

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modell für die Analyse entzündlicher Erkrankungen der Atemwege



Dissertation

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

vorgelegt von

Christina Wagner

aus Heidelberg

Kiel, Mai 2008

Referent:

Prof. Dr. Thomas Roeder

Koreferent:

Prof. Dr. Arthur J. Ulmer

Tag der mündlichen Prüfung:

15 Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Das Atemwegsepithel</i>	1
1.1.1 Aufbau der menschlichen Lunge	1
1.1.2 Das angeborene Immunsystem des menschlichen Atemwegsepithels.....	3
1.1.3 Der Einfluss des Atemwegsepithels auf chronische Erkrankungen der Atemwege	4
1.2 <i>Das Atemwegsepithel von Drosophila melanogaster als Modell zur Untersuchung der epithelialen Immunität.....</i>	6
1.3 <i>Das larvale Tracheensystem von Drosophila melanogaster.....</i>	7
1.3.1 Struktur und Organisation des larvalen Tracheensystems.....	7
1.4 <i>Das Immunsystem von Drosophila melanogaster.....</i>	8
1.4.1 Die natürlich vorkommenden Pathogene von <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.4.2 Die Architektur des Immunsystems:	9
(A) Pathogenerkennung, (B) Signaltransduktion und (C) Effektuierung	9
1.4.3 Lokale versus systemische Immunität	16
1.4.4 Die epitheliale Immunantwort.....	17
1.5 <i>Experimentelle Vorteile des Systems Drosophila.....</i>	19
1.5.1 Das binäre Gal/UAS-Expressionssystem	19
1.5.2 Das TARGET-Expressionssystem.....	20
1.6 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	21
2 Material und Methoden	23
2.1 <i>Spezielle Geräte und Materialien.....</i>	23
2.1.1 Spezielle Geräte	23
2.1.2 Spezielle Materialien	23
2.2 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	23
2.2.1 Chemikalien	23
2.2.2 Reagenziensysteme	24
2.2.3 Enzyme und die dazugehörigen Puffer.....	24
2.2.4 Marker und Ladepuffer.....	24
2.3 <i>Primer.....</i>	25
2.3.1 cDNA-Primer.....	25
2.3.2 Expressionsprimer	25
2.4 <i>Puffer und Lösungen</i>	29
2.4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	29
2.4.2 Lösungen für Transmissionselektronenmikroskopie.....	30
2.5 <i>Kultur- und Nährmedien</i>	30
2.6 <i>Bakterien</i>	31
2.7 <i>Drosophila-Stämme.....</i>	31

2.7.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen-----	32
2.7.2 Kreuzungen -----	32
2.8 <i>Infektionsversuche</i>	32
2.8.1 Kultivierung von <i>Erwinia carotovora carotovora</i> -----	32
2.8.2 Infektionsversuche mit <i>Erwinia carotovora carotovora</i> -----	33
2.9 <i>Präparation der Tracheen</i>	33
2.10 <i>Gewinnung der Gesamt-RNA</i>	33
2.10.1 Isolierung und Reinigung der RNA -----	33
2.10.2 Fällung der RNA -----	34
2.10.3 Bestimmung der RNA bzw. DNA-Konzentration im Nanodrop-----	34
2.11 <i>cDNA-Synthese</i>	34
2.11.1 Erststrangsynthese-----	36
2.11.2 Zweitstrangsynthese-----	36
2.11.3 Analytische Gelelektrophorese -----	38
2.11.4 Reinigung der ds-cDNA -----	38
2.12 <i>RT-PCR</i>	39
2.13 <i>Real-time qPCR</i>	40
2.14 <i>DNA-Mikroarray</i>	42
2.14.1 cRNA-Synthese-----	42
2.14.2 Reinigung, Gelanalyse und Fällung der aacRNA -----	43
2.14.3 Markierung der aacRNA mit den Fluorophoren Cy3 bzw. Cy5 -----	44
2.14.4 Reinigung und Fällung der markierten aaRNA -----	44
2.14.5 Bestimmung der Markierungseffizienz-----	45
2.14.6 Hybridisierung -----	46
2.14.7 Waschen des Chips-----	46
2.14.8 Einlesen des Chips -----	47
2.14.9 Bioinformatik -----	47
2.15 <i>Untersuchungen am Fluoreszenz-Stereomikroskop bzw. Mikroskop</i>	48
2.16 <i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>	49
2.17 <i>MALDI-Tof Massenspektrometrie</i>	49
3 Ergebnisse	51
3.1 <i>Struktur und Organisation des larvalen Atemwegsepithels</i>	51
3.2 <i>Die Architektur des larvalen trachealen Immunsystems</i>	51
3.2.1 Das Expressionsprofil der mustererkennenden Rezeptoren im larvalen Atemwegsepithel-----	52
3.2.2 Das Expressionsprofil der Toll-Rezeptoren im larvalen Atemwegsepithel -----	53
3.2.3 Das Expressionsprofil der immun-relevanten Signaltransduktionswege im larvalen Atemwegsepithel-----	54
3.2.4 Das Expressionsprofil der immun-relevanten Transkriptionsfaktoren im larvalen Atemwegsepithel-----	55
3.2.5 Das Immunrepertoire des larvalen Atemwegsepithels -----	56
3.3 <i>Die Infektion der larvalen Atemwege</i>	58
3.3.1 Das larvale Atemwegsepithel kann durch verschiedene Pathogene infiziert und lokal eine Immunantwort induziert werden-----	58
3.3.2 Im gesamten Atemwegsepithel der Larve kann eine Immunantwort induziert werden ----	59

