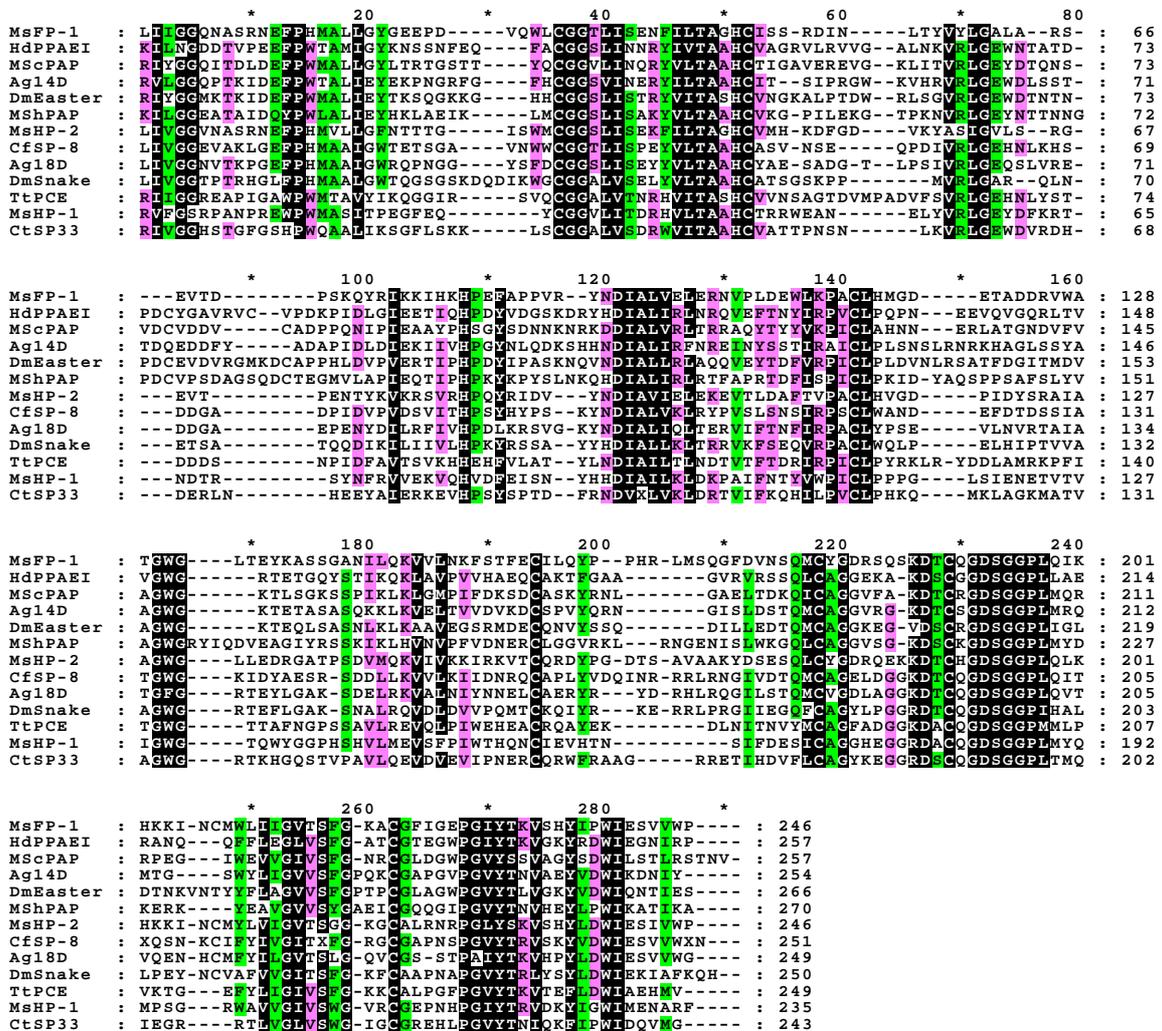


Abb. 15: Alignment der katalytischen Domäne von FP-1 mit Clip-Domänen Proteasen verschiedener Arthropoden

Zu 90% konservierte Aminosäuren wurden schwarz unterlegt, zu 80% konservierte Bereiche wurden grün markierte und zu 60% konservierte Positionen wurden violett hervorgehoben. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind in dieser Abbildung an den Positionen 51, 121 und 233. Das Alignment der FP-1 von *M. sexta* (MsFP-1) wurde mit den Sequenzen des Prophenoloxidase aktivierenden Enzyms I von *Holotrichia diomphalia* (HdPPAEI), der Phenoloxidase aktivierenden Protease aus Kutikula (MscPAP) und Hämolymphe (MshPAP) von *M. sexta*, der Serin-Protease 14D (Ag14D) und 18D (Ag18D) aus *Anopheles gambia*, der Proteasen Easter (DmEaster) und Snake (DmSnake) aus *Drosophila melanogaster*, der Hämozyten Protease-1 (MsHP-1) und -2 (MsHP-2) aus *M. sexta*, der Serin-Protease SP-8 (CfSP-8) und SP-33 (CtSP33) aus *Ctenocephalides felis* und dem Proclotting Enzym aus *Tachypleus tridentatus* (TtPCE) durchgeführt.

Für das Alignment wurden die Sequenzen des Prophenoloxidase aktivierenden Enzyms I von *Holotrichia diomphalia* (HdPPAEI) [Lee et al. 1998], der Phenoloxidase aktivierende Protease aus Kutikula (MscPAP) [Jiang et al. 1998] und Hämolymphe (MshPAP, persönliche Mitteilung Prof. H. Jiang, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA) von *M. sexta*, der Serin-Protease 14D (Ag14D) [Paskewitz et al. 1999] und 18D (Ag18D) [Gorman et al. 2000] aus *Anopheles gambia*, der Proteasen Easter (DmEaster) [Chasan et al. 1989] und Snake (DmSnake) [Delotto et al. 1986] aus *D. melanogaster*, der Hämocyten Protease-1 (MsHP-1) und -2 (MsHP-2) [Jiang et al. 1999] aus *M. sexta*, der Serin-Protease SP-8 (CfSP-8) und SP-33 (CfSP33) [Gaines et al. 1999] aus *Ctenocephalides felis* und dem *Proclotting* Enzym aus *Tachypleus tridentatus* (TtPCE) [Muta et al. 1990] genutzt. Insgesamt zeigen die Sequenzen von verschiedenen Clip-Domänen eine recht hohe Variabilität, die Identität betrug zwischen 20% und 45%. Sechs Cysteine sind jedoch streng konserviert. Diese sind in Abb 14 durch Nummerierung hervorgehoben. In allen dargestellten Proteasen ist außerdem die katalytische Triade vollständig konserviert. Aufgrund des Serins im aktiven Zentrum gehören alle dargestellten Proteasen zur Familie der Serin-Proteasen.

4.2.3. Sequenz-Analyse des Hämozyten-Aggregation-Inhibierenden-Proteins (HAIP)

Neben der FP-1, war auch die cDNA des HAIP bereits vollständig im ursprünglich isolierten Plasmid enthalten. Die Strategie zur vollständigen Sequenzierung dieser cDNA ist in Abb. 16 dargestellt.

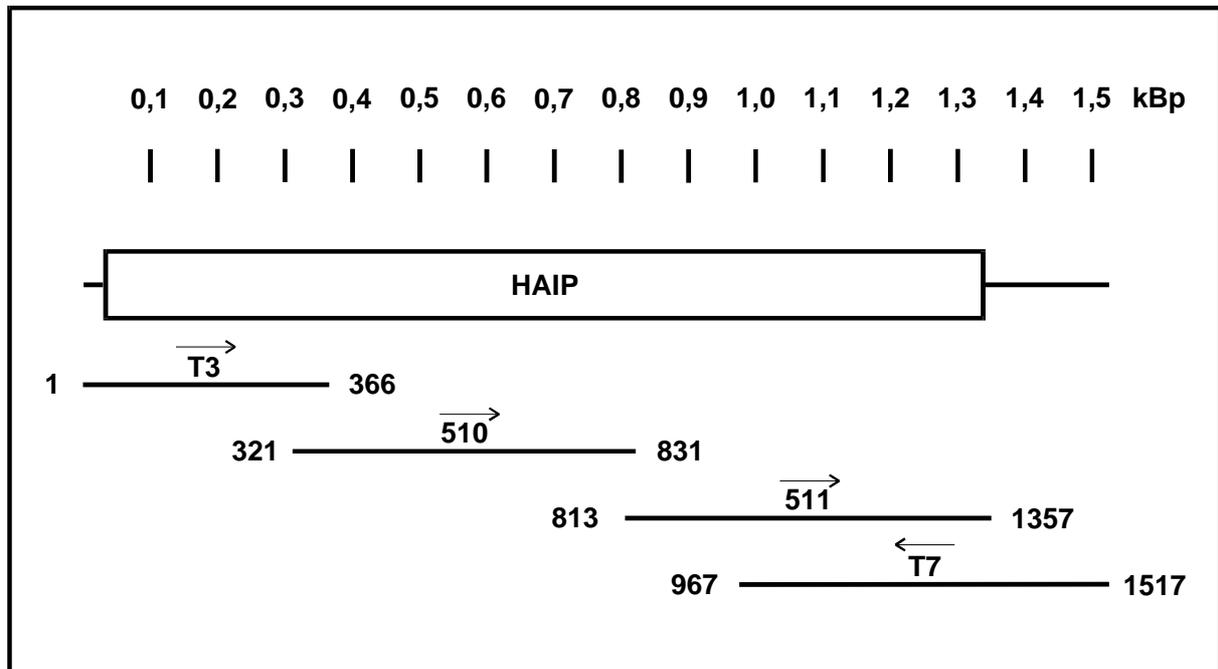


Abb. 16: Strategie zur Sequenzierung des HAIP

Zur Ermittlung der vollständigen Sequenz des HAIP wurden neben den vektorinternen Primern, T3 und T7, zwei zusätzliche Primer P510 und P511 synthetisiert. Die Leserichtung der Primer ist über deren Namen durch einen Pfeil symbolisiert. Der kodierende Bereich der cDNA ist als Kasten dargestellt, der nicht kodierende Bereich ist durch einen einfachen Strich symbolisiert.

Die komplette cDNA-Sequenz des HAIP ist in Abb. 17 dargestellt. Die cDNA umfasst 1517 Nukleotide. Das Startcodon beginnt mit Nukleotid 29. Das Stoppcodon beginnt mit Nukleotid 1331. Ein Polyadenylierungssignal befindet sich an Position 1501-1506. Die cDNA kodiert für ein Polypeptid mit einer abgeleiteten Sequenz von 434 Aminosäuren, einschließlich eines Signalpeptids von 16 Aminosäuren. Das reife Protein beginnt mit T-17. Dieser Start wurde durch Edman-Abbau bestätigt. Ein mögliches N-Glykosilierungsmotiv (N-X-S/T) konnte beginnend mit N-220 identifiziert werden.

	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150		160	170	180	190	200	210	220	230	240	250																																														
HAI P	MDLDPALSF	CTHLLVGY	AGIQPDTYK	MVPLNENLDV	DRAHANYRAIT	NFKTKYPGL	KVLLSVGGD	ADTEEA-----	QKYNLLLESP	-QARTAFVNSGV																																																									
Dm47kD	DELEPALQF	CDYLVVGY	AGIERDSHKAV	SLNQQLDLDL	GGKLYRTVTRL	KRKYPNVKI	LLSVGGD	KDIELDKDAKEL	PNKYLELLESP	-TGRTRFVNTVY																																																									
IDGF-4	TDLEPALQY	CTHLLVGY	AGINPSSNKL	VSNNNEKPD	LDLGGSLFRQ	VTLGRKYPAL	KVLLSVGGD	KDVTDPEN----	NKYLTLESS	-NARIPFINSAH																																																									
IDGF-2	PDLEIALQF	CSHLVGY	AGLRGENLQ	AYSME--NLD	IYKHQFSEV	TSLKRKYPHL	KVLLSVGGD	HDIIDPDH----	PNKYIDLLE	GEKVRQIGFIR	SAY																																																								
IDGF-1	NELDLALQF	CTHLLVGY	AGLKSGLTE	LFLSLNV--	DLMF--YK	DITALRQK	FPQLKILL	SVGGDRD	VDEAH----	PNKYVELLE	ANRTAQQNF	DSSM																																																							
IDGF-3	IDIELALQF	CTHLLVGY	AGVNADNY	EMQSINK--	RLDLEQR	HLAQAITS	SMKERYPHI	KFLLSVGGD	ADTNEG-----	NQYIKLLES	GGQGHRRF	IESAR																																																							
ECF-L	GNIDPCL--	CTHLLIYAF	AGMQ--NNE	IITYTHEQ--	DL--RD	YEALNGL	KDKNTE	KTLLAIGG	WKFGP-----	ASFSAMV	STP-QNRQ	IFIQSVI																																																							
MsChi	EDIPVEK--	CTHLLIYSF	IGVTEGN	SEVLII	DEPELD	VDK--NG	FRNFTSL	RSSHPS	KFMVAVGG	WAEGS-----	SKYSHM	VQAQK	-STRMS	FIRSVV																																																					
HAI P	LLAEQHG	FDGLDLAWQ	FPRIKPKK	VSRVTS	GIWHG	IKKTF-G	TFVDDKEA	EHREG	F	TALVRELK	QALNVK	PNMQ	LAVTVL	PNVNAS	IYYD	VPAI	INLVD																																																		
Dm47kD	SLVKTYG	FDGLDVAWQ	FPKNKPKK	VHSGI	GNLWK	GFKK	VFSGDS	I	VEKSEEHKE	QFTALL	LRDV	KNAFR	-PDN	LLLST	T	VL	PNVNS	SLFYD	I	PAVV	NYLD																																														
IDGF-4	SLVKTYG	FDGLDLGWQ	FPKNKPKK	VHSGI	GNLWK	GFKK	IFSG	DHL	VEKAE	EHKEA	F	TALVRELK	NAFR	-PDG	YIL	GLSVL	PNVNS	SLFF	D	VPAI	INLND																																														
IDGF-2	ELVKTYG	FDGLDLAYQ	FPKNKPRK	VHGD	LGLAWK	S	IKKL	LFT	GDF	I	VD	PHAAL	HKEQ	F	TALV	RDV	K	DSL	R	-ADG	F	LLS	LT	VL	PNVNS	TWY	F	D	I	P	AL	N	GL	V	D																																
IDGF-1	ILLKRNG	FDGLDLAFQ	LPRNKPRK	VHGS	LSY	WKS	F	KKL	LFT	G	D	V	VD	Q	A	E	Q	H	S	Q	F	T	D	L	V	G	N	I	K	N	A	F	R	-S	A	N	L	M	L	S	L	T	V	L	P	N	V	N	S	T	W	Y	F	D	V	P	K	L	H	P	Q	F					
IDGF-3	DLVRRYN	FDGLDLALQ	LPRNKPRK	VHGD	VGS	AWK	S	F	K	K	L	F	T	G	D	F	I	V	T	E	S	E	T	H	K	Q	V	T	A	L	I	K	D	L	S	A	A	L	K	-Q	N	D	L	L	L	S	L	T	V	L	P	N	V	N	S	S	W	Y	D	A	P	S	I	A	P	S	L
ECF-L	RFLRQYN	FDGLNDWQ	YP-----	GS--	R	G	S	P	K	D	K	H	L	F	S	V	L	V	K	E	M	R	K	A	F	E	E	S	V	E	K	D	I	P	R	L	L	T	S	T	G	A	I	I	D	V	I	K	S	G	-Y	K	I	P	E	L	S	Q	S	L							
MsChi	SFLKKYD	FDGLDLDW	YYP-----	GA	A	R	G	G	S	F	S	D	K	D	K	F	L	V	Q	E	L	R	R	A	F	I	R	V	G	K	G	W	E	L	T	A	A	V	P	L	A	N	F	R	-L	M	E	G	-Y	H	V	P	E	L	C	Q	E	L									

Abb. 18: Alignment der Domänen 2 bis 4 von HAI P mit Chitinase-ähnlichen Wachstumsfaktoren und Chitinase von *M. sexta* (MsChi)

In der katalytischen Region von Chitinasen zeigen vier Domänen eine hohe Konservierung. Dargestellt ist das Alignment der Domänen 2 bis 4 (farbig hervorgehoben) der katalytischen Region von HAI P mit verschiedenen Proteinen. Besondere Bedeutung kommt dem Austausch der Glutaminsäure (E, grün) in Domäne 4 von funktionsfähigen Chitinasen (hier repräsentiert durch MsChi) in ein Glutamin (Q, rot) zu. Durch diesen Austausch wird die hydrolytische Aktivität eliminiert. Die angegebenen Proteine sind unter folgenden Nummern in der NIH-Genbank registriert: U13825 (Dm47kD, sekretorisches Glykoprotein), AF102239 (IDGF4, imaginal disk growth factor 4), AF102237 (IDGF2, imaginal disk growth factor 2), AF102236 (IDGF1, imaginal disk growth factor 1), AF102238 (IDGF3, imaginal disk growth factor 3), D87757 (ECF-L, eosinophiles chemotaktisches Cytokin) und U02270 (MsChi, *M. sexta* Chitinase).

HAIP zeigt dabei, wie auch alle Chitinase-ähnlichen Wachstumsfaktoren mit Ausnahme des ECF-L, einen Austausch des Phenylalanins in Domäne 2 gegen ein Tyrosin. Die gleichen Proteine zeigen in der Domäne 3 einen Austausch des Tryptophans in eine Asparaginsäure und in Domäne 4 einen Austausch von Glutaminsäure in Glutamin. Die Familie der Imaginalscheiben-Wachstumsfaktoren (IDGF, *Imaginal disk growth factor*), zu der auch das 47 kD sekretorische Glykoprotein gerechnet wird, zeigte insgesamt eine Identität zwischen 51% (IDGF-4) und 42% (IDGF-3) der Aminosäuren mit HAIP.

4.2.4. Sequenz-Analyse des Immunolektin-3 (IML-3)

Die ursprünglich isolierte cDNA des IML-3 enthielt 2152 Nukleotide. Die Sequenzierstrategie für diese cDNA ist in Abb. 19 dargestellt.

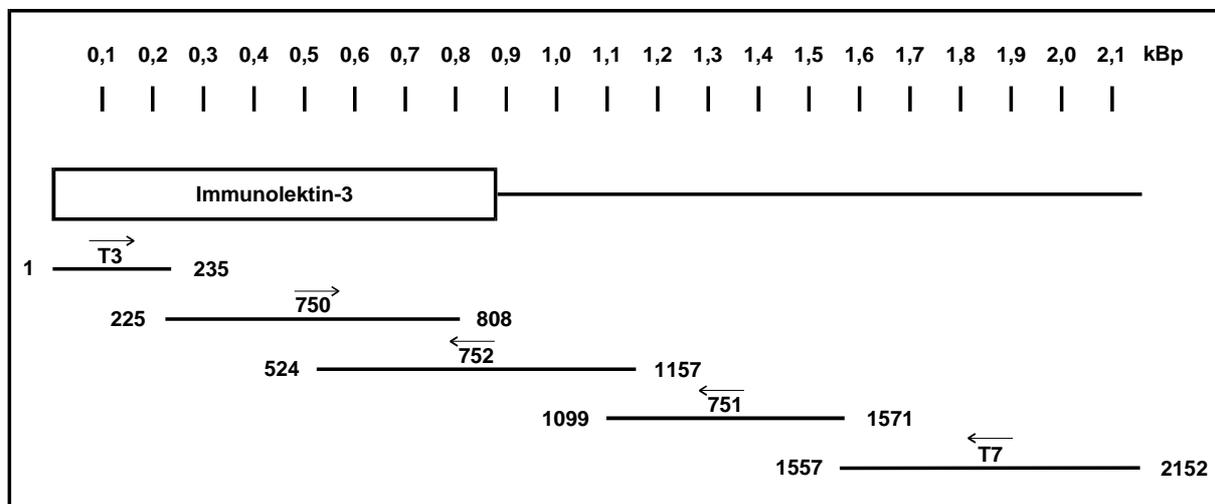


Abb. 19: Strategie zur Sequenzierung der ursprünglich isolierten cDNA des IML-3

Zur Ermittlung der vollständigen Sequenz des IML-3 wurden neben den vektorinternen Primern, T3 und T7, drei zusätzliche Primer P750, P751 und P752 synthetisiert. Die Leserichtung der Primer ist durch einen Pfeil symbolisiert. Der kodierende Bereich der cDNA ist als Kasten dargestellt, der nicht kodierende Bereich ist durch einen einfachen Strich symbolisiert.

Die weitere Analyse der Sequenz zeigte jedoch, dass diese cDNA unvollständig war. Es fehlte sowohl das Startcodon am 5'-Ende der cDNA als auch der polyadenylierte Bereich am 3'-Ende. Zur weiteren Sequenzaufklärung wurde daher durch Restriktionsverdau der ursprünglich isolierten cDNA ein etwa 500 Nukleotide umfassendes Fragment erzeugt, das nachfolgend als Sonde für einen Screen der Fettkörper-Bibliothek eingesetzt wurde. Dieser Screen ergab eine größere Anzahl positiver Kolonien, von denen fünf bis zur Einheitlichkeit subkloniert und ansequenziert wurden. Alle diese Plasmide enthielten Fragmente, die bis auf ein oder zwei zusätzliche Nukleotide identisch zu der bereits klonierten cDNA waren. Zeitgleich wurde von Dr. Xiao-Qiang Yu (Dept. of Biochemistry, Kansas State University,

N-Glykosilierungsmotiv (N-X-S/T) konnte beginnend mit N-156 identifiziert werden. Die weitere Analyse der Sequenz zeigte, dass IML-3 vermutlich zur Familie der Calcium-abhängigen Lektine (c-type lectin) gehört. Als Besonderheit konnte festgestellt werden, dass IML-3, wie einige weitere Insekten-Proteine dieser Familie, zwei Kohlenhydrat-bindende Domänen (*Carbohydrate-recognition domain*, CRD) besitzt. Ein Alignment von IML-3 mit den bekannten Insekten-Proteinen mit zwei CRDs ist in Abb. 20 dargestellt. Die erste CRD beginnt in diesem Alignment an Position 9 und verläuft bis einschließlich Position 141. Die zweite CRD beginnt mit Position 142 und wird durch die verbleibende Sequenz gebildet. Im Vergleich mit bekannten CRDs zeichnet sich die zweite Kohlenhydrat-bindende Domäne durch zwei zusätzliche Cystein-Reste (149 und 165 des Alignments) aus.

4.2.5. Sequenz-Analyse des *Manduca sexta* Hemocytins (MsHc)

In der ursprünglichen Sequenzierung des Klonen 7, der nach der Herstellung der Expressionsbank aus Hämocyten isoliert worden war, war nicht die komplette Sequenz der Hemocytin-cDNA erhalten worden. Da sich eine große Ähnlichkeit dieser cDNA mit dem von *Bombyx mori* bekannten Hemocytin (BmHc) zeigte, wurde für diese cDNA die neue Bezeichnung *M. sexta* Hemocytin (MsHc) gewählt.

4.2.5.1. Screen der Expressionsbanken zum Erhalt der kompletten cDNA des MsHc

Um die vollständige Sequenz des MsHc zu erhalten, wurde aus der vorhandenen cDNA mittels Restriktionsverdau ein ca 1,6 kB großes Fragment geschnitten, markiert und als Sonde für einen Screen der Hämocyten-Expressionsbank eingesetzt (Sonde HC-1). Während dieses Screens wurden 15 Klone gepickt und bis zur Einheitlichkeit subkloniert. Während der Subklonierung erwiesen sich fünf der Ursprungsklone als falsch positiv. Mit den verbliebenen zehn Klonen wurde eine *in-vivo* Exzision des enthaltenen Phagemids durchgeführt und nachfolgend die Plasmid-DNA gewonnen. Die Plasmide wurden einem Restriktionsverdau unterzogen. Anschließend wurde die verdaute DNA elektrophoretisch aufgetrennt und nach einem Southern-Blot erneut mit der ursprünglich zum Screen eingesetzten Sonde detektiert. Von den zehn untersuchten Plasmiden zeigten vier ein vom Ursprungsklon unterschiedliches Restriktionsmuster sowie eine andere Größe der enthaltenen cDNA (s. Abb. 21).

Diese Klone wurden ansequenziert. Alle Klone enthielten am 3'-Ende, wie die ursprünglich isolierte cDNA, das Poly-A-Motiv. Das größte Plasmid, pHC-10, umfasste 6016 Bp und wurde vollständig sequenziert. Wie die weitere Analyse ergab, handelte es sich bei diesem Fragment noch nicht um die vollständige cDNA des MsHc. Daher wurde die Hämocyten-

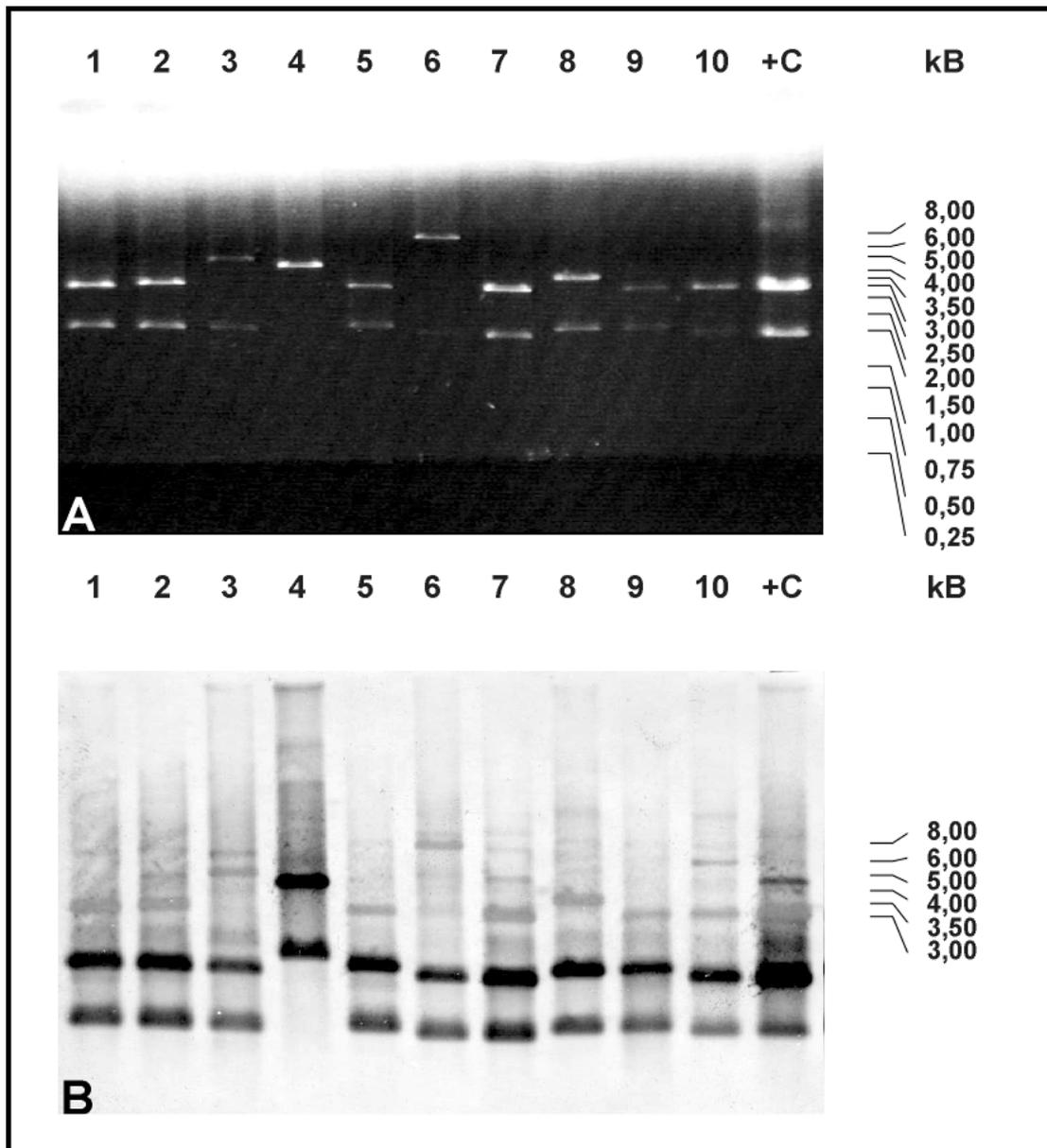


Abb. 21: Charakterisierung der nach dem Screen der Hämozyten-Expressionsbank mit der Sonde HC-1 erhaltenen Plasmide

Die erhaltenen Plasmide wurden mit EcoRI und XhoI verdaut und in einem Agarose-Gel aufgetrennt. In einem Southern-Blot wurde die Hybridisierung der erhaltenen Restriktionsfragmente mit der Sonde HC-1 verifiziert. Bahn 1: pHC-3, Bahn 2: pHC-5, Bahn 3: pHC-6, Bahn 4-10: pHC-8 bis pHC-14 und Bahn 11 Positiv-Kontrolle (Plasmid IHC-7).

Expressionsbank erneut gescreent. Hierzu wurde eine Sonde genutzt, die nach Restriktionsverdau mit EcoRI und XhoI aus pHC-10 erhalten wurde und am 5'-Ende dieses Fragments lokalisiert war. Trotz mehrmaliger Wiederholung führten erneute Screens nicht zum Erfolg. Aus diesem Grund wurde für die Ermittlung der vollständigen Sequenz des MsHc eine andere Strategie angewandt.

4.2.5.2. 5'RACE-PCR zur Amplifikation des kompletten kodierenden Bereichs von MSHC

Ein Alignment des BmHc mit einem kürzlich von *D. melanogaster* beschriebenen Protein (Hemolectin) und der Sequenz von pHC-10 zeigte, dass noch 5-6 kB an fehlender Sequenz zu erwarten waren. Außerdem konnte bei diesem Alignment in Hemolectin und BmHc ein sehr konservierter Bereich, mit der Sequenz GLCGNYNGD, ausgemacht werden. Dieser Bereich wurde genutzt, um einen degenerierten Primer (P782) zu entwickeln.

Mittels eines Primers (P776) innerhalb der bereits ermittelten Sequenz von MsHc wurde eine reverse Transkription von neu isolierter RNA mittels des GeneRacer™ Kits durchgeführt. Diese cDNA wurde als *Template* für eine anschließende PCR mit P782 und P780 eingesetzt. Die PCR ergab ein Produkt mit einer Größe von 3,1 kB (s. Abb. 22). Das PCR-Produkt wurde in den pCR®4-TOPO-Vektor kloniert (pHC-30) und nach der Amplifikation sequenziert.

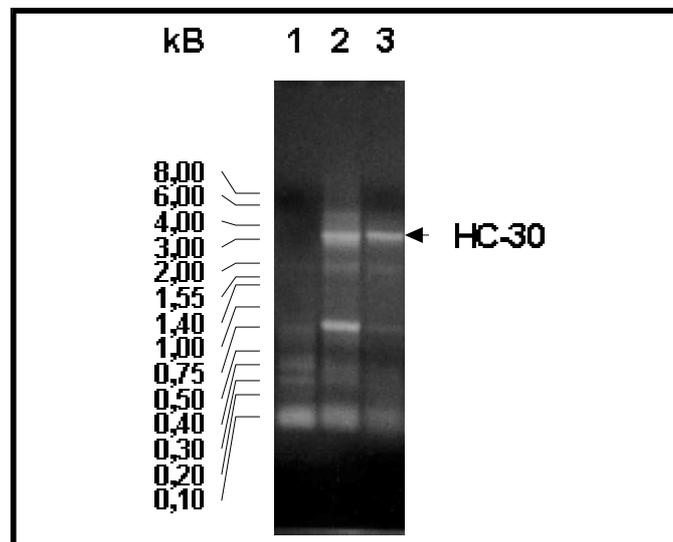


Abb. 22: Optimierung der PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Hemocytin-Fragments HC-30

Agarose-Gel mit PCR-Produkten zur Amplifikation der noch fehlenden Sequenz des MsHc. Trotz Optimierung der *Annealing*-Temperatur und der Magnesium-Konzentration konnte kein Produkt im erwarteten Größenbereich amplifiziert werden (Bahn 1). Erst der Zusatz von DMSO (Bahn 2: 5%, Bahn 3: 10%) ergab ein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe.

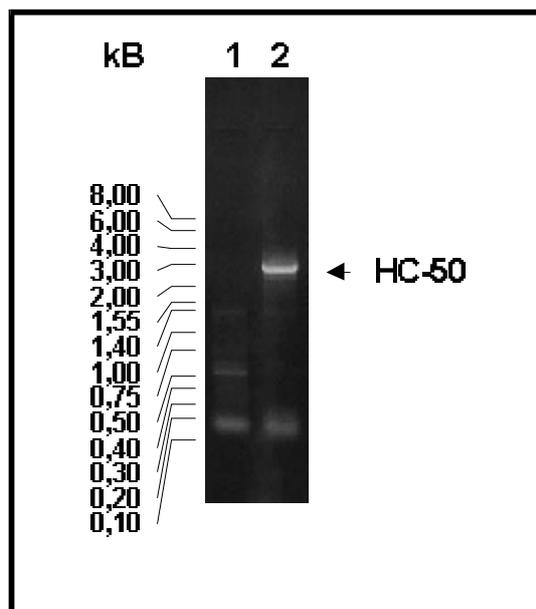


Abb. 23: Optimierung der PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Hemocytin-Fragments HC-50

Trotz Optimierung der *Annealing*-Temperatur des Primers, der Magnesium-Konzentration im Reaktionsansatz und Zusatz von DMSO (5%) konnte kein PCR-Produkt erhalten werden (Bahn 1). Erst der Zusatz eines Additives der Fa. Qiagen (Q-Solution) ergab die Amplifikation eines Reaktions-Produktes von 2,6 kB.

Das 3'-Ende von pHC-30 überlappte mit dem 5'-Ende von pHC-10. Das 5'-Ende enthielt die Sequenz des degenerierten Primers P782. Um die Sequenz im Bereich des degenerierten Primers zu verifizieren und die noch fehlende Sequenz zu ermitteln, wurde eine erneute PCR mit dem Template aus der reversen Transkription durchgeführt. Hierzu wurde der dem Kit beiliegende 5'-Primer und ein ca. 700 Nukleotide abwärts vom degenerierten Primer gelegener Primer (P790) benutzt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde ein 2,6 kB umfassendes PCR-Produkt erhalten (s. Abb. 23).

Nach Klonierung des gereinigten PCR-Produktes in den pCR[®]4-TOPO-Vektor wurde das Plasmid pHC-50 gewonnen und sequenziert. Die Analyse der Sequenzierung ergab, dass das noch fehlende 5'-Ende des MsHc mit dem Startcodon und einer längeren 5'-nicht kodierenden Region erhalten wurde. Abb. 24 zeigt den Aufbau der MsHc kodierenden cDNA anhand der vier klonierten Fragmente.

Zur weiteren Analyse der Sequenz wurden Alignments der verschiedenen Domänen der bisher bekannten, ähnlichen Proteine durchgeführt (Domänen-Typ B: Abb. 25, Domänen-Typ C: Abb. 26 und Domänen-Typ D s. Anhang). Hierzu wurden die Sequenzen des MsHc, des Hemocytins (*B. mori*) [Kotani et al. 1995], des Hemolektins (*D. melanogaster*) [Goto et al. 1999] und des von Willebrand-Faktors (*H. sapiens*) [Verweij et al. 1986] benutzt. Der Vergleich der zwei dem Domänentyp B zugeordneten Bereiche zeigte eine Übereinstimmung der Sequenzen zwischen 17% und 63%. In allen verglichenen Sequenzen waren drei Cysteinreste (Position 27, 28 und 33 im Alignment) vollständig identisch. Diese drei Cysteine flankierten einen Bereich, der in allen Domänen mit Ausnahme von B2 des *D. melanogaster* Hemolektins konserviert war. In allen B2-Domänen und der humanen B1-Domäne war ein Cystein am Beginn der Teil-Sequenz (Position 1) konserviert. Außerdem wurde ein weiteres konserviertes Cystein (C-44) festgestellt (Ausnahme: die Domäne B1 des humanen Proteins).

	*	20	*	40						
MsB1	:	-----QD	LVSPPPRP	GHCCPEYH	CA	---KKQENC	:-	27		
MsB2	:	CPKFHN	-----L	KMANVS	-GKCCPEYS	CEC	----PKDKC	:-	29	
BmB1	:	-----ED	LRTAPPPP	GQCCPEYD	CV	---KPEAQC	:-	27		
BmB2	:	CPQFQT	-----L	ASVNI	-TGKCCPEYK	CEL	----PKDKC	:-	29	
HvWB1	:	CP	TAKAPTCGLCEVAR	LRQNA	---DQCCPEYE	CV	---DPV	:-	35	
HvWB2	:	CP	PHRLPT	-----L	RKT	---QCCDEYE	CAC	----N	CV	25
DmB1	:	-----ET	IVSV	---DECCPR	YRC	VPETKDF	SKLC	:-	26	
DmB2	:	CP	KAPVNCQERFYEVKTIKEP	---GM	CCSKHS	CV	----PKDLC	:-	37	

Abb. 25: Alignment der Domänen vom B-Typ

Dargestellt wurde das Alignment von Domänen des Typs B des Hemocytins von *M. sexta* mit den ähnlichen Domänen des Hemocytins (*B. mori*, Bm), des Hemolektins (*D. melanogaster*, Dm) und des von Willebrand-Faktors (*H. sapiens*, HvW). Vollständig konservierte Aminosäuren wurden schwarz unterlegt, zu 75% konservierte Bereiche wurden grün markiert und zu 60% konservierte Positionen wurden violett hervorgehoben.

Der Vergleich der Domänen des C-Typs wurde unter Auslassung der C2-Domäne des Proteins von *D. melanogaster* durchgeführt, da diese Domäne in diesem Protein nicht erkennbar war. Das Alignment der Domänen dieses Typs ergab eine Übereinstimmung der Sequenzen zwischen 13% und 69%. Auch in diesem Domänen-Typ konnte ein zentraler, identischer Bereich, flankiert von drei konservierten Cysteinen (C-12, C-13 und C16) beobachtet werden. Daneben sind noch vier weitere Cysteine (C-62, C-67, C-89 und C-93) in allen Domänen mit Ausnahme der von *M. sexta* konserviert.

```

                *           20           *           40           *           60
MsC1 : -----*-----QFVLEPRAVPFAC-CP-----VPQYVACRDRDNVYKVGENWTSPTNPKVKYQ-- : 47
MsC2 : -----*-----QFVLKEEKVPWQVL-PY-RGSGRVSRRKQDLSGESNVAVIEP--VRE----RD : 45
BmC1 : -----*-----LFVLEPRPVPFAC-CP-----EPVQVACRHQDNVYKVGKWKSPTDVCEETYEA : 49
BmC2 : -----*-----QFVLKEEKIPGKC-CP-----KVEPVACRDGDKIYQEVQVWTFP-DPCTNRTERR : 48
HvWC1 : NSTVSCP-L-----GY-L-ASTATNDCGCTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGGFWEEGCDVCT---CTD : 56
HvWC2 : QRNVSCPQLEVPVCPSPGFQL--SCKTSAC-CPSCRCERMEACMLNGTVIGPGKTV--MIDVCTTCRCM- : 63
DmC1 : -----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----* : 19

                *           80           *           100           *           120           *
MsC1 : VQAD---DGKLEKVTIVQHDDDDQPG---WKYFPADAASGECGKCRPVACVVDGVERPIGEKWTSS : 109
MsC2 : VQ---PRRCRQARAHGERAGVRQVVSARLDVSYAPAPA---ECCGRCVQSACVLPDRLVEPGSTWQSE : 107
BmC1 : DG----DGKIQRLAAVQRCDRHQPG---WKYVPAEADSGQCCGKCEPVACVVDGEEKPIGEKWTSS : 109
BmC2 : E-----DQQLSVGRITVEHCERQRRG---WTYSPPAAD--HCCGRCVQSACLVDDQLKEPGSTWSSA : 105
HvWC1 : MEDAV--MGLRVAQCSQKPCEDSRRSG---FTYVLHE--GECGRCLPSACEVVTGSPR-GDSQSSW : 115
HvWC2 : VQVGVISGFKLE--CRKTTNP-CPLG----YKEENNT-GECCGRCLPTACTIQL---RGGQIMTLK : 119
DmC1 : GP-----DENAQVVSITLEQLTDCAPG---FSY--QNLDKTKCCGKCVQTSCLFVQKLYEVNALWKS : 76

```

Abb. 26: Alignment der Domänen vom C-Typ

Dargestellt wurde das Alignment von Domänen des Typs C des Hemocytins von *M. sexta* mit den ähnlichen Domänen des Hemocytins (*B. mori*, Bm), des Hemolektins (*D. melanogaster*, Dm) und des von Willebrand-Faktors (*H. sapiens*, HvW). Vollständig konservierte Aminosäuren wurden schwarz unterlegt, zu 85% konservierte Bereiche (bzw. konservativ substituierte Aminosäuren) wurden grün markiert und zu 55% konservierte Positionen (bzw. konservative Substitutionen) wurden violett hervorgehoben.

Der Vergleich der Domänen des D-Typs ergab, dass in allen Proteinen zwei Formen dieser Domänen existieren: eine lange (D1-D3) und eine kurze Form (d'-d''). Das Alignment dieser Domänen wurde aufgrund des Umfangs im Anhang dargestellt. Insgesamt ergibt sich in dieser Domänenform eine Identität zwischen 16% und 76%. Auch hier waren zahlreiche Cysteine konserviert. In einigen Fällen traten zusätzliche oder fehlende Cysteine auf. Zusätzliche Cysteine wurden in der Domäne des Typs D1 an Position 297 beobachtet, im Typ D2 an Position 110/111, 269 (nur *B. mori* und *D. melanogaster*) und 431 sowie im Typ D3 an den Positionen 170 und 317. Fehlende Cysteine traten in der Domäne des Typs D1 an folgenden Positionen auf: 239 und 285 (nur *B. mori*). Im Domänen-Typ D2 fehlten Cysteine an den Positionen 280, 311, 453, 456 und 458. Im Typ D3 fehlte diese Aminosäure an den Positionen 208, 287, 387 (nur *M. sexta*), 394, 453 (nur *D. melanogaster*) sowie 456 und 458 (beide nur *B. mori* und *D. melanogaster*).

4.3. Rekombinante Expression der cDNAs zur Produktion von polyklonalen Antikörpern

Zur weiteren Charakterisierung der durch die isolierten cDNAs kodierte Proteine wurden mit Ausnahme des HAIPs, für das bereits ein Antikörper existierte [Kanost et al. 1994], polyklonale Antikörper gegen die rekombinant exprimierten Proteine hergestellt. Hierzu war zunächst die Klonierung der in dem Plasmid pBSK vorliegenden cDNAs in einen Expressionsvektor notwendig. Die cDNA wurde mittels PCR aus dem vorliegenden Plasmid amplifiziert. Die Vorgehensweise ist in Abb. 27 am Beispiel des IML-3 schematisch dargestellt.

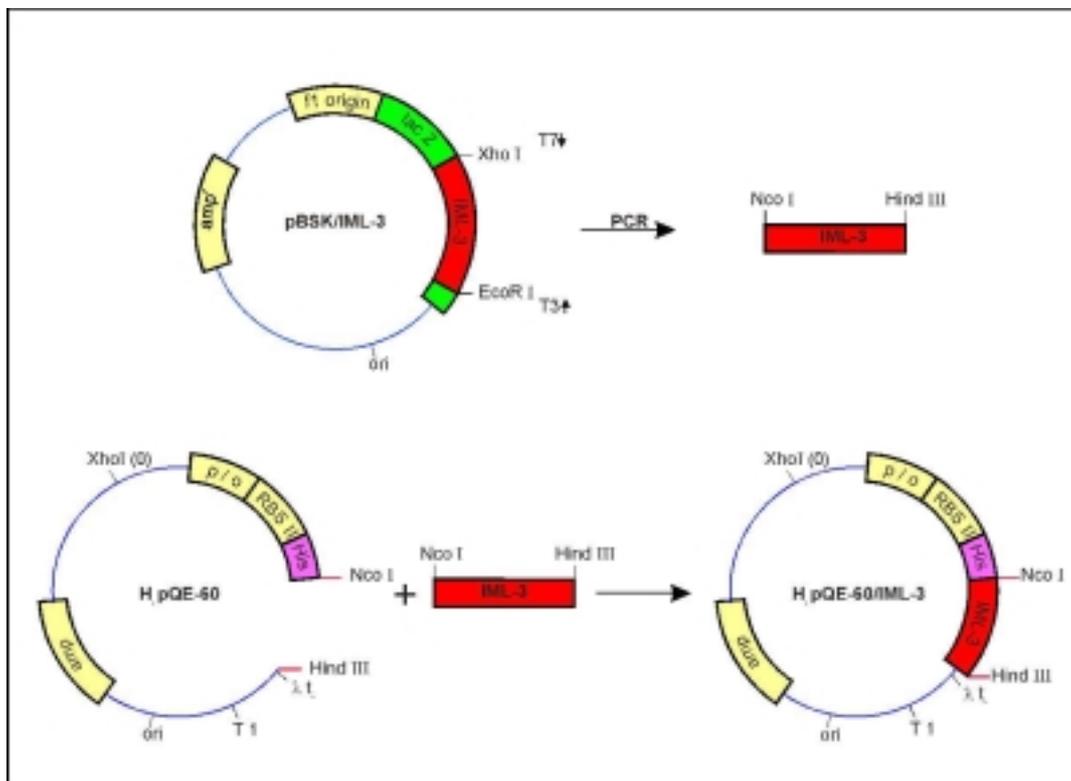


Abb. 27: Schematische Darstellung der Konstruktion der Expressionsvektoren am Beispiel des IML-3

Die im Plasmid pBSK/IML-3 vorliegende cDNA wurde mittels einer PCR amplifiziert. Die dazu eingesetzten Primer wurden so konstruiert, dass ein direktionales Klonieren unter Erhalt des Leserasters möglich war. Nach Restriktionsverdau mit NcoI und HindIII wurde das PCR-Produkt in einen nach der Methode von Lee und Mitarbeitern (1994) modifizierten Expressionsvektor des Typs H₆PQE60 (Qiagen) ligiert. Zur Orientierung sind in den Vektoren einige Funktionsbereiche hervorgehoben: amp^r: Gen für die Ampicillin-Resistenz, fl origin: Origin of replication des Phagen fl, lac z: lac Z Gen (α -Komplementation), ori: Origin of replication, p/o: Phage T5 Promotor und 2 lac Operatoren, RBSII: Ribosomen-Bindungsstelle, His6: Tag aus sechs aufeinander folgenden Histidinen, λ t₀: Transkriptionstermination des Phagen Λ und T1: Transkriptionstermination des rrnB Operons von *E. coli*.

