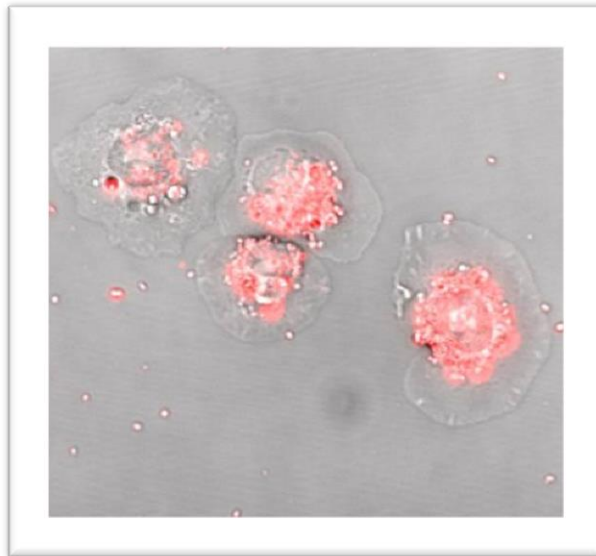


**Untersuchungen zur Modulation der zellulären
Immunantwort durch biogene Amine in der Taufliege
*Drosophila melanogaster***



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Stephanie Papenmeier

Borstel, Dezember 2016

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Roeder
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Holger Heine
Tag der mündlichen Prüfung:	20.02.2017
Zum Druck genehmigt:	20.02.2017

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	iii

Abkürzungsverzeichnis	iv
------------------------------------	-----------

1 Einleitung.....	6
1.1 Stress - und der innere Säbelzahniger	6
1.1.1 Ist Stress Freund oder Feind?	7
1.1.2 Einfluss von Stress auf das angeborene Immunsystem in Vertebraten	9
1.1.3 Einfluss von Stress auf das angeborene Immunsystem in Invertebraten.....	11
1.1.4 Signalvermittlung durch BAs in Invertebraten.....	16
1.2 Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.2.1 Balancer	19
1.2.2 Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem	19
1.2.3 Das RNAi-Expressionssystem.....	20
1.3 Das Immunsystem von <i>Drosophila melanogaster</i>	21
1.3.1 Die systemische Immunantwort	22
1.3.2 Die zelluläre Immunantwort	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit	29
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Materialien.....	31
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	31
2.1.2 Kits und Zubehör	32
2.1.3 Antikörper und Farbstoffe	32
2.1.4 Besondere Materialien	33
2.1.5 Geräte.....	33
2.1.6 Programme.....	33
2.2 Puffer und Lösungen	34
2.3 Medien.....	34
2.3.1 Fliegenstandardmedium.....	34
2.3.2 Grapefrucht-Agar Platten.....	34
2.3.3 Zellkultur-Medien.....	35
2.3.4 Induktionsmedium (IM).....	35
2.3.5 LB-Medium	35
2.4 <i>Drosophila</i>	35

2.4.1	Haltung	35
2.4.2	Stämme	36
2.4.3	Kreuzungen.....	36
2.5	Zelllinien.....	37
2.5.1	Schneider S2-Zellen.....	37
2.5.2	Dipt-Zellen.....	37
2.6	Bakterien.....	38
2.7	Primer	39
2.8	Isolierung totaler RNA	40
2.8.1	RNA aus Fliegenköpfen	40
2.8.2	RNA aus Hämocyten und Fettkörper	41
2.9	RNA-Analyse	43
2.9.1	Konzentrationsbestimmung am Nanophotometer	43
2.9.2	Konzentrationsbestimmung am Qubit [®] 2.0	44
2.9.3	RNA-Integritätsbestimmung am Bioanalyser.....	44
2.10	cDNA-Synthese	45
2.11	Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR).....	46
2.12	Gelelektrophorese.....	47
2.13	Transkriptomanalyse von PHs mittels <i>next-generation-sequencing</i> (NGS)	47
2.14	Luciferase Reporter Assay	48
2.14.1	Bright-Glo [®] Luciferase Assay System	48
2.14.2	CellTiter-Glo [®] (Lumineszenter Zellviabilitäts Assay)	49
2.14.3	Bestimmung der optimalen PGN-Konzentration.....	50
2.15	Phagozytose-Assay.....	50
2.15.1	Durchführung.....	51
2.15.2	Auswertung.....	53
2.16	cAMP-Glo [®] Assay.....	54
2.16.1	Primärhämocyten	54
2.16.2	S2-Zellen.....	55
2.17	Zelladhäsionsbestimmung	55
2.18	Überlebensversuche.....	56
2.18.1	Ansetzen zeitlich synchronisierter Fliegen	56
2.18.2	Bakterienkultur	57
2.18.3	Infektion der Fliegen.....	57
2.18.4	Experimentverlauf	58
2.18.5	Auswertung.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Biogene Amin-Rezeptorgene werden in PHs von <i>Drosophila</i> Larven exprimiert.....	59
3.2	Einfluss biogener Amine auf die AMP-Produktion einer Hämocytenzell-linie.....	62

3.2.1	BA-Rezeptorgene werden in Dipt-Zellen exprimiert	62
3.2.2	Luciferase Reporter Assay dient zur Quantifizierung der Aktivierung des Imd-Signalweges in stabil transfizierten Dipt-Zellen.....	64
3.2.3	Biogene Amine haben kaum Einfluss auf die <i>diptericin</i> -Expression in Dipt-Zellen.....	65
3.3	Einfluss biogener Amine auf Phagozytose und Ausbreitung von PHs	67
3.3.1	15-minütige Inkubation mit pHrodo [®] <i>S. aureus</i> ist ideal zur Detektion eines stimulierenden bzw. inhibierenden Effekts eines Stimulus auf die Phagozytoseaktivität von PHs	67
3.3.2	Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zu einer verminderten Phagozytoseaktivität von bPac-exprimierenden PHs	68
3.3.3	Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zu einer stärkeren Zellausbreitung in bPac ⁺ -PHs.....	69
3.3.4	Stimulation von S2-Zellen mit BAs hat kaum nachweisbaren Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration.....	71
3.3.5	Phagozytoseaktivität in S2-Zellen wird durch Zugabe verschiedener BA-Konzentrationen nicht beeinflusst	72
3.4	Einfluss biogener Amin-Rezeptoren auf den Immunstatus infizierter adulter Fliegen	74
3.4.1	Dosisfindung für die Infektion adulter Fliegen mit <i>Ecc15</i>	75
3.4.2	Infektion mit <i>Ecc15</i> kann von Octopamin-Rezeptor-KOs schlechter abgewehrt werden.....	76
3.4.3	Tyramin-Rezeptoren haben teilweise einen Einfluss auf die Überlebensrate von <i>Drosophila</i> nach <i>Ecc15</i> -Infektion.....	78
3.4.4	Dop1R1 und Dop1R2 haben keinen unmittelbaren Einfluss auf das Überleben von mit <i>Ecc15</i> infizierten Fliegen.....	80
3.4.5	Eine verminderte Expression von Octβ1R bzw. Octβ2R in immunkompetenten Geweben verändert den Immunstatus adulter Fliegen.....	81
3.4.6	Eine verminderte Expression von Octβ1R bzw. Octβ2R in Hämocyten von adulten Fliegen hat keinen Einfluss auf den Immunstatus der Fliege	83
4	Diskussion	86
4.1	Expression biogener Amin-Rezeptoren in immunkompetenten Geweben	86
4.1.1	Octopamin- und Tyramin Rezeptoren	86
4.1.2	Dopamin-Rezeptoren	88
4.1.3	Serotonin-Rezeptoren	89
4.2	Bedeutung der intrazellulären cAMP-Konzentration für Immunfunktionen von Hämocyten.....	90
4.3	Einfluss biogener Amine auf Immunfunktionen von Hämocyten.....	91
4.3.1	Aktivierung G _s -Protein-gekoppelter BA-Rezeptoren	92
4.3.2	Modulation der Phagozytose durch BAs	93
4.3.3	Modulation der <i>diptericin</i> -Expression durch BAs.....	95

4.4	Einfluss der biogenen Amine Octopamin, Tyramin und Dopamin auf den Immunstatus infizierter Fliegen	96
5	Zusammenfassung	100
6	Summary.....	102
7	Referenzen	104
8	Anhang.....	115
9	Erklärung	119
10	Danksagung	120
11	Curriculum vitae.....	121

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Biosynthesewege von Octopamin in Insekten [43].	13
Abb. 2: G-Protein vermittelte Signalwege über GPCRs (nach [82]).	16
Abb. 3: Das GAL4/UAS-Expressionssystem nach Brand und Perrimon (nach [92]).	20
Abb. 4: NF- κ B-Signalwege in der humoralen Immunantwort von <i>Drosophila</i> .	24
Abb. 5: Hämozytenzelltypen in <i>D. melanogaster</i> .	26
Abb. 6: Phagozytose eines Partikels von der Zelloberfläche in ein intrazelluläres Phagosom.	28
Abb. 7: Plasmid pJM647, hergestellt von Jean-Marc Reichhart auf Basis eines pGL3-Basis Vektors (Promega).	38
Abb. 8: Elektropherogramm für RNA-Proben	44
Abb. 9: Darstellung des CP-Wertes [166].	46
Abb. 10: Luciferase-Reaktion aus [167].	49
Abb. 11: Übersicht zur Durchführung des Luciferase-Assays.	50
Abb. 12: Gating-Strategie zur Auswertung der Phagozytoseaktivität von PHs nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit pHrodo [®] <i>S. aureus</i> Biopartikeln.	53
Abb. 13: Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in bPac ⁺ -PHs nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer.	55
Abb. 14: A: Intrathorakale Injektion einer Fliege mit einer Glaskapillare [170]. B: Röhrchen für Überlebensversuche.	57
Abb. 15: PHs aus L3-Larven mit dem Genotyp hml-GAL4, UAS-GFP (A), w ¹¹¹⁸ (B) und hml,GFP > w ¹¹¹⁸ (C).	59
Abb. 16: Expression biogener Amin-Rezeptoren in PHs und Fettkörper.	61
Abb. 17: Expression biogener Amin-Rezeptoren in Dipt-Zellen mit und ohne 20E-Stimulation.	63
Abb. 18: PGN aus <i>E. coli</i> stimuliert den Imd-Signalweg um ein Vielfaches stärker als PGN aus <i>B. subtilis</i> .	64
Abb. 19: Aktivierung des Imd-Signalweges in Dipt-Zellen nach unterschiedlicher PGN-Stimulationsdauer.	65
Abb. 20: <i>dipterizin</i> -Expression in Dipt-Zellen nach Stimulation mit Octopamin (Oct, links) bzw. Tyramin (Tyr, rechts).	66
Abb. 21: <i>dipterizin</i> -Expression in Dipt-Zellen nach Stimulation mit Dopamin (Dop, links) bzw. Serotonin (5-HT, rechts).	66
Abb. 22: Phagozytoseaktivität von PHs nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit pHrodo [®] <i>S. aureus</i> Biopartikeln.	68
Abb. 23: Phagozytoseaktivität von bPac ⁺ -PHs (B) ist bei erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration (A) reduziert. A:	69
Abb. 24: Ausbreitung von bPac ⁺ -Hämozyten nach Bestrahlung mit Blaulicht für 15 min (B) nimmt gegenüber nicht bestrahlten Hämozyten (A) zu.	70
Abb. 25: Gesamtfläche (A) und Ausbreitungsfläche (B) von bPac ⁺ -Hämozyten nehmen nach Bestrahlung mit Blaulicht signifikant zu.	70
Abb. 26: Bestimmung der Konzentrationsänderung intrazellulären cAMPs in S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Octopamin (Oct, links) oder Tyramin (Tyr, rechts).	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 27: Bestimmung der Konzentrationsänderung intrazellulären cAMPs in S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Dopamin (Dop, links) oder Serotonin (5-HT, rechts).....	72
Abb. 28: Phagozytoseaktivität von S2-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit pHrodo [®] <i>S. aureus</i> bzw. <i>E. coli</i> Biopartikeln.	73
Abb. 29: Relative Phagozytoseaktivität von S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Octopamin (Oct, oben) oder Tyramin (Tyr, unten).	73
Abb. 30: Relative Phagozytoseaktivität von S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Dopamin (Dop, oben) oder Serotonin (5-HT, unten).....	74
Abb. 31: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit verschiedenen Konzentrationen <i>Ecc15</i> infizierter w ¹¹¹⁸ -Fliegen.	75
Abb. 32: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Octβ1R-KO bzw. w ¹¹¹⁸	76
Abb. 33: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Octβ2R-KO bzw. w ¹¹¹⁸	77
Abb. 34: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Octβ3R -KO bzw. w ¹¹¹⁸	78
Abb. 35: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Oct-TyrR-KO bzw. w ¹¹¹⁸	78
Abb. 36: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes TyrR-KO bzw. w ¹¹¹⁸	79
Abb. 37: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes TyrRII-KO bzw. w ¹¹¹⁸	80
Abb. 38: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Dop1R1-KO bzw. w ¹¹¹⁸	80
Abb. 39: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Dop1R2-KO bzw. w ¹¹¹⁸	81
Abb. 40: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> (OD ₆₀₀ = 10) infizierter Octβ1R-KD-Fliegen bzw. VALIUM10 exprimierender Fliegen.	82
Abb. 41: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> (OD ₆₀₀ = 10) infizierter Octβ2R-KD-Fliegen bzw. VALIUM10 exprimierender Fliegen.	83
Abb. 42: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> (OD ₆₀₀ = 10) infizierter Octβ1R-KD-Fliegen bzw. VALIUM10 exprimierender Fliegen.	84
Abb. 43: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit <i>Ecc15</i> (OD ₆₀₀ = 10) infizierter Octβ2R-KD-Fliegen bzw. VALIUM10 exprimierender Fliegen.	85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wirkung von Octopamin auf die angeborene Immunantwort in Insekten (erweitert nach [24]).	13
Tab. 2: Wirkung von 5-Hydroxytryptamin auf die angeborene Immunantwort in Insekten ...	14
Tab. 3: Wirkung von 20-Hydroxyecdysol auf die angeborene Immunantwort in Insekten ...	15
Tab. 4: Wirkung von Juvenilhormon auf die angeborene Immunantwort in Insekten	16
Tab. 5: Übersicht über die in <i>Drosophila</i> exprimierten BA-Rezeptoren und die an sie bindenden G-Proteine.	17
Tab. 6: Kulturmedium für S2-Zellen und Dipt-Zellen	35
Tab. 7: Liste aller verwendeten <i>Drosophila</i> -Stämme	36
Tab. 8: Liste der verwendeten Kreuzungen und deren Bezeichnungen	37
Tab. 9: Bakterienstamm für Infektionsexperimente	39
Tab. 10: Liste aller verwendeten Primer mit CG-Nummern der entsprechenden Gene	39
Tab. 11: Mastermix zum Einsatz in die qRT-PCR. Das Volumen ist ausreichend für ein Well.	46
Tab. 12: Übersicht über die Rezeptorexpression biogener Amin-Rezeptoren in PHs.	60
Tab. 13: Anzahl der in Infektionsexperimenten eingesetzten Fliegen.	115

Abkürzungsverzeichnis

20E	-	20-Hydroxyecdysone
5-HT	-	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AKH	-	Adipokinetisches Hormon
AMP	-	Antimikrobielles Peptid
ATP	-	Adenosintriphosphat
BA	-	Biogenes Amin
BCP	-	1-Brom-3-chlorpropan
bPac	-	Bakterielle photoaktivierte Adenylylcyclase
BSA	-	<i>Bovine serum albumin</i>
CA	-	<i>Corpora allata</i>
cAMP	-	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC	-	<i>Corpora cardiaca</i>
cDNA	-	complementary DNA
<i>CyO</i>	-	<i>Curly of Oster</i>
DAG	-	Diacylglycerin
DAP	-	Diaminopimelinsäure
DC	-	Dendritische Zelle (<i>Dendritic cell</i>)
Dif	-	<i>Dorsal-related immunity factor</i>
dipt	-	diptericin
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonucleic acid
dNTP	-	Desoxyribonucleosidtriphosphat
Dop	-	Dopamin
Dscam	-	<i>Down syndrom cell adhesion molecule</i>
dsRNA	-	doppelsträngige RNA
E	-	Epinephrin
EcR	-	Ecdysone receptor
Epac	-	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
FACS	-	Fluorescence activated cell sorting
FBS	-	<i>Fetal Bovine serum</i>
GFP	-	<i>Green fluorescent protein</i>
GNBP	-	<i>glucan-binding protein</i>
GPCR	-	G-Protein gekoppelter (<i>coupled</i>) Rezeptor
GTP	-	Guanosintriphosphat
<i>hml</i>	-	<i>hemolectin</i>
HPA-Achse	-	Hypophysäre-Adrenale-Achse
IBMX	-	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IM	-	Induktionsmedium
Imd	-	<i>Immune deficiency</i>
IP3	-	Inositoltriphosphat
JH	-	Juvenilhormon
JNK	-	c-Jun N-terminale Kinase
KD	-	Knock-Down
KO	-	Knock-Out
LB	-	Lysogeny Broth
L3-Larven	-	Larven des dritten Stadiums
LPS	-	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

ModSP	-	<i>Modular serine protease</i>
NaCl	-	Natriumchlorid
NE	-	Norepinephrin
NK-Zellen	-	Natürliche Killerzellen
Oct	-	Octopamin
OD ₆₀₀	-	Optische Dichte bei Wellenlänge 600 nm
PAMP	-	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PGN	-	Peptidoglykan
PGRP	-	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
PH	-	Primärhämozyten
PI	-	<i>Pars intercerebralis</i>
PKA	-	Proteinkinase A
PKC	-	Proteinkinase C
PL	-	<i>Pars lateralis</i>
PLC	-	Phospholipase C
PRR	-	<i>Pattern recognition receptor</i>
(q)RT-PCR	-	(quantitative) <i>real time polymerase chain reaction</i>
RNA	-	Ribonucleic acid
RNAi	-	<i>RNA interference</i>
RT	-	Raumtemperatur
SAM	-	Sympathisch-adrenerge-Medulläre Achse
shRNA	-	<i>Small hairpin RNA</i>
TEP	-	Thioester-enthaltenden Proteine
TLR	-	<i>Toll-like receptor</i>
TNFR	-	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRiP	-	<i>Transgenic RNAi Project</i>
Tyr	-	Tyramin
UAS	-	<i>Upstream activated sequence</i>
ULA	-	Ultra-Low-Attachement
<i>usp</i>	-	<i>ultraspiracle</i>
VALIUM	-	Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS
<i>w</i>	-	<i>white</i>

1 Einleitung

1.1 Stress - und der innere Säbelzahn tiger

Stress ist im alltäglichen Sprachgebrauch meist ein recht inflationär verwendeter Begriff für den empfundenen Umstand, zu viele Dinge in zu wenig Zeit erledigen zu müssen wie, sagen wir mal, die Fertigstellung einer Doktorarbeit. Diese Definition von Stress greift aber viel zu kurz, denn wie so oft gibt es auch hierbei nicht nur schwarz und weiß.

Stress und der Umgang eines Organismus mit selbigem ist ein sehr altes Konzept, dass in erster Linie dem obersten aller Ziele dient – dem Überleben. Ob der Mensch für längere Zeit Kälte ausgesetzt ist, Hunger erfährt, verletzt wird oder Gefahr läuft, zeitnah verletzt zu werden, weil ein Säbelzahn tiger an seinen neandertalensischen Höhleneingang klopft... gemeinsam haben alle diese Faktoren, dass sie das innere, physiologische Gleichgewicht bedrohen [1]. Ist die Rückkehr zum Gleichgewicht möglich, so können wir sogar gestärkt aus solchen Erfahrungen hervorgehen. Übersteigen sie unsere Fähigkeit dazu jedoch, so werden wir krank oder sterben schlimmstenfalls daran [1], [2].

Die Entdeckung der Verbindung zwischen anhaltendem Stress und einer Vielzahl von Krankheiten lässt sich auf das frühe 20. Jahrhundert zurückdatieren. Während dieser Zeit legte der Mediziner Hans Selye die Grundlagen zur Definition und Erforschung von Stress. Als Basis dienten ihm hierfür die Arbeiten von Claude Bernard, der festgestellt hatte, dass die Fähigkeit eines Organismus zur Erhaltung des „*milieu intérieur*“ gegenüber äußeren Einflüssen wesentlich für das Leben sei [1], [3]. Dieses Konzept wurde verfeinert von Walter B. Cannon, der den Begriff der „Homöostase“ prägte als die Erhaltung physiologischer Variablen wie z. B. Blutzuckerspiegel, Blutdruck oder Kerntemperatur innerhalb eines „akzeptablen“ Bereiches. Dafür nötig sind Sensoren, die Änderungen der Größen wahrnehmen, und Regelmechanismen, die darauf Einfluss nehmen können. Neben physiologischen Gefahren für die Homöostase brachte Cannon zum ersten Mal auch psychologische Störgrößen ins Spiel. Außerdem geht auf ihn der Begriff der „*fight-or-flight-response*“ zurück, der sich auf die akute, erste Phase der Reaktion auf einen physiologischen Stressor (wie z. B. das plötzliche Auftauchen des aufdringlichen Säbelzahntigers) bezieht (von Selye später auch „Alarmphase“ genannt) [3].

Modernere Stressdefinitionen schließen vor allem den Fakt mit ein, dass die individuelle Wahrnehmung des Stressors einen großen Einfluss auf die Fähigkeit zum Umgang mit diesem hat [3]. Stress bzw. ein Stressor wird allgemein als ein Faktor bezeichnet, der die Homöostase des Organismus tatsächlich (physiologisch) oder empfunden (psychologisch) gefährdet. Sobald der Stressor (z. B. Hunger, Kälte, Schlafentzug, sportliche Betätigung, Bungeejumping, etc.) eine gewisse Intensität und/oder Dauer überschreitet, stört er die Homöostase, deren Wiederherstellung durch eine Vielzahl von Regelmechanismen gewährleistet wird, die durch das neuroendokrine System gesteuert werden [4]. Bei der Kategorisierung von Stress wird häufig zwischen akutem und chronischem Stress unterschieden. Ersterer hält Minuten bis zu wenigen Stunden an und ist vom Organismus hinsichtlich der Rückkehr zur Homöostase in der Regel zu bewältigen. Die *fight-or-flight*-Antwort wird von akutem Stress ausgelöst. Chronischer Stress dagegen dauert entweder über einen langen Zeitraum an oder tritt inner-

halb eines langen Zeitraums immer wieder auf, sodass eine Rückkehr zur Homöostase oft nicht vollständig möglich ist [4], [5].

Das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Auswirkungen von Stress auf das Immunsystem entwickelt sich stetig, ist jedoch noch recht lückenhaft. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Faktoren, die Einfluss auf die Art der Stressantwort des Organismus nehmen, so vielfältig sind [6]. Neben Art, Dauer, Intensität und Timing des Stressors sind auch individuelle Merkmale wie Geschlecht, Alter, genetische Prädisposition, individuelle Wahrnehmung, Umwelteinflüsse und sozioökonomischer Status entscheidend dafür, ob der Stressor zu einem immunprotektiven, immunregulatorischen oder immunopathologischen Ausgang führt [3], [4], [5].

Aufgrund der augenscheinlichen Komplexität der Verbindung zwischen neuroendokrinem System und Immunsystem sind Humanstudien zur Erforschung der Mechanismen allein nicht zielführend. Es braucht andere Modellorganismen wie Mäuse oder weitaus einfachere Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster*, die es ermöglichen, einige der oben genannten Faktoren isolierter zu betrachten [7].

Zur Untersuchung möglicher modulierender Effekte von Stressfaktoren auf die Immunantwort wird in dieser Arbeit die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus zur Hilfe genommen, deren Eignung als solcher im Folgenden noch eingehend beschrieben wird.

Die Art von Stressoren, denen Taufliegen und der Mensch gleichermaßen unterliegen, sind neben klassischen physiologischen Stressoren wie Hitze, Kälte und Hunger jene, bei denen die *fight-or-flight*-Reaktion aktiviert wird, also wenn ein Säbelzahniger plötzlich aus dem Gebüsch springt. Das Äquivalent bei der Fliege, da ein passenderer Fressfeind, wäre vielleicht eine Springspinne. Diese erste Phase der Reaktion auf einen akuten physiologischen Stressor ist gekennzeichnet durch Erhöhung von Atem- und Herzfrequenz, Blutzuckerspiegel und damit einhergehender besserer Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Bewegungsapparates [4].

Im Anschluss an die erste Alarmreaktion folgt entsprechend der Einteilung nach Selye die sogenannte Widerstands- oder Adaptionsphase, bei der durch die verschiedenen Regelkreisläufe ein neues, dem Stressor angepasstes Gleichgewicht hergestellt wird [3]. Dauert die Belastung jedoch zu lange an, so gehen in der Erschöpfungsphase Reserven, die der Körper bereitgestellt hatte, zur Neige. Eine Rückkehr zum Gleichgewichtszustand ist nicht möglich, und es kann zu Schädigungen von Organen und zum Versagen des Immunsystems kommen [1].

1.1.1 Ist Stress Freund oder Feind?

Stress sollte nicht *per se* zum Staatsfeind Nr. 1 erklärt werden, denn die entsprechenden Regelmechanismen haben sich in der Evolution durchaus zu unserem Vorteil bewährt. Allerdings zahlt der Körper einen Preis für die Rettung unseres Lebens. Wie hoch dieser Preis ist, hängt von der Art und Dauer des Stressors ab. Sportliche Belastung als Beispiel für eine Form des akuten Stresses kann durchaus positive Effekte auf den Organismus im Allgemeinen und das Immunsystem im Besonderen haben [8].

Vor chronisch psychologischen Stressoren wird dagegen seit längerer Zeit vermehrt gewarnt, da sie sich nachweislich negativ auf die Gesundheit auswirken. Besonders im Fall einer bestehenden Vorerkrankung kann sich der Zustand durch gleichzeitige Exposition mit chroni-

schem Stress verschlechtern. Dazu gehören kardiovaskuläre Krankheiten, Krebs, HIV, Autoimmunerkrankungen, Wundheilung [9], Allergien und auch Atemwegserkrankungen wie chronische Infektionen der oberen Atemwege und Asthma, welches die Liste der häufigsten chronischen Krankheiten inzwischen anführt [10]. Das Konzept von Stress als krankheitsauslösendem Faktor vor allem bei Asthma ist eigentlich nicht neu, wurde es doch in der frühen Phase seiner Entdeckungsgeschichte zu den psychosomatischen Erkrankungen gezählt und zunächst als „*Asthma nervosa*“ bezeichnet. Als in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts auch andere auslösende Faktoren wie z. B. Umwelteinflüsse oder Ernährung entdeckt wurden, ging der Fokus von Stress als Auslöser zunächst verloren, gewann in den letzten Jahren aber wieder an Bedeutung [11].

Asthma ist eine chronisch, entzündliche Atemwegserkrankung, die durch erhöhte Atemwegsreagibilität, Atemwegsobstruktion, vermehrte Mukusproduktion und Umbauprozesse der Atemwege („*Remodelling*“) gekennzeichnet ist [10]. Dabei nimmt das adaptive Immunsystem eine wesentliche Rolle ein und steht dabei meist im Fokus der Forschung. Seit einiger Zeit wird aber auch der Umstand untersucht, dass das angeborene Immunsystem einen wichtigen Teil zur Asthma-Pathogenese beiträgt [12]. Es existieren verschiedene Subtypen von Asthma, wobei jeweils verschiedener Zelltypen des angeborenen Immunsystems wie Alveolarmakrophagen, dendritische Zellen (DCs), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Bronchialepithelzellen eine Rolle spielen können [10]. Von diesen Zellen ist außerdem bekannt, dass sie empfänglich für verschiedene Hormone sind, die im Verlauf einer Stressantwort ausgeschüttet werden [13], [14], [15], [16], [17].

Um grundsätzlich die Frage, ob Stress immunsuppressiv oder -stimulierend ist, beantworten zu können, muss die Interaktion zwischen Nervensystem, endokrinem System und Immunsystem besser verstanden werden. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die im Verlauf der Stressantwort ausgeschütteten Hormone Veränderungen der Immunantwort herbeiführen können. Sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten wirken diese Hormone sowohl immunsuppressiv als auch immunstimulierend, wobei es scheint als sei der globale Effekt von Stresshormonen auf die Immunantwort eher suppressiv [18], [19]

In einer für den Organismus potentiell akut lebensbedrohlichen Situation wäre es jedoch logischer, wenn die Immunantwort in einen aktiven Alarmzustand versetzt würde, da die Möglichkeit einer Verwundung und damit einhergehender Infektion besteht [20]. Dies wurde für Teile der zellulären Immunantwort auch beobachtet [21]. Eine ganze Reihe an Publikationen weist dagegen eher darauf hin, dass Stress eine immunsuppressive Wirkung auf den Organismus hat. Der Schlüssel zur Aufklärung dieses vermeintlichen Widerspruchs wird oft in der Unterscheidung zwischen akutem und chronischem Stress gesucht. Dies ist Gegenstand vieler Hypothesen und Untersuchungen [4], [5], [7], [18], [22].

Auch in Invertebraten wie der Taufliede scheinen Stressoren, die eine *fight-or-flight*-Reaktion auslösen, global einen immunsuppressiven Einfluss zu haben, mit dem Ergebnis, dass die Organismen anfälliger für Krankheiten werden. Eine Theorie zur Aufklärung dieses scheinbar unsinnigen Umstands – die „*over-excitation*-Hypothese“ - geht davon aus, dass das angeborene Immunsystem durch das neuroendokrine System herunterreguliert wird, um ein Überschießen der Immunantwort und damit einhergehende Gewebeschädigung z. B. durch die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies zu vermeiden. Demnach ist eine Suppression des Immunsystems nicht zwingend von Nachteil für den Organismus [23], [24]. Unterstützt wird

diese Hypothese allerdings mehr durch Daten aus Mollusken. Untersuchungen in Insekten sprechen dagegen eher für die Hypothese, dass es bei Aktivierung der Stressantwort zu einer „Fokusverschiebung“ des Immunsystems kommt. So werden z. B. bestimmte Lipoproteine, die normalerweise als Überwachungsmoleküle in der Hämolymphe Aufgaben des Immunsystems übernehmen, zum Lipidtransport hin rekrutiert, wenn es in Antwort auf einen Stressor zum Anstieg von Lipiden als Energielieferanten in der Hämolymphe kommt. Dies führt zu einem Wettkampf um Ressourcen, der zu Ungunsten der Immunantwort geht. Dies wird vermutlich teilweise durch bestimmte Stresshormone wieder ausgeglichen, die z. B. die zelluläre Immunantwort gezielt stimulieren [19], [24].

Über das Zusammenspiel von Stress und dem Immunsystem sind also bereits einige Puzzleteile gefunden worden. Um die Teile aber zu einem vollständigen Bild zusammenfügen zu können, sind noch einige Erkenntnisse über grundlegende Mechanismen notwendig, die in weniger komplexen Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* besser adressiert werden können.

1.1.2 Einfluss von Stress auf das angeborene Immunsystem in Vertebraten

So unterschiedlich die verschiedenen Stressoren auch sein mögen, sie alle können nur dann eine Reaktion von Körper oder Gehirn auslösen, wenn sie biologische Veränderungen im Organismus bewirken [5].

Visuelle, olfaktorische oder akustische Reize sowie Temperaturwahrnehmung oder Schmerz werden von der Amygdala verarbeitet und interpretiert. Bewertet sie die Situation als Gefahr, signalisiert sie dies an den Hypothalamus, der seinerseits über das sympathische Nervensystem das Nebennierenmark (*Medulla glandulae suprarenalis*) dazu veranlasst, die Catecholamine Epinephrin (E) und Norepinephrin (NE) ins Blut auszuschütten. E und NE sorgen für die Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks, für eine beschleunigte Atmung und damit einhergehende verbesserte Sauerstoffversorgung, für die schnelle Bereitstellung von Glukose und Fetten zur Energieversorgung und erhöhte Aufmerksamkeit [7], [25]. NE ist neben seiner Funktion als Hormon auch ein Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, welches direkt in vielen Geweben wie Muskeln und Blutgefäßen mündet, aber auch in lymphoiden Organen, in denen Immunzellen lokalisiert sind [8], [26].

Im Anschluss an diese erste Reaktion über die sogenannte sympathisch-adrenerge-medulläre (SAM)-Achse aktiviert der Hypothalamus eine zweite Wirkungsachse – die hypothalamisch-hypophysäre-adrenale (HPA)-Achse. Durch Ausschüttung des Corticotropin-freisetzenden Hormons wird die Hypophyse dazu angeregt, adrenocorticotropes Hormon in den Blutkreislauf zu entlassen. Dieses erreicht schließlich die Nebennierenrinde, die als Antwort Glucocorticoide wie Cortisol ausschüttet. Diese Hormone sind in erster Linie für die Bereitstellung von Glukose zuständig. Die HPA-Achse hält die durch die SAM-Achse aktivierten Körperfunktionen so lange aufrecht, bis die Gefahr vorüber ist. Dann greift das parasympathische Nervensystem ein und dämpft die physiologischen Reaktionen wieder ab [7], [25].

Inzwischen ist ein gut belegter Fakt, dass das neuroendokrine System mit dem Immunsystem interagiert [5], [8], [13], [14], [16], [18]. Konkrete Untersuchungen zu der Art dieser Interaktion weisen jedoch, wie bereits erwähnt, häufig in gegensätzliche Richtungen. Dies liegt daran, dass das System sehr fein reguliert ist und daher keine Schwarz-Weiß-Antwort erwartet

werden kann. Studien mit Mäusen, die verschiedenen Arten von Stressoren ausgesetzt wurden, konnten z. B. zeigen, dass einige dieser Stressoren zu einer verminderten Aktivität in Makrophagen führen, andere jedoch keinen Einfluss auf diese haben. Stattdessen beeinflussen sie die Neutrophilen-Aktivität und Differenzierung von DCs [6].

Die oben genannten Hormone der SAM- und HPA-Achse sowie viele weitere wie z. B. die biogenen Amine (BAs) Dopamin (Dop), Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) und Histamin wirken über die Bindung an Adrenorezeptoren – spezielle G-Protein gekoppelte Rezeptoren - die auch auf Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems (T- und B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen und Granulozyten) zu finden sind [13], [14], [18]. Es existieren α - und β -Adrenorezeptoren, von denen aber hauptsächlich die β_2 -Adrenorezeptoren von Immunzellen exprimiert werden [15]. Die Aktivität dieser Zellen kann somit durch neuroendokrine Faktoren moduliert werden [13].

Ein Beispiel für Zellen des angeborenen Immunsystems, die über β -adrenerge Rezeptoren reguliert werden können, sind Alveolarmakrophagen. Sie sind der am häufigsten auftretende Leukozytenzelltyp in Alveolen, distalen Atemwegen und konduktiven Bereichen der Lunge und wurden bereits mit krankhaftem Atemwegs-*Remodelling* und eosinophilem Asthma in Verbindung gebracht. Es ist aber noch ungeklärt, ob die Wirkung dieser Zellen in diesem Zusammenhang eher immunsuppressiv oder immunstimulierend ist [27].

Alveolarmakrophagen reagieren auf Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren durch Catecholamine wie NE mit einer Änderung ihrer Aktivität und Cytokin-Ausschüttung [28].

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SAM-Achse) wird u. a. mit einer Veränderung der Produktion und Mobilisierung von Immunzellen in Verbindung gebracht [8]. Über den Zusammenhang von Catecholaminen und der zellulären Immunantwort ist bekannt, dass sie allgemein die Zellproliferation, lytische Aktivität, Cytokin- und Antikörperproduktion sowie Zellmigration inhibieren oder verstärken können [13]. NE im Besonderen scheint hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, suppressiver Natur zu sein. NK-Zell-Aktivität wird *in vivo* z. B. durch massive NE-Ausschüttung vermindert. Aus *in vitro* Experimenten weiß man, dass NE suppressive Effekte auf DCs und Monozyten ausübt und indirekt außerdem die Migration von NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen steigert, während die von DCs vermindert wird [16]. Außerdem wird in Leukozyten eine Expressionssteigerung von pro-inflammatorischen Cytokin-Genen und Suppression der Typ 1-Interferon vermittelten anti-viralen Antwort bewirkt [8].

Das durch die HPA-Achse aktivierte Glucocorticoid Cortisol wird als DAS Stresshormon bezeichnet. Es hat einen enormen Stellenwert im Organismus, denn es beeinflusst nicht nur ca. 20 % aller humanen Gene, sondern auch Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems [4].

Die Wirkung von Glucocorticoiden wird allgemein als immunsuppressiv angesehen. Sie unterdrücken die Reifung, Differenzierung und Proliferation aller Immunzellen und begünstigen z. B. die Apoptose von Makrophagen und dendritischen Zellen. Außerdem inhibieren sie den für die Immunregulation wesentlichen Transkriptionsfaktor NF- κ B, wodurch die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine generell vermindert wird [16]. In physiologischen Konzentrationen werden Glucocorticoide für die Aufrechterhaltung von Immunzellfunktionen benötigt [13].

Neben den beschriebenen zentralen Stresshormonen gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Hormone und Neurotransmitter, die für die Feinabstimmung des angeborenen Immunsystems entscheidend sind. Dazu gehört auch das BA Dop, welches als Vorläufer von NE ebenfalls in der Nebenniere produziert wird. Immunzellen exprimieren auch Rezeptoren für dieses BA [29] und können über verschiedene Wege mit ihm in Kontakt kommen. Zum einen gibt es in geringer Zahl Nervenenden des sympathischen Systems, die in lymphatischen Organen enden und Dop statt NE ausschütten. Darüber hinaus wird es von der Nebenniere zusammen mit anderen Catecholaminen in das Blut entlassen. Zum anderen wird Dop als Botenstoff vom Zentralnervensystem und von Darm-Epithelzellen produziert. Es gibt inzwischen Hinweise, dass Immunzellen selbst in der Lage sind, Dop zu synthetisieren, was eine Möglichkeit zur Kommunikation der Zellen mit dem Zentralnervensystem eröffnet. Dop scheint im Zusammenhang mit der Immunantwort hauptsächlich zusammen mit NE zu interagieren und so dessen Wirkung zu modulieren [30]. So verstärkt eine Zusammenarbeit von NE und Dop z. B. die Aktivierung von Lymphozyten in Ratten [13].

Ein weiteres BA, welches die Freisetzung verschiedener Hormone der HPA-Achse moduliert, ist 5-HT. Seine Wirkung ist stark abhängig von der Dauer der Stresseinwirkung, was vermutlich mit einer Veränderung der Affinität seiner Rezeptoren zusammenhängt [31]. Es gibt einige Hinweise darauf, dass Zellen des angeborenen Immunsystems auf 5-HT reagieren können oder es sogar selbst synthetisieren und sezernieren [32]. So nehmen DC in Mäusen z. B. 5-HT aus der Umgebung auf und geben es auch wieder ab [33]. Menschliche und aus Mäusen stammende Mastzellen adhäreren unter Einfluss von 5-HT stärker an Fibronektin und werden außerdem chemotaktisch von 5-HT angezogen [34]. Ebenso werden Eosinophile, die z. B. bei Asthma eine große Rolle spielen, offenbar von 5-HT, welches im Serum von Asthmatikern erhöht ist, angelockt [35]. Mausmakrophagen zeigen erhöhte Phagozytoseaktivität in Gegenwart von 5-HT [36]. Wesentliche Bedeutung scheint 5-HT auch für die verstärkte Empfänglichkeit von Depressionspatienten für Stress zu haben [31].

Die Kommunikation zwischen dem neuroendokrinen und dem Immunsystem verläuft multidirektional. Immunzellen empfangen nicht nur Signale, sie können umgekehrt auch Signale direkt an das Zentralnervensystem senden, z. B. über eigens produziertes Dop [30] oder andere Catecholamine [13] sowie Cytokine und so bestimmte Verhaltensweisen wie Schlafen, Essen oder die Affinität zu Drogenmissbrauch beeinflussen [13], [26].

Dieses fein abgestimmte Zusammenspiel der verschiedenen Systeme macht auch deutlich, dass eine dauerhafte Störung des hormonellen Gleichgewichtes wie es z. B. bei chronischem Stress der Fall ist, zur Ausbildung bzw. Verstärkung verschiedener Autoimmun- und entzündungsassoziierter Krankheiten beitragen kann [37].

1.1.3 Einfluss von Stress auf das angeborene Immunsystem in Invertebraten

Auch in Insekten sind Stress- und Immunantwort eng miteinander verknüpft, was den Schluss zulässt, dass diese Interaktion der beiden Systeme maßgeblich für das Überleben ist. Es ist allerdings nicht klar, ob die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bei Vertebraten und Invertebraten entweder hoch konserviert sind oder sich während der Evolution unabhängig voneinander entwickelt haben [38].

Viele Gemeinsamkeiten lassen sich vor allem bei der akuten Stressantwort zur Initiierung einer *fight-or-flight*-Reaktion erkennen. In Vertebraten findet man neurosekretorische Zellen der höheren Kommandozentralen des neuroendokrinen Systems im Hypothalamus, der seinerseits auf die Nebenniere wirkt. In Insekten befinden sich die für die *fight-or-flight*-Reaktion verantwortlichen neurosekretorischen Zellen in Teilen des Protocerebrums, *Pars intercerebralis* (PI) und *Pars lateralis* (PL) genannt, die ihrerseits auf die endokrinen Drüsen, *Corpora cardiaca* (CC) und *Corpora allata* (CA), wirken. In *Drosophila* sind CC und CA mit einer weiteren Drüse – der Prothoraxdrüse – zu einem Komplex verbunden, der Ringdrüse genannt wird. Diese PI/PL-Ringdrüsen-Verbindung wird häufig mit der HPA-Achse in Vertebraten verglichen [39], [40]. Die CC ist wie die Hypophyse ein Neurohämälorgan und speichert als solches Hormone wie das adipokinetische Hormon (AKH), welches von neurosekretorischen Zellen synthetisiert wurde und bei Bedarf schnell in die Hämolymphe entlassen werden kann. Trifft ein akuter Stressor auf sensorische Zellen des Insekts, kommt es über die PI/PL-Ringdrüsen-Verbindung zu einer schnellen Freisetzung der Neurohormone aus der CC in die Hämolymphe („Insektenblut“). In dieser ersten Phase der akuten Stressantwort handelt es sich bei den freigesetzten Hormonen um BAs, die innerhalb weniger Minuten für die Bereitstellung energiereicher Substrate aus dem Fettkörper (Insektenanalogon zur Leber in Säugetieren) sorgen. Im weiteren Verlauf der Stressantwort kommen zusätzliche Neurohormone ins Spiel, die ebenfalls die Bereitstellung von Energie und gleichzeitig die Rückkehr zur Homöostase unterstützen [41]. Dazu gehört vor allem das von der CC etwa 30 Minuten nach einem *fight-or-flight*-Impuls sezernierte AKH, welches in seiner Funktion dem Glukagon in Vertebraten ähnelt. Diese zeitliche Verzögerung in der Sekretion von AKH ist vergleichbar mit der des Cortisols in Vertebraten [19]. Darüber hinaus begleiten in diesem späteren Stadium auch Steroidhormone wie Ecdysterioide und Juvenilhormon (JH) die Stressantwort [41], [42]. Letztere zusammen mit den BAs beeinflussen unter anderem die Adaption an Stressoren. So führt z. B. ein stress-induziertes, erhöhtes Level an Dop zu einer Inhibierung des Abbaus von JH, was in weiblichen *Drosophila* zu einer Verzögerung der Eiablage führt [42].

Das am häufigsten vertretene BA in Invertebraten ist Octopamin (Oct), dessen schneller Konzentrationsanstieg in der Hämolymphe kennzeichnend für die erste Reaktion auf einen akuten Stressor ist [38], [41]. Oct ist strukturell und funktionell eng verwandt mit NE in Vertebraten. Es wird aus der Aminosäure Tyrosin über eine Zwischenstufe synthetisiert (Abb. 1), bei der es sich um das BA Tyramin (Tyr) handelt. Alternativ kann Tyr mit Hilfe eines anderen Enzyms (Dopamindehydroxylase) auch aus Dop synthetisiert werden. Eine biologische Relevanz für diesen alternativen Syntheseweg ist allerdings bislang nicht nachgewiesen [43], [44].

Die Wirkung von Oct in Insekten ist ausgesprochen vielfältig, was sich vor allem in der Tatsache widerspiegelt, dass Oct-Rezeptoren in praktisch jedem Organ zu finden sind [45]. In seiner Rolle als in der Hämolymphe zirkulierendes Neurohormon nimmt es im Zusammenhang mit Stress auf die Kontrolle des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus Einfluss, in dem es mit dem Fettkörper interagiert. Als Neuromodulator kontrolliert es Muskelaktivität sowie Erregungslevel und hat besonderen Einfluss auf Lernen und Erinnerung. Darüber hinaus fungiert es auch als Neurotransmitter. [46]

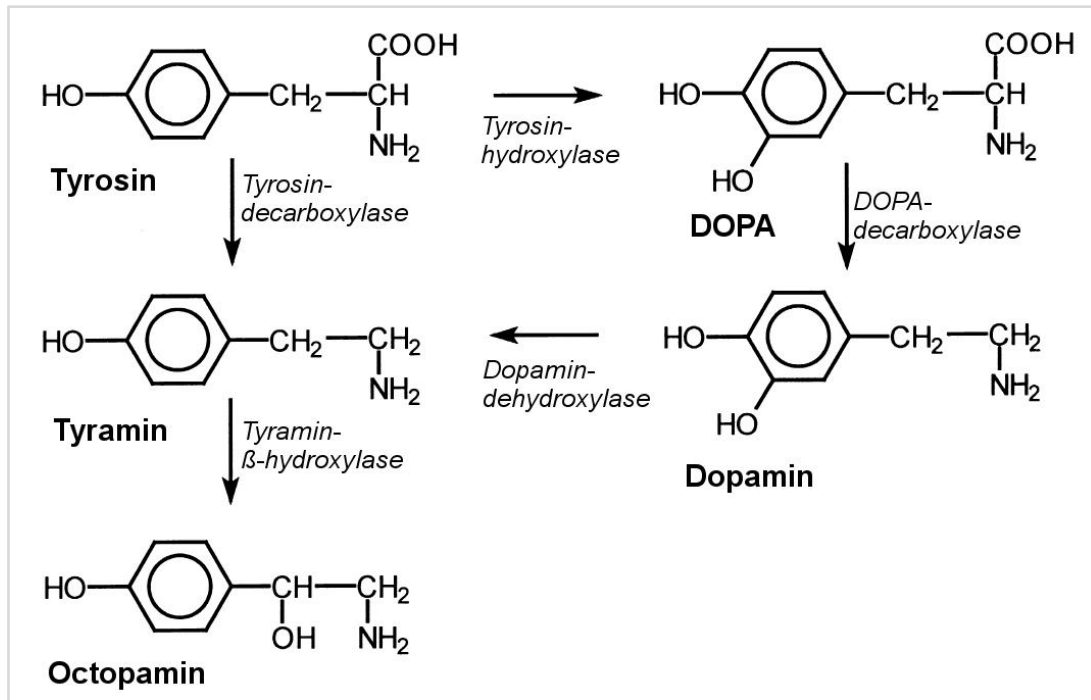


Abb. 1: Biosynthesewege von Octopamin in Insekten [43]. Die Aminosäure Tyrosin wird durch die Tyrosin-decarboxylase umgewandelt in das biogene Amin Tyramin, welches mit Hilfe eines weiteren Enzyms (Tyramin-β-Hydroxylase) zu Octopamin umgebaut wird. Alternativ kann Tyramin durch die Dopamindehydroxylase aus Dopamin synthetisiert werden.

Die Einflüsse von Oct auf die Immunantwort in Insekten im Allgemeinen und auf deren Immunzellen (Hämozyten) im Besonderen sind unter denen der BAs am besten untersucht und in Tab. 1 zusammengefasst. So wurde z. B. in Hämozyten der amerikanischen Schabe (*Periplaneta americana*) [53] und des Falters *Spodoptera exigua* eine verstärkte Phagozytoseaktivität unter Einfluss von Oct bemerkt [48].

Tab. 1: Wirkung von Octopamin auf die angeborene Immunantwort in Insekten (erweitert nach [24]).

Wirkung auf das Immunsystem	Effekt	Spezies	Ref.
Suszeptibilität für bakterielle Infektionen	↑	<i>Gryllus texensis</i>	[47]
Phagozytose	↑	<i>Periplaneta americana</i> <i>Spodoptera exigua</i>	[48] [49]
Phagozytose (konzentrationsabhängig)	↑↓	<i>Chilo suppressalis</i>	[50]
Nodule-Formation	↑	<i>Periplaneta americana</i> <i>Spodoptera exigua</i>	[48] [49]
Hämozyten-Ausbreitung (konzentrationsabhängig)	↑↓	<i>Chilo suppressalis</i>	[50]
Überleben nach bakterieller Infektion	↑	<i>Periplaneta americana</i>	[48]
Plasmatozyten-Beweglichkeit	↑	<i>Galeria mellonella</i>	[51]
Hämozytenzahl (konzentrationsabhängig)	↑↓	<i>Galeria mellonella</i>	[52]
Hämozytenaktivität	↑	<i>Galeria mellonella</i>	[52]

In Hämocyten des Falters *Chilo suppressalis* konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Oct-Konzentration entweder ein suppressiver oder stimulierender Effekt auf die Phagozytoseaktivität und das Ausbreitungsverhalten der Zellen eintritt [50].

Über Tyr weiß man dagegen bisher am wenigsten. Lange glaubte man, dass es nur eine Synthesestufe von Oct sei [54]. Mit der Entdeckung tyraminerger Rezeptoren wurde allerdings deutlich, dass es eine eigene Signalwirkung hat und zumindest in Bezug auf den stimulierenden Effekt von Oct auf Muskelkontraktionen antagonistisch wirkt [55], [56]. Allerdings ist zurzeit noch nicht geklärt, ob es in Insekten von speziellen tyraminergeren Neuronen oder zusammen mit Oct aus Neuronen sezerniert wird, die sowohl Oct als auch Tyr freisetzen können. Außerdem wurde festgestellt, dass Tyr auch mit einer geringeren Affinität an Oct-Rezeptoren binden kann, was die Komplexität der Signalzusammenhänge weiter erhöht [57], [58].

Im Zusammenhang mit der Immunantwort wurde bisher kaum ein direkter Einfluss von Tyr beschrieben. Es wurde beobachtet, dass in *Drosophila* ein Tyr-Rezeptor (Oct-TyrR) in den malphigischen Gefäßen, den Exkretionsorganen der Insekten, exprimiert wird [58]. Diese Gefäße sind immunkompetente Gewebe, die alle Komponenten des Imd- und Toll-Signalweges exprimieren [59]. Über diese Verbindung wäre eine Wirkung von Tyr auf das Immunsystem daher z. B. denkbar [58]. Darüber hinaus gibt es eine Arbeit, die darauf hinweist, dass Tyr die morphologische Ausbreitung von Hämocyten in *Chilo suppressalis* stimuliert [60].

Bei einer akuten Stressreaktion wird auch Dop vermehrt ausgeschüttet [61], [62]. Zusammen mit Oct kontrolliert es die Umwandlung von Glykogen in Trehalose, welche dann als Energielieferant in die Hämolymphe entlassen wird [62].

Die Erkenntnisse bezüglich der konkreten Wirkung von Dop auf die Immunantwort in Insekten sind rar. Offenbar sind Hämocyten selbst in der Lage Dop zu produzieren und dadurch in autokrine oder parakrine Mechanismen eingebunden zu sein [63]. Ihre Phagozytoseaktivität wird in *Chilo suppressalis* [63], *Periplaneta americana* [48] und der Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* [64] durch Dop verstärkt.

Ein weiteres BA, welches in Antwort eines Stressors in Insekten vermehrt in der Hämolymphe zu finden ist, ist 5-HT [62]. Seine bislang bekannten Wechselwirkungen mit dem Immunsystem in Insekten sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Wirkung von 5-Hydroxytryptamin auf die angeborene Immunantwort in Insekten

Wirkung auf das Immunsystem	Effekt	Spezies	Ref.
Phagozytose	↑	<i>Periplaneta americana</i>	[48]
		<i>Spodoptera exigua</i>	[49]
		<i>Drosophila melanogaster</i>	[65]
Phagozytose (durch autokrine Signale)	↑	<i>Pieris rapae</i>	[65]
Nodule-Formation	↑	<i>Periplaneta americana</i>	[48]
		<i>Spodoptera exigua</i>	[49]
Überleben nach bakterieller Infektion	↑	<i>Periplaneta americana</i>	[48]
		<i>Drosophila melanogaster</i>	[65]

In Hämocyten verschiedener Insekten wie *Drosophila* [65], *Periplaneta americana* [48] und *Spodoptera exigua* [49] konnte z. B. eine verstärkte Phagozytoseaktivität unter Einfluss von 5-HT beobachtet werden. In *Pieris rapae* wurde erkannt, dass die Phagozytoseaktivität der Hämocyten auch durch autokrine Signale von 5-HT beeinflusst wird [65].

Neben den BAs stellen außerdem die an der Entwicklung von Insekten beteiligten Hormone 20-Hydroxyecdysen (20E) und JH eine wesentliche Verbindung zwischen Stress- und Immunantwort dar. Das Ecdysteroid 20E ist für die Entwicklung, Metamorphose, Reproduktion und für das Altern von Insekten verantwortlich. Inzwischen ist auch bekannt, dass es eine wesentliche Rolle in der Modulierung der zellulären und humoralen Immunantwort innehat. Vor allem scheint es wichtig für die Reifung des embryonalen Immunsystems zu sein [66].