3.3.3 Die membranständigen mustererkennenden Rezeptoren PGRP-LA und PGRP-LF werden nach einer Infektion mit <i>Erwinia</i> im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimiert -----	61
3.3.4 Der NF- κ B-Signalweg IMD reguliert die antimikrobielle Immunantwort im Atemwegsepithel der Larve -----	62
3.3.5 Die Gene der antimikrobiellen Peptide Drosomycin, Drosocin und Metchnikowin werden nach einer Infektion mit <i>Erwinia</i> im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimiert -----	63
3.3.6 Der Insulin-Signalweg wird während der Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel inhibiert -----	65
3.3.7 Das Atemwegsepithel der Larve unterliegt während der epithelialen Immunantwort lokal begrenzten morphologischen Veränderungen -----	66
3.3.8 An der epithelialen Immunantwort des larvalen Tracheensystems sind nur wenige klassische immun-relevante Gene beteiligt -----	67
<i>3.4 Die ektopische Aktivierung des NF-κB-Signalwegs IMD im larvalen Atemwegsepithel</i>	<i>70</i>
3.4.1 Der IMD-Signalweg kann durch Überexpression des mustererkennenden Rezeptors PGRP-LE im larvalen Atemwegsepithel aktiviert werden -----	70
3.4.2 Die NP2610-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs geht mit einer verstärkten Expression aller sieben antimikrobiellen Peptidgene einher-----	72
3.4.3 Die NP2610-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs führt im larvalen Atemwegsepithel zu einer verstärkte Expression von PGRP-LA -----	73
3.4.4 Die NP2610-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs ruft im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven keine phänotypischen Veränderungen hervor -----	74
3.4.5 Der zeitliche Expressionsverlauf des Hefe-spezifischen Transkriptionsfaktors Gal4 im Tracheensystem des Treiberstamms PPK4-----	75
3.4.6 Der Treiberstamm PPK4 induziert ektopisch den IMD-Signalweg im larvalen Atemwegsepithel-----	76
3.4.7 Die PPK4-induzierte Aktivierung des Imd-Signalwegs geht mit einer verstärkten Expression aller sieben antimikrobiellen Peptidgene einher-----	77
3.4.8 Die PPK4-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs ruft im Tracheensystem transheterozygoter Larven eine Verdickung des Atemwegsepithels hervor -----	78
3.4.9 Der IMD-Signalweg steuert im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven des Mutterstamms PPK4 die Proliferation des Epithels-----	82
3.4.10 Die phänotypische Veränderung des transheterozygoten Atemwegsepithels beruht nicht auf einem entwicklungsspezifischen Defekt während der Embryogenese-----	83
<i>3.5 Vergleich verschiedener Transkriptome immunologisch aktiver Atemwegsepithelien..</i>	<i>86</i>
3.5.1 Der IMD-Signalweg dirigiert im larvalen Atemwegsepithel nur einen Bruchteil der regulierten Gene des Infektionstranskriptoms -----	86
3.5.2 Die beiden ektopisch induzierten IMD-Transkriptome besitzen nur einen geringen Überlappungsbereich in ihren Expressionsmustern-----	90
<i>3.6 Die Rolle des Transkriptionsfaktors Foxo bei der epithelialen Immunantwort des larvalen Tracheensystems</i>	<i>93</i>
3.6.1 Der Transkriptionsfaktor Foxo reguliert im larvalen Atemwegsepithel die Expression des <i>drosomycin</i> Gens-----	93
3.6.2 Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Foxo korreliert auf phänotypischer Ebene mit einer mäßigen Verdickung des larvalen Atemwegsepithels-----	94

3.6.3 Der Transkriptionsfaktor Foxo wird im larvalen Atemwegsepithel bei einer Kälte-induzierten Stressantwort aktiviert	95
4 Diskussion	97
4.1 <i>Die Immunkompetenz des larvalen Atemwegsepithels</i>	98
4.1.1 Die mustererkennenden Rezeptoren	98
4.1.2 Die Toll-Rezeptoren	99
4.1.3 Die immun-relevanten Signaltransduktionswege	100
4.1.4 Die immun-relevanten Transkriptionsfaktoren	101
4.1.5 Die konstitutiven Abwehrmechanismen	102
4.2 <i>Die Immunantwort des larvalen Atemwegsepithels</i>	104
4.2.1 Zellautonome versus nicht-zellautonome Abwehr	105
4.2.2 Das „Priming“ der Immunantwort	105
4.2.3 Die antimikrobielle Abwehr	107
4.2.4 Überlebensstrategien des larvalen Atemwegsepithels	109
4.2.5 Wundheilungsprozesse im larvalen Atemwegsepithel	110
4.3 <i>Die IMD-vermittelte Immunantwort</i>	112
4.3.1 Der PPK4-induzierte IMD-Phänotyp	112
4.3.2 Das wissenschaftliche Potential des PPK4-induzierten IMD-Modells	114
5 Zusammenfassung	116
6 Summary	118
7 Literatur	120
8 Anhang	131
8.1 <i>Mikroarray-Daten</i>	131
8.1.1 L3-Tracheentranskriptom	131
8.1.2 Infektionstranskriptom (<i>Erwinia carotovora carotovora</i>)	132
8.1.3 IMD-Transkriptom induziert durch Treiberstamm NP2610	146
8.1.4 IMD-Transkriptom induziert durch Treiberstamm PPK4	151
8.2 <i>Kreuzungsschema des homozygoten Gal4/ Gal80-Fliegenstamms PPK4/ αTubulin 84B</i>	162
9 Erklärung	163
10 Danksagung	164
11 Curriculum vitae	165
12 Abstracts	166

Abkürzungsverzeichnis

A:	–	A bsorption
aa:	–	a minoallyl
A. bidest:	–	<i>Aqua bidest</i> (doppelt destilliertes Wasser)
AMP:	–	A ntimikrobielles P eptid
ATP:	–	A denosin t riphosphat
βGRP:	–	<i>β-glucan recognition protein</i>
Bl:	–	B ristle
bp:	–	b ase p air (Basenpaar)
BrdU:	–	B romdesoxyuridin
C:	–	C uticula
cDNA:	–	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CG:	–	<i>computed gene</i>
COPD:	–	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
cRNA:	–	<i>complementary RNA</i> (komplementäre RNA)
CT:	–	<i>cycle threshold</i>
CTP:	–	C ytosin t riphosphat
CyO:	–	C urly of O yster
Da:	–	D alton (relative Molmasse)
DAP:	–	<i>diaminopimelic acid</i>
DCV:	–	<i>Drosophila C Virus</i>
DGRC:	–	<i>Drosophila Genetic Resource Center</i>
Dif:	–	<i>dorsal-related immunity factor</i>
DIM:	–	<i>Drosophila immune induced molecules</i>
dipt:	–	d iptericin
DMSO:	–	D imethylsulfoxid
DNA:	–	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase:	–	D esoxyribonuklease
dNTP:	–	D esoxynukleotid t riphosphat
droc:	–	d rosocin
drom:	–	d rosomycin
ds-cDNA:	–	<i>double stranded cDNA</i> (doppelsträngige cDNA)
dT:	–	D esoxythymidin

DTT:	–	Dithiothreitol
<i>Ecc 2141/15:</i>	–	<i>Erwinia carotovora carotovora 2141/15</i>
<i>E. coli:</i>	–	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	–	Ethylendiamintetraazetat/ -essigsäure
EM:	–	Elektronenmikroskopie/ elektronenmikroskopisch
Epi:	–	Epithel
F1/2:	–	Filialgeneration 1/2
Foxo:	–	Forkhead box, sub-group O
GEO:	–	<i>gene expression omnibus</i>
<i>gfp/GFP:</i>	–	<i>green fluorescent protein</i>
GNBP:	–	<i>gram-negative binding protein</i>
GPL:	–	GEO-Plattform
GST:	–	Glutathion-S-Transferase
GTP:	–	Guanintriphosphat
ID:	–	Identität
IKK β:	–	IkappaB-Kinase β
IM:	–	<i>immune induced molecules</i>
IMD:	–	<i>immune deficiency</i>
JAK/STAT:	–	<i>janus kinase/ signal transducers and activators of transcription</i>
JNK:	–	<i>c-Jun N-terminal-kinase</i>
kb:	–	<i>kilo base pairs</i> (Kilobasenpaare)
KF:	–	Korrekturfaktor
L:	–	Lumen
L1-L3:	–	Larve 1-3
LA-PCR:	–	<i>long and accurate polymerase chain reaction</i>
LB:	–	Lennox L Broth
LPS:	–	Lipopolysaccharid
Lys:	–	Lysin
MALDI-TOF:	–	<i>matrix-assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight</i>
MAP:	–	<i>mitogen-activated protein</i>
metch:	–	metchnikowin