Die hierzu eingesetzten Primer wurden so entworfen, dass nachfolgend ein direktionales Klonieren unter Erhalt des Leserasters möglich war. Dies wurde erreicht, indem im Vorwärtsprimer eine NcoI-Restriktionsschnittstelle und im Rückwärtsprimer eine HindIII-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde.

4.3.1. Rekombinante Expression des IML-3 und Reinigung des Proteins aus Bakterien

Da die vollständige Sequenz des IML-3 nicht bekannt war, wurde der Vorwärtsprimer so gewählt, dass nur die cDNA des potentiell reifen Peptids in den Expressionsvektor kloniert wurde. Die Sequenzen der für die Amplifikation des IML-3 eingesetzten Primer P756 und P757 sind im Anhang aufgeführt.

Nach der Amplifikation der cDNA wurde das PCR-Produkt in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Bande des IML-3 wurde ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde die cDNA mit NcoI und HindIII verdaut und in den modifizierten und mittels NcoI und HindIII linearisierten Expressionsvektor H₆PQE60 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation von M-15 Zellen eingesetzt. Da der eingesetzte Vektor nicht über die α -Komplementation zur Identifizierung von rekombinanten Klonen verfügte, erfolgte stets eine

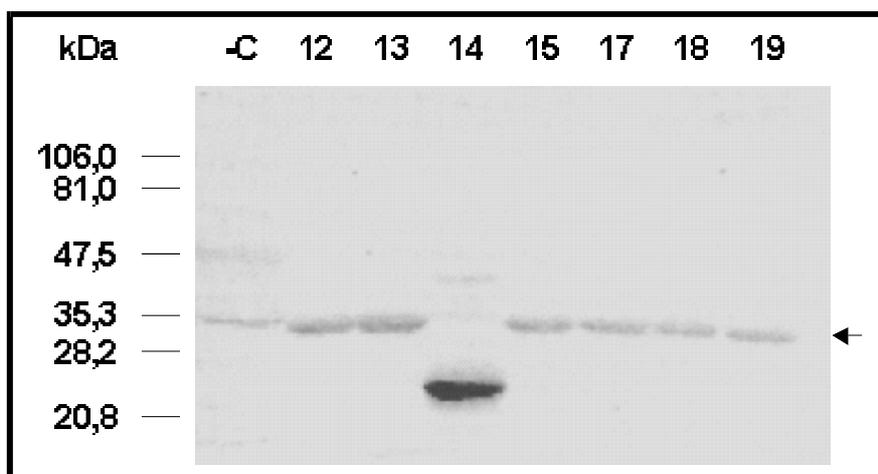


Abb. 28: Western-Blot von Bakterien-Lysaten zur Ermittlung der rekombinantes IML-3 exprimierenden Stämme

Zur Identifikation der Stämme, die rekombinantes IML-3 exprimierten, wurden einzelne Kolonien in Kultur genommen und die Expression des Fremdproteins durch Zugabe von IPTG induziert. Nach 4 h Induktion wurde ein Aliquot abgenommen und die Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet wurde in SDS-Ladepuffer resuspendiert und denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen 5 aufeinander folgende Histidin-Reste detektiert. Die Aufschlüsse der Kolonien 12 bis 19 wurden aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle (-C) wurde Lysat von M15-Zellen ohne Expressionsvektor aufgetragen. Der Pfeil zeigt rekombinantes IML-3. Eine der Kolonien (14) trug ein verkürztes Insert.

eingehende Kontrolle der Rekombinanten. In einem ersten Schritt wurden dazu 20 einzelne Kolonien gepickt und nach Induktion mit IPTG in einem Western-Blot auf Expression von Histidin-markiertem Protein untersucht. In Abb. 28 ist ein Blot zur Identifizierung von Histidin-markiertem IML-3 dargestellt.

Insgesamt zeigten 18 der isolierten Kolonien die Expression von Histidin-markiertem Protein in der erwarteten Größe von etwa 34 kDa. Einer der isolierten Klone (14) produzierte ein mit dem Antikörper reagierendes Protein, das aber nicht die zu erwartende Größe besaß. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde Plasmid-DNA des Klonen 13 isoliert. Anschließend wurde es mit NcoI und HindIII verdaut und die Wanderungsgeschwindigkeit des Restriktionsfragmentes mit der des ursprünglich zur Ligation eingesetzten PCR-Produktes verglichen (siehe Abb. 29, Bahn 1 und 2). Da das erhaltene Restriktionsfragment eine gleiche Größe wie das ursprüngliche PCR-Produkt zeigte, wurde der Klon 13 für die Optimierung der Expressionsbedingungen benutzt.

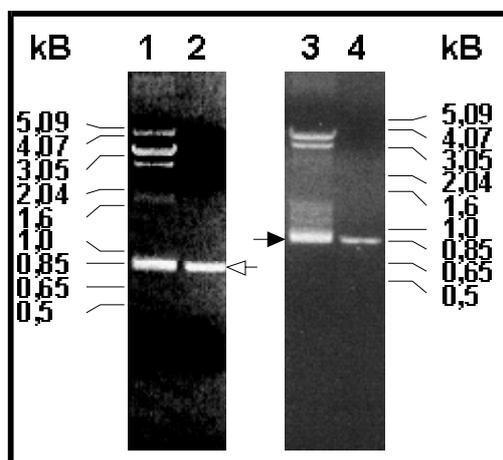


Abb. 29: Vergleich der isolierten Plasmide mit dem ursprünglichen PCR-Produkt von IML-3 und MsHc

Zur weiteren Kontrolle der Klonierung wurden aus den rekombinantes Protein exprimierenden Bakterien Plasmide präpariert und nach Verdau mit NcoI und HindIII mit dem ursprünglichen PCR-Produkt verglichen. Bahn 1: Verdau des IML-3-Expressionsplasmids, Bahn 2: IML-3-PCR-Produkt, Bahn 3: Verdau des MsHc-Expressionsplasmids und Bahn 4: MsHc-PCR-Produkt. Der offene Pfeil zeigt die cDNA des IML-3. Der schwarze Pfeil zeigt die cDNA des MsHc.

Hierzu wurde eine frische Kultur der Bakterien mit IPTG induziert. Über einen Zeitraum von sechs Stunden wurden mehrere Proben genommen. Nach der letzten Probenahme wurde außerdem ein Aliquot von 1 ml entnommen. Dieses Aliquot wurde für die Untersuchung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins eingesetzt. In Abb. 30 ist ein Coomassie-gefärbtes Gel dieser Proben gezeigt.

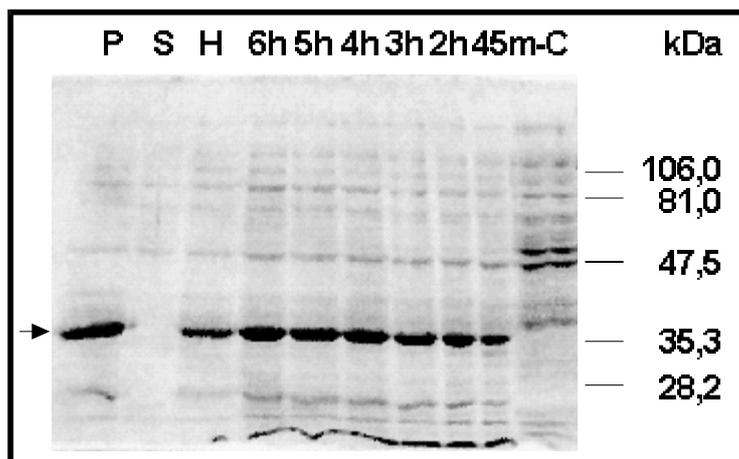


Abb. 30: Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für IML-3

Bakterien mit dem IML-3-Expressionsvektor wurden in Kultur genommen und die Expression von Fremdprotein durch Zugabe von IPTG induziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquots entnommen und denaturiert. Es wurden gleiche Mengen dieser Proben auf das Gel aufgetragen. Die abschließend verbliebene Kultur wurde genutzt, um die Löslichkeit des rIML-3 zu überprüfen. P: Pellet nach Lyse der Bakterien mittels Ultraschall, S: Überstand nach Lyse der Bakterien, H: Ultraschall-Homogenat. Die Bakterienlysate der Zeitreihe (45min bis 6h) wurden mit der Zeit nach Induktion benannt (z. B. die Probe 45m wurde 45 min nach Zugabe von IPTG entnommen). Als Negativ-Kontrolle (-C) wurde Lysat des Klonen 13 vor Zugabe des IPTGs aufgetragen. Der Pfeil markiert rekombinantes IML-3.

Wie man erkennen konnte, ist in den Bakterien vor Zugabe von IPTG keine Produktion von IML-3 feststellbar. Bereits nach 45-minütiger Induktion zeigte sich eine zusätzliche Bande, die durch das exprimierte IML-3 hervorgerufen wurde. Die größte Menge an rekombinantem Protein konnte nach etwa vier- bis fünfstündiger Induktion festgestellt werden. Das Protein wurde von den Bakterien in einer nicht-löslichen Form gebildet und in *Inclusion bodies* eingelagert. Für die Herstellung des IML-3 in größerem Umfang wurde daher eine Induktion einer 200 ml Kultur für vier Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert, resuspendiert und aufgeschlossen. Die nunmehr denaturierten Proteine wurden mit Ni-NTA-Säulenmaterial inkubiert und zur weiteren Aufarbeitung in eine kleine Säule überführt. Unspezifisch an die Säule gebundene Proteine wurden vor der Elution der spezifisch gebundenen Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt. Nach erfolgter Elution wurde der Proteingehalt der aufgefangenen Fraktionen bestimmt. Anschließend wurden Aliquots aller Fraktionen auf einem Coomassie-gefärbten Gel daraufhin untersucht, welche Fraktionen das rekombinante IML-3 enthielten. Die Gele mit den Fraktionen, die mit Waschpuffer B und Elutionspuffer von der Säule gespült wurden, sind in Abb. 31 dargestellt.

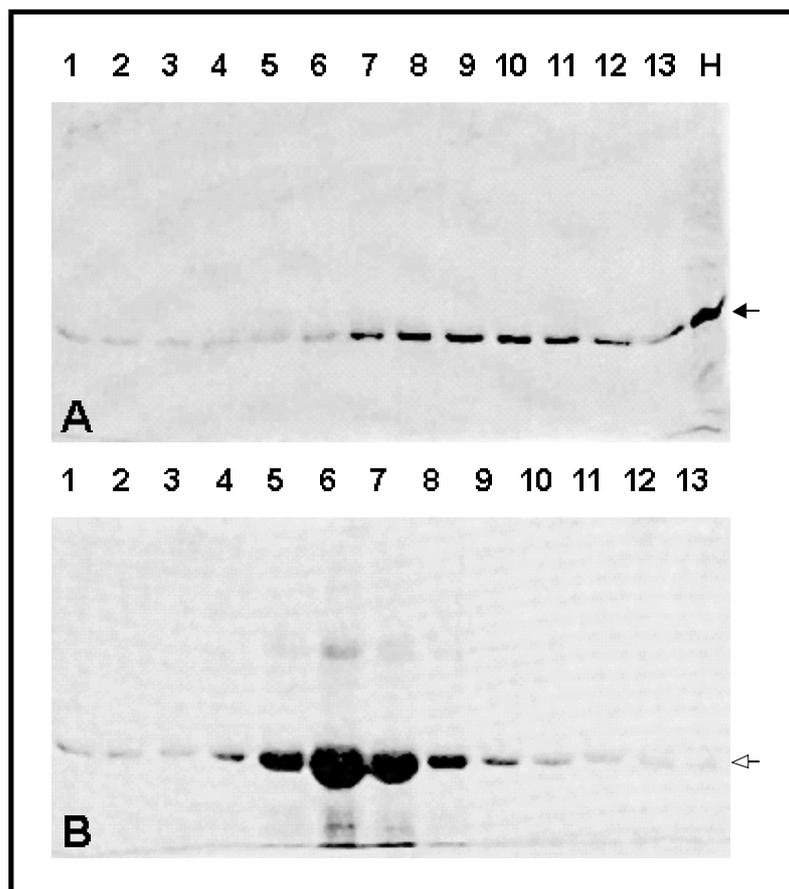


Abb. 31: Reinigung von rekombinatem IML-3

Das rekombinante IML-3 wurde mittels Ni-NTA-Säule gereinigt. Nach dem Binden des Proteins an die Säule wurde diese zur Elution nicht spezifisch gebundener Proteine mit Waschpuffer B gewaschen (Gel **A**: Fraktionen 1-13, H: Homogenat der Bakterien nach Induktion mit IPTG). Die Elution des IML-3 erfolgte sodann durch Elutionspuffer (Gel **B**: Fraktionen 1-13). Geringe Mengen IML-3 eluierten bereits während des Waschens der Säule mit Waschpuffer B (schwarzer Pfeil). Die Hauptmenge eluierte jedoch erst mit dem Elutionspuffer (offener Pfeil) in den Fraktionen E-5 bis E-8.

Bereits mit Waschpuffer B wurde IML-3 zu einem geringen Teil von der Säule gewaschen. Der größte Anteil an rekombinantem Protein wurde jedoch erst durch den Elutionspuffer in den Fraktionen E-5 bis E-8 erhalten.

Als abschließendes Kontrollexperiment wurde ein Aliquot des gereinigten IML-3 in einer SDS-PAGE von noch in Spuren vorhandenen verunreinigenden Proteinen abgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Bande, die dem IML-3 entsprach, wurde ausgeschnitten und zur N-terminalen Sequenzierung eingesetzt. Dabei sollte insbesondere überprüft werden, dass es während der PCR-Reaktion und der anschließenden Klonierung nicht zu einer Verschiebung des Leserasters gekommen war. Als N-terminale Sequenz des rekombinanten IML-3 wurde die erwartete Aminosäure-Abfolge [HHHHHHAMG(S)N] ermittelt.

4.3.2. Rekombinante Expression eines MsHc-Fragments und Reinigung des Proteins aus Bakterien

Für die Produktion eines polyklonalen Antikörpers gegen MsHc wurde ein c-terminales Peptid (Aminosäure 2932 bis Aminosäure 3213) in *E. coli* exprimiert. Zur Konstruktion des Expressionsvektors wurden die Primer P 765 und P 766 eingesetzt (die Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt). Die Klonierung des Fragmentes erfolgte in Anlehnung an die für das IML-3 erfolgreiche Strategie.

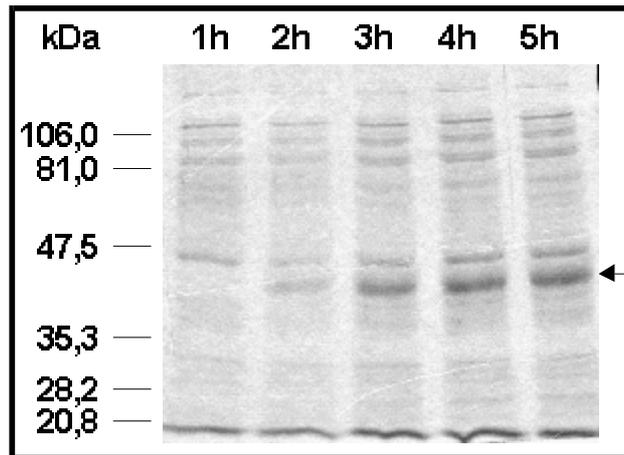


Abb. 32: Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für MsHc

Bakterien mit dem MsHc-Expressionsvektor wurden in Kultur genommen und die Expression von Fremdprotein durch Zugabe von IPTG induziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquots entnommen und denaturiert. Die über der Abbildung angegebenen Zeiten bezeichnen die Induktionsdauer für die jeweilige Probe. Der Pfeil markiert rekombinantes MsHc.

Nach der Identifizierung einer Bakterienkolonie, die nach IPTG-Induktion Histidin-*getagtes* Protein produzierte, wurde aus diesen Bakterien Plasmid isoliert. Nach einem Restriktionsverdau wurde die Größe der ausgeschnittenen cDNA mit dem ursprünglichen PCR-Produkt verglichen (s. Abb. 29, Bahn 3 und 4). Vor der Produktion von größeren Mengen des Proteins wurden auch für das MsHc-Fragment die Expressionsbedingungen optimiert (s. Abb. 32). Auch MsHc wurde von den Bakterien in einer nicht-löslichen Form gebildet.

Daher konnte für MsHc das bereits für IML-3 genutzte Reinigungsschema angewandt werden. Nach der Affinitätsreinigung des rekombinanten MsHc wurden die mit dem Waschpuffer und Elutionspuffer erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE auf Gehalt an rekombinantem Protein untersucht (s. Abb. 33).

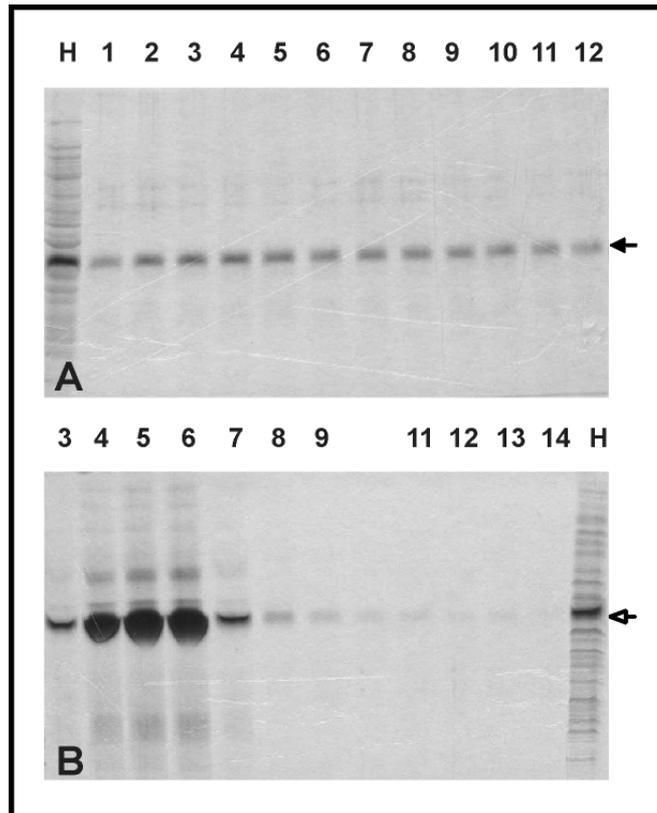


Abb. 33: Reinigung von rekombinantem MsHc

Das rekombinante MsHc wurde mittels Ni-NTA-Säule gereinigt. Nach dem Binden des Proteins an die Säule wurde diese zur Elution nicht spezifisch gebundener Proteine mit Waschpuffer B gewaschen (Gel **A**: Fraktionen 1-12, H: Homogenat der Bakterien nach Induktion mit IPTG). Die Elution des MsHc erfolgte anschließend durch Elutionspuffer (Gel **B**: Fraktionen 3-14, H: Homogenat der Bakterien nach Induktion mit IPTG). Geringe Mengen MsHc eluierten bereits während des Waschens der Säule mit Waschpuffer B (schwarzer Pfeil). Die Hauptmenge eluierte jedoch erst mit dem Elutionspuffer (offener Pfeil) in den Fraktionen E-4 bis E-6.

Auch bei diesem Protein wurde bereits eine kleine Menge durch den Waschpuffer von der Säule gespült. Der größere Anteil eluierte jedoch erst nach dem Wechsel zum Elutionspuffer in den Fraktionen E4-E6.

Als letzte Bestätigung der richtigen Klonierung wurde auch von diesem Protein der Übergang zwischen dem Histidin-Tag und MsHc mittels Edman-Abbau verifiziert. Die erhaltene Sequenz [HHHHHHAMGE(S)N] entsprach der Erwartung.

4.3.3. Rekombinante Expression der FP-1 und Reinigung des Proteins aus Bakterien

Zur rekombinanten Expression der Fettkörper-Protease 1 wurde die vollständige cDNA mit den Primern P 657 und P 658 (Primersequenzen s. Anhang) amplifiziert. Die Konstruktion des Expressionsvektors und anschließende Transformation von Bakterien mit dem Ligationsprodukt erfolgte nach dem bereits für IML-3 erfolgreichen Schema. Nach

Identifizierung eines positiven Bakterien-Stammes wurde die Größe der enthaltenen cDNA mit dem ursprünglichen PCR-Produkt verglichen. Da die Größe beider Proben übereinstimmte (s. Abb. 34), wurden die Expressionsbedingungen, wie bereits beschrieben, optimiert (s. Abb. 35).

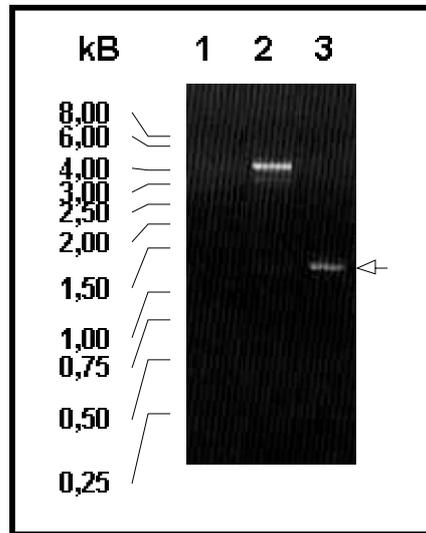


Abb. 34: Vergleich der isolierten Plasmide mit dem ursprünglichen PCR-Produkt der FP-1

Zur weiteren Kontrolle der Klonierung wurden aus zwei Bakterien-Stämmen Plasmide präpariert und nach Verdau mit NcoI und HindIII mit dem ursprünglichen PCR-Produkt verglichen. Bahn 1: Verdau eines Bakterien-Stammes, der keine mit dem ursprünglichen PCR-Produkt übereinstimmende cDNA enthielt, Bahn 2: FP-1 cDNA, die mit dem ursprünglichen PCR-Produkt co-migriert und Bahn 3: FP-1-PCR-Produkt. Der offene Pfeil markiert die cDNA der FP-1.

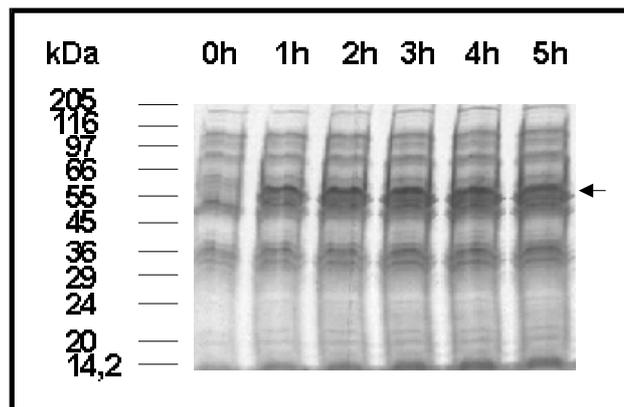


Abb. 35: Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für FP-1

Bakterien mit dem FP-1-Expressionsvektor wurden in Kultur genommen und die Expression von Fremdprotein durch Zugabe von IPTG induziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquots entnommen und denaturiert. Die über der Abbildung angegebenen Zeiten bezeichnen die Induktionsdauer der jeweiligen Probe. Der Pfeil markiert rekombinante FP-1.

Im Gegensatz zu IML-3 und MsHc erfolgte die Synthese des rekombinanten Proteins FP-1 in den Bakterien nur in sehr kleinen Mengen. Für die Aufreinigung von genügend Material zur Produktion eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers mussten daher insgesamt 7,5 Liter Bakterienkultur aufgearbeitet werden (Fraktionen der Ni-NTA-Chromatografie zur Reinigung des rekombinanten Proteins s. Abb. 36).

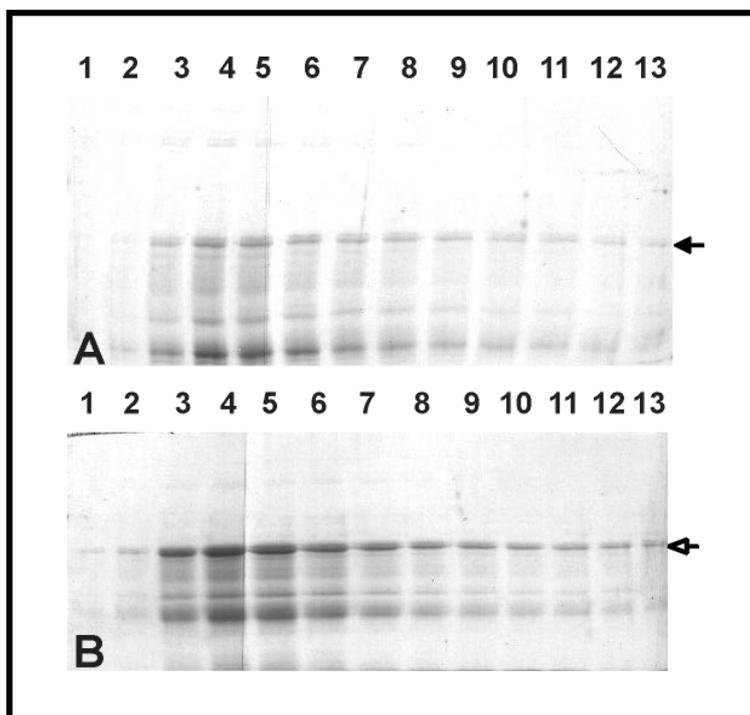


Abb. 36: Reinigung von rekombinanter FP-1

Die rekombinante FP-1 wurde mittels Ni-NTA-Säule gereinigt. Nach dem Binden des Proteins an die Säule wurde diese zur Elution nicht spezifisch gebundener Proteine mit Waschpuffer B gewaschen (Gel **A**: Fraktionen 1-13). Die Elution des MsHc erfolgte sodann durch Elutionspuffer (Gel **B**: Fraktionen 1-13). Geringe Mengen FP-1 eluierten bereits während des Waschens der Säule mit Waschpuffer B (schwarzer Pfeil). Die Hauptmenge eluierte jedoch erst mit dem Elutionspuffer (offener Pfeil) in den Fraktionen E-3 bis E-7.

Vor der weiteren Verwendung der rekombinanten FP-1 wurde zunächst überprüft, ob es während der Klonierung zu Veränderungen des Leserasters gekommen war. Da die Kontrolle mittels Edman-Abbau fehlschlug, wurde stattdessen die Plasmid-DNA des Expressionsvektors sequenziert. Mittels dieses Ansatzes konnte die erwartete Sequenz (MHHHHHAMVREVLVAL) bestätigt werden.

4.4. Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen FP-1, MsHc und IML-3

Die aufgereinigten Proteine wurden für die Herstellung von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern benutzt. Hierzu wurden jeweils 550 µg des rekombinanten Proteins nach der Reinigung über eine Ni-NTA-Säule einem abschließenden Reinigungsschritt mittels SDS-PAGE unterzogen. Die Bande des jeweiligen Proteins wurde aus dem Gel ausgeschnitten und auf Trockeneis an ein Auftragsunternehmen (IML-3 und MsHc: Fa. Cocalico Biologicals, Reamstown, Pennsylvania, USA; FP-1: Fa. Davids Biotechnologie, Regensburg) zur Immunisierung von Kaninchen verschickt. Die Immunisierung der Tiere erfolgte nach Standardprotokollen der beauftragten Firmen.

Nach erfolgreicher Immunisierung wurden die Antiseren im Western-Blot auf ihre Reaktivität gegen die zur Immunisierung eingesetzten rekombinanten Proteine getestet (s. Abb. 37A für IML-3, Abb. 37B für MsHc und Abb. 38 für FP-1).

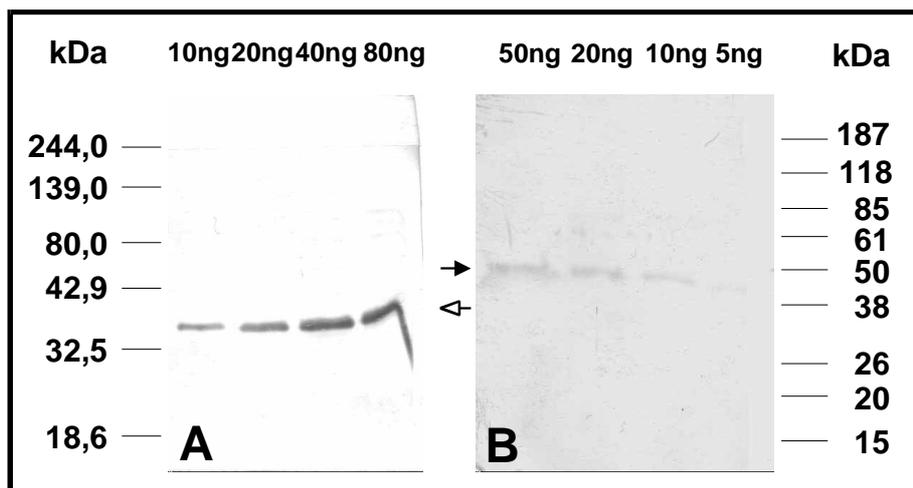


Abb. 37: Charakterisierung der gegen rekombinantes IML-3 und MsHc hergestellten polyklonalen Antikörper

Zur Charakterisierung der hergestellten Antikörper wurden unterschiedliche Mengen der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörper. **A:** Rekombinantes IML-3 wurde mit einer 1:2000 Verdünnung des Antikörpers deutlich markiert. Die aufgetragene Menge Protein ist über der Abbildung angegeben. **B:** Rekombinantes MsHc wurde mit einer 1:7500 Verdünnung des Antikörpers deutlich markiert. Die aufgetragene Menge Protein ist über der Abbildung angegeben.

Alle Seren, die vor der Immunisierung der Kaninchen entnommen wurden, reagierten nicht mit den rekombinanten Proteinen. Die nach der Immunisierung erhaltenen Seren zeigten eine deutliche Reaktivität gegen die zur Immunisierung eingesetzten rekombinanten Proteine. Zur Detektion des rekombinanten IML-3 (10 ng) war eine 1:2000 Verdünnung vom Antikörper

des mit diesem Protein immunisierten Kaninchens hinreichend. Das rekombinante MsHc-Fragment (10 ng) wurde noch von einer Verdünnung von 1:7500 von dem entsprechenden Antikörper detektiert.

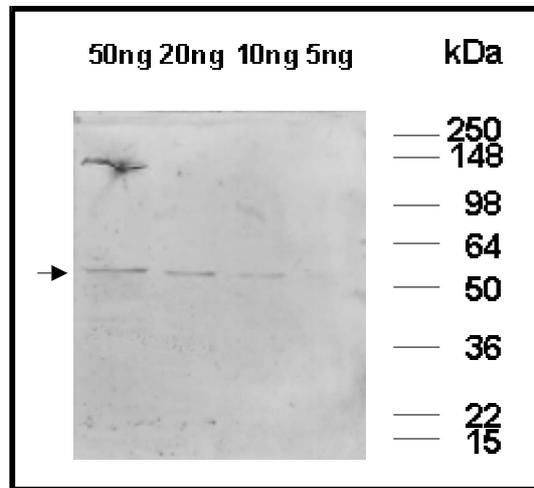


Abb. 38: Charakterisierung des gegen rekombinante FP-1 hergestellten polyklonalen Antikörpers

Zur Charakterisierung der hergestellten Antikörper wurden unterschiedliche Mengen der rekombinanten FP-1 mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit einer 1:5000 Verdünnung des FP-1 spezifischen Antikörpers werden 10 ng des rekombinanten Proteins deutlich detektiert (Pfeil).

Die rekombinante FP-1 (10 ng) wurde von einer 1:5000 Verdünnung des Antikörpers deutlich detektiert.

4.5. Kreuzreaktivität der Antiseren mit Hämolymp-Proteinen anderer Insekten

Mit den polyklonalen Antikörpern gegen die rekombinant hergestellten IML-3 und MsHc wurden die Hämolympen von *M. sexta* und verschiedener anderer Insekten untersucht. Es zeigte sich, dass der Antikörper gegen IML-3 in Hämolymphe von *M. sexta* drei Proteine markiert (s. Abb. 39).

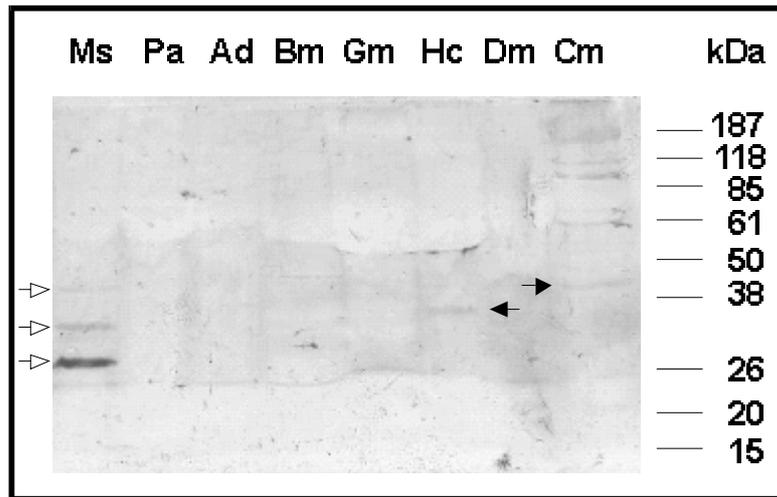


Abb. 39: Reaktivität des polyklonalen Antikörpers gegen rekombinantes IML-3 mit Hämolymp-Proteinen verschiedener Insekten

Zur weiteren Charakterisierung des Antikörpers gegen IML-3 wurden Hämolymp-Proteine von verschiedenen Insekten in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde nach Blockieren mit einer 1:2000 Verdünnung des Antikörpers gegen IML-3 behandelt. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit einem Alkalische-Phosphatase-konjugiertem, Kaninchen-spezifischen Antikörper mittels BCIP/NBT. Aufgetragene Hämolymp-Proben stammten von *M. sexta* (Ms), *P. americana* (Pa), *A. domesticus* (Ad), *B. mori* (Bm), *G. mellonella* (Gm), *H. cecropia* (Hc), *D. melanogaster* (Dm) und *C. morosus* (Cm). In Hämolymphe von *M. sexta* erkennt der Antikörper drei Proteine (offene Pfeile). In Hämolymphe von *H. cecropia* und *C. morosus* erkennt der Antikörper jeweils ein Protein (schwarze Pfeile).

Diese drei Proteine wurden mit zunehmender Größe als IML-3a, IML-3b und IML-3c benannt. Das Molekulargewicht dieser Proteine wurde mit 33,5 kDa, 37,5 kDa und 45 kDa bestimmt. Die Intensität der detektierten Banden nahm mit zunehmender Größe des Proteins ab. Von den zusätzlich getesteten Proben anderer Insekten wies nur eine Proteinbande aus der Hämolymphe von *H. cecropia* eine mit dem IML-3b co-migrierende Kreuzreaktivität auf. In der Hämolymphe von *C. morosus* wurde ein Protein detektiert, das mit IML-3c comigriert. Jedoch war in dieser Probe auch eine Färbung einiger hochmolekularer Proteine erkennbar. Die Hämolymphe von *P. americana* (Pa), *A. domesticus* (Ad), *B. mori* (Bm), *G. mellonella* (Gm) und *D. melanogaster* (Dm) wiesen keine Proteine auf, die mit dem Antikörper detektiert werden konnten.

Auch der polyklonale Antikörper gegen rekombinantes MsHc detektierte in Hämolymphe mehrere Banden (s. Abb. 40). Da der Northern-Blot für dieses Protein jedoch nur eine Bande zeigte, wurden diese Proteine nicht weiter unterteilt.

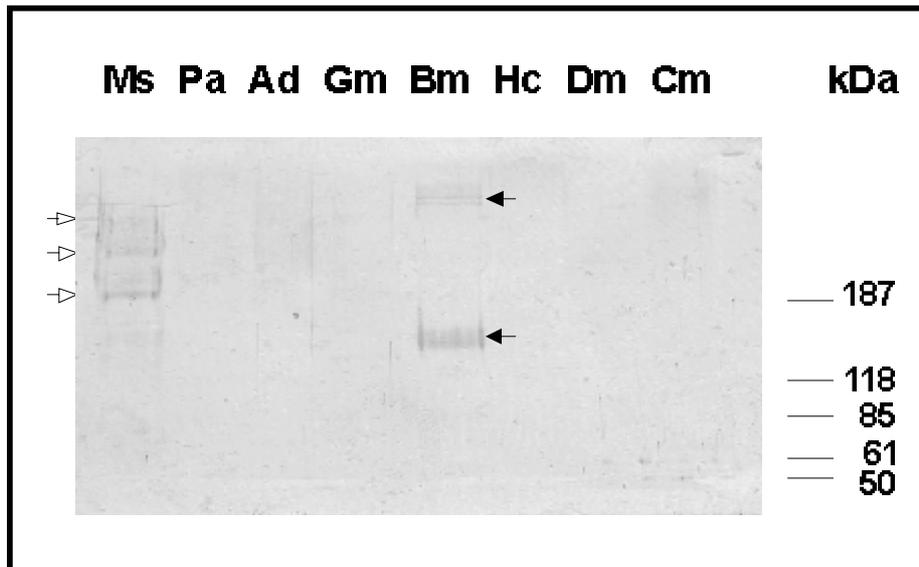


Abb. 40: Reaktivität des polyklonalen Antikörpers gegen rekombinantes MsHc mit Hämolymp-Proteinen verschiedener Insekten

Zur weiteren Charakterisierung des Antikörpers gegen MsHc wurden gleiche Mengen zellfreier Hämolymp-Proteine von verschiedenen Insekten in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde nach Blockieren mit einer 1:5000 Verdünnung des Antikörpers gegen MsHc behandelt. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit einem Alkalische-Phosphatase-konjugiertem, Kaninchen-spezifischen Antikörper mittels BCIP/NBT. Aufgetragene Hämolymp-Proben stammten von *M. sexta* (Ms), *P. americana* (Pa), *A. domesticus* (Ad), *G. mellonella* (Gm), *B. mori* (Bm), *H. cecropia* (Hc), *D. melanogaster* (Dm) und *C. morosus* (Cm). Offene Pfeile zeigen die reagierenden Proteine von *M. sexta*, schwarze Pfeile zeigen kreuzreagierende Proteine in der Hämolymphe von *B. mori*.

Die Masse der drei am deutlichsten hervortretenden Banden wurde mit 220 kDa, 315 kDa und 390 kDa bestimmt. In den Hämolymp-Proben der anderen Insekten konnte nur bei *B. mori* eine deutliche Detektion von drei Proteinen beobachtet werden. Diese 3 Proteine zeigten jedoch im Vergleich zu den bei *M. sexta* detektierten Proteinen ein abweichendes Molekulargewicht. Die am weitesten migrierende Bande besitzt eine Masse von 145 – 165 kDa. In der Hämolymphe von *A. domesticus* konnte im hochmolekularen Bereich ein ‚verschmierter‘ Bereich beobachtet werden. Trotz mehrmaliger Wiederholung war hier jedoch keine abgegrenzte Bande zu erkennen. Alle übrigen Insektenarten zeigten keine mit dem MsHc-Antikörper detektierbaren Proteine.

4.6. Charakterisierung einiger Eigenschaften des IML-3

In Vorversuchen für eine spätere Reinigung und zur Überprüfung der Hypothese, das IML-3 möglicherweise im nativen Zustand mit weiteren Proteinen assoziiert vorliegt, wurden Hämolymp-Proteine mittels einer Gelfiltration aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Western-Blot auf das Vorhandensein von IML-3 untersucht (Abb. 41).

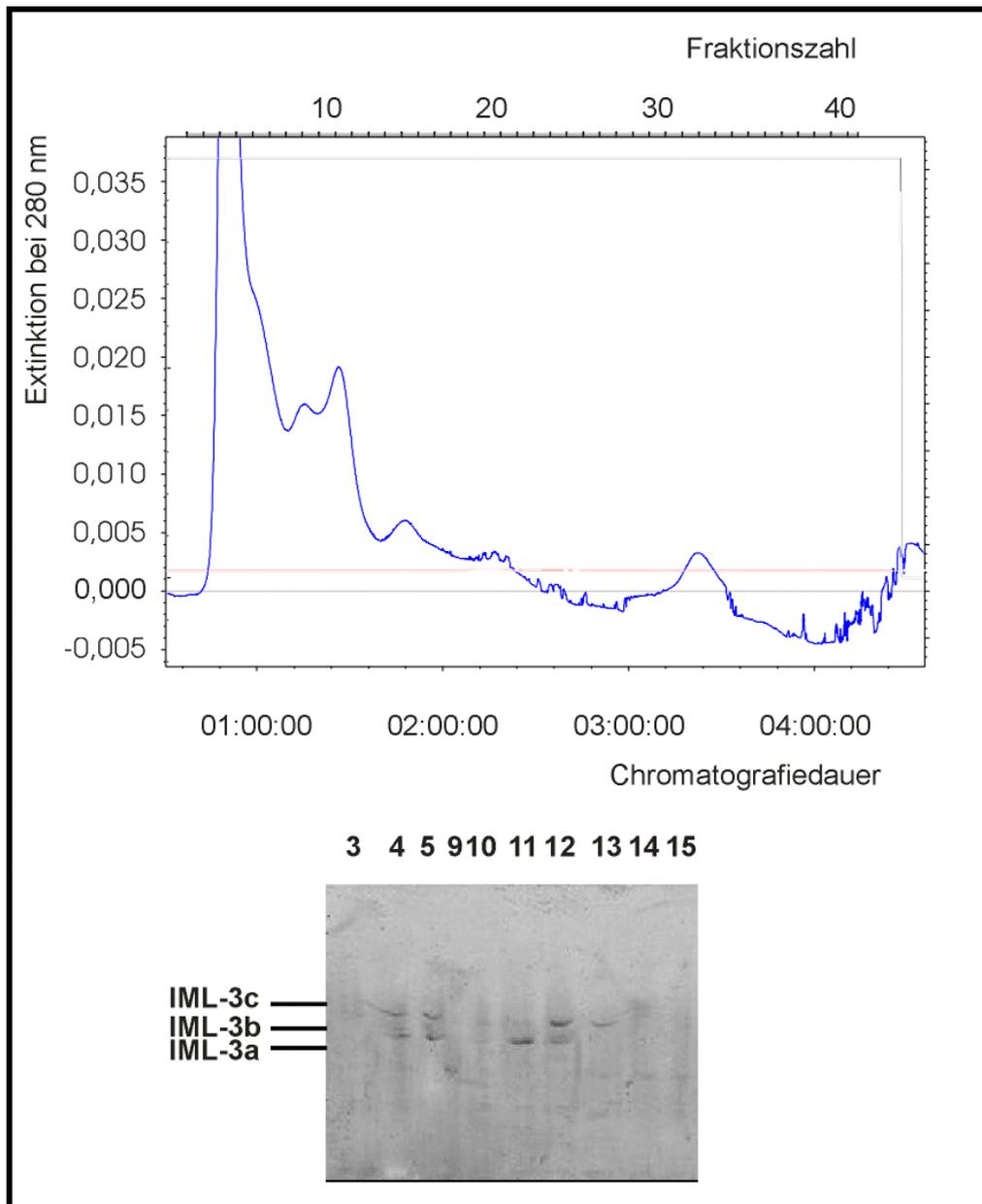


Abb. 41: Auftrennung von Hämolymp-Proteinen von *M. sexta* durch Gelfiltration

Hämolymp-Proteine wurden über eine Sephacryl-Säule größenfraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western-Blot auf den Gehalt an IML-3 untersucht. IML-3 konnte sowohl in den Fraktionen 4 und 5, aber auch in den Fraktionen 11 bis 13 detektiert werden. Die Nummern der aufgetragenen Fraktionen sind über dem Blot angegeben.

Es zeigte sich, dass IML-3 in zwei getrennten Bereichen aus der Säule eluiert wurde: das Protein war in den Fraktionen 4 und 5 sowie in den Fraktionen 11 bis 13 nachweisbar. In den dazwischen eluierten Fraktionen konnte es nicht nachgewiesen werden.

Für weitere Funktionsuntersuchungen wurde ein Testsystem etabliert, mit dem eine mögliche Bindung von IML-3 an LPS in der Hämolymphe überprüft werden sollte. Hierzu wurden die Bedingungen einer Elektrophorese unter nativen Bedingungen so optimiert, dass im Folgenden eine Auftrennung in einer zweiten Dimension mit anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran durchgeführt werden konnte. Im ‚eindimensionalen‘ nativen Blot (Abb. 42) konnten so zwei scharf abgegrenzte Banden identifiziert werden, die von dem Antikörper gegen IML-3 erkannt wurden. Zusätzlich konnte noch eine Kreuzreaktivität mit weiteren schmierenden Proteinen im oberen Bereich des Gels beobachtet werden.

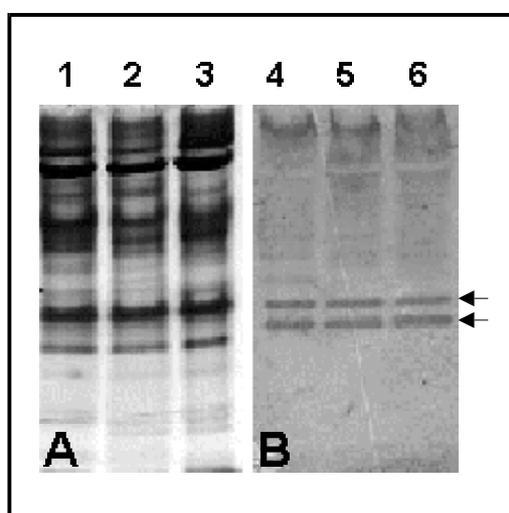


Abb. 42: Nachweis von IML-3 nach nativer Elektrophorese.

Auftrennung von gleichen Mengen zellfreier Hämolymphe-Proteine mittels nativer Elektrophorese in einem 7,5%-Gel mit anschließendem Western-Blot und Detektion mit dem Antikörper gegen IML-3. **A:** Coomassie-Färbung eines Gels. **B:** Western-Blot der zweiten Hälfte des Gels. Bahn 1 und 4: naive Hämolymphe, Bahn 2 und 5: Hämolymphe 24 h nach experimenteller Infektion mit *M. lysodeiktikus* und Bahn 3 und 6: 48 h nach experimenteller Infektion mit *M. lysodeiktikus*.