JH und 20E besitzen untereinander und zusammen mit BAs fein abgestimmte regulatorische Zusammenhänge. So ist JH ein wichtiger Gegenspieler von 20E. Als solcher verzögert es die durch 20E ausgelöste Metamorphose, die erst bei einem Abfall der JH-Konzentration einsetzen kann [67]. Im Fall eines vorliegenden Stressors kann die erhöhte Konzentration an JH – verursacht durch eine inhibierte Degradation durch erhöhte Dop- und Oct-Level - eine Verzögerung in der Entwicklung des Insekts bewirken [68], [61], [69]. JH kann wiederum die Dop-Konzentration regulieren, indem es seinerseits das für die Dop-Degradation nötige Enzym inhibiert [61].

Einige der bisher bekannten Effekte von 20E und JH auf die Immunantwort sind in Tab. 3 und Tab. 4 zusammengefasst. In *Drosophila* führt 20E zu einer erhöhten Produktion von AMPs [70], [71], die durch JH wiederum gesenkt wird [70]. Außerdem wird durch 20E in der Fliege die Phagozytoseaktivität von Hämozyten gesteigert [72], [73], die Chemotaxis dieser Zellen zu Wundstellen hin verstärkt und die Fähigkeit verbessert, bakterielle Infektionen abzuwehren [73]. Allerdings muss festgehalten werden, dass die 20E und JH vermittelten Effekte auf das Immunsystem stark abhängig vom Entwicklungsstadium der Insekten sind und daher auch andersherum gerichtet sein können, wenn sich der Organismus in einem anderen Entwicklungsstadium als dem jeweilig untersuchten befindet. Grundsätzlich wird die Wirkung von 20E auf das Immunsystem aber als stimulierend angesehen, während JH als Gegenspieler zu 20E somit als immunsuppressiv beschrieben wird [70].

Tab. 3: Wirkung von 20-Hydroxyecdysen auf die angeborene Immunantwort in Insekten

Wirkung auf das Immunsystem	Effekt	Spezies	Ref.
Produktion Antimikrobieller Peptide	↑	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>l(2)mbn</i> Zellen	[70], [71], [74] [75]
Phagozytose	↑	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Rhodnius prolixus</i>	[72], [73] [76]
Verkapselung	↑	<i>Drosophila melanogaster</i>	[77]
<i>Nodule</i> -Formation	↑	<i>Neobellieria bullata</i>	[78]
Überleben nach bakterieller Infektion	↑	<i>Drosophila melanogaster</i>	[73]
Hämozyten-Chemotaxis bei Verwundung	↑	<i>Drosophila melanogaster</i>	[73]

Tab. 4: Wirkung von Juvenilhormon auf die angeborene Immunantwort in Insekten

Wirkung auf das Immunsystem	Effekt	Spezies	Ref.
Produktion Antimikrobieller Peptide	↓	<i>Drosophila melanogaster</i>	[70]
Nodule-Formation	↓	<i>Neobellieria bullata</i>	[78]
		<i>Manduca sexta</i>	[79]
Phenoloxidasynthese	↓	<i>Tenebrio molitor</i>	[80], [81]
Verkapselung	↓	<i>Tenebrio molitor</i>	[81]

1.1.4 Signalvermittlung durch BAs in Invertebraten

Oct, Tyr, Dop und 5-HT vermitteln ihre Wirkung auf Zellen ebenso wie andere BAs hauptsächlich über Bindung an spezielle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl.: *G-protein-coupled receptor*, GPCR) der Rhodopsin-ähnlichen Familie, die für die Signaltransduktion ins Zellinnere bzw. ins Innere von Endosomen durch Aktivierung von *Second Messenger*-Signalwegen verantwortlich sind (Abb. 2).

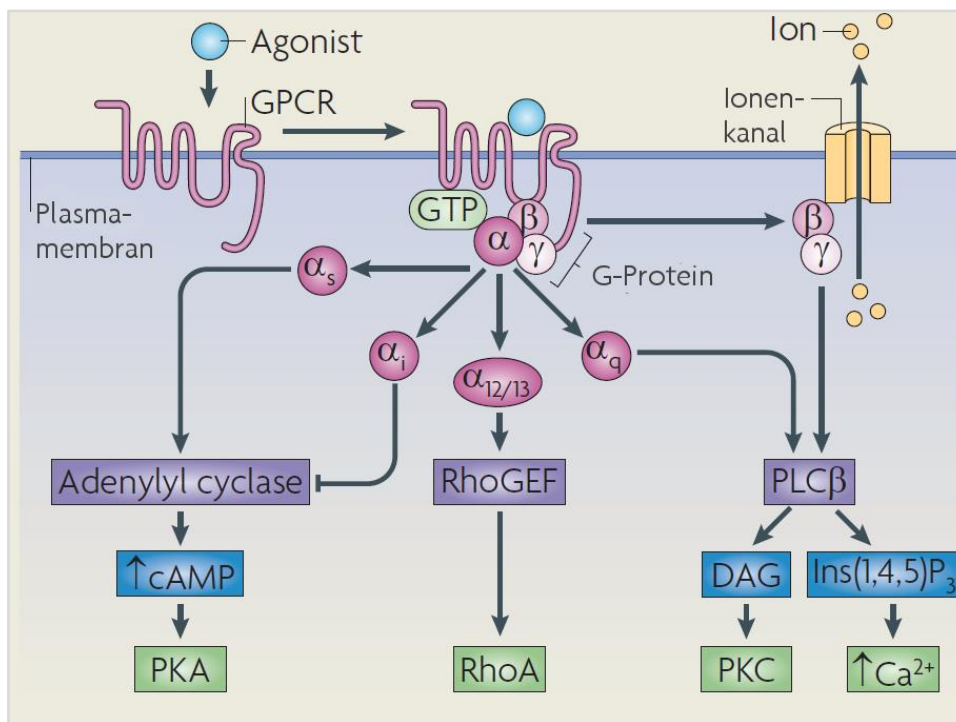


Abb. 2: G-Protein vermittelte Signalwege über GPCRs (nach [82]). Ein Agonist bindet an den Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor und führt eine Konformationsänderung herbei, die die Bindung eines G-Proteins ermöglicht. Je nach Art des Rezeptors, bindet einer von vier verschiedenen G-Protein-Typen. Die jeweilige α -Untereinheit kann entweder eine Adenyl cyclase aktivieren (α_s) oder inhibieren (α_i) und so die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen oder verringern. cAMP aktiviert seinerseits eine Proteinkinase A (PKA). Alternativ kann eine Phospholipase C aktiviert werden, wenn eine α_q -Untereinheit freigesetzt wird. Dies führt zur katalytischen Spaltung in Diacylglycerin (DAG), welches eine Proteinkinase C (PKC) aktiviert und Inositoltrisphosphat (Ins(1,4,5)P₃), wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} ansteigt. Ein viertes, potentielles G-Protein besitzt eine $\alpha_{12/13}$ -Untereinheit, die zur Aktivierung von Rho-GTPasen führt.

Bindet ein BA, so führt dies zu einer Konformationsänderung des Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptors und damit intrazellulär zur Bindung und Aktivierung eines assoziierten, heterotrimeren GTP-bindenden Proteins (G-Protein) [83]. Das aktivierte G-Protein dissoziiert in zwei Untereinheiten, eine α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex, die auf unterschiedliche Weise an der Signalweiterleitung beteiligt sind. Abhängig von Typ des GPCRs können verschiedene Arten von G-Proteinen von ihnen aktiviert werden. Obgleich auch der $\beta\gamma$ -Komplex direkt Signale weiterleiten kann, werden die G-Proteine nach der Signalwirkung ihrer α -Untereinheit kategorisiert. Proteine vom Typ G_s stimulieren Adenylylcyclasen, die ihrerseits ATP zu dem Second Messenger cAMP konvertieren. Demgegenüber inhibieren $G_{i/o}$ -Proteine Adenylylcyclasen und sorgen damit für eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration [84]. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration aktiviert eine Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung einer ganzen Reihe an cytoplasmatischen und zellulären Proteinen viele Zellprozesse beeinflussen kann. Darüber hinaus ist inzwischen ein weiteres Protein bekannt, welches durch Bindung von cAMP aktiviert wird. Dabei handelt es sich um Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*), ein Protein, welches seinerseits kleine GTPasen der Ras-Familie aktiviert und so viele grundlegende Zellfunktionen, darunter Adhäsion, Differenzierung, Proliferation, Genexpression und Phagozytose, beeinflussen kann [85].

Tab. 5: Übersicht über die in *Drosophila* exprimierten BA-Rezeptoren und die an sie bindenden G-Proteine.

BA	Rezeptor	CG-Nummer	G-Protein
Serotonin	5-HT1A	16720	$G_{i/o}$
	5-HT1B	15113	$G_{i/o}$
	5-HT7	12073	G_s
	5-HT2A	1056	G_q
	5-HT2B	42796	G_q
Octopamin	Oct β 1R	6919	G_s
	Oct β 2R	33976	G_s
	Oct β 3R	42244	G_s
	Oamb	3856	G_q / G_s
Octopamin	Oct-TyrR	7485	G_q
Tyramin	TyrR	7431	G_q
Tyramin	TyrRII	16766	$G_{i/o}$
	Dop2R	33517	$G_{i/o}$
Dopamin	DopEcR	18314	G_s
	Dop1 R1	9652	G_s
	Dop1 R2	18741	G_s

Die Ausbreitung von cAMP muss in der Zelle sowohl zeitlich als auch örtlich begrenzt werden. Dies wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Phosphodiesterasen gewährleistet, die für den kontinuierlichen Abbau von cAMP sorgen [84], [86].

Proteine der G_q-Familie aktivieren die Phospholipase C (PLC), deren katalytisches Endprodukt Inositoltrisphosphat (IP₃) zum Öffnen intrazellulärer Ca²⁺-Speicher und somit zu einer Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration führt. Das zweite Endprodukt der PLC-Katalysereaktion - Diacylglycerin (DAG) - aktiviert eine Proteinkinase C (PKC), die durch das nun vermehrt im Cytosol vorhandene Ca²⁺ an die Zellmembran gebunden wird und verschiedene Zielproteine phosphoryliert. Eine vierte Klasse bildet die G_{12/13}-Proteinfamilie, die eine Aktivierung von Rho-GTPasen nach sich zieht [84].

Die in dieser Arbeit untersuchten BAs und ihre in *Drosophila* exprimierten Rezeptoren sind in Tab. 5 aufgeführt.

1.2 Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Vor mehr als 100 Jahren im Jahr 1909 brach Thomas Hunt Morgan seine ursprüngliche Forschung über Meerestiere ab und wandte sich der Arbeit mit *Drosophila melanogaster* zu [87]. Er hoffte auf einen Modellorganismus, der einfacher und günstiger zu züchten ist, sich schnell entwickelt und eine große Zahl an Nachkommen hervorbringt, da er seine Forschung auf Entwicklungsprozesse ausdehnen wollte. Tatsächlich fand er in *Drosophila* ein solches Modell, mit dessen Hilfe er 1915 sein Buch „Mechanism of Mendelian Heredity“ vollenden konnte. Für seine Arbeit an der Rolle der Chromosomen für die Vererbung bekam er 1933 schließlich den Nobel Preis [87]. Seit Morgans Entdeckungen wurde die Taufliege eingehend studiert und durch sie wichtige, mit weiteren Nobel Preisen gewürdigte Erkenntnisse zur Genetik gewonnen bis schließlich im Jahr 2000 durch die Arbeit des Berkeley *Drosophila* Genom Projektes die Sequenzierung ihres vollständigen Genoms abgeschlossen werden konnte [88], [89]. Als dann wenig später auch die Sequenzierung des menschlichen Genoms vollendet wurde, führten Vergleiche der beiden Genome zu der Erkenntnis, dass immerhin ca. 75 % aller bis dahin bekannten (und in der entsprechenden Analyse eingeschlossenen) Krankheitsgene im Menschen verwandte Gene in der Fliege besitzen [90].

Dabei stellen den größten Anteil Gene, die mit neurologischen bzw. neurodegenerativen Krankheiten verknüpft sind. Dies ist insofern verständlich, als gerade Prozesse die Neurogenese betreffend stark konserviert sind, obgleich die gemeinsamen Wurzeln von *Drosophila* und Mensch über 700 Millionen Jahre zurückliegen [91] [92]. Auch Krankheitsgene, die mit metabolischen Prozessen, allgemeinen Zellfunktionen und endokrinen Systemen verknüpft sind, haben besonders viele verwandte Gene in *Drosophila* [6]. Insgesamt liegt die Identität des menschlichen Genoms und des Fliegen-genoms auf Nukleotidlevel bei durchschnittlich 40 %. In konservierten Genen kann sie aber auch zwischen ca. 80 bis 90 % liegen. Daher hat sich die Taufliege inzwischen für die Erforschung grundlegender molekularer Mechanismen und vieler Krankheiten als Modellorganismus als äußerst nützlich erwiesen [93].

Neben den häufig genannten offensichtlichen Vorteilen wie denen eines kurzen Entwicklungszyklus von ca. zehn Tagen bei 25 °C, einer hohen Reproduktionsrate und geringen Haltungskosten besitzt *Drosophila* eine riesige Bandbreite an phänotypischen Mutationsmarkern, die die wissenschaftliche Arbeit mit der Vielzahl an darüber hinaus verfügbaren gene-

tischen Werkzeugen erleichtert. Weitere Vorteile sind die überschaubare Anzahl an Chromosomen (es sind vier) und die Tatsache, dass in Männchen keine intrachromosomale Rekombination („*crossing over*“) stattfindet. Letzteres erleichtert die Vorhersage des Genotyps der Nachkommen einer Kreuzung beträchtlich [94]. Im Laufe der Jahre wurden viele genetische Werkzeuge wie z. B. das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem (siehe hierzu 1.2.2) für die wissenschaftliche Arbeit mit der Taufliege entwickelt. Diese ermöglichen eine gezielte genetische Manipulation der Genexpression in spezifischen Geweben oder in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Fliege. Gene können so gezielt überexprimiert, runterreguliert oder ganz ausgeschaltet werden. Diese Bandbreite an genetischen Werkzeugen macht die Arbeit mit *Drosophila* sehr attraktiv.

1.2.1 Balancer

Ein sehr häufig verwendetes genetisches Hilfsmittel bei der Kontrolle genetischer Manipulationen sind die sogenannten Balancerchromosomen, die mehrere Inversionen beinhalten, was die intrachromosomale Rekombination zwischen homologen Chromosomen verhindert [88]. Auf die Art kann sichergestellt werden, dass eine neu eingebrachte Mutation auf dem Chromosom verbleibt und nicht verloren geht. Balancer tragen außerdem entweder ein letales, rezessives Allel oder eines, das die Fruchtbarkeit beeinträchtigt. Dadurch gibt es in der F1-Generation entweder gar keine für den Balancer homozygoten Nachkommen oder diese können sich nicht weiter reproduzieren. In ersterem Fall existieren demnach nur Nachkommen, die homozygot oder heterozygot für das mutierte Gen sind. Die heterozygoten Nachkommen sind anhand eines phänotypisch dominanten Markers, der ebenfalls auf dem Balancerchromosom liegt, zu erkennen. Es existieren Balancer für die ersten drei der vier Chromosomen und Doppelbalancer verschiedener Kombinationen [95].

Balancer für das vierte Chromosom existieren nicht. Dieses ist in *Drosophila* sehr klein und besteht überwiegend aus Heterochromatin [94]. Bislang sind nur sechs Gene auf diesem Chromosom gefunden worden, die alle mit der männlichen Fruchtbarkeit in Verbindung stehen [96]. Der Einsatz von Balancern ermöglicht die Haltung von Stämmen mit einer letal rezessiven Mutation.

1.2.2 Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem

Ein mächtiges genetisches Werkzeug zur Kontrolle der Genexpression ist das von Brand und Perrimon 1993 vorgestellte GAL4/UAS-Expressionssystem [97], [98], [99]. Dieses binäre System ermöglicht eine gewebs- und entwicklungsspezifische Expression eines Zielgens (Abb. 3). GAL4 stammt ursprünglich aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und ist ein potenter Transkriptionsaktivator, welcher in der Hefe spezifisch an eine Promotorregion bindet, die sogenannte *upstream activation sequence* (UAS). In *Drosophila* hat GAL4 kein endogenes Ziel, da keine UAS-Bindestelle im Genom der Fliege vorliegt. Erst wenn neben GAL4 auch ein UAS-Element im Genom integriert wird, kann GAL4 binden und das darauf folgende Gen wird exprimiert. Um in *Drosophila* die Aktivierung eines bestimmten Gens kontrollieren zu können, müssen Transkriptionsaktivator und Zielgen zunächst voneinander fern-

gehalten werden. Dies wird dadurch erreicht, dass es Fliegenstämme gibt, die eine UAS-Sequenz vor dem zu untersuchenden, zunächst stillgelegten Gen tragen (Effektorstämme) und Stämme, in denen in Verbindung mit einem gewebsspezifischen Gen *GAL4* exprimiert wird, welches dort aber kein Ziel findet (Treiberstämme). Werden diese beiden Stämme dann miteinander verpaart (gekreuzt), wird in den Nachkommen gewebes- oder entwicklungspezifisch *GAL4* synthetisiert, welches an die ebenfalls vorhandene UAS bindet und so zur Expression des Zielgens führt [97].

Durch die Bereitstellung dieses Systems steht der *Drosophila*-Gemeinschaft inzwischen ein riesiges Repertoire an Effektor- und Treiberstämmen zur Verfügung, die im Baukastensystem fast beliebig kombiniert werden können. Häufig werden auch zusätzlich Reporterstämme verwendet, bei denen das Zielgen beispielsweise an GFP gekoppelt ist. Dies vereinfacht visuelle, mikroskopische Untersuchungen [100].

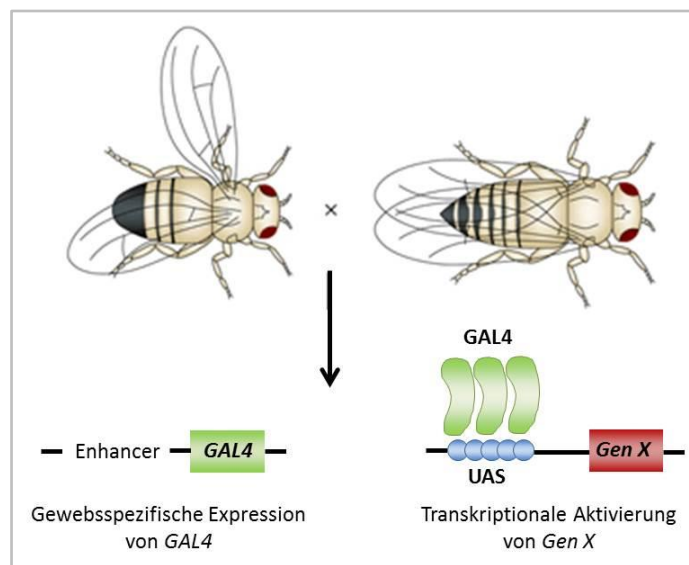


Abb. 3: Das GAL4/UAS-Expressionssystem nach Brand und Perrimon (nach [92]). Während hier das Männchen *GAL4* unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors exprimiert, stellt das Weibchen eine dem stillgelegten Zielgen vorangestellte UAS-Sequenz zur Verfügung. In der Folgegeneration wird sowohl *GAL4* gewebsspezifisch synthetisiert als auch die für die Bindung von *GAL4* notwendige UAS-Sequenz, gekoppelt an das Zielgen, exprimiert, wodurch dieses schließlich abgelesen wird.

1.2.3 Das RNAi-Expressionssystem

Eine Modifikation des *GAL4/UAS*-Systems ist dessen Kombination mit der sogenannten *RNA-interference* (RNAi). Als 1998 Fire und Kollegen herausfanden, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) genutzt werden kann, um gezielt einzelne Gene *in vivo* herunterzuregulieren („Knock-down“, KD) [101], fiel der Startschuss für die Etablierung eines weiteren vielversprechenden genetischen Werkzeugs. Daraufhin wurde eine ganze Reihe an *in vitro* und *in vivo* Methoden rund um RNAi für verschiedene Organismen entwickelt [102].

Vier verschiedene RNAi-Varianten werden *in vivo* verwendet. Zur Herstellung transgener *Drosophila*-Stämme kommt heutzutage jedoch hauptsächlich die so genannte „*small hairpin*“ RNA (shRNA) zum Einsatz, die über Vektoren stabil in das Genom der Fliege integriert wer-

den kann. Um eine gewebs- und/oder entwicklungsspezifische Kontrolle über die Expression der shRNA zu haben, steht diese unter der transkriptionellen Kontrolle eines UAS-Elementes. Diese UAS-Linie kann dann, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, mit einer GAL4-Treiberlinie gekreuzt und so in der nächsten Generation der Knock-down aktiviert werden. Für die meisten *Drosophila*-Gene existieren bereits ein bis mehrere shRNA-Stämme, sodass im Vorfeld eines Experiments i. d. R. keine transgenen Linien mehr aufwendig hergestellt werden müssen [102], [103].

Ein solches Projekt zur Herstellung vieler dieser Linien ist das „*Transgenic RNAi Project*“ (TRiP), welches 2008 an der Universität Harvard begonnen wurde und seitdem über 12.000 RNAi-Fliegenlinien hervorgebracht hat, die öffentlich zugänglich sind [104].

Um ein bei den ersten transgenen RNAi-Stämmen aufgetretenes Problem der Expressionsvariabilität zu umgehen, wurden spezielle Vektoren zur Integration in das Genom entwickelt, die mit Hilfe der aus dem Phagen Φ C31 gewonnenen Integrase an ganz speziellen Stellen im Genom platziert werden können. Bis dahin erfolgte die Integration zufällig, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse stark erschwerte [105].

Diese sogenannten VALIUM Vektoren (Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS) wurden bis heute weiterentwickelt. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten RNAi-Linien wurden mit den Vektoren VALIUM10 und VALIUM20 hergestellt, die sich hauptsächlich darin unterscheiden, dass VALIUM20 im Gegensatz zu VALIUM10 durch die Integration von shRNA zu einem etwas stärkeren Knock-down im Soma führt und auch einen starken Knock-down in der weiblichen Keimbahn erzeugt [103].

Bei der Arbeit mit RNAi-Linien kann es zu unspezifischen *Off-Target*-Effekten kommen, die allerdings weitaus häufiger bei *in vitro*-Methoden beobachtet werden als bei *in vivo*-Methoden. Trotzdem empfiehlt es sich zur Vermeidung solcher Effekte immer mit zwei unabhängigen RNAi-Linien zu arbeiten [102].

1.3 Das Immunsystem von *Drosophila melanogaster*

Um Infektionen abwehren zu können, besitzt *Drosophila* eine Reihe von Verteidigungsmechanismen in Form physikalischer Barrieren sowie humoraler und zellulärer Komponenten, von denen einige hoch konserviert sind. Dies hat die Fliege zu einem interessanten Modellorganismus für die Erforschung von Teilen der angeborenen Immunantwort werden lassen [106], [107], [108].

Die Taufliege ist in ihrer natürlichen Umgebung einem hohen Maß an Mikroorganismen ausgesetzt, die sich vor allem in dem von ihr als Nahrungsquelle präferierten, verrottenden Obst befinden und die in erster Linie über den Darm oder die Tracheen in die Fliege gelangen können [109]. Sie benötigt daher physikalische Barrieren, die in erster Linie vom Epithel gebildet werden. Wird dieses verwundet, existieren Mechanismen, die die Wunde verschließen und eindringende Pathogene physikalisch einfangen oder durch zytotoxische Zwischenprodukte des sogenannten Melanisierungsprozesses bekämpft werden. Spezialisierte Immunzellen, die Hämocyten, können Eindringlinge phagozytieren oder verkapseln, wenn diese zu groß sind. Darüber hinaus aktivieren sie eine systemische Immunantwort, bei der antimikrobielle Peptide (AMP) vom Fettkörper sezerniert und in die Hämolymphe entlassen werden.

(AMPs spielen auch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der kommensalen Bakterien im Darm.) Viren werden von *Drosophila* mit Hilfe von RNAi bekämpft [108].

1.3.1 Die systemische Immunantwort

AMPs sind ein wesentlicher Teil der systemischen humoralen Immunantwort in Insekten. Sie werden größtenteils von Fettkörperzellen sowohl konstitutiv als auch im Falle einer Infektion sezerniert. Der Fettkörper besteht aus einer einlagigen Zellschicht, die sich durch das ganze Tier hindurchzieht und häufig als funktionell analog zur Leber in Säugetieren beschrieben wird [110], [111].

Neben Fettkörperzellen können AMPs auch von Epithelzellen und Hämozyten synthetisiert werden. Während Epithelzellen alle AMP-Gene konstitutiv exprimieren können, ist ihre Induktion nach Infektion jedoch streng gewebspezifisch geregelt und auch vom Entwicklungsstadium abhängig [112] [113].

AMPs sind membranaktive Proteine, die bakterielle oder fungale Zellwand beeinträchtigen und die Mikroorganismen so unschädlich machen [107]. Im Menschen sind drei Klassen (Defensine, Cathelicidine und Histatine) bekannt, in *Drosophila* werden acht unterschieden (Attacine, Cecropine, Defensin, Diptericin, Drosocine, Drosomycin, MPAC und Metchnikowin) mit bislang insgesamt 20 identifizierten Mitgliedern. AMPs können weiter nach der Gruppe der Mikroorganismen unterteilt werden, auf die sie abzielen. Während Defensine gegen gram-positive Bakterien gerichtet sind, zielt die Wirkung von Attacinen, Cecropinen, Drosocinen, Diptericin und MPAC auf gram-negative Bakterien ab. Pilze werden durch Diptericin und Metchnikowin unschädlich gemacht [114].

Die humorale Expression von AMPs wird durch die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren Dorsal, Dorsal-related immunity factor (Dif) und Relish aktiviert [115]. Deren Dimerisierung und Translokation in den Zellkern steht wiederum am Ende zweier Signalwege, dem zum Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Signalweg homologen *immune deficiency* (Imd)-Signalweg [116] und dem zum TLR/Il-1R-Signalweg homologen Toll-Signalweg [117]. Je nach Art des Pathogens wird entweder der eine oder andere Signalweg aktiviert (Abb. 4). Hierbei spielt die Pathogenerkennung eine wichtige Rolle. Während in Säugetieren dabei die Lipopolysaccharide (LPS) als Bestandteil der gram-negativen Bakterienzellwand ein starker Immunaktivator sind, konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass LPS keine stimulierende Wirkung hat [118], [119]. Stattdessen erkennt das Immunsystem der Fliege Peptidoglykan (PGN) als universellen Bestandteil von Bakterienzellwänden, welches ein Polymer aus β -1,4-verknüpftem N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure ist. Die Verknüpfung erfolgt über ein kurzes Oligopeptid, welches im Fall gram-negativer und einiger gram-positiver Bakterien wie *Bacillus*-Arten *meso*-Diaminopimelinsäure (DAP) an der dritten Position trägt. Gram-positive Bakterien haben an dieser Position i.d.R. die Aminosäure Lysin (Lys) eingebaut. Bei diesen verschiedenen PGN-Arten handelt es sich um sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), die von speziellen mustererkennenden Rezeptoren (PRR, engl.: *pattern recognition receptor*) spezifisch erkannt werden und so die oben beschriebenen Signalkaskaden auslösen [118],[120].

1.3.1.1 Der Toll-Signalweg

Spätestens seit der Entdeckung des Toll-Rezeptors sowie seiner Bedeutung für die angeborene Immunantwort in *Drosophila* und der darauf folgenden Entdeckung der ersten Toll-like Rezeptoren (TLR, engl.: *Toll-like receptor*) in Säugetieren war die Fliege für die Erforschung der angeborenen Immunantwort als Modelorganismus etabliert [121]. Tatsächlich verlaufen der Toll-Signalweg und der TLR/IL-1R-Signalweg hoch konserviert. Jedes Protein des *Drosophila*-Signalweges abwärts des Toll-Rezeptors hat ein Säugetier-Ortholog. In den TLR-Signalwegen gibt es darüber hinaus noch einige zusätzliche Faktoren [122].

Im Gegensatz zu den TLRs funktioniert der membranständige Toll-Rezeptor nicht als PRR [115]. Anstatt PAMPs von gram-positiven Bakterien sowie von Hefen und Pilzen direkt zu erkennen, wird er durch die proteolytisch aktivierte Form seines Liganden Spätzle aktiviert [123]. Sezernierte lösliche PRRs erkennen PAMPs von Eindringlingen und initiieren proteolytische Kaskaden, die in einer Aktivierung von Spätzle münden [122]. Im Fall einer Invasion von Pilzen oder Hefen werden β -1,3-Glucane der Zellwand von GGBP3 (*glucan-binding protein 3*) als PAMP erkannt [124]. Die Erkennung von Lys-PGN aus gram-positiven Bakterien benötigt entweder den PGN Erkennungsrezeptor PGRP-SD oder PGRP-SA, welcher mit GGBP1 einen Komplex bildet [125],[126]. In beiden Fällen wird die Serinprotease ModSP (*modular serine protease*) aktiviert. Am Ende der dadurch in Gang gesetzten Kaskade wird die Vorstufe von Spätzle (Pro-Spätzle) proteolytisch gespalten und Spätzle aktiviert. Erst dann kann es an den Toll-Rezeptor binden [127], [123].

Nach mehreren intrazellulären Reaktionen werden am Ende des Toll-Signalweges die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren Dorsal und/oder Dif aktiviert, die daraufhin in den Zellkern wandern und dort durch Bindung an spezifische Promotorsequenzen unter anderem die Expression bestimmter AMP-Gene wie *Drosomycin* und *Metchnikowin* herbeiführen [115]. Je nach Entwicklungsstadium der Fliege handelt es sich bei dem aktivierten Transkriptionsfaktor entweder um Dorsal oder Dif. Während der Embryonalentwicklung ist der Toll-Signalweg an der Entstehung der dorsoventralen Achse beteiligt, wofür der Signalweg noch vor der Entdeckung seiner Beteiligung an der Immunantwort bekannt war [128], [121]. Die damit einhergehenden Prozesse werden vom Transkriptionsfaktor Dorsal gesteuert. Für die immunassoziierte Genregulation nach Toll-Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor Dif alternativ aktiviert. In der Larve funktionieren beide Transkriptionsfaktoren redundant, in der adulten Fliege ist nur noch Dif für die Regulation der AMP-Expression von Bedeutung [115]. Ein Problem, welches die Erkennung von PAMPs mit sich bringt, ist die Unfähigkeit, zwischen kommensalen und eingedrungenen fremden Bakterien zu unterscheiden. Daher werden zusätzlich sogenannte „*Danger Signals*“ verarbeitet. Ein solches Signal sind z. B. spezielle, von Bakterien und Pilzen sezernierte Proteasen, die Zellverbindungen lockern und die Zellen so für Pathogene zugänglicher machen [122].

Diese Proteasen interagieren in *Drosophila* unter anderem mit der Serinprotease Persephone, die so aktiviert wird und ihrerseits direkt zur Aktivierung von Spätzle führt [129].

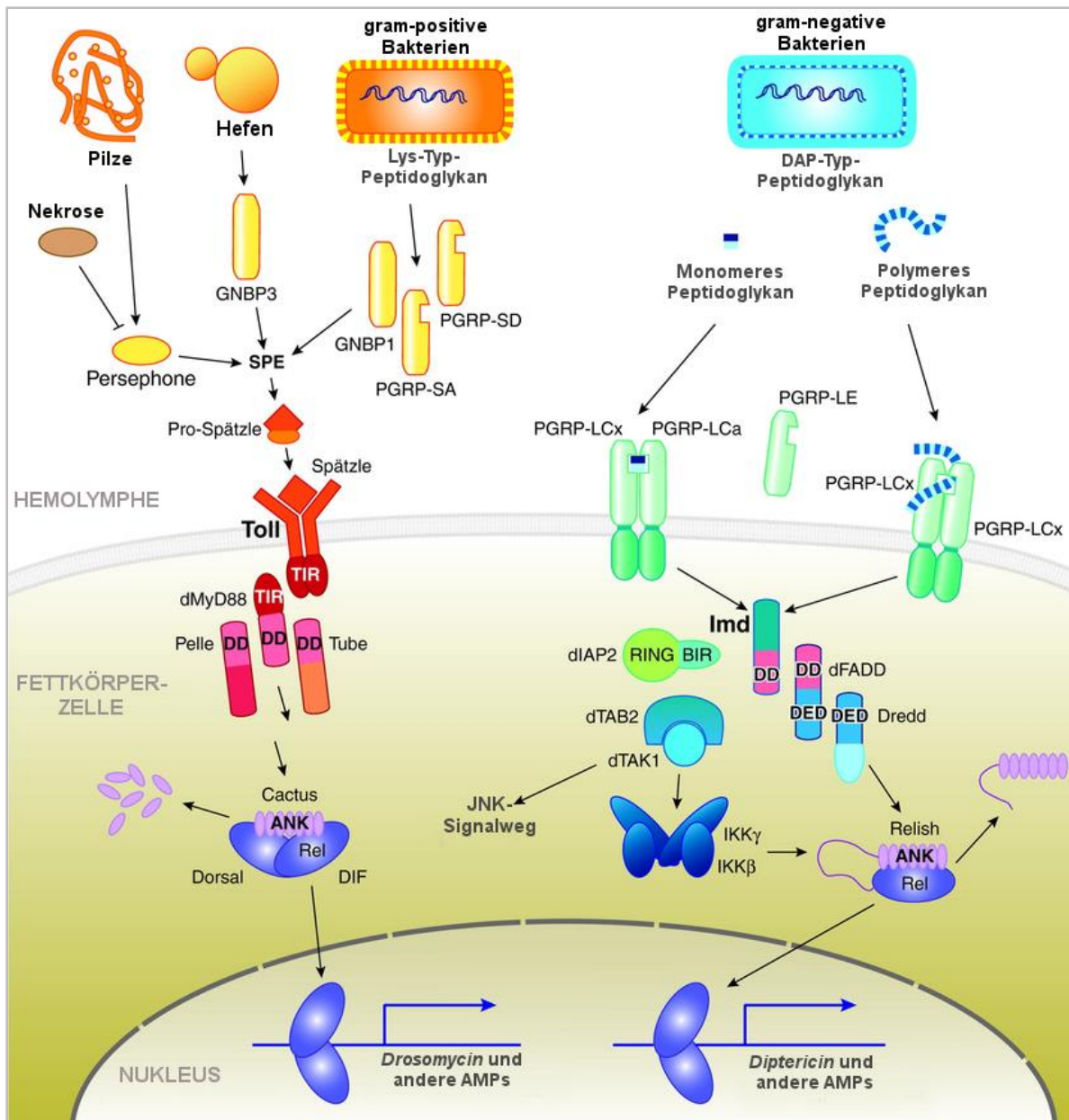


Abb. 4: NF- κ B-Signalwege in der humoralen Immunantwort von *Drosophila*. Je nach Art des eindringenden Mikroorganismus wird einer von zwei Signalwegen ausgelöst. Gram-positive Bakterien sowie Hefen und Pilze aktivieren, sobald sie erkannt werden, den Toll-Signalweg, an dessen Ende die Transkriptionsfaktoren Dif und/oder Dorsal dimerisieren, in den Kern translozieren und dort die Expression spezieller antimikrobieller Peptidgene (z. B. *drosomycin*) induzieren. Werden gram-negative Bakterien erkannt, wird der Imd-Signalweg aktiviert, in dessen Verlauf der Transkriptionsfaktor Relish dimerisiert und im Zellkern schließlich die Expression anderer AMP-Gene (z. B. *diptericin*) reguliert (nach [107]).

1.3.1.2 Der Imd-Signalweg

Werden DAP-PGN tragende Bakterien außerhalb oder im Inneren der Zelle von speziellen PGRPs (*peptidoglycan recognition proteins*) erkannt, so wird die Signalkaskade des Imd-Signalweges aktiviert, die in der Dimerisierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors Relish und dessen Translokation in den Zellkern mündet [120]. In *Drosophila* gibt es 13 Gene für 19 PGRPs, deren Funktion aber nicht in jedem Fall geklärt ist. Einige besitzen Amidaseaktivität und prozessieren und inaktivieren PGN hauptsächlich (z. B. PGRB-LB, -SB1, -SB2). Andere

dienen als PGN-Sensoren und aktivieren oder modulieren strukturabhängig den Toll- bzw. Imd-Signalweg (z. B. PGRP-LC, PGRP-SA) [119]. Wesentlich an der Erkennung von DAP-PGN und der damit verbundenen Aktivierung des Imd-Signalweges sind PGRP-LC und PGRP-LE [130]. PGRP-LC ist ein Transmembranrezeptor, von dem drei Isoformen (PGRP-LCa, -x, -y) bekannt sind [131] und der durch Dimerisierung der verschiedenen Isoformen unterschiedliche PGN Bestandteile binden kann (s. Abb. 4) [118].

Die Funktion von PGRP-LCy ist noch weitgehend unbekannt [132]. PGRP-LCx bindet polymeres DAP-PGN und dessen monomeres Fragment, das sogenannte „*tracheal cytotoxin*“ (TCT). Bindet polymeres PGN, so dimerisiert der Rezeptor mit einer weiteren PGRP-LCx-Einheit. Diese Dimerisierung löst schließlich die intrazelluläre Signalkaskade des Imd-Signalweges aus. Bindet monomeres PGN an den PGRP-LCx-Rezeptor, so bildet dieser ein Heterodimer mit PGRP-LCa, ein weiterer Rezeptor, der ausschließlich mit dem PGRP-LCx-PGN-Komplex interagieren kann [118], [133], [134]. Darüber hinaus ist PGRP-LE für die Erkennung von DAP-PGN wesentlich. Dieser Rezeptor besitzt im Gegensatz zu PGRP-LC keine Transmembrandomäne. Seine lange Isoform ist im Cytosol lokalisiert, während seine kurze Isoform sezerniert wird. Im Cytosol bindet PGRP-LE ebenfalls TCT von eingedrungenen intrazellulären Bakterien und induziert Autophagie, wodurch die Bakterien unschädlich gemacht werden [135].

Außerhalb der Zelle fängt PGRP-LE vermutlich monomeres PGN ein, um es dann dem PGRP-LCx-Rezeptor zu präsentieren. Wie genau PGRP-LC im Folgenden zur Aktivierung des Signalweges beiträgt, ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Die vermutete direkte Bindung des Proteins Imd an die cytosolische Domäne von PGRP-LC scheint eine Möglichkeit, aber nicht zwingend notwendig für die Aktivierung des Signalweges zu sein [130].

Auch die cytosolische Form von PGRP-LE kann an Imd binden und so die Kaskade in Gang setzen, die zur Dimerisierung und Translokation des Transkriptionsfaktors Relish in den Zellkern führt. Ein typisches Zielgen von Relish ist das AMP *diptericin*.

Die Aktivierung des Toll- und Imd-Signalweges erfolgt oft nicht strikt getrennt [108]. So können einige gram-negative Bakterien (z. B. *E. coli*) neben dem Imd-Signalweg zusätzlich den Toll-Signalweg aktivieren. Ein eindeutiger Hinweis auf die Interaktion beider Signalwege ist die Tatsache, dass es Zielgene gibt, die sowohl Bindungsstellen für Relish als auch Dif/Dorsal besitzen [136]. Ein Beispiel hierfür ist *drosomycin*, von dem bekannt ist, dass die Dimerisierung von Relish und Dif in infizierten S2-Zellen seine Expression stark steigert [137]. Wie genau diese Co-Regulation funktioniert, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt [122].

1.3.2 Die zelluläre Immunantwort

Drosophila besitzt kein vaskuläres System. Ab dem ersten Larvenstadium hält das Herz (Dorsalgefäß), ein rudimentärer, schlauchförmiger Muskel, die Hämolymphe in Bewegung, die so alle Gewebe im Inneren der Fliege umspült. In der Hämolymphe befinden sich neben Nährstoffen und anderen löslichen Faktoren auch die Hämozyten, die die zelluläre Immunantwort vermitteln [138]. Es werden drei Hauptzelltypen unterschieden (Abb. 5): Die Plasmatozyten, Kristallzellen und Lamellozyten, die in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Fliege unterschiedlich präsent sind [139]. In Larven existieren zu etwa 5 % die sogenannten Kristallzellen, die ihren Namen aufgrund der mikroskopisch erkennbaren kristallartigen Ein-

schlüsse tragen. Diese enthalten Prophenoloxidase, die inaktive Form der Phenoloxidase, die einen wichtigen Schritt im Melanisierungprozess katalysiert [140], [139]. Bei Aktivierung durch den JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*)-Signalweg brechen Kristallzellen auf [141] und entlassen so Prophenoloxidase in die Hämolymphe, wodurch die Melanisierungskaskade zur Abwehr von Bakterien und Parasiten sowie zum Wundverschluss aktiviert wird. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Tyrosin zu Chinonen, die schließlich zu Melanin polymerisieren [142]. Obwohl die Kristallzellvorläufer bereits im Embryo existieren, wurde dort für sie bisher keine Funktion beschrieben. Vermutlich werden sie erst in der Larve aktiv [139]. Bis vor kurzem bestand die Meinung, Kristallzellen würden in adulten Fliegen nicht existieren. Tatsächlich gibt es aber inzwischen Hinweise darauf, dass sie auch in diesem Entwicklungsstadium vorkommen [143].

Eine weitere Zellpopulation, die Lamellozyten sind in gesunden Larven nur in sehr geringer Zahl auszumachen [72]. Ihre Zahl steigt jedoch stark an, wenn z. B. Eier parasitärer Wespen im Hämocoel abgelegt werden. Lamellozyten sind an der Verkapselung eben solcher, größerer Fremdkörper maßgeblich beteiligt und differenzieren aus Plasmatozyten, sobald das zelluläre Immunsystem aktiviert wird [142]. In adulten Fliegen wurden Lamellozyten bisher nicht gefunden [144]. Kristallzellen und Lamellozyten sind Invertebraten-spezifische Zelltypen, die keine funktionellen Analoge in Vertebraten besitzen [145].

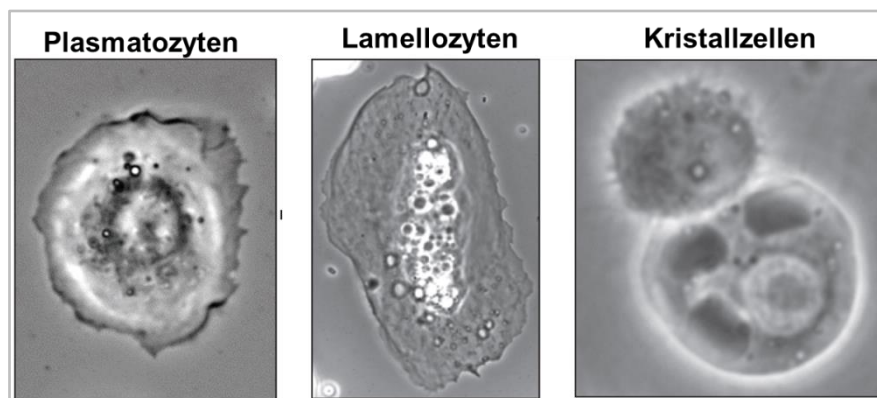


Abb. 5: Hämocytenzelltypen in *D. melanogaster*. Plasmatozyten stellen mit ca. 95 % die größte Hämocytenpopulation dar. Sie sind vor allem zur Phagozytose und Produktion von AMPs befähigt. Lamellozyten dienen der Verkapselung größerer Fremdkörper und sind in gesunden Larven kaum anzutreffen. Kristallzellen stellen etwa 5 % der Hämocyten und haben in den optisch gut erkennbaren, namensgebenden kristallinen Strukturen Prophenoloxidase eingeschlossen. Dieses Enzym ist maßgeblich an der Melanisierungskaskade beteiligt [146].

Die Plasmatozyten stellen mit etwa 95 % den am häufigsten vertretenen Hämocyten-Zelltyp dar [146]. Sie sind vergleichbar mit der Granulozyten/Makrophagen-Zelllinie in Vertebraten [145]. Obgleich Plasmatozyten zur Sekretion von AMPs wie Cecropin A1, Drosomycin und Diptericin befähigt sind, besteht ihre Kernkompetenz in der Phagozytose [145]. Im Embryo besteht ihre Hauptaufgabe in der Phagozytose von Zellresten, die während der Embryogenese durch apoptotische Prozesse entstehen. Später im Larvenstadium wird ihre Beteiligung an der zellulären Immunantwort vermehrt benötigt, da die Larven direkt mit Mikroorganismen in Kontakt stehen [139]. Die Eigenschaften der Hämocyten passen sich demnach den Anfor-

derungen des jeweiligen Entwicklungsstadiums an, was darauf hinweist, dass sie empfänglich für Entwicklungsmodulatoren wie das systemisch wirkende Hormon 20E sind [147], [148].

Hämozyten im Embryonalstadium sind aktiv beweglich und migrieren nach einem festgelegten Muster durch den Organismus [148]. Sobald im späten Embryonalstadium das Herz zu schlagen beginnt und die Hämolymphe in Bewegung gesetzt wird, verlieren sie die Fähigkeit zur aktiven Migration und patrouillieren passiv in der Hämolymphe [149]. Kommt es zur Verwundung der Larve, werden sie aus der Hämolymphe von der Wundstelle direkt „eingefangen“ [150]. Dort verteilen sie sich und sondern Hemoclectin ab, ein Homolog zum an der Gerinnung beteiligten von-Willebrand-Faktor im Menschen [151]. Außerdem phagozytieren sie eindringende Bakterien und beschädigte Zellen [145]. Im Puppenstadium gewinnen sie ihre Fähigkeit zur aktiven Migration schließlich zurück [149].

Plasmatozyten sind in der Larve in drei Bereichen zu finden. Ein Teil der embryonalen Plasmatozyten geht im Larvenstadium in die Hämolymphe über. Ein Großteil der Zellen sitzt stattdessen fest („sessil“), angeordnet in den einzelnen Segmenten in sogenannten hämatopoetischen Taschen an der Innenseite der Epidermis. Sie werden im Fall einer Verwundung nicht rekrutiert und verbleiben in ihren Kompartimenten [150], in denen sie im Gegensatz zu den zirkulierenden Hämozyten proliferieren. In den hämatopoetischen Taschen sind die Hämozyten um Oenozyten herum lokalisiert, ein Hepatozyten-ähnlicher Zelltyp, der allerdings nicht entscheidend für die Lokalisation der Hämozyten zu sein scheint. Vielmehr werden Hämozyten von lateralen und dorsalen Neuronenclustern des peripheren Nervensystems angezogen, die die hämatopoetischen Taschen innervieren [152], [153]. Ein weiterer Teil der embryonalen Hämozyten, differenziert zunächst nicht aus und bildet in der Larve die Lymphdrüsenlappen [152]. Nur bei einer massiven Provokation des Immunsystems wandeln sie sich zu „reifen“ Plasmatozyten um, die dann in Zirkulation gehen und dort unterstützend eingreifen [154]. Andernfalls werden diese Hämozyten erst beim Übergang ins Puppenstadium aktiv [152]. Lange Zeit nahm man an, dass Plasmatozyten nur bis zum Larvenstadium noch proliferieren können [139]. Inzwischen ist diese Annahme widerlegt, da Ghosh und Kollegen zeigen konnten, dass die adulte Fliege hämatopoetische Knoten besitzt, die nach der Infektion der Fliege aktiviert werden und aus Vorläuferzellen neu ausdifferenzierte Hämozyten in die Hämolymphe entlassen [143].

Die Kernkompetenz der Plasmatozyten ist die Phagozytose, ein Prozess bei dem Partikel wie Mikroorganismen oder körpereigene, abgestorbene Zellen von Plasmatozyten erkannt, internalisiert und unschädlich gemacht werden (Abb. 6) [155]. Während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* werden in erster Linie apoptotische Zellen durch Phagozytose entfernt, die mit Hilfe des *Scavenger*-Rezeptors Croquemort, sowie der *EGF-like-repeat*-enthaltenden Rezeptoren Draper und NimC4/Simu erkannt werden [155], [142]. Spätestens mit Eintritt ins Larvenstadium, kommt es zur Konfrontation mit pathogenen Mikroorganismen, die entweder von spezifischen PRRs auf Phagozyten erkannt bzw. gebunden werden oder durch Opsonine für die Phagozytose markiert werden. In beiden Fällen werden die Mikroorganismen durch Phagozytose unschädlich gemacht. Insgesamt werden in *Drosophila* vier Klassen von PRRs unterschieden: die Komplement-ähnlichen Opsonine, *Scavenger*-Rezeptoren, *EGF-like-repeat*-enthaltende Rezeptoren und die *Down syndrom cell adhesion molecules* (Dscam). Zu den Komplement-ähnlichen Opsoninen gehören die Thioester-enthaltenden Proteine (TEPs) TEPII, TEPIII und TEPVI, deren Sekretion durch eindringende Bakterien stark hoch-

reguliert wird. Sie binden an verschiedene Bakterien und verstärken so deren Phagozytose. Die *Scavenger*-Rezeptoren Peste und SR-CI sind mustererkennende Rezeptoren, die ebenfalls eine Vielzahl an Pathogenen sowie eigene Liganden erkennen können. Zur Klasse der *EGF-like-repeat*-enthaltenden Rezeptoren gehören Eater, NimC1 und Draper. [155] Von NimC1 ist neben seiner Beteiligung an der Phagozytose auch bekannt, dass es eine Rolle als Adhäsionsmolekül spielen könnte [156].

Das Molekül Dscam, welches zur Immunglobulin-Superfamilie gehört, besitzt eine immense Diversität, ähnlich der von Immunglobulinen in Vertebraten. Es wird geschätzt, dass Fettkörper und Hämocyten in *Drosophila* ca. 18.000 verschiedenen extrazellulären Domänen exprimieren können [155], [157]. Dscam hat vermutlich sowohl PRR- als auch Opsoninfunktion und ist zusätzlich in sezernierter Form in der Hämolymphe zu finden. Darüber hinaus soll es eine Verbindung zum neuronalen System darstellen [155].

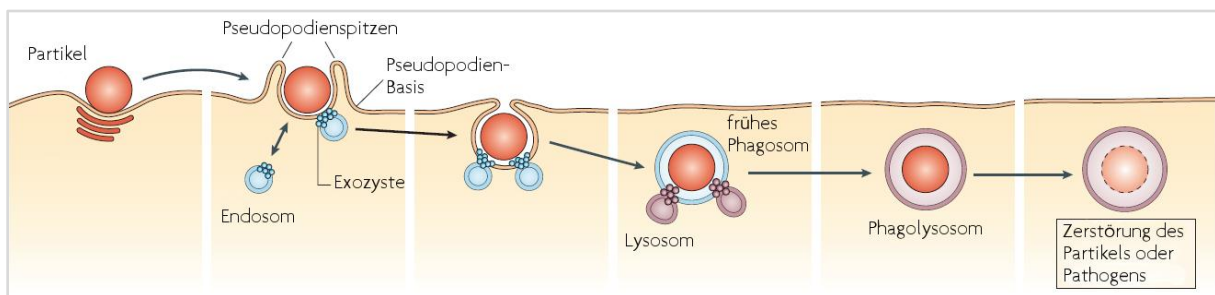


Abb. 6: Phagozytose eines Partikels von der Zelloberfläche in ein intrazelluläres Phagosom. Sobald ein Rezeptor gebunden wird, formt sich das Aktingerüst des Phagozyten um und umschließt den Partikel. Das so gebildete Phagosom durchläuft einen Reifeprozess, bei dem Endosomen und Lysosomen mit ihm verschmelzen. Das „Phagolysosom“ enthält eine saure, hydrolytische Umgebung, die Partikel oder Pathogene zerstört (nach [155]).

Hämocyten stellen außerdem eine wichtige Verbindung zur humoralen Immunantwort dar. Wird in ihnen z. B. im Rahmen einer Immunantwort die Produktion des Toll-Liganden Spätzle durch RNAi herunterreguliert, so kommt es nicht zur Induktion der AMP-Produktion im Fettkörper [158]. Aber auch der Imd-Signalweg scheint durch Depletion von Hämocyten im Fettkörper moduliert zu sein [159], [160]. Eine weitere Verknüpfung zwischen der zellulären und humoralen Immunantwort wurde mit der Charakterisierung des Gens *psidin* gefunden, welches für ein lysosomales Protein kodiert. Psidin wird von Hämocyten in der Larve exprimiert und dient dort der Degradation von Bakterien im Lysosom. Des Weiteren wird es in die Hämolymphe sezerniert und interagiert mit dem larvalen Fettkörper, wo es die *defensin*-Expression im Fettkörper induziert [161].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Stress spielt bei der Entstehung und Exazerbation chronischer Atemwegserkrankungen wie z. B. dem *Asthma bronchiale* eine wichtige Rolle. So weiß man seit langem, dass sowohl Kälte als auch körperliche Anstrengung oder psychische Belastungen beim Menschen zu einer Verschlimmerung der Erkrankung beitragen. Im Rahmen dieser Stressantwort werden verschiedene biogene Amine freigesetzt (z. B. Norepinephrin), die auf zahlreiche Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wirken. Es besteht daher im Menschen ein zwingender Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und dem neuroendokrinen System. Aufgrund des engen Zusammenspiels von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Maus und Mensch sind *in vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von Stresshormonen wie biogenen Aminen auf Zellen des angeborenen Immunsystems so gut wie nicht möglich. Aus diesem Grund ist die Verwendung eines einfacheren Modellsystems wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* notwendig. Sie besitzt keine klassische adaptive Immunantwort, dafür aber eine angeborene, die eine auffallende Ähnlichkeit zu der des Menschen hat (z. B. Toll-Rezeptoren und NF- κ B-Signalwege sowie relevante Signalwege für biogene Amine). Des Weiteren nutzt die Fliege Catecholamin-Analoga (z. B. Dopamin), welche in Mensch und Fliege dieselben intrazellulären Signalwege induzieren. Dass biogene Amine die Immunantwort modulieren können, wurde außerdem kürzlich von Qi und Kollegen gezeigt. Ihre Arbeit belegt, dass Serotonin über bestimmte serotonerge Rezeptoren Einfluss auf die Phagozytoseeigenschaften von Hämozyten und somit den Immunstatus infizierter Fliegen hat. Dies weist auch auf eine Verbindung zwischen zellulärer Immunantwort und dem neuroendokrinen System in der Fliege hin.