MIAME:	–	<i>minimum information about a microarray experiment</i>
min:	–	Minute(n)
<i>M. luteus:</i>	–	<i>Micrococcus luteus</i>
M-MLV:	–	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA:	–	<i>messenger RNA</i>
MSP:	–	<i>multiple sample pool</i>
NF-κB:	–	Nuklear Faktor-kappa B
OD:	–	optische Dichte
OVA:	–	Ovalbumin
P:	–	P-Element
p.A.:	–	pro analysi
PAMP:	–	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS:	–	Phosphate Buffered Saline
PCR:	–	<i>polymerase chain reaction</i>
PGN:	–	Peptidoglykan
PGRP:	–	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
PPK:	–	<i>pickpocket</i>
PRR:	–	<i>pattern recognition receptor</i>
Pwo:	–	<i>Pyrococcus woessii</i>
qPCR:	–	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
rG:	–	Guanosin
RNA:	–	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase:	–	Ribonuklease
RNS:	–	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS:	–	<i>reactive oxygen species</i>
rpm:	–	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT:	–	Reverse Transkriptase
RT-PCR:	–	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR:	–	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SAM:	–	<i>significance analysis of microarrays</i>
sek:	–	Sekunde
S.E.M.:	–	standard error of the mean
SLPI:	–	Sekretorischer Leukozyten-Proteinase-Inhibitor

Sp:	–	S ternopleural
SSC:	–	S aline S odium C itrate
ss-cDNA:	–	<i>single stranded cDNA</i> (einzelsträngige cDNA)
ssp.:	–	S ubspezies
Taq:	–	<i>Thermus aquaticus</i>
TARGET:	–	<i>temporal and regional gene expression targeting</i>
TB:	–	T errific B roth
TBE:	–	T ris- B orat- E DTA-Puffer
Tep:	–	<i>thiolester-binding protein</i>
TLR:	–	T oll-like R ezeptor
TLR/IL-1:	–	T oll-like R ezeptor/ I nterleukin- 1 R ezeptor
TM2:	–	" third multiple " (inversions) Nr. 2
TM6:	–	" third multiple " (inversions) Nr. 6
TM6 (B):	–	" third multiple " (inversions) Nr. 6B
TNFR:	–	T umor- N ekrose- F aktor- R ezeptor
Tris:	–	T ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tubP:	–	t ubulin- P romotor
ts:	–	<i>temperature sensitive</i>
U:	–	U nits
UAS:	–	<i>upstream activating sequence</i>
UTP:	–	U raciltriphosphat
UV:	–	U ltraviolett
VE-Wasser:	–	V ollentsalztes W asser
w:	–	wild type
%(w/v):	–	percent weight per volume
yw:	–	yellow white

1 Einleitung

1.1 Das Atemwegsepithel

Das Atemwegsepithel kleidet in den meisten multizellulären Organismen sowohl die Atemwege als auch den Atmungsapparat aus und stellt somit als Oberflächenepithel eine Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt dar. Im Bereich der Atemwege übernimmt das Atemwegsepithel eine Leitungsfunktion, während es im Atmungsapparat einen effizienten Gasaustausch gewährleistet. Damit die physiologische Funktion des Atmungsapparates vollständig entfaltet werden kann, ist das Atemwegsepithel stets großflächig angelegt und verfügt in Regionen intensivsten Gasaustauschs lediglich über ein einreihiges Epithel mit geringem Durchmesser. Beide Eigenschaften des Atemwegsepithels stehen den Anforderungen eines effizienten Immunsystems diametral gegenüber und erleichtern eine Infektion des Epithels und eine sich anschließende mikrobielle Besiedelung.

1.1.1 Aufbau der menschlichen Lunge

Die menschliche Lunge ist ein tubuläres, weit verzweigtes Organ, das sich aus den unteren Atemwegen, den blind endenden Lungenbläschen und dem sie umgebenden Lungenparenchym zusammensetzt. Die Hauptaufgabe der Lunge liegt in der Versorgung des Körpers mit Sauerstoff, der über die oberen Atemwege in die circa 12 cm lange Trachea gelangt. Sie stellt den Beginn der unteren Atemwege dar und teilt sich in die beiden Hauptbronchien auf, welche in die paarigen Lungenflügel eintreten. Von den Hauptbronchien spalten sich dichotom weitere Atemwege über die Bronchiolen bis hin zu den Terminalbronchiolen ab, sodass innerhalb der Lungenflügel ein immer feineres Netz an Verzweigungen entsteht, das ausschließlich eine Leitungsfunktion übernimmt (Abb. 1.1 A und B). Ausgekleidet sind die unteren Atemwege mit einem Flimmerepithel mit eingestreuten mukösen Becherzellen, das im Bereich der oberen Bronchien mehrreihig und schließlich in den Bronchiolen nur noch einreihig vorliegt. Hauptaufgabe dieses Flimmerepithels ist die Beseitigung von Schmutzpartikeln und Krankheitserregern, die durch den Schleim gebunden und mit dem Zilienschlag kontinuierlich oralwärts abtransportiert und abgehustet werden (Schmidt & Thews, 1997).

In einer ihrer letzten Aufzweigungen münden die unteren Atemwege in die Alveolargänge bzw. in die Alveolarsäckchen ein, die mit den blind endenden Lungenbläschen (Alveolen) dicht besetzt sind (Abb. 1.1 C und D). Dieser Alveolarbereich der menschlichen Lunge, der

überwiegend dem Gasaustausch dient, setzt sich aus circa 300 Millionen Lungenbläschen zusammen, die eng aneinander liegend die für den Gasaustausch benötigte Oberfläche von 80-100 m² bilden (Bungeroth, 2005).

Lumenseitig werden diese Lungenbläschen von zwei Typen von Alveolarepithelzellen ausgekleidet. Zu ihnen zählen zum einen die äußerst flachen Alveolarepithelzellen vom Typ I (95 %), die der Basalmembran direkt aufliegen und den Gasaustausch ermöglichen und zum anderen die kubischen Alveolarepithelzellen vom Typ II (5 %), die das Surfactant bilden. Es zieht sich wie ein Film über die Oberfläche der Lungenbläschen und verhindert das Kollabieren der Bläschen, indem es ihre Oberflächenspannung reduziert (Bungeroth, 2005).