Eine experimentelle Infektion führte nicht zu einer deutlich erkennbaren Veränderung der Banden.

Im weiteren Verlauf wurde das so etablierte Testsystem genutzt, um die Bindung von IML-3 an LPS nachzuweisen. Hierzu wurde zellfreie Hämolymphe mit verschiedenen Konzentrationen LPS für 2 h bei RT sanft geschwenkt. Anschließend wurden die Hämolymphe-Proteine in einer nativen Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 43). Um eine bessere Separation der verschiedenen Banden zu erreichen, wurden für diese Versuche Gele mit einer geringeren Acrylamid-Konzentration (5%) als in den ersten Vorversuchen genutzt. Dadurch konnten die bisher beobachteten Banden in eine größere Anzahl aufgetrennt werden. Es zeigte

sich dabei eine von der LPS-Konzentration abhängige Veränderung der Banden, die im Western-Blot von dem Antikörper gegen IML-3 erkannt wurden. Insgesamt veränderte sich das Laufverhalten der verschiedenen Banden unterschiedlich mit zunehmender Konzentration von LPS.

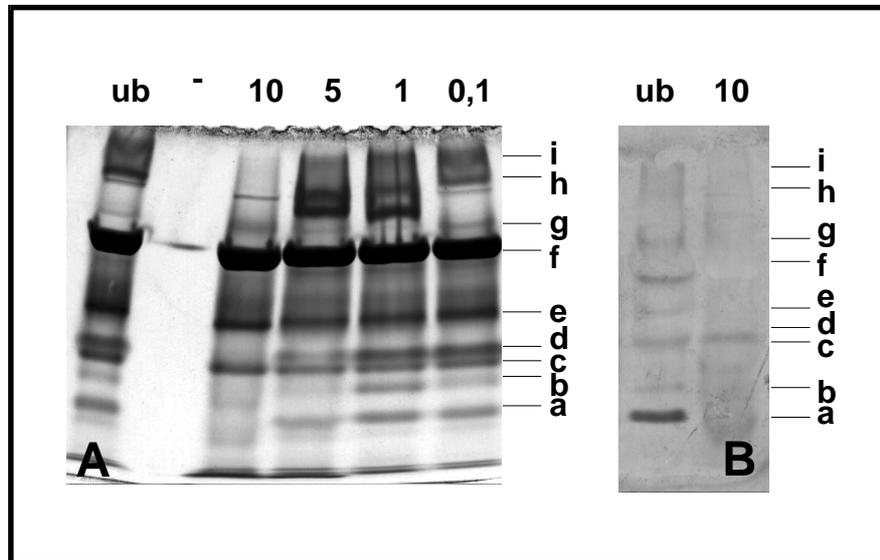


Abb. 43: Nachweis der Bindung von LPS durch IML-3 nach nativer Elektrophorese

Hämolymphe wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS inkubiert und nachfolgend in einer nativen Elektrophorese (5% Gel) aufgetrennt. **A:** Coomassie-Färbung des Gels. **B:** Western-Blot detektiert mit dem Antikörper gegen IML-3. Die Ziffern über der Abbildung geben die Konzentration des zugegebenen LPS in mg/ml an. Ub: Negativ-Kontrolle, -: leere Bahn.

Im Coomassie-Gel konnte bereits bei einer LPS-Konzentration von 1 mg/ml eine Verschiebung der Banden i und h weiter in Richtung auf die Lauffront beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 10 mg/ml waren diese Banden nicht mehr auszumachen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Bande g mit steigender LPS-Konzentration zunehmend intensiver und diffuser wurde. Eine Veränderung der Banden a und d konnte erst ab einer LPS-Konzentration zwischen 5 und 10 mg/ml festgestellt werden; Bande b war bereits bei 5 mg/ml nicht mehr detektierbar. Die Banden c, e und f veränderten sich durch die Inkubation mit LPS nicht. Im Blot, der ohne LPS und mit 10 mg/ml LPS durchgeführt wurde, konnte im Bereich von i und h nur eine diffuse Färbung erhalten werden. Schärfer abgegrenzt waren hingegen g, e, d, b und vor allem a. Im Bereich der Bande f trat neben einem ‚negativen‘ Färben auch noch eine zusätzliche, im Coomassie-Gel überlagerte Bande hervor. Alle diese Banden, mit Ausnahme von d und f, konnten nach der Inkubation nicht mehr beobachtet werden. Da erst bei einer LPS-Konzentration von 10 mg/ml ein vollständiges Verschwinden aller Banden beobachtet wurde, wurde diese Konzentration in einem weiteren Experiment zu einer zwei-dimensionalen Auftrennung genutzt. Hierzu wurde, nach der Auftrennung unter nativen Bedingungen, ein Streifen des Geles unter denaturierenden

Bedingungen aufgetrennt. In einem sich anschließenden Western-Blot (Abb. 44) gelang es nicht, die zwei scharf abgegrenzten Banden aus Abb. 42B mit den verschiedenen Banden des IML-3 im denaturierenden Gel eindeutig in Übereinstimmung zu bringen. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Banden, die unter denaturierenden Bedingungen mit IML-3 a, b und c co-migrieren, im nativen Gel überwiegend in dem Bereich des Geles enthalten waren, der die diffuse Färbung enthielt (Bande g, h und i in Abb. 43).

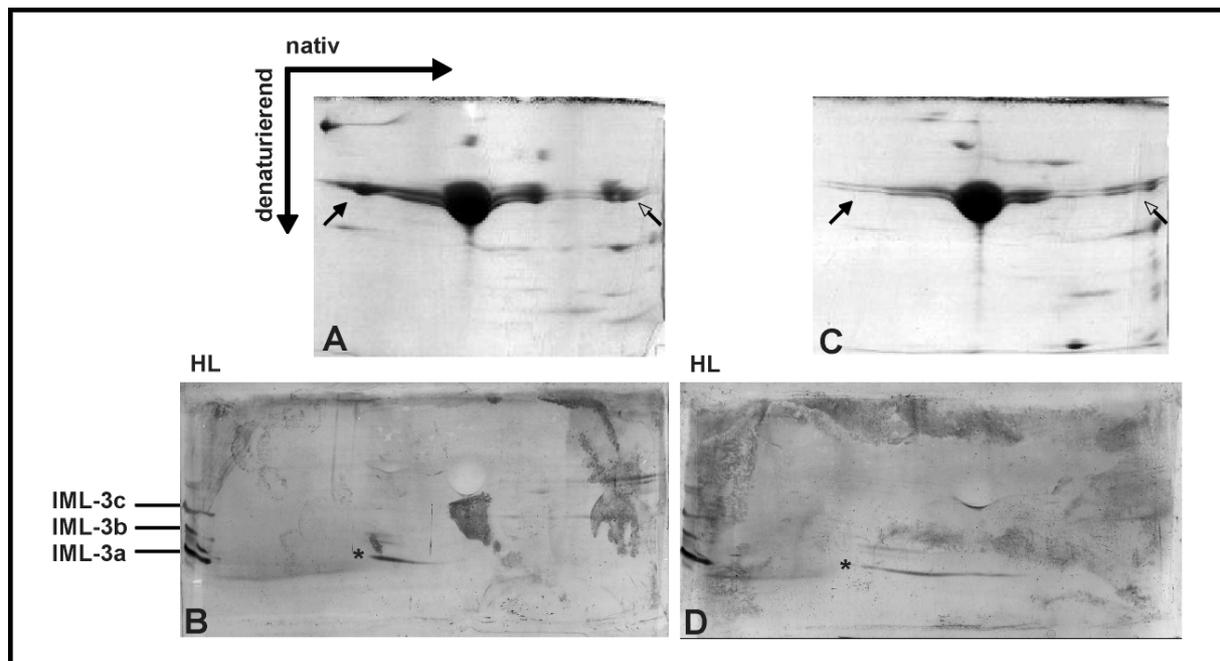


Abb. 44: In-vitro Bindungsexperiment von Hämolymp-Proteinen mit LPS

Zum Nachweis der LPS-Bindung durch IML-3 wurden Hämolymp-Proteine mit LPS inkubiert. Die Proteine wurden anschließend zweidimensional aufgetrennt (1. Dimension: native Bedingungen, 2. Dimension: nach Denaturierung) und geblottet. **A:** Auftrennung von Hämolymp-Proteinen, Inkubation ohne LPS. Coomassie-Färbung. **B:** Auftrennung von Hämolymp-Proteinen, Inkubation mit LPS. Coomassie-Färbung. **C:** Auftrennung von Hämolymp-Proteinen, Inkubation ohne LPS. Western-Blot mit dem Antikörper gegen IML-3. **D:** Auftrennung von Hämolymp-Proteinen, Inkubation mit LPS. Western-Blot mit dem Antikörper gegen IML-3. Die Wanderungsrichtung der verschiedenen Auftrennungen ist markiert. In **C** und **D** ist jeweils auf der linken Seite des Blots als Standardisierung Hämolymphe (HL) nur eindimensional (unter denaturierenden Bedingungen) aufgetrennt. Die Bande, die mit IML-3 a co-migriert, ist mit * markiert. Der Bereich der Banden g-i aus Abb. 43 ist mit einem gefüllten Pfeil, der Bereich der Banden a-d aus Abb. 43 durch offene Pfeile markiert.

In diesem Bereich konnte in den Coomassie-gefärbten Gelen beim Vergleich des Kontrollgels (Hämolymphe-Inkubation ohne LPS) mit dem Gel der LPS-behandelten Hämolymphe beobachtet werden, dass es zu einer Abschwächung der Färbintensität der Banden kommt, die in Abb. 43 mit a – d und g – i bezeichnet wurden. Ferner konnte in diesem Blot beobachtet werden, dass die Bande die mit IML-3 a co-migrierte, nach Inkubation mit LPS unter nativen Bedingungen weiter in Richtung der Lauffront ‚schmierte‘.

4.7. Einfluß bakterieller Infektionen auf die Konzentration von FP-1 und IML-3 in der Hämolymphe

Mittels der gegen FP-1 und IML-3 hergestellten Antiseren wurde der Einfluß von experimentellen Infektionen auf den Gehalt und eine mögliche Prozessierung der Proteine in der Hämolymphe untersucht. Hierzu wurden die für die Hämolymphe-Gewinnung vorgesehenen Tiere unterschiedlichen Behandlungen unterzogen. Während eine Kontrollgruppe unbehandelt blieb, wurde einer zweiten Kontrollgruppe Vollsaline gespritzt. Zwei weitere Gruppen wurden mit Bakterien (*E. coli* bzw. *M. lysodeiktikus*), suspendiert in Vollsaline, behandelt. Die Hämolymphe-Proteine wurden nachfolgend elektrophoretisch aufgetrennt und auf einem Western-Blot mit dem jeweiligen Antikörper detektiert.

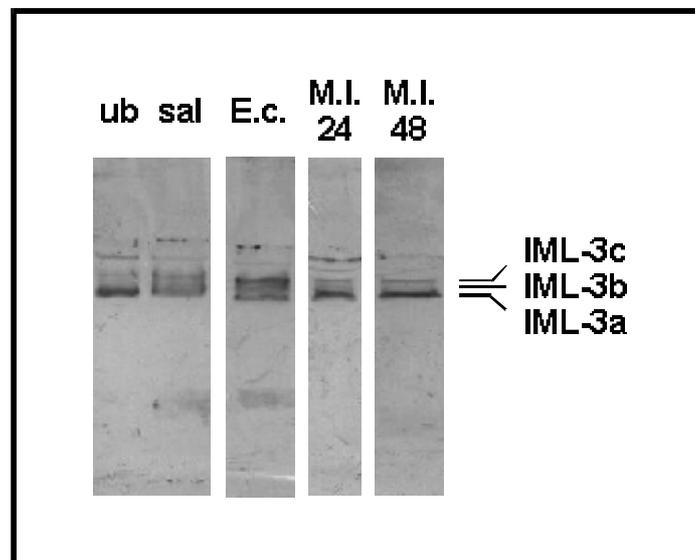


Abb. 45: Einfluß experimenteller Infektionen auf den Hämolymphe-Gehalt von IML-3
Western-Blot mit gleichen Mengen zellfreier Hämolymphe von unterschiedlich behandelten Tieren. Die Hämolymphe wurde von unbehandelten (ub) Tieren und von Tieren gewonnen, die mit gleichen Volumina von Saline (sal), *E. coli* (E.c. 24 h p. i.) oder *M. lysodeiktikus* (M.I. 24 h oder 48 h p. i.) infiziert worden waren.

Auf der mit dem Antikörper gegen IML-3 behandelten PVDF-Membran (Abb. 45) konnte in der Probe von unbehandelten Tieren eine intensive Bande von IML-3 a identifiziert werden. IML-3 c war nur sehr schwach vorhanden, während IML-3b fast nicht nachweisbar war. Im Saline-behandelten Tier blieben die Banden von IML-3b und c nahezu unverändert. Die Intensität der Bande von IML-3a nahm hingegen ab. In den Tieren, die infiziert wurden, konnte beobachtet werden, dass der Gehalt des IML-3b und c zunahm (für *E. coli*), während die Intensität von IML-3a etwa mit den Saline-injizierten Tieren vergleichbar war. Bei den mit *M. lysodeiktikus* behandelten Tieren konnte dies nicht beobachtet werden. Bei diesen Tieren war das Muster der Banden in etwa vergleichbar mit den unbehandelten Tieren.

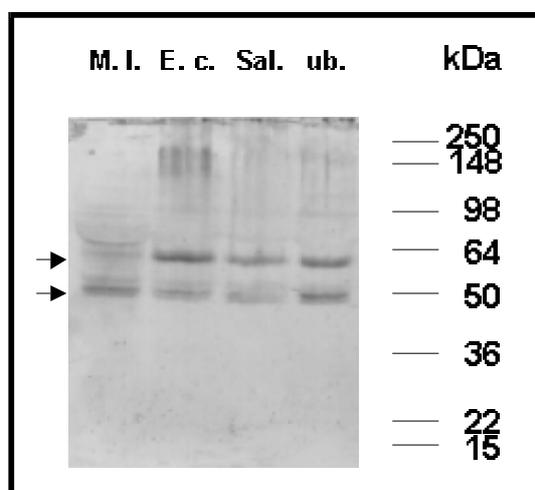


Abb. 46: Einfluß experimenteller Infektionen auf den Hämolympf-Gehalt von FP-1

Western-Blot mit gleichen Mengen zellfreier Hämolymphe von unterschiedlich behandelten Tieren. Die Hämolymphe wurde von unbehandelten (ub) Tieren und von Tieren gewonnen, die mit gleichen Volumina von Saline (sal), *E. coli* (E.c. 24 h p. i.) oder *M. lysodeiktikus* (M.l. 24 h p. i.) infiziert worden waren.

Auf dem mit dem Antikörper gegen FP-1 inkubierten Western-Blot (Abb. 46) konnte eine Induktion des Proteins durch eine Infektion nicht eindeutig beobachtet werden. Jedoch zeigte sich ein unterschiedliches Muster der Banden. Der Antikörper gegen FP-1 erkannte in der Hämolymphe von naiven Tieren zwei Banden etwa gleicher Intensität (Pfeile in Abb. 46). Dabei wurde die Bande mit dem höheren Molekulargewicht durch das unprozessierte Protein hervorgerufen. Die Bande des kleineren Proteins wurde durch die größere Untereinheit des Proteins nach erfolgter Prozessierung verursacht. Die kleine Untereinheit war im Western-Blot nicht zu erkennen. Der Vergleich der verschiedenen Proben miteinander zeigte, dass die Infektion mit verschiedenen Bakterien eine unterschiedliche Auswirkung auf die Prozessierung der FP-1 hatte. In der Hämolymphe unbehandelter Tiere waren die unprozessierte Form und die große Untereinheit deutlich auszumachen. In der Hämolymphe Saline-behandelter und *E. coli*-injizierter Tiere war die große Untereinheit in geringeren

Mengen vorhanden. Die Menge an unprozessierter FP-1, d. h. der inaktiven Vorstufe, erschien jedoch nahezu vergleichbar wie bei den unbehandelten Tieren. Eine Injektion von *M. lysodeiktikus* führte zu einem Verschwinden der unprozessierten Protease. Die Bande der prozessierten, großen Untereinheit war jedoch vergleichsweise intensiver.

4.8. Prozessierung der FP-1 in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums

Um die Hypothese, dass FP-1 neben einer Bedeutung im Rahmen der Reaktion von *M. sexta* auf bakterielle Infektionen, auch eine Bedeutung während der larvalen Entwicklung hat, wurden Western-Blots mit Hämolympheproteinen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt (Abb. 47).

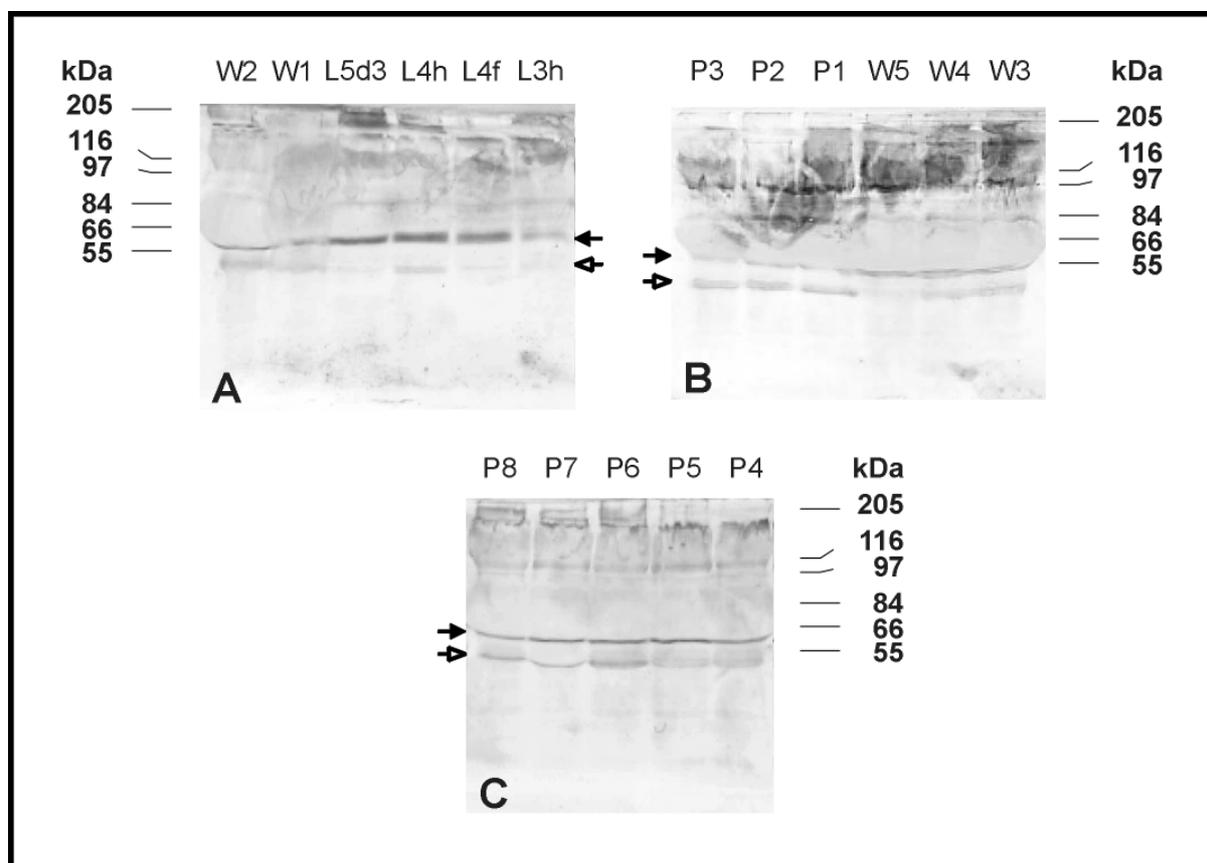


Abb. 47: Einfluß des Entwicklungsstadiums auf FP-1

Gleiche Mengen zellfreier Hämolymphe von Larven unterschiedlicher Entwicklungsstadien von *M. sexta* wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach Western-Blot mit dem Antikörper gegen FP-1 detektiert. **A:** L3h: Larvenstadium 3 mit Kopfkapsel-Vorschub, L4f: Larvenstadium 4 fressend, L4h: Larvenstadium 4 mit Kopfkapsel-Vorschub, L5d3: Larvenstadium 5 Tag 3 sowie W1 und W2: Wanderstadium (sichtbares Dorsalgefäß) Tag 1 und 2. **B:** W3 bis W5: Wanderstadium Tag 3 bis 5, P1 bis P3: Puppe Tag 1 bis 3. **C:** P4 bis P8: Puppenstadium Tag 4 bis 8. Volle Pfeile zeigen die unprozessierte FP1, offene Pfeile zeigen die große Untereinheit der prozessierten Protease.

auf den Western-Blots zeigte sich, dass der Hämolympfgehalt an unprozessierter FP-1 in den älteren Larvenstadien (L4, L5) deutlich höher als in jungen Larven und Puppen ist. Allerdings konnte in den späten Entwicklungsstadien aufgrund einer Interferenz einiger in großem Ausmaß gebildeter Proteine (Speicherproteine) mit der Detektion keine weitergehende Aussage über den Gehalt der inaktiven Form gemacht werden. Jedoch konnte eine Prozessierung und damit Aktivierung der Protease zu unterschiedlichen Zeiten der larvalen und pupalen Entwicklung beobachtet werden. Deutlich detektierbar war die prozessierte große Untereinheit der FP-1 in Larven des Entwicklungsstadiums 4, unmittelbar vor der Häutung zur L5 (beurteilt anhand des Kopfkapsel-Vorschubs). Tiere in der Mitte des Stadiums L5 (L5d3) zeigten diese Aktivierung nicht. Während der ersten vier Tage der Wanderphase (beurteilt anhand des sichtbaren Dorsalgefäßes) konnte ebenfalls eine geringfügige Prozessierung der FP-1 beobachtet werden, die am letzten Tag dieser Phase, unmittelbar vor der Verpuppung nicht erkennbar war. Am intensivsten traten die Banden der prozessierten Form der Protease jedoch während der ersten acht Tage des Puppenstadiums auf.

4.9. Einfluß experimenteller Infektionen auf die Expression von HAIP, MsHc und IML-3

Der Einfluß bakterieller Infektionen auf die Expression der untersuchten Proteine wurde im Northern-Blot Experiment untersucht. Zur Detektion der jeweiligen mRNA wurde eine DIG-markierte Sonde spezifisch für diese mRNA eingesetzt. Als Ladekontrolle diente eine DIG-markierte Sonde gegen das ribosomale Protein S3 von *M. sexta* [Jiang et al. 1996]. In Abb. 48 ist der Northern-Blot detektiert mit einer Sonde für die FP-1 dargestellt.

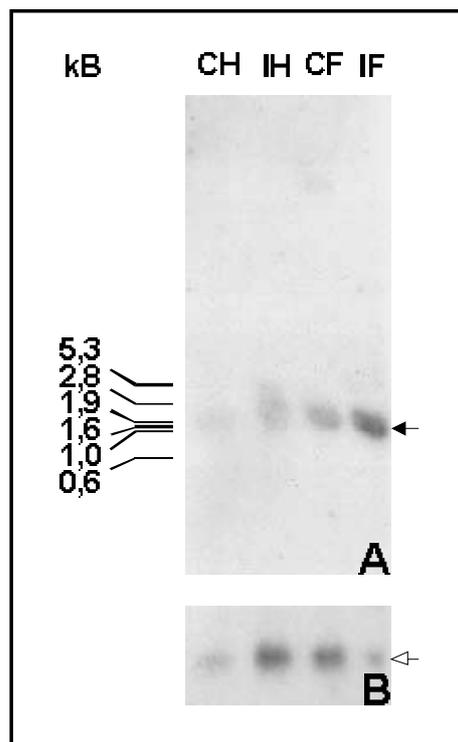


Abb. 48: Northern-Blot Analyse der Expression von FP-1

Gesamt-RNA aus Hämocyten und Fettkörper, mit und ohne experimentelle Infektion, wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einer Blotting-Membran immobilisiert. **A:** Die Detektion der FP-1-RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.4.15. beschrieben mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für FP-1. **B:** Zum Nachweis gleicher RNA-Mengen wurde der Blot mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für das ribosomale Protein S3 von *M. sexta* hybridisiert. IF: RNA aus Fettkörper infizierter Tiere, CF: RNA aus Fettkörper naiver Tiere, IH: RNA aus Hämocyten infizierter Tiere und CH: RNA aus Hämocyten naiver Tiere. Der geschlossene Pfeil zeigt die mRNA der FP-1. Der offene Pfeil zeigt die mRNA des ribosomalen Proteins S3.

Die für die FP-1 kodierende mRNA zeigte im Northern-Blot eine Größe von etwa 1,9 kB. In den Proben aus naiven (CH) und induzierten Hämocyten (IH) konnte keine Induktion der Transkription der FP-1 festgestellt werden. Es war zwar eine Zunahme der detektierten Menge an FP-1 RNA von der naiven Probe zu der Probe aus induzierten Zellen zu erkennen

(Abb. 48A). Allerdings zeigte ein Vergleich mit der Ladekontrolle, dass von der RNA naiver Zellen im Vergleich zu RNA induzierter Zellen weniger RNA aufgetragen wurde (Abb. 48B). In den Proben aus naivem (CF) und induziertem Fettkörper (IF) konnte eine Induktion von FP-1 durch Infektion deutlich beobachtet werden. Die Probe aus induziertem Fettkörper zeigte eine deutliche Signalzunahme im Vergleich zur naiven Probe. Außerdem wurde von der induzierten Fettkörper-RNA deutlich weniger aufgetragen, als von der naiven.

Abb. 49 zeigt einen Northern-Blot detektiert mit einer Sonde spezifisch für HAIP. Die für das HAIP kodierende mRNA hatte eine Größe von etwa 1,6 kB. In Hämozyten war weder in naiven Tieren noch in Larven nach einer bakteriellen Infektion mRNA für HAIP detektierbar. In Fettkörper war die HAIP mRNA jedoch eindeutig nachzuweisen. In den Proben aus diesem Gewebe konnte nach bakterieller Infektion im Vergleich zum naiven Gewebe eine geringfügig intensivere Färbung der Bande beobachtet werden.

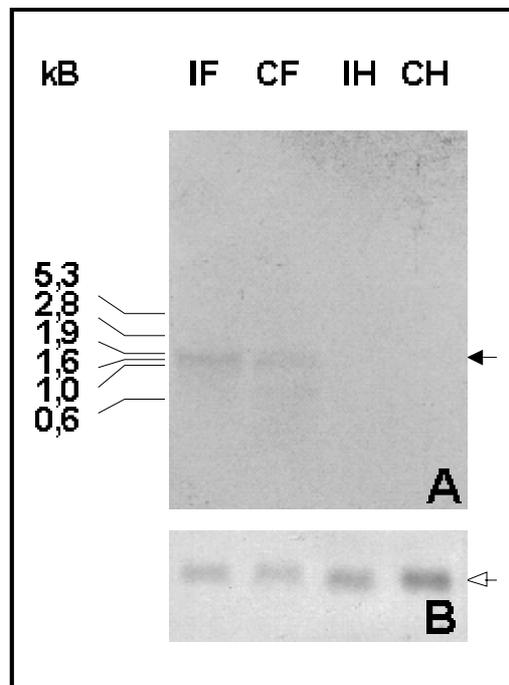


Abb. 49: Northern-Blot Analyse der Expression von HAIP

Gesamt-RNA aus Hämozyten und Fettkörper, mit und ohne experimentelle Infektion, wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einer Blotting Membran immobilisiert. **A:** Die Detektion der HAIP-RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.4.15. beschrieben mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für HAIP. **B:** Zum Nachweis gleicher RNA-Mengen wurde der Blot mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für das ribosomale Protein S3 von *M. sexta* hybridisiert. IF: RNA aus Fettkörper infizierter Tiere, CF: RNA aus Fettkörper naiver Tiere, IH: RNA aus Hämozyten infizierter Tiere und CH: RNA aus Hämozyten naiver Tiere. Der geschlossene Pfeil zeigt die mRNA des HAIP. Der offene Pfeil zeigt die mRNA des ribosomalen Proteins S3.

Die für das MsHc kodierende mRNA zeigte im Northern-Blot eine Größe von 11 kB. Die mRNA des MsHc (s. Abb. 50) konnte sowohl in induzierter wie auch in naiver Hämozyten-mRNA des MsHc nachgewiesen werden. Eine Induktion des MsHc-Gens wurde nicht beobachtet. In den RNA-Proben aus Fettkörper war die mRNA des MsHc nicht detektierbar.

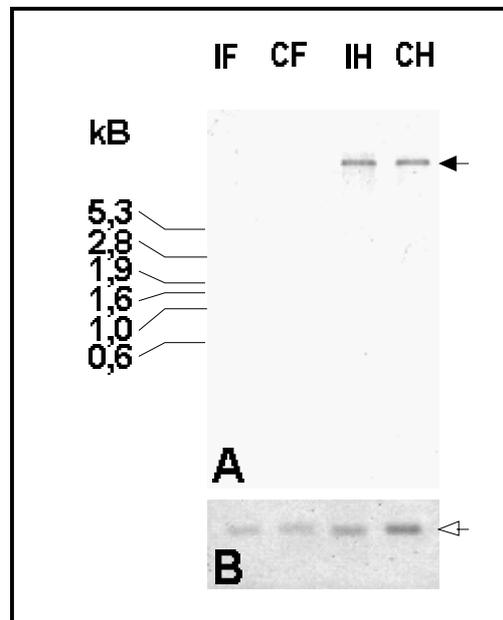


Abb. 50: Northern-Blot Analyse der Expression von MsHc

Gesamt-RNA aus Hämozyten und Fettkörper, mit und ohne experimentelle Infektion, wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einer Blotting Membran immobilisiert. **A:** Die Detektion der MsHc-RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.4.15. beschrieben mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für MsHc. **B:** Zum Nachweis gleicher RNA-Mengen wurde der Blot mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für das ribosomale Protein S3 von *M. sexta* hybridisiert. IF: RNA aus Fettkörper infizierter Tiere, CF: RNA aus Fettkörper naiver Tiere, IH: RNA aus Hämozyten infizierter Tiere und CH: RNA aus Hämozyten naiver Tiere. Der geschlossene Pfeil zeigt die mRNA des MsHc. Der offene Pfeil zeigt die mRNA des ribosomalen Proteins S3.

Im Northern-Blot für das IML-3 (s. Abb. 51) hybridisierten in der RNA aus Fettkörper nach experimenteller Infektion drei Banden in der Größe von 2,8, 4,3 und größer als 5,3 kB mit der Sonde. In der RNA aus naivem Fettkörper war die mittlere dieser Banden nicht detektierbar. Auch die beiden anderen Banden traten weniger intensiv auf. In RNA aus Hämocyten war keine dieser mRNAs nachweisbar.

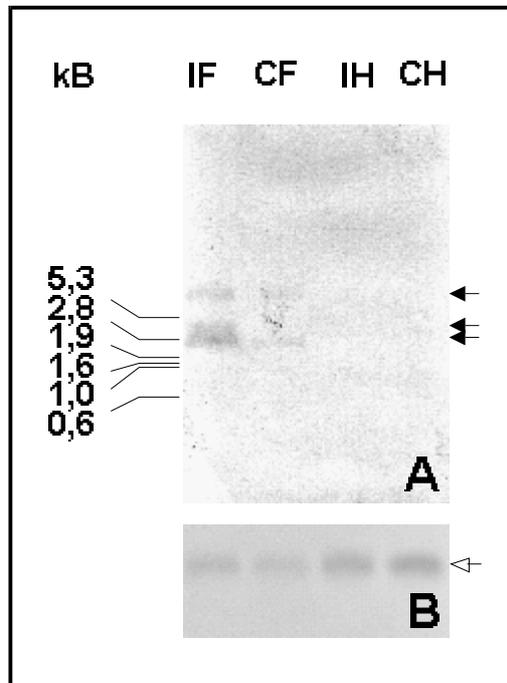


Abb. 51: Northern-Blot Analyse der Expression von IML-3

Gesamt-RNA aus Hämocyten und Fettkörper, mit und ohne experimentelle Infektion, wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einer Blotting Membran immobilisiert. **A:** Die Detektion der IML-3-RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.4.15. beschrieben mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für IML-3. **B:** Zum Nachweis gleicher RNA-Mengen wurde der Blot mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für das ribosomale Protein S3 von *M. sexta* hybridisiert. IF: RNA aus Fettkörper infizierter Tiere, CF: RNA aus Fettkörper naiver Tiere, IH: RNA aus Hämocyten infizierter Tiere und CH: RNA aus Hämocyten naiver Tiere. Die geschlossenen Pfeile zeigen die mRNA des IML-3. Der offene Pfeil zeigt die mRNA des ribosomalen Proteins S3.

4.10. Charakterisierung des HAIP

Bereits bei der Erstbeschreibung eines Fragments von HAIP [Kanost et al. 1994] wurde dem Protein ein Kohlenhydrat-Anteil von 7% zugeschrieben. Aufgrund der Gegenwart einer möglichen N-Glykosylierungssequenz (Position N-220 der Sequenz) sollte überprüft werden, ob der gesamte Kohlenhydrat-Anteil über dieses N gebunden vorliegt. Hierzu wurde nach einer einfachen Methode für die Anreinigung des Proteins gesucht. In ‚Batch‘-Versuchen erwies sich Heparin-Sepharose als ein geeignetes Mittel dafür. In einem Probelauf wurden geeignete Elutionsbedingungen für die Säule getestet (Abb. 52).

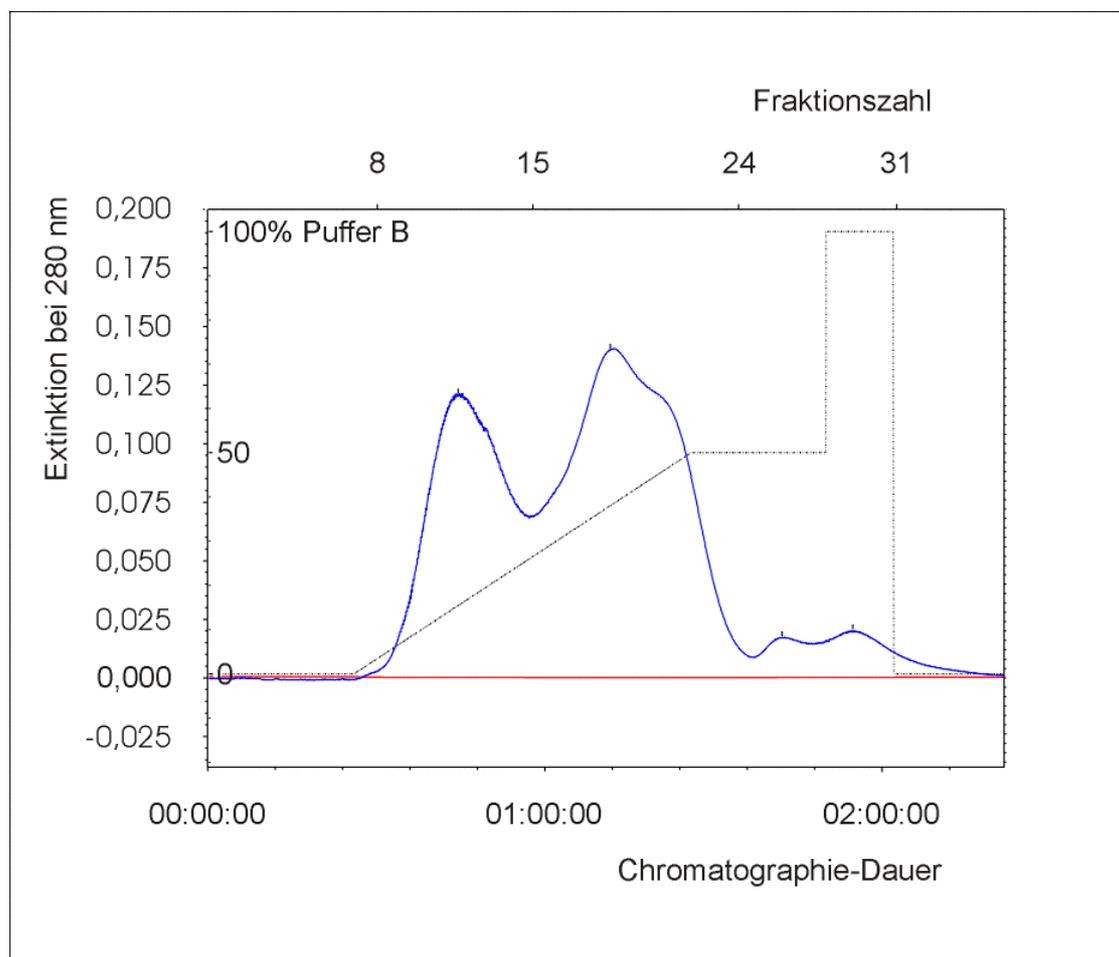


Abb. 52: Reinigung des HAIP mittels Chromatografie über eine Heparin-Säule

Hämolymp- Proteine wurden durch Chromatografie über eine Heparin-Sepharose-Säule fraktioniert. Chromatografie-Bedingungen: 10 min linearer Fluss 92,5% Puffer A (20 mmol/l Tris, pH 7,2), 60 min linearer Gradient bis zu 50% Puffer A, 40 min linearer Fluss mit 50% Puffer A, 20 min linearer Fluss 100% Puffer B (20 mmol/l Tris, pH 7,2, 2 mol/l NaCl) und 40 min linearer Fluss 100% Puffer A. Flussgeschwindigkeit: 10 min mit 0,1 ml/min, anschließend 0,25 ml/min bis zum Ende des Laufes.

Die während dieses Laufes erhaltenen Fraktionen wurden im Western-Blot auf den Gehalt an HAIP getestet (s. Abb. 53). Es zeigte sich, dass HAIP erst bei einem Salzgehalt von 1 Mol NaCl, ab Fraktion 24 bis Fraktion 30, aus der Säule eluierte.

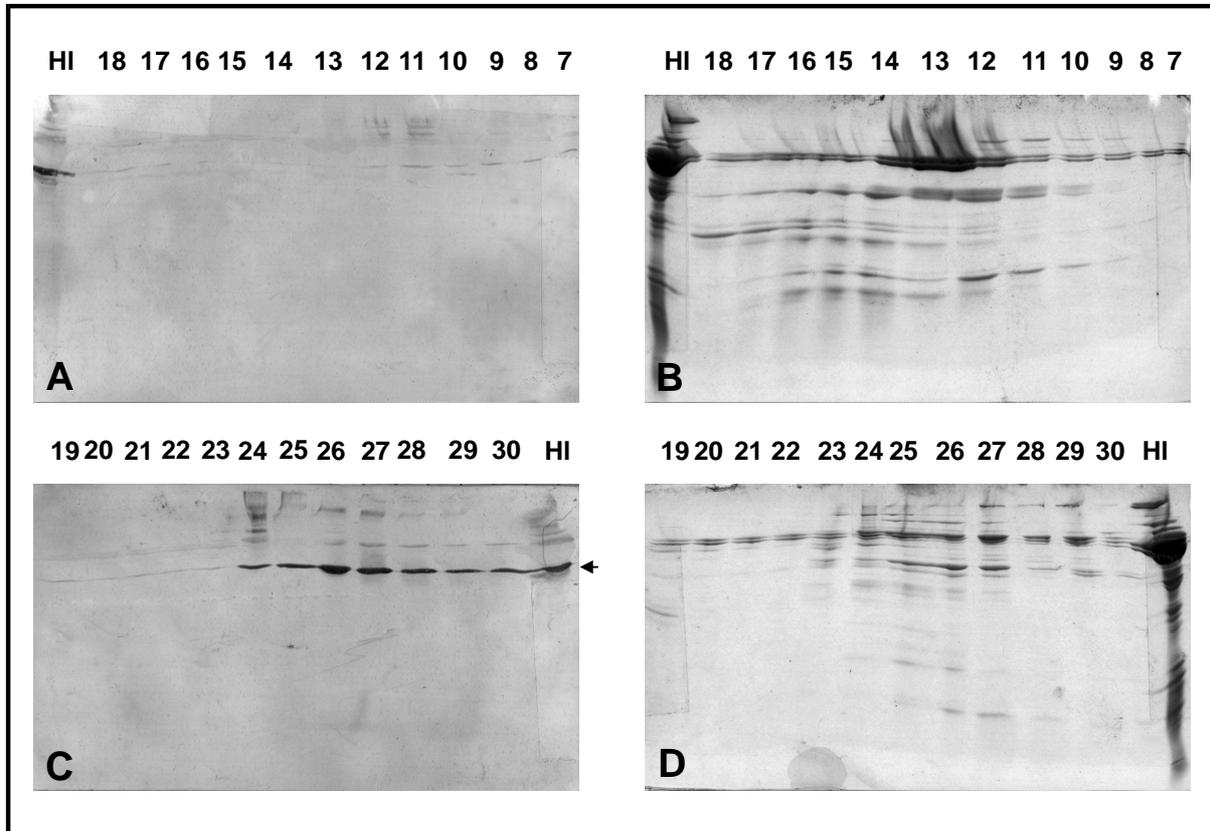


Abb. 53: Nachweis von HAIP in Fraktionen der Heparin-Säule

Die nach Chromatografie von Hämolymphe-Proteinen über eine Heparin-Säule gewonnenen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an HAIP mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Die jeweilige Fraktion aus dem in Abb. 52 gezeigten Chromatografie-Experiment ist über den Abbildungen dargestellt. Als Positiv-Kontrolle wurde Hämolymphe (HI) aufgetragen. **A, C:** Western-Blot mit dem Antikörper gegen HAIP. **B, D:** Coomassie-gefärbtes Gel.

Der Gehalt an weiteren Hämolymp- Proteinen war in diesen Fraktionen deutlich herabgesetzt. Die Fraktionen 24 bis 30 wurden vereinigt, konzentriert und in der Folge zur Deglykosilierung eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Aliquot des partiell gereinigten Proteins unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne N-Glykosidase F, inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Proben in einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Western-Blot mit dem Antikörper gegen HAIP detektiert (s. Abb. 54).

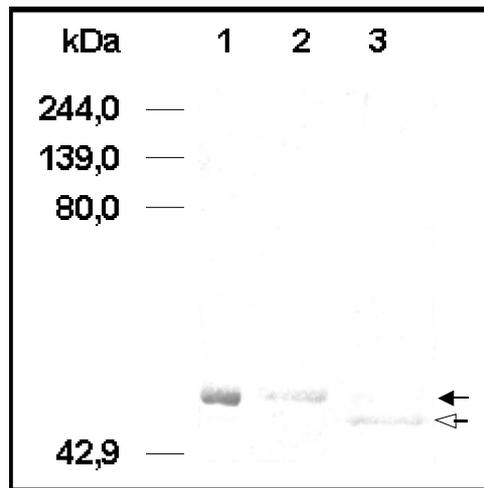


Abb. 54: Deglykosilierung von gereinigtem HAIP

Mittels Chromatografie über eine Heparin-Säule gereinigtes HAIP wurde entsprechend Abs. 3.1.8. mit N-Glykosidase F verdaut. Die Analyse der Behandlung erfolgte mittels Western-Blot. Bahn 1: partiell gereinigtes HAIP (geschlossener Pfeil), Bahn 2: Negativ-Kontrolle des Verdaus und Bahn 3: mittels N-Glykosidase F deglykosiliertes HAIP (offener Pfeil).

In der Enzym-behandelten Probe (Bahn 3) wurde eine Bande von 46,5 kDa von dem Antikörper gegen HAIP detektiert. Diese Bande trat weder in der Kontrollreaktion (Bahn 2) noch im ursprünglich eingesetzten Protein (Bahn 1) auf. In diesen zwei Proben konnte hingegen HAIP mit einer Größe von 50 kDa detektiert werden. In der deglykosilierten Probe war diese Bande nicht darstellbar. Die Differenz des Molekulargewichtes zwischen HAIP und der Bande des deglykosilierten HAIPs betrug 3,5 kDa. Diese Differenz entsprach den bereits publizierten 7% Kohlenhydrat-Anteil am Molekulargewicht des HAIP [Kanost et al. 1994].

4.10.1. Chitin-Bindungstest mit HAIP

Aufgrund der großen Ähnlichkeit von HAIP mit Chitinasen wurde überprüft, ob HAIP ein Chitin-bindendes Lektin darstellt. Ferner wurden verschiedene Kohlenhydrate auf ihre Fähigkeit hin untersucht, diese Bindung zu kompetieren. Wie in Abb. 55 zu erkennen ist, bindet HAIP Chitin (Bahn C+).