Im Rahmen dieser Arbeit soll *D. melanogaster* als Modellorganismus zur Aufklärung möglicher modulierender Effekte der stressinduzierten BAs Octopamin, Tyramin, Dopamin und Serotonin auf die Immunantwort untersucht werden, wobei der Fokus hierbei ausschließlich auf der zellulären Immunantwort liegt. Diese wird in *Drosophila* von Hämozyten reguliert, von denen der Großteil, die sogenannten Plasmatozyten, Makrophagen-ähnliche Funktionen übernimmt wie z. B. die Phagozytose sowie die Synthese antimikrobieller Peptide.

Zu diesem Zweck wurden folgende Fragen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* adressiert:

1. Exprimieren Hämozyten (und Fettkörper) biogene Amin-Rezeptoren? Wenn ja, welche?
2. Modulieren biogene Amine in Hämozyten *in vitro* die Expression antimikrobieller Peptide (z. B. *diptericin*)?
3. Werden Phagozytoseaktivität und Morphologie von Primärhämozyten durch Modulation der an die BA-Aktivierung gekoppelten *Second Messenger*-Konzentration beeinflusst? Wenn ja, wird die *Second Messenger*-Konzentration in Hämozyten *in vitro* durch Inkubation mit biogenen Aminen moduliert?
4. Verändern biogene Amine die Phagozytoseaktivität bzw. Ausbreitungsverhalten von Hämozyten?
5. Modulieren biogene Amine die Immunabwehr adulter Fliegen? Wenn ja, wird die Modulation der Immunabwehr durch den zellulären Arm des Immunsystems vermittelt?

1 Einleitung

Um der ersten Frage nachzugehen, wurde mit aus L3-Larven isolierter RNA eine Sequenzierung sowie qualitative Real-Time-PCR durchgeführt. Zur Beantwortung der Fragen zwei bis vier mussten einige zellbasierte Assays etabliert werden. Zum einen wurde mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Assays und einer stabil-transfizierten Hämozyten-Zelllinie die Expression des AMP-Gens *dipterizin* nach BA-Stimulation bestimmt (2. Fragestellung). Die Fragen drei und vier erforderten einen Lumineszenz-basierten cAMP-Detektions-Assay sowie Zellfärbemethoden zur mikroskopischen Auswertung und eine durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Hämozyten.

Um Frage fünf beantworten zu können, wurden adulte Fliegen verschiedener biogener Amin-Rezeptor-Knock-Out- bzw. Rezeptor-Knock-Down-Linien mit dem gram-negativen Bakterium *Pectobacterium carotovorum* (*Ecc15*) infiziert und ihre Überlebensraten mit den entsprechenden Kontrollen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	Artikelnr.
(±)-Octopamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	O0250
1-Brom-3-chlorpropan (BCP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	B9673
20-Hydroxyecdysen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	H5142
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	I7018
Agar-Agar, Kobe I	Roth (Karlsruhe)	5210
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth (Karlsruhe)	2267.4
Bierhefe	Resena GmbH (Berlin)	
β-Mercaptoethanol		
BSA	PAA	
D(+)-Glukose	Roth (Karlsruhe)	HN06
Dabco		
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
DNA Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	
dNTP mix		
Dopamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	H8502
Erioglaucin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	10023110
Ethidiumbromid		
FBS nicht hitzeinaktiviert	PAA	
FBS nicht hitzeinaktiviert	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	
GeneRuler Ultra low range ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	SM1213
Geneticin (G418)	Applichem (Darmstadt)	A2167
GlutaMax	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	35050061
HBSS-Puffer	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	14025092
HEPES	Roth (Karlsruhe)	
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche (Basel, CH)	04707516001
Maismehl	Minderleinsmühle GmbH & Co. KG (Neukirchen)	
Methylparaben (Methyl-4-hydroxybenzoat)		
Oligo(dT)		
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)	
PGN <i>B. subtilis</i> (1 mg/mL in 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	69554
pHrodo <i>S. aureus</i> od. <i>E. coli</i> Biopartikel	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	A10010/P353 61

2 Material und Methoden

Propionsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
RNAprotect Cell Reagent	Qiagen (Hilden)	76526
Ro 20-1724	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	B8279
Schneider's <i>Drosophila</i> -Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	21720
Serotonin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	H9523
SuperScript [®] III Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	18080
TRI Reagent [®] Lösung	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	AM9738
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Tyramin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	T2879
Zuckerrohrmelasse	EMIKO (Meckenheim)	
Zuckerrübensirup	Grafschaft Krautfabrik (Meckenheim)	

2.1.2 Kits und Zubehör

Kit/Zubehör	Hersteller/Lieferant	Artikelnr.
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)	5067-1511
Bright-Glo [™] Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)	E2610
cAMP-Glo [™] Assay	Promega (Mannheim)	V1501
CellTiter Glo [®] Cell Viability Assay	Promega (Mannheim)	G7573
Glo Lysis Buffer	Promega (Mannheim)	E2661
NucleoSpin [®] RNA	Macherey-Nagel (Düren)	740955
QIAshredder	Qiagen (Hilden)	79654
QuantiLum [®] Recombinant Luciferase	Promega (Mannheim)	E1701
Qubit [®] RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	Q32855
RNase-free DNase Set	Qiagen (Hilden)	79254
RNeasy micro Kit	Qiagen (Hilden)	74004
RNeasy mini Kit	Qiagen (Hilden)	74104
Turbo DNA-free [®] Kit	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	AM1907

2.1.3 Antikörper und Farbstoffe

Antikörper/Farbstoff	Hersteller/Lieferant	Artikelnr.
Alexa Fluor 647 Phalloidin	New England Biolabs (Frankfurt am Main)	8940S
Anti- α -Tubulin FITC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	F2168
Calcein Blue AM Viability Dye	Affimetrix eBioscience (Frankfurt am Main)	65-0855-39
Dapi		

2.1.4 Besondere Materialien

Material	Hersteller/Lieferant	Artikelnr.
96 well Ultra-Low attachment plate	Corning Costar	3474
96 PCR Platte	Roche	
Dumont-Pinzette Nr. 5 Bio	Bioform (Nürnberg)	
Eiablagebehälter für <i>Drosophila</i>	Kisker (Steinfurt)	789092
Glaskapillaren 3,5“ Drummond (Innendurchmesser 15 µm, Spitzenlänge 5,5 mm)	BioMedical Instruments	
Lab-TekII Chamber Slide	Nunc	154534
MultiScreen-Mash Platte (40 µm)	Merck Millipore (Darmstadt)	MANMN4 010
Nunc 384-well, flat bottom plate with lid, white	Nunc	164610
Nunc 96-well, flat bottom plate with lid, white	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	P8616
Stainless steel beads 5 mm	Qiagen (Hilden)	69989

2.1.5 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bioanalyser	Agilent 2100 Expert	Agilent (Santa Clara, US)
Durchflusszytometer	LSRII	BD (Heidelberg)
Fluorometer	Qubit 2.0	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Laser-Scanning-Mikroskop	TCS SP5	Leica (Wetzlar)
Luminometer	GloMax-Multi Multiplate Reader	Promega (Mannheim)
Nanoinjektor	Nanoject II	Drummond (Broomall, US)
Nanophotometer	P330	Implen (München)
Real-Time PCR Instrument	Light-Cycler 480 II	Roche GmbH (Mannheim)
Thermocycler		Eppendorf (Hamburg)
Tissue Lyser LT		Qiagen (Hilden)
Zellsortiersystem	FACSAria™ I	BD (Heidelberg)

2.1.6 Programme

Name	Version	Hersteller
FACSDiva™ Software	6.1.3	BD Biosciences
FCS Express	5.0	DeNovo Software
LAS AF Lite	5.0	Leica
ImageJ2x	2.1.4.7	Wayne Rasband National Institutes of Health, USA
GraphPad Prism	5.0	GraphPad Software (San Diego, US)
Microsoft Office	2010	Microsoft

2.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Alexa Fluor 647 Phalloidin (200 U/mL; ~6,6 μ M)	Verpackungseinheit 300 Assays; 1,3 mL Methanol; 0,2 mL H ₂ O
Calcein Blue AM Färbelösung (10 mM)	1 mg Calcein Blue; 215 μ L DMSO
HEPES-Puffer (100 mM)	30 mL Aqua Braun; 0,715 g HEPES; pH = 7,4;
HBSS+-Puffer	40 mL HBSS-Puffer; 0,1907 g HEPES (20 mM); pH = 7,4; steril-filtriert
Geneticin (50 mg/mL)	20 mL HEPES-Puffer (100 mM); 1 mg Geneticin; pH = 7,4; steril-filtriert; Lagerung -20 °C
Natriumhypochlorid-Lösung, (5 %)	50 mL NaClO (12%ig), 70 mL Aqua Braun
pHrodo [®] Biopartikel	2 mg Partikel in 1 mL HBSS+-Puffer
TAE-Puffer (50 x)	242 g Tris in 500 mL H ₂ O lösen, 100 mL Na ₂ EDTA (0,5 M; pH 8,0), 57,1 mL Eisessig; Volumen auf 1 L auffüllen

2.3 Medien

2.3.1 Fliegenstandardmedium

Für 1,5 L Standardmedium wurden 93,75 g Maismehl, 93,75 g Bierhefe, 30 g Glukose, 45 g Zuckerrübensirup, 45 g Zuckerrohrmelasse und 5 g Agar in Wasser gelöst, mit selbigem auf 1,5 L aufgefüllt und autoklaviert. Nachdem das Medium auf ca. 60 °C heruntergekühlt war, wurden als Konservierungsmittel 15 mL Propionsäure (10%ig in Wasser) und 45 mL Methylparaben zugesetzt (10%ig in 70%igem Ethanol).

Für die Herstellung von blauem Medium wurden außerdem 50 mg Erioglaucin je 100 mL Medium nach dem Autoklavieren hinzugesetzt. Anschließend wurde das Medium unter einer Sterilwerkbank in *Drosophila*-Kulturgefäße gegossen, diese nach dem Abkühlen mit milbendichten Stopfen verschlossen und bei 4 °C gelagert.

2.3.2 Grapefrucht-Agar Platten

Für 1 L Medium wurden 30 g Agar in 700 mL Wasser gelöst und autoklaviert. Außerdem wurden 0,5 g Methylparaben in 10 mL Ethanol gelöst und dann mit 300 mL Grapefruchtsaft vermischt. Der mit Konservierungsmittel versetzte Grapefruchtsaft wurde nach dem Autoklavieren dem Wasser mit Agar unter Rühren zugesetzt, sobald dieses auf ca. 60 °C heruntergekühlt war. Dann wurde das Medium in Petrischalen (100 mm Durchmesser) gegossen und trocken gelassen.

2.3.3 Zellkultur-Medien

Die Substanzen aus Tab. 6 wurden unter der Sterilwerkbank zusammengefügt. Für die stabil-transfizierten Dipt-Zellen wurde Geneticin als Selektionsantibiotikum bei jeder Passage stets frisch zugegeben.

Tab. 6: Kulturmedium für S2-Zellen und Dipt-Zellen

Inhaltsstoff	S2-Zellen	Dipt-Zellen
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	89 mL	89 mL
GlutaMax	1 mL	1 mL
FBS (Gibco) nicht hitzeinaktiviert	10 mL	-
FBS (PAA) nicht hitzeinaktiviert	-	10 mL
Geneticin (Stammkonz.: 50 mg/mL)	-	1,6 % (immer frisch zugegeben)

2.3.4 Induktionsmedium (IM)

Das Induktionsmedium wird benötigt für Assays, die eine Akkumulation des intrazellulären cAMPs voraussetzen. IBMX und Ro 20-1724 sind Phosphodiesteraseinhibitoren, die den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen verhindern.

Inhaltsstoff	IM 1	IM 2
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	99,4 %	99,85 %
IBMX (100 mM in DMSO)	0,5 % (500 μ M)	0,1 % (100 μ M)
Ro 20-1724 (100 mM in DMSO)	0,1 % (100 μ M)	0,05 % (50 μ M)

2.3.5 LB-Medium

Zur Anzucht von *Pectobacterium carotovorum* (*Ecc15*; ehemals: *Erwinia carotovora*) wurde Lysogeny Broth (LB)-Medium nach Miller verwendet. Hierfür wurden 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 950 mL entionisiertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7 eingestellt und das Volumen dann auf 1 L mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde für 20 Minuten autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.4 *Drosophila*

2.4.1 Haltung

Die Haltung der Fliegen erfolgte bei 25 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70 % und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h auf Standardmedium (2.3.1). Die Fliegen verblieben zwischen zwei und drei Tagen zur Eiablage auf dem Medium und wurden dann entweder entsorgt oder auf frisches Medium umgesetzt. Das Umsetzen erfolgte unter CO₂-Betäubung.

Für das Ansetzen großer Kulturröhrchen (53 x 100 mm) wurden 22 Weibchen und 22 Männchen eingesetzt, für kleine Kulturröhrchen (29 x 95 mm) 8 Weibchen und 8 Männchen.

2.4.2 Stämme

Tab. 7: Liste aller verwendeten *Drosophila*-Stämme (B: Bloomington)

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
Canton S	Wildtyp	T. Röder, CAU Kiel
w ¹¹¹⁸	w[1118]	B 5905
hml-GAL4, UAS-GFP	w[1118]; P{w[+mC]=Hml-GAL4.G}6-4, P{w[+mC]=UAS-GFP::lacZ.nls}15.1, P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[Ts]	B 6397
UAS-bPac	w[*]; P{UAS-bPacII}, CyO	Martin Schwärztel, FU Berlin
CyO, GFP	w[*]; In(2LR)noc[4L]Sco[rv9R], b[1]/CyO, P{w[+mC]=ActGFP}JMR1	B 4533
Octβ1R-KO	w[1118]; ;PBac{w[+mC]=WH}Octbeta1R[f02819]	B 18589
Octβ2R- KO	w[1118]; ;PBac{w[+mC]=WH}Octbeta2R[f05679]	B 18896
Octβ3R- KO	w[1118]; ;Mi{ET1}Octbeta3R[MB04794]	B 24819
Oct-TyrR-KO	w[*]; ; PBac{GAL4D,EYFP}Oct-TyrR[PL00408] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B	B 19486
TyrR- KO	w[1118]; ;Mi{ET1}TyrR[MB09692]	B 27797
TyrRII- KO	w[1118]; ; Mi{ET1}TyrRII[MB03028]	B 23837
Dop1R1- KO	PBac{WH}Dop1R1f02676	Harvard
Dop1R2- KO	w[1118]; ;Mi{ET1}Dop1R2[MB05108]	B 24743
UAS-Octβ1R_1	y[1] v[1]; ; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03103}attP2	B 50701
UAS-Octβ1R_2	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMJ22156}attP40	B 58179
UAS-Octβ2R_1	y[1] sc[*] v[1]; ;P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01151}attP2	B 34673
UAS-Octβ2R_2	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.GLC01702}attP40	B 50580
UAS-VALIUM10	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=UAS-GFP.VALIUM10}attP2	B 35786
Cg-GAL4	w[1118]; P{w[+mC]=Cg-GAL4.A}2	B 7011 (T. Röder, CAU Kiel)

2.4.3 Kreuzungen

Für Kreuzungen wurden 22 Männchen und 22 weibliche Jungfrauen in große Kulturröhrchen mit blauem Standardmedium gegeben. Nach zwei Tagen wurden die adulten Tiere entweder in ein neues Röhrchen geben oder entsorgt.

Für die Kreuzung von hml-GAL4, UAS-GFP Männchen mit UAS-bPac Weibchen konnten nur heterozygote Weibchen verwendet werden, da homozygote Weibchen steril sind. Dies führte dazu, dass die F1-Generation nur zur Hälfte das bPac-Konstrukt trug. Da aber mit Larven der F1-Generation gearbeitet werden sollte, musste zuvor ein im Larvenstadium

sichtbarer Marker eingekreuzt werden. Daher wurden UAS-bPac Weibchen mit CyO, GFP Männchen gekreuzt, und aus der F1-Generation jene herausortiert, die GFP exprimieren und *curly*-Flügel besitzen (bPac/Cyo, GFP). Diese wurden dann weiter kultiviert und die heterozygoten Weibchen für die weitere Kreuzung verwendet.

Für die Versuche mit RNAi-Linien wurde neben dem Hämozytentreiber hml-GAL4, UAS-GFP auch der Cg-GAL4-Treiberstamm mit den RNAi-Linien verpaart. Der Cg-GAL4-Treiber ist spezifisch für Fettkörper, Hämozyten und Lymphdrüsen (Flybase). Als Kontrolle wurde der Treiber jeweils mit einer Linie gekreuzt, die einen VALIUM10 Leervektor trägt (UAS-VALIUM10).

Tab. 8: Lister der verwendeten Kreuzungen und deren Bezeichnungen

Männchen	Weibchen	Bezeichnung F1
hml-GAL4, UAS-GFP	w ¹¹¹⁸	hml,GFP > w ¹¹¹⁸
CyO, GFP	UAS-bPac	UAS-bPac/CyO, GFP
hml-GAL4, UAS-GFP	UAS-bPac/Cyo, GFP	hml,GFP > bPac ⁺ und hml,GFP > bPac ⁻
hml-GAL4, UAS-GFP	UAS-Octβ1R_1	hml,GFP > Octβ1R_1
hml-GAL4, UAS-GFP	UAS-Octβ1R_2	hml,GFP > Octβ1R_2
hml-GAL4, UAS-GFP	UAS-Octβ2R_1	hml,GFP > Octβ2R_1
hml-GAL4, UAS-GFP	UAS-Octβ2R_2	hml,GFP > Octβ2R_2
hml-GAL4, UAS-GFP	UAS-VALIUM10	hml,GFP > VALIUM10
Cg-GAL4	UAS-Octβ1R_1	Cg > Octβ1R_1
Cg-GAL4	UAS-Octβ1R_2	Cg > Octβ1R_2
Cg-GAL4	UAS-Octβ2R_1	Cg > Octβ2R_1
Cg-GAL4	UAS-Octβ2R_2	Cg > Octβ2R_2
Cg-GAL4	UAS-VALIUM10	Cg > VALIUM10

2.5 Zelllinien

2.5.1 Schneider S2-Zellen

S2-Zellen entstammen ursprünglich einer immortalisierten Primärzellkultur aus embryonalen Hämozyten des Wildtypstammes Oregon R. Die Zellen sind semi-adherent und daher leicht mechanisch vom Untergrund zu lösen. Für die Kultur wurde das Medium aus Tab. 6 verwendet. Die Zellen wurden alle zwei Tage passagiert und mit einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Z/mL in eine neue T-Flasche überführt, in der sie bei 25 °C im Brutschrank verblieben. Spätestens beim Erreichen der 40. Passage wurde ein neues Röhrchen mit Zellen aufgetaut.

2.5.2 Dipt-Zellen

Um eine erste Idee von der möglichen Wirkung verschiedener BAs auf den Imd-Signalweg zu bekommen, wurde zunächst eine stabil transfizierte Zelllinie verwendet, die *luciferase* unter der Kontrolle eines *diptericin*-Promotors exprimiert. Diptericin ist ein AMP, welches bei Aktivierung des Imd-Signalweges synthetisiert wird. Das Gen der aus dem amerikanischen

Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*, engl: firefly) stammenden *luciferase* dient als Reporter, dessen Expressionslevel mit Hilfe des Bright-Glo[®] Luciferase Assays (2.14.1) quantifiziert werden kann. Die Zelllinie wurde gestiftet von Neal Silverman und ursprünglich hergestellt von Jean-Marc Reichhart. Als Ausgangszelllinie für die Transfektion wurden S*-Zellen (hinsichtlich ihrer größeren Empfänglichkeit für 20E-Stimuli selektierte Schneider S2-Zellen) verwendet. Bei dem eingebrachten Plasmid (pJM647) handelt es sich um einen pGL3-Basis Vector (Promega), der als Reporter eine Modifikation des *firefly-luciferase*-Gens enthält, und in dessen multiple Klonierungsstelle ein *dipteracin*-Promotor eingefügt wurde (Abb. 7). Das Helferplasmid, welches ursprünglich für die Transfektion verwendet wurde, trägt eine Neomycin-Resistenz, die die Selektion über das Antibiotikum Geneticin ermöglicht.

Die Dipt-Zellen müssen hormonell stimuliert werden, um die Aktivierung des Imd-Signalweges zu ermöglichen. Dies simuliert einen Stimulus, dem sie in späten L3-Larven kurz vor der Verpuppung auch ausgesetzt wären: den Konzentrationsanstieg von 20E. Das Verpuppungshormon reguliert die Expression des mustererkennenden Rezeptors PGRP-LC, der an der Erkennung von DAP-Typ-PGN wesentlich beteiligt ist [74].

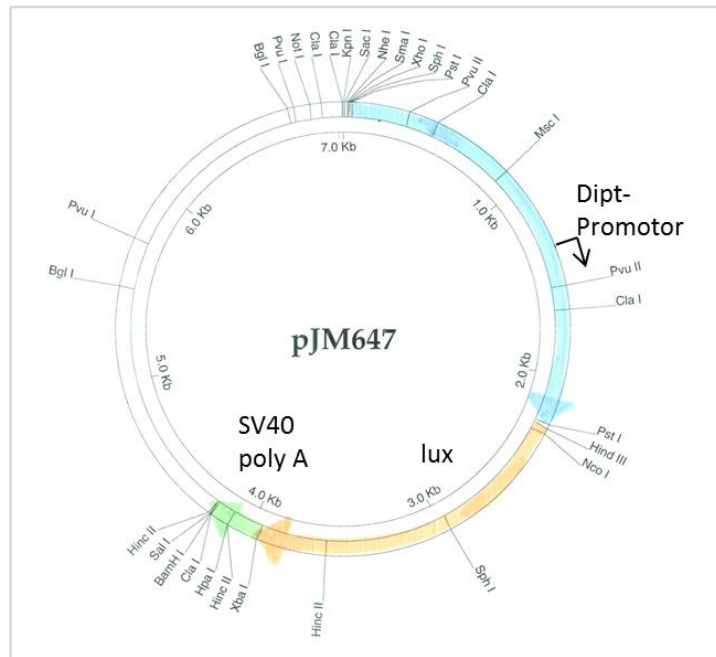


Abb. 7: Plasmid pJM647, hergestellt von Jean-Marc Reichhart auf Basis eines pGL3-Basis Vektors (Promega) [persönliche Korrespondenz].

Die Dipt-Zellen wurden in der Kultur genauso behandelt wie S2-Zellen. Nur die Mediumzusammensetzung wurde minimal variiert (Tab. 6). Geneticin wurde als Selektionsantibiotikum eingesetzt und bei jeder Passage frisch zugesetzt.

2.6 Bakterien

Für die Infektion der Fliegen wurde *Pectobacterium carotovorum* gewählt, ein gram-negatives, entomopathogenes Bakterium, welches im natürlichen Umfeld der Fliege auf

verrottenden Pflanzen vorkommt [159], [164]. Der Stamm *Ecc15* wird gerne zur Infektion von *Drosophila* verwendet, da er die Fliege auf natürlichem Wege infizieren kann, eine starke Immunantwort auslöst, dabei jedoch nur schwach letal ist [164].

Tab. 9: Bakterienstamm für Infektionsexperimente

Bakterium	Stamm	Lieferant
<i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>subsp. carotovorum</i>	CFBF2141	Cirm, Beaucuzé, Frankreich

2.7 Primer

Tab. 10: Liste aller verwendeten Primer mit CG-Nummern der entsprechenden Gene

CG Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Exon spanning
6919	<i>Octβ1R_sense</i>	CGGTTCGACAGATACTACGCC	ja
	<i>Octβ1R_antisense</i>	GTTGTGTACCATCCCGAGCA	
33976	<i>Octβ2R_sense</i>	TCCTGTGGTACACACTCTCCA	ja
	<i>Octβ2R_antisense</i>	AAGTACGCGTAGATCAGCGG	
42244	<i>Octβ3R_sense</i>	CTTTCTGGGCTGGTACACGA	nein
	<i>Octβ3R_antisense</i>	CCGGGTATCCAGAAGCTCAC	
7485	<i>Oct-TyrR_sense</i>	GAATGCGAAGGAGCTGTGGA	nein (*)
	<i>Oct-TyrR_antisense</i>	TGTTCCCGATGATGGTCAGC	
3856	<i>Oamb_sense</i>	CCGGCATTGGGGTACTCTCA	nein (*)
	<i>Oamb_antisense</i>	GTTGACCATCCTCCGAGCTT	
16720	<i>5-HT1A_sense</i>	CCATTGCCGTCGATCGTTAC	ja
	<i>5-HT1A_antisense</i>	TGTGGTGCCAAGGACACAAT	
15113	<i>5-HT1B_sense</i>	GCGCCGTCTACGAGATAAGT	ja
	<i>5-HT1B_antisense</i>	ACCAGGTGCAGTATGGATGC	
1056	<i>5-HT2A_sense</i>	TTACAGCCCTGAACACGACC	nein
	<i>5-HT2A_antisense</i>	GCCACCCGCGAAGATAAAGA	
42796	<i>5-HT2B_sense</i>	ACTCTGCTCACAATCAGGGC	nein
	<i>5-HT2B_antisense</i>	GATGCTCAACTTTCGTCGGC	
12073	<i>5-HT7_sense</i>	CATGTCGGCCTTTACCGTCT	nein
	<i>5-HT7_antisense</i>	GCCCAGCCAGAGGAATAGAG	
9652	<i>Dop1R1_sense</i>	TCGTCTCCTTTGTGCCCATC	nein
	<i>Dop1R1_antisense</i>	CCAGAGCGCATGTTGGATAC	
18741	<i>Dop1R2_sense</i>	TGAAGTAGTTGGTGGCCGTG	nein
	<i>Dop1R2_antisense</i>	TGAAGTAGTTGGTGGCCGTG	
33517	<i>Dop2R_sense</i>	ACATTTTCAAGGCGCTGAGG	ja
	<i>Dop2R_antisense</i>	CCGTGAGTTCCGATAGGTGG	
18314	<i>DopEcR_sense</i>	TCCGTGTATCCCGCTTTGAC	nein
	<i>DopEcR_antisense</i>	CCGCAAGATAGCGATCCACT	
7431	<i>TyrR_sense</i>	ACGTGGAGAATGAGCTGTCTG	nein
	<i>TyrR_antisense</i>	GGAGCTCCTTGGCTATCGTC	
16766	<i>TyrRII_sense</i>	TATCTCGCCGTCACACAACC	nein
	<i>TyrRII_antisense</i>	ACAGGGCAGTTATCCACACG	
7939	<i>Rpl32_sense</i>	CCAGTCGGATCGATATGCTAA	nein (*)
	<i>Rpl32_antisense</i>	GTTTCGATCCGTAACCGATGT	

(*) Anhand der Bandengröße können gDNA-Verunreinigungen ausgeschlossen werden.

2.8 Isolierung totaler RNA

2.8.1 RNA aus Fliegenköpfen

Für die Gewinnung totaler RNA aus Fliegenköpfen wurde die Methode aus [165] adaptiert. Von Canton S Fliegen wurden zunächst 8 x 15 Männchen und 8 x 15 Weibchen in kleine Kulturröhrchen mit Standardmedium abgesammelt. Sobald die Tiere drei Tage alt waren wurde der Inhalt eines Röhrchens mit einem Trichter ohne Betäubung in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen geflippt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dies geschah mit der einen Hälfte der Röhrchen vormittags. Die andere wurde acht Stunden später eingefroren. Dies sollte den möglichen Einfluss der Tageszeit auf die Expressionslevel verschiedener Gene verringern. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Fliegen bei -80 °C eingefroren.

Am Tag der Isolation wurden die Röhrchen zunächst auf Trockeneis gestellt. Dann wurde mit dem Finger stark gegen jedes Röhrchen geschnippt, wodurch die Köpfe der Tiere sich vom Torso trennten. Die Röhrchen wurden auf ein Stück Parafilm auf Trockeneis nacheinander geleert und die Köpfe vorsichtig mit einer Federstahlpinzette in 2 mL Schraubdeckelröhrchen gesammelt, so dass am Ende je 50 Köpfe von den morgens eingefrorenen männlichen und weiblichen Fliegen sowie je 50 Köpfe von abends eingefrorenen männlichen und weiblichen Fliegen in dem Schraubdeckelröhrchen waren (200 Köpfe gesamt). Nun wurden drei Stahlkügelchen (Durchmesser: 5 mm) dem Röhrchen hinzugefügt und es wurde im TissueLyser für 1 min bei 25 Hz geschüttelt. 1 mL TRI Reagent[®] Lösung wurde hinzugegeben und das Schütteln für weitere 2 min wiederholt. Die Suspension wurde nun in ein 1,5er RNase-freies Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 12.000 x g für 15 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und 0,1 Teile BCP hinzugegeben. Das Röhrchen wurde für 15 s stark geschüttelt und bei RT für 3 min inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 12.000 x g für 15 min Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und 0,5 Teile eiskaltes Isopropanol zugegeben. Das Röhrchen wurde zum Mischen sechs Mal invertiert und bei RT 10 min inkubiert. Es wurde ein weiteres Mal bei 4 °C und 12.000 x g für 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit 1 mL 70%igem Ethanol gewaschen. Es wurde abermals bei 4 °C und 12.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet etwa 15 Min. an der Luft trocknen gelassen. Dabei sollte das Pellet nicht vollständig austrocknen, weil ein erneutes Lösen sonst erschwert worden wäre. Die RNA wurde in 80 µL RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 min bei 55 °C inkubiert.

DNA-Verdau

Es schloss sich ein DNA-Verdau mit Hilfe des Turbo DNA-free[®] Kits (Ambion) an die RNA-Isolation an, für den zunächst die Konzentration der RNA im Nanophotometer bestimmt wurde (2.9.1). 2 x 15 µg RNA wurden in je ein neues 1,5er Reaktionsröhrchen überführt. Jedem Ansatz wurden nun 10 µL Turbo DNase Puffer (10 x), 2 µL Turbo DNase und so viel RNase-freies Wasser hinzugefügt, so dass am Ende 100 µL pro Ansatz vorlagen. Der Reaktionsmix wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 10 µL Inaktivierungspuffer zugegeben, gut gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Nach der

anschließenden Zentrifugation bei RT und 10.000 x g für 1,5 min wurden je Röhrchen 80 µl des Überstandes abgenommen und in einem neuen Röhrchen zusammengeführt.

RNA-Reinigung

Zur weiteren Reinigung der RNA schloss sich das Cleanup-Protokoll aus dem Handbuch für das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Version 06/2012) an. Zusätzlich wurde der Verdau auf der Säule mit dem RNase-free DNase Set (im Protokoll als „optional“ beschrieben) durchgeführt. Am Ende wurde die RNA in 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert und die Menge sowie die Reinheitswerte wieder im Nanophotometer (2.9.1) bestimmt.

2.8.2 RNA aus Hämozyten und Fettkörper

2.8.2.1 Probengewinnung aus Primärhämozyten (PHs)

Die RNA aus PHs wurde isoliert, um die Expression der BA-Rezeptoren zu überprüfen. Hierfür sollte sichergestellt werden, dass ausschließlich Hämozyten und nicht andere Zellen mit in die Probe geraten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach der Isolation aus L3-Larven mittels fluoreszenzaktiviertem Zellsortierer (FACS) sortiert und anschließend RNA aus ihnen gewonnen.

Es wurden Larven mit dem Genotyp $hml, GFP > w^{1118}$ auf blauem Medium herangezogen. Die Blaufärbung des Mediums ermöglichte, das Stadium der L3-Larven besser zu erkennen. Späte L3-Larven, die kurz vor der Verpuppung stehen, entleeren ihren Darminhalt und erscheinen dadurch weniger blau als solche, die erst kürzlich aus dem Medium hochgekrochen sind. Erstere wurden für die PH-Isolation benötigt.

Um ausreichend RNA für die folgenden Experimente zu erhalten, mussten sehr viele Hämozyten isoliert werden. Dies barg Probleme, da das Aufreißen der Larven einige Zeit in Anspruch nahm. Dauerte dieser Prozess zu lange, starben viele Hämozyten zwischenzeitlich. Daher mussten mehrere Isolationsdurchläufe hintereinander durchgeführt werden.

Zunächst wurden in sechs Wells einer Ultra-Low-Attachment (ULA)-96-Well Platte jeweils 330 µL Schneider-Medium vorgelegt. Die Platte verblieb fortfolgend auf Eis. Nun wurden bei RT in ein Glasschälchen 150 µL Aqua Braun pipettiert und 30 späte L3-Larven mit einer Federstahlpinzette aus den Mediumsröhrchen abgesammelt und in das Wasser gelegt. Die Tiere wurden zunächst drei Mal mit Aqua Braun gewaschen und anschließend in 150 µL einer 5%igen Natriumhypochlorid-Lösung für 2 min desinfiziert. Es wurde wieder drei Mal mit Wasser gewaschen und die Tiere dann unter dem Stereomikroskop nach Männchen und Weibchen in Glasschälchen mit 50 µL Aqua Braun auf Eis sortiert. Nun wurden die Larven nach und nach in einem der sechs Wells aufgerissen. Dafür wurden sie am posterioren Ende mit einer Dumont Pinzette Nr. 5 gegriffen, auf einem weichen Papiertuch abgetrocknet und mit einer zweiten Dumont-Pinzette die Cuticula im Well vorsichtig aufgerissen. Dabei durfte der Darm nicht verletzt werden. Die Larve wurde etwas im Medium geschwenkt, um möglichst viele Hämozyten aus dem Tier zu lösen und wieder herausgenommen. So wurde nacheinander mit allen 30 Larven verfahren. Der Vorgang wurde mit weiteren 30 Larven wiederholt bis alle sechs Wells Hämozyten aus 30 Tieren enthalten. Zwischenzeitlich wurden

die schon gefüllten Wells mit Hilfe einer Pipette resuspendiert, damit die Hämozyten sich nicht zu fest am Boden festsetzen.

Nun wurde der Inhalt eines Wells in ein Well einer 40 µm MultiMesh-Platte überführt. Dabei wurden größere Partikel, die bei der Hämozytenisolation in das Medium geraten können, herausgesiebt. Das Filtrat wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und weiterhin auf Eis belassen. So wurde nun auch mit den weiteren fünf Wells verfahren. Die Inhalte wurden alle im FACS-Röhrchen zusammengeführt. Ein weiteres FACS-Röhrchen wurde zunächst mit FBS durchgespült und anschließend 200 µL Schneider-Medium vorgelegt. In dieses Röhrchen wurden die Hämozyten im FACS sortiert. Die Benetzung mit FBS stellt sicher, dass die Hämozyten nicht am Rand des Röhrchens kleben bleiben, wenn sie aus dem FACS kommen.

Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Die Hämozyten werden nun am BD FACS Aria nach ihrem GFP Signal sortiert. Dieser Vorgang dauerte etwa eine halbe Stunde und lieferte eine durchschnittliche Hämozytenzahl von 150.000 bis 200.000 Zellen. (Geräteeinstellungen: 100 µm Düse, Flussrate: 10 (≈110 µL/min), 4 °C Proben temperatur)

Die sortierten Hämozyten wurden in ein 1,5er RNase-freies Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1500 x g für 5 min zentrifugiert. Da die Zellzahl so gering war, dass nach dem Zentrifugieren kein Pellet sichtbar war, wurde das Medium nicht vollständig abgenommen. 50 µL verblieben im Röhrchen, um sicherzustellen, dass die Zellen nicht aufgesogen wurden. Es wurden 100 µL RLT-Puffer (RNeasy micro Kit, Qiagen) und 1 µL β-Mercaptoethanol zugefügt und die Zellen mit einem rotierenden Stößel aufgeschlossen. In dieser Form wurden sie bei -80°C eingefroren. Es wurden insgesamt sechs Durchgänge mit jeweils 180 Larven, verteilt auf zwei Tage durchgeführt, um eine Menge von ca. 500 ng RNA aus PHs zu erhalten. Die sechs Proben wurden anschließend zu einer vereint.

2.8.2.2 Probengewinnung aus Fettkörper

Zunächst wurden Larven mit dem Genotyp $hml, GFP > w^{118}$ auf blauem Medium herangezogen. Für die Fettkörperisolation wurden jene gesammelt, die gerade das Medium verließen, da in späten L3-Larven der Fettkörper schwer zu isolieren ist. In diesem Stadium, kurz vor der Verpuppung setzen bereits Metamorphoseprozesse ein, in deren Verlauf der larvale Fettkörper umgebaut wird.

Es wurde Fettkörper aus sechs Weibchen und sechs Männchen isoliert. Die Tiere wurden wie unter 2.8.2 beschrieben, gewaschen, desinfiziert und nach Geschlecht getrennt. In einem 1,5er Reaktionsröhrchen auf Eis wurden 100 µL RNAProtect Cell Reagent (Qiagen) vorgelegt. Dieses Reagenz stabilisiert die RNA während der Fettkörperisolation.

Es wurden nun zwei Glasschälchen mit einem Tropfen Aqua Braun bereitgestellt. Mit zwei Dumontpinzetten wurde die Larve in einem der Schälchen nun vorsichtig aufgerissen. Zunächst wurden der Darm und größere Epidermis-Stücke entfernt. Der Fettkörper und evtl. weitere verbliebene Gewebe wurden in das zweite Schälchen überführt. Hier wurden nun die Fettkörperlappen sauber abgetrennt und in das Röhrchen mit dem RNAProtect Cell Reagent überführt. Anschließend wurde die Fettkörperprobe zentrifugiert bei 4 °C, 4500 x g für 5 min.

Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 350 μL RLT-Puffer (RNeasy Micro Kit, Qiagen) aufgenommen. Mit dem rotierenden Stößel wurden die Zellen aufgeschlossen und noch 3,5 μL β -Mercaptoethanol der Probe hinzugefügt, bevor sie bei -80°C eingefroren wurde. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben. Abweichend davon wurde mit 70%igem Ethanol gearbeitet, da der RLT-Puffer bei den Fettkörperproben nicht verdünnt wurde.

2.8.2.3 Probengewinnung aus S2-Zellen

Es wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen je Probe benötigt. Sollten die Zellen vorher mit 20E stimuliert werden, wurden zunächst $5 \cdot 10^6$ Zellen/999 μL in einer 24-Well Platte ausgesät und 1 μL 20E hinzugegeben. 24 h später wurden sie dann in ein 1,5er Zentrifugenröhrchen überführt und bei $1500 \times g$ für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 350 μL RLT-Puffer des RNeasy Micro Kits resuspendiert. Nach der Zugabe von 3,5 μL β -Mercaptoethanol wurden die Zellen bei -80°C eingefroren bis sie weiter verarbeitet werden konnten.

2.8.2.4 RNA-Isolation

Die PH-, S2-Zell- und Fettkörperproben wurden zunächst auf eine QIAshredder-Säule gegeben. Diese wurde 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen) und nach entsprechendem Protokoll isoliert. Im Fall der PHs wurden die Proben in zwei sequenziellen Schritten über die Säule gegeben, da hier das Volumen der vereinten Proben größer war.

Außerdem wurde hier aufgrund der Verdünnung des RLT-Puffers mit Schneider-Medium statt 70%em Ethanol 100%iger so eingesetzt, dass das Verhältnis von RLT-Puffer zu Ethanol wieder stimmte. Von hier wurde weitestgehend nach Protokoll gearbeitet. Abweichend davon wurde für alle Proben der DNA-Verdau (RNase-free DNase Kit) auf der Säule bei 30°C für 15 min ein zweites Mal direkt im Anschluss an den ersten Verdau durchgeführt. Der Waschschritt mit dem RPE-Puffer wurde auch einmal wiederholt.

Am Ende wurde die Probe in 12 μL RNase-freiem, 95°C heißem Wasser eluiert, zunächst auf Eis gestellt und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.9 RNA-Analyse

2.9.1 Konzentrationsbestimmung am Nanophotometer

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Nanophotometer der Firma Implen (P330) verwendet. Dieses ermöglicht die Konzentrationsbestimmung aus einem Mikroliter einer Probe. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die Absorption von Nucleinsäuren gemessen. Das Gerät bestimmt darüber hinaus die Absorption bei 230 nm, 280 nm und 320 nm. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Davon abweichende Werte deuten auf Verunreinigungen der Probe hin. Diese sind nach Möglichkeit zu vermeiden, weil sie in der anschließenden Umschreibung der RNA in cDNA die Effektivität

der Reversen Transkriptase beeinflussen können. Der A260/A280-Wert kann allerdings auch durch eine zu niedrige Konzentration der Probe beeinträchtigt werden. Dies war bei Proben, die aus PHs gewonnen wurden, gelegentlich der Fall, da diese meist eine Konzentration von $< 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ besaßen und damit in die Nähe der unteren Messgrenze des Gerätes kommen. Das Verhältnis A260/A230 sollte > 2.0 sein. Niedrigere Werte deuten auf die Anwesenheit von Pufferverunreinigungen hin.

2.9.2 Konzentrationsbestimmung am Qubit® 2.0

Bei sehr geringer RNA-Konzentration, also i.d.R. nach der Isolation aus PHs, wurde die Konzentration am Qubit® 2.0 bestimmt. Das Qubit® RNA HS (High Sensitivity) Kit ist für einen Konzentrationsbereich von $250 \text{ pg}/\text{mL}$ bis $100 \text{ ng}/\text{mL}$ konzipiert. In diesem System wird ein Fluoreszenzfarbstoff spezifisch an RNA gebunden, detektiert und quantifiziert. Die RNA-Proben wurden für die Messung 1:10 verdünnt eingesetzt. Es wurde nach Kit-Protokoll gearbeitet (Version 2014).

2.9.3 RNA-Integritätsbestimmung am Bioanalyser

Um sicher zu stellen, dass mit intakter RNA weiter gearbeitet wurde, wurde sie im Agilent 2100 Bioanalyser (Firmware Version C.01.069) mit Hilfe des RNA 6000 Pico Kits analysiert. Der Bioanalyser ermittelt den RIN (RNA Integrity Number) in dessen Berechnung unter anderem das Verhältnis zwischen eukaryotischer, ribosomaler 18S und 28S RNA einfließt (Abb. 8, A). Am Ende steht ein Wert zwischen 1 und 10, wobei die RNA stärker degradiert ist, je niedriger der RIN. Wie in den meisten Insekten besteht die 28S rRNA in *Drosophila* aus zwei etwa gleich großen Untereinheiten, die über eine Wasserstoffbrückenbindung zusammengehalten werden und leicht voneinander dissoziieren (z. B. durch Erhitzen).

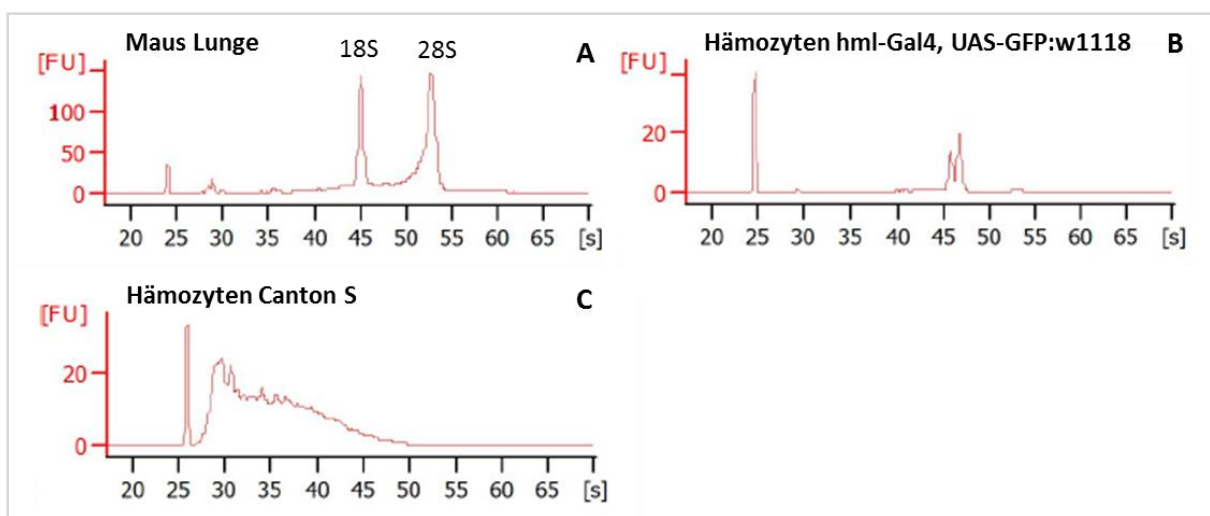


Abb. 8: Elektropherogramm für RNA-Proben aus Maus Lunge (A), Hämozyten aus L3-Larven des Stammes hml, GFP $> w^{1118}$ (B) und Hämozyten aus L3-Larven des Stammes Canton S. (A) zeigt die typischen 18S und 28S Banden der eukaryotischen, ribosomalen RNA. In (B) ist eine nicht degradierte RNA-Probe aus *Drosophila*-PHs zu sehen. Die RNA in (C) ist dagegen stark degradiert.

Die daraus resultierenden zwei Banden befinden sich sehr nah an der 18S Bande (Abb. 8, B), was eine Bestimmung des RIN unmöglich macht. Nichtsdestotrotz kann anhand der Beschaffenheit der Banden gut erkannt werden, ob die RNA intakt (Abb. 8, B) oder degradiert (Abb. 8, C) ist. Für die Transkriptomanalyse und die quantitative RT-PCR wurde nur RNA verwendet, die distinkte Banden aufweisen konnte. Es wurde nach dem Protokoll des Kits (Version 8/2006) gearbeitet. Die RNA wurde 1:100 verdünnt eingesetzt.

2.10 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA aus totaler RNA wurde die SuperScript[®] III Reverse Transkriptase verwendet und weitestgehend nach dem zugehörigen Protokoll gearbeitet.

Bei allen Primern, die nicht Exon-übergreifend gestaltet werden konnten, wurde in der cDNA Synthese eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (-RT) mitgeführt. Dies ermöglichte die Identifikation von möglichen Verunreinigungen mit genomischer DNA (gDNA) in der Probe. Einige Primerpaare führen zu unterschiedlich großen Amplikons, je nachdem ob es sich um cDNA oder gDNA handelt. Für diese wurde auf die -RT-Kontrolle verzichtet. Leider war nicht genug RNA aus PHs vorhanden, um in der -RT und +RT die gleiche Menge RNA einsetzen zu können. Daher wurde am Ende über die Verdünnung der cDNA ein Konzentrationsausgleich bewirkt.

Zunächst wurde in zwei RNase-freie 0,5er Zentrifugenröhrchen je pipettiert:

Substanz	Menge	
	+RT	-RT
Oligo(dT) (1 pmol/ μ L)	0,5 μ L	0,5 μ L
dNTP mix (10 mM)	0,5 μ L	0,5 μ L
tRNA	400 ng	100 ng
RNase-freies H ₂ O	ad. 6,5 μ L	ad. 6,5 μ L

Das Gemisch wurde bei 65 °C für 5 min in einem Thermoblock erhitzt und anschließend auf Eis für 1 min heruntergekühlt.

Weiter hinzugegeben wurden:

Substanz	Menge	
	+RT	-RT
5x First-Strand Buffer	2,0 μ L	2,0 μ L
DTT (0,1 M)	0,5 μ L	0,5 μ L
RNase Out (40 U/ μ L)	0,5 μ L	0,5 μ L
SuperScript III (200 U/ μ L)	0,5 μ L	---
RNase-freies H ₂ O	---	0,5 μ L

Die Proben wurden im Thermocycler für eine Stunde bei 50 °C inkubiert und die Reaktion bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Für den Einsatz in der qRT-PCR wurden die cDNA-Proben verdünnt. Die -RT wurde 1:4 und die +RT 1:16 verdünnt.

2.11 Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR ist ein PCR-Verfahren, bei dem eine Quantifizierung der Produktmenge durch Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I) ermöglicht wird, der zwischen doppelsträngige DNA interkaliert. Die Detektion erfolgt nach jedem Syntheseschritt. Da bei der Verwendung von DNA-Farbstoffen die Detektion nicht produktspezifisch ist, wird über eine Schmelzkurvenanalyse überprüft, ob ein oder mehrere Produkte vorliegen. Dabei werden die doppelsträngigen Produkte geschmolzen, was zum Freiwerden des Farbstoffes und damit zur Änderung der Fluoreszenzintensität führt. Primerdimere trennen sich z. B. bereits bei niedrigeren Temperaturen von einander, wodurch sie von spezifischen PCR-Produkten meist deutlich unterschieden werden können. Als Quantifizierungswert dient der CP-Wert (Crossing Point), der die Zykluszahl beschreibt, bei der die Fluoreszenz einen Grenzwert überschreitet (Abb. 9). Je niedriger der CP-Wert ist, desto mehr Transkriptkopien sind vorhanden.

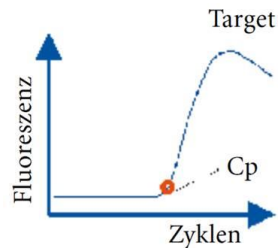


Abb. 9: Darstellung des CP-Wertes [166]

Mit Hilfe der Erstellung einer Standardkurve durch Ansetzen einer Verdünnungsreihe ist es theoretisch möglich, diese CP-Werte einer absoluten DNA-Konzentration zuzuweisen. Praktisch war die Expression der BA-Rezeptoren teilweise so schwach, dass das Bilden eines zuverlässigen Mittelwertes, mit dem eine Quantifizierung hätte durchgeführt werden können, nicht gebildet werden konnte. Aufgrund dessen war es auch nicht möglich die Rezeptorexpression relativ zur Expression des Haushaltsgens Rpl32 zu berechnen. Stattdessen wurde zur qualitativen Auswertung beispielhaft eine Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Dies ermöglichte eine Beurteilung darüber, ob ein Rezeptor überhaupt exprimiert wurde oder nicht. Für die qRT-PCR wurde zunächst ein Mastermix für jedes Primerpaar angesetzt:

Tab. 11: Mastermix zum Einsatz in die qRT-PCR. Das Volumen ist ausreichend für ein Well.

Substanz	Volumen (1x)
RNase-freies H ₂ O	2,0 µL
Primer sense (10 pmol/µL)	0,5 µL
Primer antisense (10 pmol/µL)	0,5 µL
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	5,0 µL

In einer qPCR-Platte wurden je Well 2 µL cDNA vorgelegt und 8 µL des Mastermixes hinzugegeben.

2.12 Gelelektrophorese

Die Proben aus der qRT-PCR wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurde ein 2,5 %iges Agarose-Gel hergestellt indem 2,5 mg Agarose in 100 mL TAE-Puffer durch aufkochen gelöst wurden. Dann wurden der etwas abgekühlten Lösung 20 µL Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in eine Kammer mit 20 Taschen gegossen. Während des Aushärtens wurde den Proben auf der qPCR-Platte je 2 µL Ladepuffer (6 x) hinzugegeben und die Platte für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt, mit 1 x TAE-Puffer bedeckt und die Taschen mit je 6 µL Probe beladen. Als Marker wurden 6 µL des GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladders eingesetzt. Die Proben wurden aufgetrennt bei einer Spannung von 120 V für eine Laufzeit von 33 min. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe einer UV-Lampe belichtet und das Bild mit einer Kamera festgehalten.

2.13 Transkriptomanalyse von PHs mittels *next-generation-sequencing* (NGS)

Bei Transkriptomanalyse mittels Sequenzierung der nächsten Generation (engl.: *next generation sequencing*, NGS) handelt es sich um eine sehr sensitive Sequenzierungsmethode, die es ermöglicht einzelne Transkripte aufzuspüren. Sie wurde zusammen mit der dazugehörige Auswertung wurden am Heinrich-Pette-Institut (HPI) in Hamburg durchgeführt. Es wurde eine Probe totaler RNA aus am FACS sortierten PHs des Genotyps $hml, GFP > w^{1118}$ zunächst am Bioanalyser auf ihre Integrität hin untersucht, im Qubit die Konzentration bestimmt und die Probe dann mit einer Konzentration von 33,7 ng/µL in insgesamt 9 µL RNase-freiem H₂O eingeschickt. Die sich anschließende Sequenzierung erfolgte in einem Illumina HiSeq 2500 v3.

Beim NGS von RNA wird aus der totalen RNA zunächst mRNA isoliert, die sich von anderen RNA-Arten dadurch unterscheidet, dass sie einen Poly(A)-Schwanz trägt, der sie unter anderem vor dem Abbau schützt. Dies ermöglicht eine gezielte Isolierung von mRNA mit deren Hilfe ein genaues Bild erhalten werden kann, welche Gene in PHs tatsächlich exprimiert werden. Nach der Isolierung der mRNA wird diese in cDNA umgeschrieben, aus der wiederum in einem ersten Schritt die Sequenzierungsbibliothek erstellt wird. Die Doppelstränge werden zu dem Zweck getrennt, mittels „shotgun“-Methode in zufällige Fragmente zerteilt und diese, je nach Strangende, mit einem von zwei bestimmten Adapteroligonukleotiden ligiert.