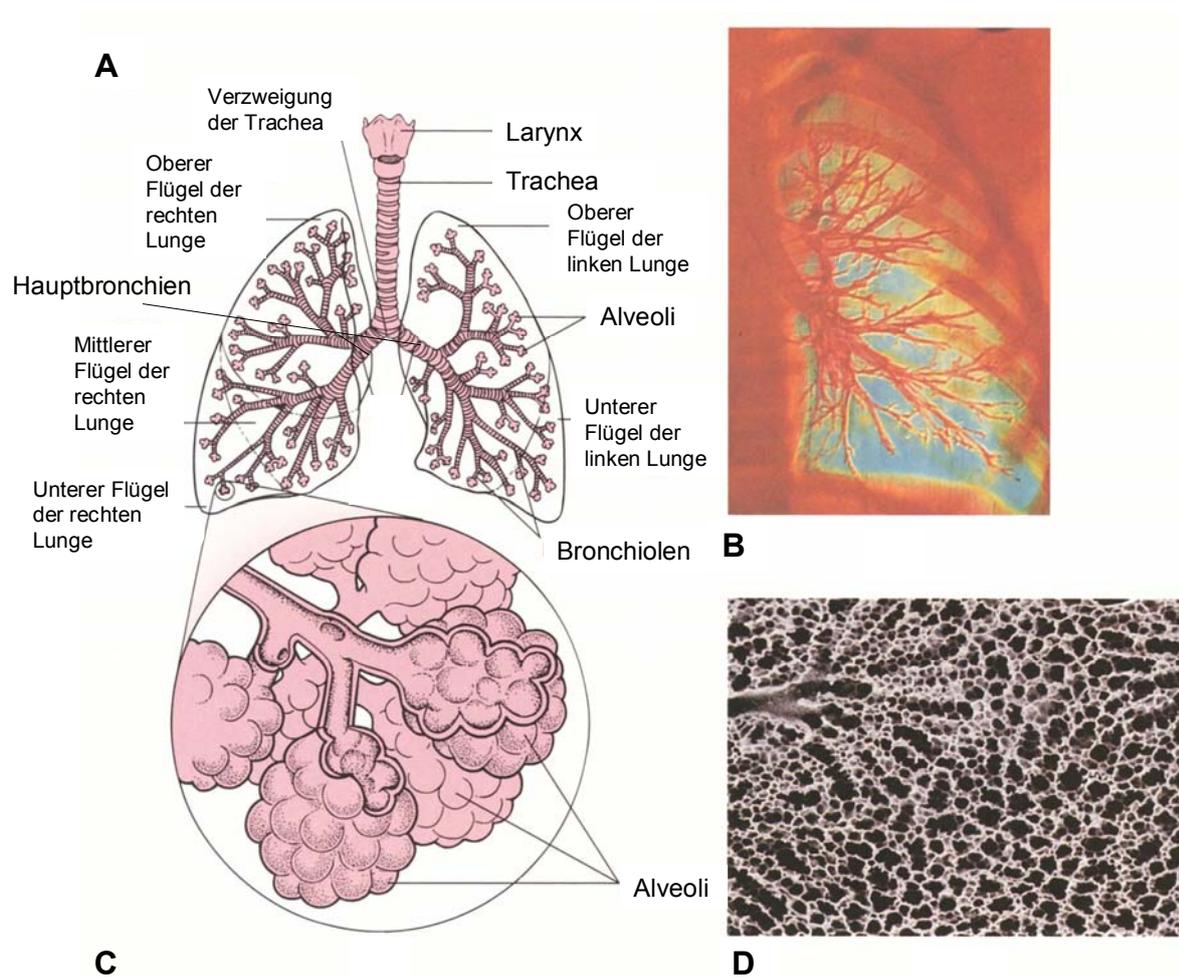


Abb. 1.1: Aufbau der menschlichen Lunge. (A) Schematische Darstellung der menschlichen Lunge mit ihren beiden gelappten Lungenflügeln und den unteren dichotom verzweigten Atemwegen. (B) Kontrastdarstellung eines rechten Lungenflügels mit seinem Bronchialbaum. (C) Alveolargänge (Ductus alveolares) der menschlichen Lunge, die in den Alveolarsäckchen (Alveoli) münden. (D) Semi-Dünnschnitt einer menschlichen Lunge mit zahlreichen Alveolarsäckchen, die von zwei Alveolargängen abgehen (Modifiziert nach: Rhoades & Pflanzler, 1996).

1.1.2 Das angeborene Immunsystem des menschlichen Atemwegsepithels

Das menschliche Atemwegsepithel stellt als Oberflächenepithel eine Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt dar. Eingeatmete körperfremde Stoffe, die über die oberen Atemwege in die Lunge gelangen, können somit nicht ungehindert in das Körperinnere eindringen. Sie treten vielmehr im Bereich der unteren Atemwege erstmals mit dem Atemwegsepithel in Kontakt, wo sie vom Mukus-überzogenen Zilienapparat des Flimmerepithels abgefangen werden. Dieser mukoziliäre Apparat transportiert die körperfremden Stoffe kontinuierlich oralwärts ab und beseitigt sie in der Regel aus der Lunge. Studien aus den vorangegangenen Jahren konnten deutlich belegen, dass das Atemwegsepithel nicht nur ein Barriereepithel mit physikalischen Abwehrmechanismen darstellt. Vielmehr leistet es gleichzeitig als immunologisch aktives Epithel einen wichtigen Beitrag zum angeborenen Immunsystem der Lunge (Diamond *et al.*, 2000). Charakteristisch für die immunologischen Abwehrmechanismen des Atemwegsepithels ist die konstitutive Expression verschiedener antimikrobieller Peptide und Proteine. Sie werden vom Flimmerepithel, den eingelagerten Becherzellen und von den erstmals in den terminalen Bronchiolen auftretenden Clarazellen produziert und ins Lumen der Atemwege sezerniert (Diamond *et al.*, 2000). Diese antimikrobiellen Agenzien bilden zusammen mit den Muzinen des Atemwegsepithels einen leicht viskösen, elastischen Oberflächenfilm, der das Atemwegsepithel auskleidet und das Epithel vor der Infektion und Besiedlung mit Pathogenen schützt. In diesem Zusammenhang stellen die Lysozyme, die Laktoferrine und der Proteinase-Inhibitor SLPI (Sekretorischer Leukozyten-Proteinase-Inhibitor) die in den Atemwegen am häufigsten vorkommenden antimikrobiellen Proteine dar (Laube *et al.*, 2006). Von den kleineren antimikrobiellen Peptiden werden lediglich β -Defensin-1 (hBD-1) und Cathelicidin hCAP-18/ LL-37 im Atemwegsepithel konstitutiv exprimiert, die beide einen großen Wirkungsbereich gegen gram-positive und gram-negative Bakterien besitzen (Zhao *et al.*, 1996, Bals *et al.*, 1998).

Das Atemwegsepithel des Menschen verfügt aber auch über induzierbare immunologische Abwehrmechanismen, die im Epithel erst nach einer Infektion aktiviert werden. Hierbei stellen die β -Defensine hBD-2, -3 und -4 die wichtigsten antimikrobiellen Peptide dar, für die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte, dass ihre Expression durch verschiedene bakterielle PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) oder Bakterien induziert werden kann (Becker *et al.*, 2000, Harder *et al.*, 2000, Hiratsuka *et al.*, 1998, Ishimoto *et al.*, 2006, Garcia *et al.*, 2001).

Neben der verstärkten Expression an antimikrobiellen Peptiden setzt das Atemwegsepithel nach einer Infektion basolateral verschiedene Chemokine und Zytokine in die Submukosa frei. Sie rekrutieren gezielt die klassischen Zellen des Immunsystems aus dem Blut und leiten in den infizierten Bereichen des Atemwegsepithels und im angrenzenden Lungenparenchym eine Entzündungsreaktion ein. Unter den einwandernden Immunzellen befinden sich in erster Linie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die die Pathogene auf der luminalen Seite des Atemwegsepithels eliminieren, aber auch dendritische Zellen und Lymphozyten, die die Immunreaktion auf das adaptive Immunsystem ausweiten (Rastogi *et al.*, 2001).