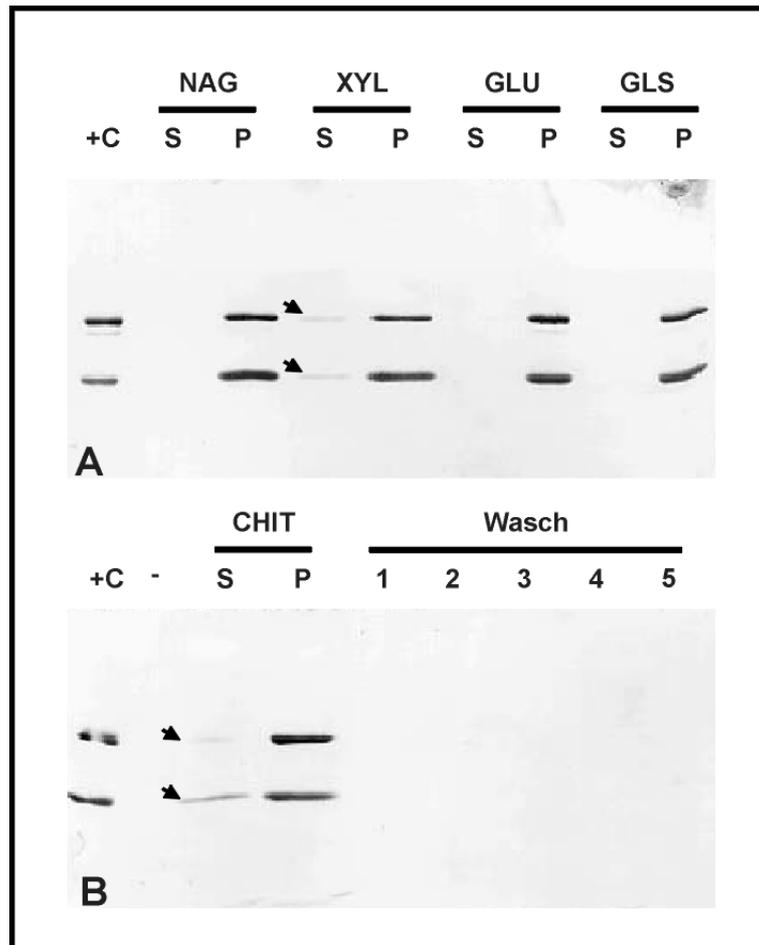


Abb. 55: Chitin-Bindungstest mit gereinigtem HAIP

HAIP wurde mit Chitin inkubiert und nach erfolgter Bindung ausgiebig gewaschen. Für Kompetitions-Experimente wurde vor der Inkubation mit Chitin das jeweilige Kohlenhydrat zum HAIP gegeben. Anhaftende Proteine wurden durch Denaturierung vom Chitin abgelöst und mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit dem Antikörper gegen HAIP analysiert. Positiv-Kontrolle: +C, S: Überstand der Inkubation mit Chitin und P: an Chitin bindendes Protein. **A:** N-Acetylglucosamin (NAG), Xylose (XYL), Glucose (GLU) und Glucosamin (GLS). **B:** Chitosan (CHIT) und Überstände der Waschschrte (WASCH, 1: NAG, 2: XYL, 3: GLU, 4: GLS und 5: CHIT).

Von den zur Konkurrenz eingesetzten Kohlenhydraten konnten nur Xylose und Chitosan in geringem Umfang die Bindung von HAIP an Chitin inhibieren. Bei der Entwicklung der Blots konnte in den Proben des gereinigten Proteins eine zweite Bande von etwa 30 kDa mit dem Antikörper detektiert werden. Daneben war in Coomassie gefärbten Gelen auch eine zusätzliche Bande von etwa 18 kDa darstellbar, die von dem Antikörper nicht eindeutig detektiert wurde. Wie sich zeigte, wurde das 30 kDa-Protein durch ein Abbau-Produkt des HAIP hervorgerufen. Das Abbau-Produkt wurde ansequenziert. Die erste Aminosäure der erhaltenen Sequenz wurde von Thr-162 des reifen HAIP gebildet (persönliche Mitteilung Dr. Yu, Dept. of Biochemistry, Kansas State University, Manhattan, Kansas). Demzufolge wurde durch diese Spaltung der in Chitinasen funktionelle Bereich abgespalten. Das 30 kDa Fragment des HAIP zeigte ebenfalls eine Bindung von Chitin. Jedoch war diese Bindung geringfügig sensitiver für die Konkurrenz mit Xylose und Chitosan. Beide Proteine waren bereits im Ausgangsmaterial nachweisbar, d. h. die Degradation war bereits während der Reinigung des HAIP erfolgt.

4.10.2. Bestimmung des Gehalts von HAIP in der Hämolymphe verschiedener Entwicklungsstadien von *M. sexta*

Um eine mögliche Bedeutung von HAIP in entwicklungsbiologischen Prozessen festzustellen, wurde der Hämolymphe-Gehalt an HAIP in verschiedenen Stadien der Entwicklung von *M. sexta* untersucht. Hierzu wurden serielle Verdünnungen der Hämolymphe mittels Dot-Blot auf einer Westran-Membran aufgebracht. Die Detektion erfolgte wie bei einem gewöhnlichen Western-Blot mit dem Antikörper gegen HAIP. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Blotting-Papiere untereinander zu gewährleisten, wurde auf jede Membran eine serielle Verdünnung eines Standard-Hämolymphe-Pools aufgetragen. Die Membranen wurden von drei unabhängigen Personen, denen die Anordnung der Proben nicht bekannt war, ausgewertet. Dabei wurde die Verdünnung bestimmt, bei der keine vom Hintergrund unterscheidbare Färbung der Probeflecken (Dots) mehr zu erkennen war. Die erhaltenen Werte der drei Personen wurden anschließend gemittelt, auf den internen Standard relativiert und auf die Protein-Konzentration in der Hämolymphe bezogen. Von jedem untersuchten Larvenstadium wurden drei einzelne Tiere eingesetzt. In Abb. 56 sind die so erhaltenen Ergebnisse in relativen Einheiten HAIP pro μg Protein dargestellt. Zur besseren Unterscheidung der drei Tiere pro Larvenstadium wurde der Stadien-Abfolge jedes einzelnen Tieres eine unterschiedliche Farbe zugeteilt.

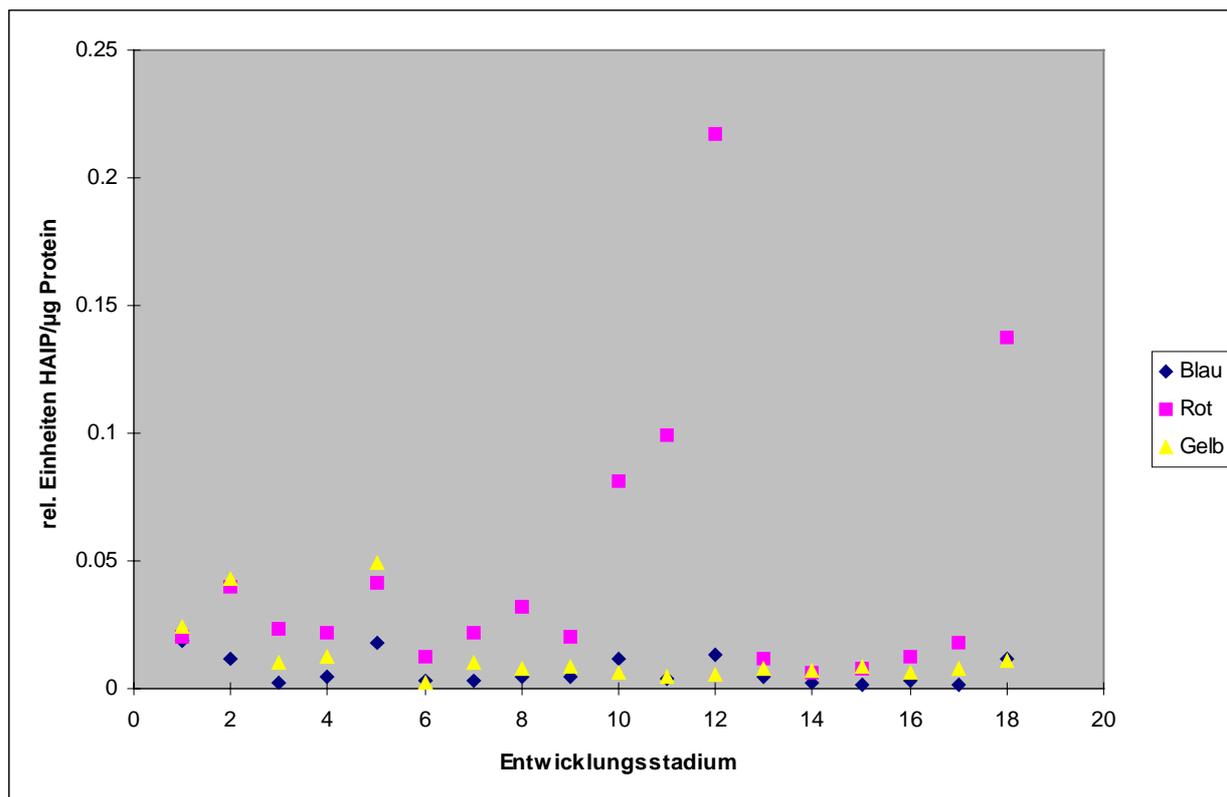


Abb. 56: Hämolympf-Gehalt von HAIP in verschiedenen Entwicklungsstadien

Serielle Verdünnungen zellfreier Hämolympf-Proben von *M. sexta* Larven verschiedener Entwicklungsstadien wurden mittels Dot-Blot auf den Gehalt an HAIP untersucht. Die Detektion erfolgte mittels eines für HAIP spezifischen Antikörpers. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Verdünnung, bei der keine Färbung in den Spots mehr feststellbar war. Diese Auswertung wurde im Blindversuch durch drei unabhängige Testpersonen durchgeführt. Die Messergebnisse verschiedener Membranen wurden durch einen internen Standard vereinheitlicht und zum Proteingehalt der verschiedenen Proben in Bezug gesetzt. Die Untersuchung wurde mit Hämolymphe von drei unabhängig gewonnenen Proben je Larvenstadium durchgeführt, symbolisiert durch unterschiedliche Färbung der Messpunkte (Blau, Rot und Gelb). Folgende Larvenstadien wurden untersucht: fressende Larven des Stadiums 3 und 4 (L3 f und L4 f), Kopfkapselvorschub zeigende Larven des Stadiums 3 und 4 (L3 h und L4 h), Larven am dritten Tag des Stadiums 5, Larven im Wanderstadium, mit sichtbarem Dorsalgefäß, von Tag 1 bis Tag 5 (W 1 bis W 5) sowie Puppen von Tag 1 bis Tag 8 des Puppenstadiums (P 1 bis P 8).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten eine deutliche Schwankung zwischen den Tieren eines Larvenstadiums. Die Tiere der Versuchsreihe ‚Rot‘ zeigten insgesamt sehr hohe Werte verglichen mit den Versuchsreihen ‚Gelb‘ und ‚Blau‘. Dies wurde besonders bei späten Larvenstadien deutlich. Daneben war in Larven des Stadiums 3 und am dritten Tag des Stadiums 5 ein etwas erhöhter Gehalt an HAIP in der Hämolymphe zu beobachten.

4.11. Immunhistochemische Untersuchungen an Hämozyten und Gewebeschnitten

Zur weiteren Charakterisierung der klonierten Proteine wurde die Verteilung der Proteine in Hämozyten-Präparaten und Gewebeschnitten untersucht. Die Hämozyten-Präparate wurden dabei von naiven Tieren, von Saline-behandelten Tieren und von Bakterien-injizierten Tieren hergestellt. Die Gewebeschnitte stammten von naiven Tieren.

4.11.1. Fettkörper-Protease 1 (FP-1)

In Hämozyten-Präparaten von naiven Tieren (Abb. 57, **A** und **B**) konnte eine deutliche Nachweis-Reaktion für FP-1 in Bestandteilen des Cytosols von Oenocytoiden beobachtet werden. Weder Plasmatozyten noch granuläre Zellen zeigten eine Färbung durch den Antikörper gegen FP-1. In Hämozyten-Präparaten von Saline-injizierten Larven (Abb. 57, **C** und **D**) konnte auch eine intensive Reaktion von vesikulären Strukturen in granulären Zellen beobachtet werden. Es erwiesen sich jedoch nicht alle granulären Zellen FP-1 positiv. Plasmatozyten wurden auch in diesen Tieren nicht angefärbt. Oenocytoide wurden in den ausgewerteten Präparaten nicht gefunden.

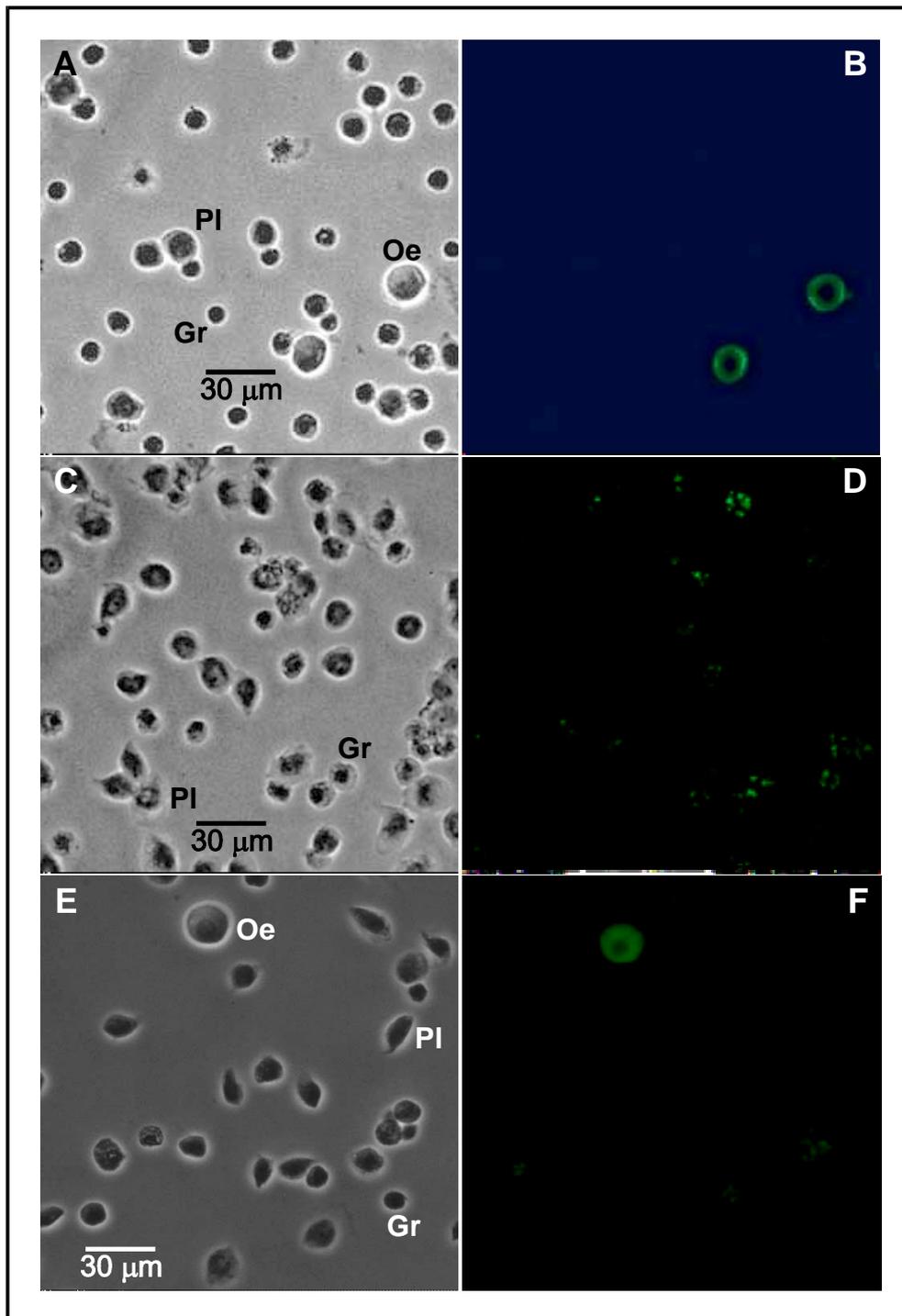


Abb. 57: Bindungsmuster des Antikörpers gegen FP-1 an Hämocyten von *M. sexta* nach unterschiedlicher Behandlung

Hämocyten von naiven (A, B), Saline-injizierten (C, D) und Bakterien-injizierten Larven (E, F) wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen FP-1 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. In naiven und Bakterien-injizierten Tieren sind die Oenozytoiden (Oe) deutlich FP-1 positiv. In Saline-behandelten Tieren sind auch vesikuläre Strukturen einiger granulärer Zellen (Gr) deutlich markiert. Plasmatozyten (Pl) zeigten keine Reaktion mit dem FP-1 Antikörper.

In Präparaten von Bakterien-infizierten Tieren (Abb. 57, **E** und **F**) zeigte sich eine deutlich schwächere Reaktion der vesikulären Strukturen in granulären Zellen mit dem FP-1 Antikörper. Die Plasmatozyten waren auch in diesen Präparaten FP-1-negativ. Oenozytoide zeigten auch in diesen Tieren eine deutliche Cytoplasma-Färbung.

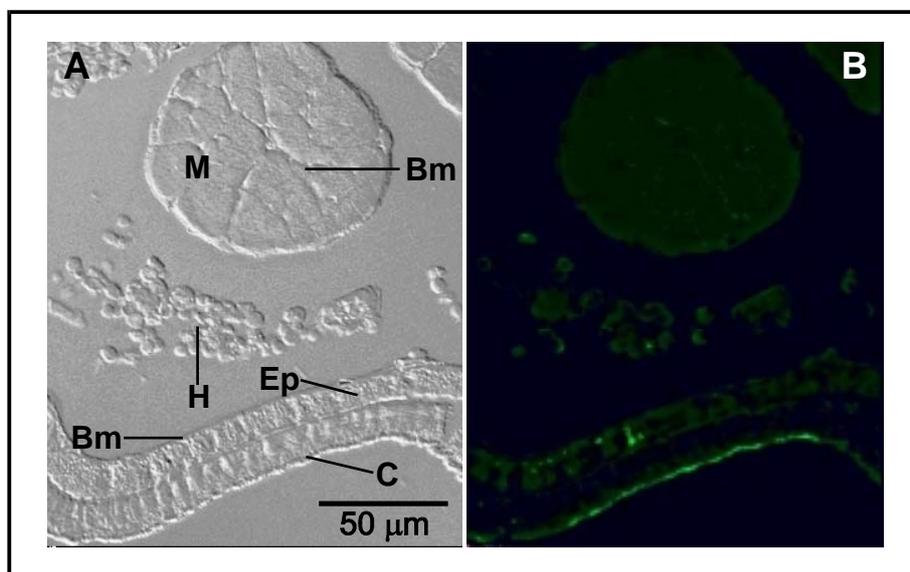


Abb. 58: Nachweis von FP-1 in Gewebeschnitten von *M. sexta*

Gewebeschnitte wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen FP-1 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. Basalmembran (Bm), Cuticula (C), Epidermis (Ep) und Hämocyten (H) zeigten eine unterschiedlich intensive Reaktion mit dem Antikörper. Muskelgewebe war FP-1 negativ.

In Gewebeschnitten von *M. sexta* Larven (Abb. 58) konnte eine schwache Färbung sowohl der Basalmembran unterhalb der Epidermis als auch um das Muskelgewebe herum beobachtet werden. Das reine Muskelgewebe selbst reagierte nicht. Auch Hämocyten zeigten eine schwache Reaktion mit dem Antikörper. Die äußerste Schicht der Cuticula war deutlich FP-1-positiv. In einigen Fällen war eine punktuelle Färbung in der Epidermis zu beobachten.

4.11.2. Hämocyten-Aggregation-Inhibierendes-Protein (HAIP)

In den Hämocyten-Präparaten, die mit dem Antikörper gegen HAIP behandelt worden waren (Abb. 59) zeigte sich insgesamt eine abnehmende Intensität der Färbung der Hämocyten von naiven Tieren (Abb. 59, **A** und **B**), über Saline-injizierte Tiere (Abb. 59, **C** und **D**) zu den Tieren nach bakterieller Infektion (Abb. 59, **E** und **F**). In den Hämocyten wurden vesikuläre Strukturen in granulären Zellen markiert. Daneben konnte in diesem Zelltyp auch eine diffuse Färbung des Cytosols beobachtet werden. Auch von dem HAIP-Antikörper wurden nicht alle granulären Zellen angefärbt. Plasmatozyten zeigten keine Fluoreszenz.

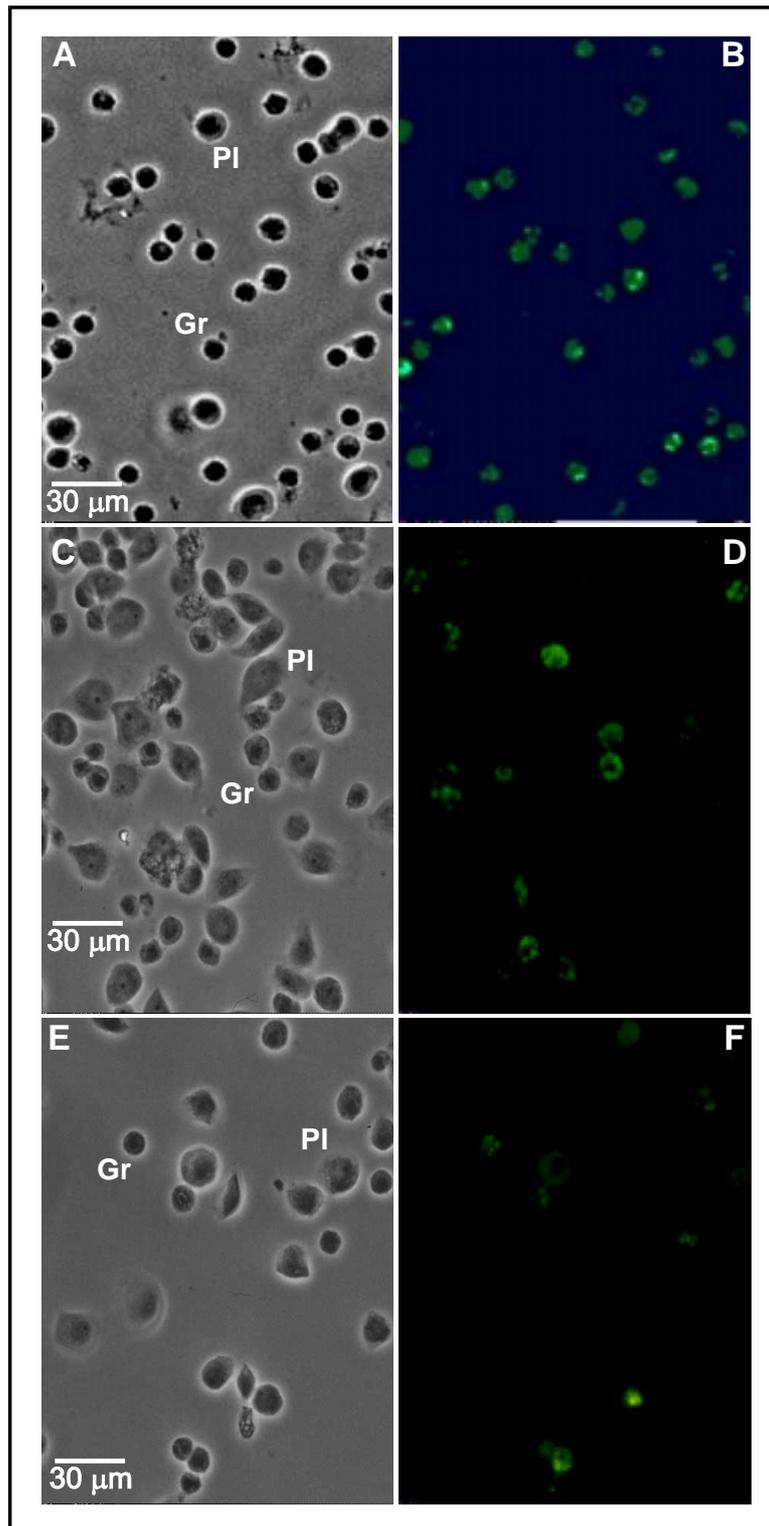


Abb. 59: Bindungsmuster des Antikörpers gegen HAIP an Hämozyten von *M. sexta* nach unterschiedlicher Behandlung

Hämozyten von naiven (A, B), Saline-injizierten (C, D) und Bakterien-injizierten Larven (E, F) wurden mit einer 1:1000 Verdünnung des Antikörpers gegen HAIP und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. In den verschiedenen behandelten Tieren waren granuläre Zellen (Gr) deutlich HAIP-positiv. Es zeigte sich eine abnehmende Intensität der Reaktion von naiven zu Bakterien-injizierten Tieren. Plasmatozyten (PI) waren nur in Bakterien-injizierten Tieren schwach HAIP-positiv.

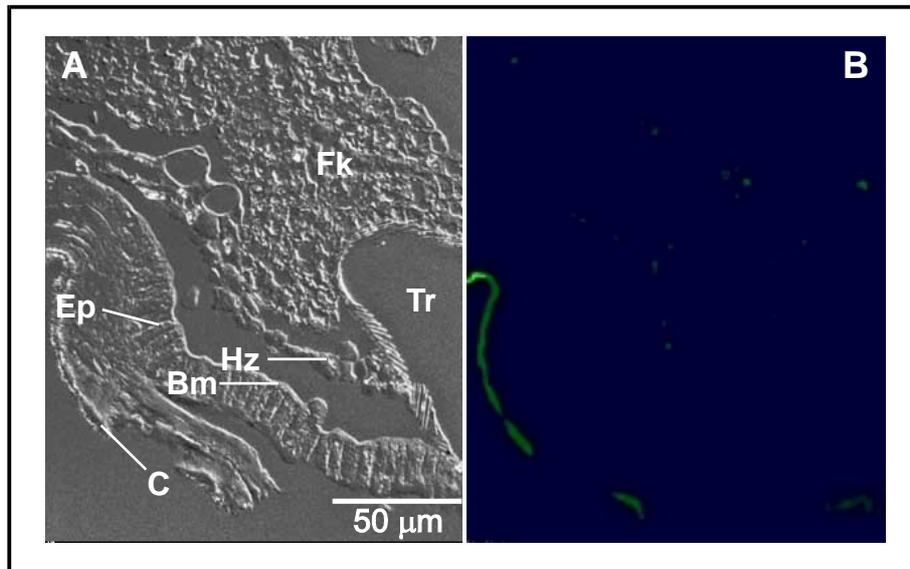


Abb. 60: Nachweis von HAIP in Gewebeschnitten von *M. sexta*

Gewebeschnitte wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen HAIP und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. Die äußerste Schicht der Cuticula (C) und des Fettkörpers (Fk) zeigen eine schwache, beim Fettkörper punktuelle Fluoreszenz. Basalmembran (Bm), Epidermis (Ep) und Tracheen (Tr) waren HAIP-negativ. Hämocyten, im Schnitt nicht näher identifizierbar, wiesen punktuell eine positive Reaktion mit dem HAIP-Antikörper auf.

In den Gewebeschnitten konnte eine positive Reaktion mit dem HAIP-Antikörper deutlich an der äußeren Cuticulaschicht nachgewiesen werden (Abb. 60). Ferner zeigten sich im Fettkörper punktuelle Fluoreszenzen. Möglicherweise wurden diese von eingewanderten oder anhaftenden Hämocyten verursacht. Andere Gewebe waren HAIP-negativ.

4.11.3. Immunolektin-3 (IML-3)

Immunolektin-3 konnte in Saline-behandelten Tieren nur in sehr wenigen Hämocyten nachgewiesen werden (Abb. 61, A und B). Eindeutig positiv erwiesen sich dabei eine geringe Anzahl granulärer Zellen. In diesen Zellen reagierten Vesikel mit dem Antikörper. Auch wenige Plasmatozyten zeigten eine diffuse Färbung des Cytosols. Bei infizierten Tieren war die Menge IML-3-positiver Zellen größer (Abb. 61, C und D). Auch hier wurden granuläre Zellen und Plasmatozyten markiert. Die Färbung verteilte sich dabei sowohl auf das Cytosol als auch auf vesikuläre Strukturen.

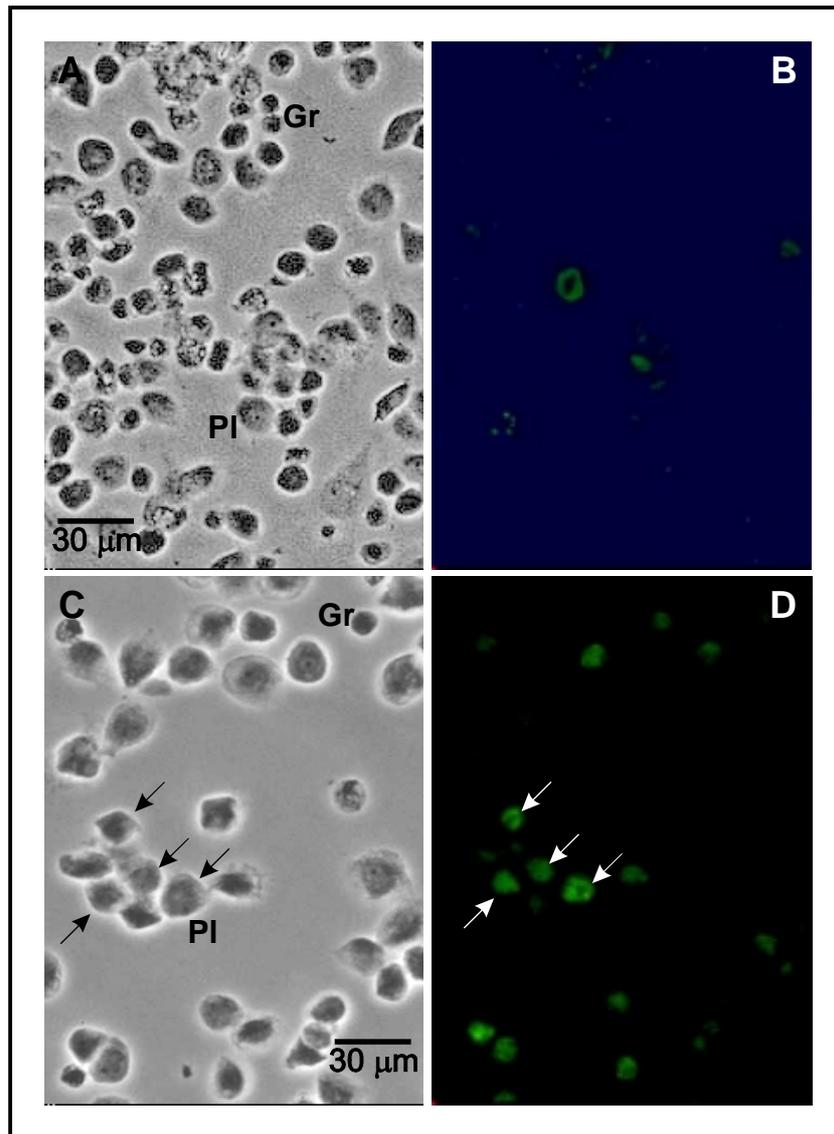


Abb. 61: Bindungsmuster des Antikörpers gegen IML-3 an Hämozyten von *M. sexta* nach unterschiedlicher Behandlung

Hämozyten von Saline-injizierten (A, B) und Bakterien-injizierten Larven (C, D) wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen IML-3 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. In den Saline-behandelten Tieren waren deutlich weniger Hämozyten IML-3-positiv als in den Bakterien-injizierten Larven. Sowohl granuläre Zellen (Gr) als auch Plasmatozyten (Pl) wurden von dem IML-3 Antikörper markiert, jedoch waren nicht alle Zellen IML-3 positiv.

In Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass auch Hämozyten von naiven Tieren von dem Antikörper gegen IML-3 detektiert werden (Abb. 62). Diese Hämozyten zeigten eine diffuse bis membranständige Färbung. Zudem zeigte sich, dass sowohl Cuticula als auch Epidermis nur eine schwache Eigenfluoreszenz aufweisen.

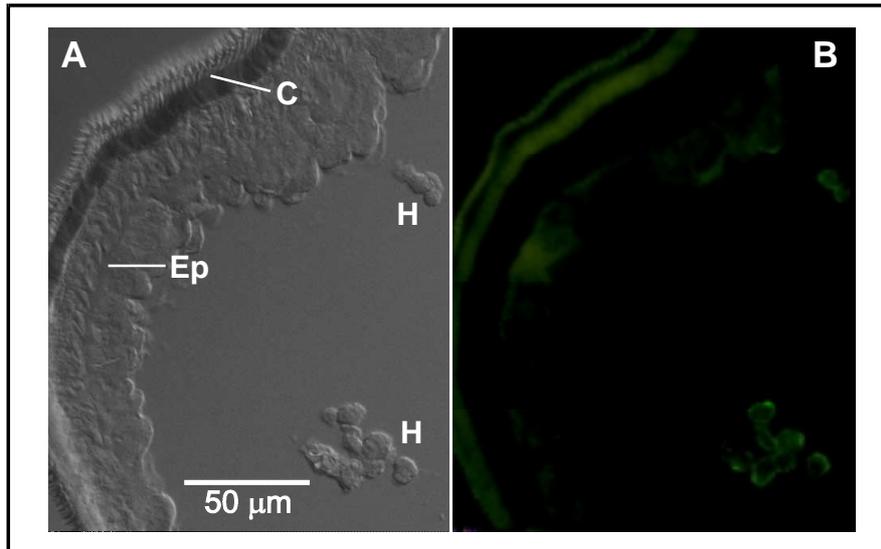


Abb. 62: Nachweis von IML-3 in Gewebeschnitten von *M. sexta*

Gewebeschnitte wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen IML-3 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. Cuticula (C) und Epidermis (Ep) zeigten eine schwache Eigenfluoreszenz. Hämocyten (H) zeigten eine unterschiedlich intensive Reaktion mit dem Antikörper.

In weiteren Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass der Fettkörper eindeutig IML-3-positiv war (Abb. 63). Das Fettkörper-Gewebe zeigte dabei eine diffuse Färbung. In einigen Bereichen traten dabei auch intensiv gefärbte Spots auf. Ferner konnte in diesem Schnitt auch gezeigt werden, dass Tracheen und Muskulatur IML-3-negativ waren.

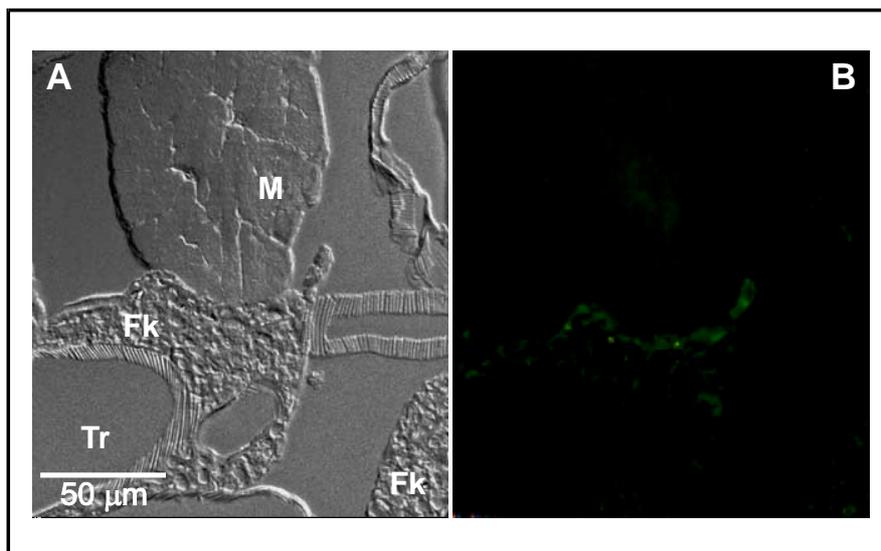


Abb. 63: Nachweis von IML-3 in Gewebeschnitten von *M. sexta*

Gewebeschnitte wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen IML-3 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. Muskelgewebe (M) war IML-3-negativ. Fettkörper (Fk) hingegen erwies sich als deutlich IML-3 positiv.

4.11.4. *Manduca sexta* Hemocytin (MsHc)

Der Antikörper gegen MsHc reagierte mit Hämocyten (Abb. 64). Dabei zeigte sich in Präparaten von naiven Tieren (Abb. 64, **A** und **B**) eine diffuse Färbung von granulären Zellen. Bei Präparaten Saline-injizierter Tiere waren weniger Zellen angefärbt (Abb. 64, **C** und **D**). Eine genaue Identifizierung des Zelltyps war nicht möglich, da die Reaktion in Bereichen von Zellanhäufungen zu beobachten war. In Hämocyten-Präparaten infizierter Tiere (Abb. 64, **E** und **F**) konnte der Typ der positiv reagierenden Zellen eindeutig ausgemacht werden. Granuläre Zellen zeigten eine diffuse bis “gespottete” Färbung.

In einigen Fällen entstand der Eindruck, dass diese Färbung im Bereich von Zell-Zell-Kontakten oder bei degranulierenden Zellen besonders deutlich wurde.

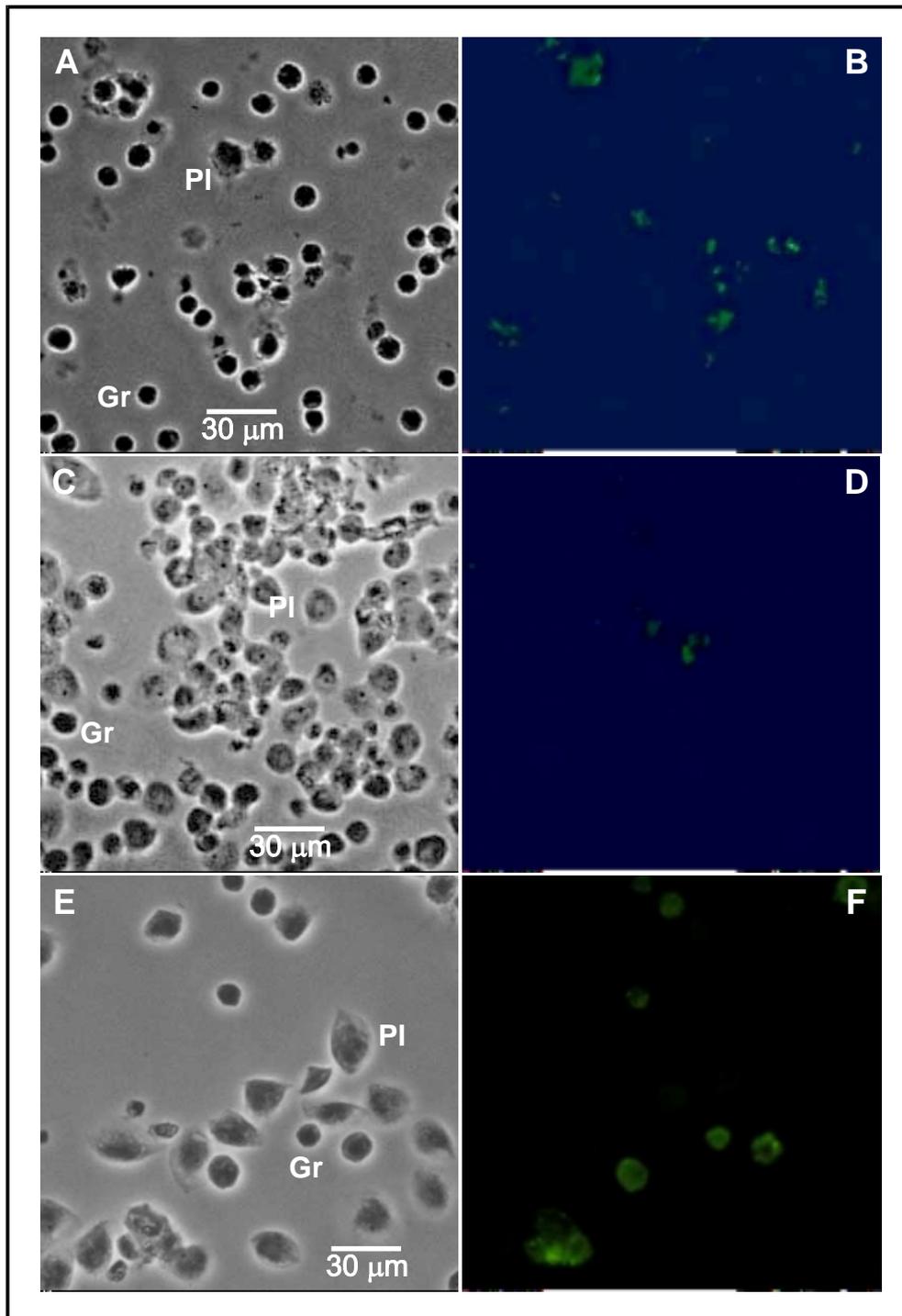


Abb. 64: Bindungsmuster des Antikörpers gegen MsHc an Hämocyten von *M. sexta* nach unterschiedlicher Behandlung

Hämocyten von naiven (A, B), Saline-injizierten (C, D) und Bakterien-injizierten Larven (E, F) wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen MsHc und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. Nur granuläre Zellen (Gr) waren MsHc-positiv. Plasmatozyten (Pl) wurden vom MsHc-Antikörper nicht erkannt.

In Gewebeschnitten reagierte kein Gewebe eindeutig (Abb. 65). In einigen Präparaten traten vereinzelt schwach gefärbte Bereiche hervor. Diese wurden aber vermutlich von anhaftenden oder ins Gewebe eingewanderten Hämozyten hervorgerufen.

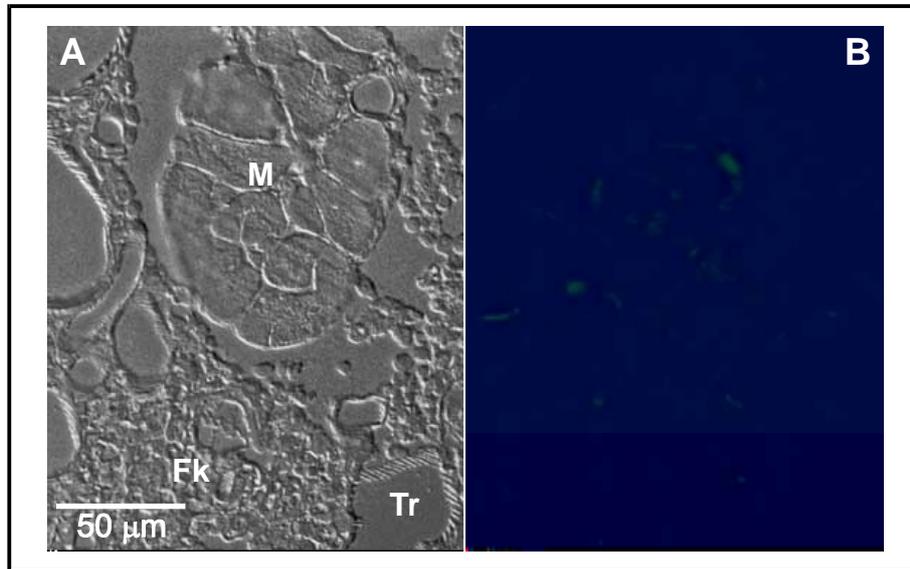


Abb. 65: Nachweis von MsHc in Gewebeschnitten von *M. sexta*

Gewebeschnitte wurden mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers gegen MsHc und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline behandelt. Die im Schnitt sichtbaren Gewebetypen Fettkörper (Fk), Muskel (M) und Tracheen (Tr) zeigten keine Reaktion mit dem Antikörper gegen MsHc. Einige schwache Fluoreszenzen wurden vermutlich von anhaftenden Hämozyten hervorgerufen.

5. Diskussion

5.1. Nachweis von Bindungsfaktoren in Hämozyten-Membranen von *M. sexta*

Nach einer bakteriellen Infektion kommt es bei Insekten zu zahlreichen Veränderungen im Stoffwechsel und in der Aktivität verschiedener Organe. Dazu zählt beispielsweise die Aktivierung konstitutiv in der Hämolymphe vorliegender Proteine, Sekretion von gespeicherten Substanzen oder eine Neusynthese von antimikrobiell wirkenden Faktoren. Abänderungen im Aktivitätsmuster kann bei den Blutzellen der Insekten, den Hämozyten beobachtet werden: Ihre Adhäsivität ist abgewandelt und sie reagieren mit einer Aufnahme oder Einkapselung von Fremdkörpern. Bisher sind die diesen Reaktionen zugrunde liegenden Mechanismen allerdings nur bruchstückhaft untersucht. Es existieren noch keine zusammenhängenden Vorstellungen über die beteiligten Abläufe [Hoffmann 1995; Hoffmann et al. 1996; Gillespie et al. 1997; Hoffmann et al. 1997; Trenczek 1998; Franc et al. 2000; Kimbrell et al. 2001].

Es wird angenommen, dass eine Aktivitätsänderung von Hämozyten durch eine spezifische Bindung einer konservierten Struktur eines Pathogens (z. B. Peptidoglykan von Gram-positiven Bakterien oder Lipopolysaccharid von Gram-negativen Bakterien) durch einen oder mehrere Bindungsmoleküle oder Rezeptoren initiiert wird. Mehrere derartige Moleküle sind in den letzten Jahren bei Insekten beschrieben worden. Viele gehören zur Familie der Lektine [Franc et al. 2000] und nur wenige Moleküle mit anderer Spezifität wurden bisher beschrieben. Hierzu gehört z. B. Apo-Lipophorin III [Nieme et al. 1999; Halwani et al. 2000] und Hemolin [Daffre et al. 1997]. Die überwiegende Mehrzahl dieser Moleküle wird in die Hämolymphe sezerniert. Membran-ständige Bindungsmoleküle für Lipopolysaccharid (LPS) wurden bisher nur bei wenigen Insektenarten, z. B. bei *Bombyx mori* [Xu et al. 1995], *Galleria mellonella* [Klünner 1994] und *Ceratis capitata* [Charalambidis et al. 1996], identifiziert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und nähere Charakterisierung von derartigen Bindungsmolekülen, oder Molekülen, die auf andere Art an der Aktivierung von Hämozyten von *Manduca sexta* beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Wege beschritten: Mittels Affinitätsreinigung sollten potentielle Bindungsfaktoren in Hämozytenmembranen nachgewiesen und nachfolgend aufgereinigt werden. Hierzu wurde Lipopolysaccharid an eine nicht-lösliche Matrix nach Minetti et al. [Minetti et al. 1991] kovalent gebunden. Diese Methode wurde bereits von Klünner [Klünner 1994] erfolgreich für den Nachweis LPS-bindender Proteine in der Hämolymphe und in

Hämozytenmembranen von *G. mellonella* eingesetzt. Auch in Hämozytenmembranen von *M. sexta* gelang so der Nachweis von mehreren Proteinen mit Affinität zu LPS (Abb. 6). Besonders deutlich waren die Proteine P21 a und b in den Hämozytenmembranen nachweisbar, dagegen waren diese beiden Proteine in Hämolymphe von naiven und mit Bakterien injizierten Tieren nicht erkennbar (Abb. 7A). Mittels Western-Blot-Technik konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei P21 a und b um das bei *G. mellonella* als LPS-bindendes Protein beschriebene Apolipoprotein III [Nieme et al. 1999] bzw. Lipoprotein [Kato et al. 1994] handelte (Abb. 7B, C). Aufgrund dieser Befunde wurde im Folgenden versucht, die Bedingungen für eine Reinigung zu optimieren. Dazu wurde die Bindung der Proteine an die Affinitätsmatrix durch Konkurrenz mit freiem LPS gelöst. Anhand der mit den Eluaten durchgeführten Gele wurde keine erfolgreiche Elution mit freiem LPS beobachtet. Wegen des sehr dunkeln Hintergrundes waren weder schwach gefärbte Banden erkennbar noch waren die Gele als Abbildung darstellbar. Als Alternative wurde anschließend die Elution mit Harnstoff und parallel dazu mit einer Erniedrigung des pH-Wertes im Elutionspuffer versucht (Abb. 8). Mit keiner dieser Varianten gelang es, die Bindung von P21 a und b an die Affinitätsmatrix zu lösen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Klünner [Klünner 1994] bei der Darstellung von Hämozyten-Membranproteinen von *G. mellonella* mit Affinität zu LPS und Ma [Ma et al. 2000] bei der Isolierung eines β -1,3-bindenden Proteins aus der Hämolymphe von *M. sexta* erzielt. Variationen in der Präparation der Hämozytenmembranen ergaben nur insgesamt eine Verdünnung der Proteine. Dagegen zeigte ein vorgeschalteter Präzipitationsschritt bei 25% Ammoniumsulfat (Abb. 9) eine deutliche Anreicherung von P21 a und b im Präzipitat.