Für die sich anschließende Sequenzierung wird eine Sequenzierungs-Flusszelle mit einem Rasen zweier bestimmter Oligonukleotide bestückt, die zu den Adapteroligonukleotiden komplementär sind. Die Flusszelle wird nun mit den Fragmenten der Bibliothek beladen. Jedes Fragment bindet durch Hybridisierung des Adapters an die Oligonukleotide auf der Flusszelle und stellt den Startpunkt für einen Sequenzierungscluster dar. Eine Polymerase bildet den komplementären Strang und der Originalstrang wird abgewaschen. Bei der sogenannten Cluster-Verstärkung bilden die gebundenen Fragmente eine Brücke und binden mit dem freien Adapter an ein komplementäres Oligonukleotid auf der Flusszelle. Eine

Polymerase erstellt den komplementären Strang. Die doppelsträngigen Brücken werden wieder aufgeschmolzen. Die zwei Einzelstränge bilden im nächsten Zyklus wieder eine Brücke usw. Auf diese Weise entstehen Cluster mit vielen Kopien des Ausgangsstranges und den dazu komplementären Strängen. Diese reversen Stränge werden am Ende wieder abgewaschen, so dass nur die Kopien der Ausgangsstränge auf der Flusszelle verbleiben. In einem dritten Schritt beginnt nun die eigentliche Sequenzierung. Hierbei wird zunächst ein Sequenzierungsprimer an das Template gebunden und nach und nach Nukleotide angebaut, die je nach Art an eines von vier Fluorochromen gebunden sind und außerdem einen reversiblen Kettenabbruch herbeiführen. Nach jedem Bindungsschritt werden die Cluster mittels Laser angeregt und die Emission detektiert. Anschließend wird das terminierte Nukleotid enzymatisch gespalten, so dass in einer weiteren Runde ein neues Nukleotid angehängt werden kann, usw. Ein Cluster liefert so die Sequenz eines sogenannten „Reads“. Diese Reads werden am Ende mit einem Referenzgenom, in diesem Fall dem von *Drosophila melanogaster* verglichen und so deren Locus im Genom identifiziert. Je mehr Reads am Ende einem Gen zugeordnet werden können, desto stärker wurde es exprimiert.

2.14 Luciferase Reporter Assay

Der Luciferase Reporter Assay wurde verwendet, um die Expression an *luciferase* in stabil transfizierten Dipt-Zellen zu quantifizieren. Da in diesen Zellen das *luciferase*-Gen unter Kontrolle des *diptricin*-Promotors steht, kann mit Hilfe des Assays die *dipericin*-Expression und damit die Aktivierung des Imd-Signalweges abhängig von der jeweiligen Stimulation quantifiziert werden.

In einer 96 Well Platte wurden $8 \cdot 10^4$ Dipt-Zellen je Well in 100 μ L Kulturmedium (Tab. 6) ausgesät. Zur Vorstimulation der Zellen wurde dem Medium 1 μ M 20E (Stammkonzentration: 1 mM) zugesetzt. Die Zellen wurden bei 25 °C für 24 h inkubiert. Es wurden immer auch Kontrollen mit unstimulierten Zellen mitgeführt. Diese Zellen wurden erst unmittelbar vor der Konfrontation mit PGN ausgesät. 20E hat eine proliferationshemmende Wirkung auf Hämocyten. Demnach wären 24 h später viel mehr Zellen in den unstimulierten Wells gewesen, wären sie gleichzeitig mit den stimulierten Zellen ausgesät worden.

Nach der 24-stündigen Vorstimulation mit 20E werden nun je Well 1 μ L einer *E. coli* PGN-Verdünnung in Kulturmedium zugegeben. Die Negativkontrollen enthalten die entsprechende Menge Kulturmedium. Je nach Fragestellung wurden die Konzentrationen und Arten von PGN variiert. Dabei wurde das zugegebene Volumen aber nicht variiert. Auch die Zugabe der BAs, sofern Teil der Fragestellung, erfolgte zu verschiedenen Zeiten und Konzentrationen in immer gleichen Volumina.

2.14.1 Bright-Glo® Luciferase Assay System

In allen Versuchsansätzen erfolgte nach insgesamt 30-stündiger Zellstimulation die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität am GloMax®-Multi Mikroplatten Luminometer. Gemäß des Bright-Glo® Assay Protokolls (Vers. 9/2015) wurden 100 μ L Bright-Glo®

Reagenz bei RT den Zellen hinzugefügt und 2 min inkubiert. Das Reagenz lysiert die Zellen und liefert außerdem das Substrat (D-Luciferin), welches von der Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt wird.

Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Lumineszenz frei, die proportional zur Menge der synthetisierten Luciferase und damit in diesem System zur Expression von *dipteracin* ist (Abb. 10).

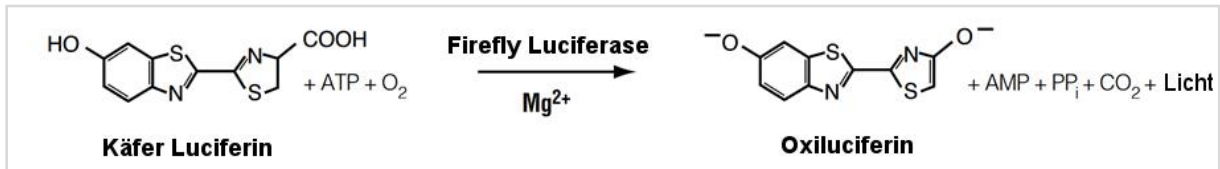


Abb. 10: Luciferase-Reaktion aus [167]. Die Reaktionsgleichung beschreibt die Umsetzung von Leuchtkäfer-Luciferin zu Oxiluciferin durch die Luciferase des amerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*).

Das Zelllysat wurde in eine 96 Well Luminometerplatte pipettiert. Dabei wurde immer ein Well frei gelassen, um zu verhindern, dass das Signal benachbarter Wells interferiert („crosstalk“).

Als Negativkontrolle wurde nur das Reagenz ohne Zellen eingesetzt, als Positivkontrolle wurden dem Reagenz 100 µL einer 1:10⁷ in Glo Lysis Puffer verdünnten rekombinanten Luciferase (QuantiLum[®]) zugegeben. Auf dieses Signal ließ sich später normieren, so dass die verschiedenen biologischen Replikate an unterschiedlichen Tagen vergleichbar wurden. Das Lumineszenzsignal wurde schließlich im Luminometer gemessen. Es bleibt im Bright-Glo[®]-Assay System für etwa 15 min konstant.

2.14.2 CellTiter-Glo[®] (Lumineszenter Zellviabilitäts Assay)

Der Bright-Glo[®] Assay reagiert recht sensibel auf bereits kleine Schwankungen in der Zellzahl. Um die unterschiedlichen biologischen Replikate vergleichbar zu machen und darüber hinaus eine Kontrolle für die Zellviabilität zu haben, wurde zusätzlich auf der gleichen Platte noch der CellTiter-Glo[®] Assay durchgeführt. Dieser Assay ermöglicht die Quantifizierung von ATP ebenfalls basierend auf der Luciferase-Reaktion (Abb. 10). Das Reagenz enthält Luciferin und Luciferase, die das von den Zellen bereitgestellte ATP zur Umsetzung des Luciferins in Oxyluciferin nutzt. Zunächst wurde gemäß des Assay Protokolls (Vers. 3/2015) eine Standardkurve mit unterschiedlichen Zellzahlen erzeugt, anhand derer später auf die genaue Zellzahl rückgeschlossen wurde.

Mit Hilfe der genauen Zellzahl konnte die relative Lumineszenz aus dem Bright-Glo[®] Assay auf die Zellzahl normiert werden. Hier wurden 10⁵ Zellen als Normierungswert festgelegt.

Zur Durchführung des CellTiter-Glo[®] Assays wurden zusätzliche Wells genau wie für den Bright-Glo[®]-Assay angesetzt. Anstelle des Bright-Glo[®] Reagenzes wurden 100 µL CellTiter-Glo[®] Reagenz zugegeben. Die Zellen wurden während der anschließenden 10-minütigen Inkubation lysiert und das Lysat auf die Luminometerplatte pipettiert. Die Messung fand zeitgleich mit der des Bright-Glo[®] Assays statt, da beide Zelllysate auf die gleiche Luminometerplatte pipettiert wurden.

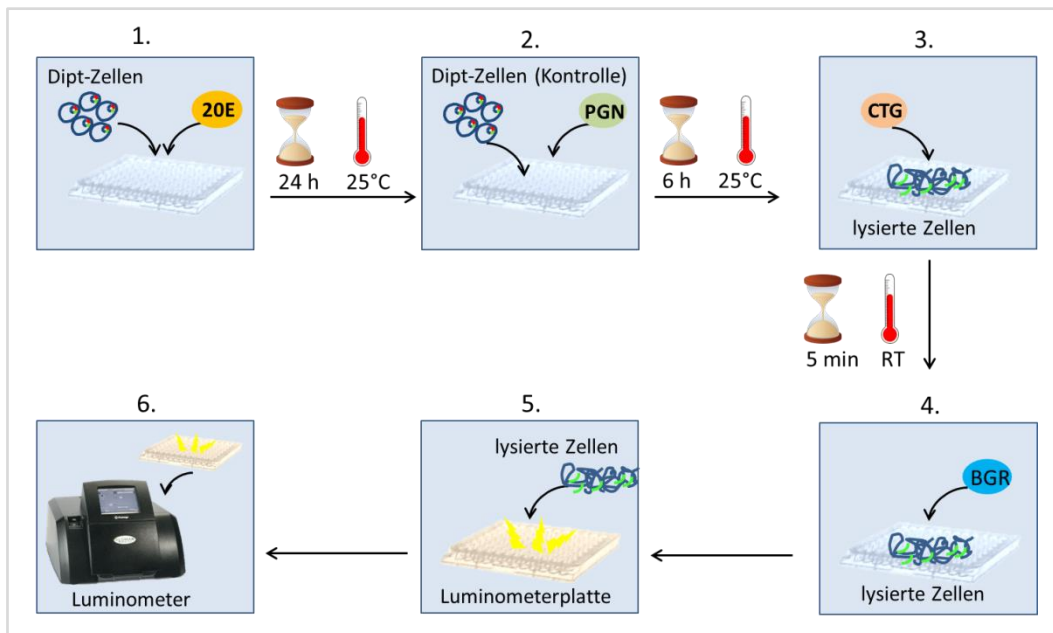


Abb. 11: Übersicht zur Durchführung des Luciferase-Assays. 1. Dipt-Zellen wurden ausgesät und mit 20E für 24 h bei 25 °C stimuliert. 2. Zellen wurden mit Peptidoglykan (PGN) stimuliert und weitere 6 h inkubiert. 3. CellTiter-Glo[®] (CTG)-Reagenz wurde hinzugegeben und die Zellen somit lysiert. 4. Nach fünfminütiger Inkubation wurde das Bright-Glo[®] Reagenz (BGR) zu einem weiteren Set an Zellen hinzugegeben. 5. Nun wurden die lysierten Zellen auf eine Luminometerplatte überführt und 6. das Lumineszenzsignal im Luminometer bestimmt.

2.14.3 Bestimmung der optimalen PGN-Konzentration

Zunächst sollte bestimmt werden, ob PGN von *E. coli* oder *B. subtilis* besser geeignet ist zur Aktivierung des Imd-Signalweges in Dipt-Zellen. Das *B. subtilis*-PGN ist kommerziell erhältlich. Das *E. coli*-PGN wurde am Forschungszentrum Borstel in der Gruppe von Otto Holst hergestellt. Es wurde aus dem K12-Stamm gewonnen und durch spezielle Aufreinigung von LPS befreit. Nachdem die Zellen, wie unter 2.14 zu Anfang beschrieben, ausgesät und vorstimuliert wurden, erhielten die Wells 24 h nach der Zellaussaat eine Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an PGN. Dabei wurde dieses jeweils so verdünnt, dass es den Wells in immer gleichen Volumina (1 µL) zugegeben werden konnte. Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Volumen an Kulturmedium hinzu gegeben. Nach 6 h Inkubation mit PGN wurden der Bright-Glo[®]- bzw. CellTiter-Glo[®]-Assay durchgeführt wie unter 2.14.1 und 2.14.2 beschrieben.

2.15 Phagozytose-Assay

Im Phagozytose-Assay wurden PHs *ex vivo* bzw. S2-Zellen *in vitro* mit pHrodo[®] *S. aureus* bzw. *E. coli* Biopartikeln zusammen inkubiert, die von den Zellen phagozytiert wurden. Die Biopartikel sind mit einem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff markiert, der bei neutralem pH-Wert eine schwache Fluoreszenzintensität aufweist, bei niedrigem pH – wie im Phagosom zu erwarten – jedoch sehr viel intensiver rot fluoresziert. Diese Intensitätsverschiebung kann

mit dem Durchflusszytometer im PE-Kanal detektiert werden. Um zu gewährleisten, dass ausschließlich vitale Zellen in die Auswertung eingehen, wurde außerdem eine Lebendfärbung mit Calcein Blue AM durchgeführt. Die Wahl des Farbstoffes wurde beeinflusst durch die Tatsache, dass die pHrodo[®] Biopartikel durch Totfarbstoffe wie Propidiumiodid ebenfalls angefärbt werden. Auch wenn die Partikel nicht von den Zellen phagozytiert werden, lagern sie sich an der Zellwand an. Die Zellen erscheinen dann fälschlicherweise als tot. Daher wurde ein Lebendfarbstoff benötigt, der in einem der freien Kanäle detektiert werden konnte. Dies trifft auf Calcein Blue zu, welches durch den UV-Laser angeregt im Dapi-Kanal detektiert wird. Das Aussortieren der Hämocyten als solche erfolgte im Fall der PHs über das GFP-Signal.

2.15.1 Durchführung

2.15.1.1 Grundprotokoll PHs

Das Ansetzen der Kreuzung, das Sammeln und Waschen der Larven, sowie die Isolation der PHs erfolgte weitestgehend wie unter 2.8.2 beschrieben. Es wurden abweichend davon nur 12 Weibchen und 12 Männchen je Well ausbluten gelassen. Nicht mehr als drei Wells wurden pro Experiment mit Hämocyten gefüllt, da die zuerst isolierten Hämocyten sonst viel länger außerhalb der Larve verblieben als die zuletzt isolierten. Erfahrungsgemäß führte dies zu einer Verschlechterung der Vitalität respektive Phagozytoseaktivität der Hämocyten und somit zu starken Abweichungen in den Ergebnissen.

Der Inhalt jedes Wells wurde anschließend gut resuspendiert und in ein Well einer 40 µm MultiScreen-Mesh-Platte gegeben, um größere Gewebebestandteile wie z. B. Cuticula oder Fettkörper zu entfernen.

Die verbliebene Zellsuspension eines Wells wurde zu gleichen Teilen auf zwei neue Wells der ULA-Platte verteilt. Bis zu diesem Zeitpunkt verblieben die Zellen stets auf Eis.

Die Partikel wurden in ein kleines, steriles Glasröhrchen überführt und 5 min in ein Ultraschallbad gestellt, um eine Vereinzelung der Partikel sicher zu stellen.

Die ULA-Platte mit den isolierten Hämocyten wurde in der Zwischenzeit bei 700 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert und danach das Medium unter einem Mikroskop vorsichtig gegen 196,7 µL HBSS+-Puffer ausgetauscht. Die Platte wurde danach wieder auf Eis gestellt. Von nun an wurde so dunkel wie möglich gearbeitet, da die zuzufügenden Biopartikel lichtempfindlich sind. Es wurden 3,32 µL (etwa $2 \cdot 10^6$ Partikel) der pHrodo[®] -Suspension (Stammkonzentration: 2 mg/mL) den Wells hinzugefügt und die Platte bei 150 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde sie auf einer Wärmeplatte bei 27 °C für 15 min im Dunkeln inkubiert und nach Ablauf der Zeit wieder für 5 min auf Eis gestellt. Der Inhalt der Wells wurde gut resuspendiert und in eisgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Es wurde noch 1 µL einer 1:10 in HBSS+-Puffer verdünnten Calcein Blue-Färbelösung (Stammkonzentration: 10 mM) zu den 200 µL Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden mit dem Lebendfarbstoff 30 min auf Eis inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Negativkontrollen wurden anstelle der Inkubation bei 27 °C auf 4 °C auf einer weiteren Platte belassen, da die derart verminderte Zellaktivität wenig bis keine Phagozytose zulässt.

Zur Messung der Phagozytoserate wurde ein LSR II Durchflusszytometer verwendet. Hier wurden durch Gating zunächst Dubletten ausgeschlossen und dann die GFP-positiven Zellen ausgewählt. Das Signal des pHrodo[®]-Farbstoffs wurde im PE-Kanal gemessen und das geometrische Mittel der Punktwolke als Zielwert aufgetragen (Abb. 12).

2.15.1.2 Phagozytosezeiten

Für das Austesten der optimalen Phagozytosezeit wurden die Zellen für jeden Zeitpunkt auf eine eigene Platte ausgesät und auf Eis gestellt. Die Partikel wurden dann zunächst der ersten Platte zugegeben, diese zentrifugiert und in den Brutschrank gestellt. Dann wurden der nächsten Platte Partikel zugegeben, diese zentrifugiert und mit dem gewünschten Zeitabstand zur vorherigen Platte in den Brutschrank gestellt usw. Nach Ablauf der Zeit wurden alle Platten gleichzeitig für 5 min auf Eis gestellt, die Zellen dann in eisgekühlte FACS-Röhrchen überführt und 1 μ L einer 1:10 verdünnten Calcein Blue-Färbelösung zugegeben.

2.15.1.3 bPac⁺-Hämozyten

L3-Larven mit dem Genotyp hml,GFP > bPac wurden zunächst mikroskopisch sortiert. Jene, die GFP nur in den Hämozyten tragen, sind bPac-positiv (bPac⁺), solche die darüber hinaus auch ein GFP-Signal in Ösophagus und Vorderdarm aufweisen bPac-negativ (bPac⁻). Letztere dienen als Negativkontrolle. Es wurden Hämozyten aus beiden Larven-Typen isoliert wie unter 2.8.2 beschrieben. Dabei wurde der Raum soweit wie möglich verdunkelt und die Isolation unter Rotlicht durchgeführt, um sicherzugehen, dass bPac in den Hämozyten nicht bereits durch normales Licht aktiviert wird, welches auch einen gewissen Blaulichtanteil enthält. Die weitere Behandlung der Hämozyten erfolgte wie unter 2.15.1.1 beschrieben. Abweichend davon wurden die Zellen für den Assay auf einer speziell präparierten ULA 96 Well Platte ausgesät. Die Platte war von außen zur Hälfte mit schwarzer, lichtundurchlässiger Folie beklebt. Die mittlere Reihe Wells sowie deren Zwischenräume wurden mit Erioglaucin-eingefärbtem Wasser gefüllt, um Lichtreflexionen von der hellen zur dunklen Seite zu vermeiden. Auf diese Art konnten die Kontrollzellen auf der gleichen Platte inkubiert werden wie die mit Blaulicht bestrahlten Zellen. Die Inkubation der Zellen mit den Partikeln für 15 min erfolgte unter Blaulicht. Die verwendete LED-Lampe strahlte im Abstand von 40 cm senkrecht auf die Platte. Durch den Abstand wurde näherungsweise eine Lichtintensität von 0,1 mW/mm² erreicht – eine Intensität, die einer entsprechenden Veröffentlichung entnommen wurde [168].

2.15.1.4 S2-Zellen

Wurde der Assay zusammen mit einer Zugabe von BAs durchgeführt, wurden anstelle von PHs S2-Zellen verwendet. Diesen wurde nach der Zentrifugation zunächst nur 96,7 μ L HBSS+-Puffer zugegeben. Die BAs wurden dann in 100 μ L HBSS+-Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen unmittelbar vor der Zugabe der Partikel ebenfalls auf Eis

hinzugefügt. Es wurde dafür zunächst eine Verdünnungsreihe hergestellt, die mit einer Multipipette pipettiert wurde, um zeitliche Varianzen zu minimieren. Anschließend erfolgte die Zugabe der Biopartikel und der Versuch dann, wie unter 2.15.1.1 beschrieben, weiter durchgeführt. Es wurden hier je Konzentration drei technische Replikate hergestellt.

2.15.2 Auswertung

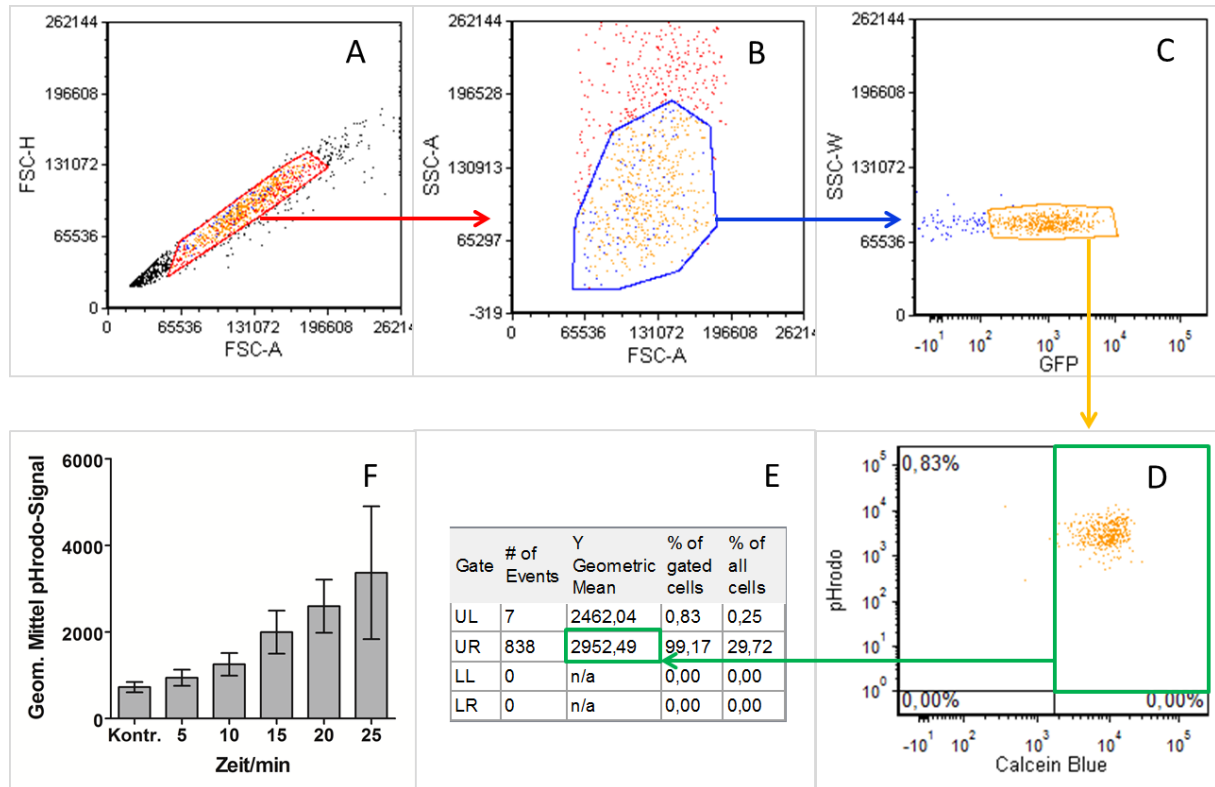


Abb. 12: Gating-Strategie zur Auswertung der Phagozytoseaktivität von PHs nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit pHrodo® *S.aureus* Biopartikeln. Zuerst fand ein Dublettenausschluss statt (A, B). Anschließend wurden die Hämozyten mittels GFP aussortiert (C) und am Ende noch tote Zellen über Calcein Blue-Färbung ausgeschlossen (D) bevor der geometrische Mittelwert aller Punkte im Verbliebenen Gate bestimmt wurde. F: Zusammenfassung aus sechs unabhängigen Experimenten.

Die Gating-Strategie wurde so gewählt, dass zunächst ein Dubletten-Ausschluss (Abb. 12 A und B) erfolgte. Anschließend wurden die Hämozyten anhand des positiven GFP-Signals aussortiert (Abb. 12, C). In Abb. 12, D wurden die Calcein Blue negativen Zellen ausgeschlossen, von denen allerdings meist nach dem vorangehenden Auswahlverfahren nicht mehr viele vorhanden waren. Als finaler Messwert wurde das geometrische Mittel des pHrodo®-Signals für zwei bis drei technische Replikate bestimmt und am Ende der Mittelwert aus mindestens drei biologischen Replikaten aufgetragen.

2.16 cAMP-Glo® Assay

Um eine Möglichkeit zur Überprüfung der Aktivierung von bPac in PHs zu haben und auch als Kontrolle für die Aktivierung entsprechender GPCRs in S2-Zellen nach Gabe verschiedener Konzentrationen an BAs, wurde der cAMP-Glo® Assay für diese Zellen etabliert. In diesem Assay wird nicht direkt die Menge an cAMP detektiert, sondern die Abnahme von ATP, welches von Adenylylcyclasen zu cAMP umgewandelt wird. Das über das Detektions-Reagenz eingebrachte ATP wird in Abwesenheit von cAMP vollständig in einer Luciferase-Reaktion verbraucht, die dann in einem maximalen Lumineszenzsignal resultiert. Ist cAMP vorhanden, aktiviert dieses die Protein Kinase A, die ebenfalls im Detektions-Reagenz bereitgestellt wird und die ihrerseits ATP verbraucht. Die Kinase tritt in Konkurrenz mit der Luciferase um das ATP, was zu einer Reduktion des Lumineszenzsignals führt. Je mehr intrazelluläres cAMP also vorhanden ist, desto geringer ist das resultierende Lumineszenzsignal.

Um eine detektierbare Menge an intrazellulärem cAMP zu akkumulieren, muss der Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen verhindert werden, die in der Zelle die Ausbreitung von cAMP strikt kontrollieren. Dies wird erreicht durch Inkubation der Zellen in Medium, welches die Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX und Ro 20-1724 enthält (Induktionsmedium, IM). Es wurde weitestgehend nach Hersteller-Protokoll (Vers. 2013) gearbeitet. Lediglich Zellzahlen und Inkubationszeiten wurden teilweise angepasst.

2.16.1 Primärhämozyten

Es wurden 12 Weibchen und 12 Männchen der bPac⁺-Larven sowie 15 Weibchen und 15 Männchen der bPac⁻-Larven aussortiert, gewaschen und in je 330 µL Schneider-Medium ausbluten gelassen. Die Zellen wurden anschließend gezählt, in einem Volumen IM 1 so aufgenommen, dass eine Konzentration von 666,67 Zellen/µL vorlag. Je Well einer zur Hälfte verdunkelten ULA-Platte wurden 50 µL Zellsuspension pipettiert. Die Hämozyten wurden zunächst im Dunkeln für 20 min bei 27 °C auf einer Wärmeplatte inkubiert. Dann wurde für 15 min das Blaulicht angestellt. In der Zwischenzeit wurden auf einer 384 Well Luminometerplatte je Well 7,5 µL Lysepuffer vorgelegt, zu dem 7,5 µL der jeweiligen Zellsuspension nach Ablauf der Bestrahlungszeit unmittelbar pipettiert wurden. Es wurden drei technische Replikate für jeden Ansatz pipettiert. Die Platte mit den Zellen wurde für 20 min bei 27 °C auf einem Schüttler geschüttelt und zu dem Zellysat anschließend mit einer Multipipette 15 µL Detektions-Reagenz gegeben. Die Platte wurde für 30 s geschüttelt und für weitere 20 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 30 µL Kinase-Glo Reagenz je Well hinzu pipettiert, die Platte kurz geschüttelt und in das Luminometer gestellt, wo sie für 10 min bei 25 °C inkubiert wurde bis schließlich die Messung des Lumineszenzsignals erfolgte.

Die RLU's wurden zur Auswertung auf den Mittelwert der jeweiligen Wasserkontrolle normiert. In Abb. 13 ist gezeigt, wie sich die cAMP-Konzentration bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer entwickelt. Bereits fünfminütige Bestrahlung mit Blaulicht, erhöht die cAMP-Konzentration fast bis an die Detektionsgrenzen des Assays.

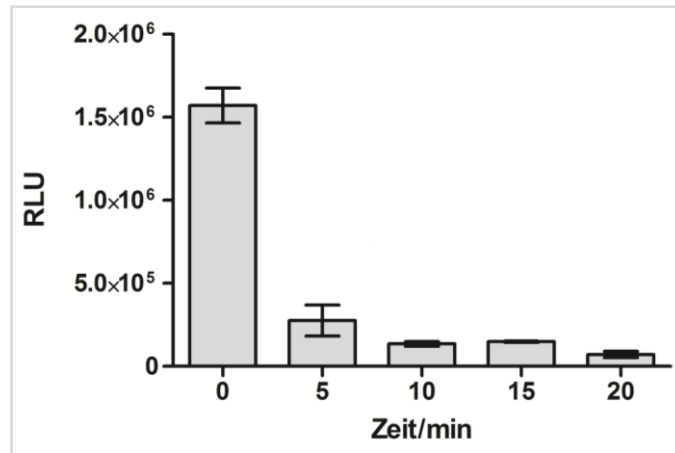


Abb. 13: Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in bPac⁺-PHs nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer. bPac⁺-PHs wurden aus L3-Larven isoliert, für 20 min in Schneider-Medium mit 500 μ M IBMX und 100 μ M Ro 20-1724 im Dunkeln bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden sie unterschiedlich lang mit Blaulicht bestrahlt (450 nm, \sim 0,1 mW/mm²). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe des cAMP-Glo Assay Kits die relative Lumineszenzintensität (RLU) bestimmt, die sich invers proportional zur cAMP-Konzentration verhält. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

2.16.2 S2-Zellen

Für die Durchführung mit S2-Zellen wurden 10000 Zellen in 3,75 μ L IM 2 je Well einer 384 Well Luminometerplatte eingesetzt. Dann wurden unterschiedliche Konzentrationen verschiedener BAs in IM 2 vorverdünnt und in 3,75 μ L zu den Zellen pipettiert. Die Platte wurde für 30 min bei 25 °C inkubiert und anschließend 7,5 μ L Lysepuffer je Well zugegeben. Von hieran wurde genau wie bei den PHs in Abschnitt 2.16.1 vorgegangen.

2.17 Zelladhäsionsbestimmung

Um die Zelladhäsionseigenschaften zu quantifizieren wurde die Ausbreitungsfläche von PHs bestimmt. Hierfür wurden zunächst PHs aus bPac⁺- und bPac⁻-Larven wie unter 2.16.1 isoliert. Nachdem die Zellsuspensionen über je ein Well der Siebplatte gegeben wurden, wurde das verbliebene Volumen auf Wells zweier Chamber-Slides aufgeteilt und das Volumen je Well auf 200 μ L Schneider-Medium aufgefüllt. Auf jedem Slide gab es demnach ein Well mit bPac⁺- und eines mit bPac⁻-Hämozyten. Beide Slides wurden nun für 30 min bei 25 °C auf einer Wärmeplatte mit Alufolie abgedeckt inkubiert. Anschließend wurde von einem Slide die Alufolie abgenommen und das Blaulicht (λ = 450 nm) für 15 min auf die Slides gerichtet. Danach wurde zügig das Medium abgenommen und gegen 200 μ L eiskaltes 3%iges PFA ersetzt. So wurden die Zellen für 12 min fixiert. Nach dem Entfernen des PFAs wurde drei Mal mit PBS (1 x) gewaschen. Dann wurde für 5 min mit PBS inkubiert, welches 0,1 % Triton X-100 enthielt. Dieses wurde gegen PBS getauscht, dem 0,1 % Triton X-100 und 1 % BSA zugesetzt wurden und welches für 30 min auf den Zellen verblieb. Die Lösung wurde abgenommen und durch die Färbelösung bestehend aus 96,5 μ L PBS (1 x), 1 μ L anti- α -

Tubulin, 1 μL Dapi und 1,5 μL Alexa Fluor 647 Phalloidin ersetzt. Die Färbung des α -Tubulins ermöglicht die Visualisierung des Zellsomas, während Alexa Fluor 647 Phalloidin das F-Aktin der Zelle und damit das gesamte Zytoskelett mit sämtlichen Zellausläufern anfärbt. Nach 40 min Inkubation wurde die Färbelösung abgenommen und drei Mal mit PBS (1 x) gewaschen. Zum Schluss wurde das PBS für 30 min im Well belassen, dann abgenommen und mit Dabco die Zellen eingedeckelt. Das Deckgläschen wurde mit klarem Nagellack befestigt und die Slides bei 4 °C dunkel gelagert.

Die mikroskopische Bildaufnahme erfolgte am Leica SP5 Laser-Scanning Mikroskop mit einem 63 x 1,4 Ölobjectiv. Die Bilder wurden bei einer Auflösung von 1024 x 1024 px im „Photocounting Mode“ aufgenommen.

Für die Auswertung wurden ImageJ und Gimp verwendet. In Gimp wurde zunächst sowohl für das Bild des roten Kanals (F-Aktin) als auch das Bild des grünen Kanals (α -Tubulin) eine schwarz-weiß-Maske der Zellen erzeugt (Zellen weiß, Hintergrund schwarz). In ImageJ wurden die weißen Regionen mit Hilfe des ROI-Managers ausgewählt und deren Fläche bestimmt. Die Gesamtfläche wurde definiert als Fläche des F-Aktins einer Zelle. Für die Berechnung der Ausbreitungsfläche wurde die Fläche des α -Tubulins von der Gesamtfläche der Zelle subtrahiert.

2.18 Überlebensversuche

2.18.1 Ansetzen zeitlich synchronisierter Fliegen

Für das Ansetzen der Überlebensversuche wurde sich am Protokoll aus [169] orientiert.

Auf einer Grapefrucht-Agar Platte wurde mit einem Wattestäbchen etwas Hefepaste (2,8 mL Wasser mit 1,5 g Trockenhefe vermischt) mit einem Durchmesser von 2 bis 3 cm verteilt. Dann wurden 200 Fliegenpaare in einen Eiablagekäfig gesetzt und dieser mit der Grapefrucht-Agar Platte verschlossen. Die Fliegen verblieben im Eiablagekäfig für 20 h bei 25 °C im Brutschrank. Die Agar Platte der ersten Eiablage wurde verworfen und gegen eine neue ausgetauscht, auf der ein ca. 1 cm großer Kreis mit Hefepaste ausgestrichen wurde. 20 h später wurde die Platte erneut ausgetauscht.

Auf die Platte mit den Eiern wurden 2 mL PBS (1 x) gegeben und die Eier mit einem Wattestäbchen vorsichtig gelöst. Dann wurden sie mit Hilfe eines Trichters im PBS in ein Falcon Tube überführt und so oft mit PBS gewaschen bis alle Hefereste entfernt waren.

Zuletzt wurden 2 mL PBS im Röhrchen behalten. Mit Hilfe einer gekürzten Pipettenspitze wurden 50 μL Eier aufgenommen und in ein großes Fliegen-Kulturröhrchen überführt. Weitere 50 μL PBS aus dem Überstand wurden anschließend aufgenommen und auch in das Röhrchen gespritzt, um so evtl. an der Spitze hängen gebliebene Eier abzuwaschen. Auf diese Art wurden so viele Röhrchen wie nötig angesetzt. Aus den synchronisierten Röhrchen wurden etwa 10 Tage später Männchen und jungfräuliche Weibchen abgesammelt und je 50 Tiere nach Geschlecht getrennt in große Kulturröhrchen mit Standardmedium gesammelt. Nach drei Tagen wurden sie auf frisches Medium umgesetzt und weitere drei bis vier Tage später mit *Ecc15* infiziert.

2.18.2 Bakterienkultur

Für die Infektion der adulten Tiere wurde eine Übernachtkultur von *Ecc15* angesetzt. Hierfür wurden in einen 250 mL Erlenmeyerkolben unter einer Sterilwerkbank 50 mL LB-Medium gefüllt und 5 μ L eines Glycerolstocks von *Ecc15* hinzugegeben. Das beimpfte Medium wurde bei 29 °C und 210 rpm im Schüttler über Nacht (14-15 h) inkubiert.

2.18.3 Infektion der Fliegen

Zunächst wurden in die Hälfte der abgesammelten, fünf bis sechs Tage alten Fliegen intrathorakal je 13,8 nL steriles PBS (1 x) mit einem Drummond Nanoject II und einer Glaskapillare injiziert (Abb. 14, A). Hierfür wurden immer 50 Fliegen auf einmal auf einem CO₂-Pad betäubt. Die Tiere verblieben dort maximal 10 min während der Injektion. Dann wurden sie in ein präpariertes großes Fliegen-Kulturröhrchen überführt (Abb. 14, B), welches von nun an stets liegend gelagert wurde, um ein versehentliches Festkleben der Tiere am Medium zu vermeiden. Auf die Art wurden 2 x 50 w¹¹¹⁸ Weibchen, 2 x 50 w¹¹¹⁸ Männchen, 2 x 50 Weibchen eines KO-Stammes und 2 x 50 Männchen des gleichen KO-Stammes behandelt.

Die Röhrchen für die Überlebensversuche waren große Kulturröhrchen, deren Boden abgesägt wurde. Dort wurden sie mit einem Milbenstopfen verschlossen. Vor der andere Öffnung wurde eine Petrischale (60 mm Durchmesser) mit Standardfliegenmedium mit Hilfe von Parafilm befestigt. Außerdem befand sich noch ein zugeklebtes Loch mit 4 mm Durchmesser im Röhrchen, welches dem Entsorgen toter Tiere während des Experimentverlaufs diente (Abb. 14, B).

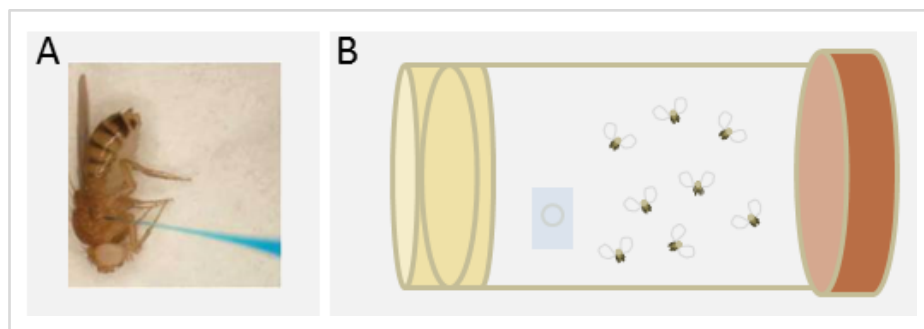


Abb. 14: A: Intrathorakale Injektion einer Fliege mit einer Glaskapillare [170]. B: Röhrchen für Überlebensversuche. Auf der linken Seite ist das Röhrchen mit einem Milbenstopfen verschlossen, auf der rechten Seite befindet sich eine Petrischale mit Standardfliegenmedium. Ein kleines, abgeklebtes Loch in der Seite ermöglicht das Entsorgen toter Fliegen während des Experimentes.

Anschließend wurde die Extinktion (optische Dichte) einer *Ecc15* Übernachtkultur nach 14 h in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. 1 mL der Bakteriensuspension wurde bei 4 °C und 3200 x g für 10 min in einem 1,5er Zentrifugenröhrchen zentrifugiert, das LB-Medium abgenommen und das Pellet in dem nötigen Volumen PBS resuspendiert, um eine OD₆₀₀ von 10 einzustellen. Die Bakterien

wurden auf Eis gestellt und die Suspension direkt im Anschluss an die PBS-Kontrollen in ein gleiches Set an Fliegen injiziert. Die Röhren mit den Fliegen wurden liegend in einem Brutschrank bei 29 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h gelagert.

2.18.4 Experimentverlauf

Die Fliegen, die in den ersten 24 h nach der Injektion starben, wurden gezählt und so behandelt als wären sie nie Teil des Experimentes gewesen. Die Ausgangszahl N wurde also um diese Tiere korrigiert. Damit sollte verhindert werden, dass Todesfälle, die auf die Verletzung allein zurückzuführen sind, die Auswertung beeinflussen. Die Anzahl der toten Fliegen wurde jeden Tag notiert und nach Möglichkeit wurden die toten Tiere über das Loch im Röhren entsorgt. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt, indem die Röhren mit dem Stopfen zuunterst auf einen Tisch geklopft wurden. Dies hielt die Fliegen unten und die Petrischale konnte gegen eine neue mit frischem Medium gewechselt werden. Somit wurde eine erneute CO₂-Betäubung der Tiere vermieden. Die Fliegen wurden insgesamt für 14 Tage beobachtet.

2.18.5 Auswertung

Die Auftragung der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier wurde in GraphPad durchgeführt. Hierbei wurden tote Fliegen mit „1“ bezeichnet, Tiere, die aufgrund anderer Umstände nicht mitgezählt werden konnten (z. B. weil sie beim Mediumswechsel entwischen konnten) wurden zensiert und mit „0“ bezeichnet. Dabei beginnt die Zählung 24 h nach der Infektion, um mögliche Effekte durch die Verwundung selbst auszuschließen.

3 Ergebnisse

3.1 Biogene Amin-Rezeptorgene werden in PHs von *Drosophila* Larven exprimiert

Zur Beantwortung der Frage, ob BAs auf die Immunantwort der Taufliege modulierend wirken können, ist es zunächst wichtig zu überprüfen, ob die entsprechenden, immunologisch relevanten Zelltypen überhaupt in der Lage sind, auf Signale der BAs zu reagieren.

Daher wurde sowohl in PHs als auch im Fettkörper zunächst die Expression der Rezeptorgene überprüft. Hierfür wurden Larven des Genotyps *hml, GFP > w¹¹¹⁸* verwendet. Die Hämocyten dieser Tiere sind GFP-positiv, was ein Sortieren am FACS und damit die Auswahl einer reinen Hämocyten-Population ermöglicht. Ein Einkreuzen des *w¹¹¹⁸*-Stammes war notwendig, da der Mutterstamm *hml-GAL4, UAS-GFP* aufgrund von Mutationen im *nimC1* Gen über einen funktionsunfähigen NimrodC1-Rezeptor verfügt, der veränderte Adhäsions- und Phagozytoseeigenschaften der Plasmatozyten zur Folge hat [171].

Durch das Einkreuzen des Wildtypallels *nimC1* wurde phänotypisch der Wildtyp der Hämocyten-Population wieder hergestellt. So adhären Hämocyten des Mutterstamms (Abb. 15, A) schlechter an Zellkulturplatten als Hämocyten aus *w¹¹¹⁸* (Abb. 15, B). Das Einkreuzen von *w¹¹¹⁸* neutralisiert diesen Effekt weitestgehend (Abb. 15, C). Darüber hinaus phagozytieren Hämocyten aus dem *hml-GAL4, UAS-GFP*-Stamm viel stärker als jene aus *w¹¹¹⁸* oder *hml,GFP > w¹¹¹⁸* (Daten nicht gezeigt), was ebenfalls dafür sprach *w¹¹¹⁸* einzukreuzen und so einen Wildtyp-Phänotyp zu erzeugen.

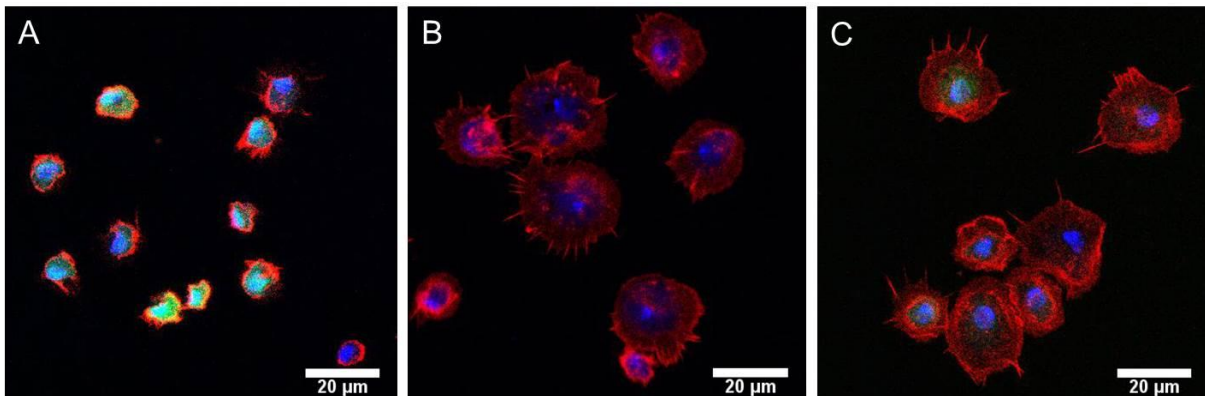


Abb. 15: PHs aus L3-Larven mit dem Genotyp *hml-GAL4, UAS-GFP* (A), *w¹¹¹⁸* (B) und *hml,GFP > w¹¹¹⁸* (C). Die Zellen wurden für 30 min bei 25 °C inkubiert, dann mit 3 % PFA fixiert und mit Dapi (Zellkern, blau) und Alexa Fluor 647 Phalloidin (F-Aktin, rot) gefärbt. Die Bilder wurden an einem Leica TCS SP5 Laser-Scanning-Mikroskop mit 63x/1.4 Öl-Objektiv aufgenommen.

Hämocyten wurden zur Analyse der Rezeptorexpression aus späten L3-Larven (*hml,GFP > w¹¹¹⁸*) isoliert, da sich in diesem Stadium kurz vor der Verpuppung eine große Anzahl dieser Zellen von der Epidermis löst und in die Hämolymphe übergeht, was die Isolation der Zellen erleichtert. Darüber hinaus sind sie zu diesem Zeitpunkt durch eine erhöhte Konzentration des Verpuppungshormons 20E besonders immunkompetent [74]. Der Fettkörper wurde hingegen aus frühen L3-Larven des gleichen Genotyps isoliert, aus dem

auch Hämocyten isoliert wurden. In späten L3-Larven unterliegt dieses Gewebe bereits beginnenden Metamorphoseprozessen, in deren Verlauf die Zellkontakte gelöst werden. Dies erschwert eine Isolation des Fettkörpers als Ganzes. Zur Bestimmung des vollständigen PH-Transkriptoms wurde RNA aus FACS-sortierten, GFP-positiven Hämocyten isoliert und eine RNA-Sequenzierung mittels NGS durchgeführt, um auch sehr schwach exprimierte BA-Rezeptoren nachweisen zu können. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der NGS-Analyse für alle BA-Rezeptoren mittels qRT-PCR validiert und semi-quantitativ ausgewertet, da die Daten aufgrund der schwachen Expression der BA-Rezeptoren nicht zuverlässig quantitativ auszuwerten waren. Als Positivkontrolle wurde RNA aus Canton S-Köpfen verwendet, da die BA-Rezeptoren hier alle exprimiert werden. In Tab.12 ist die Anzahl der den BA-Rezeptorgenen zugeordneten Fragmenten aus insgesamt 150 Mio. detektierten Fragmenten („Reads“) aufgeführt. Des Weiteren gibt die Tabelle einen Überblick über die Ergebnisse der qRT-PCR für die einzelnen BA-Rezeptoren. Zur besseren Übersicht wurde die Bandenintensität für die einzelnen Rezeptoren mit „+“, „++“ und „-“ bewertet.

Zur qualitativen Auswertung wurde beispielhaft eines von drei biologischen Replikaten auf einem 2,5%igen Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 16). Sowohl die Ergebnisse der Transkriptomanalyse als auch die der qRT-PCR zeigen, dass in Hämocyten ein Großteil der BA-Rezeptorgene exprimiert wird.

Tab. 12: Übersicht über die Rezeptorexpression biogener Amin-Rezeptoren in PHs. Die Anzahl der Reads bezieht sich auf eine Gesamtzahl von 150 Mio. Reads, die in der RNA-Sequenzierung detektiert wurden. Die Stärke der Banden aus Abb. 16 wurde semi-quantitativ mit +, ++ und - bewertet. Außerdem ist der an den Rezeptor bindende G-Proteintyp aufgeführt.

BA	BA-Rezeptor	Totale Reads	Bandenintensität auf Agarose Gel	G-Protein
Serotonin	5-HT1A	13	+	G _{i/o}
	5-HT1B	1	-	G _{i/o}
	5-HT7	7	++	G _s
	5-HT2A	0	-	G _q
	5-HT2B	3	++	G _q
Octopamin	Octβ1R	71	++	G _s
	Octβ2R	133	++	G _s
	Octβ3R	406	++	G _s
	Oamb	10	-	G _q / G _s
Octopamin Tyramin	Oct-TyrR	8	+	G _q G _{i/o}
Tyramin	TyrR	0	+	G _q
	TyrRII	0	-	G _{i/o}
Dopamin	Dop2R	0	++	G _{i/o}
	DopEcR	0	-	G _s
	Dop1 R1	11	+	G _s
	Dop1 R2	6	-	G _s

3 Ergebnisse

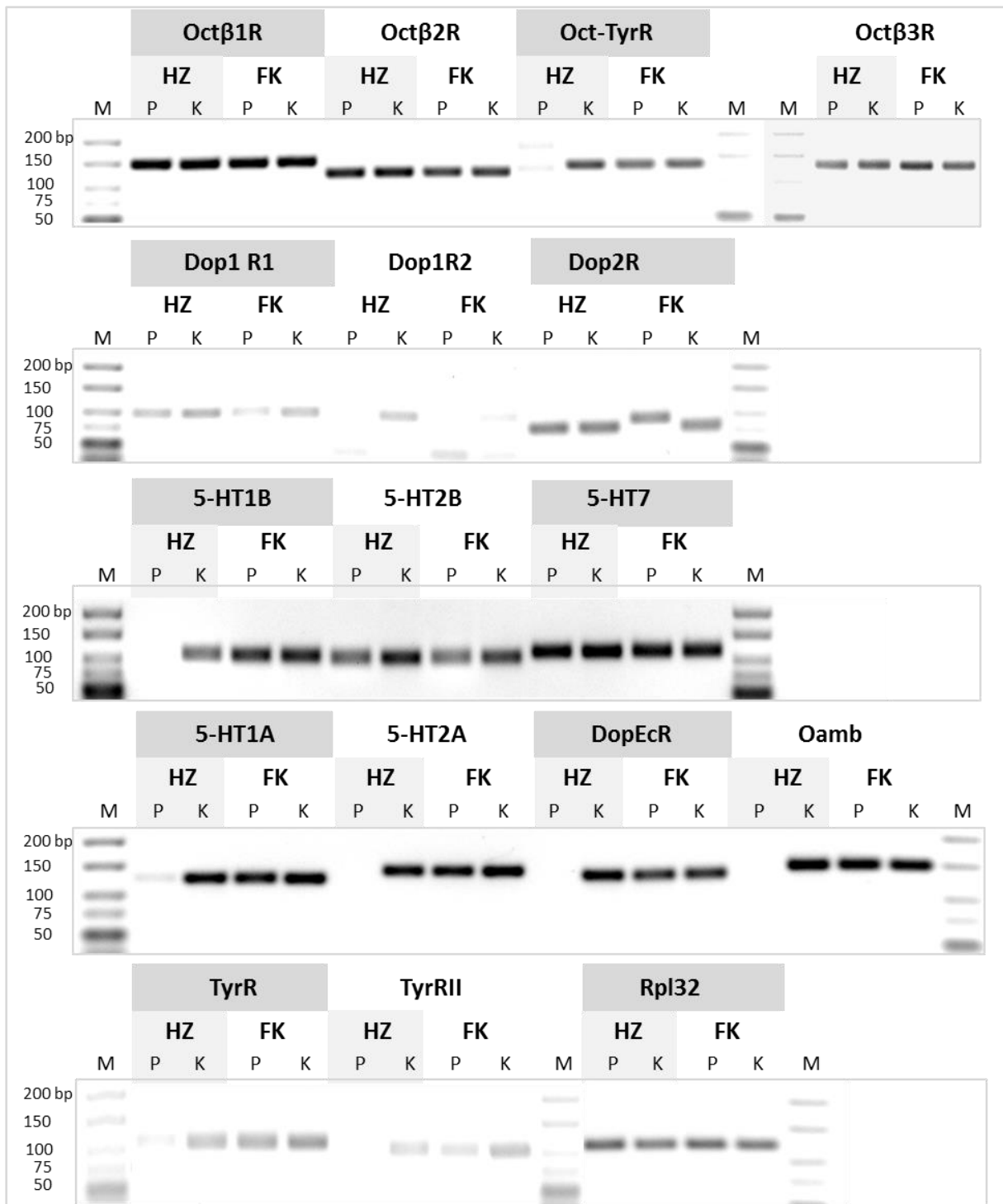


Abb. 16: Expression biogener Amin-Rezeptoren in PHs und Fettkörper. Auf einem 2,5%igen Agarose-Gel wurden die Produkte für die einzelnen BA-Rezeptoren gegen einen Ultra-Low-Range DNA-Marker aufgetragen. HZ: Hämozyten aus L3-Larven des Genotyps *hml,GFP > w¹¹¹⁸*, FK: Fettkörper aus L3-Larven des Genotyps *hml,GFP > w¹¹¹⁸*, P: Probe, K: Kontrolle. Als Kontrollgewebe dienten Köpfe von Canton S Fliegen, M: Marker

Besonders die Gene dreier Oct-Rezeptoren werden relativ stark exprimiert (*Octβ1R*, *Octβ2R*, *Octβ3R*). *Oct-TyrR* wird dagegen sehr schwach exprimiert. Bei wenigen Genen weichen die Ergebnisse leicht voneinander ab. *Dop2R* und *TyrR* werden z. B. in der qRT-PCR (Abb. 16) detektiert, in der Transkriptomanalyse (Tab. 12) jedoch nicht. Bei *Oamb* und *Dop1R2* ist es umgekehrt. Die Expression von *DopEcR*, *TyrRII* und *5-HT2A* kann mit beiden Methoden in

Hämozyten nicht nachgewiesen werden. Von den 5-HT-Rezeptorgenen werden *5-HT1A* und *5-HT2B* sowie *5-HT7* exprimiert. Im Fettkörper kann die Expression aller Rezeptorgene abgesehen von *Dop1R2* mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. *Rpl32* wurde als Haushaltsgen mitgeführt.