An der Pathogenerkennung sind im menschlichen Atemwegsepithel in erster Linie die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) beteiligt. Sie werden bis auf TLR-11 konstitutiv in kultivierten Bronchialepithelzellen exprimiert, wobei für TLR-2, -3, -5 und -6 nachgewiesen werden konnte, dass sie am häufigsten im Atemwegsepithel vertreten sind. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung der TLRs im Atemwegsepithel über die klassischen Vertreter ihrer Liganden möglich ist (Sha *et al.*, 2004). So kann TLR2 unter anderem über Zymosan A und bakterielle Lipoproteine, TLR-3 über virale doppelsträngige RNA, TLR4 über LPS (Lipopolysaccharid), TLR-5 über Flagellin und TLR-9 über bakterielle CpG-DNA induziert werden (Platz *et al.*, 2004, Sha *et al.*, 2004). Die intrazelluläre Signalweiterleitung führt abhängig vom TLR-Adaptor Myd88 zur Aktivierung von NF- κ B und mündet unter anderem in der Transkription der β -defensin Gene.

1.1.3 Der Einfluss des Atemwegsepithels auf chronische Erkrankungen der Atemwege

Lang anhaltende Entzündungsprozesse in den Atemwegen führen beim Menschen zu chronischen Erkrankungen der Atemwege, wie sie beim Asthma bronchiale und bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) zu beobachten sind. Durch intensive Untersuchungen der angeborenen Immunität des Atemwegsepithels häuften sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass neben den klassischen Immunzellen auch das Atemwegsepithel an der Entstehung und dem Verlauf dieser chronischen Entzündungserkrankungen beteiligt ist.

Studien über die Immunpathogenese des Asthma bronchiale konnten zeigen, dass das Atemwegsepithel sowohl auf struktureller als auch auf transkriptioneller Ebene eine Vielzahl von Veränderungen erfährt. Beim Asthma bronchiale äußern sich diese strukturellen Veränderungen des Atemwegsepithels in einer Ablösung der Epithelzellen von ihrer Basalmembran. Initiiert wird diese irreguläre Anordnung und somit Schädigung des Epithels entweder vom Allergen selbst oder indirekt durch freigesetzte proinflammatorische

Mediatoren verschiedener Immunzellen. Als Folge des permanenten Allergenkontakts und der Gewebsschädigung setzt das Atemwegsepithel verschiedene Zytokine, Chemokine sowie Wachstumsfaktoren frei und weitet somit die Immunreaktion auf das adaptive Immunsystem aus (Holgate *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang scheint der Signaltransduktionsweg NF- κ B eine wichtige Rolle zu spielen, da er im Atemwegsepithel die Transkription einer Vielzahl von Zytokin-, Chemokin- und Adhäsionsmolekülgenen reguliert (Karin *et al.*, 2004). Fehlregulationen innerhalb dieses Signaltransduktionswegs, wie sie z.B. durch eine Überexpression der Proteinkinase IKK β (IkappaB-Kinase β) in den Atemwegsepithelzellen der Maus entstehen, führen in den murinen Atemwegen zu anhaltenden Entzündungsprozessen und zur Schädigung des Lungenparenchyms (Cheng *et al.*, 2007). Gleichzeitig verhindert eine Inaktivierung des Signaltransduktionswegs NF- κ B in den Atemwegsepithelzellen Ovalbumin-sensibilisierter Mäuse die strukturelle Veränderung der Atemwege (*airway remodelling*), wie sie beim allergischen Asthma zu beobachten sind (Broide *et al.*, 2005). So entwickeln diese Ovalbumin-sensibilisierten Mäuse weder eine vermehrte Ablagerung von kollagenen Fasern in der Atemwegswand noch eine gesteigerte Mukusekretion (Abb. 1.2). Sie zeigen lediglich eine für das „*airway remodelling*“ typische Hypertrophie bzw. Hyperplasie der glatten Muskelzellen (Broide *et al.*, 2005).

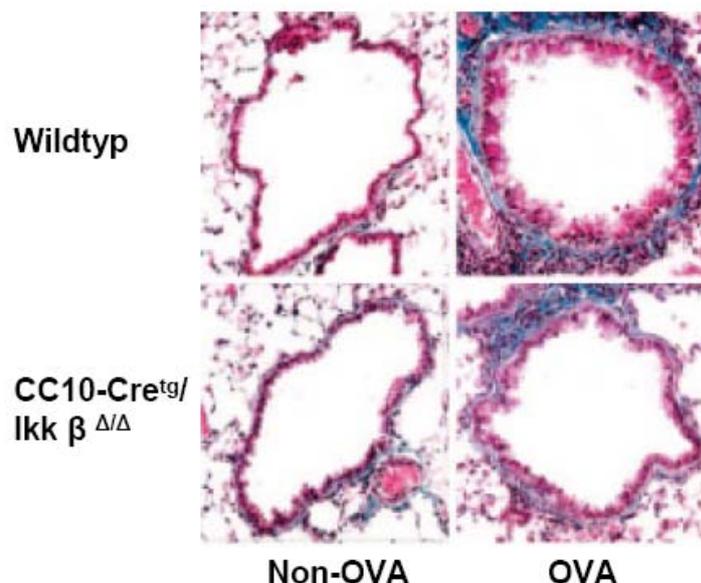


Abb. 1.2: Subepitheliale Fibrose in den Atemwegen von OVA-sensibilisierten CC10-Cre^{tg}/Ikk β ^{Δ/Δ} -Mäusen. Die CC10-Cre^{tg}/Ikk β ^{Δ/Δ} und Wildtyp-Mäuse wurden mit Ovalbumin (OVA) wiederholt sensibilisiert und über die Atemwege gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Nicht Ovalbumin-sensibilisierte Mäuse dienten als Kontrolle. In den Atemwegen der transgenen Mäuse (CC10-Cre^{tg}/Ikk β ^{Δ/Δ}) wurde die Proteinkinase Ikk β des NF- κ B-Signalwegs unter Verwendung des Cre-LoxP Systems deletiert. Dargestellt sind Atemwegsquerschnitte in einer Trichromfärbung. (Modifiziert nach: Broide *et al.*, 2005).