Aufgrund der Befunde der Vorversuche wurde für einen Sequenzierungsversuch ein Reinigungsschema entwickelt, das nach der Gewinnung der Membranproteine eine Präzipitation mit 25% Ammoniumsulfat einschloss. Die präzipitierten Proteine wurden nach einer Prä-Adsorption an Agarose-Matrix mit LPS-Agarose inkubiert und nach intensiven Waschschritten denaturiert. Nach einer Auftrennung und einem Transfer auf PVDF-Membran wurden die Banden der Proteine P21 a und b ausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzierung nach Edman unterzogen. Von den ausgeschnittenen Banden ließ sich mittels Edman-Sequenzierung keine lesbare Sequenz ermitteln. Eine Ursache hierfür könnte in der Blockierung des N-Terminus des Proteins liegen.

5.2. Herstellung von Expressionsbibliotheken aus Fettkörper und Hämocyten

Den Schwerpunkt der molekularbiologischen Untersuchungen sollte die Isolierung und Charakterisierung von Bindungsmolekülen/Rezeptoren für konservierte Strukturen Gram-negativer Bakterien, sowie Anderer an der Aktivierung von Hämocyten beteiligter Faktoren bilden. Als Basis für diese Untersuchungen wurden Expressionsbanken aus Fettkörper- und Hämocyten-mRNA experimentell infizierter Tiere hergestellt. Die Stimulation der Immunantwort wurde durch den Nachweis des induzierbaren Immunolektin-1 (Fettkörper-RNA) [Yu et al. 1999] und des induzierbaren Hemolin (Hämocyten-RNA) [Ladendorff et al. 1990] nachgewiesen (Abb. 10). Der Umfang der erhaltenen Bibliotheken lag mit 7×10^5 unabhängigen Klonen pro 100 ng cDNA für den Fettkörper und 2×10^6 unabhängigen Klonen pro 100 ng cDNA für die Hämocyten im Bereich, der anhand der Produktinformationen zu erwarten war (1×10^6 unabhängige Klone pro 100 ng cDNA, s. Tabelle 3). Um eine grobe Übersicht über die Integrität der einzelnen cDNAs zu erhalten, wurden je Genbank zehn nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Klone isoliert und ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Vergleich mit Genbank-Daten des Nationalen Gesundheitsinstituts der USA (NIH) weiter charakterisiert. Die Ergebnisse (s. Tabelle 4) für die Expressionsbank aus Fettkörper ergaben, dass fünf der ansequenzierten Klone in voller Länge erhalten wurden. Bei zwei weiteren cDNAs lag ein potentiell Translations-Startcodon vor; aufgrund der Länge der cDNA wurde gefolgert, dass die komplette kodierende Sequenz isoliert wurde. Vier der von den isolierten cDNAs kodierten Proteine ließen einen direkten Zusammenhang mit Aktivierungsvorgängen bei Hämocyten vermuten:

Lysozym (IFb-3) ist bereits seit längerem als ein an Abwehrprozessen beteiligtes Enzym bekannt. Die durch Lysozym freigesetzten Abbauprodukte vermögen in Insekten die Synthese anti-mikrobieller Proteine zu stimulieren [Dunn et al. 1985]. **Immunolektin-3** (IML-3, IFb-2) zeigte eine große Sequenz-Übereinstimmung mit dem von *Periplaneta americana* beschriebenen LPS-bindenden Protein [Jomori et al. 1990; Jomori et al. 1991], **Fettkörper-Protease 1** (FP-1, IFb-5) zeigte Ähnlichkeit zu verschiedenen Proteasen, die mit der Blutkoagulation von Invertebraten und Aktivierung der Phenoloxidasekaskade [Jiang et al. 2000] in Zusammenhang gebracht werden und **HAIP** (IFb-10) wurde bereits als Inhibitor der Hämocyten Aggregation beschrieben [Kanost et al. 1994]. Von drei weiteren cDNAs, **IFb-1** (ähnlich zu Cytochrom C Oxidase Va) [Caggese et al. 1997], **IFb-6** (ähnlich zu Tyrosin-Kinase FPS) [Katzen et al. 1991] und **IFB-11** (ähnlich zu β -Alanin-Synthase) [Kvalnes-Krick et al. 1993] (s. Tabelle 4A), wurde ein direkter Zusammenhang mit Aktivierungsvorgängen von Hämocyten zwar nicht deutlich, aber auch nicht vollkommen ausgeschlossen.

Aus der Hämocyten-Expressionsbank (s. Tabelle 4B) wurde eine cDNA (IHc-7) mit Ähnlichkeit zu Hemocytin [Kotani et al. 1995] und dem von Willebrand Faktor [Verweij et al. 1986] isoliert. Daneben wurden fünf cDNAs isoliert, die die vollständige kodierende Sequenz umfassten, bzw. aufgrund der Länge der cDNA und dem Vorliegen eines potentiellen Translations-Startcodons als vollständig interpretiert wurden: **IHc-3** (ähnlich zur NADH-Dehydrogenase) [van der Spek et al. 1989], **Lysozym** (IHc-4), **IHc-9** (ähnlich zum 60S-ribosomalem Protein XL1) [Lorenz et al. 1985], **IHc-12** (ähnlich zum nicht-funktionellen Folat-Bindungsprotein) [Verma et al. 1997] und **IHc-13** (ähnlich zu Tubulin- α) [Hachouf et al. 1995]. Vier weitere cDNAs zeigten Ähnlichkeit zu Genbanksequenzen unbekannter Funktion: **IHc-6** (ähnlich zu GAG-Protein) [Takahashi et al. 1997] und **IHc-14** (ähnlich zu POL-Protein) [Hashido et al. 1996] bzw. keine Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen (**IHc-5** und **IHc-11**). Eine Aussage über die Vollständigkeit dieser cDNAs ist daher nicht möglich.

5.3. Sequenzierung und Charakterisierung des HAIP

Das Hämocyten-Aggregation-inhibierende-Protein (HAIP) wurde ursprünglich 1994 von Kanost und Mitarbeitern [Kanost et al. 1994] bei der Reinigung von Hemolin [Ladendorff et al. 1990] isoliert. Der Erhalt der vollständigen Sequenz gelang jedoch nicht. Das gereinigte Protein wurde ansequenziert und zur Herstellung eines Kaninchen-Antikörpers eingesetzt. In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HAIP die Aggregation von Hämocyten in einem ähnlichen Umfang beeinträchtigt wie Hemolin [Ladendorff et al. 1991].

Während der Herstellung der Expressionsbibliothek aus Fettkörper-mRNA immunstimulierter Tiere wurde die vollständige cDNA des HAIP isoliert. Die cDNA hatte eine Länge von 1517 Nukleotiden. Daraus wurde ein Protein von 434 Aminosäuren Länge hergeleitet (Abb. 17). Die mittels ‚Signal-P‘ vorhergesagte Spaltstelle zwischen Signalpeptid und reifem HAIP stimmte mit der publizierten N-terminalen Sequenz überein [Kanost et al. 1994]. Datenbank Analysen ergaben eine große Ähnlichkeit von HAIP zu einer Untergruppe der Familie der Chitinasen. Diese Chitinase-ähnlichen Proteine zeichnen sich durch einen Austausch der für die katalytische Aktivität erforderlichen Glutaminsäure im aktiven Zentrum in ein Glutamin aus [Watanabe et al. 1993]. Kürzlich wurde aus dem Kulturüberstand einer aus Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* abgeleiteten Zelllinie eine Gruppe von vier sehr ähnlichen Proteinen isoliert, die ebenfalls zur Familie der Chitinasen gehören und durch den Austausch von Glutaminsäure in Glutamin im aktiven Zentrum deaktiviert sind (Abb. 18). In Zellkultur wurde gezeigt, dass zwei dieser Proteine eine proliferationsfördernde Wirkung entfalten, Zugabe von Insulin wirkte synergistisch auf die Wachstumsförderung [Kawamura et al. 1999]. Aufgrund dieser proliferationsfördernden Wirkung wurden sie als Imaginalscheiben Wachstumsfaktoren 1 bis 4 (IDGF, *Imaginal disc growth factor*) benannt.

Neben diesen vier Vertretern wird auch das ebenfalls aus *D. melanogaster* stammende 47 kDa Glykoprotein [Kirkpatrick et al. 1995] zu dieser Familie gerechnet. HAIP zeigte zu diesen Proteinen eine Identität zwischen 51% (IDGF4) und 42% (IDGF3) aller Aminosäuren. Auch in HAIP wurde die Chitinase-Funktion eliminierende Substitution von Glutaminsäure in Glutamin festgestellt. Dass HAIP einen Wachstumsfaktor darstellt, erscheint aufgrund der relativ hohen Konzentration in der Hämolymphe ($230 \pm 20 \mu\text{g/ml}$) [Kanost et al. 1994] unwahrscheinlich. Jedoch sind Chitinase-ähnliche Proteine in zahlreichen anderen Spezies nachgewiesen worden. Bei vielen dieser Proteine fehlt bisher der Nachweis mitogener Wirkung [Hipfner et al. 1999]. Für ein aus Maus-Milzzellen Kulturüberstand neu isoliertes Chitinase-ähnliches Protein konnte kürzlich eine Wirkung als Chemokin nachgewiesen werden [Owhashi et al. 2000].

Die weitere Sequenzanalyse von HAIP zeigte ein potentiell N-Glykosilierungsmotiv [Voet et al. 1994] an Position N-220 des Proteins (Abb. 17). Da bereits in der ursprünglichen Beschreibung festgestellt wurde, dass HAIP einen Kohlenhydrat-Anteil von 7% enthält [Kanost et al. 1994], wurde mittels enzymatischer Deglykosilierung untersucht, ob der gesamte Kohlenhydrat Anteil über das Asparagin-220 gebunden vorliegt. Um HAIP vor der Deglykosilierung anzureinigen, wurde eine einfache Chromatografie an immobilisiertem Heparin etabliert (Abb. 52 und 53). Das mittels N-Glykosidase F deglykosilierte HAIP zeigte im Western-Blot im Vergleich zum unbehandelten Protein einen Unterschied in der Masse von 3,5 kD (Abb. 54). Die Masse des deglykosilierten Proteins betrug 46,5 kDa und entsprach somit dem anhand der Signalpeptid-bereinigten Sequenz berechneten Molekulargewicht.

Zur weiteren Charakterisierung von HAIP wurde ein Northern-Blot mit RNA aus Fettkörper und Hämocyten durchgeführt (Abb. 49). Nur im Fettkörper konnte die HAIP-mRNA nachgewiesen werden. Eine Infektion mit Gram-negativen Bakterien hatte keinen Einfluß auf die beobachtete Menge mRNA. Dieser Befund steht im Einklang mit den Beobachtungen auf der Protein-Ebene. Der HAIP-Proteintiter in der Hämolymphe bleibt nach einer bakteriellen Infektion ebenfalls konstant [Kanost et al. 1994]. Allerdings konnten in einer ersten Untersuchung Schwankungen der HAIP-Menge in der Hämolymphe in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Larven beobachtet werden (Abb. 56). Die Veränderungen des HAIP-Titers zeigten eine Parallelität zum Verlauf des Gehalts an 20-Hydroxyecdysen in der Hämolymphe [Holthusen 1999]. Kürzlich wurde in einer Untersuchung von Ecdysteroidhormon gesteuerten Genen während des programmierten Zelltodes (*programmed cell death*, PCD) in *B. mori* ein zu HAIP sehr ähnliches Protein beschrieben [Tsuzuki et al. 2001]. Mittels subtraktiver PCR konnten aus diesem Insekt mehrere Gene isoliert werden, deren Transkription in Spinndrüsen nach Stimulation mit 20-Hydroxyecdysen ansteigen. Eines dieser Gene, EN03, ist zu 80% identisch mit HAIP. Tsuzuki und Mitarbeiter konnten in dieser Untersuchung zeigen, dass die Expression von EN03 durch Gabe von

20-Hydroxyecdysone zunächst stimuliert und später supprimiert wird. Allerdings wurde in dieser Studie keine weitergehende Funktionsuntersuchung von EN03 durchgeführt. Da der Hämolympf-Gehalt des HAIP eine Ähnlichkeit mit dem Verlauf der 20-Hydroxyecdysone-Kurve aufweist, erscheint es interessant, eine mögliche Beteiligung von HAIP an der Induktion des PCD in verschiedenen Organen zu überprüfen. Wahrscheinlicher aber scheint, dass die Funktion des HAIP entweder in der Modulation der Adhäsivität der Hämozyten oder in der Bindung und der Detoxifikation von Chitin-Bruchstücken liegt.

Aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit von HAIP mit Chitinasen, wurde überprüft, ob HAIP möglicherweise ein neues Lektin mit Spezifität für Chitin darstellen könnte. Dabei zeigte sich, dass HAIP an Chitin bindet. In weiteren Experimenten wurde versucht, die Spezifität der Bindung genauer zu charakterisieren. Weder das Monomer des Chitins, N-Acetyl-Glucosamin, noch Glucosamin oder Glucose, zeigten eine Beeinträchtigung auf die Bindung des HAIP an Chitin (Abb. 55). Nur Chitosan, ein Oligomer aus Glucosamin, und Xylose zeigten ein schwaches Kompetitionsvermögen. Offensichtlich ist eine bestimmte Kettenlänge von Glucosamin-Untereinheiten erforderlich, um wirksam mit der Bindungsstelle des HAIP interagieren zu können. Möglicherweise ist die Konkurrenz mit Oligomeren aus N-Acetyl-Glucosamin noch wirkungsvoller. Weshalb Xylose ebenfalls die Bindung von HAIP an Chitin beeinträchtigen kann, konnte anhand der durchgeführten Untersuchung nicht geklärt werden. Möglich ist, dass Xylose aufgrund der kleineren Molekülgröße, im Vergleich zum monomeren N-Acetyl-Glucosamin günstiger mit der Bindungsstelle des HAIP interagieren kann. Neben diesen Befunden ergab sich während des Experiments eine weitere Beobachtung: Die aufgereinigte HAIP-Fraktion enthielt als Verunreinigung ein kleineres Protein, das ebenfalls mit dem Antikörper gegen HAIP reagierte. Die Sequenzierung dieses Proteins ergab, dass es sich um ein C-terminales Fragment von HAIP handelt. Die Spaltung erfolgte vor T-162 des reifen Proteins (persönliche Mitteilung Dr. Yu, Depart. of Biochemistry, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA), so dass nahezu die vollständige Chitinase-ähnliche Domäne im N-terminalen Fragment abgespalten wurde (Abb. 17). Die Bindung von Chitin an dieses vermutlich durch Degradation während der Reinigung entstandene C-terminale Fragment konnte von Chitosan und Xylose wirkungsvoller kompetiert werden als die von Chitin an das komplette HAIP-Molekül. Trotzdem konnte eine Bindung an Chitin nachgewiesen werden. Die Chitinase-ähnliche Domäne ist also für eine feste Bindung an Chitin nicht notwendig. Das eröffnet die Frage, ob die spezifische Spaltung von HAIP vor T-162 des reifen Proteins einen biologischen Zweck erfüllt, etwa die Aktivierung einer bisher nicht bekannten enzymatischen Aktivität. Allerdings enthielt das für die Bindungsexperimente eingesetzte Protein bereits das Fragment, so dass es unwahrscheinlich ist, dass die Chitinbindung selbst ein auslösendes Ereignis für die Prozessierung darstellt.

In immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Verteilung von HAIP in Gewebeschnitten untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Antikörper gegen HAIP mit Substanzen der Cuticula reagiert, was aufgrund des Vermögens von HAIP Chitin zu binden zu erwarten war. Es zeigte sich ebenfalls eine schwache, aber punktuell intensive Antikörperbindung an den Fettkörper. Die in einzelnen Gebieten intensive Reaktion könnte von eingewanderten Hämozyten stammen. In weiteren immunhistochemischen Untersuchungen wurde in granulären Zellen eine intensive Antikörperbindung an vesikulären Strukturen beobachtet. Dabei nahm die Intensität der Reaktion bei Präparaten von naiven Tieren zu solchen von Saline-injizierten Tieren und bakteriell infizierten Tieren deutlich ab. Da im Northern-Blot für Hämozyten keine HAIP-mRNA nachweisbar war, kann dies ein erster Hinweis darauf sein, dass HAIP in Hämozyten gespeichert und auf ein Signal hin freigesetzt wird. Eine andere Funktion kann darin bestehen, dass HAIP Abbauprodukte des Chitins oder Chitin-enthaltende Fremdstoffe, z. B. Pilze, bindet und damit die Aufnahme durch Hämozyten erleichtert. Dies kann eine Voraussetzung für die bei *B. mori* beobachtete Expressionsinduktion antimikrobieller Proteine darstellen [Furukawa et al. 1999].

5.4. Sequenzierung und Charakterisierung der Fettkörper-Protease-1

Eine weitere aus der Fettkörper-Expressionsbibliothek klonierte cDNA enthielt das Gen für eine neue, putative Clip-Domänen Protease (Abb. 13 und 14). Das von der cDNA kodierte Protein wurde Fettkörper-Protease-1 (FP-1) genannt.

Die cDNA der FP-1 umfasst 1700 Nukleotide und kodiert ein Protein mit einer abgeleiteten Sequenz von 413 Aminosäuren. FP-1 wird als Prä-Proprotein gebildet. Mittels ‚Signal P‘ wurde die Spaltstelle des Signalpeptids zwischen A-16 und A-17 berechnet (Abb. 14). Datenbank Analysen ergaben eine große Ähnlichkeit von FP-1 mit Proteinen aus der Familie der Clip-Domänen Proteasen. Die erste sogenannte Clip-Domänen Protease wurde aus *Tachypleus tridentatus* isoliert [Muta et al. 1990]. In den letzten Jahren wurden weitere Serin-Proteasen kloniert, die ebenfalls eine Clip-Domäne tragen. Clip-Domänen Proteasen bestehen aus einer N-terminalen, regulatorischen Clip-Domäne und einer C-terminalen katalytischen Serin-Protease Domäne [Jiang et al. 2000]. Sie werden als inaktive Pro-Formen gebildet. Auf ein Signal hin erfolgt die Prozessierung durch eine andere Protease. Die putative Aktivierungs-Schnittstelle der FP-1 liegt hinter L-168 (Abb. 14). In Clip-Domänen Proteasen wird die sogenannte katalytische Triade durch drei konservierte Aminosäuren, His-Asp-Ser, gebildet. Diese Domänenstruktur ist typisch für Serin-Proteasen der Chymotrypsin-Familie [Jiang et al. 2000]. Auch in FP-1 ist diese Struktur konserviert. Sie wird aus den Aminosäuren H-213, D-261 und S-361 gebildet (Abb. 14). Daneben sind sechs Cysteine (1 bis 3 in Abb. 14) der katalytischen Domäne konserviert. Diese Cysteine bilden im „Proclotting

Enzyme" von *T. tridentatus* Disulfid-Brücken [Muta et al. 1990]. Aufgrund der Konservierung dieser Aminosäuren in allen Clip-Domänen Proteasen wird davon ausgegangen, dass auch die Struktur der Disulfid-Brücken in allen Proteasen dieses Typs erhalten ist [Jiang et al. 2000].

Ein Alignment der katalytischen Domäne der FP-1 mit katalytischen Domänen anderer Proteine aus der Familie der Clip-Domänen Proteasen ergab eine Identität der Aminosäure-Zusammensetzung von 20-45%. Anhand des Alignments können zwei Untergruppen dieser Protease-Familie unterschieden werden. Gruppe 1 umfasst FP-1, MsHP-1 und -2 [Jiang et al. 1999], TtPCE [Muta et al. 1990], Ag18D [Gorman et al. 2000], DmSnake [Delotto et al. 1986], CfSP-8 und -33 [Gaines et al. 1999]. Sie besitzen ein Leucin oder Arginin vor der Aktivierungs-Spaltstelle. Die Gruppe 2, bestehend aus Ag14D [Paskewitz et al. 1999], HdPPAEI [Lee et al. 1998], MScPAP [Jiang et al. 1998], MShPAP (persönliche Mitteilung Prof. H. Jiang, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA) und DmEaster [Chasan et al. 1989] besitzt ein Lysin oder Arginin vor der Aktivierungs-Spaltstelle (Abb. 15). Die unterschiedlichen Aminosäuren vor der Aktivierungs-Spaltstelle können als ein erster Hinweis auf die Beteiligung unterschiedlicher aktivierender Proteasen interpretiert werden. Außerdem wurde in den Proteinen der Gruppe 2 eine Insertion zwischen dem Histidin und der Asparaginsäure der katalytischen Triade festgestellt. Mit Ausnahme der Protease Ag14D umfasst diese Insertion zwei zusätzliche Cysteine. Möglicherweise bilden diese beiden Cysteine durch Disulfid-Brückenbildung eine zusätzliche Schleife, die wahrscheinlich die Spezifität der Proteine beeinflusst [Jiang et al. 2000].

Die Clip-Domänen sind in der Aminosäurezusammensetzung wesentlich heterogener. In ihnen sind sechs Cysteine konserviert, die zu einer Faltung der Domäne ähnlich einer Büroklammer führen (Abb. 66) [Jiang et al. 2000]. Aufgrund der Heterogenität der Clip-Domänen wurde auf ein Alignment verzichtet.

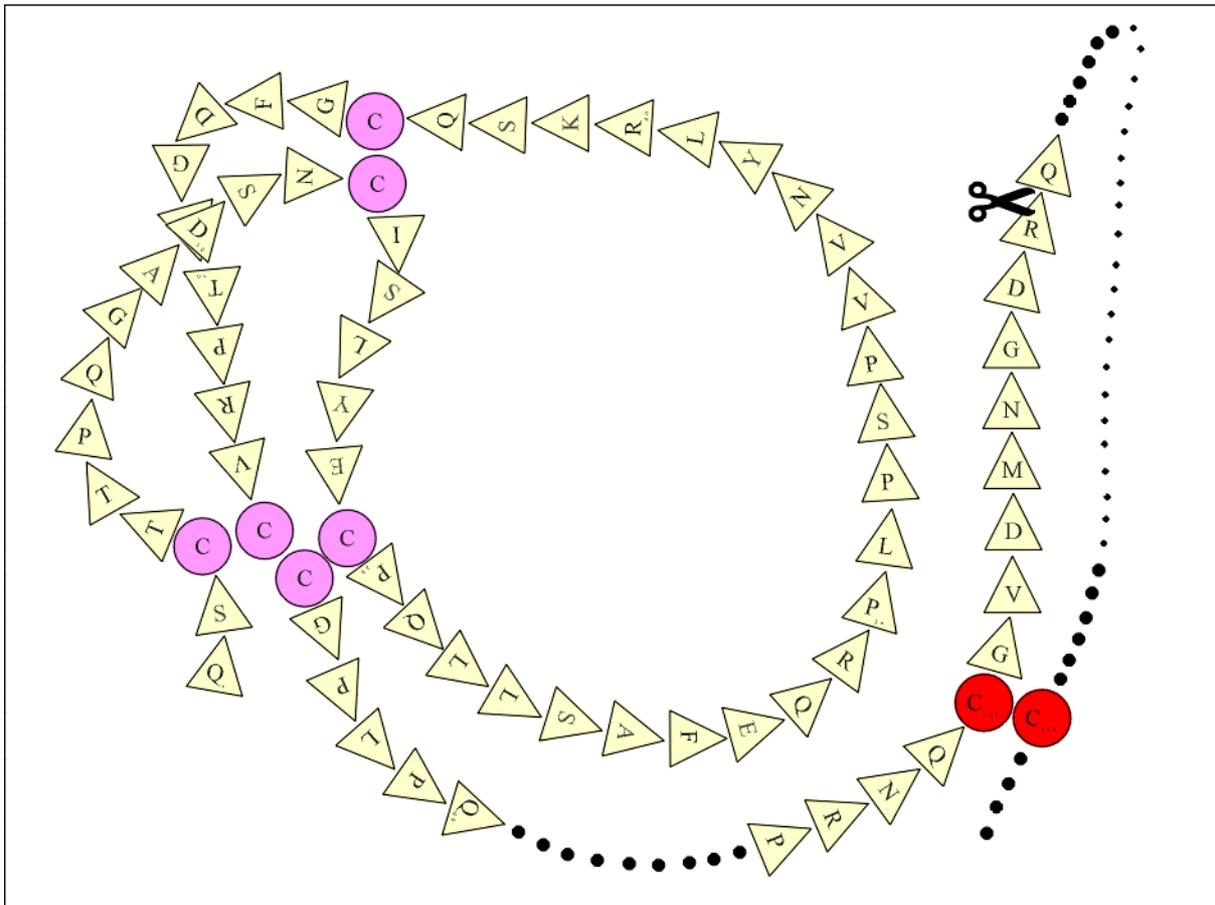


Abb. 66: Hypothetisches Faltungsmuster der Clip-Domäne des ‘Proclotting’ Enzym von *T. tridentatus*

Ursprünglich wurde eine Faltung der Clip-Domäne ähnlich einer Büroklammer für das ‘Proclotting’ Enzym von *T. tridentatus* beschrieben. Da alle Mitglieder der Familie der Clip-Domänen Proteasen sechs konservierte Cysteine (rosa hervorgehoben) besitzen wird vermutet, dass dieses Faltungsmuster in allen Familienmitgliedern konserviert ist. Nach einer Aktivierung durch proteolytische Spaltung (dargestellt durch das Scherensymbol) verbleibt die Clip-Domäne durch eine Disulfid-Brücke an die katalytische Untereinheit gebunden (rot hervorgehobene Cysteine) [Abgewandelt nach Jiang et al. 2000].

Die weitere Sequenzanalyse der FP-1 ergab zwei potentielle N-Glykosilierungsmotive (N-20 und N-221, Abb. 14). Die aus der Aminosäure-Sequenz berechnete Masse der Pro-Form der FP-1 betrug 44,4 kDa; das berechnete Molekulargewicht der katalytischen Domäne allein betrug 27,5 kDa. Im Western-Blot mit dem Antikörper gegen das rekombinante Protein (Abb. 46), zeigte sich, dass die tatsächliche Masse der Pro-Form der FP-1 61 kDa (bzw. 48 kDa für die katalytische Domäne alleine) betrug. Eine Erklärung für die Differenz könnte eine Glykosilierung der FP-1 sein, die bei Clip-Domänen Proteasen häufig beobachtet wird

(persönliche Mitteilung Prof. H. Jiang, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA).

Nicht von allen Proteasen, die im Alignment genutzt wurden, sind gegenwärtig die biologischen Funktionen bekannt. Allerdings sind einige davon, z. B. über die Aktivierung der Phenoloxidase [Jiang et al. 2000] oder über die Aktivierung von Liganden des Toll-Rezeptors [Hashimoto et al. 1988; Means et al. 2000], sowohl an entwicklungsbiologischen wie auch an immunologischen Reaktionen beteiligt. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch die FP-1 an diesen Prozessen beteiligt sein könnte. Um die biologische Funktion der FP-1 einzugrenzen, wurde mittels Northern-Blot untersucht, ob FP-1 auch von Hämozyten exprimiert wird und ob die Synthese der FP-1-mRNA in Fettkörpergewebe und Hämozyten durch eine Infektion mit Gram-negativen Bakterien induziert wird (Abb. 48). Der Blot zeigte, dass die FP-1-mRNA in naiven Tieren sowohl in Hämozyten als auch im Fettkörper nachweisbar ist. Eine experimentelle Infektion führte jedoch nur im Fettkörper zu einer deutlichen Induktion der Expression.

Auch eine Western-Blot Analyse zeigte einen Einfluß bakterieller Infektionen auf den Gehalt der FP-1 in der Hämolymphe. Der gegen das rekombinante Protein hergestellte polyklonale Antikörper reagierte in Western-Blots von Hämolymphe-Proben mit zwei Banden (Abb. 46). Das höhermolekulare Protein repräsentiert die nicht aktivierte Pro-Form der FP-1; die Bande mit dem kleineren Molekulargewicht entspricht der katalytischen Domäne, welche durch die reduzierenden Bedingungen der Probenaufbereitung für die Elektrophorese nicht mehr über eine Disulfid-Brücke mit der Clip-Domäne verbunden ist. Die isolierte Clip-Domäne wurde von dem Antikörper nicht erkannt. In der Hämolymphe von unbehandelten Tieren konnte sowohl die inaktive Vorstufe der FP-1 als auch die katalytische Domäne allein nachgewiesen werden. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die FP-1 neben einer möglichen Funktion in Abwehrreaktionen auch noch weitere physiologische Aufgaben erfüllen könnte. Allerdings ist auch von anderen Proteasen eine Beteiligung an Abwehrfunktionen bekannt: Die Blutgerinnungskaskade wird bei Vertebraten bereits durch Verwundung aktiviert [O'Brien et al. 1993]. Es konnte kein Unterschied in der detektierten Menge der FP-1-Pro-Form im Vergleich zwischen Proben aus verwundeten Tieren zu unbehandelten Tieren festgestellt werden. Jedoch war die katalytische Domäne bei Proben aus verwundeten Larven nur sehr schwach detektierbar. In der Hämolymphe experimentell infizierter Tiere konnten Unterschiede in den FP-1 Einheiten in Abhängigkeit der injizierten Bakterienart festgestellt werden. Stammte die Hämolymphe von Tieren, die mit *Escherichia coli* infiziert waren, konnte mehr Protein der Pro-Form beobachtet werden als in Proben von Tieren, die mit *Micrococcus lysodeikticus* infiziert wurden. Diese Beobachtung stimmte mit den Befunden des Northern-Blots überein. Auch die katalytische Untereinheit war in der Hämolymphe von mit *E. coli* infizierten Tieren detektierbar, allerdings in geringerem Ausmaß als in

unbehandelten Tieren. In Hämolymphe von Tieren, die mit *M. lysodeiktitikus* infiziert wurden, war die Pro-FP-1 fast nicht zu detektieren, während die katalytische Domäne deutlicher als bei den mit *E. coli* infizierten Tieren zu beobachten war. Dieses Ergebnis kann als ein erster Hinweis auf eine Spezifität der Aktivierungsreaktion interpretiert werden. Gram-positive Bakterien vermögen nach diesen Befunden möglicherweise eine umfassendere Aktivierung der FP-1 zu bewirken. Allerdings sind zur Erhärtung dieser Aussage weitere Experimente erforderlich, da Daten über die Induktion der FP-1-Transkription nach Injektion Gram-positiver Bakterien fehlen. In *D. melanogaster* konnte die selektive Expression verschiedener anti-mikrobiell wirkender Proteine bereits demonstriert werden [Lemaitre et al. 1997]. Daher ist es möglich, dass die Aktivierung der FP-1 durch beide Bakterienformen gleich erfolgt, aber nur Gram-negative Erreger die Expression der FP-1-mRNA induzieren. Da in einigen Untersuchungen spezifisch Gram-positive oder Gram-negative Bakterien bindende Proteine beschrieben wurden [Yoshida et al. 1996; Yu et al. 1999; Ma et al. 2000; Yu et al. 2000], ist ein solcher Mechanismus vorstellbar.

Festgestellt wurde auch, dass in der Hämolymphe von unbehandelten Tieren im Vergleich zu allen anderen Proben die katalytische Domäne das intensivste Signal ergab. Zumindest in der Probe des mit *M. lysodeiktitikus* behandelten Tieres wäre eine höhere Menge an FP-1 vermutet worden. Möglicherweise wird FP-1 nach der Aktivierung sehr schnell inhibiert und abgebaut. Ähnliche Mechanismen sind bei der Blutkoagulation und der Regulation des Komplement-Systems bekannt [Janeway et al. 1999; Jiang et al. 2000]. Es ist jedoch auch möglich, dass FP-1 an Bakterien bindet und an einer Verklumpung dieser beteiligt ist. In diesem Fall könnte durch die Abtrennung der zellulären Bestandteile auch an Bakterien anhaftende, aktivierte FP-1 aus der Hämolymphe entfernt worden sein.

Im Western-Blot mit Hämolymphe-Proben von *M. sexta* unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigte sich ein heterogenes Bild des Gehalts an Pro-FP-1 und aktiver katalytischer Untereinheit (Abb. 47). Die Menge der Pro-FP-1 stieg etwa ab Mitte des vierten Larvenstadiums deutlich an. Aufgrund der mit dem Beginn des Wanderstadiums in hoher Konzentration vorliegenden Speicherproteine konnte für die späteren Stadien keine genaue Beurteilung erfolgen. Kurz vor der Häutung von Larvenstadium vier zu Larvenstadium fünf konnte die prozessierte katalytische Untereinheit entdeckt werden. Danach wurde die aktivierte Form erst wieder in den ersten vier Tagen des Wanderstadiums und danach während aller untersuchten Tage des Puppenstadiums nachgewiesen. Das Vorliegen einer größeren Menge aktiver FP-1 könnte auf eine Beteiligung des Proteins an den Vorgängen der Metamorphose hindeuten. Da aber auch schon während der Häutung vom vierten zum fünften Larvenstadium eine geringfügige Aktivierung zu beobachten war, ist es auch möglich, dass die Aktivierung der FP-1 entweder mit dem Häutungsprozess an sich gekoppelt ist oder einen protektiven Charakter hat. Während der Metamorphose kommt es auch zu Umbildungen im

Bereich des Darmes, wobei eine Infektion durch ein Entkommen von Pathogenen aus dem Darm in den Körper erfolgen kann [Dunn et al. 1994]. Während des Häutungsprozesses ist die Cuticula nicht ausgehärtet. In dieser Phase kann eine Verwundung, gefolgt von einer Invasion von Pathogenen, leichter erfolgen als nach der Aushärtung der Cuticula. An der Aushärtung der Cuticula ist über die Sklerotin-Bildung auch die Phenoloxidase beteiligt [Ashida et al. 1995] die durch eine Serin-Protease Kaskade aktiviert wird. Zwar wurde kürzlich eine Protease aus *M. sexta* isoliert, die die Phenoloxidase aktiviert, diese Protease wird aber ebenfalls als Zymogen synthetisiert [Jiang et al. 1998]. Die Protease, die die Pro-Phenoloxidase aktivierende Protease (PAP) aktiviert, ist für *M. sexta* bisher nicht beschrieben. Auch die mRNA der PAP wird durch die experimentelle Infektion mit Bakterien im Fettkörper vermehrt gebildet [Jiang et al. 1998]. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die FP-1 in Oenozytoplasten deutlich nachweisbar ist (Abb. 57). Die Pro-Phenoloxidase (PPO) wird ebenfalls in Oenozytoplasten gebildet [Ashida et al. 1988; Sugumaran et al. 1993]. Nur granuläre Zellen zeigten in dieser Untersuchung ebenfalls eine Reaktivität nach Behandlung mit dem Antikörper gegen FP-1. Dabei wird die Hypothese, dass die FP-1 an Abwehrreaktionen gegen Pathogene und der Sklerotisierung der Cuticula beteiligt ist, von der Beobachtung unterstützt, dass der Antikörper gegen FP-1 in der Cuticula eine deutliche Reaktion zeigt (Abb. 58). PPO kann ebenfalls in der Cuticula nachgewiesen werden, ebenso wie eine Form der Pro-Phenoloxidase-aktivierenden Protease [Ashida et al. 1995]. Außerdem sind in verwundeten Kontrolltieren vesikuläre Kompartimente der granulären Zellen deutlich FP-1 positiv. In infizierten Tieren konnten vereinzelt auch schwach positive vesikuläre Strukturen in granulären Zellen beobachtet werden, die Reaktion war in diesen Fällen jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei den verwundeten Larven. Es ist möglich, dass FP-1 nach einer Aktivierung selbst oder vermittelt über ein Brückenmolekül an Bakterien bindet. Eine solche Aktivierung könnte bereits durch eine Verwundung ausgelöst werden. Anschließend könnte dann über PAP eine Melanisierung und Verklumpung der Bakterien stattfinden. Die über eine Disulfid-Brücke an der aktivierten FP-1 verbleibende Clip-Domäne könnte dabei eine regulierende Funktion einnehmen. Ein ähnlicher Mechanismus ist für *snake* vorgeschlagen worden [Smith et al. 1995]. Nicht an Bakterien gebundene FP-1 würde durch einen potentiellen Inhibitor inaktiviert und von granulären Zellen zum Abbau aufgenommen. Bruchstücke der proteolytischen Spaltungen könnten dabei, ähnlich verschiedener Metabolite der Komplement-Kaskade, als chemotaktisch aktive Komponenten Hämocyten anlocken.

5.5. Sequenzierung und Charakterisierung des Immunolektin-3

Immunolektin-3 (IML-3), für welches eine weitere cDNA isoliert wurde, gehört zu einer Gruppe von Lektinen in der Hämolymphe von *M. sexta*. Gegenwärtig sind aus *M. sexta* mit Immunolectin-1 und Immunolectin-2 zwei weitere Mitglieder dieser Gruppe bekannt [Yu et al. 1999; Yu et al. 2000]. Auch aus anderen Insekten sind mehrere, sehr ähnliche Lektine isoliert worden [Shin et al. 1998; Koizumi et al. 1999; Shin et al. 2000]. Die umfangreichste Gruppe dieser Lektine ist bisher für *Periplaneta americana* beschrieben worden [Jomori et al. 1990; Kawasaki et al. 1996]. Für viele der Lektine ist die genaue Funktion bisher unbekannt. In einigen Fällen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine mögliche Funktion in der Erkennung von Pathogenen und der Aktivierung der Phenoloxidase-Kaskade liegt [Yu et al. 1999; Yu et al. 2000]. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sie als Opsonine wirken [Jomori et al. 1992].

Die ursprünglich isolierte cDNA umfasste 2152 Nukleotide (Abb. 19). Die Analyse der Sequenz zeigte jedoch, dass sowohl das Startcodon, als auch der polyadenylierte Bereich am 3'-Ende der cDNA fehlten. Durch den Einsatz eines Fragmentes des ursprünglich isolierten Klons wurde eine vollständigere cDNA aus der Fettkörper-Bibliothek isoliert. Die Sequenzierung zeigte, dass auch dieses Fragment am 5'-Ende unvollständig war. Weitere Versuche mittels 5'-RACE die vollständige Sequenz des IML-3 zu erhalten, resultierten in einem weiteren, am 5'-Ende der bekannten Sequenz überlappenden Fragment. Obwohl auch dieses Fragment noch nicht die vollständige cDNA lieferte, kann aufgrund der vorliegenden Sequenz vermutet werden, dass nur noch das erste Nukleotid des Startcodons fehlt (bisher vorliegende Sequenz s. Anhang). Die gegenwärtig vorliegende cDNA umfasst 3810 Nukleotide und kodiert ein Protein mit einer abgeleiteten Sequenz von 314 Aminosäuren. Mittels „Signal P“ konnte eine potentielle Spaltstelle des Signalpeptids vor S-23 vorhergesagt werden. Die Masse des verbleibenden Peptids wurde zu ca. 32 kDa berechnet. Ein potentielles N-Glykosilierungsmotiv wurde beginnend mit N-156 identifiziert. Der Datenbank-Vergleich der erhaltenen Sequenz zeigte, dass IML-3 zur Familie der Calcium-abhängigen Lektine gehört [Weis et al. 1998], mit der Besonderheit, dass in IML-3 zwei CRDs zu finden sind. Mehrere ähnliche Lektine sind in neuerer Zeit bei Insekten nachgewiesen worden. IML-3 zeichnet sich dabei, wie vier weitere Proteine [Shin et al. 1998; Koizumi et al. 1999; Yu et al. 1999; Yu et al. 2000], durch zwei zusätzliche Cysteine in der CRD-2 aus. Das Alignment der CRDs von IML-3 mit den CRDs dieser vier Insekten-Proteine ergab (Abb. 20), dass IML-3 die höchste Ähnlichkeit mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein von *B. mori* hat (31% identische Aminosäuren in CRD-1, 46% identische Aminosäuren in CRD-2). IML-2 zeigte eine Übereinstimmung von 32% (CRD-1) und 41% (CRD-2), Hdd15 war zu 29% (CRD-1) und 38% (CRD-2) identisch und IML-1 hatte 17% (CRD-1) beziehungsweise 31% (CRD-2)

identische Aminosäuren. Das Alignment der CRDs umfasst mit Ausnahme der potentiellen Signalpeptide, welches für das IML-3 noch nicht vollständig bekannt ist und weniger C-terminaler Aminosäuren die vollständigen Sequenzen von IML-3 und den vier beschriebenen Proteinen. Der C-terminale Bereich ist bei allen diesen Proteinen sehr heterogen. Aus diesem Grund wurde auf ein weiteres Alignment verzichtet.

Bei dem Datenbank-Vergleich zeigte sich aber auch eine Ähnlichkeit zu verschiedenen Vertebraten-Proteinen, hierunter das humane Protein gp200-MR, einem Homologen des Mannose-Rezeptors von Makrophagen (25% identische Aminosäuren) [McKay et al. 1998] und dem Asialoglykoprotein-Rezeptor-2 verschiedener Vertebraten, wobei das Protein der Maus die höchste Übereinstimmung mit IML-3 zeigt (29% identische Aminosäuren) [Sanford et al. 1990]. Der Mannose-Rezeptor und Asialoglykoprotein-Rezeptoren erfüllen in Vertebraten unter anderem Funktionen in der Erkennung von ‚alternden‘ Strukturen und ‚Fremd‘ [Janeway et al. 1999]. Gegenwärtig fehlen experimentelle Daten zu den Spezifitäten beider CRDs in IML-3. In früheren Untersuchungen anderer Lektine konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren F-104 und E-106 in der CRD-1 und Q-259 und D-261 in der CRD-2 von IML-3 (s. Abb. 20) massgeblich an der Bindungsspezifität beteiligt sind [Weis et al. 1992]. Für das LPS-bindende Protein aus *H. cunea* konnte die Spezifität der beiden CRDs durch Kompetitions-Experimente mit rekombinant exprimierten, isolierten CRDs bestimmt werden [Shin et al. 2000]. Die Bindung der CRD-1 an LPS wurde durch Mannose und N-Acetylglucosamin inhibiert, für die CRD-2 zeigte nur Mannose einen inhibitorischen Effekt. In dem für die Spezifität der Kohlenhydrat-Bindung verantwortlichen Bereich der CRD-2 (Aminosäuren 259-261 der Abb. 20) von IML-3 konnte eine vollständige Identität mit dem Protein von *H. cunea* ausgemacht werden. Dies spricht dafür, dass die CRD-2 von IML-3 ebenfalls eine Spezifität für Mannose aufweist. Die hämagglutinierende Aktivität von IML-2 hingegen wird durch Xylose und Glucose inhibiert [Yu et al. 2000]. Für IML-1 wurde lediglich die Bindung von LPS nachgewiesen [Yu et al. 1999]. In Bezug auf das LPS-bindende Protein von *B. mori* konnte bisher keine eindeutige Kohlenhydrat-Spezifität ermittelt werden [Koizumi et al. 1999]. Frühere Befunde lassen darauf schließen, dass BmLBP an den Lipid-A Anteil des LPS bindet [Koizumi et al. 1997].

Im Northern-Blot mit Fettkörper- und Hämocyten-RNA aus naiven und Bakterien-infizierten Larven hybridisierte die IML-3-spezifische Sonde nur mit RNA aus Fettkörper; Hämocyten waren IML-3 negativ (Abb. 51). Während in Fettkörper-Gewebe naiver Tiere lediglich zwei hybridisierende Banden auftraten, wurde in RNA aus Gewebe induzierter Larven eine zusätzliche Bande von etwa 4,3 kB nachgewiesen. Auch die Zwei bisher in *M. sexta* identifizierten IML-1 und IML-2 zeigten eine Induzierbarkeit der RNA in der Folge bakterieller Infektionen. Für beide Proteine konnte neben der Bindung von LPS auch eine Funktion in der Aktivierung der Phenoloxidasekaskade gezeigt werden [Yu et al. 1999; Yu et

al. 2000]. Das für die RNA im Northern-Blot erhaltene Molekulargewicht für IML-3 lag geringfügig über dem der - bis jetzt unvollständigen - cDNA. Nach einem Vergleich der Western-Blot-Daten wurde das erhaltene Molekulargewicht als eine Bestätigung der Hypothese angesehen, dass nur noch ein sehr kleines Fragment der vollständigen cDNA für IML-3 fehlt. Auch die zwei anderen Banden traten in Proben aus infizierten Larven im Vergleich zu jenen aus naiven Larven etwas intensiver hervor, was dafür spricht, dass auch diese mRNAs induziert werden. Die Identität dieser Banden ist jedoch gegenwärtig ungewiss. Auch in *P. americana* hybridisierte die cDNA für das Lipopolysaccharid-bindende Protein mit multiplen Banden [Jomori et al. 1991]. In diesem Insekt wurden in der Zwischenzeit mehrere untereinander sehr ähnliche Lektine identifiziert [Kawasaki et al. 1996]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnten Spleiß-Varianten darstellen. Die IML-3-cDNA zeigte einen sehr umfangreichen 3'-nicht-translatierten Bereich mit zahlreichen Polyadenylierungs-Signalen. Möglicherweise stellt die isolierte cDNA die mittlere Variante unterschiedlich gespleißter Formen von IML-3 dar.