3.2 Einfluss biogener Amine auf die AMP-Produktion einer Hämozytenzelllinie

Die Sekretion antimikrobieller Peptide ist ein klassischer Bestandteil der angeborenen Immunantwort, die der Abwehr von Bakterien und Pilzen dient. Neben Epithelzellen und Fettkörper, sind auch Hämozyten zur Synthese von AMPs befähigt. Welches AMP-Gen von ihnen hochreguliert wird hängt maßgeblich von der Art des Eindringlings und damit von der Aktivierung zweier möglicher Signalwege – des Toll- und Imd-Signalwegs - ab. Gram-negative Bakterien wie *E. coli* und einige Bacillus-Arten wie *B. subtilis* besitzen in ihrer Zellwand DAP-Typ-PGN, dessen Erkennung eine Aktivierung des Imd-Signalweges nach sich zieht. Am Ende der Signalkaskade steht die Synthese bestimmter AMPs wie z. B. Diptericin [107].

Es soll nun in einer embryonalen Hämozytenzelllinie untersucht werden, ob BAs auf diesen Signalweg in Hämozyten modulierend wirken können. Hierfür wurde *in vitro* mit stabil transfizierten S*-Zellen gearbeitet, die *luciferase* unter der Kontrolle eines *diptericin*-Promotors exprimieren. Mit dieser Zelllinie, fortfolgend als „Dipt-Zellen“ bezeichnet, lässt sich indirekt über die Luciferase-Aktivität die *diptericin*-Expression und somit die Imd-Aktivierung quantifizieren. Bevor die modulierende Wirkung von BAs in dieser Zelllinie allerdings untersucht werden konnte, musste auch hier zunächst das Expressionsprofil der BA-Rezeptoren ermittelt werden.

3.2.1 BA-Rezeptorgene werden in Dipt-Zellen exprimiert

Gerade bei einer Zelllinie ist es nicht selbstverständlich, dass das Expressionsmuster für BA-Rezeptoren noch dem von PHs entspricht, da diese Zellen bereits seit vielen Passagen in Kultur sind und dort nicht den natürlichen hormonellen Stimuli ausgesetzt sind. Daher wurde auch hier zunächst die Expression dieser Rezeptorgene überprüft. Darüber hinaus wurde das Expressionsmuster von unstimulierten Zellen mit Zellen verglichen, die zunächst mit 20E vorstimuliert wurden.

20E ist als Verpuppungshormon bekannt und sorgt außerdem dafür, dass Hämozyten den zur Erkennung von DAP-Typ PGN notwendigen Rezeptor PGRP-LC vermehrt exprimieren. [74] In Kultur sind die Zellen auf eine externe Zugabe von 20E angewiesen, um den IMD-Signalweg aktivieren zu können. Da der 20E-Stimulus möglicherweise Auswirkungen auf das Expressionslevel einiger Rezeptorgene haben könnte, erschien eine Analyse von unstimulierten wie auch stimulierten Zellen in der qRT-PCR sinnvoll.

Tatsächlich sind einige dieser Gene in unstimulierten Zellen weniger stark exprimiert als in stimulierten. Das gilt für *Octβ3R*, *Oct-TyrR* und *5-HT1A*. Nicht exprimiert wird *5-HT1B*.

3 Ergebnisse

TyrR und *TyrRII* werden in der Zelllinie exprimiert, obwohl sie in PHs nicht bzw. nur schwach nachweisbar waren. *5-HT2A*, *DopEcR* und *Oamb* werden in PHs nicht, in Dipt-Zellen hingegen sowohl in unstimuliertem sowie stimuliertem Zustand exprimiert.

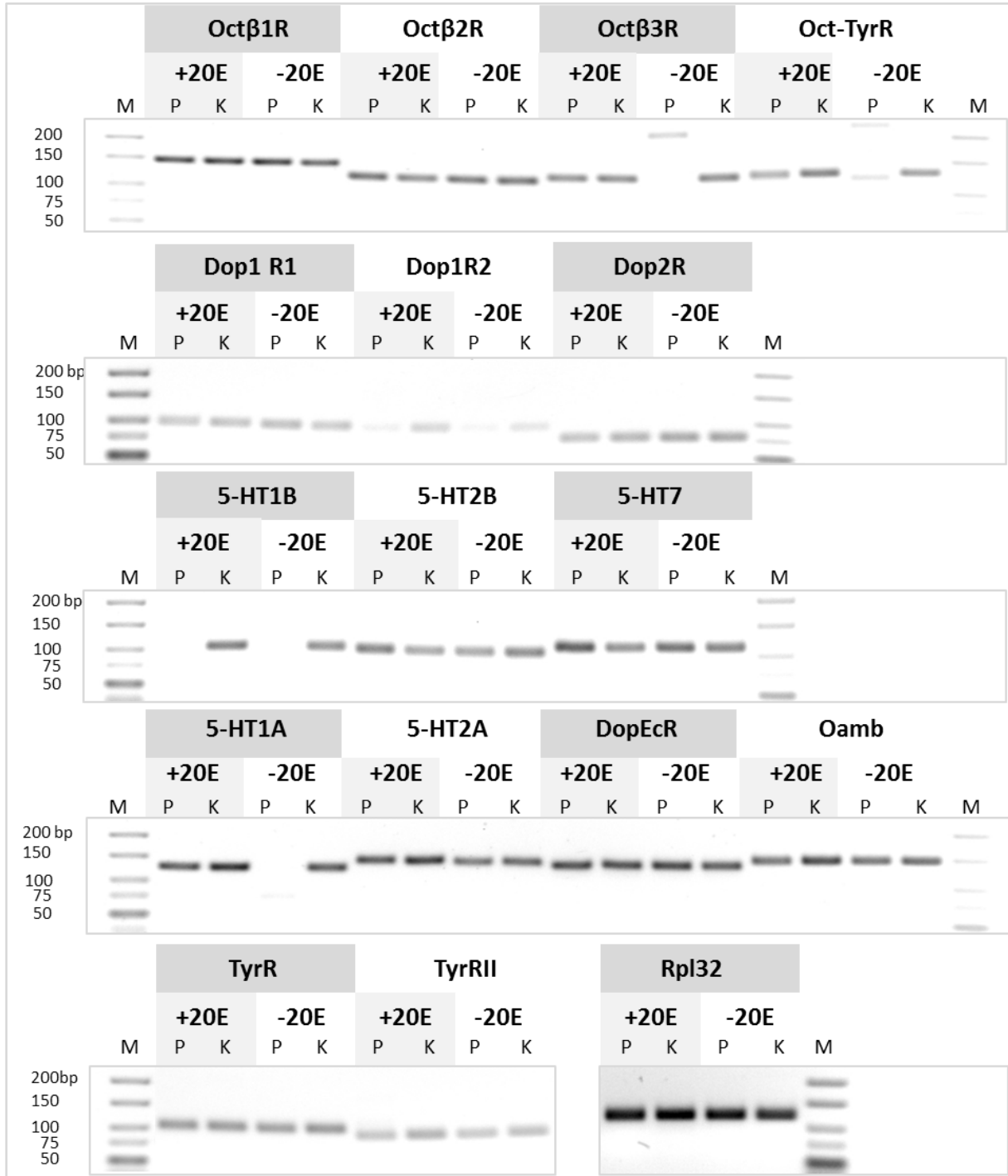


Abb. 17: Expression biogener Amin-Rezeptoren in Dipt-Zellen mit und ohne 20E-Stimulation. Auf einem 2,5%igen Agarose-Gel wurden die Produkte für die einzelnen BA-Rezeptoren gegen einen Ultra-Low-Range DNA-Marker aufgetragen. +20E: Stimulation der Dipt-Zellen mit 1 μ M 20E für 24 h; -20E: unstimulierte Dipt-Zellen; P: Probe aus Dipt-Zellen, K: Kontrolle aus Köpfen von Canton S Fliegen, M: Marker

3.2.2 Luciferase Reporter Assay dient zur Quantifizierung der Aktivierung des Imd-Signalweges in stabil transfizierten Dipt-Zellen

Bevor in den Dipt-Zellen der immunmodulierende Einfluss von BAs auf den Imd-Signalweg untersucht werden konnte, musste in Vorexperimenten die optimale PGN-Konzentration ermittelt werden, die nötig ist, um den Imd-Signalweg initial zu aktivieren. Zur Aktivierung des Imd-Signalwegs in Dipt-Zellen wurde DAP-Typ-PGN aus *E. coli* bzw. *B. subtilis* hinzugegeben. Welches PGN in welchen Konzentrationen verwendet werden sollte und wie lange die Inkubation damit idealerweise dauern sollte, wurde zunächst eruiert.

3.2.2.1 PGN aus *E. coli* ist für die Vorstimulation des IMD-Signalweges besser geeignet als PGN aus *B. subtilis*

Zunächst sollte das am besten geeignete PGN und dessen optimale Stimulationskonzentration gefunden werden. Zur Verfügung standen kommerziell erhältliches PGN aus *B. subtilis* und ein LPS-freies PGN aus *E. coli*, welches am Forschungszentrum Borstel in der Gruppe von Otto Holst aus dem K12-Stamm gewonnen wurde.

Nachdem die Zellen wie unter 2.14 zu Anfang beschrieben ausgesät und mit 20E vorstimuliert wurden, erhielten die Wells 24 h nach der Zellaussaat eine Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an PGN. Anhand von Abb. 18 lässt sich erkennen, dass das zur Verfügung stehende PGN von *E. coli* nach sechsständiger Inkubation weitaus potenter die *dipterizin*-Expression aktiviert als das PGN aus *B. subtilis*. Die Aktivierung erfolgt darüber hinaus konzentrationsabhängig. Um für den Assay gewährleisten zu können, dass eine Steigerung bzw. Reduktion der *dipterizin*-Expression durch BAs detektiert werden kann, wurde für alle folgenden Assays eine mittlerer PGN-Stimulationskonzentration von 0,01 µg/µL des *E. coli* PGNs gewählt.

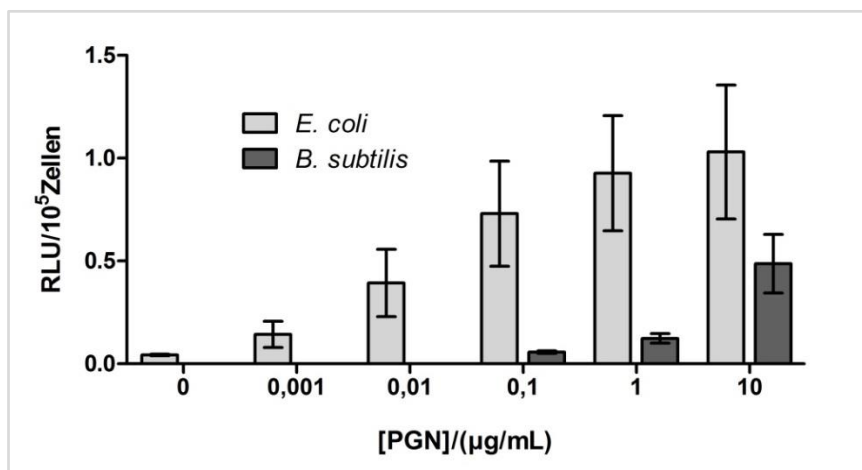


Abb. 18: PGN aus *E. coli* stimuliert den Imd-Signalweg um ein Vielfaches stärker als PGN aus *B. subtilis*. Dargestellt ist die relative Lumineszenzintensität (RLU) pro 10⁵ Dipt-Zellen nach 24-stündiger Vorstimulation mit 20E und anschließender 6-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PGN aus *E. coli* oder *B. subtilis*. Als Kontrolle wurde anstelle von PGN H₂O hinzugegeben. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SEM

3.2.2.2 Sechsstündige Stimulation mit PGN ist ausreichend für eine Aktivierung des Imd-Signalweges

Als Anhaltspunkt für die Bestimmung der optimalen Stimulationszeit der Dipt-Zellen mit PGN wurde die Veröffentlichung von Flatt *et al.* [70] zu Hilfe genommen. Die Zellen wurden nach Vorstimulation mit 20E für 3 h, 6 h und 9 h mit PGN aus *E. coli* stimuliert. 30 h nach der Aussaat wurde die relative Lumineszenzintensität (RLU) pro 10^5 Zellen bestimmt (Abb. 19).

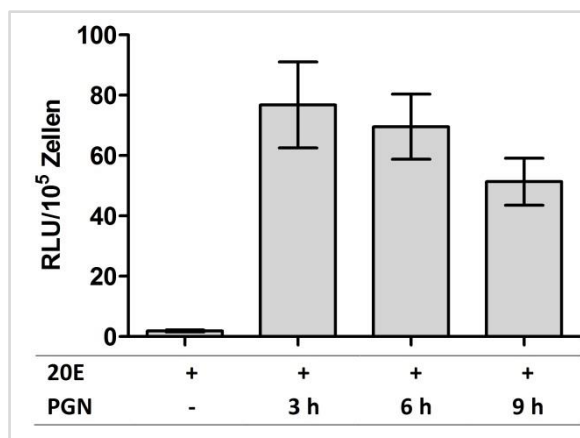


Abb. 19: Aktivierung des Imd-Signalweges in Dipt-Zellen nach unterschiedlicher PGN-Stimulationsdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Lumineszenzintensität (RLU) pro 10^5 Dipt-Zellen nach Vorstimulation mit 20E und anschließender 3-, 6- oder 9-stündiger Stimulation mit 0,01 $\mu\text{g/mL}$ PGN aus *E. coli*. aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Die alleinige Vorstimulation mit 20E ohne zusätzlichen Stimulus von PGN löst keine nennenswerte Expression von *dipterizin* aus. Dagegen reicht eine Stimulation mit PGN von drei Stunden, um das Signal um ein Vielfaches zu erhöhen. Längere Inkubationszeiten können die Expression nicht weiter steigern. Nach sechs- und neunstündiger PGN-Stimulation nimmt sie tendenziell ab. Die Änderungen sind statistisch aber nicht signifikant (gemäß einfaktorieller ANOVA und Bonferroni Post-Test).

Obgleich die Aktivierung des Imd-Signalweges nach dreistündiger Inkubation mit PGN am stärksten ist, so ist sie nach sechsstündiger nicht wesentlich geringer. Da bei Flatt *et al.* ebenfalls für sechs Stunden inkubiert wurde, haben wir beschlossen, uns für alle weiteren Versuche auf diese PGN-Stimulationsdauer festzulegen.

3.2.3 Biogene Amine haben kaum Einfluss auf die *dipterizin*-Expression in Dipt-Zellen

Nachdem die optimale PGN-Art und -Konzentration sowie die Stimulationsdauer ermittelt waren, wurden die Dipt-Zellen nun mit einem der vier BAs Oct, Tyr, Dop oder 5-HT stimuliert. Hierfür wurden unterschiedliche Konzentrationen (0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM und 1 μM) und Inkubationszeiten (6 h, 11 h, 24 h und 30 h) gewählt, um die maximale Modulation der *dipterizin*-Expression erfassen zu können. Dabei blieben die 30-stündige Inkubation mit 20E und die 6-stündige Inkubation mit PGN stets konstant. Zunächst wurde Oct den Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und zwar 6 h vor der Messung (zusammen mit PGN), 11 h, 24 h oder 30 h vor der Messung (zusammen mit 20E).

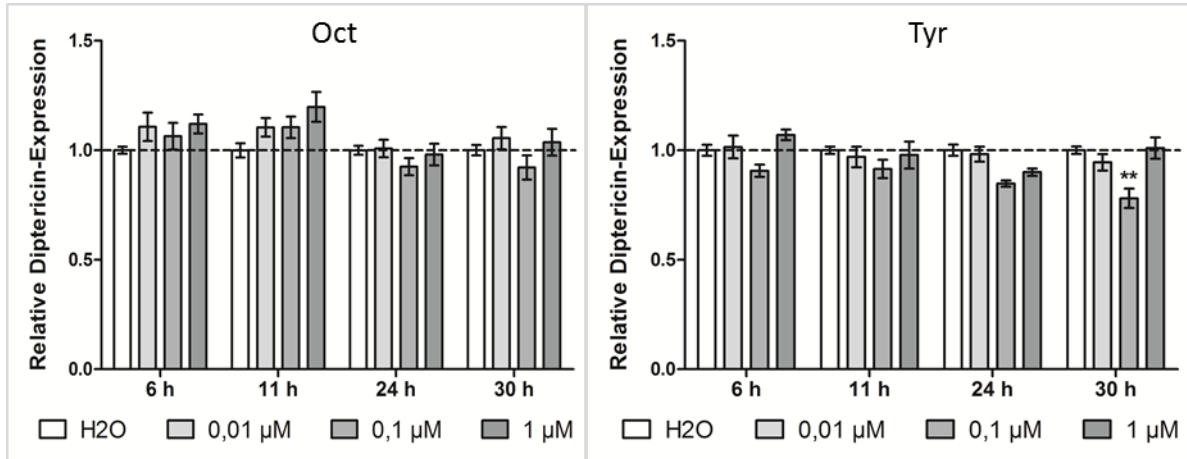


Abb. 20: diptericin-Expression in Dipt-Zellen nach Stimulation mit Octopamin (Oct, links) bzw. Tyramin (Tyr, rechts). Dipt-Zellen wurden für 24 h mit 20E (1 µM) vorstimuliert, dann für weitere 6 h zusätzlich mit 0,01 µg/mL PGN aus *E. coli* und zu unterschiedlichen Zeiten mit verschiedenen Konzentrationen Oct bzw. Tyr stimuliert. Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Volumen H₂O anstelle von Oct oder Tyr zugegeben. Die relative Lumineszenz wurde zunächst auf 10⁵ Zellen normiert und anschließend auf die jeweilige Wasserkontrolle bezogen. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SEM. (Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post Test: ** 0,001 < p < 0,01)

Die Stimulation mit Oct wies zu keinem Zeitpunkt und in keiner verwendeten Konzentration auf eine Modulation der *diptericin*-Expression hin (Abb. 20 links). Auch die Stimulation mit Tyr führte zu keiner deutlichen Modulation der *diptericin*-Expression. (Abb. 20, rechts) Lediglich nach 30-stündiger Stimulation mit 0,1 µM konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Expression beobachtet werden.

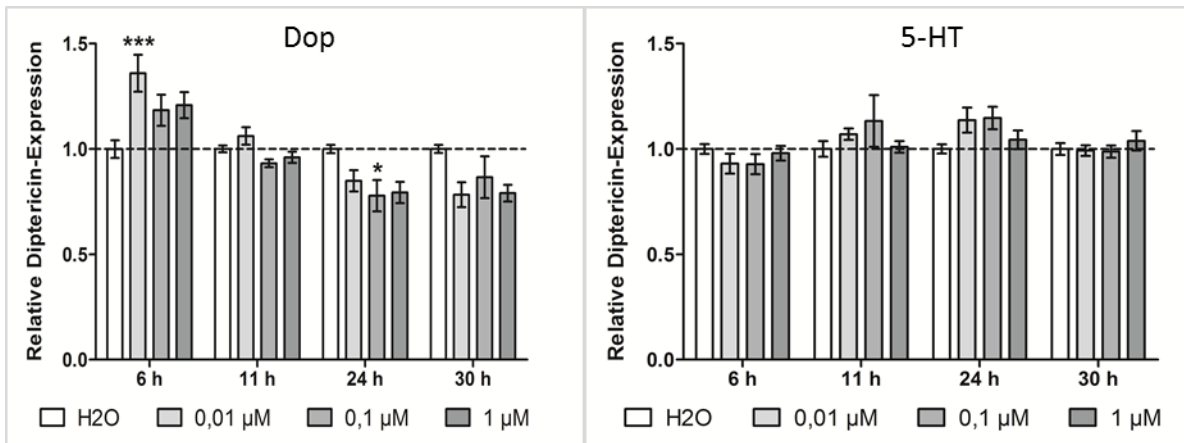


Abb. 21: diptericin-Expression in Dipt-Zellen nach Stimulation mit Dopamin (Dop, links) bzw. Serotonin (5-HT, rechts). Dipt-Zellen wurden für 24 h mit 20E (1 µM) vorstimuliert, dann für weitere 6 h zusätzlich mit 0,01 µg/mL PGN aus *E. coli* und zu unterschiedlichen Zeiten mit verschiedenen Konzentrationen Dop bzw. 5-HT stimuliert. Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Volumen H₂O anstelle von Dop zugegeben. Die relative Lumineszenz wurde zunächst auf 10⁵ Zellen normiert und anschließend auf die jeweilige Wasserkontrolle bezogen. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SEM. (Zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post Test: * 0,01 < p < 0,05; *** p < 0,001)

Die Stimulation mit Dop führte nach 6-stündiger Stimulation zu einem statistisch signifikanten Anstieg der *diptericin*-Expression in der kleinsten getesteten Konzentration von 0,01 μM (Abb. 21, links). Bei längerer Stimulation reduzierte sich die Expression tendenziell. 5-HT konnte, ungeachtet der Stimulationsdauer und -konzentration, keine Modulation der *diptericin*-Expression bewirken (Abb. 21, rechts).

3.3 Einfluss biogener Amine auf Phagozytose und Ausbreitung von PHs

Neben der Sekretion von AMPs sind Hämocyten vor allem zur Phagozytose von Eindringlingen befähigt. Eng verknüpft mit der Phagozytoseaktivität sind auch die Adhäsionseigenschaften der Zellen. Ein Blick auf Tab. 12 zeigt, dass die am stärksten in PHs exprimierten Rezeptoren ein G_s -Protein binden und daher bei Aktivierung eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration herbeiführen. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob Phagozytoseaktivität und Ausbreitungseigenschaften („*Spreading*“) von PHs durch eine erhöhte cAMP-Konzentration moduliert werden. Anschließend wurde auch der Einfluss der BAs selbst auf Phagozytose und Spreading untersucht. Zunächst musste jedoch die optimale Konzentration der von PHs zu phagozytierenden Partikel ermittelt werden, bei der sowohl ein potentieller stimulierender als auch inhibierender Effekt der Stimuli detektiert werden kann.

3.3.1 15-minütige Inkubation mit pHrodo® *S. aureus* ist ideal zur Detektion eines stimulierenden bzw. inhibierenden Effekts eines Stimulus auf die Phagozytoseaktivität von PHs

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer von PHs mit pHrodo® *S. aureus* Biopartikeln wurden PHs aus späten L3-Larven des Genotyps $hml, GFP > w^{1118}$ isoliert und anschließend unterschiedlich lang mit den Partikeln inkubiert. Die GFP-Synthese in den Hämocyten ermöglicht eine genaue Identifizierung dieser Zellen im Durchflusszytometer. Eine Quantifizierung der Phagozytoseaktivität wird durch die Fluoreszenz der internalisierten Biopartikel ermöglicht. In Abb. 22 wurde das geometrische Mittel der GFP-positiven und zugleich pHrodo®-positiven Punktwolke aufgetragen. Darüber lässt sich die Phagozytoseaktivität der Zellen quantifizieren. Es ist zu erkennen, dass eine fünf- und zehnminütige Inkubation mit den Partikeln das Signal leicht, aber noch nicht signifikant über den Wert der 4 °C-Negativkontrolle anhebt. Ab einer Inkubationsdauer von 15 Minuten ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Der Mittelwert des Signals bei einer Inkubationszeit von 25 Minuten liegt zwar noch einmal deutlich über dem der 15-minütigen Inkubation, dafür steigt die Varianz aber stark an. Aus dem Grund wurde für die folgenden Experimente mit PHs beschlossen, die Zellen für 15 Minuten mit den Biopartikeln zu inkubieren. So kann sowohl eine suppressive als auch stimulierende Modulation eines Stimulus erkennbar werden.

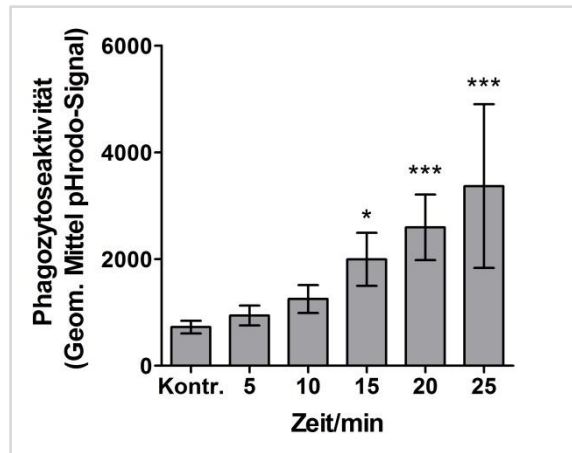


Abb. 22: Phagozytoseaktivität von PHs nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit pHrodo[®] *S. aureus* Biopartikeln. Es wurden Hämocyten aus L3-Larven des Genotyps *hml,GFP > w¹¹¹⁸* isoliert und unterschiedlich lang bei 27 °C mit Biopartikeln inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde für 25 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde im Durchflusszytometer das geometrische Mittel des pHrodo[®]-Signals der GFP-positiven Hämocyten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten ± SEM (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test auf Kontr.: * 0,01 < p < 0,05; *** 0,0001 < p < 0,001).

3.3.2 Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zu einer verminderten Phagozytoseaktivität von bPac-exprimierenden PHs

Wie unter 3.1 bereits gezeigt wurde, werden die meisten BA-Rezeptorgene in PHs exprimiert. Dabei fällt auf, dass besonders ein Großteil der relativ stark exprimierten Gene – *Octβ1R*, *Octβ2R*, *Octβ3R* und *5-HT7* – die Synthese von BA-Rezeptoren verantwortet, die über ein G_s-Protein einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration herbeiführen (Tab. 12). Daher bestand zunächst die Überlegung, ob grundsätzlich eine Aktivierung der Adenylylcyclase Auswirkungen auf die zelluläre Immunantwort hat. Um zu untersuchen, ob die Phagozytoseaktivität von PHs durch eine erhöhte cAMP-Konzentration moduliert wird, wurden unter Verwendung des binären GAL4/UAS-Systems transgene Tiere hergestellt, die in Hämocyten eine xenogene, photoaktivierende Adenylylcyclase (bPac) synthetisieren. Werden diese aus den entsprechenden L3-Larven isolierten Hämocyten mit blauem Licht bestrahlt, wird bPac aktiviert und führt damit zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels. Vorexperimente haben gezeigt, dass eine fünfminütige Bestrahlung mit Blaulicht bereits ausreicht, um die cAMP-Konzentration in PHs deutlich zu erhöhen und dieser Level bei einer Bestrahlung von 15 Minuten erhalten bleibt. Daher wurden die Hämocyten während der Phagozytose der pHrodo[®] *S. aureus*-Partikel für die volle Zeit mit Blaulicht bestrahlt.

Stets wurde der cAMP-Level in den isolierten bPac⁺-Hämocyten gemessen, um sichergehen zu können, dass die bakterielle photoaktivierte Adenylylcyclase aktiv ist. Als Negativkontrolle wurde der Assay auch mit bPac⁻-Hämocyten durchgeführt. Hier fand keine Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Bestrahlung mit Licht statt (Daten nicht gezeigt). Aus Abb. 23, A ist zu entnehmen, dass die cAMP-Konzentration in den bPac⁺-Zellen durch die Aktivierung der photoaktivierten Adenylylcyclase massiv ansteigt. (An der Stelle sei noch einmal darauf verwiesen, dass der cAMP-Glo[®]-Assay eigentlich eine Abnahme von ATP misst, die proportional zu einem Anstieg von cAMP ist.) Anschließend konnte mit

Hämozyten aus weiteren $hml, GFP > bPac^+$ -Larven der Phagozytose-Assay durchgeführt werden. Die $bPac^+$ -Hämozyten wurden während der 15-minütigen Inkubationszeit mit pHrodo[®] *S. aureus* Partikeln mit blauem Licht bestrahlt, während die entsprechende Kontrolle während dieser Zeit im Dunkeln verblieb. Wie in Abb. 23, B zu erkennen ist die Phagozytoserate der $bPac^+$ -Hämozyten in Folge der lichtinduzierten, erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration signifikant, um ca. 30 % vermindert.

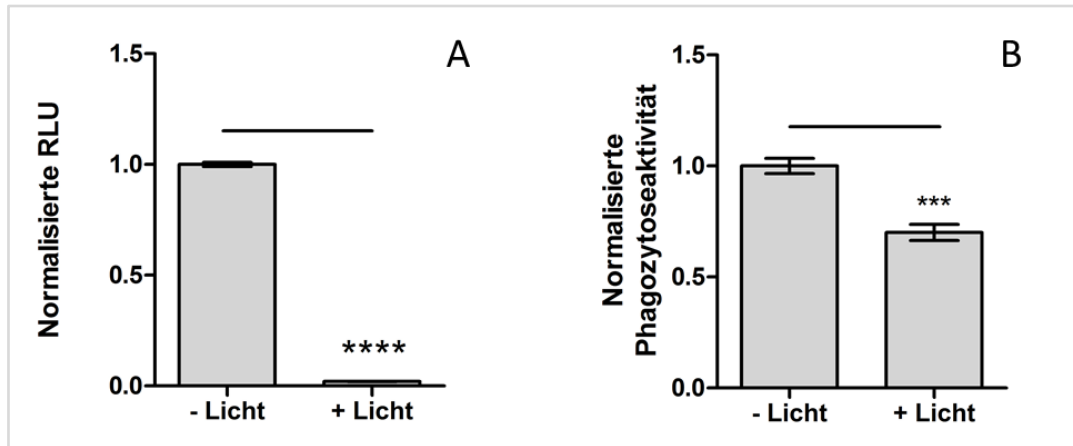


Abb. 23: Phagozytoseaktivität von $bPac^+$ -PHs (B) ist bei erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration (A) reduziert. A: $bPac^+$ -PHs wurden aus $hml, GFP > bPac^+$ L3-Larven isoliert und für 20 min mit den Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX (500 μM) und Ro 20-1724 (100 μM) im Dunkeln bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden sie für 15 min mit Blaulicht bestrahlt, lysiert und im cAMP-Glo[®]-Assay die relative Lumineszenzintensität (RLU) bestimmt. Dargestellt sind die auf die –Licht-Kontrolle normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM. (Ungepaarter t-test mit Welch-Korrektur **** $p < 0,0001$) B: $bPac^+$ -PHs wurden für 20 min im Dunkeln bei 27 °C inkubiert und anschließend für 15 min mit Blaulicht bestrahlt und gleichzeitig mit pHrodo[®] *S. aureus* inkubiert. Im Durchflusszytometer wurde anschließend zur Quantifizierung der Phagozytoseaktivität das geometrische Mittel der GFP-positiven und zugleich pHrodo[®]-positiven Punktewolke bestimmt. Dargestellt sind die auf die –Licht-Kontrolle normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM. (Ungepaarter t-Test: *** $p < 0,001$)

3.3.3 Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zu einer stärkeren Zellausbreitung in $bPac^+$ -PHs

Direkt mit Phagozytoseprozessen verknüpft sind die Adhäsionseigenschaften von Hämozyten. Mit Hilfe des nächsten Experimentes sollte daher untersucht werden, ob eine $bPac$ -Aktivierung in PHs Auswirkungen auf das Ausbreitungsverhalten der Zellen hat. Hierfür wurden $bPac^+$ -Hämozyten aus transgenen Larven isoliert und während der Adhäsion auf einem Glasuntergrund mit Blaulicht bestrahlt.

Anschließend wurde die Gesamtfläche der Zellen bestimmt, die durch die Färbung des F-Aktins repräsentiert wird, sowie die Ausbreitungsfläche, die der Fläche des F-Aktins abzüglich der des Zellsomas (α -Tubulin) entspricht. In Abb. 24 sowie Abb. 25 ist zu erkennen, dass eine intrazellulär erhöhte cAMP-Konzentration, induziert durch die Aktivierung von $bPac$, zu einer stärkeren Zellausbreitung führt. Sowohl die Gesamtfläche der Zellen als auch die Ausbreitungsfläche der Filopodien nimmt bei $bPac^+$ -Hämozyten durch Bestrahlung mit Blaulicht signifikant zu.

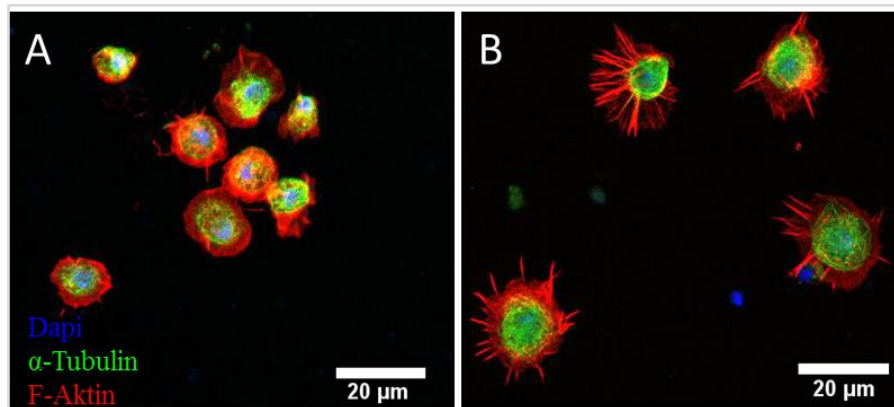


Abb. 24: Ausbreitung von bPac⁺-Hämozyten nach Bestrahlung mit Blaulicht für 15 min (B) nimmt gegenüber nicht bestrahlten Hämozyten (A) zu. bPac⁺-PHs wurden aus hml,GFP > bPac⁺ L3-Larven isoliert und für 20 min mit den Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX (500 μ M) und Ro 20-1724 (100 μ M) im Dunkeln bei 27 °C auf einem Glasuntergrund inkubiert. Anschließend wurden sie entweder für 15 min mit Blaulicht bestrahlt (B) oder als Negativkontrolle im Dunkeln belassen (A). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit 3%igem PFA fixiert und eine Färbung mit Alexa Fluor 647 Phalloidin (F-Aktin, rot), anti- α -Tubulin-FITC (Zellsoma, grün) und Dapi (Zellkern, blau) durchgeführt. Die Bilder wurden an einem Leica TCS SP5 Laser-Scanning-Mikroskop mit 63x/1.4 Öl-Objektiv aufgenommen.

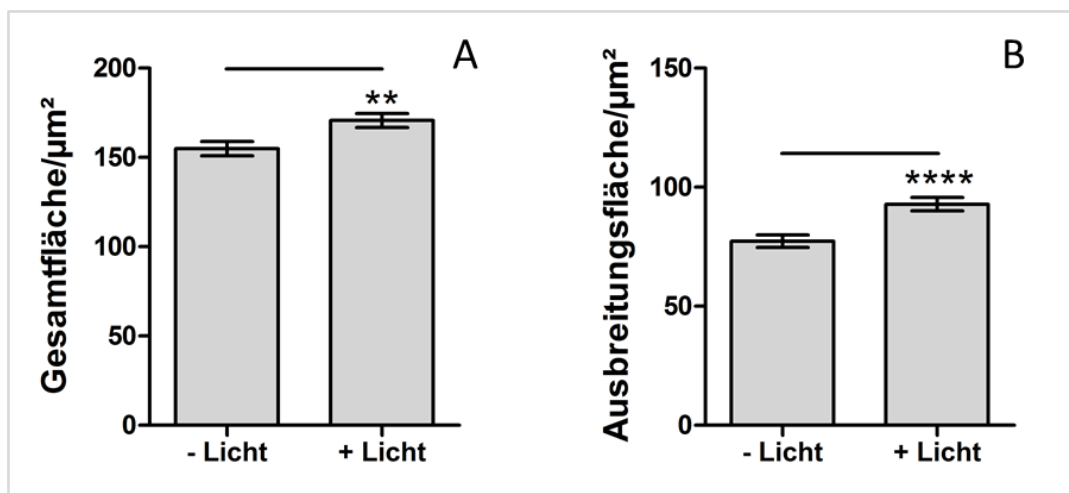


Abb. 25: Gesamtfläche (A) und Ausbreitungsfläche (B) von bPac⁺-Hämozyten nehmen nach Bestrahlung mit Blaulicht signifikant zu. bPac⁺-PHs wurden aus hml,GFP > bPac⁺ L3-Larven isoliert und für 20 min mit den Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX (500 μ M) und Ro 20-1724 (100 μ M) im Dunkeln bei 27 °C auf einem Glasuntergrund inkubiert. Anschließend wurden sie entweder für 15 min mit Blaulicht bestrahlt (B) oder als Negativkontrolle im Dunkeln belassen (A). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit 3%igem PFA fixiert und eine Färbung mit Alexa Fluor 647 Phalloidin (F-Aktin), anti- α -Tubulin-FITC (Zellsoma) und Dapi (Zellkern) durchgeführt. Die Bilder wurden am SP5 Konfokalmikroskop erstellt und anschließend mit ImageJ ausgewertet. Die Gesamtfläche entspricht der Fläche des F-Aktins. Die Ausbreitungsfläche entspricht der Gesamtfläche abzüglich der Fläche des Zellsomas. Dargestellt sind die Mittelwerte der Flächen aus n Zellen \pm SEM ($n_{-Licht} = 445$, $n_{+Licht} = 450$) (ungepaarter t-Test: ** 0,001 < p < 0,01; **** p < 0,0001)

3.3.4 Stimulation von S2-Zellen mit BAs hat kaum nachweisbaren Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration bedeutet für PHs eine verminderte Phagozytoseaktivität und verstärkte Adhäsion. Um herauszufinden, ob eines der hier untersuchten BAs Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration von Hämocyten hat, wurden S2-Zellen mit unterschiedlichen BA-Konzentrationen stimuliert. Für dieses Experiment wurden erneut S2-Zellen verwendet, da PHs nicht in ausreichender Zahl aus L3-Larven isoliert werden konnten. Da hier nicht transfizierte, normale S2-Zellen verwendet wurden, wurde auch von diesen Zellen zunächst das BA-Rezeptor-Expressionsprofil bestimmt. Dieses entspricht dem der unstimulierten Dipt-Zellen (Daten nicht gezeigt), was bedeutet, dass auch die S2-Zellen für alle BAs entsprechende Rezeptoren besitzen. Die Zellen wurden mit 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM oder 100 μM des jeweiligen BAs stimuliert und die relative Änderung des intrazellulären cAMP-Levelns indirekt über den Verbrauch von ATP bestimmt (Abb. 26, Abb. 27).

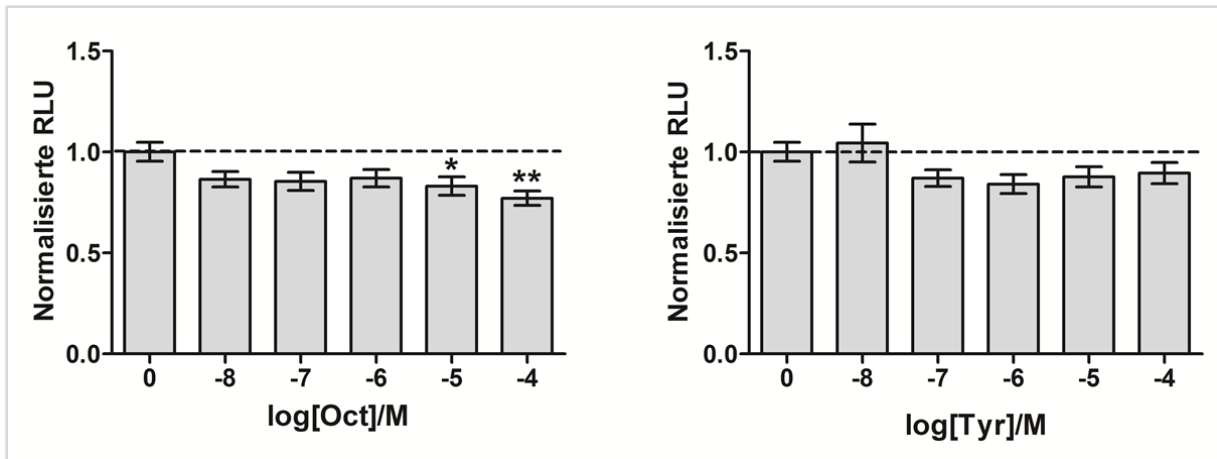


Abb. 26: Bestimmung der Konzentrationsänderung intrazellulären cAMPs in S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Octopamin (Oct, links) oder Tyramin (Tyr, rechts). Die Zellen wurden zunächst 20 min in Medium mit den Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX (100 μM) und Ro-1724 (50 μM) inkubiert, dann für 30 min mit der jeweiligen BA-Konzentration stimuliert bevor sie lysiert wurden und das Lumineszenzsignal bestimmt wurde. Dargestellt sind die auf die Wasserkontrolle normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM. (Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-Test: * 0,01 < p < 0,05; ** 0,001 < p < 0,01)

Eine statistisch signifikante Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levelns kann jedoch nur für die beiden höchsten Konzentrationen von Oct (10 μM und 100 μM , Abb. 26, links), sowie für 100 μM Dop (Abb. 27, links) und 0,1 μM 5-HT (Abb. 27, rechts) nachgewiesen werden. Bei allen anderen Konzentrationen entspricht der intrazelluläre cAMP-Level dem der Kontrolle. Allerdings kann in allen Fällen mittels Post-Test von links nach rechts ein mehr oder weniger signifikanter linearer Trend nachgewiesen werden (Oct: p=0,0011; Tyr: p=0,0331; Dop: p=0,0002; 5-HT: p=0,0276).

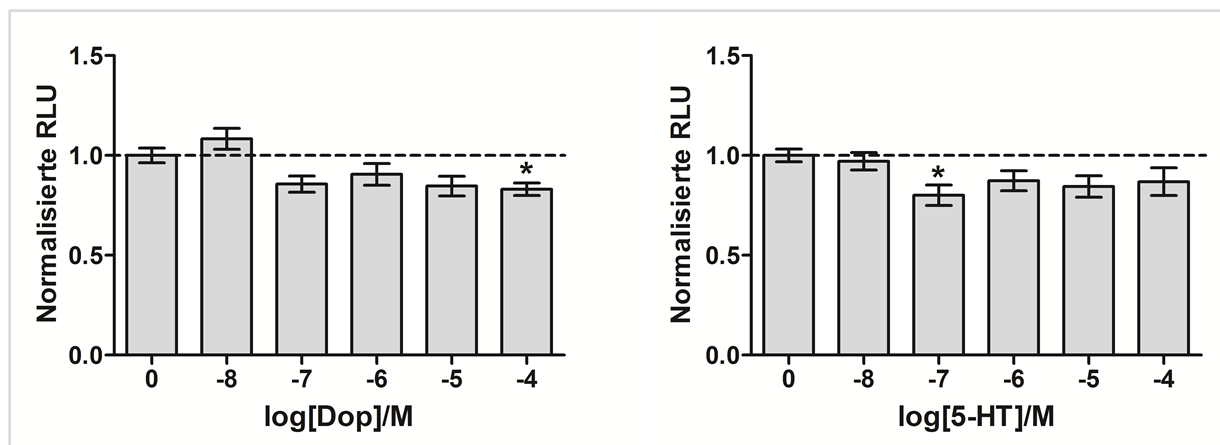


Abb. 27: Bestimmung der Konzentrationsänderung intrazellulären cAMPs in S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Dopamin (Dop, links) oder Serotonin (5-HT, rechts). Die Zellen wurden zunächst 20 min in Medium mit den Phosphodiesteraseinhibitoren IBMX (100 μ M) und Ro-1724 (50 μ M) inkubiert, dann für 30 min mit der jeweiligen BA-Konzentration stimuliert bevor sie lysiert wurden und das Lumineszenzsignal bestimmt wurde. Dargestellt sind die auf die Wasserkontrolle normierten Mittelwerte aus drei (Dop) bzw. vier (5-HT) unabhängigen Experimenten \pm SEM. (Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-Test: * 0,01 < p < 0,05)

3.3.5 Phagozytoseaktivität in S2-Zellen wird durch Zugabe verschiedener BA-Konzentrationen nicht beeinflusst

Zur Beantwortung der Frage, ob BAs Einfluss auf die Phagozytoseaktivität von Hämozyten haben, wurden S2-Zellen mit unterschiedlichen BA-Konzentrationen stimuliert und im Anschluss die Phagozytoserate bestimmt. Um der Möglichkeit Rechnung zu tragen, dass die Zellen gram-positive bzw. gram-negative Bakterien mit unterschiedlicher Aktivität phagozytieren respektive ein möglicher modulierender Effekt von BAs sich mehr auf die Phagozytose der einen oder anderen Art auswirkt, wurden die folgenden Experimente sowohl mit pHrodo[®] *S. aureus* als auch mit *E. coli* Biopartikeln durchgeführt und zunächst eine Zeitreihe zur Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer erstellt (Abb. 28). Die Inkubation von S2-Zellen für unterschiedliche Zeiten und mit unterschiedlichen Biopartikeln zeigt zunächst keine klare Präferenz der Hämozyten für *S. aureus* oder *E. coli* Biopartikel. Es wurde eine Inkubationszeit von 20 min für die folgenden Experimente festgelegt, da die S2-Zellen zu dem Zeitpunkt noch nicht gesättigt sind und somit BA-induzierte Modulationen in der Phagozytoserate in beide Richtungen detektiert werden können. Die zeitgleiche Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Oct während der Phagozytose der pHrodo[®] Biopartikel beeinflusst die Phagozytoseaktivität der Zellen weder für *S. aureus*- noch für *E. coli*-Partikel signifikant (Abb. 29, oben). Lediglich bei der Stimulation mit 0,1 μ M Tyr nimmt die Phagozytoseaktivität der Zellen für *E. coli*-Partikel leicht zu (Abb. 29, unten).

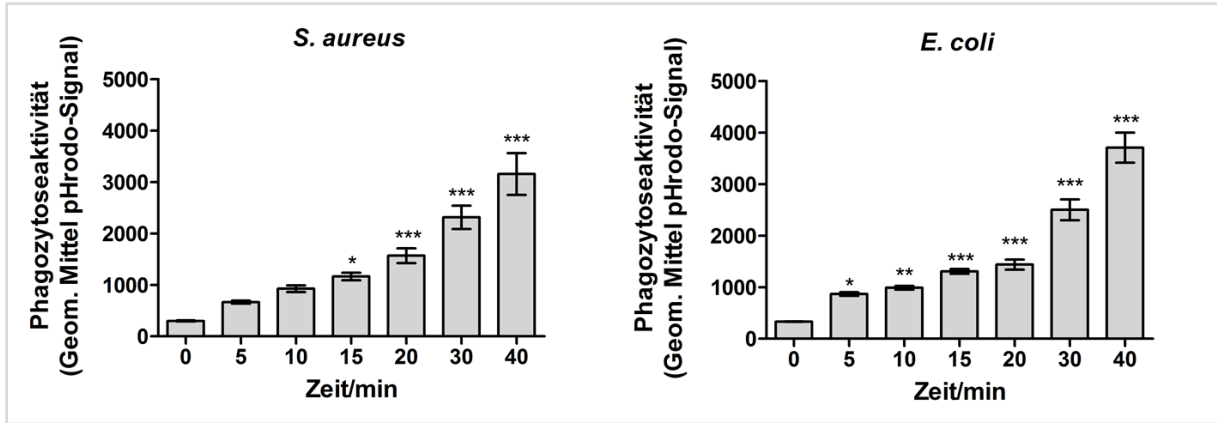


Abb. 28: Phagozytoseaktivität von S2-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit pHrodo® *S. aureus* bzw. *E. coli* Biopartikeln. S2-Zellen wurden unterschiedlich lang bei 27 °C mit Biopartikeln inkubiert. Die Kontrollgruppe (0 min) wurde für 40 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde im Durchflusszytometer das geometrische Mittel der pHrodo®-positiven Hämozyten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SEM (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-Test auf Kontr.: * 0,01 < p < 0,05; ** 0,001 < p < 0,01; *** 0,0001 < p < 0,001).

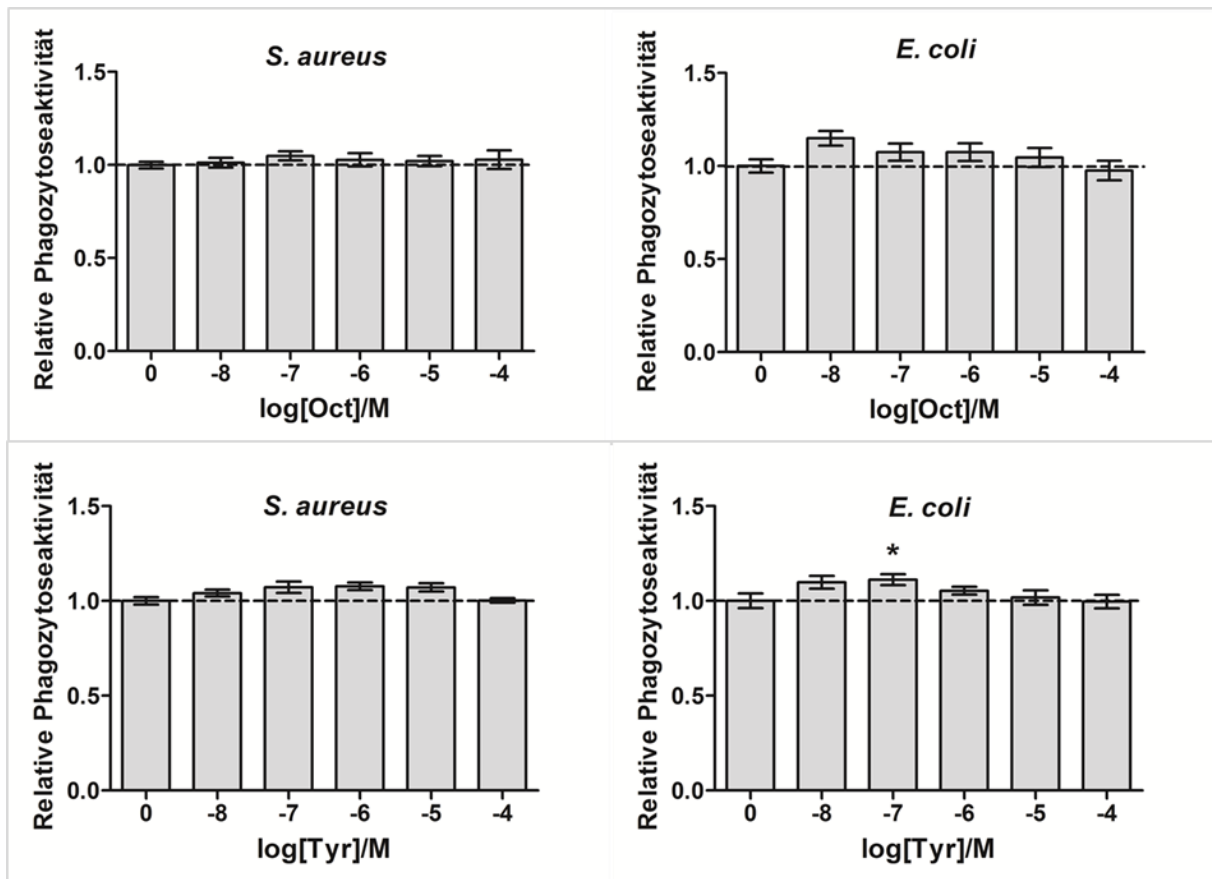


Abb. 29: Relative Phagozytoseaktivität von S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Octopamin (Oct, oben) oder Tyramin (Tyr, unten). Die BAs werden den Zellen zeitgleich mit pHrodo *S. aureus* bzw. *E. coli* Biopartikeln zugegeben. So werden sie für 20 min bei 27 °C inkubiert, anschließend zum Stoppen der Phagozytose auf Eis gestellt, im Durchflusszytometer analysiert und das geometrische Mittel der pHrodo®-positiven Hämozyten bestimmt. Die Werte der Replikate wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Wasserkontrolle (0 M Oct, Tyr) normiert und dann der Mittelwert dargestellt ± SEM (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-Test: * 0,01 < p < 0,05)

Für die Stimulation mit Dop und 5-HT lassen sich ebenfalls für unterschiedliche Konzentrationen keine Abweichungen in der Phagozytoseaktivität der S2-Zellen feststellen (Abb. 30).