1.2 Das Atemwegsepithel von *Drosophila melanogaster* als Modell zur Untersuchung der epithelialen Immunität

Einen wesentlichen Teil des Wissens über die Moleküle und Mechanismen der angeborenen Immunität des Menschen verdanken wir der Identifizierung funktionell homologer Systeme bei der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Ein erster Hinweis auf den beachtlichen Grad an Übereinstimmung zwischen diesen beiden Systemen ergab die Erforschung der Toll-like Rezeptoren bei Säugern. Ihre Entdeckung war erst möglich, nachdem der Toll-Rezeptor bei *Drosophila* identifiziert und seine Funktion in der Immunabwehr der Fliege entschlüsselt worden war (Lemaitre *et al.*, 1996). Aber auch nach der TLR-Entdeckung konnten weitere Gemeinsamkeiten insbesondere in den Mechanismen der Pathogenerkennung und Signaltransduktion festgestellt werden. So wird z.B. in beiden Immunsystemen nach einem externen Stimulus die Expression verschiedener Effektormoleküle durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert (Bonizzi *et al.*, 2004, Khush *et al.*, 2001). Homologien zwischen den intrazellulären Komponenten der immun-relevanten NF- κ B-Signalkaskaden existieren in der Fliege sowohl für den NF- κ B-Signalwege TLR/IL-1 als auch für TNFR (Khush *et al.*, 2001). Grundsätzliche Fragen, die epitheliale Immunabwehr betreffend, lassen sich somit am Modell der Taufliege klären. Eine ungestörte Analyse dieser Form der Immunabwehr wird erst durch das Fehlen eines adaptiven Immunsystems möglich.

Neben diesen immunologischen Gemeinsamkeiten rechtfertigt ein weiterer Aspekt die Untersuchung der epithelialen Immunität im Atemwegsepithel der Fliege. So besitzt *Drosophila* analog zur menschlichen Lunge sowohl als Larve als auch als Imago ein weit verzweigtes, tubuläres Atemwegssystem (Rühle, 1932). Ähnlichkeiten in der Morphologie der beiden Organe gehen auf frühe morphologische Prozesse in der Embryonalentwicklung zurück, wo durch Knospung, Zellwachstum und Zellwanderung ein stark verzweigtes und mit Flüssigkeit gefülltes Röhrensystem entsteht (Lubarsky *et al.*, 2003). Ein Großteil des Wissens über die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung dieser tubulären Strukturen führen, stammt aus der Erforschung des embryonalen Tracheensystems der Taufliege (Metzger *et al.*, 1999, Ghabrial *et al.*, 2003).

Diese Ähnlichkeiten in der Morphologie der Atemwege gepaart mit der Tatsache, dass die Fliege als Modell zur Untersuchung der angeborenen Immunität in der Wissenschaft seit langem Akzeptanz findet, lässt die Untersuchung grundlegender Aspekte der epithelialen Immunabwehr, einschließlich chronisch entzündlicher Prozesse im Atemwegsepithel, am Modell *Drosophila* sinnvoll erscheinen.

1.3 Das larvale Tracheensystem von *Drosophila melanogaster*

1.3.1 Struktur und Organisation des larvalen Tracheensystems

Das larvale Tracheensystem von *Drosophila melanogaster* ist ein weit verzweigtes, bilateral symmetrisches Röhrensystem, das den gesamten Körper der Larve durchzieht. Es besteht im späten Larvenstadium aus etwa 10 000 untereinander verbundenen Röhren und zwei am Vorder- bzw. Hinterende der Larve gelegenen paarigen Atemwegsöffnungen (Stigmen). Eingebettet in Hautfalten stehen diese kurzen beweglichen und verschließbaren Stigmen mit den beiden dorsal gelegenen primären Ästen (primäre Tracheen) des larvalen Tracheensystems in Verbindung (Abb. 1.3). Sie durchziehen beide parallel zueinander den gesamten Körper der Larve und spalten sich stereotypisch in nahezu jedem Segmentbereich in die inneren und äußeren sekundären Äste (sekundäre Tracheen) auf. Während die inneren sekundären Äste sehr kurz sind und nur dorsal verlaufen, durchziehen die äußeren sekundären Äste den gesamten Körper der Larve und bilden auf beiden Seiten des Körpers einen durchgängigen Längsstamm. In unmittelbarer Nähe der Organe gehen von diesen sekundären Ästen Hunderte von feinen tertiären Ästen (Tracheolen) ab, die mit ihren Endigungen in direktem Kontakt zu den Organen stehen. Während die Verzweigungen der primären und sekundären Äste im larvalen Tracheensystem während der Embryonalentwicklung entstehen und stereotypisch sind, ist die Anordnung der tertiären Äste in der Larve variabel und abhängig vom Sauerstoffgehalt des umgebenden Gewebes. Demnach befinden sich insbesondere in sauerstoffarmen Bereichen der Körperhöhle dichte Netzwerke aus tertiären Ästen (Rühle *et al.*, 1932, Ghabrial *et al.*, 2003).

Die Hauptaufgabe des larvalen Tracheensystems liegt im Transport und in der Versorgung des Körpers mit Sauerstoff. Der Sauerstoff wird über die beiden Atemwegsöffnungen aufgenommen und unterliegt im Körper der Larve einem passiven Transport. Häufig nehmen die anterior gelegenen Stigmen jedoch keinen Sauerstoff auf, da die Larve bis zum späten L3-Stadium mit ihrem Vorderende im Futter lebt und nur über ihre posterior gelegenen Stigmen unmittelbar mit der Atemluft in Verbindung steht. Die Weiterleitung des Sauerstoffs erfolgt über die primären und sekundären Äste zu den tertiären, wo er durch Diffusion direkt an das Gewebe abgegeben wird. Da das gesamte Epithel des Tracheensystems einschichtig ist, kann man davon ausgehen, dass auch im Bereich der primären und sekundären Äste ein Austausch von Sauerstoff zum Körpergewebe stattfinden kann.

Ausgekleidet sind die Transportleitungen des larvalen Tracheensystems mit einer dünnen Cuticula aus Chitin. Sie stabilisiert die Tracheen und verhindert gemeinsam mit den spiralig angeordneten Cuticularleisten (Taeniden) das Kollabieren der Äste. In den tertiären Ästen

wird dieses cuticuläre Gerüst jedoch auf ein Minimum reduziert, um die Organe ausreichend mit Sauerstoff versorgen zu können (Storch & Welsch, 2003).

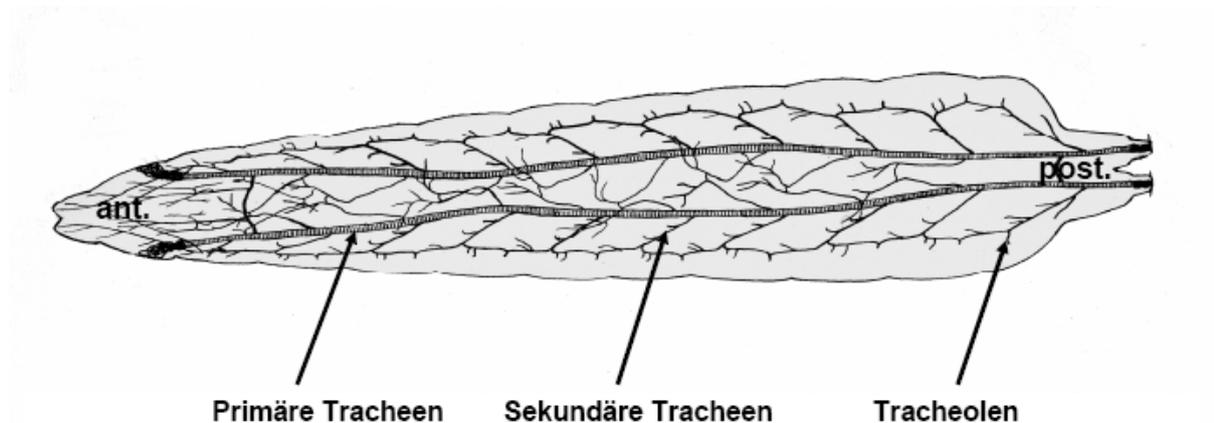


Abb. 1.3: Das larvale Tracheensystem der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Dorsale Ansicht auf das Tracheensystem einer Larve im dritten Larvalstadium. Ant.: anteriores Ende, post.: posteriores Ende. (Modifiziert nach: Rühle, 1932).