Zur weiteren Charakterisierung des IML-3 wurde gegen das rekombinant hergestellte Protein ein Kaninchen-Antikörper hergestellt. Der Antikörper erkannte das rekombinante Protein (Abb. 37A) ebenso, wie drei Proteine in der Hämolymphe von *M. sexta* (Abb. 39). Diese drei mit dem Antikörper reagierenden Proteine wurden mit zunehmender Masse als IML-3a (33,5 kDa), IML-3b (37,5 kDa) und IML-3c (45 kDa) benannt. Vermutlich entspricht dabei die Bande des IML-3a dem reifen Protein. Hierfür spricht einerseits das aus der Sequenz berechnete Molekulargewicht und andererseits die Intensität der Bande. Ein eindeutiger Nachweis durch Edman-Sequenzierung erscheint jedoch zur vollständigen Klärung wünschenswert. In diesem Fall könnte auch festgestellt werden, ob die zwei zusätzlichen Banden Iso- oder Pro-Formen von IML-3 darstellen, oder andere Proteine sind, die nur aufgrund bestimmter Epitope oder gar nur zufällig vom Antikörper erkannt werden. Aufgrund der Ergebnisse des Northern-Blots ist auch das Auftreten von drei nahezu identischen Proteinen unterschiedlicher Größe vorstellbar. Dabei könnten beispielsweise eine oder mehrere weitere CRDs im Protein vorliegen, multiple CRDs sind beispielsweise aus dem Mannose-Rezeptor von Makrophagen bekannt [Drickamer et al. 1993]. Eine andere Möglichkeit wäre eine längere Kollagen-artige Domäne, wie sie beispielsweise bei einigen Collectinen vorliegt [Drickamer 1995], oder eine Transmembran-Domäne, wie beispielsweise bei den Makrophagen-Mannose-Rezeptoren [Drickamer et al. 1993] oder den Asialoglykoprotein-Rezeptoren [Day 1994]. Gegen letztgenannte Hypothese spricht jedoch, dass die Proteine in der Hämolymphe gelöst nachgewiesen werden können. Wahrscheinlicher ist eine Assoziation an die Zellmembran, die sowohl durch kovalente aber auch durch nicht-kovalente Bindung zustande kommen könnte. Auch ein gegen IML-1 gewonnener Antikörper reagierte mit weiteren Proteinen. Durch Variation der Elektrophoresebedingungen konnte die

unter Lämmli-Bedingungen beobachtete Einzel-Bande in zwei Banden, vermutlich verursacht durch zwei Isoformen von IML-1, aufgetrennt werden [Yu et al. 1999]. Zwei Isoformen konnten auch für IML-2 beobachtet werden [Yu et al. 2000]. In beiden Fällen war der Unterschied der Molekulargewichte jedoch erheblich kleiner als dies für IML-3 zutrifft. Für IML-1 wurde darüber hinaus eine weitere schwächer erscheinende Bande geringeren Molekulargewichts beobachtet. Dieses Protein wurde als Abbauprodukt interpretiert [Yu et al. 1999]. Der Antikörper gegen IML-3 reagierte in Hämolymphe von *H. cecropia* mit einem Protein, das mit IML-3b co-migrierte und in der Hämolymphe von *C. morosus* mit einem Protein, das eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie IML-3c zeigte (Abb. 39). In allen weiteren getesteten Hämolymphe-Proben verschiedener Insekten konnte im Western-Blot mit dem IML-3-Antikörper keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden. Aufgrund der zunehmenden Größe der Familie Calcium-abhängiger Lektine bei zahlreichen Insektenarten verwundert diese Beobachtung zunächst. Das Auftreten multipler Banden in der Hämolymphe von *M. sexta* war zunächst auf eine gewisse Unspezifität des Antikörpers zurückgeführt worden. Die Tatsache, dass jedoch auch das aufgrund von Sequenzdaten gegenwärtig ähnlichste Protein, das LBP von *B. mori*, nicht mit dem Antikörper gegen IML-3 reagierte, unterstützt die Hypothese der Existenz unterschiedlicher Iso- oder Spleiß-Formen.

In Western-Blots mit Hämolymphe-Proben naiver und infizierter Tiere konnte gezeigt werden, dass nach einer Verletzung die Menge des IML-3a in der Hämolymphe von *M. sexta* abnahm, während die Menge des IML-3b und -3c konstant blieb. Eine Injektion von *E. coli* führte dazu, dass eine größere Menge IML-3b und -3c nachweisbar war als in unbehandelten Larven. Eine Infektion mit *M. lysodeiktikus* zeigte keinen erkennbaren Effekt auf den Hämolymphe-Gehalt von IML-3 (Abb. 45). Die Beobachtung, dass der Hämolymphe-Gehalt des IML-3a längere Zeit nach Verwundung oder Infektion mit Gram-negativen Bakterien auf einem niedrigen Niveau blieb, während die Injektion von Gram-positiven Bakterien keinen sichtbaren Einfluß auf die Menge des Proteins zeigt, spricht für eine Beteiligung von IML-3a an einer Erkennungs- oder Abwehrreaktion gegen Gram-negative Bakterien. Durch die Bindung von IML-3 an die Bakterien könnte das Protein beispielsweise durch Phagozytose der Pathogene dem Kreislauf entzogen werden. Es ist aber auch möglich, dass die Zentrifugation zur Abtrennung der Hämozyten, ebenso aggregierte Bakterien und daran bindendes IML-3 aus der Hämolymphe entfernte. Bis zur endgültigen Klärung, ob die Banden des IML-3b und -3c Pro-Formen des IML-3 darstellen, besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass das neugebildete Protein noch nicht vollständig prozessiert worden ist. Für IML-1 und -2 konnte kein Absinken des Hämolymphtiters gezeigt werden; nach Infektion war ein ansteigender Gehalt dieser Proteine in der Hämolymphe nachweisbar [Yu et al. 1999; Yu et al. 2000].

Als Vorbereitung für spätere Untersuchungen wurde mit der Entwicklung eines Reinigungsschemas für IML-3 begonnen. Als ein erster Schritt wurden Hämolymp- Proteine mittels Gelfiltration aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Western-Blot auf Anwesenheit von IML-3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass IML-3 nicht in den Fraktionen mit sehr kleinen Proteinen nachweisbar war. Stattdessen konnte es in einem sehr hohen Molekulargewichtsbereich (größer als 150 kDa) und in einem Bereich etwas kleineren Molekulargewichts (etwa 100 kDa) identifiziert werden (Abb. 41) (Eichung der Säule: [Magill 1999]). Dieses Ergebnis deutet auf eine Assoziation von IML-3 mit anderen Proteinen oder mit sich selbst hin. Die Oligomerisierung von Lektinen wurde bereits für Proteine aus der Familie der Collektine beschrieben [Lu 1997; Weis et al. 1998]. In den Collektinen trimerisieren die einzelnen Untereinheiten zu Grundbausteinen, welche wiederum, abhängig von der Länge einer Kollagen-ähnlichen Domäne, größere Aggregate aus jeweils zwei bis sechs trimeren Untereinheiten bilden. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für IML-1 und -2 beschrieben [Yu et al. 1999; Yu et al. 2000]. Da alle drei potentiellen IML-3-Formen in den hochmolekularen Fraktionen detektierbar waren, besteht auch die Möglichkeit, dass sich Heterooligomere bilden. Die Bildung von Heterooligomeren mit möglicherweise geringfügig unterschiedlicher Spezifität für unterschiedliche Liganden könnte eine Bedeutung z. B. für die Koagulation von eingedrungenen Pathogenen haben. Die Beobachtung des identischen Verhaltens der drei mit dem Antikörper detektierbaren Proteine bestärkt die Hypothese, dass es sich bei diesen Proteinen um Isoformen oder Spleiß-Varianten handelt.

Um einen ersten Anhaltspunkt für potentielle Interaktionen von IML-3 mit LPS zu erhalten, wurde ein *in-vitro* Testsystem entwickelt. Hierzu wurde zellfreie Hämolymphe mit LPS inkubiert und der Einfluß auf das Wanderungsverhalten der Hämolymp- Proteine untersucht. Zur Etablierung dieses Systems wurden die Hämolymp- Proteine zunächst nur in einer Dimension, unter nativen Bedingungen, aufgetrennt und sowohl Coomassie-gefärbt als auch geblottet (Abb. 42 und 44). In den Coomassie-gefärbten Gelen konnte deutlich ein unterschiedliches Wanderungsverhalten von einzelnen Proteinen beobachtet werden. Allerdings war damit keine eindeutige Zuordnung zu IML-3 möglich. Auch durch einen Western-Blot mit dem Antikörper gegen IML-3 konnte keine eindeutige Aussage über eine mögliche Interaktion zwischen LPS und IML-3 getroffen werden. Erwartungsgemäß erkannte der Antikörper nach der nativen Elektrophorese Protein-Banden, die nicht zweifelsfrei als IML-3 angesehen werden konnten. Durch eine zweidimensionale Auftrennung, zunächst unter nativen Bedingungen und anschließend unter reduzierenden Bedingungen, konnte dargestellt werden, dass mit IML-3 co-migrierende Banden nach Inkubation mit LPS eine veränderte Mobilität im nativen Gel zeigten (Abb. 44). Eine Bindung von LPS wurde auch schon für die bereits beschriebenen Proteine IML-1 und -2 und der LPS-Bindungsproteine von *B. mori* und *H. cunea* gezeigt [Koizumi et al. 1999; Shin et al. 2000]. In zukünftigen

Untersuchungen könnte, z. B. mittels ELISA die Bindungsspezifität von IML-3 an LPS genauer untersucht werden. Interessant wäre beispielsweise, ob IML-3 alleine ausreichend für eine derartige Interaktion ist, oder ob weitere Hämolymp-Komponenten daran beteiligt sind. Die immunhistochemischen Untersuchungen von Gewebeschnitten bestätigten die Befunde des Northern-Blots; der Fettkörper war eindeutig IML-3 positiv (Abb. 63). In den Schnitten reagierten aber auch einige Hämozyten mit dem Antikörper (Abb. 62). Der markierte Bereich lag dabei in der Nähe der Zellmembran. Auch Hämozyten von Saline-injizierten und experimentell infizierten Tieren zeigten eine IML-3 positive Reaktion (Abb. 61), jedoch waren in den Saline-injizierten Tieren nur äußerst wenige Hämozyten IML-3 positiv. In den Präparaten infizierter Tiere waren hingegen eine bedeutend höhere Anzahl IML-3-positiver Hämozyten zu beobachten. In allen Fällen wurden ausschließlich granuläre Zellen und Plasmatozyten mit dem Antikörper gegen IML-3 detektiert, wobei eine diffuse Färbung des Plasmas sowie vesikulärer Strukturen zu erkennen waren. Aufgrund der deutlich höheren Zahl an positiv reagierenden Zellen von verwundeten Tieren im Vergleich zu infizierten Tieren, scheint es wahrscheinlich, dass IML-3 während einer Abwehrreaktion der Zellen internalisiert wird. Für beide Zelltypen wurde bereits beschrieben, dass sie an der Phagozytose von Bakterien beteiligt sind [Scholz et al. 1997]. Gegenwärtig ist eine Wirkung von IML-3 als Oponin nicht belegbar, jedoch konnte in Untersuchungen anderer Insekten-Lektine eine derartige Reaktion gezeigt werden [Jomori et al. 1992]. Um eine Internalisierung von IML-3 als Folge einer Bindung an Bakterien zu zeigen, wären Versuche mit Doppelmarkierungen eine mögliche Vorgehensweise.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit von IML-3 zu IML-1 und -2 besteht die Möglichkeit, dass auch IML-3 ein PRR mit Spezifität für Gram-negative Bakterien darstellen könnte. Die in dieser Untersuchung erhaltenen ersten Hinweise auf eine derartige Funktion müssen in zukünftigen Untersuchungen bestätigt und vertieft werden. Wenn sich diese Befunde bestätigen lassen, wäre es sehr interessant herauszufinden, ob auch IML-3 die PO-Kaskade zu aktivieren vermag. Wenn dies bestätigt werden sollte, könnte in weitergehenden Experimenten versucht werden, Interaktionspartner zu identifizieren, die möglicherweise Proteaseaktivität zeigen könnten. Ein Ansatzpunkt für eine derartige Untersuchung ist eine Co-Immunpräzipitation mit dem hergestellten Antikörper gegen IML-3.

5.6. Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung des Hemocytin

Die Sequenzierung der aus der Hämocyten-Expressionsbank isolierten cDNA ergab ein Fragment, das eine sehr große Ähnlichkeit zu Hemocytin [Kotani et al. 1995] und dem von Willebrand Faktor [Verweij et al. 1986] zeigte. Aufgrund der großen Ähnlichkeit wurde das von der erhaltenen cDNA kodierte Protein *M. sexta* Hemocytin (MsHc) genannt.

Hemocytin wurde ursprünglich aus *B. mori* isoliert [Kotani et al. 1995]. Hemocytin von *B. mori* besitzt hämagglutinierende Aktivität, die durch das C-terminale Ende des Proteins hervorgerufen wird. Kürzlich wurde die Sequenz eines zu Hemocytin homologen Proteins aus *D. melanogaster*, Hemolektin, publiziert [Goto et al. 1999]. Der von Willebrand Faktor (vWF) wurde ursprünglich bei Vertebraten gefunden. Beim Menschen ist er an der Entstehung der von Willebrand Erkrankung beteiligt [Ginsburg et al. 1985; Lynch et al. 1985; Perutelli et al. 1997]. In Vertebraten ist der vWF für die Blutkoagulation und die Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen, z. B. im Bereich von Verwundungen mitverantwortlich [Perutelli et al. 1997].

Die Sequenzierung des ursprünglich erhaltenen Klons zeigte, dass die Sequenz nicht vollständig erhalten worden war. Die Klonierung der vollständigen Sequenz des MsHc gestaltete sich äußerst schwierig. Trotz mehrfacher Versuche wurden zwar ähnliche, aber keine vollständigen cDNAs aus der Hämocyten-Expressionsbibliothek isoliert (Abb. 21). Die weitere Sequenz-Analyse ergab, dass wie bei dem Hemocytin-Gen aus *B. mori* im 3'-nicht kodierenden Bereich zwei Signale, ATTA und ATTTA, vorlagen. Hierin liegt wahrscheinlich die Ursache dafür, dass keine komplette cDNA aus der Bibliothek erhalten wurde, da diese Sequenzen mRNAs als instabil markieren [Shaw et al. 1986]. Ferner zeigte sich bei der Analyse der vollständigen cDNA ein partiell sehr hoher GC-Gehalt und eine Repetitivität der Sequenz. Die Bildung von Sekundärstrukturen könnte zu Kettenabbrüchen während der Synthese der cDNA geführt haben. Ähnliche Schwierigkeiten waren auch bei der Isolierung der Hemocytin-cDNA aus *B. mori* aufgetreten [Kotani et al. 1995]. Erst durch eine Neusynthese von cDNA mittels eines innerhalb der bereits bekannten Sequenz liegenden genspezifischen Primers gelang in nachfolgenden PCR-Reaktionen die Amplifizierung der fehlenden Fragmente (Abb. 22 und 23). Die cDNA umfasst 10897 Nukleotide und kodiert ein Protein mit einer berechneten Länge von 3213 Aminosäuren (s. Anhang). Die Sequenz enthält 23 potentielle N-Glykosilierungsmotive (N-X-S/T). Ähnlich wie bei dem Hemocytin-Gen von *B. mori* besitzt auch das Gen von MsHc eine lange 5'-nichtkodierende Region [Kotani et al. 1995]. Das Startcodon beginnt mit Nukleotid 757. Aus der Sequenz wurde eine Masse von 352,4 kDa abgeleitet, wobei eine mögliche Glykosilierung noch nicht berücksichtigt ist. Mittels ‚Signal P‘ konnte keine Spaltstelle für ein Signalpeptid vorhergesagt werden.

Allerdings konnte beginnend mit Aminosäure 638 eine potentielle Spaltstelle für Furin (Konsensus-Motiv RXXXKR) identifiziert werden. Furine repräsentieren eine Familie von Endopeptidasen, die auch als Pro-Protein-Konvertasen bezeichnet werden. Furine wurden aus verschiedenen Spezies kloniert und zeigen ein ausgesprochen großes Spezifitätsspektrum. Sie katalysieren die Reifung von Peptidhormonen, Wachstumsfaktoren, Zelloberflächen-Rezeptoren, bakteriellen Toxinen, viralen Hüllproteinen, Proteinen der extrazellulären Matrix und Serumproteinen [Molloy et al. 1999]. Auch die proteolytische Spaltung des Pro-vWF der Vertebraten in den reifen vWF erfolgt durch ein Furin [Molloy et al. 1999]. Dabei wird die Konsensus-Sequenz auch von dem kürzlich aus *D. melanogaster* beschriebene Dfurin2 erkannt, dass ebenfalls die Reifung des Pro-vWF katalysieren kann [Roebroek et al. 1992].

In der Sequenz des MsHc wurde das RGD-Motiv (beginnend mit Aminosäure 2016), gefunden (s. Anhang). Viele Proteine der Integrin Familie binden an dieses Motiv in anderen Zelladhäsionsmolekülen, wobei diese Bindung die Adhäsion an Substrate vermittelt [D'Souza et al. 1991]. Im Hemocytin von *B. mori* konnte diese Sequenz nicht gefunden werden [Kotani et al. 1995], jedoch konnte bei der Überprüfung eine KGD-Sequenz an Position 1938-1940 des Hemocytin-Precursors ausgemacht werden. KGD gilt bei Crustaceen neben RGD als ein weiteres Sequenzmotiv bei Adhäsionsvorgängen [Johannsson 1999]. Allerdings liegt auch im vWF aus Rindern kein RGD-Motiv vor, während im humanen Protein dieses Motiv existiert. Bindungsmotive und -eigenschaften von Adhäsionsmolekülen in verschiedenen Spezies unterliegen wahrscheinlich gewissen an die Funktion adaptierten Veränderungen. Die Funktionalität des RGD-Motivs in *M. sexta* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

Das vollständige Alignment von MsHc, Hemocytin von *B. mori*, Hemolektin von *D. melanogaster* und dem humanen vWF ergab zwischen MsHc und Bm-Hemocytin eine Identität von 61%, zwischen MsHc und Dm-Hemolectin von 21% und zwischen MsHc und dem vWF von 13% der Aminosäuren. Dabei konnte die bereits im humanen vWF beschriebene Domänenstruktur [Shelton-Inloes et al. 1986; Shelton-Inloes et al. 1987], die auch im Hemocytin von *B. mori* gefunden wurde [Kotani et al. 1995], auch in MsHc nachgewiesen werden. Die genaue Funktion der verschiedenen Domänen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Experimentelle Befunde zeigen, dass der Domäentyp A eine Homologie zu einem Segment des Komplementfaktors B zeigt [Shelton-Inloes et al. 1986; Shelton-Inloes et al. 1987]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Domänen A1 und A3 an der Bindung an Collagen beteiligt sind [Perutelli et al. 1997]. Die mehrfach im vWF auftretenden Domänen des Typs D werden zum Teil während der Reifung des Proteins mit dem Propeptid abgespalten (D1 und D2) [Perutelli et al. 1997]. Die Domäne D' wurde als mögliche Bindungsstelle für den Faktor VIII beschrieben, der durch diese Interaktion stabilisiert wird [Perutelli et al. 1997]. Interessanterweise liegen im MsHc, ebenso wie im Bm-Hemocytin und

Dm-Hemolectin drei dieser Domänen vor. Möglicherweise üben sie eine ähnlich stabilisierende Wirkung auf bisher noch nicht bekannte Insekten-Proteine ähnlicher Funktion wie dem Faktor VIII aus. Ein weiterer Sequenzabschnitt des Bm-Hemocytons, zwei c-terminale C-Domänen, zeigen in einem Teilbereich eine Ähnlichkeit zu Calcium-abhängigen Lektinen [Kotani et al. 1995]. Dem Domärentyp B ist bisher weder im vWF noch im Hemocytin eine Funktion zugeordnet. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten von MsHc mit Bm-Hemocytin und dem vWF ist auch für das Protein von *M. sexta* zu vermuten, dass es eine wichtige Funktion bei der Homöostase und der Aggregation von Hämocyten ausübt.

Im Northern-Blot Experiment wurde der Einfluß bakterieller Infektionen auf die Expression der MsHc-mRNA untersucht (Abb. 50). Von den untersuchten Geweben zeigten nur Hämocyten eine Expression der MsHc-mRNA. Bei *M. sexta* blieb der Gehalt an mRNA nach bakterielle Infektionen, anders als für das Hemocytin von *B. mori* [Kotani et al. 1995] konstant. Möglicherweise wurde mit der Zeitspanne von 24 Stunden zwischen der Applikation der Bakterien und der Entnahme der Hämocyten für die RNA-Präparation die optimale Induktionszeit verfehlt. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ist dieser Unterschied zu den Ergebnissen in *B. mori* nicht zu erklären. Das durch den Northern-Blot erhaltene Molekulargewicht von ca. 11 kB bestätigte die Größe der klonierten cDNA.

Für weitere Untersuchungen wurde ein Antikörper gegen das durch den Klon pHc-7 kodierte c-terminale Ende des MsHc hergestellt. Der Antikörper erkannte deutlich das rekombinante Protein (Abb. 37B). Im Western-Blot mit Hämolymp- Proteinen von *M. sexta* wurden von dem Antikörper drei Proteine mit hohem Molekulargewicht markiert. Das relative Molekulargewicht des kleinsten Proteins betrug 220 k. Die Größe der beiden anderen Banden wurde nur grob extrapoliert, da sie deutlich außerhalb der Eichkurve des verwendeten Molekulargewichts-Markers lagen. Ihr relatives Molekulargewicht betrug 315 k und 390 k (Abb. 40). Mit den Ergebnissen dieser Untersuchung konnte nicht ermittelt werden, welche dieser Banden das eigentliche MsHc repräsentiert. Hierzu wäre eine Isolierung der Proteine und eine anschließende Sequenzierung erforderlich. Möglicherweise stellen die drei Proteine unterschiedlich prozessierte Formen des MsHc dar. Dies könnte zum Beispiel durch unterschiedliche Glykosylierung oder durch unterschiedliche proteolytische Spaltungen geschehen. Auch für das Protein von *B. mori* schwanken die Angaben zum Molekulargewicht zwischen 280 k des reifen Hemocytons [Mori et al. 1992] und aus der Sequenz abgeschätzten 343 k, wobei bei dem höhermolekularen Protein noch keine Glykosylierung berücksichtigt ist [Kotani et al. 1995]. Aufgrund der großen Ähnlichkeit von MsHc mit dem humanen vWF erscheint denkbar, dass MsHc als Präpro-Protein gebildet wird. Der humane vWF wird aus einem Präpro-Protein von 2853 Aminosäuren in ein reifes Protein von 2050 Aminosäuren konvertiert [Verweij et al. 1986]. Dabei beträgt die molekulare Masse des reifen vWF etwa

270 kDa, während das mittels SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese abgeschätzte relative Molekulargewicht nur 225 k beträgt [Perutelli et al. 1997].

Der Antikörper gegen MsHc erkannte ebenfalls drei Proteine in der Hämolymphe von *B. mori* mit einem relativen Molekulargewicht von 145-165 k, 440 k und 480 k (Abb. 40). Aufgrund der Molekulargewichts-Unterschiede erscheint es jedoch bis zu einer genaueren Überprüfung fraglich, ob es sich bei diesen drei Proteinen um das Hemocytin von *B. mori* handelt oder um zufällig kreuzreagierende Proteine. In den anderen getesteten Insektenarten konnten keine Kreuzreaktivitäten ausgemacht werden.

Die immunhistochemischen Untersuchungen müssen bis zur endgültigen Klärung der Spezifität des hergestellten Antikörpers als vorläufig betrachtet werden. In Gewebeschnitten wurde in keinem Gewebe eine eindeutige Reaktion des Antikörpers beobachtet (Abb. 65). Einige schwach markierte Bereiche stammen eventuell von an Gewebe anhaftenden oder ins Gewebe eingewanderten Hämocyten. In Hämocyten-Präparaten ergab sich eine deutliche Immunreaktion mit granulären Zellen naiver Tiere (Abb. 64 **A** und **B**). Dabei wiesen auch vesikuläre Strukturen Immunreaktivität auf. Auch der vWF kann in humanen Zellen intrazellulär in spezifischen Organellen nachgewiesen werden [Wagner et al. 1991]. In verwundeten Tieren war MsHc nur schwach und in sehr wenigen Zellen nachzuweisen (Abb. 64 **C** und **D**), wogegen es in Hämocyten experimentell infizierter Tiere wieder deutlich detektierbar war (Abb. 64 **E** und **F**). In einigen Fällen wurde die Färbung in Bereichen von Zellhaufen oder beschädigten Zellen beobachtet (Abb. 64 **A**, **B**, **E** und **F**). Da dieses Bild jedoch nicht vollständig homogen ist, wäre es interessant, die Reaktivität des Antikörpers zum Beispiel an ungewaschenen Präparaten zu überprüfen. Die Beobachtungen der immunhistochemischen Untersuchungen bestätigten die Befunde des Northern-Blots bezüglich der Gewebe, die MsHc exprimieren. Eine Induktion der Expression konnte in Hämocyten mit den immunhistochemischen Untersuchungen nicht beobachtet werden und bestätigt somit ebenfalls die Beobachtungen im Northern-Blot.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern derzeit noch kein eindeutiges Bild über die biologische Funktion des MsHc. Die sehr große Ähnlichkeit des MsHc zum vWF und Bm-Hemocytin lässt Raum für die Vermutung, dass MsHc wie die beiden anderen Proteine an der Koagulation von Hämolymphe und der Wechselwirkung von Hämocyten mit verwundetem Gewebe beteiligt ist. Hierfür sprechen die Beobachtungen in den immunhistochemischen Untersuchungen wie auch die Identifizierung des RGD-Motivs und das Vorliegen des von Furinen erkannten Motivs. Eine Möglichkeit zur Überprüfung dieser Hypothese könnte mit immunhistochemischen Untersuchungen an experimentell herbeigeführten Verwundungen oder durch Mutagenese der beiden Struktur motive erfolgen. Da nach der Klonierung der vollständigen cDNA auch der Einsatz von Deletionsmutanten größerer Sequenzabschnitte möglich ist, kann durch die Injektion von rekombinanten Fragmenten in die lebende Larve die

Funktion einzelner Domänen charakterisiert werden. Da in *B. mori* ein Unterschied der Expression von Hemocytin in verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet wurde, erscheint es auch lohnenswert, eine Beteiligung von MsHc an entwicklungsbiologischen Vorgängen zu untersuchen.

Die in der vorliegenden Arbeit mit einem molekularbiologischen Versuchsansatz isolierten cDNAs von vier Genen deuten nach einem Vergleich mit Daten bekannter Proteine anderer Arten auf eine Beteiligung an der Regulation der Hämocyten-Aktivierung hin. Erste Befunde zur Charakterisierung der Funktion der verschiedenen Proteine erhärten die aufgrund der Sequenz-Ähnlichkeiten vermuteten Funktionen. Gegen drei der kodierten Proteine konnten erfolgreich polyklonale Antikörper hergestellt werden. Damit ist eine solide Grundlage für weiterführende Experimente zur Untersuchung der an der Hämocyten-Aktivierung bei *M. sexta* beteiligten Mechanismen gelegt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Affinitätsnachweis mehrere unterschiedliche Faktoren in der Hämocytenmembran des Tabakswärmers *Manduca sexta* nachgewiesen, die den bakteriellen Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid binden können. In den Reinigungsversuchen zeigten zwei dieser Moleküle eine äußerst feste Assoziation an immobilisiertes LPS, sie konnten nur durch Hitzedenaturierung in Gegenwart reduzierender Reagenzien abgelöst werden. Die mittels eines dafür entwickelten Reinigungsschemas isolierten Proteine wurden N-terminal sequenziert. Die Sequenzierung ergab jedoch bisher keine lesbare Sequenz.

Mittels eines molekularbiologischen Versuchsansatzes wurden mehrere Gene isoliert, die an der Hämocyten-Aktivierung nach bakteriellen Infektionen von *M. sexta* beteiligt sein können. Für diese Versuche wurden zunächst Gen-Expressionsbibliotheken aus mRNA hergestellt, die aus Fettkörper-Gewebe und Hämocyten nach einer bakteriellen Infektion gewonnen worden war. Vier der zu Kontrollzwecken ansequenzierten cDNAs zeigten aufgrund der während der Sequenz-Analysen erhaltenen Daten eine potentielle Beteiligung an den erwähnten Aktivierungsvorgängen.

Die cDNA des Hämocyten-Aggregation inhibierenden Proteins (HAIP) kodiert ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 50 k das zur Familie der Chitinasen gehört. Die Sequenz-Analyse zeigte, dass in HAIP aufgrund eines Aminosäure-Austauschs im reaktiven Zentrum die enzymatische Aktivität eliminiert ist. Dieser erste Hinweis auf eine mögliche Chitin-bindende Aktivität des HAIP wurde mit einem Bindungstest bestätigt. Die Chitin-Bindung konnte durch Kompetition mit Glucosamin-Oligomeren und Xylose teilweise unterbunden werden. Wie bereits in der Erst-Beschreibung [Kanost et al. 1994] festgestellt wurde, handelt es sich bei HAIP um ein Glykoprotein. Ein Deglykosilierungsexperiment zeigte, dass der Kohlenhydrat-Anteil über N-220 gebunden ist. Mittels Northern-Blot wurde nachgewiesen, dass eine experimentelle Infektion keinen Einfluß auf die gebildete Menge von HAIP-mRNA hatte. HAIP wird vom Fettkörper produziert. In Hämocyten kann keine HAIP-mRNA nachgewiesen werden. Allerdings ergaben immunhistochemische Untersuchungen, dass HAIP in granulären Zellen nachweisbar ist und das nach einer bakteriellen Infektion dieser Nachweis schwächer ausfällt. Mittels Northern-Blot wurde der Fettkörper als Syntheseort von HAIP bestätigt. Ferner konnte HAIP auch in Cuticula nachgewiesen werden. Mit einer weiteren Methode konnten außerdem erste Anhaltspunkte für eine entwicklungsbiologische Steuerung der HAIP-Expression gefunden werden.

Die cDNA des Immunolektin-3 (IML-3) kodiert ein Protein aus der Familie der Calcium-abhängigen Lektine mit einer Tandem-CRD. Mittels Sequenzanalyse kann vorhergesagt

werden, dass die zweite CRD vermutlich Mannose bindet. Mittels Western- und Northern-Blot Analysen wurden erste Indizien für drei unterschiedlich große Formen von IML-3 gefunden, von denen zwei konstitutiv exprimiert werden. Alle drei Formen werden im Fettkörper in Folge bakterieller Infektionen induziert und synthetisiert. Die tatsächlich in der Hämolymphe vorhandene Menge an IML-3 variiert jedoch in Abhängigkeit von der benutzten Pathogen-Art. Die Masse wurde für die drei Proteine mit 33,5 kDa (IML-3a), 37,5 kDa (IML-3b) und 45 kDa (IML-3c) bestimmt. Die mRNA des IML-3 war in Hämozyten nicht nachweisbar. Mittels weiterer Untersuchungen konnten erste Hinweise auf eine Oligomerisierung von IML-3 und eine Beteiligung des Proteins bzw. seiner Varianten an der Bindung von LPS gefunden werden. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass Plasmatozyten und granuläre Zellen, phagozytotisch aktive Hämozyten-Typen, nach Exposition mit Bakterien IML-3 aufnehmen.

Weiterhin wurde die cDNA der Fettkörper Protease-1 (FP-1) isoliert. Sequenz-Analysen ergaben, dass FP-1 zur Familie der Clip-Domänen Proteasen gehört. Aufgrund eines Serins im aktiven Zentrum des Enzyms stellt FP-1 eine Serinprotease dar, deren Aktivität vermutlich Chymotrypsin-ähnlich ist. In der Sequenz wurden zwei mögliche Spaltstellen für Proteasen gefunden. Wahrscheinlich wird FP-1 als Prä-Proprotein gebildet. Dies wurde durch Western-Blot Ergebnisse mit dem gegen das rekombinante Protein hergestellten Antikörper bestätigt. In der Sequenz wurden zwei potentielle N-Glykosilierungsmotive gefunden. Die Glykosilierung der FP-1 ist sehr wahrscheinlich, da die im Western-Blot ermittelte Masse der FP-1 mit 61 kDa für die Pro-Form deutlich über der anhand der Sequenz berechneten Masse (44,4 kDa) liegt. Darüber hinaus liefern die Befunde des Western-Blots einen ersten Hinweis darauf, dass FP-1 von Gram-positiven Bakterien effektiver aktiviert wird als von Gram-negativen Pathogenen. Ferner kann anhand der Western-Blot Ergebnisse eine Beteiligung der FP-1 an entwicklungsbiologischen Prozessen vermutet werden. Mittels Northern-Blot wurde gezeigt, dass FP-1 in Hämozyten und Fettkörper gebildet wird. Die Expression wird jedoch nach einer bakteriellen Infektion nur im Fettkörper gesteigert. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte FP-1 hauptsächlich in Oenozytoiden, dem Bildungsort der PPO, und in granulären Zellen, die die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen, nachgewiesen werden.

Ferner wurde die cDNA des *M. sexta* Hemocytins gewonnen. In der Sequenz des MsHc konnten eine potentielle Furin-Spaltstelle und ein Integrin-Bindungsmotiv identifiziert werden. Desweiteren wurden zahlreiche N-Glykosilierungsmotive in der Sequenz des Proteins gefunden. Befunde der Western-Blot Analysen unterstützen die Hypothese, dass MsHc unterschiedliche Glykosilierungs-Zustände einnehmen kann und proteolytisch prozessiert wird: der Antikörper gegen ein rekombinantes Fragment reagierte mit Proteinen von 220 kDa, 315 kDa und 390 kDa. MsHc wird in Hämozyten exprimiert. Bakterielle

Infektionen zeigen keinen Einfluß auf die mRNA-Synthese. Diese Ergebnisse wurden durch immunhistochemische Untersuchungen bestätigt.

7. Literatur

Alexander, C. und Rietschel, E. T. (1999).

“Bakterielle Lipopolysaccharide-Hochaktive Stimulatoren der angeborenen Immunität.” *Biospektrum* **5**(4): 275-282.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990).

“Basic local alignment search tool.” *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997).

“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.” *Nucleic acid research* **25**: 3389-3402.

Ashida, M. und Brey, P. T. (1995).

“Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(23): 10698-702.

Ashida, M., Ochiai, M. und Niki, T. (1988).

“Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*.” *Tissue and Cell* **20**(4): 599-610.

Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1996).

“NF- κ B: Ten years after.” *Cell* **87**: 13-20.

Baeuerle, P. A. und Henkel, T. (1994).

“Function and activation of NF- κ B in the immune system.” *Annual Reviews of Immunology* **12**: 141-179.

Beck, G., Cardinale, S., Wang, L., Reiner, M. und Sugumaran, M. (1996).

“Characterization of a defense complex consisting of II-1 and PO from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta*.” *The Journal of Biological Chemistry* **271**(19): 11035-11038.

Beck, G. und Habicht, G. S. (1997).

“Das Wirbeltier-Immunsystem: Vorformen bei Wirbellosen.” *Spektrum der Wissenschaft* Januar 1997: 30-35.

Beckage, N. E. und Kanost, M. R. (1993).

“Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.” *Insect Biochemistry and Molecular biology* **23**(5): 643-653.

Bedick, J. C., Pardy, R. L., Howard, R. W. und Stanley, D. W. (2000).

“Insect cellular reactions to the lipopolysaccharide component of the bacterium *Serratia marcescens* are mediated by eicosanoids.” *Journal of Insect Physiology* **46**: 1481-1487.

Belvin, M. P. und Anderson, K. V. (1996).

“A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll-Dorsal pathway.” *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* **12**: 393-416.

Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987).

“Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels.” *Electrophoresis* **8**: 93-99.

Boman, H. G. (1998).

“Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity.” *Scandinavian Journal of Immunology* **48**: 15-25.

Bradford, M. M. (1976).

“A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Caggese, C., Ragone, G., Perrini, B., Moschetti, R. und Barsanti, P. (1997).

“A strategy for the identification of nuclear genes encoding proteins targeted to the mitochondrion: isolation of *D. melanogaster* cDNA clones with significant homology to sequences in the human cDNA database.” Genbank-entry **Acc.-No.: Y09065**.

Chain, B. M., Leyshon-Soland, K. und Siva-Jothy, M. T. (1992).

“Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analyzed using monoclonal antibodies.” *Journal of Cell Science* **103**: 1261-1267.

Charalambidis, N. D., Foukas, L. C. und Marmaras, V. J. (1996).

“Covalent association of lipopolysaccharide at the hemocyte surface of insects is an initial step for its internalization.” *The European Journal of Biochemistry* **236**: 200-206.

Charalambidis, N. D., Zervas, C. G., Lambropoulou, M., Katsoris, P. G. und Marmaras, V. J. (1995).

“Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend on protein tyrosine phosphorylation.” *European Journal of Cell biology* **67**: 32-41.

Chasan, R. und Anderson, K. V. (1989).

“The role of easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo.” *Cell* **56**: 391-400.

Chetty, C. und Schwab, J. H. (1984).

Endotoxin-like products of gram-positive bacteria. *Handbook of Endotoxin*. Ed.: Rietschel, Elsevier Science Publishers B. V: 376-410

Clark, K. D., Pech, L. L. und Strand, M. (1997).

“Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*.” *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 23440-23447.

Crossley, A. C. (1981).

Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage, and secretion in hemocytes. *Insect hemocytes*. A. P. Gupta, Cambridge University Press: 423-473.

Daffre, S. und Faye, I. (1997).

“Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig-superfamily.” *Federation of European Biochemical Societies letters* **408**: 127-130.

Day, A. J. (1994).

“The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily.” *Biochemical Society Transactions* **22**: 83-94.

Delotto, R. und Spierer, P. (1986).

“A gene required for the specification of dorsal-ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease.” *Nature* **323**: 688-692.

Drickamer, K. (1995).

“Increasing diversity of animal lectin structures.” *Current Opinion in Structural Biology* **5**: 612-616.

Drickamer, K. und Taylor, M. E. (1993).

“Biology of animal lectins.” *Annual Reviews in Cell Biology* **9**: 237-264.

D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H. und Plow, E. F. (1991).

“Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif.” *Trends in Biochemical Sciences* **16**: 246-250.

Dunn, P. E., Bohnert, T. J. und Russel, V. (1994).

“Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta*.” *Annals of the New York Academy of Sciences* **712**: 117-130.

Dunn, P. E., Dai, W., Kanost, M. R. und Geng, C. (1985).

“Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*.” *Developmental and Comparative Immunology* **9**: 559-568.

Fearon, D. T. (1997).

“Seeking wisdom in innate immunity.” *Nature* **388**: 323-324.

Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M.-C., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J.-M. und Hoffmann, J. A. (1998).

“A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway.” *The EMBO Journal* **17**(5): 1217-1227.

Fotiadou, N.-K. (1994).

Untersuchungen zur Induktion der zellulären und humoralen Immunantwort durch Lipopolysaccharid (LPS) bei der Larve der Großen Wachsmotte, *Galleria mellonella*, Diplom-Arbeit, Freie Universität Berlin.

Franc, N. C. und White, K. (2000).

“Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*.” *Microbes and Infection* **2**: 243-250.

Fröbius, A. C., Kanost, M. R., Götz, P. und Vilcinskas, A. (2000).

“Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*.” *European Journal of Biochemistry* **267**: 2046-2053.

Furukawa, S., Taniai, K., Yang, J., Shono, T. und Yamakawa, M. (1999).

“Induction of gene expression of antibacterial proteins by chitin oligomers in the silkworm, *Bombyx mori*.” *Insect Molecular Biology* **8**: 145-148.

Gaines, P. J., Sampson, C. M., Rushlow, K. E. und Stiegler, G. L. (1999).

“Cloning of a family of serine protease genes from the cat flea *Ctenocephalides felis*.” *Insect Molecular Biology* **81**: 11-22.

Geng, C. und Dunn, P. E. (1989).

“Plasmatocyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria.” *Developmental and Comparative Immunology* **13**: 17-23.

Gillespie, J. P., Bailey, A. M., Cobb, B. und Vilcinskas, A. (2000).

“Fungi as elicitors of insect immune responses.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **44**: 49-68.

Gillespie, J. P., Kanost, M. R. und Trenczek, T. (1997).

“Biological mediators of insect immunity.” *Annual Reviews of Entomology* **42**: 611-643.

Ginsburg, D., Handin, R. I., Bonthron, D. T., Donlon, T. A., Bruns, G. A., Latt, S. A. und Orkin, S. H. (1985).

“Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization.” *Science* **228**: 1401-1406.

Gorman, M. J., Andreeva, O. V. und Paskewitz, S. M. (2000).

“Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 35-46.

Goto, A., Kumagai, C., Kumagai, T., Hirose, J., Narita, H., Beck, K., Mori, H., Kadowaki, T. und Kitagawa, Y. (1999).

“Identification and cloning of Hemoclectin: A *Drosophila* protein with homology to the silkworm hemocytin and mammalian von Willebrand factor.” *Genbank Acc.-No.:* **AB035891**.

Hachouf, S. S. und Bosquet, G. L. (1995).

“mRNA sequence of a *Bombyx mori* alpha tubulin.” *Genbank entry* **X83429**.

Halwani, A. E., Niven, D. F. und Dunphy, G. B. (2000).

“Apolipoprotein-III and the interactions of lipoteichoic acid with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*.” *Journal of Invertebrate Pathology* **76**: 233-241.

Hashido, K., Mochida, M., Tsuchida, K., Takada, N. und Maekawa, H. (1996).

“1,7 kB GC-rich sequence of tandem array is discontinuously localized on *Bombyx mori* chromosomes.” Genbank-entry **Accession No.: 2662336**.

Hashimoto, C., Hudson, K. L. und Anderson, K. V. (1988).

“The toll gene of *Drosophila* required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein.” *Cell* **52**: 269-279.

Hipfner, D. R. und Cohen, S. M. (1999).

“New growth factors for imaginal discs.” *Bioessays* **21**: 718-720.

Hoffmann, J. A. (1995).

“Innate immunity of insects.” *Current Opinion in Immunology* **7**: 4-10.

Hoffmann, J. A. und Reichhart, J.-M. (1997).

“*Drosophila* immunity.” *Trends in Cell Biology* **7**: 309-315.

Hoffmann, J. A., Reichhart, J.-M. und Hetru, C. (1996).

“Innate immunity in higher insects.” *Current Opinion in Immunology* **8**: 8-13.

Holthusen, T. K. (1999).

Veränderung des Hämocytenbildes von *Manduca sexta* im Verlauf der Metamorphose. Department of Zoology, Diplom-Arbeit, Justus-Liebig Universität Giessen.

Horohov, D. W. und Dunn, P. E. (1982).

“Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria.” *Journal of Invertebrate Pathology* **40**: 327-339.

Horohov, D. W. und Dunn, P. E. (1983).

“Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Journal of Invertebrate Pathology* **41**: 203-213.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. und Boman, H. G. (1980).

“Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*.” *European Journal of Biochemistry* **106**: 7-16.

Hurlbert, R. E., Karlinsey, J. E. und Spence, K. D. (1985).

“Differential synthesis of bacteria-induced proteins of *Manduca sexta* larvae and pupae.” *Journal of Insect Physiology* **31**(3): 205-215.

Janeway, C. A. (1989).

“Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.” *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**: 1-13.

Janeway, C. A. (1992).

“The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self.” *Immunology Today* **13**(1): 11-16.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Capra, J. D. (1999).

Immunobiology: The immune system in health and disease. London, UK, Elsevier Science.

Jiang, H. und Kanost, M. (2000).

“The clip-domain family of serine proteinases in arthropods.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 95-105.

Jiang, H., Wang, Y. und Kanost, M. R. (1996).

“Primary structure of ribosomal proteins S3 and S7 from *Manduca sexta*.” *Insect Molecular Biology* **5**(1): 31-38.

Jiang, H., Wang, Y. und Kanost, M. R. (1998).

“Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*.” *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **95**: 12220-12225.

Jiang, H., Wang, Y. und Kanost, M. R. (1999).

“Four serine proteinases expressed in *Manduca sexta* haemocytes.” *Insect Molecular Biology* **8**: 39-53.

Johannsson, M. W. (1999).

“Cell adhesion molecules in invertebrate immunity.” *Developmental and Comparative Immunology* **23**: 303-315.

Jomori, T., Kubo, T. und Natori, S. (1990).

“Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of american cockroach *Periplaneta americana*.” *The European Journal of Biochemistry* **190**: 201-206.

Jomori, T. und Natori, S. (1991).

“Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the american cockroach, *Periplaneta americana*.” *The Journal of Biological Chemistry* **266**(20): 13318-13323.

Jomori, T. und Natori, S. (1992).

“Function of the lipopolysaccharide-binding protein of *Periplaneta americana* as an opsonin.” *Federation of European Biochemical Societies letters* **296**(3): 283-286.

Kanost, M. R. (1999).

“Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity.” *Dev Comp Immunol* **23**(4-5): 291-301.

Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, J. H., Ryan, R. O., Van Heusden, M. C. und Ziegler, R. (1990).

“Insect haemolymph proteins.” *Advances in Insect Physiology* **22**: 299-396.

Kanost, M. R., Zepp, M. K., Ladendorff, N. E. und Anderson, L. A. (1994).

“Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **27**: 123-136.

Kato, Y., Motoi, Y., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, M., Higashino, Y., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., Xu, J., Sugiyama, M., Hiramatsu, M. und Yamakawa, M. (1994).

“Lipopolysaccharide-lipophorin complex formation in insect hemolymph: a common pathway of lipopolysaccharide detoxification both in insects and in mammals.” *Insect Biochemistry and Molecular biology* **24**(6): 547-555.

Katzen, A. L., Montarras, D., Jackson, J., Paulson, R. F., Kornberg, T. und Bishop, J. M. (1991).

“A gene related to the proto-oncogene *fps/fes* is expressed at diverse times during the life cycle of *Drosophila melanogaster*.” *Molecular and Cellular Biology* **11**(1): 226-239.

Kawamura, K., Shibata, T., Saget, O., Peel, D., und Bryant, P. J. (1999).

“A new family of growth factors produced by the fatbody and active on *Drosophila* imaginal disc cells.” *Development* **126**: 211-219.

Kawasaki, K., Kubo, T. und Natori, S. (1996).

“Presence of the periplaneta lectin-related protein family in the american cockroach *Periplaneta americana*.” *Insect Biochemistry and Molecular biology* **26**(4): 355-364.