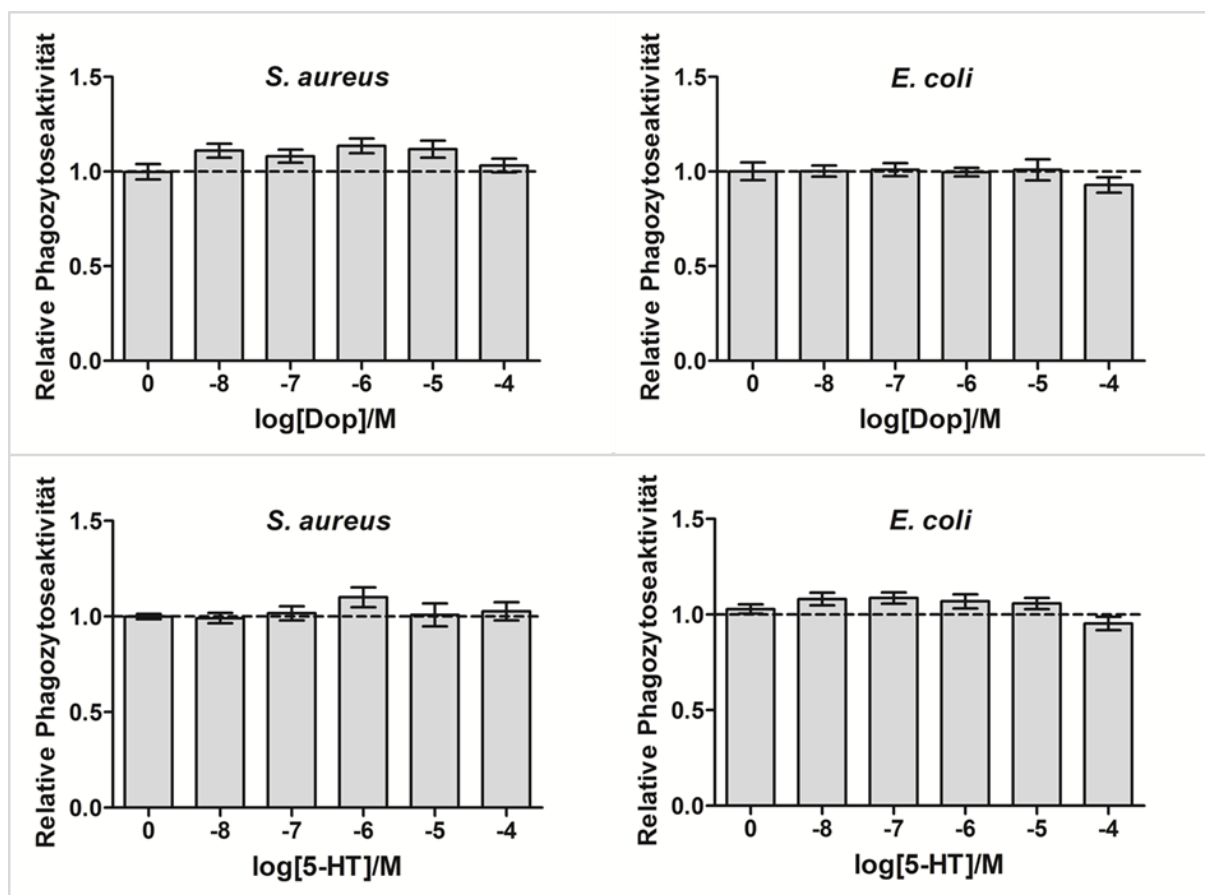


Abb. 30: Relative Phagozytoseaktivität von S2-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Dopamin (Dop, oben) oder Serotonin (5-HT, unten). Die BAs werden den Zellen zeitgleich mit pHrodo *S. aureus* bzw. *E. coli* Biopartikeln zugegeben. So werden sie für 20 min bei 27 °C inkubiert, anschließend zum Stoppen der Phagozytose auf Eis gestellt, im Durchflusszytometer analysiert und das geometrische Mittel der pHrodo®-positiven Hämozyten bestimmt. Die Werte der Replikate wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Wasserkontrolle (0 M Dop, 5-HT) normiert und dann der Mittelwert dargestellt \pm SEM (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Post-Test)

3.4 Einfluss biogener Amin-Rezeptoren auf den Immunstatus infizierter adulter Fliegen

Da die bisherigen *ex vivo* bzw. *in vitro* Experimente nur vage Hinweise liefern konnten, ob BAs tatsächlich Einfluss auf die Immunantwort von *Drosophila* haben, sollte nun *in vivo* getestet werden, ob das Fehlen oder Herunterregeln der Expression einzelner BA-Rezeptorgene zu einer Veränderung im Immunstatus infizierter Fliegen führt. Zunächst wurden transgene Fliegen verwendet, die ubiquitär ein dysfunktionales BA-Rezeptorgen tragen (KO). Die transgenen Tiere bekamen *Pectobacterium carotovorum* (*Ecc15*) injiziert, ein Pflanzenpathogen, welches eine vergleichsweise moderate Immunantwort in der Fliege

auslöst [164]. Anhand der Überlebensrate infizierter bzw. nicht-infizierter Tiere wurde der veränderte Immunstatus der verschiedenen BA-Rezeptor-Mutanten ermittelt und mit den von entsprechend behandelten w^{1118} -Tieren verglichen. Anschließend sollten die Effekte des Rezeptor-KOs weiter eingegrenzt werden, wofür adulte Fliegen mit *Ecc15* infiziert wurden, in denen einzelne BA-Rezeptorgene gezielt im Fettkörper und Hämocyten bzw. nur Hämocyten mittels RNAi herunterreguliert wurden. Mit Hilfe dieser Tiere kann der Einfluss bestimmter Rezeptoren auf den Immunstatus gezielt in Fettkörper und Hämocyten oder nur in den Hämocyten der Fliegen untersucht werden.

3.4.1 Dosisfindung für die Infektion adulter Fliegen mit *Ecc15*

Zunächst sollte eine Bakterienkonzentration für die Infektion gefunden werden, bei der sowohl ein potentieller immunprotektiver als auch immunsuppressiver Effekt des KOs gegenüber dem Wildtyp erkennbar werden kann. Die Fliegen sollten zu diesem Zweck eine gut sichtbare Mortalität infolge der Infektion aufweisen. Hierfür wurde die OD_{600} bestimmt, mit PBS auf 1, 10 und 100 eingestellt und den fünf bis sechs Tage alten, adulten Fliegen des Stammes w^{1118} mit Hilfe eines Nanoinjectors ein Volumen von 13,8 nL der jeweiligen Bakteriensuspension gespritzt (Abb. 31). Die Kontrollgruppe bekam ein entsprechendes Volumen PBS injiziert. Außerdem wurden jungfräuliche Weibchen und Männchen getrennt beobachtet für den Fall, dass geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen. Alle Tiere, die in den ersten 24 h nach der Injektion verstorben sind, wurden in der Auswertung nicht mit berücksichtigt, um einen möglichen Einfluss der Verwundung selbst auszuschließen. Der erste Auswertungszeitpunkt liegt daher 48 h nach der Injektion.

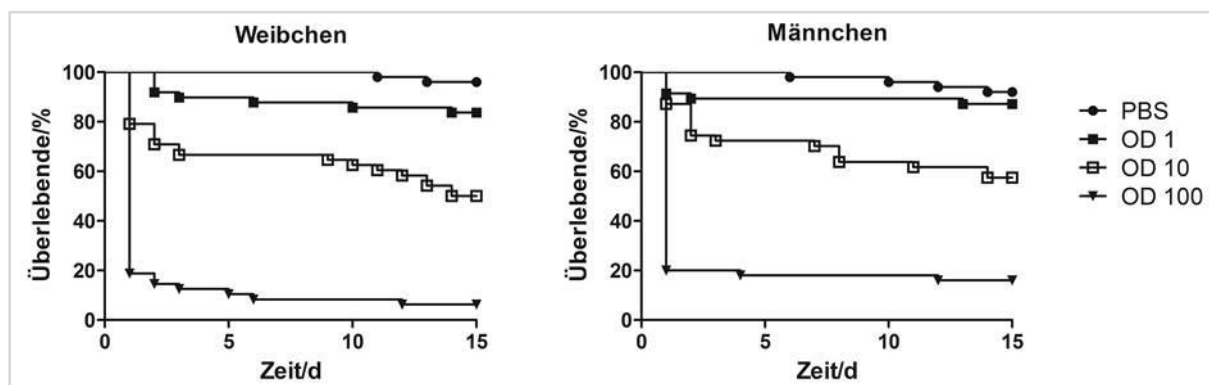


Abb. 31: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit verschiedenen Konzentrationen *Ecc15* infizierter w^{1118} -Fliegen. Die OD_{600} der Übernachtskultur von *Ecc15* wurde photometrisch bestimmt und mit PBS eingestellt. Jeder Ansatz umfasst ca. 50 Tiere. Die Bakterien bzw. PBS wurden in einem Volumen von 13,8 nL mit Hilfe eines Nanoinjectors intrathorakal unter CO_2 -Betäubung injiziert. Die Fliegen wurden für 15 Tage bei 29 °C gelagert und die Anzahl der toten Tiere täglich bestimmt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion.

Bei der Betrachtung der Überlebensraten fällt auf, dass die Infektion mit *Ecc15* hauptsächlich innerhalb der ersten ein bis vier Tage unmittelbaren Einfluss auf das Überleben der Fliegen hat. Die Tiere, die darüber hinaus noch leben, scheinen die Infektion erfolgreich bekämpft zu

haben, da nach Tag fünf die Überlebensrate dann wieder weitestgehend parallel mit der der PBS-Kontrollen verläuft. Für die folgenden Infektions-Experimente mit *Ecc15* und den Rezeptor-KO- bzw. RNAi-Linien wurde entsprechend eine OD_{600} von 10 gewählt, da bei dieser *Ecc15*-Konzentration sowohl ein potenzieller immunsuppressiver als auch –protektiver Effekt der BA-Rezeptor-KOs sichtbar werden kann. Im Fall der Rezeptor-KOs für Oct β 1R und Oct β 2R wurde eine OD von 2 gewählt, da diese Tiere an sich schon eine schwächere Konstitution mitbringen und eine OD von 10 alle Fliegen sehr schnell ausgelöscht hätte.

3.4.2 Infektion mit *Ecc15* kann von Octopamin-Rezeptor-KOs schlechter abgewehrt werden

Ist der Signalweg von Oct über Oct β 1R ausgeschaltet, so hat dies sehr deutliche Konsequenzen für das Überleben der Fliegen. Wie in Abb. 32 zu sehen, führt allein die Injektion von PBS in beiden Geschlechtern zu einer verminderten Überlebensrate gegenüber den PBS-Kontrollen der w^{1118} -Tiere. Die Männchen des Oct β 1R-KOs sind darüber hinaus gegenüber den Weibchen im Nachteil. Bereits nach sechs Tagen lebt nur noch etwa die Hälfte der PBS-Männchen, während zum gleichen Zeitpunkt noch ca. 70 % der Weibchen leben. Eine Injektion von *Ecc15* in w^{1118} -Tiere bewirkt, dass bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von zwölf Tagen etwa 20 % der Fliegen sterben, wobei die meisten Todesfälle innerhalb der ersten drei Tage auftreten. Mit *Ecc15* infizierte Oct β 1R-KO-Weibchen sterben anfänglich etwas weniger schnell als die entsprechenden Männchen. Etwa die Hälfte ist bereits 48 h nach der Injektion tot. Die verbliebenen Fliegen sterben alle sukzessive innerhalb der nächsten elf Tage. 48 h nach der Infektion sind dagegen nur noch etwa 30 % der Männchen am Leben. Bis Tag zwölf sterben auch sie nach und nach, so dass am Ende nur wenige Tiere noch leben.

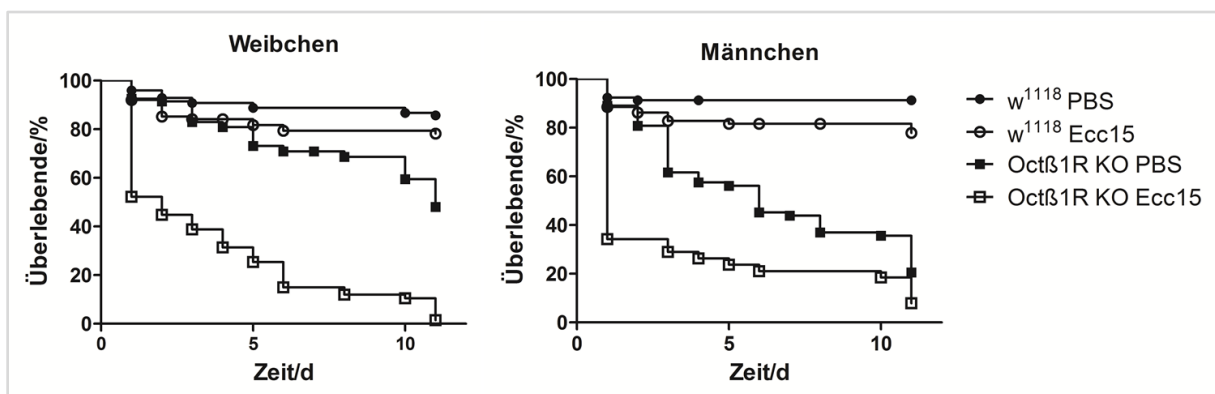


Abb. 32: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Oct β 1R-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 2$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 12 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion.

Um die Fähigkeit der unterschiedlichen Stämme mit der *Ecc15*-Infektion umzugehen beurteilen zu können, wird nun der Unterschied der Überlebensraten zu den jeweiligen

3 Ergebnisse

Kontrollen miteinander verglichen. Obwohl die Tiere des Oct β 1R-KOs auch nach PBS-Injektion bereits eine recht große Sterberate aufweisen, kann man doch erkennen, dass wesentlich mehr Tiere im Vergleich an der *Ecc15*-Infektion sterben, als dies bei w^{1118} der Fall ist.

Wird Oct β 2R in Fliegen ausgeschaltet (Abb. 33), so sind die Tiere insgesamt vitaler als jene, denen Oct β 1R fehlt, was vor allem daran zu erkennen ist, dass sie nach PBS-Injektion in kaum nennenswerter Zahl versterben. Während etwa 20 % der w^{1118} -Weibchen nach Infektion mit *Ecc15* innerhalb der ersten 48 h sterben, liegt der Anteil toter Weibchen des Oct β 2R-KOs bei über 40 %. Dieses Verhältnis bleibt bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen konstant. Letztlich überleben ca. 65 % der w^{1118} -Weibchen und 35 % der Oct β 2R-KO-Weibchen. Bei den Männchen ist das Verhältnis der Überlebensraten infizierter Oct β 2R-KO- und w^{1118} - Fliegen gegenüber dem der Weibchen vergleichbar. Insgesamt stirbt aber jeweils nur etwa die Hälfte der männlichen Fliegen im Vergleich zu den Weibchen.

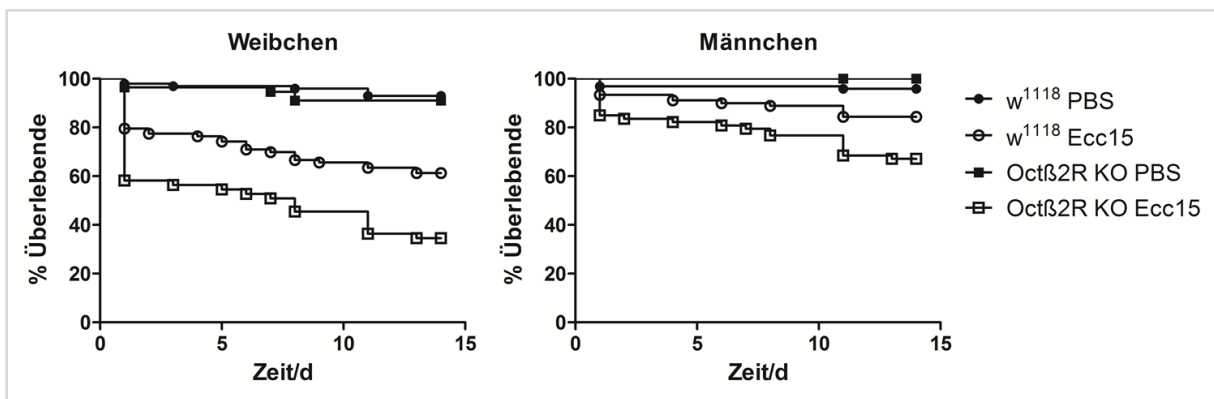


Abb. 33: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Oct β 2R-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 2$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 12 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

Für die Tiere des Oct β 3R-KOs (Abb. 34) kann Ähnliches beobachtet werden. Grundsätzlich fällt auch hier auf, dass die Männchen eine insgesamt etwas geringere Sterberate haben als die jungfräulichen Weibchen. In beiden Geschlechtern ist trotz höherer *Ecc15*-Dosis ($OD_{600} = 10$) ein geringerer Unterschied zwischen infizierten Oct β 3R-KO-Tieren gegenüber w^{1118} -Fliegen auszumachen. In den ersten 48 h nach der Infektion leben noch etwa 85 % der w^{1118} -Weibchen, während noch ca. 75 % der Oct β 3R-KO-Weibchen leben. Innerhalb von 14 Tagen reduziert sich die Anzahl der Fliegen darüber hinaus nicht sehr stark. Am Ende leben noch ca. 75 % der w^{1118} -Weibchen und etwa 65 % der KO-Weibchen. Bei den Männchen ist der Unterschied zwischen den infizierten Stämmen etwas größer, die totale Überlebensrate liegt aber bei beiden Stämmen höher als bei den Weibchen. Nach 14 Tagen leben noch etwa 90 % der w^{1118} -Männchen, aber nur noch ca. 75 % der KO-Männchen.

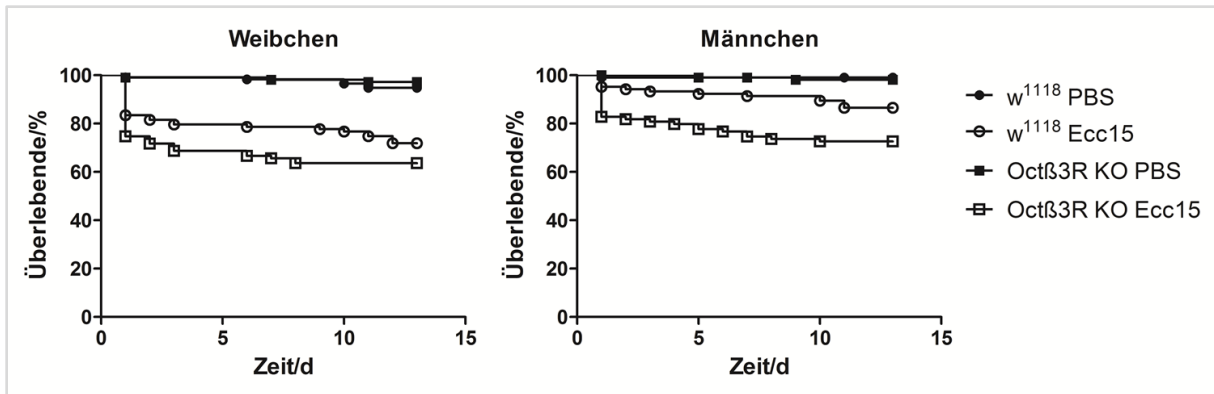


Abb. 34: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Oct β 3R -KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 14 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

3.4.3 Tyramin-Rezeptoren haben teilweise einen Einfluss auf die Überlebensrate von *Drosophila* nach *Ecc15*-Infektion

Der Oct-Tyr-Rezeptor kann sowohl Oct als auch Tyr binden. Er bindet letzteres aber mit höherer Affinität und wird daher zu den Tyr-Rezeptoren gezählt [44]. Bei den Oct-TyrR-KO-Fliegen (Abb. 35) ist zu beobachten, dass sie bereits zu einem nicht unwesentlichen Teil an der PBS-Injektion selbst sterben. Immerhin auf etwa 20 % der Weibchen und 15 % der Männchen trifft dies zu. Trotzdem ist auch hier unabhängig vom Geschlecht der Tiere die Sterberate von infizierten Oct-TyrR-defizienten Tieren deutlich größer als bei den entsprechenden w^{1118} -Kontrollen. Bei den Weibchen der KOs sterben innerhalb der ersten 48 h ca. 65 %, innerhalb der nächsten 13 Tage noch weitere 10 %. Von den Männchen überleben letztlich auch ca. 25 %, allerdings sterben nur etwa 35 % innerhalb der ersten 48 h. Im Gegensatz zu den Weibchen sterben die Männchen über den Beobachtungszeitraum hinweg also kontinuierlicher.

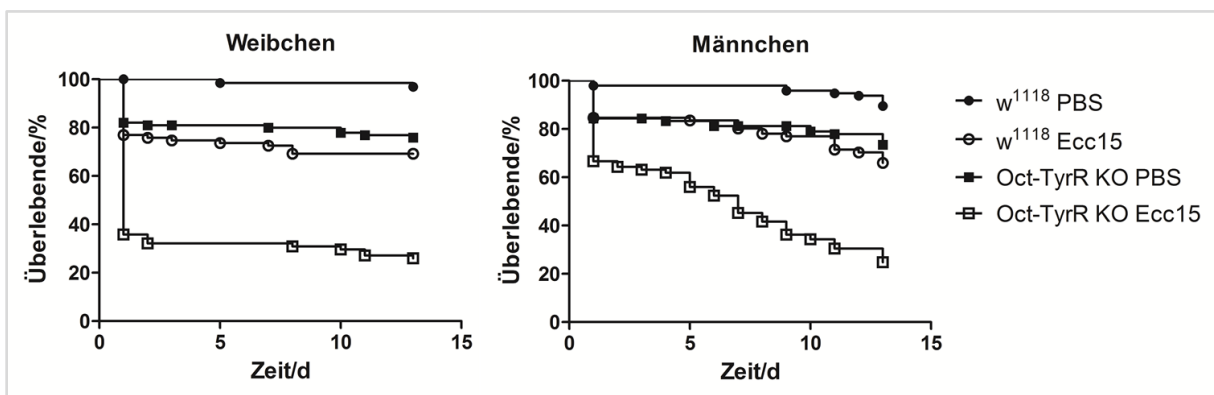


Abb. 35: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Oct-TyrR-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 14 Tage gehalten und die Überlebensrate wurde ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

Die infektionsbedingte Sterberate ist bei der TyrR-KO-Linie (Abb. 36) nicht so deutlich größer im Vergleich zur w^{1118} -Kontrolle wie es bei den Oct-Rezeptor-KOs und dem Oct-TyrR-KO der Fall ist. Bei den Männchen ist tatsächlich kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen infizierten w^{1118} - und TyrR-KO-Tieren erkennbar. In beiden Fällen sterben ca. 15 % in den ersten 48 h nach der Infektion und im weiteren Verlauf des Experimentes nur noch wenig mehr Fliegen. Bei den Weibchen unterscheidet sich die Überlebensrate der infizierten w^{1118} - und TyrR-KO-Fliegen nach den ersten 48 h ebenfalls nicht wesentlich voneinander. Sie liegt bei knapp unter 80 %. Im weiteren Verlauf allerdings bleibt die Population der w^{1118} -Weibchen weitestgehend stabil, während noch etwa 25 % der TyrR-KO-Weibchen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes sterben.

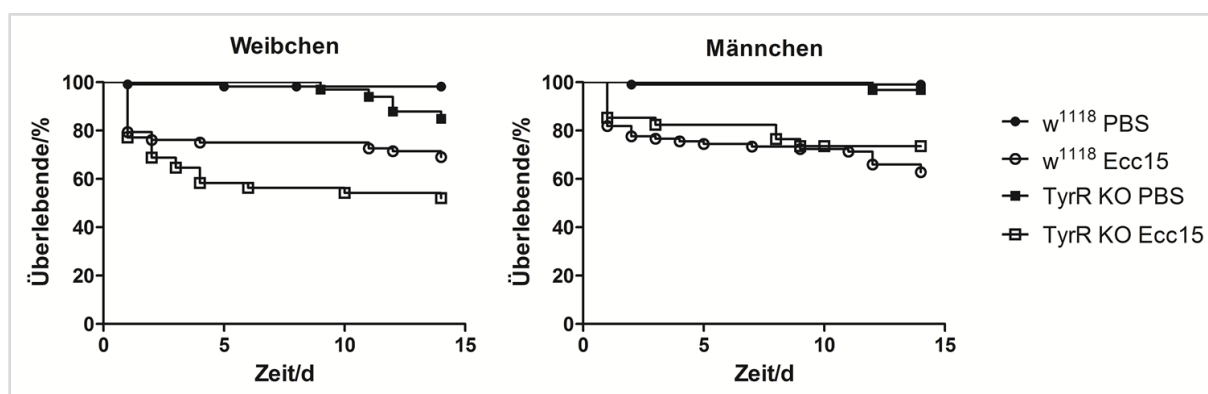


Abb. 36: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes TyrR-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 14 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

Im Falle des TyrRII-KOs (Abb. 37) fielen die Fliegen dadurch auf, dass sie ca. acht Tage nach der Behandlung, unabhängig davon ob PBS oder *Ecc15* injiziert wurde, recht plötzlich sehr träge wurden und sich kaum noch bewegten. Etwa ein bis zwei Tage nach Eintreten der Symptome waren bei den Männchen alle Tiere tot, weshalb die weitere Beobachtung auch bei den Weibchen eingestellt wurde. Bei den Weibchen trat der gleiche Effekt in milderer Form auf. Während an Tag elf alle Männchen tot sind, sind noch etwa 40 % der mit *Ecc15* infizierten TyrRII-defizienten Weibchen am Leben und etwa 80 % der PBS-Kontrollen. Dies traf sowohl auf die PBS-Kontrollen als auch auf die mit *Ecc15* infizierten Tiere zu. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Sterberatenverlauf der infizierten w^{1118} - bzw. TyrRII-KO-Tiere aber recht ähnlich dem der TyrR-KO-Linie.

3 Ergebnisse

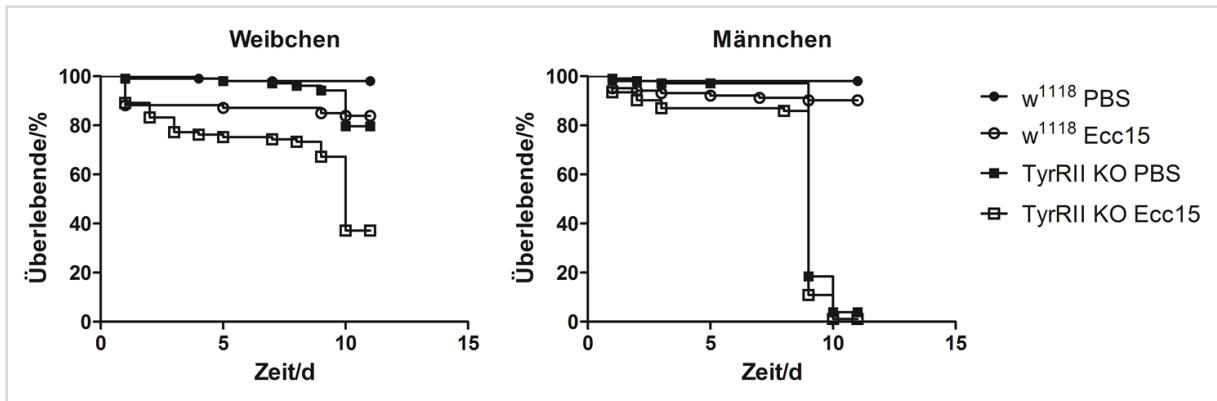


Abb. 37: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes TyrRII-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 11 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

3.4.4 Dop1R1 und Dop1R2 haben keinen unmittelbaren Einfluss auf das Überleben von mit *Ecc15* infizierten Fliegen

Die Überlebensrate beider Dop-Rezeptor-defizienter Linien (Dop1R1-KO und Dop1R2-KO) weicht nach Infektion mit *Ecc15* nicht wesentlich von denen der entsprechenden w^{1118} -Kontrollen ab. Bei den infizierten Dop1R1-defizienten Weibchen (Abb. 38) liegt die Überlebensrate 48 h nach der Behandlung bei ca. 75 %. Die Überlebensrate der entsprechenden w^{1118} -Weibchen liegt nur knapp darüber. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes sterben in beiden Linien nicht wesentlich mehr Weibchen. Bei den Männchen liegen die Überlebensraten der beiden infizierten Stämme ebenfalls sehr dicht beieinander, unterscheiden sich jedoch etwas im Verlauf gegenüber dem der Weibchen. In den ersten 48 h nach der Infektion sterben ca. 15 % der Tiere. Weitere 15 % sterben in den folgenden Tagen bis zum Ende der Beobachtung.

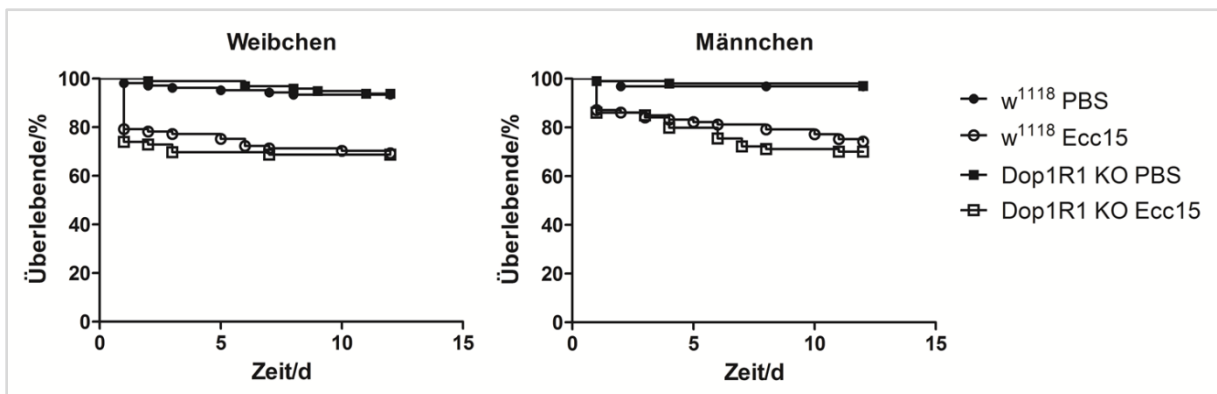


Abb. 38: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Dop1R1-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 11 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

Die Abwesenheit von Dop1R2 (Abb. 39) führt ebenfalls nicht zu einer deutlichen Veränderung der Überlebensrate infizierter KO-Fliegen gegenüber w^{1118} -Tieren.

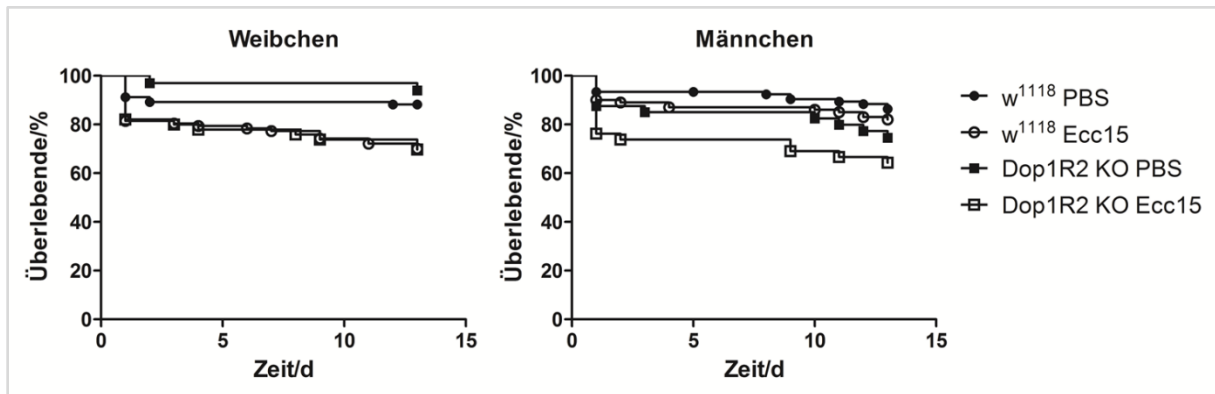


Abb. 39: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* infizierter jungfräulicher Weibchen bzw. Männchen des Stammes Dop1R2-KO bzw. w^{1118} . Die Fliegen bekamen entweder *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Im Anschluss wurden sie bei 29 °C für 11 Tage gehalten und die Überlebensrate ermittelt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 48 h nach Infektion

3.4.5 Eine verminderte Expression von Oct β 1R bzw. Oct β 2R in immunkompetenten Geweben verändert den Immunstatus adulter Fliegen

Die Ergebnisse der Überlebensversuche von Abschnitt 3.4.2 bis 3.4.4 weisen auf eine Beteiligung von Oct an der Immunantwort der Fliege hin. Zur näheren Eingrenzung dieser Beobachtung sollte die Expression von *Oct β 1R* bzw. *Oct β 2R* in Fettkörper, Hämocyten und Lymphdrüse, den Hauptimmunorganen der Fliege, herunterreguliert werden. Zu diesem Zweck wurden Nachkommen der Kreuzung der RNAi-Linien mit der Treiberlinie Cg-GAL4 verwendet. Um sicher zu gehen, dass die möglichen Effekte eines Rezeptorgen-KDs aufgrund der Ähnlichkeit des „sense“-Stranges der generierten shRNA zu anderen Genen keine „off-Target“-Effekte darstellen, wurden jeweils zwei verschiedene RNAi-Linien für *Oct β 1R* bzw. *Oct β 2R* verwendet. Auch bei diesen Infektionsexperimenten wurde anhand der Überlebensrate bestimmt, ob eine verminderte Expression von *Oct β 1R* bzw. *Oct β 2R* den Immunstatus der Fliege beeinflusst. Der KD von *Oct β 1R* in den immunkompetenten Geweben der ersten RNAi-Linie (Oct β 1R_1, Abb. 40) führt weder in Männchen noch Weibchen zu einer Verschlechterung der Überlebensrate nach *Ecc15*-Infektion im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Cg > VALIUM10). Die zweite RNAi-Linie (Oct β 1R_2, Abb. 40) dagegen zeigt in beiden Geschlechtern eine deutliche Abnahme der Überlebensrate. Während am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 14 Tagen noch etwa 75 % der infizierten Kontrolltiere in beiden Geschlechtern leben, leben nur noch knapp 45 % der entsprechenden KD-Weibchen und 50 % der Kontrollmännchen.

3 Ergebnisse

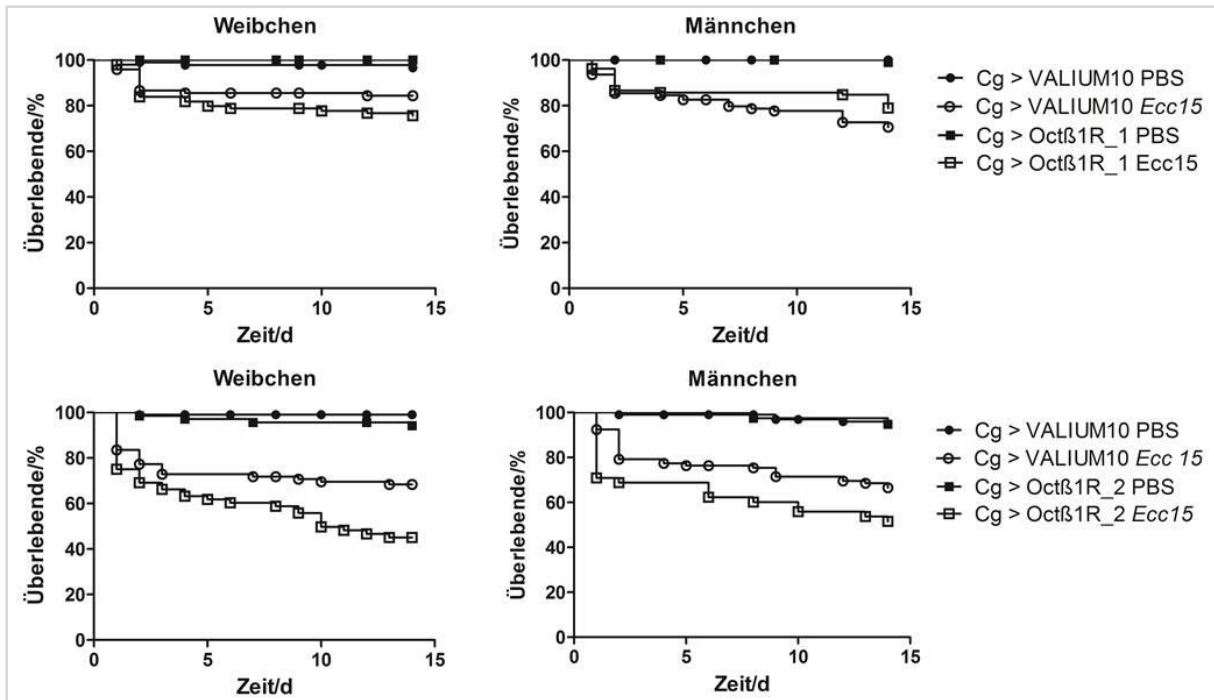


Abb. 40: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) infizierter *Octβ1R*-KD-Fliegen bzw. *VALIUM10* exprimierender Fliegen. Die Expression von *Octβ1R* wird in Hämocyten, Fettkörper und Lymphdrüse durch Kreuzung der entsprechenden UAS-RNAi-Linien mit dem Treiberstamm Cg-GAL4 in den Nachkommen herunterreguliert. Als Kontrolltiere dienten Nachkommen, die sowohl eine Kopie des Cg-GAL4-Konstrukts als auch eine Kopie des Leervektors (*VALIUM10*) trugen. Die Fliegen wurden für 14 d bei 29 °C gelagert und die Anzahl toter Tiere wurde täglich bestimmt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 24 h nach Infektion.

Wird in immunkompetenten Geweben hingegen *Octβ2R* herunterreguliert, so deuten die Ergebnisse in wenigstens einer der beiden RNAi-Linien (*Octβ2R_1*, Abb. 41) sogar auf eine verbesserten Infektionsabwehr hin. Hier leben nach 14 Tagen noch ca. 70 % der infizierten Kontrollweibchen und 65 % der Kontrollmännchen, während etwa 75 % der infizierten KD-Weibchen und -Männchen überlebt haben. Bei der anderen RNAi-Linie (*Octβ2R_2*, Abb. 41) trifft diese Beobachtung nur für die mit *Ecc15* infizierten Weibchen zu. Hier leben am Ende ca. 70 % der Kontrollweibchen und noch ca. 80 % der infizierten KD-Weibchen. Bei den Männchen des *Octβ2R*-KDs kann kein Unterschied zwischen infizierten Kontrolltieren und KD-Tieren festgestellt werden. Allerdings ist die Infektion hier auch insgesamt sehr ineffizient, da anfangs nur etwa 5 % der Kontrolltiere nach Infektion sterben. Der Effekt der *Ecc15*-Infektion auf die Überlebensrate der Kontrollmännchen ist normalerweise mindestens doppelt so stark.

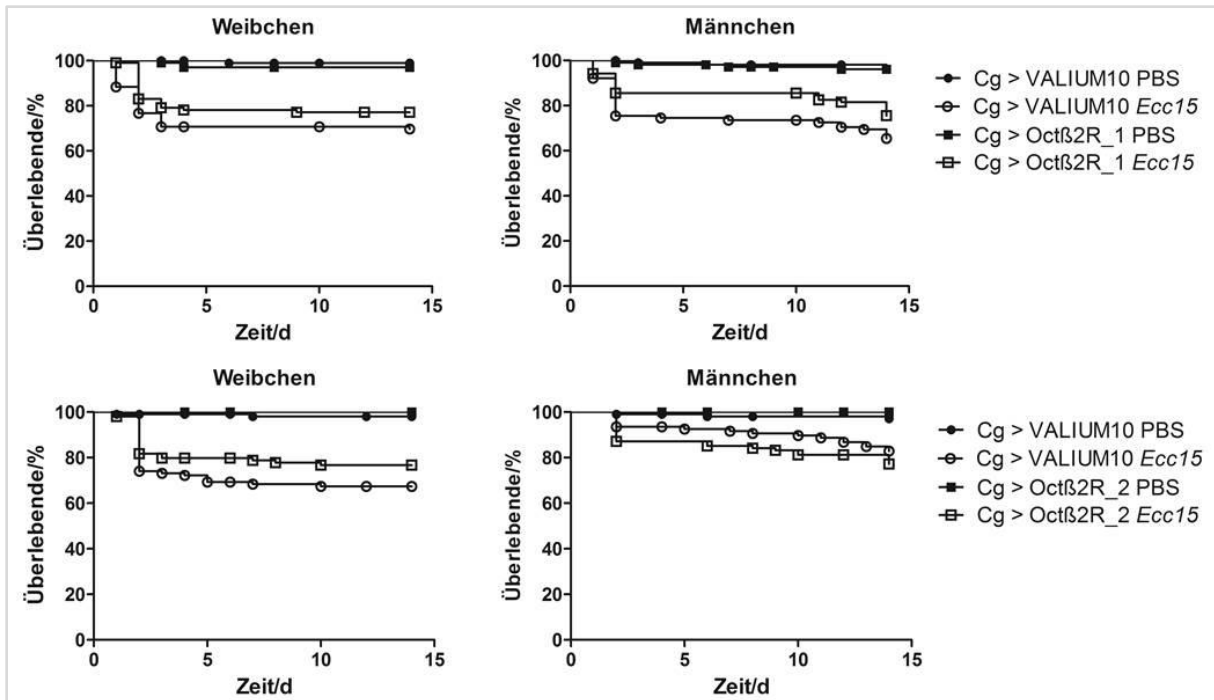


Abb. 41: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* ($OD_{600} = 10$) infizierter *Octβ2R*-KD-Fliegen bzw. *VALIUM10* exprimierender Fliegen. Die Expression von *Octβ2R* wird in Hämocyten, Fettkörper und Lymphdrüse durch Kreuzung der entsprechenden UAS-RNAi-Linien mit dem Treiberstamm Cg-GAL4 in den Nachkommen herunterreguliert. Als Kontrolltiere dienten Nachkommen, die sowohl eine Kopie des Cg-GAL4-Konstrukts als auch eine Kopie des Leervektors (*VALIUM10*) trugen. Die Fliegen wurden für 14 d bei 29 °C gelagert und die Anzahl toter Tiere wurde täglich bestimmt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 24 h nach Infektion.

3.4.6 Eine verminderte Expression von *Octβ1R* bzw. *Octβ2R* in Hämocyten von adulten Fliegen hat keinen Einfluss auf den Immunstatus der Fliege

Da in den Überlebensversuchen von Abschnitt 3.4.5 die octopaminergen Rezeptoren vornehmlich in den Hauptimmunorganen der Fliege herunterreguliert wurden, im Zusammenhang mit dieser Arbeit aber besonders die Hämocyten im Mittelpunkt stehen, sollte noch einmal überprüft werden, inwiefern *Octβ1R* bzw. *Octβ2R* defiziente Hämocyten den Immunstatus der Fliege beeinflussen. Daher wurden die beiden RNAi-Linien für *Octβ1R* bzw. *Octβ2R* mit dem Hämocyten-treiber (*hml,GFP*) gekreuzt, die Nachkommen mit *Ecc15* infiziert und erneut anhand des Überlebens bestimmt, ob eine verminderte Expression von *Octβ1R* bzw. *Octβ2R* in PHs den Immunstatus der Fliege ändert. Abb. 42 kann man deutlich entnehmen, dass eine Herunterregulation von *Octβ1R* in Hämocyten von adulten Fliegen keinen Einfluss auf das Überleben und somit auf den Immunstatus infizierter Tiere hat. So sterben *Ecc15* infizierte Tiere mit *Octβ1R*-defizienten Hämocyten unabhängig vom Geschlecht ebenso schnell und zahlreich wie der infizierte Kontrollstamm. Lediglich bei der zweiten RNAi-Linie scheinen die infizierten Weibchen durch die verminderte Expression des Rezeptors in Hämocyten etwas benachteiligt zu sein. Hier sterben zu Beginn der Beobachtung ca. 20 % der infizierten Kontrollfliegen und 70 % der KD-Fliegen.

3 Ergebnisse

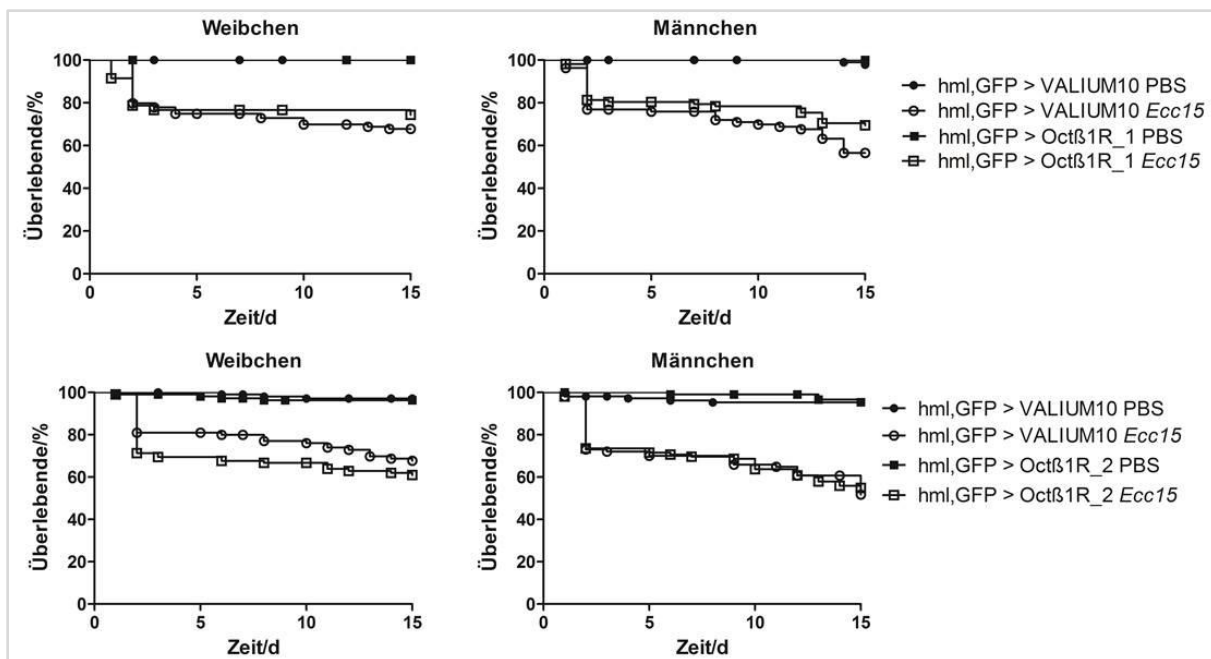


Abb. 42: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* (OD₆₀₀ = 10) infizierter Octβ1R-KD-Fliegen bzw. VALIUM10 exprimierender Fliegen. Die Expression von *Octβ1R* wird in Hämocyten durch Kreuzung der entsprechenden UAS-RNAi-Linien mit dem Treiberstamm hml-GAL4, UAS-GFP in den Nachkommen herunterreguliert. Als Kontrolltiere dienten Nachkommen, die sowohl eine Kopie des hml-GAL4, UAS-GFP - Konstrukts als auch eine Kopie des Leervektors (VALIUM10) trugen. Die Fliegen wurden für 14 d bei 29 °C gelagert und die Anzahl toter Tiere wurde täglich bestimmt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 24 h nach Infektion.

Der Herunterregulation von *Octβ2R* in Hämocyten (Abb. 43) führt zu widersprüchlichen Erkenntnissen. Zunächst einmal kann in beiden RNAi-Linien kein Unterschied in der Überlebensrate infizierter KD-Männchen im Vergleich zu Kontrollmännchen ausgemacht werden. Bei den Weibchen scheint der Effekt einmal immunprotektiv (*Octβ2_1*) und bei der anderen Linie immunsuppressiv (*Octβ2_2*) zu sein. So leben nach 14 Tagen noch etwa 55 % der Kontrolltiere und 65 % der *Octβ2_1*-KDs. Von den Weibchen der *Octβ2_2*-KDs leben nach 14 Tagen noch ca. 65 %, während nur noch etwa 55 % der Kontrollweibchen leben.

3 Ergebnisse

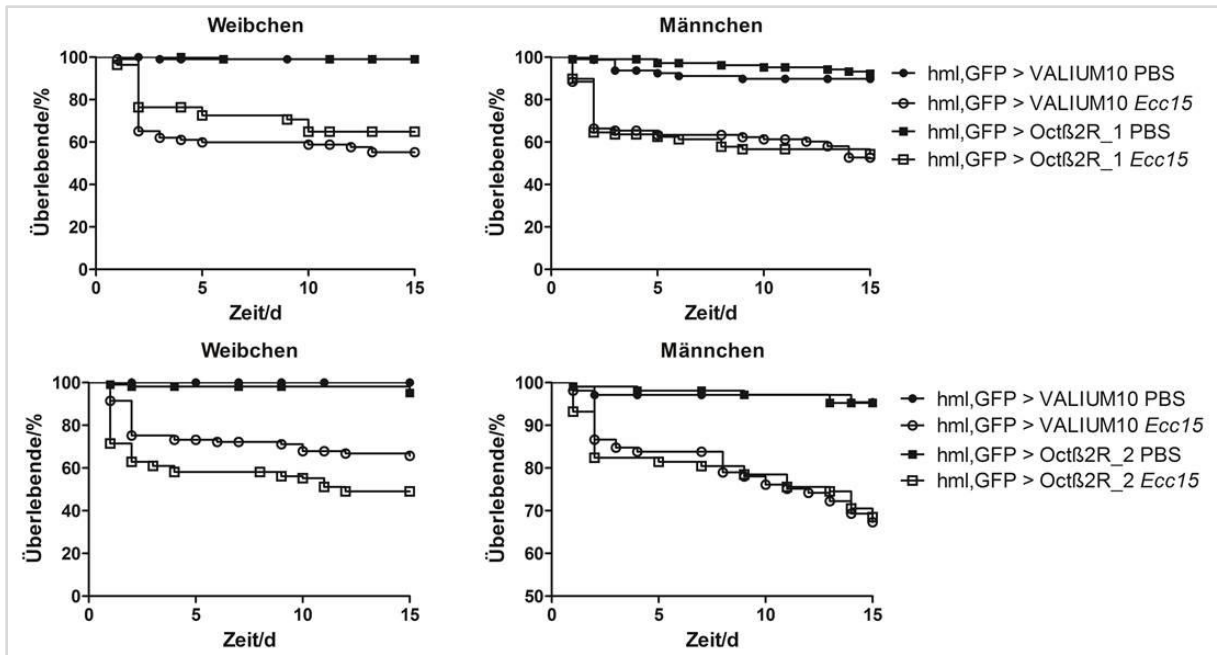


Abb. 43: Überlebensrate fünf bis sechs Tage alter, mit *Ecc15* (OD₆₀₀ = 10) infizierter Octβ2R-KD-Fliegen bzw. VALIUM10 exprimierender Fliegen. Die Expression von *Octβ2R* wird in Hämocyten durch Kreuzung der entsprechenden UAS-RNAi-Linien mit dem Treiberstamm hml-GAL4, UAS-GFP in den Nachkommen herunterreguliert. Als Kontrolltiere dienten Nachkommen, die sowohl eine Kopie des hml-GAL4, UAS-GFP - Konstrukts als auch eine Kopie des Leervektors (VALIUM10) trugen. Die Fliegen wurden für 14 d bei 29 °C gelagert und die Anzahl toter Tiere wurde täglich bestimmt. Die Auftragung erfolgte nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism. „Tag 1“ = 24 h nach Infektion.

4 Diskussion

4.1 Expression biogener Amin-Rezeptoren in immunkompetenten Geweben

Um die Frage beantworten zu können, ob und inwiefern Hämozyten auf BA-vermittelte Signale reagieren können, musste zunächst geklärt werden, ob diese Zellen überhaupt die dafür notwendigen Rezeptoren exprimieren. Zu Beginn dieser Arbeit war die Datenlage bezüglich der Expression biogener Amin-Rezeptoren auf Hämozyten sehr rudimentär. Gängige Expressionsdatenbanken wie *Fly Atlas* führen Hämozyten nicht gesondert auf. Einzig die Microarray-Daten (Affimetrix Array) aus der Arbeit von Regan *et al.* [73] wiesen darauf hin, dass Hämozyten durchaus BA-Rezeptoren exprimieren. Deren Expressionslevel liegt anhand der Ergebnisse aber laut Insel *et al.* offenbar in einem stark fehleranfälligen Bereich [172]. Für derartig schwach exprimierte Gene sind demnach sensitivere Methoden zur Detektion erforderlich. Aus diesem Grund wurde eine RNA-Sequenzierung mit Hilfe der sogenannten *Next-Generation-Sequencing-Technologie* durchgeführt und so das gesamte Transkriptom von durchflusszytometrisch sortierten PHs ermittelt. Später wurde zusätzlich gezielt mittels qRT-PCR die Rezeptorexpression in PHs und Fettkörper aus L3-Larven (Abb. 16) sowie stabil transfizierten (Dipt-Zellen) S2-Zellen, die mit oder ohne 20E vorstimuliert wurden (Abb. 17), untersucht. Der Fettkörper wurde mit eingeschlossen, weil er einen wesentlichen Bestandteil des Immunsystems der Fliege darstellt und seine Immunantwort ebenfalls durch BAs moduliert werden kann. Die Dipt-Zellen wurden auf ihre BA-Rezeptorexpression hin untersucht, um sicher zu gehen, dass sie ein vergleichbares Expressionsprofil wie PHs aufwiesen.

Die Daten der Transkriptomanalyse stellen das Expressionsprofil eines biologischen Replikates dar, weshalb eine Validierung mittels qRT-PCR mit drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt wurde.

4.1.1 Octopamin- und Tyramin Rezeptoren

In *Drosophila* existieren vier verschiedene Oct-Rezeptoren (Oamb, Oct β 1R, Oct β 2R, Oct β 3R), zwei Tyr-Rezeptoren (TyrR, TyrRII), sowie ein Rezeptor, der sowohl Oct als auch Tyr bindet (Oct-TyrR). Oct β 1R, Oct β 2R und Oct β 3R werden ausschließlich durch Bindung von Oct aktiviert. Hinsichtlich ihrer Struktur und Signalweiterleitung weisen sie Ähnlichkeit mit β -adrenergen Rezeptoren in Vertebraten auf [173]. Ihre Aktivierung löst die Bindung eines G $_s$ -Proteins aus, dessen α -Untereinheit schließlich eine Adenylylcyclase zur Produktion des *Second Messenger* cAMP stimuliert (Abb. 2, Tab. 5). Die Ergebnisse sowohl der Transkriptomanalyse als auch der qRT-PCR zeigen deutlich, dass Oct β 1R, Oct β 2R und Oct β 3R im Gegensatz zu allen anderen BA-Rezeptorgenen in PHs vergleichsweise stark exprimiert werden. Die Daten der qRT-PCR zeigen das gleiche Bild auch für den Fettkörper. In Dipt-Zellen werden hingegen nur Oct β 1R und Oct β 2R exprimiert. Erst durch die Stimulation mit 20E lässt sich mittels qRT-PCR die Expression von Oct β 3R nachweisen. Die Expression von Oct-

Rezeptoren im Fettkörper ist grundsätzlich schlüssig, da Oct im Zusammenhang mit einer *fight-or-flight*-Antwort für die Bereitstellung von Lipiden als Energielieferanten aus diesem Gewebe verantwortlich ist [41]. Interessanterweise ist die Expression von *Octβ3R* in Dipt-Zellen nur nach Stimulation mit dem Entwicklungshormon 20E detektierbar. Dies weist zumindest im Fall von *Octβ3R* auf eine mögliche Abhängigkeit der Expression vom Differenzierungsgrad bzw. Immunstatus der Dipt-Zellen hin, was beides unter anderem von 20E bekanntermaßen reguliert wird [66], [70], [73], [74].