1.4 Das Immunsystem von *Drosophila melanogaster*

1.4.1 Die natürlich vorkommenden Pathogene von *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster ist aufgrund ihrer Lebensweise mit einer Vielzahl von Mikroorganismen konfrontiert. Hauptquelle dieses potentiellen Infektionsherds ist die Nahrung selbst, die bei *Drosophila* ausschließlich aus verdorbenem und faulem Obst besteht. Erstaunlicherweise sind nur wenige dieser Mikroorganismen in der Lage *Drosophila* auf natürliche Weise zu infizieren und eine Immunreaktion im Körper der Fliege auszulösen. In diesem Zusammenhang sind die beiden gram-negativen Bakterien *Erwinia carotovora carotovora* und *Pseudomonas entomophila* erwähnenswert, die *Drosophila*-Larven erst bei einer vermeintlich hohen Bakteriendichte über den Darm infizieren (Basset *et al.*, 2000, Vodovar *et al.*, 2005). Neben diesen gram-negativen Bakterien sind aber auch andere Pathogene in der Lage, *Drosophila* auf natürliche Weise zu infizieren. Als entomopathogener Pilz kommt für die adulte Fliege *Beauveria bassiana* in Frage. Seine Sporen infizieren die adulte Fliege über die Epidermis, indem die Cuticula der Fliege durch fungale Proteasen und Chitinasen zerstört wird (Lemaitre *et al.*, 1997). Infektionen mit Parasiten stellen insbesondere eine Bedrohung für die *Drosophila*-Larve dar. So legen parasitäre Wespen wie z.B. *Ganaspis xanthopoda* ihre Eier unter anderem ins Hämocoel der *Drosophila*-Larven ab, wo sie sich in der Larve bzw. in der *Drosophila*-Puppe zur adulten Wespe entwickeln können

(Melk *et al.*, 1999). Auch Viren stellen wichtige Pathogene von *Drosophila* dar. Mittlerweile konnten 25 verschiedene, natürlich vorkommende Viren identifiziert werden, die *Drosophila* befallen (Lemaitre *et al.*, 2007). Allerdings wurde die antivirale Immunantwort bisher nur für die RNA-Viren Sigma und *Drosophila C Virus* (DCV) in der adulten Fliege genauer untersucht. Eine Immunantwort konnte in diesen Fliegen nur durch Injektion des Virus in die Körperhöhle ausgelöst werden (Dostert *et al.*, 2005).

Während die antiviralen Abwehrmechanismen der Fliege nahezu unbekannt sind, wurden in den letzten Jahren sowohl für die Larve als auch für die adulte Fliege die immun-relevanten Mechanismen entschlüsselt, die einen wichtigen Beitrag zur antibakteriellen und antifungalen Abwehr leisten. Dieses Wissen umfasst die Pathogenerkennung, die Signaltransduktion und Effektivierung und somit die gesamte Architektur des Immunsystems.

1.4.2 Die Architektur des Immunsystems:

(A) Pathogenerkennung, (B) Signaltransduktion und (C) Effektivierung

(A) Pathogenerkennung: Bei einer natürlichen Infektion dringen Pathogene in der Regel über die Oberflächenepithelien in den Körper der Larve bzw. der adulten Fliege ein. Für die Pathogenerkennung und Aktivierung zielgerichteter Abwehrmechanismen, die zur Eliminierung der eingedrungenen Mikroorganismen führen, stehen *Drosophila* verschiedene mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*) zur Verfügung. Sie sind in der Lage konservierte mikrobielle Struktur motive, so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) zu erkennen, um eingedrungene Mikroorganismen von körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Bisher ist für drei der zahlreichen mikrobiellen Struktur motive bekannt, dass sie eine Immunreaktion im Körper von *Drosophila* induzieren können. Neben den Glucanen von Pilzen stellen die Peptidoglykane gram-positiver bzw. gram-negativer Bakterien die am häufigsten vorkommenden PAMPs dar (Kaneko *et al.*, 2004, Gottar *et al.*, 2006). Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Peptidoglykanformen erfolgt in der Fliege anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung des Peptidgerüsts. So erkennen die mustererkennenden Rezeptoren gram-positive Bakterien an ihrem Lysin-enthaltendem Peptidoglykan während sie gram-negative Bakterien und einige Bazillus-Arten an ihrem Diaminopimelinsäure-enthaltendem Peptidoglykan identifizieren können (Leulier *et al.*, 2003).

Zwei Gruppen von mustererkennenden Rezeptoren sind für die Erkennung der unterschiedlichen PAMPs verantwortlich. Hierbei handelt es sich zum einen um die

Peptidoglykanerkennungsproteine (PGRPs) und zum anderen um die Gram-negativ-bindenden Proteine (GNBPs), die auch unter dem Namen β -Glucan-Erkennungsproteine bekannt sind.

Zu der ersten Gruppe, den so genannten PGRPs, gehören bei *Drosophila* insgesamt dreizehn Rezeptoren. Für einige wenige dieser Rezeptoren existieren mehrere Varianten in der Fliege, die durch alternatives Spleißen aus den entsprechenden Genen hervorgehen (Werner *et al.*, 2000). Die dreizehn PGRP-Rezeptoren werden aufgrund ihrer Größe auch in „short“ (PGRP-S) und „long“ PGRPs (PGRP-L) unterteilt. Während die PGRP-S aus sieben Mitgliedern bestehen (PGRP-SA, -SB1, -SB2, -SC1A, -SC1B, -SC2 und -SD) und kleine extrazelluläre Proteine darstellen, umfassen die PGRP-L sechs Mitglieder, von denen allein vier membranständig sind (PGRP-LA, -LC, -LD und -LF) und zwei in ihrer prozessierten Form (PGRP-LB und -LE) extrazellulär vorliegen (Werner *et al.*, 2000, Takehana *et al.*, 2004, Zaidman-Rémy *et al.*, 2006). Im Fall von PGRP-LE konnte in den Malpighischen Gefäßen gleichzeitig gezeigt werden, dass der Rezeptor in seiner inaktiven Form auch intrazellulär vorkommen kann (Kaneko *et al.*, 2006).