Kim, Y.-S., Ryu, J.-H., Han, S.-J., Choi, K.-H., Nam, K.-B., Jang, I.-H., Lemaitre, B., Brey, P. T. und Lee, W.-J. (2000).

“Gram-negative Bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for Lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immunity genes in *Drosophila melanogaster* cells.” *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 32721-32727.

Kimbrell, D. A. und Beutler, B. (2001).

“The evolution and genetics of innate immunity.” *Nature Reviews* **2**: 256-267.

Kirkpatrick, R. B., Matico, R. E., McNulty, D. E., Strickler, J. E. und Rosenberg, M. (1995).

“An abundantly secreted glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages.” *Gene* **153**: 147-154.

Klünner, T. (1994).

Isolierung und Darstellung von Lipopolysaccharid-Bindungsfaktoren aus der Hämolymphe von *Galleria mellonella* L. Department of Zoology, Diplom-Arbeit, Freie Universität Berlin.

Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. und Sato, R. (1999).

“The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm, *Bombyx mori* is a novel member of the c-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains.” *Federation of European Biochemical Societies letters* **443**: 139-143.

Koizumi, N., Morozumi, A., Imamura, M., Tanaka, E., Iwahana, H. und Sato, R. (1997).

“Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*.” *The European Journal of Biochemistry* **248**: 217-224.

Kotani, E., Yamakawa, M., Iwamoto, S.-I., Tashiro, M., Mori, H., Sumida, M., Matsubara, F., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y. und Mori, H. (1995).

“Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor.” *Biochimica et Biophysica Acta* **1260**: 245-258.

Kvalnes-Krick, K. L. und Traut, T. W. (1993).

“Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding beta-alanine synthase from rat liver.” *Journal of Biological Chemistry* **268**: 5686-5693.

Kyriakides, T. R., Bedoyan, J. K., Patil, C. S. und Spence, K. D. (1993).

“In vivo distribution of immune protein scolexin in bacteria-injected *Manduca sexta* larvae.” *Tissue Cell* **25**: 423-434.

Kyriakides, T. R., McKillip, J. L. und Spence, K. D. (1995).

“Biochemical characterization, developmental expression, and induction of the immune protein scolexin from *Manduca sexta*.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**: 269-280.

Lackie, A. M. (1988).

“Haemocyte behaviour.” *Advances in Insect Physiology* **21**: 85-178.

Ladendorff, N. E. und Kanost, M. R. (1990).

“Isolation and characterization of bacteria-induced protein P4 from hemolymph of *Manduca sexta*.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **15**: 33-41.

Ladendorff, N. E. und Kanost, M. R. (1991).

“Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **18**: 285-300.

Laemmli, U. K. (1970).

“Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* **227**: 680-685.

Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M. und Hoffmann, J. A. (2000).

“Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants in *Drosophila*.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **97**: 11427-11432.

Lanz-Mendoza, H., Bettencourt, R., Fabbri, M. und Faye, I. (1996).

“Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms.” Cellular Immunology **169**: 47-54.

Lee, E., Linder, M. E. und Gilman, A. G. (1994).

“Expression of G-protein alpha subunits in *Escherichia coli*.” Methods in Enzymology **237**: 146-164.

Lee, S. Y., Cho, M. Y., Hyun, J. H., Lee, K. M., Homma, K. I., Natori, S., Kawabata, S. I., Iwanaga, S. und Lee, B. L. (1998).

“Molecular cloning of cDNA for Pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3-beta-glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae.” European Journal of Biochemistry **257**: 615-621.

Lee, W.-J., Lee, J.-D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J. und Brey, P. T. (1996).

“Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 7888-7893.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.-M. und Hoffmann, J. A. (1995).

“A recessive mutation immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**: 9465-9469.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996).

“The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/*cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.” Cell **86**: 973-983.

Lemaitre, B., Reichhart, J.-M. und Hoffmann, J. A. (1997).

“*Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 14614-14619.

Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A. und Reichhart, J. M. (1999).

“Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*.” Science **285**(5435): 1917-9.

Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M. und Kafatos, F. C. (2001).

“Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*.” Cell **104**: 709-718.

Loreni, F., Ruberti, I., Bozzoni, I., Pierandrei-Amaldi, P. und Amaldi, F. (1985).

“Nucleotide sequence of the L1 ribosomal protein gene of *Xenopus laevis*: remarkable sequence homology among introns.” The EMBO Journal **4**: 3483-3466.

Lu, J. (1997).

“Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system.” Bioessays **19**(6): 509-518.

Lynch, D. C., Zimmerman, T. S., Collins, C. J., Brown, M., Morin, M. J., Ling, E. H. und Livingston, D. M. (1985).

“Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method.” Cell **41**: 49-56.

Ma, C. und Kanost, M. R. (2000).

“A b1,3 Glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade.” *Journal of Biological Chemistry* **275**: 7505-7514.

Magill, T. J. (1999).

Charakterisierung von Hämolympfproteinen des Tabakswärmers *Manduca sexta* mit Affinität zu Lipopolysaccharid. Department of Zoology, Diplom-Arbeit, Justus-Liebig Universität Giessen.

Mandato, C. A., Diehl-Jones, W. L. und Downer, R. G. H. (1996).

“Insect hemocyte adhesion in vitro: inhibition by Apoliphorin I and an artificial substrate.” *Journal of Insect Physiology* **42**: 143-148.

Marmaras, V. J., Bournazos, S. N., Katsoris, P. G. und Lambropoulou, M. (1993).

“Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **23**: 169-180.

Marmaras, V. J. und Charalambidis, N. (1992).

“Certain hemocyte proteins of the medfly, *Ceratitis capitata*; are responsible for nonself recognition and immobilization of *Escherichia coli* in vitro.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **21**: 281-288.

Marmaras, V. J., Charalambidis, N. D. und Lambropoulou, M. (1994).

“Cellular defense mechanisms in *C. capitata*: recognition and entrapment of *E. coli* by hemocytes.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **26**: 1-14.

McKay, P. F., Imami, N., Johns, M., Taylor-Fishwick, D. A., Sedibane, L. M., Totty, N. F., Hsuan, J. J., Palmer, D. B., Feorge, A. J. T., Foxwell, B. M. J. und Ritter, M. A. (1998).

“The gp200-MR6 molecule which is functionally associated with the IL-4 receptor modulates B cell phenotype and is a novel member of the human macrophage mannose receptor family.” *European Journal of Immunology* **28**: 4071-4083.

Means, T. K., Golenbock, D. T. und Fenton, M. J. (2000).

“The biology of toll-like receptors.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* **11**: 219-232.

Minetti, C. A. S. A., Lin, Y., Cislo, T. und Liu, T.-Y. (1991).

“Purification and characterization of an endotoxin-binding protein with protease inhibitory activity from *Limulus* amebocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* **266**(31): 20773-20780.

Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F. und Thomas, G. (1999).

“Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis.” *Trends in cell biology* **9**: 28-35.

Mori, H., Iwamoto, S., Kotani, E., Sumida, M., Matsumoto, T. und Matsubara, F. (1992).

“Isolation of cDNA clones coding for humoral lectin of silkworm, *Bombyx mori*, larvae.” *Journal of Invertebrate Pathology* **59**: 40-45.

Muta, T., Hashimoto, R., Miyata, T., Nishimura, H., Toh, Y. und Iwanaga, S. (1990).

“Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes: cDNA cloning, disulfide location, and subcellular localization.” *Journal of Biological Chemistry* **265**: 22426-22433.

Nappi, A. J. und Vass, E. (1993).

“Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions.” *Pigment and Cell Research* **6**: 117-126.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997).

“Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage side.” *Protein Engineering* **10**: 1-6.

Niere, M., Meisslitzer, C., Dettloff, M., Weise, C., Ziegler, M. und Wiesner, A. (1999).

“Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III.” *Biochimica et Biophysica Acta* **1433**: 16-26.

Nossal, G. J. V. (1993).

“Das Immunsystem.” *Spektrum der Wissenschaft SPEZIAL* **2**: 8-17.

O'Brien, D. und McVey, J. (1993).

Blood coagulation, inflammation, and defense. *The Natural Immune System, Humoral Factors*. E. Sim. New York, IRL Press: 257-280.

Ochiai, M. und Ashida, M. (1988).

“Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.” *The Journal of Biological Chemistry* **263**(24): 12056-12062.

Ochiai, M. und Ashida, M. (2000).

“A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*.” *Journal of Biological Chemistry* **275**(7): 4995-5002.

Owhashi, M., Arita, H. und Hayai, N. (2000).

“Identification of a novel eosinophil chemotactic cytokine (ECF-L) as a chitinase family protein.” *The Journal of Biological Chemistry* **275**(2): 1279-1286.

Paskewitz, S. M., Reese-Stardy, S. und Gorman, M. J. (1999).

“An easter-like serine protease from *Anopheles gambiae* exhibits changes in transcript abundance following immune challenge.” *Insect Molecular Biology* **8**: 329-337.

Pech, L. L. und Strand, M. R. (1996).

“Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes.” *The Journal of Cell Science* **109**: 2053-2060.

Perutelli, P., Biglino, P. und Mori, G. P. (1997).

“Von Willebrand factor: biological function and molecular defects.” *Pediatric Hematology and Oncology* **14**: 499-512.

Raetz, C. R. H. (1990).

“Biochemistry of endotoxins.” *Annual Reviews of Biochemistry* **59**: 129-170.

Ravindranath, R. M. H., Moradian-Oldak, J. und Fincham, A. G. (1999).

“Tyrosyl motif in amelogenin binds N-Acetyl-D-glucosamine.” *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 2464-2471.

Ratcliffe, N. A. (1993).

Cellular defense responses of insects: unresolved problems. *Parasites and Pathogens of insects*. Ed.: N. E. Beckage, S. N. Thompson, B. A. Federici. Academic Press, San Diego. **1**: 267-304.

Roebroek, A. J. M., Creemers, J. W. M., Pauli, I. G. L., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E. A. F., Leunissen, J. A. M. und Van de Ven, W. J. M. (1992).

“Cloning and functional expression of Dfurin2, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif.” *The Journal of Biological Chemistry* **267**(24): 17208-17215.

Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985).

“Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.” *Science* **230**: 1350-1353.

Sanford, J. P. und Doyle, D. (1990).

“Mouse asialoglycoprotein receptor cDNA sequence: conservation of receptor genes during mammalian evolution.” *Biochimica et Biophysica Acta* **1087**: 259-261.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).

“DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**: 5463-5467.

Scharrer, B., Paemen, L., Smith, E. M., Hughes, T. K., Liu, Y., Pope, M. und Stefano, G. B. (1996).

“The presence and effects of mammalian signal molecules in immunocytes of the insect *Leucophaea maderae*.” *Cell and Tissue Research* **283**: 93-97.

Scholz, F. R. und Trenczek, T. (1997).

“Activation of insect hemocytes after bacterial infections.” *Proceedings of the German Zoological Society* **90.1**: 385.

Shaw, G. und Kamen, R. (1986).

“A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.” *Cell* **46**: 659-667.

Shelton-Inloes, B. B., Broze, G. J., Miletich, J. P. und Sadler, J. E. (1987).

“Evolution of human von Willebrand factor: cDNA sequence polymorphisms, repeated domains, and relationship to von Willebrand antigen II.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* **144**: 657-665.

Shelton-Inloes, B. B., Titani, K. und Sadler, J. E. (1986).

“cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms.” *Biochemistry* **25**: 3164-3171.

Shin, W. S., Park, D.-S., Kim, S. C. und Park, H.-Y. (2000).

“Two carbohydrate recognition domains of *Hyphantria cunea* lectin bind to bacterial lipopolysaccharide through O-specific chain.” *The European Biochemical Societies letters* **467**: 70-74.

Shin, W. S., Park, S.-S., Park, D.-S., Kim, M. G., Kim, S. C., Brey, P. T. und Park, H.-Y. (1998).

“Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 827-837.

Smith, C. L., Giordano, H., Schwartz, M. und DeLotto, R. (1995).

“Spatial regulation of *Drosophila* snake protease activity in the generation of dorsal-ventral polarity.” *Development* **121**: 4127-4135.

Söderhäll, K. und Cerenius, L. (1998).

“Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity.” *Current Opinion in Immunology* **10**: 23-28.

Stanley-Samuelson, D. W., Jensen, E., Nickerson, K. W., Tiebel, K., Ogg, C. L. und Howard, R. W. (1991).

“Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 1064-1068.

Strand, M. R., Hayakawa, Y. und Clark, K. D. (2000).

“Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs.” *Journal of Insect Physiology* **46**: 817-824.

Strand, M. R. und Johnsson, J. A. (1996).

“Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*.” *Journal of Insect Physiology* **42**: 21-31.

Sugumaran, M. und Kanost, M. R. (1993).

Regulation of insect hemolymph phenoloxidases. Parasites and Pathogenes of insects. Ed. N. E. Beckage, S. N. Thompson, B. A. Federici. Academic Press, San Diego. **1**: 317-342.

Sun, S.-C., Lindström, I., Boman, H. G., Faye, I. und Schmidt, O. (1990).

“Hemolin: An insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily.” *Science* **250**: 1729-1732.

Takahashi, H., Okazaki, S. und Fujiwara, H. (1997).

“A new family of site-specific retrotransposons SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*.” *Nucleic Acid Research* **25**: 1578-1584.

Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A. und Imler, J.-L. (2000).

“Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 10520-10525.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994).

“Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties, and weight matrix choice.” *Nucleic Acid Research* **22**: 4673-4680.

Tossi, A. (2001).

“An antimicrobial sequence data base with more than 600 entries (August 2001).” <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>.

Trenczek, T. (1998).

“Endogenous defense mechanisms of insects.” *Zoology* **101**: 298-315.

Trenczek, T. und Bennich, H. (1990).

Characterization of immune competent hemocytes by monoclonal antibodies. *Molecular Insect Science*. H. H. Hagedorn, H. G. Hildebrand, M. G. Kidwell and J. H. Law. New York, Plenum: 372.

Tsuzuki, S., Iwami, M. und Sakurai, S. (2001).

“Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**: 321-331.

Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S. (1995).

“Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.” *Annual Reviews of Immunology* **13**: 437-457.

van der Spek, H., Arts, G. J., van den Burg, J., Sloof, P. und Benne, R. (1989).

“The nucleotide sequence of mitochondrial maxicircle genes of *Crithidia fasciculata*.” *Nucleic acid research* **17**: 4876-.

Venegas, A., Goldstein, J. C., Beaugard, K., Oles, A., Abdulhayoglu, N. und Fuhrman, J. A. (1996).

“Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function.” *Molecular and Biochemical Parasitology* **78**: 149-159.

Verma, R. S. und Elwood, P. C. (1997).

“Identification and characterization of homologous cDNA to KB folate receptor from human salivary gland.” Genbank entry **Acc.-No.:** AF000381.

Verweij, C. L., Diergaarde, P. J., Hart, M. und Pannekoek, H. (1986).

“Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit.” *The EMBO Journal* **5**: 1839-1847.

Villarejo, M. R. und Zabin, I. (1974).

“Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains.” *Journal of Bacteriology* **120**: 466-474.

Voet, D. und Voet, J. G. (1994).

Biochemie. Weinheim, Verlag Chemie.

Wagner, D. D., Saffaripour, S., Bonfanti, R., Sadler, J. E., Cramer, E. M., Chapman, B. und Mayadas, T. N. (1991).

“Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide.” *Cell* **64**: 403-413.

Wang, Y., Jiang, H. und Kanost, M. R. (1999).

“Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**: 1075-1086.

Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T. und Sakai, H. (1993).

“Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential for chitinase activity.” *Journal of Biological Chemistry* **268**: 18567-18572.

Weis, I. W., Taylor, M. E. und Drickamer, K. (1998).

“The c-type lectin superfamily in the immune system.” *Immunological Reviews* **163**(19-34).

Weis, W. I., Drickamer, K. und Hendrickson, W. A. (1992).

“Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide.” *Nature* **360**: 127-134.

Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H. und Hultmark, D. (2000).

“A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 13772-13777.

Wiegand, C., Levin, D., Gillespie, J. P., Willott, E., Kanost, M. R. und Trenczek, T. (2001).

“Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **45**: 95-108.

Williams, M. J., Rodrigue'z, A., Kimbrell, D. A. und Eldon, E. D. (1997).

“The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense.” *The EMBO Journal* **16**(20): 6120-6130.

Willott, E., Trenczek, T., Thrower, L. W. und Kanost, M. R. (1994).

“Immunochemical identification of insect hemocyte populations: Monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*.” *European Journal of Cell Biology* **65**(2): 417-423.

Wilson, R., Chen, C. und Ratcliffe, N. A. (1999).

“Innate immunity in insects: The role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*.” *The Journal of Immunology* **162**: 1590-1596.

Wittwer, D., Franchini, A., Ottaviani, E. und Wiesner, A. (1999).

“Presence of Il-1- and TNF-like molecules in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) haemocytes and in an insect cell line from *Estigmene acraea* (Lepidoptera).” *Cytokine* **11**: 637-642.

Xu, J., Nishijima, M., Kono, Y., Taniai, K., Kato, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., Choi, S. K. und Yamakawa, M. (1995).

“Identification of a hemocyte membrane protein of the silkworm, *Bombyx mori*, which specifically binds to bacterial lipopolysaccharide.” *Insect Biochemistry and Molecular biology* **25**(8): 921-928.

Yamamoto, R. T. (1969).

“Mass rearing of the tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation.” *Journal of Economic Entomology* **62**(6): 1427-1431.

Yoshida, H., Kinoshita, K. und Ashida, M. (1996).

“Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.” *The Journal of Biological Chemistry* **271**(23): 13854-13860.

Yoshida, H., Ochiai, M. und Ashida, M. (1986).

“Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system.” *Biochem Biophys Res Commun* **141**(3): 1177-84.

Yu, X.-Q., Gan, H. und Kanost, M. R. (1999).

“Immulectin, an inducible c-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**: 585-597.

Yu, X.-Q. und Kanost, M. R. (2000).

“Immulectin-2, a Lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria.” *Journal of Biological Chemistry* **275**: 37373-37381.

Zor, T. und Selinger, Z. (1996).

“Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.” *Analytical Biochemistry* **236**: 302-308.

8. Anhang

8.1. Sequenzen der benutzen Primer

HAIP:

510 5' TCA AGA CCA AGT ATC CT 3' (Sequenzierung)
 511 5' TAC TTC ACT CCT GAA CG 3' (Sequenzierung)

IML-3-Primer:

750 5' ACG TCA CTG ACG TGT TG 3' (Sequenzierung)
 751 5' ATC TCG TCA ACG TCA CTG 3' (Sequenzierung)
 752 5' TTC ATG GTC ACA CGG G 3' (Sequenzierung)
 756 5' TAG CCA TGG GAA GCA ATG TGT TTC (Klonierung in H₆pQE, NcoI)
 757 5' ATT AAG CTT AAT TAA ACG TTG TTT G 3' (Klonierung in H₆pQE, HIND III)

Ms-Hemocytin-Primer:

760 5' TGC GAC AAG TCG TGT C 3' (Sequenzierung)
 761 5' TCA GAG TTA TTG CTT CC 3' (Sequenzierung)
 762 5' TAC CGC TCA GAG GGT TC 3' (Sequenzierung)
 765 5' GAT CTC CAT GGA GAA TCA AAC GTG 3' (Klonierung in H₆pQE, Nco I)
 766 5' CTG TAA GCT TAA GTT TAT CTA CGC G 3' (Klonierung in H₆pQE, HindIII)
 767 5' ACA CAG TAA ATG CAC GCC 3' (Sequenzierung)
 768 5' TGT CTG GAC TGT ACG TGC 3' (Sequenzierung)
 769 5' AAG AGT TGG CAA GCG AGT CC 3' (Sequenzierung)
 775 5' TAG TGT ACA GAA CTT GCG TGG 3' (Sequenzierung)
 776 5' AAG TTC TGT ACA CTA GTG GCG 3' (Sequenzierung)
 777 5' AGA TAC CCT CAG AGA GCG AGG 3' (Sequenzierung)
 778 5' TCT TAC TGC ACG TGC AGG ATG 3' (Sequenzierung)
 779 5' ATG GAT TGC AAG ACT GTC CTG ACG 3' (Sequenzierung)
 780 5' TTG CAA ACA CAT TCG TCG CAG 3' (Sequenzierung und Amplifikation von pHC-30)
 782 5' GGI YTI TGY GGI AAY TAY AAY GG 3' (degenerierter Primer, konserviert in BmHc und vWF)
 783 5' ATA GGC TCG ACC CTC ATC 3' (Sequenzierung)
 784 5' TCT GTC ACT GTG CCA CGC 3' (Sequenzierung)
 788 5' TTG CTC TTG CCG TCA GGT C 3' (Sequenzierung)
 789 5' ATG TGC CAC CGG ATG GAC 3' (Sequenzierung)
 790 5' TGT GCT TCT TTG AAC ACC TGC AG 3' (Sequenzierung)
 791 5' ATA CCC ATG CGA CAA ACT CTG C 3' (Sequenzierung)
 792 5' AGA ACG ATC CGA AGT TGC ACT CG 3' (Sequenzierung)
 793 5' TTC AGT ACT TCA GCG CAT TGG GAC 3' (Sequenzierung und Amplifikation von pHC50)
 794 5' AGG TGT AGT TGG TGC AGA AGT CTG 3' (Sequenzierung)
 796 5' TTG CGC AGG ATG ATG AGC CAC G 3' (Sequenzierung)
 797.2 5' TAC TTT GTC GCC GAA CTT GCA CG 3' (Sequenzierung)
 798 5' TGA TGT GGA TAA CAG TCA CCT GG 3' (Sequenzierung)
 799 5' AAT GGA AGA CCA GGG AGT TCT GC 3' (Sequenzierung)
 800 5' TTC AAG GCA CCG CAG GTC TCT TG 3' (Sequenzierung)

Protease-Primer:

653 5' ATA CAA CCA CAG CTA TA 3' (Sequenzierung)
 655 5' TTT CCT CAC ATG GCG CTG 3' (Sequenzierung)
 656 5' AGT TTC TCC TGG TAC TC 3' (Sequenzierung)
 657 5' AGA TAC CAT GGT TCG GGA AGT GTT G 3' (Klonierung in H₆pQE, worked, Nco I)
 658 5' GTC AAG CTT CTA AGG CCA CAC 3' (Klonierung in H₆pQE, HindIII)

8.2. Sequenz des Immunolektin-3

Gegenwärtig bekannte Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäure-Zusammensetzung des Immunolektin-3. In der Sequenz wurde das potentielle Signalpeptid gepunktet unterstrichen. Ein mögliches N-Glykosilierungsmotiv ist einfach unterstrichen. Mehrere Polyadenylierungssignale sind doppelt unterstrichen.

1		tg	
3	<u>gagcggccgccccgggcaggtgctacgcggagtcg</u> <u>ttgtgttgattaccgtctcaatagtc</u>		20
	<u>E R P P G Q V L R G V V V L I T V S I V</u>		
63	<u>cagggaaagcaatgtgtttcgtgccgactacgaataccatgcatcagctggcggttggttt</u>		40
	<u>Q G S N V F R A D Y E Y H A S A G G W F</u>		
123	aagttccacaaggtgcctgcccgattggcagcgcgcgactcatgtgagcattcgaaggt		60
	K F H K V P A D W H D A R L M C D F E G		
183	gctgttttggcgtcgcccataaatgtggacgtcactgacgtgttgacagaacattatcaac		80
	A V L A S P I N V D V T D V L Q N I I N		
243	aaaattgagcatttgtctaccgggtgtgcacactgggtgtccataatacaatatcgccagta		100
	K I E H L S T G V H T G V H N T I S P V		
303	gtatttaaatagtatagaaggagtgcccttgtcagcactgccgggtgcgcacgcgtgatatg		120
	V F N S I E G V P L S A L P V R T R D M		
363	ttcacccaggagtagcagctcagggccgcactgtgcccgcctgatacctcaggagggactc		140
	F T E E Y S S G P H C A R L I P Q E G L		
423	gtcgcagggcagctgtagcgcgcgctcccctacatttgttacaagaacaagaccgccgaa		160
	V A G S C S D A L P Y I C Y K N K T A E		
483	ctgagcatgaccgagtggtgggaccgtcgacaaaaggttatcagcttagtgccaaaactgga		180
	L S M T E C G T V D K G Y Q L S A K T G		
543	cactgctacaagttccacaattacgggttggcgtggctgctggcgtacttgagatgtatc		200
	H C Y K F H N Y G L P W S L A Y L R C I		
603	gctgagggggggcagctggccgtcatcaacagcgcgtgtggaggcgaacgtcctcaaggaa		220
	A E G G Q L A V I N S A V E A N V L K E		
663	ctcttggcagcgcatacccgactggactcattaagggagggtacgcaggagggggcgcttcctc		240
	L L A R Y P T G L I K G G Y A G G A F L		
723	ggctttcatgattggaataataacaatgtttggagaaccgtcaatggacagacgctggaa		260
	G F H D W N N N N V W R T V N G Q T L E		
783	gaagctggctatgcaattgggggtgtcaccagccggacagctccgtacaaaactgtggc		280
	E A G Y A N W G V T Q P D S S V Q N C G		
843	cagatgtttcgcagcagggcaactcgacgatataggatgtgcaagtagtaccctttatatgc		300
	Q M F R S G Q L D D I G C A K V P F I C		
903	gagaagcaccctaataacatcatgccagtcocaaacaacgtttaattgaaaagaataacg		314
	E K H P N N I M P V P N N V -		
963	tcattagtgtagtgccgagcatttatatgtttcaaagtagtcagacattatacagtatagtc		
1023	tggtatagtcgggaccaaattctatgctccaaaagttataaccaattgttaagacaagtc		
1083	cttagattttaatacaaaaattacttattgatagaaaatgtgataatatgcatgtagcgg		
1143	cgtgtaagtttacgctattgttagaggaacagatggttgcgctccgctgtagaaggggaag		
1203	accaccagctgaagatggaagatgggtgcgctctgataggtcgcggtccctccgacagttc		
1263	ctatttggaggtggtatacttattgcgcgctgcgcaaatctgttaccgcaattcagtatc		
1323	gactatgcccatcaaggggtgattattgggcattatttcctaattatccatattcatcacg		
1383	cagtttttagtgatgtttacgagatgggggtgtacattaattgtgtcgccataatacacat		
1443	tataaacgtgaaaatcactacatggaaaaaatatgatataattagcaaatcttactaga		
1503	agaccgggagacggttagctgcaactataacgtaggattatatacctctttggtttaaaat		
1563	ggccggctcgcgctgatcattgcgctgcgatataatttttttggctgtcattaattgtt		
1623	agatcctcagaaccaaagagaatataatcactacgttttaagagataggacttaatacaa		
1683	agtaataaaatcgaatttacatggcgtatcaataccaatatcacggaagaatacgtcagg		
1743	aacgtcaaataacaataactaccaactgaacaaaatacatagtagtgagcactttttatcg		

1803 atatcgataaattctactgggtgggaatcgacgctaatactgctactttgataaaattcatat
1863 aatgtattttcgagtcacattatcaatccaactcacaatatacagtgaacattttagca
1923 ctataattacaaggctagactaaaatgaggactcgaaataaaacgaaaagctttcacatg
1983 ttgaataataattgtattttaaaataaaaatccttcattcaccatgtaggcgaatatagtt
2043 gcacttatgataggtcaaggtacaatgagaatatttaattataaggatggtgacacttct
2103 ttgtcgcacttctcttgaaagatattatcatttgggcaataattgtttataaaaaacatgg
2163 cacggaaattcaaacaaaatttcatcaggaagtggatcagctttcaaattttctcgatgg
2223 atggctgactttctaaaggcgattgttcttttaaatctttgttattaaagtgagaaccac
2283 acacatatttcaaaatgacagcttttctatgggaacatatatacaaatcttctttttcca
2343 caacctgaactcactttcggcatctggaaatatttttaattgtaataaaattgcttatt
2403 aaattatatttaagcctaaaatcataaacagtgaccaggcatattgattgctcaatgcat
2463 ttttaagtacacacacacacgcacacgcacacacacacacacacacacacacacacacac
2523 acacacacacacacaccgcac
2583 tcatcttactaatattataaaaacgtgctgcaatgtagtttattattcgtaccgcg
2643 aaaaaatctaaaatgattgctgattaaacttggtagatgtagatgtagaattactactttt
2703 tactactatggtccacagaatctggacctaaatgggtgaaaccacggaggggcaaatgga
2763 ttaataaaatttaaacaggatcgatatacgataataaacaacatcactagtaacataat
2823 ggtaattagaaaataagaatttttattatttctaagctactttatttgcgagatggctaa
2883 aaacatctaattaatgcttacctgaccgcatccaatggaaatttctgcataaacattctg
2943 cttttgtgatttattcgaactggctcgatctccacaaatttcacacgtaatgaaacgtttt
3003 tttgggtggcatgtctttgaaacgtattcatttacaccaacaaaaacactttttggtatat
3063 ttttacttgtttgaataacaaataatacaaacataaatcaataaacacaaatgtattcca
3123 aaacgtcaggaagtaaacacaaataataatggcggtagggaatagaaagagaaactgta
3183 ctgagagagagagatagcagtatccgccattaaatgccatgtcaattccatacaaaaagtt
3243 tttttgttcttctgttgcgctaggctgctcagaacaatgcttgttctttaaaacgtagtga
3303 ttatattctctttgcttgttcttgttctgaggttagatcggacggacgcttcacaatcttt
3363 tcgctagctttatttttgggttcttgttatttgattcaaattattctgtttataaatt
3423 agtatagtttttgttataggttaataattacttttttaggtttatgttaatttttctaata
3483 ataaaatgtaaaaaccctaaatataatataacagaactgaatacctaaccatcgcatgag
3543 cacaaaattttgcatgactatcttcatatgtccgttctatataattttaacactctgata
3603 ttaatttaattgctgacgtaaatccattctctaacgaagtattatgtatttaaaataaac
3663 taatgactttgtacaatatactggctcactgctgccatcctctactactgagaagattta
3723 ggtggtagatgaacattttctacgctggtgaaaatgtagtttatagaaataaaatgtttattt
3783 tgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

8.3. Vollständige Sequenz des *M. sexta* Hemocytins

In der Sequenz wurden mögliche N-Glykosilierungsmotive (NXS/T) einfach unterstrichen. Ebenfalls einfach unterstrichen ist ein Polyadenylierungsmotiv (AATAAA) in der 3'-nichtkodierenden Region. Doppelt unterstrichen hervorgehoben wurden Bereiche in der 3'-nichtkodierenden Region, die die mRNA des Hemocytins als instabil markieren (ATTA und ATTTA). Farblich hervorgehoben wurden:

eine potentielle Furin-Spaltsequenz (**RXXXXR**) und ein potentielles Zellattachementmotiv (**RGD**).

```

1      ctgccaggctggcgagtggaacttgaccacaggtcccttgtgggtgctcgctgcagtgccgt
61     gggcgaccctcactacaccacggttcgacgggctgcggtacaacttcatgggccgctgtac
121    ttacactctcttcaactctgggtgacgtcaatattgaagtggaaagcattgcgtgctcagg
181    agctatcaccgaagctatgagcctagccccctacacagcggaaggcaagccgctcgtgcac
241    taaggccgctcagtcctcgtacaatggagtcacaatccatctcaagcagggtggggttcgt
301    cctggccaatgggaaggagatctctacgctgcccgttgtaataggagataacaggatacg
361    agctacgtcttctctcttcttattgtacaactgccaacaaagtggacctctgggtggga
421    cggcaacactcgtgtcttcgtcgacgtgcctccagaattccacgacaagaccaagggtct
481    ctgcgccaccttcaacctgaacaaaaagacgacttctcgacaccggagaacgatgtaga
541    gcaatcagtcctggcgtttgccaacaaatggaagaccagggagttctgccttgacgtgga
601    cacgaaggaaccggagcatccccgcaaggccaacgtggagaacaaagaagccgagaa
661    atactgcagcaagttaaatagcaagctatttgagtcagccactggtagctggagctgga
721    gccgtactacgaatcctgtctgtatgacatgtgcgcagtcgcccggggacgtgccgcgctg
                                     M R R G R A A L      11
781    cctgtgccccatcctcgggagactacgccatggcctgcgccaaggctggcgatgggtgca
      P V P H P R R L R H G L R Q G W R D G A      31
841    gagcgggtacaacgtaaggagtgccaactgtcgtgcaccggcggtcaggagtacacggtg
      E R Y N V K E C E L S C T G G Q E Y T V      51
901    tgcgaggacagttgcttgcgcaagtgtcggacacggcgctggcgggcagcggcacttgc
      C A D S C L R K C S D T A L A A S G T C      71
961    aagcccagctgtgtggggaagcgcttgcctactggacagctgtcagacgacagcggg
      K P S C V E G S A C P T G Q L S D D S G      91
1021   gtgtgcgtgccgggtgggactctgcccctgctaccacaaaggactgcagttcaatgccggc
      V C V P V G L C P C Y H K G L Q F N A G      111
1081   taaaaagaggtcagagcgggaaagcgagaaagagaactttgcacatgtgtaggagcccgt
      Y K E V R A G K R E R E L C T C V G A R      131
1141   tgggactgtgctcccgccactcccggaggagatccagaactaccctcccgccgaagacttg
      W D C A P A T P E E I Q N Y P P A E D L      151
1201   aggaccaactgcagcgcgagcaacaacatggagttcaccacttgtgagatcgctgagcct
      R T N C S A S N N M E F T T C E I A E P      171
1261   cttacttgcaagaacatgcatcttccgccatcatcaacaactgctgaatgccgtccaggc
      L T C K N M H L P P S S T T A E C R P G      191
1321   cgccagtgcaagaagggttacgtgttagaaacagtggtcaaagaagtgcgtcctggcgaca
      R Q C K K G Y V L E T V S K K C V L A T      211
1381   gagtggcccctgccatcacggaggcaggagttatcctgatggacacgtcatgcaggaggaa
      E C P C H H G G R S Y P D G H V M Q E E      231
1441   tgtaacaatgtgaatgcaagaacggcaactggactggcagcaagcgggaagtgcgcgggc
      C N K C E C K N G N W T C T K R K C A G      251
1501   gtgtgcagcgcctggggcgactcgcacgtcaccagcttcgacggcaccgactgacttc
      V C S A W G D S H V T S F D G T D Y D F      271

```

1561	gagggcgtctgcacctacctcctcgccaagggcgtgatggacggcaatgacgggttcgac E G V C T Y L L A K G V M D G N D G F D	291
1621	gttgagattcagaacgttccctgtgggtacaactggcgcgacctgctctaaatcagtgacc V E I Q N V P C G T T G A T C S K S V T	311
1681	ctgaaggtcggcgggtgggtggcaacgaagaaattgtctccctcaccaagaacgctccaatt L K V G G G G N E E I V S L T K N A P I	331
1741	cccgacatctctaaactgaagcgaattaagctccgcattgpcggaaatatacgtattcctg P D I S K L K R I K L R I A E I Y V F L	351
1801	gatgtcccacgctggtggaatgagcctgacagtgaggacagagagctgpcgtgtttacgtcaag D V P S L G M S L Q W D R E L R V Y V K	371
1861	atcgattccatgtggcagaacaggggtgaaaggtctttgtggtaactacaatggagacatg I D S M W Q N R V K G L C G N Y N G D M	391
1921	cgcgacgacttccaacgcctctggcggagggatggccgagtcctcggctctcatcttc R D D F Q T P S G G G M A E S S A L I F	411
1981	gcggaactcttgaaactgaagcctacctgtccgaaaccgcagcctgctattgatcactgc A D S W K L K P T C P K P Q P A I D H C	431
2041	aaacaacgctccagaacgctcgcgaatgggcgcaagaaacctgpcggggccttgaagcgttac K Q R P E R R E W A Q E T C G A L K R Y	451
2101	cctctgtcactgtgccacgcggaggtgcccggctcggcgcgcttcgtgcagcgttgccgagcgc P L S L C H A E V P V G A F V Q R C E R	471
2161	gatgpcgtgpcgtgtgpcgacgcgggggggactgpcgpcgtgpcgpcgtgpcgpcgpcgtgpcgpcg D A C V C D A G G D C A C A C A A L A A	491
2221	tacgpcgacgcgpcgtgpcgtgpcgpcgactgpcgpcgtgpcgpcgpcgpcgpcgpcgpcgpcgpcg Y A H A C S L R G L D L R W R T P Q L C	511
2281	ccgatgpcagtgpcgacgaagagtgpcctgcaactacgaccccgpcgtgpcgtgpcgtgpcgpcgpcgpcg P M Q C D E E C S N Y D P C V S A C P V	531
2341	gagacttgpcgacaacaccctgtattacacagaaatgaagaccaactgpcgaacaggacacc E T C D N T L Y Y T E M K T N C E Q D T	551
2401	tgtgtgaaggttgcaagccaagaagtcgctgpccccgaagcactgtgtacaagaacgc C V E G C K P K K S C P E G T V Y K N S	571
2461	tcgctaacagactgtgtgpcgpcgtgccaagtgcaaacgggtgpcgpcatgaccctcagggac S L T D C V P R A K C K P V C M T L E D	591
2521	ggccgagaaatattggagggagaggtcatcgaagaggacgcgpcgpcacacactgpcaggtgt G R E I L E G E V I E E D A C H T C R C	611
2581	tcaaagaagcacagagtgctgtacaggacagccatgctctactgaaccgccaacacatcgg S K K H R V C T G Q P C S T E P P T H R	631
2641	ctccaccgaaccatccagcgcgagaagccacacgacgagccggttgaatgtgpcaccggatg L H R T I Q R E A T R R A V E M C H R M	651
2701	gaccaactggatcaacgggggtccccagaaactggacccaatggggagtcattgacaac D Q L D Q R G P P E T G P N G E S I D N	671
2761	gaaccactccctaaacctaaggaattgcaaattggctccccgatgtgcaagccggacatg E P L P K P K E L Q I G S P M C K P D M	691
2821	atgaagaaaatcgagtgccgcacggctcaggggtcacaaggagccgaaggagaccggctca M K K I E C R T V E G H K E P K E T G L	711
2881	gacgtggggcgcagccaggagaagggcttggtgtgcaaggaggtcggcaaggcttgtcca D V G R S Q E K G L V C K E V G K A C P	731
2941	gactttgagatagcgtgttctgpcgagtgagataccgcaagcctgpcgtcacctcggag D F E I R V F C E C E I P E A C V T S E	751
3001	cgtcccaacgacccccaccacaaccgactgpcgcaagttctacgagtgpcgcccccggt R P N D P P P N R L Q Q V L R V C P P G	771
3061	cccacgctgaaggactgpcgccccgggaccctgtacaacccggtagccatgggtgtgpcgac P T L K D C A P G T L Y N P V A M V C D	791
3121	tggcctgpcagtcgpcgtgacccatgagggccggagtgpcggagtgpcgtgpcacgpcctcact W P A V V I P M R P E C G V A A T A S T	811
3181	cctacaactgtcactttggctgcaaacactagtagacactactacggtggaagaagaagaa P T T V T L A A T P S T P T T V E E E E	831
3241	caacgaaccttaatttcgaaagtcctatgggaaccagcaataaaagtgccgcctcgcct Q R T L I S K V P W E P A I K V P P S P	851

3301	gtgccgagccgctgtcccccgggcaaggtgtacaagccctgcgcataccatgcgacaaa V P S R C P P G K V Y K P C A Y P C D K	871
3361	ctctgcgactactccaaacgaatactggtggataaaggcagatgtatgctggagtcctgc L C D Y S K R I L L D K G R C M L E S C	891
3421	gtggacgggtgtgtcgcgacgagtcggctcgcgaacatcgagtgcaacttcggatcgttctgg V D G C V D E S V A N I E C N F G S F W	911
3481	cgcgacgagctgacctgctaccgctacacgactgcacttgcttcaggaacggggatatac R D E L T C V P V H D C T C F R N G D I	931
3541	gtcaggccccatggagttatacacgaaggttgcattctcctgcctatgcatggacaacgag V R P H G V I H E G C I S C L C M D N E	951
3601	ctgcaactgcgactccagccactgcccgatgataggctcaaccacttgcccatgatggag L H C D S S H C P M I G S T H L P M M E	971
3661	tacagcccctcagtcctaccccatacagccccacccatccactaaagccccagttgag Y S P S V Y P I Y S P T P S T K A P V E	991
3721	attccaatcacaataccatcatcagtgggatcgactccgtctacgccaggaattagttcg I P I T I P S S V G S T P S T P G I S S	1011
3781	cctccgctgataatcaagacgactggttacgccaccaccagaatgtgcgccagataggtac P P L I I K T T V T P P P E C A P D R Y	1031
3841	atagacttgatgatgggggatcaacctctgccagactcctcgtacagtgccagctcgaag I D L M M G D Q P L P D S S Y S A S S K	1051
3901	gcgagtgaactgttcgctccacacaacgctaagcttttcagccgccctaatgatgtctca A S E L F A P H N A K L F S R P N D V S	1071
3961	gccggcagctggaatccacaaatatacagacaagaaccagtacatccaagtggagttgcc A G S W N P Q I S D K N Q Y I Q V E L P	1091
4021	acgcgggagccgatctacggcggtgatgcaaggaagccccttgttcaaccagtacgtg T R E P I Y G V V M Q G S P L F N Q Y V	1111
4081	accagctacgaggtggtgtacgggagacgatggtcacacggttctccactgtcgcagggacct T S Y E V L Y G D D G H T F S T V D G P	1131
4141	gacggcaagagcaaggtgttcgcgccccctgggacaacaataccccgctgaagcaaatg D G K S K V F R G P V D N N T P L K Q M	1151
4201	ttcgaaccgccgatagaggccaaggtggtccgcatcccaccgctgacgtggcagcagcagc F E P P I E A K V V R I H P L T W H D D	1171
4261	atcgctgtcaggatggagctcatcggctgcggggagctcaccaccaccacgatcaccacc I A V R M E L I G C G E L T T T T I T T	1191
4321	agacacaccactgttactactttggagccaatgcaatgcacagagccccttggttgccg R H T T V T T L E P M Q C T E P L G L A	1211
4381	tctaattctacctctccggcaaatagacgtgagttcgaacagcgcgcaagagatacttc S N L P L R Q I D V S S N S D A K R Y F	1231
4441	aagctggatggagagagaggctggaagccgctgtacagcaccaccaggggaatgggtcatg K L D G E R G W K P L Y S T P G E W V M	1251
4501	ttcgacttcacatcaccgctaacctgaccggcatcaccactaaaggcgggtccgagcgg F D F T S P R <u>N L T</u> G I T T K G G P S G	1271
4561	tgggtgacagtcatacaaggtcctctacacgtcagacctgaccaccttcaaccatcat W V T V I Q G P L H V R P D H L Q P N H	1291
4621	cgacgagatggcaaggagaaggtgttcccgccaactatgacaacgactcggcagtgacc R R D G K E K V F P A N Y D <u>N D S</u> A V T	1311
4681	aacgagttcagacccccgacacatgcgacgtacctgaagatcttacctttgaagtggaaa N E F R P P T H A Q Y L K I L P L K W K	1331
4741	ggaggaatggagatgagggctcagcctattggatgcttcgagccttacgcagtgacagaa G G M E M R V E P I G C F E P Y A V T E	1351
4801	atggtaccaatacgcgaggagacgacaacggttctccccggagacgtgcgaggctgtccc M V P I R E E T T T F S P E T C E V C P	1371
4861	gggggtgcaggacgtcgtcgcactgcaaatctccagacgtccatactacgacggg G V Q D V V D C D C K S P D A P Y Y D G	1391
4921	gagaactgcgtggctcgaaccagtgctccgtcgcgtcagtccttcatgacatatcccgtg E N C V A R N Q C P C V E S F M T Y P V	1411
4981	ggatcaacggttccgagggaccaactgcgacgaatgtggttgcaagctcggcggagtgact G S T F R G T N C D E C V C K L G G V T	1431