In einer kürzlich erschienen Arbeit von El-Kholy *et al.* konnte gezeigt werden, dass das Expressionsprofil von Oct- und Tyr-Rezeptorgenen nicht nur gewebespezifisch ist, sondern sich darüber hinaus auch zwischen Larve und adulter Fliege unterscheidet [174]. Diese Beobachtungen und die augenscheinliche Abhängigkeit der Expression einiger BA-Rezeptoren von 20E unterstreicht die Notwendigkeit, stets den Entwicklungsstatus des zu untersuchenden Gewebes zu berücksichtigen.

Die Aktivierung des vierten Oct-Rezeptors *Oamb* kann auf zwei Arten erfolgen. Oct bindet mit höherer Affinität als Tyr und führt zu einem Anstieg des Ca^{2+} -Levels. Eine Bindung von Tyr erhöht dagegen die cAMP-Konzentration [175]. *Oamb* wird gemäß den Ergebnissen der Transkriptomanalyse in PHs nur sehr schwach exprimiert. Mittels qRT-PCR konnte kein Nachweis für die Expression von *Oamb* in PHs erbracht werden. In Fettkörper und Dipt-Zellen hingegen kann eine stärkere Expression des Rezeptors nachgewiesen werden.

Aufgrund dessen, dass *Octβ1R*, *Octβ2R* und *Octβ3R* in Hämocyten von allen Oct-Rezeptoren und auch allen anderen BA-Rezeptoren am stärksten exprimiert werden, darf davon ausgegangen werden, dass ihnen eine besondere Bedeutung zuzuschreiben ist. Die Hämocyten sind dadurch theoretisch befähigt, auf Signale von Oct zu reagieren. Darüber hinaus kann auch davon ausgegangen werden, dass der *Second Messenger* cAMP für Hämocyten in diesem Zusammenhang besonders wichtig ist, da alle drei Rezeptoren ein G_s -Protein aktivieren, was zu einer Erhöhung von cAMP führt.

Oct-TyrR nimmt als BA-Rezeptor ähnlich wie *Oamb* eine Doppelrolle ein, da er sowohl Oct als auch Tyr binden kann. Mit höherer Affinität wird Tyr gebunden, wodurch eine Adenylyl-cyclase inhibiert wird, mit dem Ergebnis einer verringerten intrazellulären cAMP-Konzentration. Bindet allerdings Oct, so führt dies nach bisheriger Erkenntnis zu einer alternativen Konformationsänderung des Rezeptors mit der Konsequenz, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt [44], [57]. Aufgrund der höheren Affinität von Tyr wird dieser Rezeptor inzwischen als Tyr-Rezeptor aufgeführt [46].

Gemäß den Ergebnissen von Transkriptom- und qRT-PCR-Analyse wird *Oct-TyrR* in PH ebenfalls nur schwach exprimiert, in Fettkörper dagegen stark. In Dipt-Zellen lässt sich allerdings für diesen Rezeptor wie auch für *Octβ3R* eine Abhängigkeit vom Hormon 20E feststellen. Leider kann aufgrund der Tatsache, dass der Rezeptor sowohl eine Affinität zu Oct als auch Tyr hat, keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob seine Expression eher für eine eventuelle Beteiligung von Oct oder Tyr an Hämocyten- bzw. Fettkörperfunktionen spricht.

Die beiden anderen Tyr-Rezeptoren bewirken nach Aktivierung eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (*TyrR*) oder Verringerung der cAMP-Konzentration (*TyrRII*). Auffällig ist dabei die Tatsache, dass keiner der Tyr-Rezeptoren eine Erhöhung der cAMP-Konzentration indu-

ziert. Dadurch lässt sich die als teilweise antagonistisch beschriebene Beziehung zwischen Oct und Tyr erklären [54].

Für *TyrR* und *TyrRII* ist ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den Expressionsprofilen der PHs und Dipt-Zellen auszumachen. Beide Rezeptoren werden in Dipt-Zellen (mit und ohne 20E Stimulation) zwar schwach aber dennoch nachweisbar exprimiert. Auch in Fettkörper können beide Rezeptoren detektiert werden. In PHs werden beide gemäß Transkriptomanalyse nicht exprimiert. Mit Hilfe der qRT-PCR kann jedoch wenigstens *TyrR* sehr schwach detektiert werden.

Wie bereits eingangs erwähnt, könnte ein Grund für die gelegentlich abweichenden Ergebnisse zwischen Transkriptomanalyse und qRT-PCR der sein, dass die Transkriptomanalyse nur einmal mit einer Probe durchgeführt wurde. Bei der geringen Transkriptanzahl, die generell für die BA-Rezeptoren detektiert werden kann, sind demnach Abweichungen nicht auszuschließen. Nichtsdestotrotz ist eine potenzielle modulierende Wirkung von Tyr auf Hämozytenfunktionen grundsätzlich über Oct-TyrR und eventuell auch TyrR möglich. Aufgrund der schwachen Ausprägung liegt allerdings die Vermutung nah, dass Tyr eher eine untergeordnete Rolle bei der Modulation von Hämozytenfunktionen spielt.

Die Klassifizierung der Oct- und Tyr-Rezeptoren unterliegt einem ständigen Wandel, da immer wieder neue Varianten gefunden werden, die eine Neuordnung erfordern [44], [46], [176]. So wurden erst kürzlich in *Chilo suppressalis* zwei *Splice*-Varianten eines weiteren Oct-Rezeptors untersucht, der offenbar homolog zu dem *Drosophila-Orphan*-Gen *CG18208* ist [176]. Die Transkriptomanalyse ermöglicht es, nachträglich auch seine Expression in Hämozyten zu überprüfen. Er wird allerdings in diesen nicht exprimiert. Nichtsdestotrotz wäre es für zukünftige Untersuchungen im Zusammenhang mit Oct-Rezeptoren in *Drosophila* sicherlich sinnvoll, dieses Gen mit einzubeziehen.

4.1.2 Dopamin-Rezeptoren

Die Bedeutung von Dop für die Funktion von Hämozyten in Insekten ist noch relativ wenig untersucht. Es existiert eine Arbeit über Hämozyten aus dem Reisstengelbohrer *Chilo suppressalis*, in der gezeigt werden konnte, dass Dop die Phagozytoseaktivität erhöht, die Überlebensrate von infizierten Larven verbessert und außerdem von Hämozyten selbst synthetisiert werden kann [63]. Darüber hinaus ist in Insekten wenig darüber bekannt, welche Auswirkungen Dop auf das Immunsystem hat.

In *Drosophila* existieren vier Dop-Rezeptoren. Davon gehören zwei zur Klasse der D1-ähnlichen Rezeptoren (*Dop1R1* und *Dop1R2*), die bei Aktivierung ein G_s -Protein binden und somit eine Erhöhung der cAMP-Konzentration auslösen [177]. *Dop1R1* wird relativ schwach in PHs und Dipt-Zellen exprimiert. Die Expression ist allerdings stärker als im Fettkörper und auch als die des zweiten D1-Rezeptors (*Dop1R2*) in PHs und im Fettkörper, der dort nicht detektierbar ist. In Dipt-Zellen können für *Dop1R2* nur sehr schwache Banden ausgemacht werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass dieser Rezeptor eine wesentliche Funktion in immunkompetenten Geweben der Fliege ausübt. *Dop1R1* stellt dagegen ein potentiell Ziel für die Stimulation mit Dop dar.

Eine weitere Rezeptorklasse, die der D2-ähnlichen Rezeptoren, wird durch *Dop2R* repräsentiert. Bei Aktivierung dieses Rezeptors bindet ein $G_{i/o}$ -Protein, wodurch die Produktion intra-

zellulären cAMPs inhibiert wird [177]. *Dop2R*-Expression kann in PHs und Dipt-Zellen detektiert werden, allerdings nur mit Hilfe der qRT-PCR-Analyse.

Gerade im Hinblick auf die Zusammenhänge zwischen Steroidhormonen und BAs ist ein vierter Dop-Rezeptor interessant. *DopEcR* bindet sowohl Dop als auch 20E [178], [179], [180] und wird zur Klasse der β -adrenergen Rezeptoren gezählt [177]. Daher führt auch seine Aktivierung zu einer Erhöhung von intrazellulärem cAMP. Er wird in Fettkörper und Dipt-Zellen relativ stark exprimiert, in PHs hingegen nicht.

Sämtliche Dop-Rezeptoren adressieren den cAMP-Signalweg. Es existiert nach derzeitigem Wissen keiner, der eine Erhöhung von Ca^{2+} induziert. In Hämocyten werden vor allem *Dop2R* und *Dop1R1* exprimiert. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass *Dop2R* wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt, da in der Arbeit von Wu *et al.* gezeigt werden konnte, dass eine Dop-Behandlung von Hämocyten ausschließlich eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levelns zur Folge hatte, nicht aber eine Verringerung desselben oder eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration [63].

4.1.3 Serotonin-Rezeptoren

Wie in Tab. 2 aufgeführt, konnte in einigen Invertebraten bereits ein Zusammenhang zwischen 5-HT und der Immunfunktion von Hämocyten hergestellt werden. Erst kürzlich wurde dies ebenfalls für *Drosophila* bestätigt. So konnten Qi und Kollegen mit Hilfe von RNAi-Linien zeigen, dass 5-HT-Rezeptoren die Phagozytoseaktivität von Hämocyten *in vivo* positiv beeinflussen [65].

In Invertebraten werden extrazelluläre 5-HT-Signale über die drei Rezeptortypen 5-HT1, 5-HT2 und 5-HT7 vermittelt, wobei 5-HT1 und 5-HT2 jeweils zwei Mitglieder (5-HT1A und 5-HT1B, 5-HT2A und 5-HT2B) besitzen. 5-HT1-Rezeptoren binden bei Aktivierung ein $G_{i/o}$ -Protein und inhibieren damit Adenylylcyclasen. 5-HT2-Rezeptoren binden an G_q -Proteine und aktivieren somit PLC, während 5-HT7 durch Bindung an ein G_s -Protein zur Aktivierung von Adenylylcyclasen beiträgt [181].

Während im Fettkörper alle fünf 5-HT-Rezeptorgene exprimiert werden, ist die Expression in Hämocyten etwas differenzierter. In PHs wird von jedem Rezeptortyp nur einer exprimiert (5-HT1A, 5-HT2B und 5-HT7). In Dipt-Zellen kann zusätzlich noch 5-HT2A nachgewiesen werden. Die 5-HT1A-Expression ist darüber hinaus abhängig von einer Stimulation mit 20E.

Nach den Ergebnissen der Transkriptomanalyse zu urteilen, werden alle Rezeptoren nur schwach oder gar nicht exprimiert. Die qRT-PCR-Analyse hebt 5-HT7 als am stärksten exprimiert hervor. Dies gilt für PHs und Fettkörper sowie unstimulierte und stimulierte Dipt-Zellen. Auch dieser Rezeptor führt bei Aktivierung zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Levelns, was die Theorie weiter untermauert, dass dieser Signalweg in Hämocyten eine übergeordnete Rolle spielt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für jedes der untersuchten BAs verschiedene Rezeptortypen in Hämocyten zur Verfügung stehen, über die die einzelnen BAs ihre Wirkung vermitteln können. Bei einigen dieser Rezeptoren ist die Stärke der Expression in Dipt-Zellen offenbar abhängig von der An- bzw. Abwesenheit des Entwicklungshormons 20E. Außerdem deutet die verstärkte Präsenz von G_s -Protein gekoppelten BA-Rezeptortypen

darauf hin, dass potentiell modulierende Effekte von BAs auf Hämocyten hauptsächlich über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt werden.

Ein Grund für die Unterschiede im Expressionsprofil der verschiedenen BA-Rezeptoren zwischen PHs und Dipt-Zellen könnte das Zusammenspiel von BAs mit weiteren Hormonen wie z. B. 20E und JH sein, deren Zusammenwirken mit Stresshormonen bekannt ist [41], [68]. Während diese Stimuli *in vivo* vorhanden sind, fehlen sie *in vitro* (sofern sie nicht hinzugegeben werden) und können daher theoretisch zu einem veränderten Expressionsprofil beitragen. Auch sind die Zellkulturzellen embryonalen Ursprungs, während die PHs aus späten L3-Larven stammen.

Abschließend sei noch auf folgenden Fakt verwiesen: Für die Isolation von PHs wurde der Stamm hml-GAL4, UAS-GFP mit w^{1118} gekreuzt. Das Einkreuzen von w^{1118} erfolgte zur Wiederherstellung eines Wildtyp-Phänotyps der Hämocyten. Dadurch besitzt der genetische Hintergrund der Nachkommen dieser Kreuzung eine Mutation im *white*-Gen.

Zahlreiche transgene *Drosophila*-Linien tragen eine Mutation des *white*-Gens. Inzwischen ist aber bekannt, dass neben der Augenfarbe auch einige andere Funktionen durch die Mutation betroffen sind. So wurde u. a. eine reduzierte Menge an 5-HT und Dop in *white*-Mutanten-Köpfen gefunden. Dies führt z. B. zu Lern- und Erinnerungsdefiziten in diesen Fliegen [182]. Dies kann bedeuten, dass es auch zu einer verminderten Expression der entsprechenden BA-Rezeptoren in anderen Gewebetypen wie z. B. PHs gegenüber Wildtyp-Fliegen kommen kann. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass einige Rezeptorgene wie *Oamb*, *Oct-TyrR*, *TyrR*, *TyrRII*, *DopEcR* und *5-HT2A* in PHs kaum oder nur sehr schwach, in Dipt-Zellen, die ursprünglich einer Wildtyp-Linie (Oregon R) entstammen, hingegen stärker exprimiert werden.

4.2 Bedeutung der intrazellulären cAMP-Konzentration für Immunfunktionen von Hämocyten

Aus Vertebraten ist bekannt, dass eine erhöhte cAMP-Konzentration insgesamt suppressive Effekte auf Immunzellen der angeborenen Immunantwort hat [183]. So konnte z. B. eine durch erhöhte cAMP-Konzentration induzierte, verminderte Phagozytoserate in humanen Makrophagen [184] bzw. humanen Monozyten und Neutrophilen beobachtet werden [183]. Außerdem wurde ein Zusammenhang hergestellt zwischen dem durch cAMP aktivierten Guannukleotid-Austauschfaktor Epac und diversen Zellstrukturfunktionen. Durch eine verstärkte Aktivierung von Epac werden wichtige Zellfunktionen moduliert. *In vitro* in HEK-Zellen konnte z. B. nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Epac durch cAMP die Zelladhäsion und das „Spreading“ begünstigt [185]. Ebenso unterstützt Epac die Proliferation, Differenzierung, Genexpression und Phagozytose in diversen humanen und murinen Zellsystemen [85].

Die Proteinprodukte der gemäß der Expressionsdaten am stärksten in Hämocyten exprimierten Rezeptorgene *Octβ1R*, *Octβ2R*, *Octβ3R*, sowie *5-HT7* und *Dop1R1* binden nach Aktivierung allesamt ein G_s -Protein, welches Adenylylcyclasen stimuliert, die die intrazelluläre

cAMP-Konzentration erhöhen. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass eine potentielle Modulation der Immunantwort von Hämocyten durch BAs (wie z. B. im Fall der Phagozytose) mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Erhöhung der cAMP-Konzentration vermittelt werden kann.

Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse, die mit isolierten bPac⁺-Hämocyten erzielt wurden (Abb. 23). So haben bPac⁺-Hämocyten nach Blaulichtbestrahlung nicht nur einen erhöhten cAMP-Spiegel, sondern auch im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen eine signifikant verminderte Phagozytoseaktivität. Dies bestätigt die Vermutung, dass ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Level Einfluss auf die phagozytotischen Eigenschaften der Zellen hat. Dabei ist zu bemerken, dass die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Aktivierung von bPac sicherlich deutlich über dem Niveau liegt, welches bei Aktivierung endogener Adenylcyclasen durch BA-Rezeptoren in der Zelle vorherrscht. In Abb. 13 ist zu sehen, dass bereits fünf Minuten Bestrahlung ausreichen, um die cAMP-Konzentration in bPac⁺-Hämocyten massiv zu erhöhen. Bei längerer Bestrahlungsdauer wird durch weitere Akkumulation von cAMP durch den Einsatz von Phosphodiesteraseinhibitoren, die den ansonsten eintretenden Abbau von cAMP verhindern, die obere Auflösungsgrenze des Assays erreicht.

Eine unnatürliche Akkumulation von cAMP im Fall einer Phosphodiesteraseinhibition kann alle möglichen Arten von unerwünschten Nebeneffekten erzeugen, weshalb darauf verzichtet wurde, diese beim Phagozytose-Assay einzusetzen. Nichtsdestotrotz stellte sich während des Experiments zwangsläufig die Frage, ob die Zellen durch eine erhöhte cAMP-Konzentration an Vitalität einbüßen. Durch die gleichzeitige Verwendung eines Lebendfarbstoffes und aufgrund einer unveränderten Erscheinung der Zellen hinsichtlich Größe und Granularität konnte ein unmittelbar zytotoxischer Effekt der hohen cAMP-Konzentration jedoch ausgeschlossen werden.

Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass die Bestrahlung mit Blaulicht und die damit verbundene Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einer Vergrößerung von Ausbreitungs- und Gesamtfläche bei der Adhäsion von bPac⁺-Hämocyten auf einem Glasobjektträger führt (Abb. 24).

Beide Effekte schließen sich damit an die zu Beginn dieses Abschnitts beschriebenen Beobachtungen an, die in Immunzellen aus Vertebraten bereits gemacht wurden. Obgleich damit bewiesen ist, dass cAMP eine Rolle bei der Modulation der Phagozytoseaktivität und Adhäsion von PHs spielt, bedeutet es im Umkehrschluss nicht, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten BA-Rezeptoren an dieser Modulation tatsächlich bzw. uneingeschränkt beteiligt sind. Es ist zu bedenken, dass neben BAs auch andere Faktoren eine Rolle spielen könnten, die bei Stress akkumulieren, entsprechende GPCRs aktivieren und dann zu einer Erhöhung des cAMP-Levels führen. Ein Beispiel hierfür ist Adenosin, dessen stress-induzierte Anreicherung und Bindung an seinen GPCR zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und in Folge dessen zu einer Immunsuppression führt [186].

4.3 Einfluss biogener Amine auf Immunfunktionen von Hämocyten

Makrophagen haben seit jeher ein enges Verhältnis zum Nervensystem, denn sie spielen eine enorme Rolle bei seiner Strukturierung während der Entwicklung des Organismus. Im *Droso-*

phila-Embryo entfernen Hämozyten ständig Überreste apoptotischer Neuronen und steuern so die Morphogenese des zentralen Nervensystems [187].

Später in der Larve suchen sessile Hämozyten unter anderem weiterhin die Nähe zum Nervensystem. Sie sammeln sich subkutan in hämatopoetischen Taschen in direkter Nähe zu peripheren sensorischen Neuronenclustern, deren Umgebung für ihr Überleben und ihre Funktion wesentlich zu sein scheint [153], [152]. Da sensorische Nerven äußere Reize wie z. B. Temperatur, Chemikalien oder mechanische Beanspruchung aufnehmen und Hämozyten je nach Stimulus aktiviert werden können, besteht eine direkte Interaktion zwischen neuroendokrinem System und Immunfunktionen der Hämozyten [152].

Um diese Interaktion näher zu charakterisieren, wurden wesentliche Immunfunktionen der Plasmatozyten wie Phagozytoseaktivität und AMP-Produktion im Hinblick auf ihre Modulierbarkeit durch BAs untersucht. Zunächst musste jedoch bestätigt werden, dass die Stimulation mit BAs eine Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren auslöst. Dies sollte anhand eines erhöhten intrazellulären cAMP-Levels nachgewiesen werden, da nach der Ermittlung des Expressionsprofils offensichtlich war, dass G_s-Protein-gekoppelte BA-Rezeptoren in PHs mitunter am stärksten exprimiert werden. Außerdem zielte der Assay darauf ab, einen Eindruck von der Kinetik der BA-Stimulation zu bekommen.

4.3.1 Aktivierung G_s-Protein-gekoppelter BA-Rezeptoren

Unter 4.2 wurde der Zusammenhang zwischen einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration und Hämozytenfunktionen dargelegt. Die am stärksten exprimierten BA-Rezeptoren in Hämozyten vermitteln ihre Wirkung über eine cAMP-Konzentrationserhöhung. Daher sollte durch die Stimulation von Hämozyten mit BAs nun bewiesen werden, dass die Aktivierung dieser Rezeptoren tatsächlich einen solchen Anstieg der Konzentration bewirkt.

Hierfür war die Verwendung von S2-Zellen notwendig, da PHs nicht in ausreichend großer Menge isoliert werden können, um den cAMP-Assay mit verschiedenen Konzentrationen der BAs durchführen zu können. Während mit dem cAMP Glo[®]-Assays bei den bPac⁺-PHs eine deutliche cAMP-Änderung detektiert werden konnte, stellte sich im Zusammenhang mit den S2-Zellen heraus, dass der Assay für diese nur bedingt geeignet ist. Die Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration ist im Vergleich zu der von stimulierten bPac⁺-Hämozyten derart gering, dass sie meist nur die untere Detektionsgrenze des Assays im einstelligen nanomolaren Bereich tangiert. Daher gehen potentielle kleinere Modulationen der cAMP-Konzentration im Hintergrundrauschen verloren.

Es ist nicht unbedingt verwunderlich, dass die Änderungen der cAMP-Konzentration bei den S2-Zellen viel geringer ausfallen als es bei Verwendung der bPac⁺-Hämozyten der Fall war. In diesem doch sehr artifiziellen System werden Rezeptoren stark überexprimiert und können daher den cAMP-Level viel stärker beeinflussen als es bei der Aktivierung endogener Rezeptoren der Fall ist. Bedenkt man wie schwach die natürliche Expression der BA-Rezeptoren in Hämozyten ist, muss ihre entsprechende Aktivierung eine sehr viel geringere Konzentrationsänderung zur Folge haben. Die Publikation von Wu *et al.* [63] macht am Beispiel der Dop-Stimulation bei *Chilo suppressalis* Hämozyten deutlich, dass Änderungen der cAMP-Konzentration eher im zweistelligen picomolaren Bereich zu erwarten sind. Es empfiehlt sich daher, für

eventuelle weiterführende Untersuchungen einen sensitiveren Assay wie z. B. einen ELISA zu verwenden.

Nichtsdestotrotz weisen die Ergebnisse für die Oct- und Dop-Stimulation (Abb. 26, Abb. 27) in der höchsten Konzentration von 100 μM eine signifikante Steigerung der cAMP-Konzentration auf. Außerdem deutet der „Test auf linearen Trend“ auf eine Abhängigkeit der cAMP-Konzentration von der BA-Konzentration hin. Für Oct ist ein Anstieg des cAMP-Levels auf jeden Fall zu erwarten, da die in S2-Zellen exprimierten Rezeptoren, abgesehen von Oamb, bei Aktivierung eine Adenylylcyclase stimulieren. Auch nach Inkubation der Zellen mit Dop ist mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration zu rechnen, da hier mit DopEcR und Dop1R1 zwei Rezeptoren zur Verfügung stehen, die einen solchen Effekt ermöglichen können. Außerdem wäre auch eine Aktivierung des Dop1R2-Rezeptors in S2-Zellen denkbar. Aufgrund seiner sehr schwachen Expression im Vergleich zu DopEcR und Dop1R1 ist allerdings unwahrscheinlich, dass sein eventueller Beitrag zur Erhöhung der cAMP-Konzentration stark ins Gewicht fällt.

Die Stimulation mit 5-HT kann nur bei einer Konzentration von 100 nM zu einer signifikanten Steigerung der cAMP-Konzentration beitragen. Der hierfür notwendige Rezeptor (5-HT7) wird ebenfalls exprimiert. Die kürzlich in der Arbeit von Qi *et al.* untersuchten pharmakologischen Eigenschaften des 5-HT7-Rezeptors aus *Pieris rapae* zeigen, dass eine Stimulationskonzentration von 10 μM 5-HT gerade nicht ausreichen, um die cAMP-Produktion in transfizierten HEK 293-Zellen zu induzieren. Eine Konzentration von 100 μM dagegen führt zu maximaler Erhöhung der cAMP-Konzentration [65]. Dies zeigt, dass die Effekte von 5-HT auf S2-Zellen im cAMP-Glo[®]-Assay zwar schwach, aber durchaus valide sind.

Die Stimulation der Zellen mit Tyr weist eine ähnliche Tendenz auf wie die der anderen BAs, allerdings ist hier keine statistisch signifikante Änderung wahrzunehmen. Eine solche ist eigentlich auch nicht zu erwarten, da die Aktivierung sämtlicher Tyr-Rezeptoren nicht zu einer Stimulation von Adenylylcyclasen führt. Wäre trotzdem eine Erhöhung der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Tyr zu detektieren, so müsste man davon ausgehen, dass es an Oct-Rezeptoren (z. B. Oamb) bindet. Dies ist durchaus möglich, wenn auch mit einer geringeren Affinität als es Oct täte [175].

Zusammenfassend sei gesagt, dass eine signifikante Erhöhung der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Oct (10 μM und 100 μM), Dop (10 μM) und 5-HT (0,1 μM) erreicht werden kann. Ob diese allerdings ausreicht, um auch biologisch relevant zu sein, müssen funktionelle Assays wie z. B. der Phagozytose-Assay aufklären.

4.3.2 Modulation der Phagozytose durch BAs

Zur Untersuchung des Einflusses von BAs auf die Phagozytoseaktivität von Hämozyten wurden ebenfalls S2-Zellen herangezogen und während der Phagozytose von pHrodo *E. coli* oder *S. aureus* Biopartikeln mit verschiedenen Konzentrationen von BAs stimuliert. Der cAMP-Glo-Assay hätte eigentlich auch einen Hinweis auf eine optimale Stimulationskonzentration während der Phagozytose liefern sollen. Da diese aufgrund der mangelnden Sensitivität des Assays nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden auch im Phagozytose-Assay verschiedene Konzentrationen der BAs eingesetzt.

Die Detektion von gram-positiven und gram-negativen Bakterien läuft teilweise über verschiedene Rezeptoren. Da es durchaus möglich sein kann, dass eine BA-abhängige Modulation der Phagozytose auch durch die zu phagozytierende Bakterienspezies beeinträchtigt wird, wurde der Phagozytose-Assay sowohl mit gram-positiven als auch gram-negativen Biopartikeln durchgeführt.

Leider lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Phagozytoseaktivität der S2-Zellen in Abhängigkeit von der BA-Konzentration bzw. der Partikelspezies ausmachen (Abb. 29, Abb. 30). Damit ist nicht grundsätzlich ausgeschlossen, dass die Phagozytoseaktivität von Hämocyten durch BAs moduliert wird. Zum einen wurden die BAs hier zusammen mit den Biopartikeln den Zellen hinzugegeben. Es ist gut möglich, dass dies nicht für alle BAs der optimale Zeitpunkt für die Stimulation ist. Die Entscheidung, in welchen Konzentrationen und zu welchem Zeitpunkt die BAs hinzugegeben seien, wurde aufgrund der Arbeit von Huang *et al.* getroffen, um einen ersten Anhaltspunkt zu haben [50]. In dieser Arbeit wird sich allerdings ausschließlich auf Oct und Hämocyten aus *Chilo suppressalis* bezogen. Es ist durchaus vorstellbar, dass die Kinetik in *Drosophila* und auch für die anderen BAs anders verläuft. Finden außerdem Modulationen auf Genexpressionsebene statt, so dauert es möglicherweise länger, einen sichtbaren Effekt zu erhalten. Ist die Wirkung unmittelbar physiologisch, so müsste ein solcher in einem kürzeren Zeitraum sichtbar werden. Grundsätzlich wäre jedoch eine BA-abhängige Modulation der Phagozytose *in vitro* zu erwarten. Dies haben verschiedene *in vitro*-Untersuchungen in anderen Invertebraten bereits gezeigt. In *Chilo suppressalis*-Hämocyten konnte nachgewiesen werden, dass die Phagozytoseaktivität nach Stimulation mit geringen Oct-Konzentrationen zunimmt, bei höheren Konzentrationen jedoch abnimmt [50]. Im gleichen Insekt führt Behandlung mit Dop zu einer verbesserten Phagozytoseleistung [63]. Außerdem fand man, dass die chemische Blockade der verschiedenen 5-HT-Rezeptortypen in *Pieris rapae*-Hämocyten sehr verschiedene Auswirkungen auf die Phagozytose hat. Während die Blockade des 5-HT_{1B}-Rezeptors durch einen Antagonisten zu einer verminderten Phagozytose führte, bewirkte die Blockade von 5-HT_{2B} das Gegenteil. In der Kakerlake *Periplaneta americana* konnte für Oct, Dop und 5-HT, abhängig von der Konzentration, ein die Phagozytose begünstigender Einfluss entdeckt werden. In dieser Publikation wurde allerdings auch gezeigt, dass 5-HT und Oct in Kombination eine verminderte Wirkung aufweisen [48].

Diese bereits bestehenden Ergebnisse in anderen Invertebraten zeigen, dass auf jeden Fall eine Modulation der Phagozytose durch BAs möglich sein sollte. Oft weisen die Ergebnisse aber in unterschiedliche Richtung, was sicherlich den verschiedenen Insektenarten und Versuchsbedingungen zuzuschreiben ist. Dies zeigt aber auch, wie komplex das Zusammenspiel der Hormone tatsächlich ist. Möglicherweise können *in vitro*-Experimente dieser Komplexität nicht ausreichend gerecht werden, da eventuelle zusätzliche Mitspieler, die für eine Modulation notwendig sein könnten (wie z. B. 20E oder JH), nicht *per se* vorhanden sind. Demnach wäre es sinnvoll, sich zur vollständigen Klärung der Beteiligung von BAs an der Modulation der Phagozytose durch Experimente *in vivo* weiter der Lösung des Problems zu nähern.

4.3.3 Modulation der *dipteracin*-Expression durch BAs

Ein Großteil der bei einer Infektion ausgeschütteten AMPs wird in *Drosophila* vom Fettkörper sezerniert. Dieser steht dabei in enger Interaktion mit den Plasmatozyten [188], [161], die ebenfalls zur AMP-Produktion befähigt sind [115]. Die Expression der AMP-Gene in *Drosophila* steht am Ende zweier zu Vertebraten homologen NF- κ B-Signalwege – dem Imd- und Toll-Signalweg. Diese Signalwege werden in erster Linie durch spezielle Mustererkennende Rezeptoren aktiviert [107]. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass sie durch weitere Faktoren moduliert werden können. Aus Vertebraten ist bekannt, dass die Aktivierung von β_2 -adrenergen-Rezeptoren nach Aktivierung durch NE und damit einhergehender Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu zelltypspezifischer Modulation der Aktivität von NF- κ B führt. Diese wirkt in Monozyten und Makrophagen dabei insgesamt suppressiv [189].

Da die in *Drosophila*-Hämozyten besonders stark synthetisierten Rezeptoren Oct β 1R, Oct β 2R und Oct β 3R strukturelle Homologie zu den β -adrenergen-Rezeptoren in Vertebraten aufweisen und in Hämozyten der Fliege auch weitere BA-Rezeptoren exprimiert werden, die eine Erhöhung der cAMP-Konzentration zur Folge haben (Dop1R1, Dop1R2, DopEcR, 5-HT7), lag die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren in *Drosophila*-Hämozyten ebenfalls eine Modulation der NF- κ B-Signalwege bewirken könnte. Zur Aufklärung dieser Hypothese wurden Dipt-Zellen unterschiedlich lange mit verschiedenen Konzentrationen an Oct, Tyr, Dop bzw. 5-HT stimuliert, während sie außerdem mit PGN provoziert wurden, um den Imd-Signalweg zu aktivieren (Abb. 20, Abb. 21). Sowohl eine Herauf- als auch Herunterregulierung sollte bei der gewählten mittleren PGN-Konzentration sichtbar werden, so sie denn tatsächlich stattfindet. Es kann allerdings weder für die Stimulation mit Oct noch mit Tyr oder 5-HT ein Effekt auf die Expression von *dipteracin* festgestellt werden.

Bei Tyr ist laut Statistik eine signifikante Abweichung bei einer Stimulationsdauer von 30 h mit 0,1 μ M zu sehen. Da aber im Gesamtbild keine eindeutigen Tendenzen hinsichtlich Konzentrations- oder Zeitabhängigkeit sichtbar werden, qualifiziert sich diese Änderung nicht für eine sichere Aussage über einen modulierenden Effekt von Tyr auf die *dipteracin*-Expression.

Für Dop ergibt sich jedoch ein anderes Bild. Wenigstens tendenziell scheint ein konzentrations- und zeitabhängiger Effekt auf die *dipteracin*-Expression zu bestehen. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,01 μ M ist eine stimulierende Wirkung von Dop auf die *dipteracin*-Expression am deutlichsten. So kann zumindest festgestellt werden, dass bei relativ kurzer Stimulation von 6 h eine erhöhte *dipteracin*-Expression gegenüber der H₂O-Kontrolle zu erkennen ist, die bei längerer Stimulationsdauer wieder abnimmt. Eine ähnliche Tendenz ist für 0,1 μ M zu erkennen. Während nach 6-stündiger Inkubation mit Dop eine leicht verstärkte *dipteracin*-Expression gegenüber der Wasserkontrolle vorliegt, ist sie nach 24-stündiger Konzentration signifikant reduziert.

Dies bestätigt, dass der zeitliche Rahmen einer Stimulation durchaus entscheidend sein kann für die Art der Modulation. Da Dop-Rezeptoren ausschließlich mit den cAMP-Signalwegen verknüpft sind, passt dieses Ergebnis durchaus in das oben beschriebene Bild, das bereits durch Experimente in Monozyten und Makrophagen aus Vertebraten gewonnen werden konnte.

Die Tatsache, dass für alle anderen untersuchten BAs keine modulierende Wirkung auf die *dipteracin*-Expression festgestellt werden konnte, kann diverse Gründe haben. Zum einen

besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich kein Zusammenhang zwischen den BAs und der Aktivierung des Imd-Signalwegs in Hämozyten besteht. Zum anderen muss berücksichtigt werden, dass die *dipteracin*-Expression als *Readout*-System für die Aktivierung des Imd-Signalweges nur einen von zwei möglichen NF- κ B-Signalwegen einschließt. Es wäre durchaus vorstellbar, dass der Toll-Signalweg über BAs moduliert werden kann. Allerdings kann der Toll-Signalweg im Vergleich zum Imd-Signalweg *in vitro* nur durch Zugabe der rekombinant hergestellten Vorstufe des Cytokins Spätzle stimuliert werden [190]. Leider ist diese bis heute kommerziell nicht erhältlich.

4.4 Einfluss der biogenen Amine Octopamin, Tyramin und Dopamin auf den Immunstatus infizierter Fliegen

Die *in vitro*-Experimente lieferten nur vage Ergebnisse zur Beantwortung der Frage, ob BAs die Immunantwort der Fliege modulieren können. Die Umgebung, in der BAs üblicherweise ihre Wirkung vermitteln ist eigentlich viel komplexer als *in vitro* nachgestellt werden kann. Daher sollten *in vivo*-Versuche zusätzlich herangezogen werden, um eine Idee davon zu bekommen, welche BA-Rezeptoren auf die Immunantwort infizierter Fliegen modulierenden Einfluss haben. In der Arbeit von Qi *et al.* wurde gezeigt, dass Fliegen, in denen der Rezeptor 5-HT1B oder 5-HT2B in Hämozyten gezielt herunterreguliert wurde, deutlich schneller an einer Infektion mit *S. aureus* sterben als die entsprechenden Kontrollen [65]. Es ist daher anzunehmen, dass auch andere Rezeptor-KOs zu ähnlich modulierenden Effekten führen.

Werden adulte Rezeptor-KO-Fliegen mit *Ecc15* infiziert, so fallen grundsätzlich zwei Dinge auf. Zum einen ist der stärkste Effekt der Infektion auf das Überleben der Fliegen stets in den ersten zwei bis drei Tagen zu beobachten. Die Tiere, die dann noch leben, scheinen die Infektion erfolgreich bekämpft zu haben, da die Sterberate deutlich abnimmt. Zum anderen fällt für nahezu alle verwendeten Rezeptor-KO-Linien anhand der Überlebenskurven auf, dass Männchen die Infektion besser abwehren können als Weibchen, obwohl sie aufgrund ihrer geringeren Körpergröße relativ mehr Bakterien injiziert bekommen hatten (Abb. 32 -Abb. 39). Dies überrascht insofern nicht, als geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort bei *Drosophila* bekannt sind [191]. Im Zuge der geschlechtsorientierten Gesundheits- und Altersforschung findet dieser Faktor übrigens auch beim Menschen inzwischen mehr Beachtung [192]. Neben dem Geschlecht als immunmodulierenden Faktor ist bei den Fliegenweibchen auch wesentlich, ob sie bereits verpaart wurden oder noch jungfräulich sind. Obwohl bei der Paarung selbst einige immunrelevante Gene hochreguliert werden [193], sind die sexuell aktiven Weibchen insgesamt anfälliger gegenüber Infektionen als jungfräuliche Weibchen [191]. Um eine entsprechende Beeinflussung durch den Verpaarungsstatus ausschließen zu können, wurden daher für die Überlebensversuche nur jungfräuliche Weibchen infiziert.

Für die Abwehr einer *Ecc15*-Infektion sind entsprechend der Ergebnisse besonders die octopaminergen Rezeptoren wesentlich (Abb. 32Abb. 34). Ein totaler KO von jeweils einem der

Oct-Rezeptoren führt bei allen drei Linien zu einer vergleichsweise geringeren Überlebensrate von mit *Ecc15* infizierten Fliegen gegenüber infizierten w^{1118} -Tieren.

Im Vergleich zu allen anderen octopaminergen Rezeptor-KOs ist besonders die Oct β 1R-KO-Linie herauszuheben (Abb. 32). So sterben Oct β 1R-Kos unabhängig vom Geschlecht bereits nach Infektion mit PBS wesentlich früher als die vergleichbaren w^{1118} -Kontrollen. Diese Beobachtungen weisen auf eine Bedeutung von Oct β 1R unter anderem für die Wundheilung. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass eine durch die Verwundung induzierte Infiltration von Bakterien, die sich in der Nähe der Einstichstelle auf der Cuticula befinden, das Überleben der Fliegen gefährdet. Die Tiere befinden sich schließlich keineswegs in einer aseptischen Umgebung und kommen daher ständig mit Bakterien in Kontakt, die sie unter normalen Umständen abwehren können. Die Oct β 1R-KO-Linie unterscheidet sich gegenüber allen anderen KO-Linien außerdem dadurch, dass alle Weibchen noch vor dem Ablauf des ansonsten 14 Tage andauernden Beobachtungszeitraumes gestorben sind. Zwar kann auch hier die höchste Sterberate innerhalb der ersten Tage beobachtet werden, allerdings stellt sich anschließend keine Plateauphase ein wie bei den meisten anderen KO-Linien und dem w^{1118} -Stamm. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Immunantwort bei adulten Fliegen des Oct β 1R-KOs derart massiv gestört ist, dass ein effektives Bekämpfen der Infektion unmöglich wird. Das spricht dafür, dass der Rezeptor bzw. sein dazugehöriger Ligand Oct für das Überleben infizierter Fliegen grundsätzlich wesentlich ist und somit Oct einen wichtigen Beitrag zur wirksamen Abwehr der *Ecc15*-Infektion leistet.

Die Infektion der Oct β 2R- und Oct β 3R-KOs (Abb. 33, Abb. 34) liefert ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung der entsprechenden Rezeptoren an der Immunantwort, denn in beiden Fällen ist die Überlebensrate im Verhältnis zum w^{1118} -Stamm vermindert. Für den Oct β 3R-KO ist der Effekt allerdings im Vergleich zu Oct β 2R und Oct β 3R am geringsten. Damit heben sich die drei β -adrenergen Oct-Rezeptoren erneut gegenüber fast allen restlichen Rezeptor-KO-Linien ab, für die nach Infektion mit *Ecc15* keine deutlichen Unterschiede im Überleben festgestellt werden konnten. Eine Ausnahme stellt noch Oct-TyrR dar, auf den weiter unten eingegangen wird.

Die in diesem Experiment verwendeten KO-Linien sind für die jeweiligen Rezeptoren allerdings vollständig aberant, wodurch sich keine Aussage darüber treffen lässt, welche immun-kompetenten Gewebe von *Drosophila* an der Immunabwehr von *Ecc15* beteiligt sind.

Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, wurden UAS-RNAi-Linien für die beiden Oct-Rezeptoren, die nach Infektion die geringste Überlebensrate zeigten (Oct β 1R, Oct β 2R) mit einem Immungewebe-spezifischen bzw. einer Hämocyten-spezifischen GAL4-Treiberlinie gekreuzt, sodass in der folgenden Generation die Rezeptoren in Fettkörper, Hämocyten und Lymphdrüsen (Abb. 40, Abb. 41) bzw. nur Hämocyten (Abb. 42, Abb. 43) mittels RNAi herunterreguliert wurden (*Knock-Down*, KD). Um eventuelle *Off-Target*-Effekte der RNAi-Konstrukte ausschließen zu können, wurden jeweils zwei verschiedene RNAi-Linien pro Rezeptor verwendet. Beim Vergleich der Überlebenskurven infizierter Oct β 1R bzw. Oct β 2R-KD-Fliegen mit den dazugehörigen Kontrollen fällt auf, dass lediglich eine Herunterregulierung von *Oct β 1R* in immunspezifischen Geweben zu einem vermeintlich schlechteren Überleben beider Geschlechter führt. Allerdings konnte das nur für eine der beiden RNAi-Linien für Oct β 1R gezeigt werden (Oct β 1R_2). Eine Herunterregulierung von *Oct β 1R* bzw.

Octβ2R in Hämocyten scheint hingegen keinen Einfluss auf das Überleben von infizierten adulten Fliegen zu haben, wodurch anhand dieser Experimente keine klare Aussage über die Bedeutung der octopaminergen Rezeptoren *Octβ1R* und *Octβ2R* für die Immunabwehr der Tiere getroffen werden kann. Um generell die Ergebnisse der RNAi-Versuche besser bewerten zu können, wäre die Ermittlung der Effizienz des Knock-downs mittels qRT-PCR hilfreich gewesen. Darauf wurde im Vorfeld jedoch bewusst verzichtet, da zum einen insbesondere die Isolation einer für die qRT-PCR notwendigen Menge an Hämocyten mittels FACS sehr zeitintensiv und aufwendig gewesen wäre und zum anderen bereits zahlreiche Publikationen belegen, dass der hier verwendete Hämocyten bzw. immunspezifische Treiber häufig für die Herunterregulation eines Zielgens in adulten Fliegen verwendet wurden [65], [194].

Alternativ wäre die Verwendung von Fliegenlinien anzuraten, die bessere Kontrolle über die Effizienz des KDs ermöglichen. Hierfür wären *Geneswitch*-Linien denkbar, bei denen abhängig von der Konzentration eines hinzugegebenen Hormones das Zielgen gezielt herunterreguliert wird. Allerdings muss auch bei diesen Linien stets die Effizienz des Knock-downs überprüft werden.

Die Herunterregulierung von *Octβ1R* bzw. *Octβ2R* hat in Hämocyten scheinbar keinen Effekt auf die Immunabwehr der Fliegen. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass sie bei der Oct-vermittelten Modulation der Immunantwort nicht beteiligt sind. Es bedeutet nur, dass die Zellen die Signale von Oct offenbar nicht selbst verarbeiten. Theoretisch könnten andere Zelltypen auf Oct reagieren und in Folge sekundäre Mediatoren ausschütten, auf die Hämocyten dann mit einer modulierten Immunantwort reagieren. Klarheit über die eventuelle Beteiligung der octopaminergen Rezeptoren an der zellulären Immunantwort könnte daher auch ein *in vivo*-Phagozytose-Assay in den KO-Linien liefern. Hierbei würden pHrodo[®]-Partikel anstelle von *Ecc15* in die Tiere injiziert und mikroskopisch die Phagozytoseaktivität der Zellen bestimmt.

Neben den Oct-Rezeptoren reduziert auch die ubiquitäre Abwesenheit des Oct-TyrR die Überlebensrate infizierter Fliegen beträchtlich. Es fällt außerdem auf, dass allein die Injektion von PBS die Überlebensrate der KO-Tiere drastisch senkt, was ähnlich dem *Octβ1R*-KO ein Hinweis darauf sein kann, dass entweder die bei der Verwundung eintretenden Bakterien bereits ausreichen, um die Tiere zu schwächen oder die Wundheilung selbst gestört ist. Nichtsdestotrotz hat ein Fehlen dieses Rezeptors wesentliche Bedeutung für die Bekämpfung der *Ecc15*-Infektion. Da dieser Rezeptor aber sowohl durch Bindung von Oct als auch Tyr aktiviert werden kann, lässt sich anhand der Ergebnisse der Überlebensversuche keine Aussage treffen, welches BA Anteil an der Reduktion der Immunabwehr hat. Im Fall der Ergebnisse für die beiden anderen Tyr-Rezeptoren ist es schwierig zu beurteilen, ob Tyr-Rezeptoren generell die Immunantwort modulieren. Bei der TyrR-KO Linie ist ein Unterschied in der Überlebensrate nur bei den infizierten Weibchen im Vergleich zur w^{1118} -Kontrolle auszumachen. Dies würde dafür sprechen, dass dieser Rezeptor-KO durchaus einen Einfluss auf das Überleben der Tiere hat und darüber hinaus geschlechtsspezifisch wirkt. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Beteiligung von Hormonen wie 20E und JH sein, die in Männchen und Weibchen unterschiedlich stark reguliert werden und ihrerseits mit der BA-Regulation verknüpft sind [68], [195]. Für die infizierten Tiere der TyrRII-KO-Linie konnte zunächst kein Unterschied in der Überlebensrate im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren festgestellt werden. Diese Linie fiel aber aufgrund einer Besonderheit auf. Sowohl infizierte als

auch nicht infizierte Fliegen unabhängig vom Geschlecht, wurden nach ca. acht Tagen plötzlich sehr träge und verstarben innerhalb von weiteren zwei Tagen fast vollständig. Da dies bei den w¹¹¹⁸-Kontrolltieren nicht der Fall war, kann ein Problem bei der Durchführung des Experimentes ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse für die beiden Dop-Rezeptor-KOs zeigen, dass sie an der Abwehr der *Ecc15*-Infektion nicht beteiligt sind. Diese beiden Rezeptoren decken die Bindungsmöglichkeiten für Dop allerdings nicht vollständig ab. Zusätzlich kann Dop an Dop2R oder DopEcR binden, für die aber im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keine KO-Linien zur Verfügung standen.

5 Zusammenfassung

Seit längerem ist bekannt, dass Stress ein Risikofaktor für die Entstehung und Exazerbation von Asthma sowie anderer chronischer Atemwegserkrankungen ist. Stress induziert die Ausschüttung neuroendokriner Faktoren wie biogener Amine (BAs), die modulierend sowohl auf die angeborene als auch adaptive Immunantwort wirken können. Effekte biogener Amine auf Zellen der angeborenen Immunantwort können allerdings aufgrund des engen Zusammenspiels mit der adaptiven Immunantwort in komplexen Modellorganismen wie der Maus nur schwer aufgeklärt werden. Einfachere Modellsysteme wie das der Taufliege *Drosophila melanogaster*, die ausschließlich ein angeborenes Immunsystem besitzt, eignen sich besser, um dieser Fragestellung nachzugehen. So nutzt die Fliege nicht nur eine Reihe von Signalwegen, die hohe Ähnlichkeit zu denen des Menschen haben (z. B. Toll-Rezeptoren, NF- κ B-Signalwege), sondern auch Catecholamin-Analoga (z. B. Dopamin oder das mit Norepinephrin chemisch verwandte Octopamin), die sowohl in der Fliege als auch im Menschen dieselben intrazellulären Signalwege anstoßen. Auch wird in *Drosophila* die zelluläre Immunantwort ausschließlich von Makrophagen-ähnlichen Hämozyten vermittelt, deren Hauptaufgabe in der Phagozytose apoptotischer Zellen und Mikroorganismen besteht. Darüber hinaus sind sie auch zur Synthese antimikrobieller Peptide befähigt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob die BAs Octopamin, Tyramin, Dopamin und Serotonin die zelluläre Immunantwort in der Taufliege modulieren.

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass Hämozyten Rezeptorgene für alle zu untersuchenden BAs exprimieren und damit grundsätzlich in der Lage sind, auf diese zu reagieren. Zur Beantwortung der Frage, ob BAs die Expression antimikrobieller Peptidgene modulieren, wurde die aus *Drosophila* stammende Hämozytenzelllinie S2 mit den verschiedenen BAs stimuliert und die Modulation der Expression des antimikrobiellen Peptidgens *dipteracin* bestimmt. Während Octopamin, Tyramin und Serotonin *in vitro* keine signifikante Modulation der *dipteracin*-Expression in Abhängigkeit von Konzentration bzw. Stimulationsdauer induzierten, konnte für Dopamin allenfalls ein leichter, modulierender Effekt festgestellt werden.

Des Weiteren wies das Expressionsprofil der BA-Rezeptoren in Hämozyten darauf hin, dass ein Großteil der in diesen Zellen existenten BA-Rezeptoren zur Klasse der G_s-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, die bei Aktivierung eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration induzieren. Dass ein cAMP-Konzentrationsanstieg in Hämozyten von *Drosophila*-Larven die Immunfunktion von Hämozyten tatsächlich moduliert, konnten *ex vivo*-Versuche mit genetisch veränderten Hämozyten zeigen, die eine xenogene photoaktivierte Adenylylcyclase (bPac) aus dem Bodenbakterium *Beggiatoa* exprimieren. So nimmt in bPac-exprimierenden Hämozyten die Phagozytoserate nach Induktion durch Blaulicht im Vergleich zur Kontrolle maßgeblich ab, während die Ausbreitungsfläche der Zellen signifikant zunimmt.

Um nachzuweisen, dass BAs unter anderem über G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren den Anstieg von cAMP in Hämozyten bewirken, wurden S2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen BAs stimuliert. Ein, wenn auch nur geringer Anstieg von intrazellulärem cAMP konnte lediglich für Octopamin und Dopamin verzeichnet werden. Die

in vitro-Stimulation von S2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an BAs hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Phagozytoseaktivität.

In Infektionsexperimenten mit verschiedenen BA-Rezeptor-defizienten adulten Fliegen konnte allerdings gezeigt werden, dass alle octopaminergen Rezeptoren sowie der Tyramin-Rezeptor Oct-TyrR an der Immunantwort gegen das gram-negative Bakterium *Pectobacterium carotovorum* beteiligt sind. Infizierte Rezeptor-defiziente Tiere für die octopaminergen Rezeptoren Oct β 1R, Oct β 2R und Oct β 3R starben im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen vermehrt. Ein Fehlen der Dopamin-Rezeptoren (Dop1R1 und Dop1R2) und zwei weiterer Tyramin-Rezeptoren (TyrR und TyrRII) scheint hingegen keinen Effekt auf die Immunabwehr von adulten Fliegen zu haben.

Da besonders Oct β 1R- und Oct β 2R-defiziente Tiere eine schlechtere Immunabwehr bei Infektion aufwiesen, sollte außerdem geklärt werden, ob diese beiden Rezeptoren in den immunkompetenten Geweben Fettkörper, Hämocyten und Lymphdrüse an der Vermittlung des immunprotektiven Effekts von Octopamin beteiligt sind. Die gezielte Herunterregulierung eines der beiden Rezeptoren mittels RNAi konnte allerdings keine Notwendigkeit für die octopaminergen Rezeptoren in Hämocyten zur Bekämpfung der Bakterien erkennen lassen. Auch die Herunterregulierung der Rezeptoren in Fettkörper, Hämocyten und Lymphdrüsen scheint erstaunlicherweise die Bekämpfung gram-negativer Bakterien nicht maßgeblich zu beeinflussen.

Abschließend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit zumindest für eines der hier untersuchten BAs, nämlich Octopamin, zumindest erste Hinweise dafür aufgedeckt wurden, dass BAs auch in der Fliege die Immunabwehr modulieren können. Die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche weisen darauf hin, dass Octopamin in der Fliege eher einen immunprotektiven Charakter hat.

6 Summary

Stress is known to be a risk factor for the development and exacerbation of asthma and other chronic respiratory diseases. It induces the release of neuroendocrine factors like biogenic amines (BAs), modulating the innate and adaptive immune response. Effects of BAs on innate immune cells can barely be elucidated in complex model organisms such as mice due to the close interaction with the adaptive immune response. Simpler model organisms such as the fruit fly *Drosophila melanogaster* are more suitable to address this issue, since they only have an innate immune system. The fly not only uses a couple of signalling pathways with high similarities to human counterparts (e. g. Toll-receptors, NF- κ B-signalling pathways). It also uses analogues to catecholamins (e. g. dopamine or octopamine, a chemical relative of norepinephrine), activating the same intracellular signalling pathways in flies as in humans. Moreover, the cellular immune response in *Drosophila* is mediated by macrophage-like hemocytes, which primarily phagocytise apoptotic cells and microorganisms. Additionally, these cells are capable of synthesising antimicrobial peptides.