5041	agctgcaagccagtc	caaggcgtg	cgagtg	tgacaat	gttaacct	ggtacca	aaagctatcg	
	S	C	K	P	V	K	A	C
	E	C	D	N	V	N	L	V
	P	K	L	S				1451
5101	cctaagtc	atgtgaat	gctcct	ggaac	ctgccc	gctgta	agatctgtccc	
	P	K	S	C	E	C	S	C
	E	P	C	P	P	G	T	K
	I	C	P	T				1471
5161	agcaaa	ctgtgc	cttcc	cttgaga	agtggt	gtgat	ggattgca	
	S	K	L	C	L	P	L	E
	K	W	C	D	G	L	Q	D
	C	P	D	D				1491
5221	gagcgag	attgcacc	accac	gatgg	tcacc	gaccca	agcacc	
	E	R	D	C	T	T	T	M
	V	T	V	T	E	A	P	V
	I	T	T	V				1511
5281	gcaccg	accgccc	gctacc	ccagc	cttctac	caccacc	acgattg	
	A	P	T	A	A	A	T	Q
	P	S	T	T	T	T	I	A
	P	S	T	T				1531
5341	accaa	acctga	agaat	gtccg	gaggt	gaaat	gcccgc	
	T	C	P	E	C	P	E	V
	K	C	P	P	G	Y	I	I
	S	Y	A					1551
5401	acgaag	tcaag	tacac	gcgata	cgcact	agtgc	acctg	
	T	K	S	S	Y	T	R	Y
	A	T	S	D	L	P	P	P
	R	P	R	V				1571
5461	tcctacc	agcgg	tattat	agggg	atacaa	aggag	gttat	
	S	Y	Q	R	Y	Y	R	G
	Y	K	G	G	Y	G	R	G
	G	Y	A	K				1591
5521	ggagg	atac	gctaa	aggag	gatatt	ctaa	aggag	
	G	G	Y	A	K	G	G	Y
	S	K	G	G	L	P	P	
								1611
5581	ccaccg	aagccg	aacca	agcatt	ctctc	gcaca	agcct	
	P	P	K	P	N	Q	A	F
	S	L	D	K	P	D	V	D
	N	S	H	L				1631
5641	gctgtg	aaga	aggaat	gcg	tcag	ttcag	atgtatt	
	A	V	K	K	E	C	V	Q
	F	R	C	I	P	K	L	P
	P	F	V	P				1651
5701	cccgg	cgcc	accg	ctccg	cccgc	gtctg	cacgg	
	P	G	A	T	A	P	P	V
	V	C	T	V	T	T	C	P
	P	G	Y	T				1671
5761	gtgaag	ttgga	acgc	agca	agtct	gcat	caa	
	V	K	L	E	R	S	K	S
	A	S	N	M	C	P	Q	Y
	E	C	V	P				1691
5821	ccgcc	agag	cgcc	agtg	ttctg	caac	atgacc	
	P	P	E	R	P	V	F	C
	N	M	T	G	R	T	F	N
	T	F	D	G				1711
5881	aacgag	taca	agtag	cagc	gtgct	ttcc	acatc	
	N	E	Y	K	Y	D	V	C
	F	H	I	L	A	R	D	N
	R	F	D	A				1731
5941	tggct	catcat	cctg	cgca	agaa	atgtg	tcca	
	W	L	I	I	L	R	K	K
	C	V	Q	D	G	C	Q	N
	E	L	I	V				1751
6001	atgca	agac	gacc	agct	gatc	ctgg	ttaag	
	M	Q	D	D	Q	L	I	L
	V	K	P	N	M	M	I	E
	Y	D	N	Y				1771
6061	gaata	tacc	atcg	agcag	agag	aatct	gcttcc	
	E	Y	T	I	E	Q	T	R
	K	I	C	F	Q	K	N	S
	F	D	V	D				1791
6121	cggtt	ggat	ggcgt	ctct	atca	agtc	ccagg	
	R	L	G	D	G	V	S	I
	K	S	R	K	Y	N	F	T
	V	L	F	T				1811
6181	aagaat	ggag	atg	ttaa	aatt	gggg	gtg	
	K	N	G	D	V	K	I	G
	V	L	K	K	L	Q	G	T
	V	D	G	M				1831
6241	tgcgg	tgcat	tcgac	ggca	accc	cgca	accg	
	C	G	A	F	D	G	N	P
	R	N	D	R	Q	L	P	D
	G	R	L	A				1851
6301	accac	catcg	acgag	ttcg	gcgc	ggct	gggg	
	T	T	I	D	E	F	G	R
	G	W	G	K	P	G	L	P
	A	D	A	C				1871
6361	gcac	cccg	gatc	acg	cccc	aa	caac	
	A	P	R	I	T	P	P	N
	Q	Q	E	V	W	D	L	C
	K	V	I					1891
6421	accg	agg	agc	ctct	gtccc	aatg	cgc	
	T	E	E	P	L	S	Q	C
	A	E	V	L	N	L	N	K
	W	R	H	I				1911
6481	tgtct	ggaga	atg	ttct	ggaat	gtccc	agctg	
	C	L	E	N	V	L	E	C
	S	Q	L	V	V	N	G	T
	K	R	S	H				1931
6541	gagg	agtg	tcg	ctg	cttcc	tgag	cagg	
	E	E	C	R	C	L	F	L
	E	Q	M	V	A	E	C	L
	A	A	A	K				1951
6601	gacct	ggat	gtgg	ctg	ctg	gaga	atcat	
	D	L	D	V	A	A	W	R
	I	M	M	D	C	P	A	E
	C	A	A	P				1971
6661	ctggt	gcact	acg	actg	ctacc	gcaag	cgc	
	L	V	H	Y	D	C	Y	R
	K	R	C	E	P	T	C	A
	G	W	G	P				1991
6721	gcg	cg	cg	cg	cg	cg	cg	
	A	R	A	A	C	P	A	E
	D	G	Q	C	F	P	G	C
	Y	C	P	D				2011

6781	ggcacgctcaggagggggcgaccagtgcgctcggtgcccgcgactgtctggactgtacgtgc G T L R R G D Q C V V P A D C L D C T C	2031
6841	acaggagtgggtacccccgggtaaatacgtgacgttcgaaggcgacgacctgccgttctg T G V G T P G K Y V T F E G D D L P F L	2051
6901	agcaactgcacctacctcgcgtcccaggacaggaacgagaccggacaacacaagtaccag S N C T Y L A S Q D R N E T G Q H K Y Q	2071
6961	gtgttcgcgacgaacggcccgtgtgaagacaacccccgcggtggtctgcaccaagagcgtg V F A T N G P C E D N P A V V C T K S V	2091
7021	cacctcgtctacgggaaggacgtcatccacatcaccaaggacgccagtaagaagctgcta H L V Y G K D V I H I T K D A S K K L L	2111
7081	acaatgatcggaaagtaagaccgtgtacaaataccccgtgaacaaggagtggggcaccatc T M I G S K T V Y K Y P V N K E W G T I	2131
7141	agcctggccaacggacaggacgtcacctgcagaatavacaagacatacacgtcgagctaag S L V N G Q D V T V R I Q D I H V E L T	2151
7201	gtgctggagtctaagatggagttcgcggtgcaagtgccgctcgttcctgtacgcccaaccag V L E S K M E F A V Q V P S F L Y A N Q	2171
7261	acggaggggctgtgcggtctgcccgggtaccaggaggagctcatcaccagcaacggc T E G L C G V C A G Y Q E E L I T S N G	2191
7321	accgccactaacgactttgaagagtacggcaagagttggcaagcaggtcccgcggccctg T A T N D F E E Y G K S W Q A S P A A L	2211
7381	gagcagctggacatccccccgcaggagcagtgacggaacccgaacctccaccggaatgc E Q L D I P P Q E Q C T E P E P P P E C	2231
7441	gtcacaccacctccggagaacaacccgtgcttcaacttgtaaatgctgatagattcggg V T P P P E N N P C F N L Y N A D R F G	2251
7501	ccgtgccacgcgctggtggacccggagccggttcggtgctgctgagggcggacctgtgc P C H A L V D P E P F V V S C E A D L C	2271
7561	gccaacgcgagcgcgctgcccgcgctcgggcgctacgccgccgctgcagcgcgcac A N A S D A C A A L G R Y A A A C S A H	2291
7621	gacgtctgtctgcccactggaggccctctgtccgtaccctgtgagggcgcacta D V C L P H W R R D L C C P Y P C E A P L	2311
7681	gtgtacagaacttgcgtggactgcgagaggacttgcgagacacgaggaactagaaaagag V Y R T C V D C E R T C E T R G T R K E	2331
7741	ccccgagaagtgcaccaacaacctgtggagggatgcttctgtcctgaggggaatggttcgt P G E V H Q Q P V E G C F C P E G M V R	2351
7801	ctaaacaacacgtgtatagagccaagcaagtgttcccgtgcgacgcgaagaaggaacac L N N T C I E P S K C F P C D A K K E H	2371
7861	tacgccggcgatgaatggaaggaggacgcggtgcacatcctgcacgtgcagtaagatcccg Y A G D E W K E D A C T S C T C S K I P	2391
7921	ggcgagaactctgcgacgtgtcgtgcacctcgcagggctgcgcgccgcccagcgtgctcg G E N S A H V S C T S Q G C A P P T C S	2411
7981	gacgcgcaggacctcgtgtcgcgcccgcgccccggacactgctgtccccgagtaccac D A Q D L V S P P P R P G H C C P E Y H	2431
8041	tgcgcaccaaaagaaacaagaaaactgtgaggaagccaagaagatagtgtgcggcttcggt C A P K K Q E N C E E A K K I V C G F G	2451
8101	caggtgctaaaacagaagacactgcctaattggatgcaagacgtacgcttgtgaatgcaaa Q V L K Q K T L P N G C K T Y A C E C K	2471
8161	ccagcaagcagtgcgagcagataccctcagagagcaggtggagatcatggagccgggc P A S E C E Q I P S E S E V E I M E P G	2491
8221	atggagcggctcatcgacaacagcggctgctgcccacgcggtggacttcatctgccgcgtg M E R L I D N S G C C P R V D F I C R V	2511
8281	gagacctgtcccaagacgcccacctgcccgaagtccataacctgaagatggctaattgtt E T C P K T P T C P K F H N L K M A N V	2531
8341	agtgggaagtgtgtccggagtactcttgtgaatgccccaaagacaaaatgcgtggttaacc S G K C C P E Y S C E C P K D K C V V T	2551
8401	ctagaaatggagtccgcttccaagggcggtgagaaagcaagaaagacgcctgaagtgtg L E M E S A S K G G E K A R K T P E V V	2571
8461	ttgaaagatacgaagggcgggtgtgggcccggacggctccgtgccgctcgtgccgggtgcgagacg L K D T K A V W A D G P C R S C R C E T	2591

10261 aagtcgCGctacactggaacgaagactccaaaagttccagcacacgatcgtgacgaagaa
K S R Y T G T K T P K V P A H D R D E E 3191

10321 gaagattacattccttccttcgcccgtaggtttggagaagtgtcgtcagagaagccaccg
E D Y I P S F A R R F G E V S S E K P P 3211

10381 cgtagataaaacttaatcaaacagtatgcttaatgtaagttttgtattaaccatttgaaa
R R - 3213

10441 tgtaggctctgtgtaaataaggaagcaataactctgaaaatttactgtacacataaattct

10501 tagaaataatttggcgaaatgatttgtcagattaaaatgattgcatttttcaaaagatta

10561 gaaatttaaaaactctgtgataattcattaatttataataaaaaattactaagttcttgt

10621 acttgcaaacaatttaagtttcatatattttattctcattatttatctgatttttgagat

10681 attttgtaaataagtgctgactccaaataattaattatttataaataatttgaattaat

10741 gtatttgtaaataagtgctgactccaaataattaattatttataaataatttgaattaaa

10801 tgtatttgtaaatagacaataataactcagatctcatttataatataattttgtaataaat

10861 cgtacagcaattataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

8.4. Vollständiges Alignment des Hemocytins von *M. sexta* mit homologen Proteinen aus *B. mori*, *D. melanogaster* und *H. sapiens*:

Konservierte Aminosäuren sind farblich markiert (100% = schwarz, 80% = grün und 60% violett). BmHC = Hemocytin von *B. mori*, DmHL = Hemolektin von *D. melanogaster* und HsvWF = von Willebrand Faktor von *H. sapiens*.

	* 20 * 40 * 60 * 80	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: MANKVIFVALWLLFISSVLTENGDI IITDDDDDEDINPLLQAAPEVVDKENERNERHISFNILKAPAVSARYTYGGSEGGRSFG	: 84
HsvWf	: -----	: -
	* 100 * 120 * 140 * 160	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: GGYGVGGGGGGYGGIKTSHAAGLLTKTLGFLGMGGQSQGNFYGGGGHFLAAF GKCSALQLPSNVQSECHNGRCKVFCPTGY	: 168
HsvWf	: -----	: -
	* 180 * 200 * 220 * 240 *	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: SFAQDVSVLEMFCSDNGWIIGNSVFAEVPPCQAQCTPPCQNNGICISAGVCQCPENYYGLPCQQKKSICASF PKAPKNSKVSCK	: 252
HsvWf	: -----	: -
	260 * 280 * 300 * 320 *	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: NNMCHAECMRGFQFPDGGGITNIECRNGQVHTKTGLSKTPDCAPTCAPACQNGGQCISFNVCQCSKMFRGDHCQYNIDRCNVT	: 336
HsvWf	: -----	: -
	340 * 360 * 380 * 400 * 420	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: NTNFNNGNYKCAEMDDARCTFSCPQVPLKIQGRIDIEYKCNLYLQGYLPAPLPKCIFFPPGYTVRSTSSMQGVTHQNGVYHRGM	: 420
HsvWf	: -----	: -
	* 440 * 460 * 480 * 500	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: SGEMAYELQTERQKLLALLAKYRDLERRSEWWSSEETVVTMSYSLSYQSNLDIVIDKTPRPALCTTWGGINMKTDFDGLVFKAP	: 504
HsvWf	: -----	: -
	* 520 * 540 * 560 * 580	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: LSCSHTLITDKVSGTFDIILKACPYGSGYCAHTLKIWLQSVLYTFENLNGTMQLTTPIKKLPMPVQVMGMKMPVAQHVQIDL	: 588
HsvWf	: -----	: -
	* 600 * 620 * 640 * 660 *	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: ESVGLKLDWDRHQYVSVQAGPQMVGKVGGLCGTL DGPNTDLTSRTGKKLATVKAFADAWRVEDRSELQVENS AEMEF GMDSC	: 672
HsvWf	: -----	: -
	680 * 700 * 720 * 740 *	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: EQSKLQKAVSVCERLLANEKLGDCIKPFNYDALIRTCMADYCNANREHPESCNCDAIAMLAK ECAF KGIKLEHGWRNLEICPI	: 756
HsvWf	: -----	: -
	760 * 780 * 800 * 820 * 840	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: SCGFGRVYQACGPNVEPTCDSLALPASKGACNEGCFCEPGETVQYKEACITRELCPCSLRGKEFKPESTVKKNCNTCTCKNGQW	: 840
HsvWf	: -----MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGRGRSS	: 31
	* 860 * 880 * 900 * 920	
MsHC	: -----	: -
BmHC	: -----	: -
DmHL	: RCTEDKCGARCGAVGDPHYQTFDGKRYDFMGKCSYHLKQTQNTSVEAENVACSGAVSESMNFAAPDDPSCTKAVTIRFILRDGT	: 924
HsvWf	: -----TARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAG-----	: 63

MsHC : KAPVEIPIITIPSSVSGSTPSTPGISSPPLIKTIVTPPFCADRYDIDLMG-DQPLPDSYSASSKASELFAHNAKLFSPRPND : 1066
 BmHC : TTTTSTSTTTTTPPETETTTETTVPLIKSVSPPECSADNYDIDVMG-DEPLPDTAFSSASSEFSEIFAHNARLNHRGPTN : 985
 DmHL : -----LTPVITLPLDCCSEFRLPKIENPAHSLPDSIFNASSQLAPEHGEKMARITK---E : 2113
 HsvWf : -----KPLDSSPATCHNNIMKQITVVDSSCRILTSDVFEQDCNKLVDPPEYLVVCIYDTCSC : 1091

MsHC : VSAGSWNPQLSDKNQYFQVELPTRPEPIYGVVMQGSPLFNQVVTSEYVLYGDDGHTFSTVDGPDGKSKVFRGPVDNNTPEKQMF : 1150
 BmHC : SGAGSWNPKVNNDKQYFQVELPRRPEPIYGVVLDGSPIDFQVVTSEYIMYGDDGHTFSTVDGPDGKPKIFRGPIDNTHPEVKMIS : 1069
 DmHL : QPRGWSSESLNDQMOYELNFAKPEEFYGVVMASSPEFDNYVTLKILHSHDGIAYHYVDETEKPKQMFNGLDRAPEVQTLFK : 2197
 HsvWf : ESIQCACAFCDTIAAFAHVCAQHGVVITWRTATLCPQSCERNLRNGYECWEYRNSCAPACQVTCQHPPELACPVQCVRGCHA : 1175

MsHC : PPIEAKVRIHPLTWHDDIAVRMELIGCGELTITITIRH-----TIVTTLEFMOCTEPLGLASNLPLRQIDVSSNSDAK-- : 1225
 BmHC : PPIEAKVRIHPLTWHDEISLRLEIGCAEPLTETSE-----PSPTSESLOCTEPLGLIGELPLLNQVSSNSSEK-- : 1142
 DmHL : IPIEASSLRIPYPLKWHGSIAMRVELIGDKEEPKVPVTVSITLPIITERPARLVDELECIDLMGVDEGKMYDQVQSSSLWQQPN : 2281
 HsvWf : HCPPGKILDELQCVPEDCPVCEWAGRRFAEGKKVIT-----LNPSDEHQCICHCDVVMITCACQEPGGVVPV-- : 1247

MsHC : -----RYFKIDCERGWKPLYSTFGEVWVDFTSRNLIGITIKGKPSGCVTVIQGPLHVRPDHLQPNHRRDGKEKVPANV : 1301
 BmHC : -----DYLSSNGNRGWKPLYNTH-GWVWDFITGPRNITGILTRKGNNDGWVTSYKVLVYTSDFETFPNVLTKDGKKEKIPANV : 1217
 DmHL : LGKKLQLELLKSLSTPLAWRPLANQNEFIEFDPLERNISGFVTKGPPDGWVYGYKVMFSSKPKPTWNTVLTSDGQARITFANH : 2365
 HsvWf : -----TDAVVSPTTLYVEDISEI---PLHDEYCSRLDLVFLLDGSS-----RLSEAEFEVLKAFVVDMMELRLRSQKWV : 1314

MsHC : UNDSAVTNEFRPETHAQLKLLPLKWKGGEMRVEPIGCFEPIAVTEVMPVIRETTTFSP-----ETCEVCPGVQDV : 1373
 BmHC : DGIYSVTRNEFHPHILRARFLKVLQKWNKNIELRIEPIGCFEPYPELRSVLFEEEGREEPQVVRKEYGMSQEREMPNCHTICPV : 1301
 DmHL : DAETERRHFKKILRQYIKLVPAVYKKNIRTEPELGCFLPYPELQRPVVEVNEKPKTCN-----ICDVFSTSS : 2435
 HsvWf : RVAVVEYHDGSHAYIGLKDRLRPELRLRIASQVYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDR-----P--EASR : 1379

MsHC : VDCDCKSPDAPYVDGENQVARNOCPCVESVMTVPVGSFRGTNCDQVCKLGGVTSCKFVFKACECDNVNVEFKLFPKSCFCS : 1457
 BmHC : EAKECTCSYEPFDGENCVPRALCPCVESVMTVPVGSFRGANCDQVCKLGGTECKFFRECCODESVEFKLSPTTCDCT : 1385
 DmHL : STTGCCQDQLFVDGNTQVQNLCPGIEVMTVPIGKFFENSAQEDCVVLEGGHKNCKPKKCPPCLGGKLRVLS-DFCFKE : 2518
 HsvWf : IALLLMASQEPQMRSNFVRYVGLKKKKVLIVTPVGLGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSVDELEQQRDEIVSYLCLDAP : 1463

MsHC : PCTPGTKIQPTKLCLELEKNCDELQDCPDDEEDCT--TMVTVTEAPVITVAPTAAATQPSTTTTAPSTTTKPEE : 1539
 BmHC : KPALNTKICKTKLCLALESCDQVDDCPDEEDCTSTARTTTTEPTVITVAPTQAATAPPTTTPKP----VVECFKVE : 1464
 DmHL : PCKXHQRLPSSGDCLPEILWCVGDDCADDASCA-----DFTVEPDVSREKNELEVIT--DFVPV : 2581
 HsvWf : APPTLPPHMAQVTVGGLGVSTLGPKRNSMVLDAVAVLE-G-----SDKLEADFNRSKFFMEEVIQRMVDVGQDSIHVTVL : 1540

MsHC : PPGYILSYITGSS--YTRYATSDLPVPRVSYORYVRYGKGGYGRGGYAKGGYAKGGYSKG--GLPppPKPNAFSLD : 1619
 BmHC : PPGYILSYITGSSSYSRAFSSDLPVPRVSYORYVRS-TGGYSYAKTGSKGGFSKGGYSKGGYPSIPRSNQAFTLD : 1547
 DmHL : PPKMIRITEKKS-----RKMSKMFTSKQVSVDDGTTITIKLISKEQILAMPNR----- : 2634
 HsvWf : QYSINVEYPPS-----EAQSKGDILOVREIRYQGGNRTNGLALRYLSDHSFLVS----- : 1594

MsHC : KPDVDNSHLAVKKECVDFRCLEKLPFFVPPGATAPPVCTVITPCPGYTKLERSKASANMCPQYECVPEPPEPFCNMTGRTH : 1703
 BmHC : KPALNTKICKTKLCLALESCDQVDDCPDEEDCTSTARTTTTEPTVITVAPTQAATAPPTTTPKP----VVECFKVE : 1630
 DmHL : -----ELDFQLELQDDEFTCVHIPSQVVDK--NETVITTEPKCEKVDVLELMSASKVGD LRVSVLVRNKKDDVCEISGKSE : 2710
 HsvWf : -----GDREQAPNLVYVMTGNASDEIKRLPGDIQVVPVIGLGNANVQELERIGWPNAPILIQDFETLREAPDVLQRCSSGE : 1673

MsHC : NTFDGNKYDYVCFHMLARDNRFDALILIRKKVQDQ---QNELVIMQDQ--LILWKNMNIIEVDNYEYTIETQTRKICFOK : 1782
 BmHC : NTFDGNKYDYVCFHMLARDNKFDALILIRKNGRLDG---QNELVIMQDQ--LILWKNMNIIEVDNYEYTIETQTRKICFOK : 1709
 DmHL : TTFDGTVEKYGPEHMLARDIHSSNSLSHQQSDSTRKVDHKKVITIQTEAGNELILLEHKLKFNQYEFYVQGLINSPICK : 2794
 HsvWf : GLQIPTLSPAPDQSQPDLVILLGLSSSPFASYFDEMKSS--PAKAFISKAIGPRITQVSVLQYGSITIDVPPNWNVPEKAHLL : 1755

MsHC : NSFVVDRLDQGVSIKSRKYNFTVLETKNDVVKIGVLKLLQGTVDGMCAGLADGNPRNDQLPDGRLATTIDIEFGRGWGKPGPLAD : 1866
 BmHC : NSFVVDRLDQGVSIKSRKYNFTVLETKNDVVKIGVLKLLHMGVVDGLCCA-DGSLANERRLPDGRVATSIDFGRSWAKPGVPAD : 1793
 DmHL : ASFVVSQPKTLAVSKYGFVWQLDDIILVKGIVSIFIRVVDGLCGYVNGNOKDDRSBDGQIIPNTEKFGDSWYDKRIEK : 2878
 HsvWf : SLVVMOREGEPQIGDALGAVRLTSEMHGARGPGASKAVVLLVTVDSVSVDAADAARSNVVTVFPPIGIDRYDAQAQLRIL : 1839

MsHC : ACAPRITPPNQOQEVWDLCKVITEEPLSQCAEVLNLNKWR-HICLENVLECSQLVNVGTRKRSHEE : 1949
 BmHC : ACAPRVASAHKRRAWDLNVIAEPPFSQCGKVLNLDKWR-HICLEKICCTDLVNVGTRKTEEQCRCLVLCQMAAECIADADAG : 1876
 DmHL : CCGDLKCPREMKALQQLNIHHPFARHKAIVYKQFLNNYCLEAACCMMANNNG--D--PAA : 2958
 HsvWf : AGPAGDSNVVKKQRIEELPTMVTILG-----NS---FLHKCSGFVRICTMDEEGN-----EK : 1887

MsHC : LDVAARWIMMDCPAEIAAPLVHYDCYRKRCEPFCAGWGPAAACPAEDGQCFPCYCPDGLTRRGDQCVLPADCLLCTC : 2033
 BmHC : VDLASWRLLMDCPADCPPLVHYDCYRKRCEETCAPYNAARA : 1960
 DmHL : VQLTTRWRAIAQCPIINCPSPLVHTDCYRKRCEPSCD--NVHGGDDCVFLPDACFP-CYCPDGLTRRGDQCVLPADCLLCTC : 3039
 HsvWf : RPDGVWITLPDQCHTVTCQEDGQTLKSHRWNCDRG-----LRPSCPNQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSS-- : 1954

MsHC : PGKVTIFEEDDLPLSLNCTYLASQDRNETGQHKNOVATNGPCEDN-----PAVVCTKSVLWYKDVILITKIP--ASKKLLT : 2109
 BmHC : PAKYTIIFEEDDLPLSLNCTYLASDRNETGQHKNOVATNGPCEDN-----ANIVCTKIVLWYKDVILITKIP--TRKRLRT : 2037
 DmHL : ASKVTITDRKSFSENGNCTYLASDRVLLPQVHTTQVVSMDCKKLGQPTPVEGGSCAKSLILNNGDHVITVQVPEKPLSLQV : 3123
 HsvWf : TRHIVTFDQNFKLTSCSYVLFQNEQD---LEVLHNGACSPG-----ARGCCKSIEVWKSALSVEHS--ME : 2021

8.5. Alignment der Hemocytin Domänen vom D-Typ

Konservierte Aminosäuren sind farblich markiert (100% = schwarz, 80% = grün und 60% violett). BmHC = Hemocytin von *B. mori*, DmHL = Hemolektin von *D. melanogaster* und HsvWF = von Willebrand Faktor von *H. sapiens*.

```

          *          20          *          40          *          60          *
D1MsHc : V[SAWG]-DSHVT[SF]DCTD[DF]EGV[CYL]AKG-VMDGNDG[ND]VEI[QNV]P[CGTTG]-----AT[Q]-SK[SVT]LKVGGGGN : 68
D1BmHc : V[GAWG]-DSHVNT[TF]DCTQ[DF]EGV[CYL]AKG-AMDGTG[GD]VEI[QNV]P[CGTTG]-----AT[Q]-SK[SVT]LKVGGAGN : 68
D1DmHL : T[SVWG]-DSH[TF]DCHD[DF]QGA[CYV]AKG-VFDNGD[GS]TI[QNV]L[CGTMG]-----VT[Q]-SK[SL]E[AL]TGHA[E] : 68
D2MsHc : F[ENMTG]-RT[NTF]D[CN]EYK[V]D-V[CFHM]LAD---NRFD[AW]---I[IL]RKK[CVQDG]-----Q[ONEL]I[V]M[QD]---DQ : 59
D2BmHc : F[ENMTG]-RT[NTF]D[CN]EYK[V]D-V[CFHM]LAD---NRFD[AW]---I[IL]RKK[CVQDG]-----Q[ONEL]I[V]M[QD]---DQ : 59
D2DmHL : V[EISG]-KS[FTF]D[CTV]K[V]G-P[SHI]LAD---IHSS[SW]-SISVH[QQ]CSDETR-----KV[Q]-H[VIT]LQDTEAGN : 64
D3MsHc : T[PGVT]TPGKYV[TF]E[DDLP]E[LSN]CYL[AS]ODRNET[Q]GHK[V]FAT[NGF]CEDN-----PAV[Q]-T[SVH]VY[Q]--- : 67
D3BmHc : T[PGVT]TPAK[V]TFE[DDLP]E[LSN]CYL[AS]DRNOT[GE]HK[V]YAT[NGF]CDDN-----ANIV[Q]-T[IVH]IYE--- : 67
D3DmHL : V[NSLG]-ASK[V]M[V]D[RRKS]F[SE]NGN[CYL]L[AS]D[VVLP]GVHT[QV]V[SMDD]CKKL[Q]P[TPVE]GGS-A[SLH]L[NG]--- : 72
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D''MsHc : ----- : -
D''BmHc : ----- : -
D''DmHL : ----- : -
DHsvWF : T[STIG]-MAH[V]L[DF]D[GLK]V[L]P[GE]Q[V]V[QD]YCGSNP[GT]R[L]V[GN]K[G]CSHPS-----VK[Q]-K[RVT]L[V]EG--- : 66

          80          *          100          *          120          *          140          *
D1MsHc : EE[IVSLTKN]-APIP[DISK]LKR[IK]-R-----IAEIV[FLD]V[PSL]GMSLQ-WDR[ELRVY]-VK[IDS]-MWQ : 126
D1BmHc : EE[IVSLTKN]-APIP[DISK]LKR[IK]-R-----KAG[VYFLD]V[PSL]GMSLQ-WDR[GLRVY]-VK[IDS]-MWQ : 126
D1DmHL : ES[LILSA]-SAYST[DPNK]TPIK[K]-RDSVNSK[GHNA]FHIY-KAG[VVVEV]IPL[KLQV]K-WDE[GRVY]-VK[IGN]-EWR : 140
D2MsHc : LI[LVKP]-NMV[TYN]-N-YEY--T[EQT]KKIC[QKNS]FD[V]DRL[GD]---GVS[IKSR]KYN-FTVL[FTKN]-GD[KIGV]LK : 125
D2BmHc : LI[LVKP]-NMV[TYN]-N-YEY--T[EQT]KKIC[QKNS]FD[V]DRL[GD]---GVS[IKSR]KYN-FTVL[FTKN]-GD[KIGV]LK : 125
D2DmHL : EL[LILLP]-H[LKLF]-NGYEF--T[VQ]LINS[PTC]KAS[V]V[SQ]P[K]---T[L]LAV[STKY]G-FWV[QLDDI]-GI[KVGI]SS : 130
D3MsHc : KD[VHITK]-ASKK-LLT[MIG]SKT[V]KYPVNK[EWG]TISL[VN]--QD[VTVR]IQD[IH]VELT[VLES]KMEFA-VQ[PSFL]YA : 140
D3BmHc : KN[VHISK]P[PTTK]-LRTV[IGK]TAV[FKY]PVKN[EWG]TISL[LLN]--QD[VSVT]LPD[IH]VELT[VSQL]NLEFA-VR[PTFL]YG : 141
D3DmHL : DH[VHVQRV]PQKPKS[LQV]LVDGFE[V]KKIPYKDSWISL[RQV]V--KEL[VLSL]PESH[VELT]ASFED[LIFS]-LG[PSIK]YG : 147
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D''MsHc : ----- : -
D''BmHc : ----- : -
D''DmHL : ----- : -
DHsvWF : GEI[E]F--G[EV]-NV---KRP--M[KDETH]FEV[VES]-----R[RYT]I[L]L[LGK]ALS[V]-V[DRH]L[SISV]L[KQT]-YQ : 124

          160          *          180          *          200          *          220          *
D1MsHc : NR---VK[GLCG]NY[GDMR]DFQ[TPS]GGGMAESSALI[ADSW]-K-LK[F]-T[CPK]QPAIDH-----C[KQRP]ERRE- : 188
D1BmHc : GR---VK[GLCG]NY[GDMR]DFQ[TPS]GGGMS[ESSALI]ADSW-K-LK[F]-T[CPK]QPV[IDH]-----C[KQRP]ERKE- : 188
D1DmHL : QK---V[SGLCG]NY[GNSL]DMQ[TPSM]G--L[ETSP]ML[GHAW]-K-LQ[F]-H[CSAPV]APIDA-----C[KKH]PERET- : 200
D2MsHc : KLQGT[VDCM]CA[AF]C[NPRN]DRQLP--DGR[LATT]IDE[GRG]G-KPGL[ADAC]APRIT[PPN]Q[QEV]WDLCKVIT[E]EP-- : 198
D2BmHc : KHMGG[VDCG]AY[GLSLA]NERRLP--DGR[VAT]SIDE[GRG]W-AKPGV[ADAC]APR[VASAHK]ORRAWDL[CNVIA]E[EP]- : 198
D2DmHL : KFIRT[VDCG]L[CGYV]G[NQK]D[KRSP]-DGQ[I]P[NT]EK[GD]S[WYD]KRI--K[DQ]G[DLK]CPREM[QAKAL]Q[CN]I[H]HPT-- : 203
D3MsHc : NQT---E[GLCCV]CAG-YQEELIT-S-NGTAT[ND]FEE[VGK]WQAS---A[ALE]QLDI--P[PE]EQ-----C[TE]-P[PP]PE : 201
D3BmHc : NRT---E[GLCCV]CAG-YQDFLVT-S-NGT[VTD]DFDL[VGK]WQAS---E[KLTE]LEV--P[PS]EQ-----C[DA]-P[PP]PAP : 202
D3DmHL : SKM---E[GLCGD]C[NAGN]DLQ-P--NPAK[KKAGV]DVI[Q]WQAD--E[PKL]G--LVE-----E-----C[LS]EDVPKEH : 204
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D''MsHc : ----- : -
D''BmHc : ----- : -
D''DmHL : ----- : -
DHsvWF : EK---V[CG]L[CGN]F[EG]-I[Q]N[NDL]T[SS]-N[LQV]EED[PVD]E[GN]W--K[VSS]---Q[CA]D[TRK]V[PLD]SSPAT--C[HNN]I[M]K[QTM] : 190

```

```

240          *          260          *          280          *          300          *
D1MsHc : -----WAQETCGALKRYPLSL---CHAEVPGAFVQRCERDAVCDA---GGDCACACAAAYAHACS : 246
D1BmHc : -----WAQSVCGALKRYPFSL---GAGEVAGAYVARCERDA---GADCECACAAAYAHACA : 244
D1DmHL : -----WAQLKCGALKKSDLFKE---CHAEVPLERFWKRCIFDTACDQ---GGDECLCTAYAYADACA : 258
D2MsHc : -LSQCAEVLNLDKWRHI---C---LENVLE---ESQLVNGTKRSHE---CRCLFLEQMVAECL---AAAKDLDVAA : 260
D2BmHc : -FSQCGKVLNLDKWRHI---C---LEKI---EECTDLVNGTKRTEQ---CRCLVLQQMAAEC---ADAAGVDLAS : 260
D2DmHL : -FARCHKAVNYKQLNNYC---LEAA---ENCMANNGDPA---CKCNILESFVKKCLSVNPLQLTT--- : 262
D3MsHc : ---CVTPPPE---NNTCFN---YNADRFPGHALDPEPFVVSCEADLCANASDA---C---ALGRYAAACS : 260
D3BmHc : ---CTPPPPD---NNTCYHL---YNADRFGAHALDPEPQYVESCEADEC---GGHGP---ALQRYAAACA : 260
D3DmHL : ---CIPLPPEKDP---C---LQFYNAELFGKPLAVDPIAYVSAQQDI---KPGNTQQGV---AV---ALAAAYAKECN : 266
D'MsHc : ----- : -
D'BmHc : ----- : -
D'DmHL : ----- : -
D''MsHc : ----- : -
D''BmHc : ----- : -
D''DmHL : ----- : -
D'''MsHc : ----- : -
D'''BmHc : ----- : -
D'''DmHL : ----- : -
DHsvWF : VDSSCRILTS-DVF-QD-CNKLVDPPEYLDV-CI--YDTC---CS---IGDCACFCDTLAAVAHVCA : 247

```

```

320          *          340          *          360          *          380          *
D1MsHc : LRGLDLR-WRTPQL-CPMOCDEECSN---YDP---CVSA-CPVETC-DNTLYYTEMKTN-----EQD : 299
D1BmHc : HRGVTFN-WRTNDL-CPMOCDEVCSN---YDS---CVSA-CPVETC-DNILYYAETAR-----EQD : 297
D1DmHL : QKGINIR-WRSQHF-CPMOCDPHCSN---YKA---CTPA-CAVETC-DNFLDQGIARMA-----ENRE : 311
D2MsHc : -----WRIMMD-CPAECAPPLVH---YD---CYRRCCE-PTCAGWGPARAA-----CPAE : 302
D2BmHc : -----WRIMMD-CPADCPPLVH---YD---CYRRCCE-ETCAPPYNAARA-----CPAQ : 302
D2DmHL : -----WRVAQA-CEINCPPLVH---TD---CYRRCCE-PSD-DNVHGD---CPVL : 302
D3MsHc : AHDVCLPHWRRLI-CPYCEAPLV---IRT---VVD---CE-RT---ETRGTRKE-----PGEV : 306
D3BmHc : ELGLCLPDWRREL-CPYCEEPFV---IRA---CVD---CE-RTC---DNYEQLQTSPEK-----TNK : 310
D3DmHL : QHGICTN-WRRPQL-CPYCEPSDMV---YEP---CG---CA-KNC---DTIKALSEFDAVSLKNEAVVHTVKTDEM---LNS : 331
D'MsHc : -----ERYNVKCELSCT-GGQE---YTV---CADS-C-LRRCSDTALAASGT-----CKPS : 43
D'BmHc : -----WRYNVKECELSCT-GGQQ---YTV---CADS-C-LRRCSDTALAASGQ-----CKPV : 43
D'DmHL : -----WRMSVKECAVKCP-LGQV---YDE---GDG-CAL-SDD---LPSKGS-----KRE : 41
D''MsHc : -----SASNME---FTT---CEIAE-PL-TCKNMHLPPSSTTAE-----CRP : 35
D''BmHc : -----TAQNME---FTT---ETSE-PL-TCKNMHLPPSTQTAE-----CRP : 34
D''DmHL : -----CAKQ--P---YA---EFTK---APKEPKTCKNMMDKYVADSSD-----CLP : 35
D'''MsHc : -----TISPETEVE---CPGQDVVDCD-----CKSP : 24
D'''BmHc : --GMSQ--ERBMPN-CHI-CPGV-----EAKE----- : 21
D'''DmHL : --NKPTK-----CNI-CDGVSTSSSTG-----CQ---QDQLFDWGNT----- : 33
DHsvWF : QHGKVVV-WRATATL-CPQSCERNLRENGE---EWRYN---SAPACQVTCQHPPELA-----PVQ : 303

```

```

400          *          420          *          440          *          460          *
D1MsHc : T--CVBCKPKKKSPEGTVYKNSSLTDVPRACKKPVCMTELEDRE-EILEGEV--IEEDA--CHTRCCKSKHRV--CT : 368
D1BmHc : T--CVBCKPKKKSPEGSVYKNDSTTEVPRACKKPVCMTELEDRE-EILEGEV--IEEDA--CHTRCCKSKHKV--CT : 366
D1DmHL : N--CLBCHKIKP-EDGFYLNLDYRDVCPKACKKPVCMVR-DK-TFYEGDITF-TDS---CATCRCKSRKEI--CS : 378
D2MsHc : DGQCFFPCY---PDGTLRRGDQ---CVVPADCLD-C-TCT-V-GTPGKYVTF-EGDDLPLFLSN-----CT : 358
D2BmHc : EGQCSPECY---PDGKLRKGDQ---CVLPADCLD-C-TCT-V-GTPAKYVTF-EGDDLPLFLGN-----CT : 358
D2DmHL : PDACFPCY---PEGTVRKGN---CVPISEKD-CVC-NSL-GASKYM-TYDRKSPFNGN-----CT : 357
D3MsHc : HQQPVECF---PEGMVRLNNT---CEPSKCF---DAKK---EHYAGDE-WKEDA--CTSCTCS----- : 359
D3BmHc : PVE---CF---PEGKVRVNT---CEPGRCF---C---VVDGHYAGDE-WQEDASTLCA-----CA : 359
D3DmHL : ERFE---CF---PPGKVMDDGGQ---CVPEIATK---CD---D---LHLP-DEKWKKDK-----CT : 376
D'MsHc : ---CVBQSA---PTGQLSDDSG---VCPVGLD-P-OYHK---LQFNAG---YKEVVRAG-----KREREL-CT : 95
D'BmHc : ---CVBQSA---SPSOLLDDNG---VCPVPAK-P-CIHK---LQFNAG---YKEIRPG-----RREREL-CT : 95
D'DmHL : ---CVBQCR---PHGEYVNEDEG---ECPKMKCH---CNF---DMSFRPG---YKEVVRPG-----EKFLDL-CT : 93
D''MsHc : GRQCKKGYVLETVS---KK---CVLATC-P-CHHG---RSYPDGHVM---QEE---CNKCEC-KNGNWT-CT : 90
D''BmHc : ---CQ---KKGVLDTASKR---CVPATC-P-CHHA---RSYPDGHLM---QEE---CNKCEC-KNGNWS-CT : 89
D''DmHL : ---GV---MEGYVYDTSRLA---CVLPANC-S-CHHA---KSYDDEKIL---KED---CNLCEC-RAGNWK-CS : 90
D'''MsHc : DAPYDGEN-----CVARNCP-P-VESFSM---TYPVG--STRGTN-----CDEVCV-KLGGVTS- : 73
D'''BmHc : ---TISYPEYFDG-----ENCVPRAP-P-VESFSM---TYPVGSTFRGAN---CDEVCV-KLGGTTE- : 74
D'''DmHL : ---CVQHNL---P---CLENVYSYI---SKFNSA---EDVCV-VLGGHKNC- : 73
DHsvWF : ---CVBCHAH---PPGKILDELLQ-TVDPEDC-PVGEVA---RRFASGKKVTLNPSDPEHCQIHC---DVVNLT- : 369

```

9. Veröffentlichungen

9.1. Originalarbeiten

Müller-Wieprecht V., C. Riebeling, C. Alexander, F. R. Scholz, A. Höer, T. Wieder, C. E. Orfanos, C. C. Geilen (1998)

“Expression and regulation of phospholipase D in the human keratinocyte cell line HaCaT.”
FEBS letters, 425: 199-203.

Scholz, F. R., S. Beetz, C. Lesch, T. Holthusen und T. Trenczek (1999)

“Wie wehren sich Insekten gegen Krankheitserreger. Immunreaktionen bei Insekten.” Spiegel der Forschung, 16 (1): 46-54.

9.2. Kurzveröffentlichungen

Scholz F. R., T. Wieder, C. C. Geilen und C. E. Orfanos (1995)

“Charakterisierung der Phospholipase D in humanen Keratinozyten.” Fachbereich Humanmedizin der FU Berlin, Jahrbuch 1995, S. 370-371.

Wieder T., F. R. Scholz, C. C. Geilen, C. E. Orfanos (1996)

“Regulation of phospholipase D activity in human keratinocytes.” XXIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Münster

Scholz F. R., T. Wieder, C. C. Geilen, C. E. Orfanos (1996)

“Influence of synthetic ceramides on phospholipase D activity in human keratinocytes.” 17. Symposium Phospholipid Signaling, Rauschholzhausen.

Scholz F. R., T. Trenczek (1997)

“Activation of insect hemocytes after bacterial infections.” Verh. Dtsch. Zool. Ges., 90.1:385.

Scholz F. R., M. R. Kanost, T. Trenczek (1999)

“Expression and tissue distribution of hemocyte aggregation inhibitory protein (HAIP) from *Manduca sexta*.” Jahrestagung des Arbeitskreises Vergleichende Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Jena

Magill, T. M., F. R. Scholz, T. Trenczek (1999)

“Characterization of insect hemolymph factors showing binding affinity to bacterial components.” Jahrestagung des Arbeitskreises Vergleichende Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Jena

Trenczek, T., F. R. Scholz, R. Poppe, S. Franke, E. Gateff (1999)

“Characterization of a hemocyte component typical of granular cells of *Hyalophora cecropia* pupae and crystal cells of *Drosophila melanogaster* but also present in the garland cells of late *Drosophila* embryos.” Jahrestagung des Arbeitskreises Vergleichende Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Jena

Scholz F. R., X.-Q. Yu, M. R. Kanost, T. Trenczek (2000)

“HAIP – A chitinase family protein from *Manduca sexta*.” Jahrestagung des Arbeitskreises Vergleichende Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Rauschholzhausen

Scholz F. R., X.-Q. Yu, M. R. Kanost, T. Trenczek (2000)

“Identification of a lectin in the hemolymph of *Manduca sexta* similar to insect LPS-binding proteins.” Jahrestagung des Arbeitskreises Vergleichende Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Rauschholzhausen

Scholz F. R., M. R. Kanost, T. Trenczek (2000)

“Cloning of a protein from *Manduca sexta* showing sequence similarity to the von Willebrand Factor of vertebrates and hemocytin from *Bombyx mori*.” Jahrestagung des Arbeitskreises Vergleichende Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Rauschholzhausen

Scholz F. R., M. R. Kanost, T. Trenczek (2001)

“Cloning and characterization of fatbody proteinase 1 (FP-1) from *Manduca sexta*.” *Zoology*, 104 (S IV): 64

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 16. November 1962 in Hellersen (Kreis Lüdenscheid)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

5/1983 Abitur am Gymnasium Lüchow

Studium

10/83 – 4/86 Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin

4/86 – 12/95 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin

Vordiplom im Oktober 1994

Diplom im Dezember 1995

6/96 – 11/00 Arbeiten an der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Trenczek, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie der JLU Giessen.

8/97 – 5/98 Stipendiat des Austauschprogramms zwischen der JLU Giessen und der Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. R. Kanost

8/99 – 11/99 Stipendiat der Deutschen Gesellschaft für Immunologie. Aufenthalt an der Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. R. Kanost

Seit 12/00 wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe Dr. I. Tamm, Charite, Campus Virchow Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. B. Dörken).

Lehre

1997 Betreuung des Praktikums “Insektenimmunologie” und “Entomologische Übungen” für Studenten der Biologie.

1998 Betreuung des Praktikums “Insektenimmunologie” für Studenten der Biologie.

DANKSAGUNG:

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Tina Trenczek für die Bereitstellung des Themas und die Freiräume, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit gewährt wurden, bedanken. Ihre Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit zügig fertiggestellt werden konnte.

Herrn Prof. Dr. Mike Kanost danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die ungeheure Unterstützung, die mir in jeder Hinsicht gewährt wurde. Das überaus freundschaftliche Klima in seiner Arbeitsgruppe war der geeignete Grund für fruchtbares Arbeiten.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Haobo Jiang und seiner Frau Yang Wang aussprechen. Ihr umfassendes Wissen war mir eine stete Quelle bei der Planung und der Durchführung meiner Experimente. Daneben gehört ihnen mein Dank aber auch für banale Dinge des Lebens: Die Heimfahrten vom Labor bei Frostgraden begleitet von Diskussionen über **Gott** und die Welt, die wöchentlichen Einkaufstrips und das beste Fischgericht meines Lebens.

Ein Dank auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schipp, denen es nicht nur gelang ein sehr freundschaftliches Klima zu schaffen. Besonders Dr. Henrike Schmidtberg und Dr. Peter Ruth waren mir durch fachkundige Verbesserungsvorschläge, heldenhafte Standfestigkeit aber auch sachbezogene Karikaturen eine große Hilfe. In diesem Zusammenhang sollen auch die Sitzungen in jener legendären Gaststätte und alle Beteiligten nicht unerwähnt bleiben....

Wichtig für den Erfolg dieser Arbeit waren die umfassenden Diskussionen mit Dr. Aram Prokop und PD Dr. Thomas Wieder. Ihre Fachkunde hat mich vor manchem Mißerfolg bewahrt.

Besonders erwähnt werden sollen auch Terry Johnson und David Levin. Sie waren mir eine stete Quelle der Heiterkeit, erwarben sich aber auch Ruhm für die Unterstützung bei der PCR in Zeiten der Fehlschläge, das keimarme Klima in der Zellkultur, 'shooting pool' und als kompetente Diskussionspartner zur Analyse der Football-Ereignisse der Wochenenden.

Für ein entspanntes Klima sorgten auch die 'late night calls to play a game', ein Ereignis für dessen Organisation ich Maria, Sabine, Alex und Scott danke.

Dr. med. Ingo Tamm gehört mein Dank für die Freiräume, die er mir besonders in der letzten Phase der Anfertigung dieser Arbeit eingeräumt hat.

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich nicht nur dadurch unterstützt haben, dass sie während meiner Aufenthalte in den USA zu 'Adoptiv-Eltern' wurden....

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und sämtliche Textpassagen, die der Literatur dem Wort oder Sinn nach entnommen sind, eindeutig als solche gekennzeichnet habe.

Berlin, im Dezember 2001

Frank Rüdiger Scholz