Within the scope of this thesis it should be elucidated, whether the BAs octopamine, tyramine, dopamine and serotonin modulate the cellular immune response in the fruit fly.

The work in hand could show that hemocytes express receptor genes for all investigated BAs and are therefore capable of reacting to corresponding stimuli. To answer the question, whether BAs modulate the expression of antimicrobial peptide genes, the *Drosophila*-derived hemocyte cell line S2 had been stimulated with the different BAs and the modulation of the antimicrobial peptide gene expression had been determined.

Octopamine, tyramine and serotonin could not induce a significant modulation of *dipteracin*-expression depending on concentration or length of stimulation *in vitro*, whereas a slight modulating effect could be observed for dopamine. Moreover, the expression profile of BA receptors in hemocytes pointed out that a majority of the BA receptors, found in hemocytes, induces an increase in intracellular cAMP concentration via the class of G_s-protein-coupled receptors. An increase of the cAMP concentration in hemocytes of *Drosophila*-larvae can in fact modulate the immune functions of hemocytes. This could be shown by *ex vivo*-experiments with genetically manipulated hemocytes, expressing a xenogeneic photoactivated adenylylcyclase (bPac) from the soil bacterium *Beggiatoa*. In bPac-expressing hemocytes the phagocytic activity after induction with blue light decreases substantially in comparison to the control, whereas the cell's spreading area increases significantly. To proof that BAs can induce the increase of the cAMP-concentration in hemocytes via G_s-protein-coupled receptors, S2-cells were stimulated with different concentrations of BAs. An increase, if only slight, of intracellular cAMP could be found only for octopamine and dopamine. The *in vitro*-stimulation of S2-cells with different concentrations of BAs could not reveal a detectable effect on the phagocytic activity.

In infection experiments with different BA-receptor-deficient adult flies, it could be demonstrated that all octopaminergic receptors and the tyramine-receptor Oct-TyrR are involved in the immune response against the gram-negative bacterium *Pectobacterium carotovorum*. Infected, receptor-deficient flies for the octopaminergic receptors Oct β 1R, Oct β 2R and Oct β 3R died in greater number compared to the corresponding controls. The lack of the

dopamine-receptors (Dop1R1, Dop1R2) and two additional tyramine-receptors (TyrR, TyrRII) does seemingly have no effect on the immune defence of adult flies.

Since especially Oct β 1R- and Oct β 2R-deficient flies had an impaired immune response to infection, it should be elucidated, whether those two receptors are involved in the mediation of the immune-protective effect of octopamine in immune-competent tissues (fat body, hemocytes and lymph gland). The targeted knock-down of one of the two receptors with the help of RNAi could not indicate the need for the octopaminergic receptors in hemocytes in order to fight bacteria. Additionally, the knock-down of those receptors in fat body, hemocytes and lymph glands did not seem to affect the defence against gram-negative bacteria, substantially.

In summary, it can be stated that in the scope of this thesis, first hints could be found for the modulating effects of at least one BA, namely octopamine, on the immune response of *Drosophila*. The results *in vivo* point to a rather immunoprotective character of octopamine in the fly.

7 Referenzen

- [1] H. Selye, *Stress in Health and Disease*. Boston: Butterworth-Heinemann Ltd, 1976.
- [2] C. Liezmann, B. Klapp, und E. M. Peters, „Stress, atopy and allergy“, *Dermatoendocrinol.*, Bd. 3, Nr. 1, S. 37–40, 2011.
- [3] D. S. Goldstein und I. J. Kopin, „Evolution of concepts of stress“, *Stress*, Bd. 10, Nr. 2, S. 109–120, Jan. 2007.
- [4] G. P. Chrousos, „Stress and disorders of the stress system“, *Nat. Rev. Endocrinol.*, Bd. 5, Nr. 7, S. 374–381, Juli 2009.
- [5] F. S. Dhabhar, „Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology“, *Neuroimmunomodulation*, Bd. 16, Nr. 5, S. 300–317, Juni 2009.
- [6] F. A. Costa-Pinto und J. Palermo-Neto, „Neuroimmune interactions in stress“, *Neuroimmunomodulation*, Bd. 17, Nr. 3, S. 196–199, 2010.
- [7] D. A. Padgett und R. Glaser, „How stress influences the immune response“, *Trends Immunol.*, Bd. 24, Nr. 8, S. 444–448, Aug. 2003.
- [8] M. R. Irwin und S. W. Cole, „Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 11, Nr. 9, S. 625–632, Sep. 2011.
- [9] S. Cohen, D. Janicki-Deverts, und G. E. Miller, „Psychological stress and disease“, *JAMA*, Bd. 298, Nr. 14, S. 1685–1687, Okt. 2007.
- [10] A. F. Trueba und T. Ritz, „Stress, asthma, and respiratory infections: pathways involving airway immunology and microbial endocrinology“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 29, S. 11–27, März 2013.
- [11] J. Douwes, C. Brooks, und N. Pearce, „Asthma nervosa: old concept, new insights“, *Eur. Respir. J.*, Bd. 37, Nr. 5, S. 986–990, Mai 2011.
- [12] P. W. Finn und T. D. Bigby, „Innate Immunity and Asthma“, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, Bd. 6, Nr. 3, S. 260–265, Mai 2009.
- [13] D. Wrona, „Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems“, *J. Neuroimmunol.*, Bd. 172, Nr. 1–2, S. 38–58, März 2006.
- [14] D. D. Taub, „Neuroendocrine interactions in the immune system“, *Cell. Immunol.*, Bd. 252, Nr. 1–2, S. 1–6, Jan. 2008.
- [15] K. S. Madden, „Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 17 Suppl 1, S. S5-10, Feb. 2003.
- [16] E. M. Sternberg, „Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 6, Nr. 4, S. 318–328, Apr. 2006.
- [17] I. J. Elenkov und G. P. Chrousos, „Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 966, Nr. 1, S. 290–303, 2002.
- [18] R. Glaser und J. K. Kiecolt-Glaser, „Stress-induced immune dysfunction: implications for health“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 5, Nr. 3, S. 243–251, März 2005.
- [19] S. A. Adamo, „The effects of the stress response on immune function in invertebrates: an evolutionary perspective on an ancient connection“, *Horm. Behav.*, Bd. 62, Nr. 3, S. 324–330, Aug. 2012.
- [20] F. S. Dhabhar und B. S. McEwen, „Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 11, Nr. 4, S. 286–306, Dez. 1997.

- [21] F. S. Dhabhar und B. S. McEwen, „Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 11, Nr. 4, S. 286–306, Dez. 1997.
- [22] B. S. McEwen, „Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain“, *Dialogues Clin. Neurosci.*, Bd. 8, Nr. 4, S. 367–381, Dez. 2006.
- [23] S. A. Adamo, „Stress responses sculpt the insect immune system, optimizing defense in an ever-changing world“, *Dev. Comp. Immunol.*, Juni 2016.
- [24] S. A. Adamo, „Norepinephrine and octopamine: linking stress and immune function across phyla“, 2008.
- [25] H. H. Publications, „Understanding the stress response“, *Harvard Health*. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.health.harvard.edu/staying-healthy/understanding-the-stress-response>. [Zugegriffen: 19-Sep-2016].
- [26] L. Steinman, „Elaborate interactions between the immune and nervous systems“, *Nat. Immunol.*, Bd. 5, Nr. 6, S. 575–581, Juni 2004.
- [27] J. Balhara und A. S. Gounni, „The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword“, *Mucosal Immunol.*, Bd. 5, Nr. 6, S. 605–609, Nov. 2012.
- [28] E. Broug-Holub, J. H. A. Persoons, K. Schornagel, S. C. Mastbergen, und G. Kraal, „Effects of Stress on Alveolar Macrophages: A Role for the Sympathetic Nervous System“, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Bd. 19, Nr. 5, S. 842–848, Nov. 1998.
- [29] F. McKenna u. a., „Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study“, *J. Neuroimmunol.*, Bd. 132, Nr. 1–2, S. 34–40, Nov. 2002.
- [30] R. Pacheco, F. Contreras, und M. Zouali, „The Dopaminergic System in Autoimmune Diseases“, *Front. Immunol.*, Bd. 5, März 2014.
- [31] B. E. Leonard, „The HPA and immune axes in stress: The involvement of the serotonergic system“, *Eur. Psychiatry*, Bd. 20, Supplement 3, S. S302–S306, Okt. 2005.
- [32] A. Chen u. a., „Dispensable, redundant, complementary, and cooperative roles of dopamine, octopamine, and serotonin in *Drosophila melanogaster*“, *Genetics*, Bd. 193, Nr. 1, S. 159–176, Jan. 2013.
- [33] P. J. O’Connell, X. Wang, M. Leon-Ponte, C. Griffiths, S. C. Pingle, und G. P. Ahern, „A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells“, *Blood*, Bd. 107, Nr. 3, S. 1010–1017, Feb. 2006.
- [34] N. M. Kushnir-Sukhov u. a., „5-Hydroxytryptamine Induces Mast Cell Adhesion and Migration“, *J. Immunol.*, Bd. 177, Nr. 9, S. 6422–6432, Jan. 2006.
- [35] S. A. Boehme u. a., „Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 173, Nr. 6, S. 3599–3603, Sep. 2004.
- [36] K. Nakamura, T. Sato, A. Ohashi, H. Tsurui, und H. Hasegawa, „Role of a serotonin precursor in development of gut microvilli“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 172, Nr. 2, S. 333–344, Feb. 2008.
- [37] R. J. Wright, „Stress and atopic disorders“, *J. Allergy Clin. Immunol.*, Bd. 116, Nr. 6, S. 1301–1306, Dez. 2005.
- [38] S. A. Adamo, „The effects of stress hormones on immune function may be vital for the adaptive reconfiguration of the immune system during fight-or-flight behavior“, *Integr. Comp. Biol.*, Bd. 54, Nr. 3, S. 419–426, Sep. 2014.
- [39] V. Hartenstein, „The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective“, *J. Endocrinol.*, Bd. 190, Nr. 3, S. 555–570, Jan. 2006.
- [40] B. de Velasco u. a., „Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain“, *Dev. Biol.*, Bd. 302, Nr. 1, S. 309–323, Feb. 2007.

- [41] V. Perić-Mataruga, V. Nenadović, und J. Ivanović, „Neurohormones in insect stress: A review“, *ResearchGate*, Bd. 58, Nr. 1, Jan. 2006.
- [42] N. Gruntenko u. a., „The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to environmental stresses“, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Bd. 55, Nr. 2, S. 55–67, Feb. 2004.
- [43] T. Roeder, „Octopamine in invertebrates“, *Prog. Neurobiol.*, Bd. 59, Nr. 5, S. 533–561, Dez. 1999.
- [44] T. Farooqui, „Review of octopamine in insect nervous systems“, *Open Access Insect Physiol.*, S. 1, Juni 2012.
- [45] T. Roeder, „TYRAMINE AND OCTOPAMINE: Ruling Behavior and Metabolism“, *Annu. Rev. Entomol.*, Bd. 50, Nr. 1, S. 447–477, 2005.
- [46] P. D. Evans und B. Maqueira, „Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors“, *Invert. Neurosci.*, Bd. 5, Nr. 3–4, S. 111–118, Okt. 2005.
- [47] S. A. Adamo und N. M. Parsons, „The emergency life-history stage and immunity in the cricket, *Gryllus texensis*“, *Anim. Behav.*, Bd. 72, Nr. 1, S. 235–244, Juli 2006.
- [48] D. Baines, T. DeSantis, und R. G. H. Downer, „Octopamine and 5-hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 38, Nr. 11, S. 905–914, Nov. 1992.
- [49] G. S. Kim, M. Nalini, Y. Kim, und D.-W. Lee, „Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*“, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Bd. 70, Nr. 3, S. 162–176, März 2009.
- [50] J. Huang, S.-F. Wu, X.-H. Li, S. A. Adamo, und G.-Y. Ye, „The characterization of a concentration-sensitive α -adrenergic-like octopamine receptor found on insect immune cells and its possible role in mediating stress hormone effects on immune function“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 26, Nr. 6, S. 942–950, Aug. 2012.
- [51] W. L. Diehl-Jones, C. A. Mandato, G. Whent, und R. G. H. Downer, „Monoaminergic regulation of hemocyte activity“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 42, Nr. 1, S. 13–19, Jan. 1996.
- [52] G. B. Dunphy und R. G. H. Downer, „Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-immune *Galleria mellonella* larvae“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 40, Nr. 3, S. 267–272, März 1994.
- [53] G. S. Kim, M. Nalini, Y. Kim, und D.-W. Lee, „Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*“, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Bd. 70, Nr. 3, S. 162–176, März 2009.
- [54] M. Selcho, D. Pauls, B. El Jundi, R. F. Stocker, und A. S. Thum, „The role of octopamine and tyramine in *Drosophila* larval locomotion“, *J. Comp. Neurol.*, Bd. 520, Nr. 16, S. 3764–3785, Nov. 2012.
- [55] S. Saraswati, L. E. Fox, D. R. Soll, und C.-F. Wu, „Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae“, *J. Neurobiol.*, Bd. 58, Nr. 4, S. 425–441, 2004.
- [56] H. Verlinden u. a., „The role of octopamine in locusts and other arthropods“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 56, Nr. 8, S. 854–867, Aug. 2010.
- [57] A. Bayliss, G. Roselli, und P. D. Evans, „A comparison of the signalling properties of two tyramine receptors from *Drosophila*“, *J. Neurochem.*, Bd. 125, Nr. 1, S. 37–48, Apr. 2013.
- [58] A. B. Lange, „Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects“, *Gen. Comp. Endocrinol.*, Bd. 162, Nr. 1, S. 18–26, Mai 2009.
- [59] S.-A. Davies u. a., „Immune and stress response ‘cross-talk’ in the *Drosophila* Malpighian tubule“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 58, Nr. 4, S. 488–497, Apr. 2012.

- [60] S.-F. Wu, G. Xu, und G.-Y. Ye, „Characterization of a tyramine receptor type 2 from hemocytes of rice stem borer, *Chilo suppressalis*“, *J. Insect Physiol.*, März 2015.
- [61] N. E. Gruntenko *u. a.*, „Decrease in juvenile hormone level as a result of genetic ablation of the Corpus allatum cells affects the synthesis and metabolism of stress related hormones in *Drosophila*“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 58, Nr. 1, S. 49–55, Jan. 2012.
- [62] A. Hirashima und M. Eto, „Chemical Stress-Induced Changes in the Biogenic Amine Levels of *Periplaneta americana* L.“, *Pestic. Biochem. Physiol.*, Bd. 46, Nr. 2, S. 131–140, Juni 1993.
- [63] S.-F. Wu, G. Xu, D. Stanley, J. Huang, und G.-Y. Ye, „Dopamine modulates hemocyte phagocytosis via a D1-like receptor in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*“, *Sci. Rep.*, Bd. 5, S. 12247, Juli 2015.
- [64] M. Sideri, S. Tsakas, E. Markoutsas, M. Lampropoulou, und V. J. Marmaras, „Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes“, *Immunology*, Bd. 123, Nr. 4, S. 528–537, Apr. 2008.
- [65] Y. Qi, J. Huang, M. Li, Y. Wu, R. Xia, und G. Ye, „Serotonin modulates insect hemocyte phagocytosis via two different serotonin receptors“, *eLife*, Bd. 5, S. e12241, März 2016.
- [66] K. L. Tan, I. Vlisidou, und W. Wood, „Ecdysone Mediates the Development of Immunity in the *Drosophila* Embryo“, *Curr. Biol.*, Bd. 24, Nr. 10, S. 1145–1152, Mai 2014.
- [67] L. Quinn, J. Lin, N. Cranna, J. E. Amanda Lee, N. Mitchell, und R. H., „Steroid Hormones in *Drosophila*: How Ecdysone Coordinates Developmental Signalling with Cell Growth and Division“, in *Steroids - Basic Science*, H. Abduljabbar, Hrsg. InTech, 2012.
- [68] N. E. Gruntenko und I. Y. Rauschenbach, „Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 54, Nr. 6, S. 902–908, Juni 2008.
- [69] S. J. Tauchman, J. M. Lorch, A. P. Orth, und W. G. Goodman, „Effects of stress on the hemolymph juvenile hormone binding protein titers of *Manduca sexta*“, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Bd. 37, Nr. 8, S. 847–854, Aug. 2007.
- [70] T. Flatt *u. a.*, „Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*“, *J. Exp. Biol.*, Bd. 211, Nr. Pt 16, S. 2712–2724, Aug. 2008.
- [71] M. Meister und G. Richards, „Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipterin gene in *Drosophila* larvae“, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Bd. 26, Nr. 2, S. 155–160, Feb. 1996.
- [72] R. Lanot, D. Zachary, F. Holder, und M. Meister, „Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*“, *Dev. Biol.*, Bd. 230, Nr. 2, S. 243–257, Feb. 2001.
- [73] J. C. Regan *u. a.*, „Steroid Hormone Signaling Is Essential to Regulate Innate Immune Cells and Fight Bacterial Infection in *Drosophila*“, *PLoS Pathog.*, Bd. 9, Nr. 10, S. e1003720, Okt. 2013.
- [74] F. Rus *u. a.*, „Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity“, *EMBO J.*, Bd. 32, Nr. 11, S. 1626–1638, Mai 2013.
- [75] J.-L. Dimarcq *u. a.*, „Treatment of *l(2)mbn* *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression“, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Bd. 27, Nr. 10, S. 877–886, Okt. 1997.
- [76] M. B. Figueiredo, D. P. Castro, N. F. S. Nogueira, E. S. Garcia, und P. Azambuja, „Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: Role of ecdysone in hemocyte phagocytosis“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 52, Nr. 7, S. 711–716, Juli 2006.

- [77] R. P. Sorrentino, Y. Carton, und S. Govind, „Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated“, *Dev. Biol.*, Bd. 243, Nr. 1, S. 65–80, März 2002.
- [78] V. Franssens *u. a.*, „20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*“, *Dev. Comp. Immunol.*, Bd. 30, Nr. 9, S. 735–740, 2006.
- [79] K. Hiruma und L. M. Riddiford, „Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone“, *Dev. Biol.*, Bd. 130, Nr. 1, S. 87–97, Nov. 1988.
- [80] J. Rolff und M. T. Siva-Jothy, „Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 99, Nr. 15, S. 9916–9918, Juli 2002.
- [81] M. J. Rantala, A. Vainikka, und R. Kortet, „The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle.“, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, Bd. 270, Nr. 1530, S. 2257–2261, Nov. 2003.
- [82] S. L. Ritter und R. A. Hall, „Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 10, Nr. 12, S. 819–830, Dez. 2009.
- [83] „Contents of Essentials of Cell Biology | Learn Science at Scitable“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122997540>. [Zugegriffen: 15-Aug-2016].
- [84] U. Schäfer *u. a.*, *Molekularbiologie der Zelle*, 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
- [85] X. Cheng, Z. Ji, T. Tsalkova, und F. Mei, „Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors“, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, Bd. 40, Nr. 7, S. 651–662, Juli 2008.
- [86] M. Conti, D. Mika, und W. Richter, „Cyclic AMP compartments and signaling specificity: Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases“, *J. Gen. Physiol.*, Bd. 143, Nr. 1, S. 29–38, Jan. 2014.
- [87] „Thomas H. Morgan - Biographical“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1933/morgan-bio.html. [Zugegriffen: 16-Aug-2016].
- [88] Resh, Vincent H. und Cardé, Ring T., Hrsg., *Encyclopedia of Insects*, Second Edition. Academic Press, 2009.
- [89] M. D. Adams *u. a.*, „The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*“, *Science*, Bd. 287, Nr. 5461, S. 2185–2195, März 2000.
- [90] L. T. Reiter, L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov, und E. Bier, „A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*“, *Genome Res.*, Bd. 11, Nr. 6, S. 1114–1125, Juni 2001.
- [91] A. Salzberg und H. J. Bellen, „Invertebrate versus vertebrate neurogenesis: Variations on the same theme?“, *Dev. Genet.*, Bd. 18, Nr. 1, S. 1–10, Jan. 1996.
- [92] D. St Johnston, „The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*“, *Nat. Rev. Genet.*, Bd. 3, Nr. 3, S. 176–188, März 2002.
- [93] U. B. Pandey und C. D. Nichols, „Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery“, *Pharmacol. Rev.*, Bd. 63, Nr. 2, S. 411–436, Juni 2011.
- [94] R. Greenspan, *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. {Cold Spring Harbor Laboratory Press}, 2004.
- [95] D. Casso, F.-A. Ramírez-Weber, und T. B. Kornberg, „GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*“, *Mech. Dev.*, Bd. 88, Nr. 2, S. 229–232, Nov. 1999.

- [96] A. B. Carvalho *u. a.*, „Y chromosome and other heterochromatic sequences of the *Drosophila melanogaster* genome: how far can we go?“, *Genetica*, Bd. 117, Nr. 2–3, S. 227–237, März 2003.
- [97] A. H. Brand und N. Perrimon, „Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes“, *Development*, Bd. 118, Nr. 2, S. 401–415, Jan. 1993.
- [98] J. B. Duffy, „GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist’s Swiss army knife“, *Genes. N. Y. N 2000*, Bd. 34, Nr. 1–2, S. 1–15, Okt. 2002.
- [99] A. del Valle Rodríguez, D. Didiano, und C. Desplan, „Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*“, *Nat. Methods*, Bd. 9, Nr. 1, S. 47–55, Jan. 2012.
- [100] J. B. Duffy, „GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist’s swiss army knife“, *genesis*, Bd. 34, Nr. 1–2, S. 1–15, Sep. 2002.
- [101] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, und C. C. Mello, „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“, *Nature*, Bd. 391, Nr. 6669, S. 806–811, Feb. 1998.
- [102] N. Perrimon, J.-Q. Ni, und L. Perkins, „In vivo RNAi: today and tomorrow“, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Bd. 2, Nr. 8, S. a003640, Aug. 2010.
- [103] J.-Q. Ni *u. a.*, „A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*“, *Nat. Methods*, Bd. 8, Nr. 5, S. 405–407, Mai 2011.
- [104] „in vivo RNAi fly stocks and vectors“. [Online]. Verfügbar unter: <http://fgr.hms.harvard.edu/trip-in-vivo-fly-rnai>. [Zugegriffen: 06-Sep-2016].
- [105] A. C. Groth, M. Fish, R. Nusse, und M. P. Calos, „Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31“, *Genetics*, Bd. 166, Nr. 4, S. 1775–1782, Apr. 2004.
- [106] N. Buchon, N. Silverman, und S. Cherry, „Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 14, Nr. 12, S. 796–810, Dez. 2014.
- [107] B. Lemaitre und J. Hoffmann, „The Host Defense of *Drosophila melanogaster*“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 25, Nr. 1, S. 697–743, 2007.
- [108] M. S. Dionne und D. S. Schneider, „Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*“, *Dis. Model. Mech.*, Bd. 1, Nr. 1, S. 43–49, Juli 2008.
- [109] P. Tzou, E. De Gregorio, und B. Lemaitre, „How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions“, *Curr. Opin. Microbiol.*, Bd. 5, Nr. 1, S. 102–110, Feb. 2002.
- [110] C. A. Brennan und K. V. Anderson, „*Drosophila*: The Genetics of Innate Immune Recognition and Response“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 22, Nr. 1, S. 457–483, 2004.
- [111] L. Søndergaard, „Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body“, *Trends Genet.*, Bd. 9, Nr. 6, S. 193, Juni 1993.
- [112] P. Tzou *u. a.*, „Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia“, *Immunity*, Bd. 13, Nr. 5, S. 737–748, Nov. 2000.
- [113] D. Ferrandon *u. a.*, „A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway“, *EMBO J.*, Bd. 17, Nr. 5, S. 1217–1227, Aug. 1998.
- [114] J.-L. Imler und P. Bulet, „Antimicrobial Peptides in *Drosophila*: Structures, Activities and Gene Regulation“, in *Chemical Immunology and Allergy*, D. Kabelitz und J.-M. Schröder, Hrsg. Basel: KARGER, 2005, S. 1–21.
- [115] S. Ganesan, K. Aggarwal, N. Paquette, und N. Silverman, „NF- κ B/Rel Proteins and the Humoral Immune Responses of *Drosophila melanogaster*“, in *NF- κ B in Health and Disease*, Bd. 349, M. Karin, Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, S. 25–60.

- [116] R. L. Schmidt, T. R. Trejo, T. B. Plummer, J. L. Platt, und A. H. Tang, „Infection-induced proteolysis of PGRP-LC controls the IMD activation and melanization cascades in *Drosophila*“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 22, Nr. 3, S. 918–929, März 2008.
- [117] S. Valanne, J.-H. Wang, und M. Rämet, „The *Drosophila* Toll Signaling Pathway“, *J. Immunol.*, Bd. 186, Nr. 2, S. 649–656, Jan. 2011.
- [118] T. Kaneko *u. a.*, „Monomeric and Polymeric Gram-Negative Peptidoglycan but Not Purified LPS Stimulate the *Drosophila* IMD Pathway“, *Immunity*, Bd. 20, Nr. 5, S. 637–649, Mai 2004.
- [119] S. Kurata, „Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity“, *Dev. Comp. Immunol.*, Bd. 42, Nr. 1, Jan. 2014.
- [120] F. Leulier *u. a.*, „The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition“, *Nat. Immunol.*, Bd. 4, Nr. 5, S. 478–484, Mai 2003.
- [121] L. A. J. O’Neill, D. Golenbock, und A. G. Bowie, „The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 13, Nr. 6, S. 453–460, Juni 2013.
- [122] S. A. Lindsay und S. A. Wasserman, „Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling“, *Dev. Comp. Immunol.*, Bd. 42, Nr. 1, S. 16–24, Jan. 2014.
- [123] A. N. R. Weber *u. a.*, „Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling“, *Nat. Immunol.*, Bd. 4, Nr. 8, S. 794–800, Aug. 2003.
- [124] M. Gottar *u. a.*, „Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors“, *Cell*, Bd. 127, Nr. 7, S. 1425–1437, Dez. 2006.
- [125] V. Gobert *u. a.*, „Dual Activation of the *Drosophila* Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors“, *Science*, Bd. 302, Nr. 5653, S. 2126–2130, Dez. 2003.
- [126] L. Wang, R. J. C. Gilbert, M. L. Atilano, S. R. Filipe, N. J. Gay, und P. Ligoxygakis, „Peptidoglycan recognition protein-SD provides versatility of receptor formation in *Drosophila* immunity“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 105, Nr. 33, S. 11881–11886, Aug. 2008.
- [127] N. Buchon *u. a.*, „A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 106, Nr. 30, S. 12442–12447, Juli 2009.
- [128] K. V. Anderson, G. Jürgens, und C. Nüsslein-Volhard, „Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product“, *Cell*, Bd. 42, Nr. 3, S. 779–789, Okt. 1985.
- [129] L. E. Chamy, V. Leclerc, I. Caldelari, und J.-M. Reichhart, „Sensing of ‚danger signals‘ and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways ‚upstream‘ of Toll“, *Nat. Immunol.*, Bd. 9, Nr. 10, S. 1165–1170, Okt. 2008.
- [130] T. Kaneko *u. a.*, „PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan“, *Nat. Immunol.*, Bd. 7, Nr. 7, S. 715–723, Juli 2006.
- [131] T. Werner, K. Borge-Renberg, P. Mellroth, H. Steiner, und D. Hultmark, „Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 278, Nr. 29, S. 26319–26322, Juli 2003.
- [132] A. Kleino und N. Silverman, „The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response“, *Dev. Comp. Immunol.*, Bd. 42, Nr. 1, S. 25–35, Jan. 2014.
- [133] C.-I. Chang, Y. Chelliah, D. Borek, D. Mengin-Lecreulx, und J. Deisenhofer, „Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor“, *Science*, Bd. 311, Nr. 5768, S. 1761–1764, März 2006.
- [134] C.-I. Chang, K. Ihara, Y. Chelliah, D. Mengin-Lecreulx, S. Wakatsuki, und J. Deisenhofer, „Structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition

- protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 102, Nr. 29, S. 10279–10284, Juli 2005.
- [135] T. Yano und S. Kurata, „Intracellular recognition of pathogens and autophagy as an innate immune host defence“, *J. Biochem. (Tokyo)*, Bd. 150, Nr. 2, S. 143–149, Aug. 2011.
- [136] E. De Gregorio, P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin, und B. Lemaitre, „The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*“, *EMBO J.*, Bd. 21, Nr. 11, S. 2568–2579, Juni 2002.
- [137] Z. S. Han und Y. T. Ip, „Interaction and specificity of Rel-related proteins in regulating *Drosophila* immunity gene expression“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 274, Nr. 30, S. 21355–21361, Juli 1999.
- [138] B. Rotstein und A. Paululat, „On the Morphology of the *Drosophila* Heart“, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, Bd. 3, Nr. 2, S. 15, Apr. 2016.
- [139] V. Honti, G. Csordás, É. Kurucz, R. Márkus, und I. Andó, „The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation“, *Dev. Comp. Immunol.*
- [140] M. T. M. Rizki und R. M. Rizki, „Functional Significance of the Crystal Cells in the Larva of *Drosophila melanogaster*“, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, Bd. 5, Nr. 2, S. 235–240, März 1959.
- [141] G. Bidla, M. S. Dushay, und U. Theopold, „Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger“, *J. Cell Sci.*, Bd. 120, Nr. Pt 7, S. 1209–1215, Apr. 2007.
- [142] I. Vlisidou und W. Wood, „*Drosophila* blood cells and their role in immune responses“, *FEBS J.*, S. n/a-n/a, März 2015.
- [143] S. Ghosh, A. Singh, S. Mandal, und L. Mandal, „Active Hematopoietic Hubs in *Drosophila* Adults Generate Hemocytes and Contribute to Immune Response“, *Dev. Cell*, Bd. 33, Nr. 4, S. 478–488, Mai 2015.
- [144] Y. Carton und A. J. Nappi, „*Drosophila* cellular immunity against parasitoids“, *Parasitol. Today*, Bd. 13, Nr. 6, S. 218–227, Juni 1997.
- [145] C. J. Evans, V. Hartenstein, und U. Banerjee, „Thicker Than Blood: Conserved Mechanisms in *Drosophila* and Vertebrate Hematopoiesis“, *Dev. Cell*, Bd. 5, Nr. 5, S. 673–690, Nov. 2003.
- [146] M.-O. Fauvarque und M. J. Williams, „*Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion“, *J. Cell Sci.*, Bd. 124, Nr. 9, S. 1373–1382, Jan. 2011.
- [147] C. J. Sampson, U. Amin, und J.-P. Couso, „Activation of *Drosophila* hemocyte motility by the ecdysone hormone“, *Biol. Open*, S. BIO20136619, Nov. 2013.
- [148] W. Wood und A. Jacinto, „*Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 8, Nr. 7, S. 542–551, Juli 2007.
- [149] I. R. Evans und W. Wood, „*Drosophila* blood cell chemotaxis“, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Bd. 30, S. 1–8, Okt. 2014.
- [150] D. T. Babcock *u. a.*, „Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 105, Nr. 29, S. 10017–10022, Juli 2008.
- [151] A. Goto, T. Kadowaki, und Y. Kitagawa, „*Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects1“, *Dev. Biol.*, Bd. 264, Nr. 2, S. 582–591, Dez. 2003.
- [152] K. Makhijani und K. Brückner, „Of blood cells and the nervous system: hematopoiesis in the *Drosophila* larva“, *Fly (Austin)*, Bd. 6, Nr. 4, S. 254–260, Dez. 2012.
- [153] K. Makhijani, B. Alexander, T. Tanaka, E. Rulifson, und K. Brückner, „The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva“, *Dev. Camb. Engl.*, Bd. 138, Nr. 24, S. 5379–5391, Dez. 2011.

- [154] K. S. Gold und K. Brückner, „Drosophila as a model for the two myeloid blood cell systems in vertebrates“, *Exp. Hematol.*, Bd. 42, Nr. 8, S. 717–727, Aug. 2014.
- [155] L. M. Stuart und R. A. Ezekowitz, „Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 8, Nr. 2, S. 131–141, Feb. 2008.
- [156] E. Kurucz *u. a.*, „Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in Drosophila plasmatocytes“, *Curr. Biol. CB*, Bd. 17, Nr. 7, S. 649–654, Apr. 2007.
- [157] F. L. Watson *u. a.*, „Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects“, *Science*, Bd. 309, Nr. 5742, S. 1874–1878, Sep. 2005.
- [158] A. K. H. Shia, M. Glittenberg, G. Thompson, A. N. Weber, J.-M. Reichhart, und P. Ligoxygakis, „Toll-dependent antimicrobial responses in Drosophila larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes“, *J. Cell Sci.*, Bd. 122, Nr. 24, S. 4505–4515, Dez. 2009.
- [159] A. Basset *u. a.*, „The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects Drosophila and activates an immune response“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 97, Nr. 7, S. 3376–3381, März 2000.
- [160] B. Charroux und J. Royet, „Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the Drosophila immune response“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 106, Nr. 24, S. 9797–9802, Juni 2009.
- [161] C. A. Brennan, J. R. Delaney, D. S. Schneider, und K. V. Anderson, „Psidin Is Required in Drosophila Blood Cells for Both Phagocytic Degradation and Immune Activation of the Fat Body“, *Curr. Biol.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 67–72, Jan. 2007.
- [162] M. Ziehm, D. K. Ivanov, A. Bhat, L. Partridge, und J. M. Thornton, „SurvCurv database and online survival analysis platform update“, *Bioinformatics*, Bd. 31, Nr. 23, S. 3878–3880, Dez. 2015.
- [163] M. Ziehm und J. M. Thornton, „Unlocking the potential of survival data for model organisms through a new database and online analysis platform: SurvCurv“, *Aging Cell*, Bd. 12, Nr. 5, S. 910–916, Okt. 2013.
- [164] C. Neyen, A. J. Bretscher, O. Binggeli, und B. Lemaitre, „Methods to study Drosophila immunity“, *Methods*, Bd. 68, Nr. 1, S. 116–128, Juni 2014.
- [165] K. Jensen *u. a.*, „Purification of transcripts and metabolites from Drosophila heads“, *J. Vis. Exp. JoVE*, Nr. 73, S. e50245, 2013.
- [166] „05450110990_DE_EA_LightCycler-480-Quantifizierungsstrategien-Broschüre_DE.PDF“ .
- [167] „Bright-Glo Luciferase Assay System Technical Manual TM052 - bright glo luciferase assay system protocol.pdf“ .
- [168] M. Stierl *u. a.*, „Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 286, Nr. 2, S. 1181–1188, Jan. 2011.
- [169] N. J. Linford, C. Bilgir, J. Ro, und S. D. Pletcher, „Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*“, *J. Vis. Exp. JoVE*, Nr. 71, 2013.
- [170] H. M. Cochemé *u. a.*, „Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living Drosophila“, *Nat. Protoc.*, Bd. 7, Nr. 5, S. 946–958, Mai 2012.
- [171] V. Honti *u. a.*, „Variation of NimC1 expression in Drosophila stocks and transgenic strains“, *Fly (Austin)*, Bd. 7, Nr. 4, S. 263–266, Dez. 2013.
- [172] P. A. Insel *u. a.*, „G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Expression in Native Cells: “Novel” endoGPCRs as Physiologic Regulators and Therapeutic Targets“, *Mol. Pharmacol.*, Bd. 88, Nr. 1, S. 181–187, Juli 2015.
- [173] B. Maqueira, H. Chatwin, und P. D. Evans, „Identification and characterization of a novel family of Drosophila β -adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors“, *J. Neurochem.*, Bd. 94, Nr. 2, S. 547–560, 2005.

- [174] S. El-Kholy, F. Stephano, Y. Li, A. Bhandari, C. Fink, und T. Roeder, „Expression analysis of octopamine and tyramine receptors in *Drosophila*“, *Cell Tissue Res.*, Bd. 361, Nr. 3, S. 669–684, März 2015.
- [175] S. Balfanz, T. Strünker, S. Frings, und A. Baumann, „A family of octapamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca²⁺ release in *Drosophila melanogaster*“, *J. Neurochem.*, Bd. 93, Nr. 2, S. 440–451, Apr. 2005.
- [176] S.-F. Wu, G. Xu, Y.-X. Qi, R.-Y. Xia, J. Huang, und G.-Y. Ye, „Two splicing variants of a novel family of octopamine receptors with different signaling properties“, *J. Neurochem.*, Bd. 129, Nr. 1, S. 37–47, Apr. 2014.
- [177] S. Yamamoto und E. S. Seto, „Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms“, *Exp. Anim.*, Bd. 63, Nr. 2, S. 107–119, 2014.
- [178] A. Abrieux, L. Duportets, S. Debernard, C. Gadenne, und S. Anton, „The GPCR membrane receptor, DopEcR, mediates the actions of both dopamine and ecdysone to control sex pheromone perception in an insect“, *Front. Behav. Neurosci.*, Bd. 8, Sep. 2014.
- [179] E. Petruccioli, Q. Li, Y. Rao, und T. Kitamoto, „The Unique Dopamine/Ecdysteroid Receptor Modulates Ethanol-Induced Sedation in *Drosophila*“, *J. Neurosci.*, Bd. 36, Nr. 16, S. 4647–4657, Apr. 2016.
- [180] R. Lösel und M. Wehling, „Nongenomic actions of steroid hormones“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 4, Nr. 1, S. 46–55, Jan. 2003.
- [181] R. Vleugels, H. Verlinden, und J. V. Broeck, „Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects“, *Neurotransmitter*, Bd. 2, Nr. 0, Sep. 2014.
- [182] J. Borycz, J. A. Borycz, A. Kubów, V. Lloyd, und I. A. Meinertzhagen, „*Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain“, *J. Exp. Biol.*, Bd. 211, Nr. 21, S. 3454–3466, Jan. 2008.
- [183] C. H. Serezani, M. N. Ballinger, D. M. Aronoff, und M. Peters-Golden, „Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function“, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Bd. 39, Nr. 2, S. 127–132, Aug. 2008.
- [184] A. G. Rossi, J. C. McCutcheon, N. Roy, E. R. Chilvers, C. Haslett, und I. Dransfield, „Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 160, Nr. 7, S. 3562–3568, Apr. 1998.
- [185] J. M. Enserink u. a., „The cAMP-Epac-Rap1 Pathway Regulates Cell Spreading and Cell Adhesion to Laminin-5 through the $\alpha 3 \beta 1$ Integrin but Not the $\alpha 6 \beta 4$ Integrin“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279, Nr. 43, S. 44889–44896, Okt. 2004.
- [186] M. Zemanová, T. Stašková, und D. Kodrik, „Role of adipokinetic hormone and adenosine in the anti-stress response in *Drosophila melanogaster*“, *J. Insect Physiol.*, Bd. 91–92, S. 39–47, Aug. 2016.
- [187] H. C. Sears, C. J. Kennedy, und P. A. Garrity, „Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis“, *Development*, Bd. 130, Nr. 15, S. 3557–3565, Aug. 2003.
- [188] I. Kounatidis und P. Ligoxygakis, „*Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection“, *Open Biol.*, Bd. 2, Nr. 5, S. 120075, Mai 2012.
- [189] K. Kolmus, J. Tavernier, und S. Gerlo, „ $\beta 2$ -Adrenergic receptors in immunity and inflammation: stressing NF- κ B“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 45, S. 297–310, März 2015.
- [190] C. An, H. Jiang, und M. R. Kanost, „Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*“, *FEBS J.*, Bd. 277, Nr. 1, S. 148–162, Jan. 2010.

- [191] S. M. Short und B. P. Lazzaro, „Female and male genetic contributions to post-mating immune defence in female *Drosophila melanogaster*“, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, S. rspb20100937, Juni 2010.
- [192] S. L. Klein und K. L. Flanagan, „Sex differences in immune responses“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 16, Nr. 10, S. 626–638, Okt. 2016.
- [193] W. Zhong *u. a.*, „Immune anticipation of mating in *Drosophila*: Turandot M promotes immunity against sexually transmitted fungal infections“, *Proc R Soc B*, Bd. 280, Nr. 1773, S. 20132018, Dez. 2013.
- [194] M. R. Schmid *u. a.*, „Control of *Drosophila* Blood Cell Activation via Toll Signaling in the Fat Body“, *PLOS ONE*, Bd. 9, Nr. 8, S. e102568, Aug. 2014.
- [195] N. e. Gruntenko *u. a.*, „Effects of octopamine on reproduction, juvenile hormone metabolism, dopamine, and 20-hydroxyecdysone contents in *Drosophila*“, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Bd. 65, Nr. 2, S. 85–94, Juni 2007.

8 Anhang

Tab. 13: Anzahl der in Infektionsexperimenten eingesetzten Fliegen.

	Linie	Anzahl ♀		Anzahl ♂	
		PBS	<i>Ecc15</i>	PBS	<i>Ecc15</i>
	w ¹¹¹⁸	98	88	92	87
	Octβ1R-KO	94	67	73	38
Abb. 33	w ¹¹¹⁸	99	93	96	90
	Octβ2R-KO	56	55	79	73
Abb. 34	w ¹¹¹⁸	116	104	107	103
	Octβ3R-KO	106	95	107	97
Abb. 35	w ¹¹¹⁸	65	91	98	91
	Octβ-TyrR-KO	100	81	96	84
Abb. 36	w ¹¹¹⁸	112	92	105	94
	TyrR-KO	33	48	63	34
Abb. 37	w ¹¹¹⁸	102	93	104	99
	TyrRII-KO	104	101	104	92
Abb. 38	w ¹¹¹⁸	105	101	98	101
	Dop1R1-KO	97	96	101	100
Abb. 39	w ¹¹¹⁸	102	97	105	100
	Dop1R2-KO	33	50	40	42

Tab. 14: Auswahl einiger Gene und ihre Transkripthäufigkeit in der Transkriptomanalyse. Die totalen Reads beziehen sich auf eine Gesamtzahl von ca. 150 Mio. Reads.

Gene-ID	Genkürzel	Genname	Total Reads
GPCRs und assoziierte Proteingene			
CG42244	Octbeta3R	Octopamine beta3 receptor	406
CG33976	Octbeta2R	Octopamine beta2 receptor	133
CG6919	Octbeta1R	Octopamine beta1 receptor	71
CG16720	5-HT1A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	13
CG9652	Dop1R1	Dopamine 1-like receptor 1	11
CG3856	Oamb	Octopamine receptor in mushroom bodies	10
CG7485	Oct-TyrR	Octopamine-Tyramine receptor	8
CG12073	5-HT7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	7
CG18741	Dop1R2	Dopamine 1-like receptor 2	6
CG42796	5-HT2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	3
CG15113	5-HT1B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	1
CG18314	DopEcR	Dopamine/Ecdysteroid receptor	0
CG16766	TyrRII	Tyramine receptor II	0
CG7431	TyrR	Tyramine receptor	0
CG1056	5-HT2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	0
CG3318	Dat	Dopamine N acetyltransferase	657

8 Anhang

CG30445	Tdc1	Tyrosine decarboxylase 1	124
CG10697	Ddc	Dopa decarboxylase	83
CG8380	DAT	Dopamine transporter	80
CG30446	Tdc2	Tyrosine decarboxylase 2	53
CG1543	Tbh	Tyramine beta hydroxylase	30
CG9122	Trh	Tryptophan hydroxylase	2
CG4545	SerT	Serotonin transporter	1
CG33528	Vmat	Vesicular monoamine transporter	0

Gene des cAMP-Signalweges

CG4379	Pka-C1	cAMP-dependent protein kinase 1	22411
CG42276	Pde9	Phosphodiesterase 9	21317
CG34341	Pde11	Phosphodiesterase 11	17324
CG42341	Pka-R1	cAMP-dependent protein kinase R1	10609
CG45019	Pde8	Phosphodiesterase 8	10087
CG6734	CG6734		9986
CG10564	Ac78C	Adenylyl cyclase 78C	9943
CG6962	CG6962		2238
CG31643	CG31643		1562
CG15862	Pka-R2	cAMP-dependent protein kinase R2	526
CG9210	Ac13E	Adenylyl cyclase 35C	520
CG7978	Ac76E	Adenylyl cyclase 76E	446
CG6117	Pka-C3	cAMP-dependent protein kinase 3	36
CG12066	Pka-C2	cAMP-dependent protein kinase 2	23
CG8279	Pde6	Phosphodiesterase 6	16
CG34274	CG34274	Epac	13
CG32052	CG32052		5
CG15534	CG15534		2

Mustererkennende Rezeptoren

CG2086	drpr	draper	151713
CG8942	NimC1	Nimrod C1	130025
CG18096	Tep1	Thioester-containing protein 1	124066
CG6124	eater	eater	110935
CG18146	NimC2	Nimrod C2	106838
CG10363	Tep4	Thioester-containing protein 4	86769
CG17800	Dscam1	Down syndrome cell adhesion molecule 1	43470
CG33119	NimB1	Nimrod B1	23566
CG7052	Tep2	Thioester-containing protein 2	20146
CG4432	PGRP-LC	Peptidoglycan recognition protein LC scavenger receptor acting in neural tissue and	17410
CG12789	santa-maria	majority of rhodopsin is absent	13174
CG4437	PGRP-LF	Peptidoglycan recognition protein LF	5996
CG8995	PGRP-LE	Peptidoglycan recognition protein LE	4841
CG32042	PGRP-LA	Peptidoglycan recognition protein LA	4813
CG42330	Dscam4	Down syndrome cell adhesion molecule 4	3425
CG6895	GNBP1	Gram-negative bacteria binding protein 1	3286

CG14745	PGRP-SC2	PGRP-SC2	1136
CG11709	PGRP-SA	Peptidoglycan recognition protein SA	505
CG14704	PGRP-LB	Peptidoglycan recognition protein LB	337
CG5008	GNBP3	Gram-negative bacteria binding protein 3	246
CG13079	Tep5	Thioester-containing protein 5	241
CG31962	Sr-CIII	Scavenger receptor class C, type III	144
CG4144	GNBP2	Gram-negative bacteria binding protein 2	126
CG42256	Dscam2	Down syndrome cell adhesion molecule 2	104
CG16880	NimC3	Nimrod C3	84
CG7068	Tep3	Thioester-containing protein 3	52
CG33717	PGRP-LD	Peptidoglycan recognition protein LD	27
CG7496	PGRP-SD	PGRP-SD	26
CG31509	TotA	Turandot A	22
CG31190	Dscam3	Down syndrome cell adhesion molecule 3	9
CG14027	TotM	Turandot M	7
CG8577	PGRP-SC1b	PGRP-SC1b	2
CG8856	Sr-CII	Scavenger receptor class C, type II	0
CG5609	TotB	Turandot B	0
CG31507	TotZ	Turandot Z	0
CG31193	TotX	Turandot X	0
CG31691	TotF	Turandot F	0
CG31508	TotC	Turandot C	0
CG31741	CG31741		0
CG14746	PGRP-SC1a	PGRP-SC1a	0
Imd-Signalweg			
CG5576	imd	immune deficiency	9860
CG11992	Rel	Relish	126694
CG1651	Ank	Ankyrin	72246
CG8400	casp	caspar	16720
CG7417	Tab2	TAK1-associated binding protein 2	13995
CG16910	key	kenny	10256
CG18492	Tak1	TGF-beta activated kinase 1	8846
CG8293	Diap2	Death-associated inhibitor of apoptosis 2	8198
CG7486	Dredd	Death related ced-3/Nedd2-like caspase	8135
CG2615	IKK ϵ	I-kappaB kinase ϵ	6941
CG15678	pirk	poor Imd response upon knock-in	6089
CG4201	IKK β	I-kappaB kinase β	4260
CG12297	Fadd	Fas-associated death domain ortholog	2025
CG15917	Gbp	Growth-blocking peptide	57
Toll-Signalweg			
CG6667	dl	dorsal	32052
CG6134	spz	spatzle	31491
CG5848	cact	cactus	26867
CG10520	tub	tube	25709
CG2078	Myd88	Myd88	23155

8 Anhang

CG5974	pll	pelle	19349
CG5490	Tl	Toll	15806
CG7228	pes	peste	13454
CG6890	Tollo	Tollo	7553
CG6794	Dif	Dorsal-related immunity factor	2608
CG8896	18w	18 wheeler	2420
CG8595	Toll-7	Toll-7	1798
CG16705	SPE	Spatzle-Processing Enzyme	26
CG4920	ea	easter	22
CG18241	Toll-4	Toll-4	0
CG7250	Toll-6	Toll-6	0
CG5528	Toll-9	Toll-9	0
CG6367	psh	persephone	0
AMPs			
CG7629	AttD	Attacin-D	653
CG10810	Drs	Drosomyacin	439
CG1373	CecC	Cecropin C	190
CG8175	Mtk	Metchnikowin	186
CG18372	AttB	Attacin-B	98
CG1365	CecA1	Cecropin A1	38
CG1878	CecB	Cecropin B	31
CG10146	AttA	Attacin-A	23
CG1367	CecA2	Cecropin A2	9
CG1385	Def	Defensin	3
CG10816	Dro	Drosocin	2
CG12763	Dpt	Diptericin	0
CG4740	AttC	Attacin-C	0

9 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Borstel den 20.12.2016

(Stephanie Papenmeier)

Die vorliegende Dissertation hat weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde auch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Borstel den 20.12.2016

(Stephanie Papenmeier)

Diese Dissertation ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Borstel den 20.12.2016

(Stephanie Papenmeier)

10 Danksagung

*So bleibt mir noch zu sagen dies,
dass alles gar nichts brächte,
wenn Menschen, die beteiligt war'n,
ich nicht mit Dank bedächte.*

Zunächst geht mein Dank an Prof. Dr. Thomas Roeder und Prof. Dr. Holger Heine, die stets als Ansprechpartner bereit standen, fleißig die Ergebnisse mit diskutierte und sich breit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten. *Vielen Dank auch für die vielen Fliegen, Thomas!*

Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Frau Dr. Christina Wagner bedanken, die mir die Gelegenheit gegeben hat, an dieser Arbeit zu wirken und werkeln und mir damit großes Vertrauen entgegen gebracht hat. *Tina, mir hat die Arbeit an diesem Projekt und in deiner Gruppe riesigen Spaß gemacht, auch wenn gelegentlich aufgrund mangelnder Effekte eine gewisse Frustrationstoleranz gefordert war ;-), aber das nennt sich eben Forschung und härtet ab. Drosophila rules!*

Bei Dr. Karin Uliczka möchte ich mich außerdem bedanken. Sie zog Anfang dieses Jahres in mein Büro ein und war von da an ständig meinen Meinungsumfragen zum Thema: "Kann man das so schreiben...?" ausgesetzt, die sie geduldig beantwortete.

Außerdem vielen Dank auch an alle weiteren Mitglieder der Gruppen "Invertebratenmodelle", "Asthma Exazerbation & Regulation" sowie "Experimentelle Pneumologie", die stets mit Rat und Tat zur Seite standen und immer zu einem phänomenalen Arbeitsklima beigetragen haben, wodurch aus der Zeit eine wirklich tolle wurde.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Jochen Behrends, Martina Hein und Dr. Thomas Scholzen, die eine große Hilfe bei der ganzen FACSerei und Mikroskopiererei waren und von mir gnadenlos mit Fragen bombardiert wurden. *"Ich hab da mal kurz ne Frage..."*

Dann geht noch ein großes Dankeschön an meine Doktorandenmädels Franzi, Anna und Mahin, die selbst und mit mir mitgelitten haben und eine große moralische Unterstützung waren.

Und Danke auch an meine liebste Tina zu Hause, die mich in der letzten Phase der Doktorarbeit viel zu wenig zu Gesicht bekommen hat und es mir trotzdem nicht übel nimmt. *Ich gelobe Besserung!*

Viel zu wenig gesehen haben mich auch meine Eltern während des letzten halben Jahres. *Mama, Papa, ich hab euch lieb. Leider muss ich euch aber enttäuschen. In der nächsten Zeit werde ich wohl wie es aussieht immer noch keine "richtige Arbeit" haben ;-)*

11 Curriculum vitae

Stephanie Papenmeier

Geburtsdatum 12. Januar 1984
Geburtsort Bonn
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

04.2013-2017 Beginn der Doktorarbeit in der Nachwuchsforschungsgruppe „Invertebratenmodelle“ am Forschungszentrum Borstel (Dr. Christina Wagner) mit dem Thema: „Untersuchungen zur Modulation der zellulären Immunantwort durch biogene Amine in der Taufliege *Drosophila melanogaster*“

04.2012-01.2013 Masterarbeit bei der Firma Aktogen Ltd. in Cambridge (UK) mit dem Thema: „Development of an insect mass behaviour system and testing genetic and drug effects in it on *Drosophila* models for cognitive disorders“

11.2010-01.2013 **Masterstudium Bio- und Nanotechnologien** an der Fachhochschule Südwestfalen Iserlohn mit dem Abschluss **Master of Science** als Jahrgangsbeste dieses Studienfachs

2010 Bachelorarbeit an der Fachhochschule Südwestfalen Iserlohn mit dem Thema: „Prüfung der Zytotoxizität und Degradation von Magnesiumlegierungen als Biomaterialien

11.2008-11.2010 Bachelorstudium Bio- und Nanotechnologien an der Fachhochschule Südwestfalen Iserlohn mit dem Abschluss **Bachelor of Science**

10.2004-11.2008 Studium im Fach Bioingenieurswesen an der Technischen Universität Dortmund

10.2003-10.2004 Studium im Fach Betriebswirtschaftslehre an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

08.1994-06.2003 Ruhrtal-Gymnasium Schwerte