Neben der klassischen Einteilung der PGRPs nach ihrer molekularen Größe ist auch eine Eingruppierung der PGRPs nach ihrer Funktion möglich. So besitzt nahezu die Hälfte der PGRPs (PGRP-LB, -SB1, -SB2, -SC1 A/B und -SC2) als katalytische Domäne eine Amidase, die polymeres Peptidoglykan gram-positiver bzw. gram-negativer Bakterien erkennt und in Peptidoglykanfragmente spaltet. Allerdings konnte eine Amidase-Aktivität bisher nur eindeutig für die PGRPs -LB, -SB1 und -SC1B nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2003, Mellroth *et al.*, 2003, Mellroth *et al.*, 2006, Zaidman-Rémy *et al.*, 2006). Diesen katalytischen PGRPs stehen die nicht-katalytischen PGRPs (PGRP-LA, -LC, -LD, -LE und -LF) gegenüber. Ihre Amidase-Domäne besitzt keine katalytische Aktivität mehr und fungiert in der Immunabwehr der Fliege nur als klassische Erkennungsdomäne.

Die zweite Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren stellen die Gram-negativ-bindenden Proteine (GNBPs, β GRPs) dar. Zu dieser Rezeptorfamilie können bisher nur drei Mitglieder gezählt werden, wobei lediglich für GGBP1 bzw. GGBP3 eine Rolle bei Pathogenerkennung nachgewiesen werden konnte (Gobert *et al.*, 2003, Gottar *et al.*, 2006). Beide Rezeptoren können als lösliche Proteine extrazellulär vorliegen oder über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker mit der Plasmamembran verbunden sein.

(B) Signaltransduktion: Die mustererkennenden Rezeptoren sind in der Fliege allerdings nicht nur für die Pathogenerkennung und deren proteolytische Degradierung verantwortlich. Eine weitere Funktion der Rezeptoren besteht in der Aktivierung verschiedener

Signaltransduktionswege, die die Expression verschiedener Effektormoleküle, einschließlich der antimikrobiellen Peptide (AMPs) regulieren. Eine zentrale Rolle bei der Steuerung der AMP-Expression übernehmen die beiden NF- κ B-Signaltransduktionswege Toll und IMD (*immune deficiency*; Khush *et al.*, 2001). Ihre intrazellulären Signalkaskaden weisen funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten zu den beiden NF- κ B-Signaltransduktionswegen TLR/ IL-1R und TNFR der Säuger auf. Hierbei ist der Toll-Signalweg homolog zum TLR/ IL-1R-Signalweg, während der IMD-Signalweg einen hohen Grad an Übereinstimmung zum TNFR-Signalweg aufweist (Silverman *et al.*, 2001). Ein zentraler Unterschied zwischen den Signalwegen der Fliege bzw. denen der Säuger besteht in der Möglichkeit, miteinander zu interagieren. Während TLR/ IL-1R und TNFR über einen gemeinsamen Proteinkinase-Komplex (IKK-Komplex) verfügen und sich über ihn gegenseitig beeinflussen, fehlt den NF- κ B-Signaltransduktionswegen der Fliege eine gemeinsame Komponente als Bindeglied (Khush *et al.*, 2001). Sie agieren demnach im Gegensatz zu ihren Gegenspielern bei der angeborenen Immunität der Säuger weitgehend unabhängig voneinander. Allerdings besteht eine Verknüpfung der beiden Signalwege auf Transkriptionsebene. Da einige antimikrobielle Peptide in ihren Promotorregionen sowohl über Toll- als auch Imd-NF- κ B Bindestellen verfügen, ist die Regulation der AMP-Expression z.B. im Fall des *metchnikowin*-Gens über beide Signalwege möglich (Levashina *et al.*, 1998).

Bei einer natürlichen Infektion wird die Transkription der verschiedenen antimikrobiellen Peptide nur durch einen der beiden Signalwege reguliert. Welcher der beiden Signalwege aktiviert wird, hängt in erster Linie vom Mikroorganismus selbst bzw. seinem Strukturmotiv ab. So erfolgt die Aktivierung des Toll-Signalwegs in der Regel nach einer Infektion mit gram-positiven Bakterien bzw. Pilzen, während der IMD-Signalweg hingegen durch gram-negative Bakterien oder einige wenige *Bacillus* spp. induziert werden kann (Abb. 1.4; Lemaitre *et al.*, 1995, 1996).

Für einige der mustererkennenden Rezeptoren von *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine Schlüsselrolle in der Aktivierung einer der beiden Signalwege übernehmen. An der Erkennung gram-positiver Bakterien und der anschließenden Aktivierung des Toll-Signalwegs sind demnach ausschließlich die beiden nicht-katalytischen PGRPs -SA und -SD und entgegen seiner Bezeichnung GNBPI beteiligt. Insbesondere bei einer Infektion mit *Micrococcus luteus* fungieren die beiden Rezeptoren PGRP-SA und GNBPI gemeinsam als Rezeptorkomplex (Michel *et al.*, 2001, Gobert *et al.*, 2003). PGRP-SA und PGRP-SD, nicht jedoch GNBPI, sind hingegen als Rezeptorkomplex an der Erkennung von *Staphylococcus aureus* beteiligt (Bischoff *et al.*, 2004) und leiten ähnlich wie PGRP-SA und GNBPI ihr

Signal über Serinproteasen an das Vorläuferprotein von Spaetzle weiter, dessen Prozessierung die Aktivierung des Toll-Signalwegs bedingt. Charakteristischerweise exprimiert der Toll-Signalweg daraufhin als Indikator einer gram-positiven Infektion das Gen des antimikrobiellen Peptids Defensin (Dimarcq *et al.*, 1994).

Neben gram-positiven Bakterien sind auch Pilze in der Lage den Toll-Signalweg über Serinproteasekaskaden einschließlich Spätzle zu aktivieren. Zentraler mustererkennender Rezeptor bei einer Hefeinfektion ist der GNB3-Rezeptor GNB3. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass GNB3 als rekombinantes Protein das fungale Strukturmotiv β -(1,3)-Glucan bindet, und seine Überexpression *in vivo* in Abwesenheit einer Hefeinfektion den Toll-Signalweg aktiviert (Gottar *et al.*, 2006). Abgesehen von GNB3 existiert bei *Drosophila* ein weiteres Erkennungssystem für Pilzinfektionen. Dies beruht nicht auf den klassischen mustererkennenden Rezeptoren von *Drosophila* sondern auf der Aktivität der Serinprotease Persephone. Sie wird z.B. bei einer Infektion mit *Beauveria bassiana* durch spezifische Virulenzfaktoren prozessiert und induziert in ihrer aktiven Form über eine Serinproteasekaskade, die in der proteolytischen Spaltung von Spaetzle mündet, den Toll-Signalweg (Ligoxygakis *et al.*, 2002). Grundsätzlich führt seine Aktivierung durch eine klassische Pilzinfektion zu einer verstärkten Expression des antimikrobiellen Peptids Drosomycin (Lemaitre *et al.*, 1997).

Dem Toll-Signalweg steht im Immunsystem der Fliege der bereits erwähnte IMD-Signalweg gegenüber. Seine Aktivierung durch gram-negative Bakterien bedingt ausschließlich die verstärkte Expression des antimikrobiellen Peptids Diptericin (Lemaitre *et al.*, 1997). Zentrale mustererkennende Rezeptoren des IMD-Signalwegs sind der lösliche Rezeptor PGRP-LE bzw. der membranständige Rezeptor PGRP-LC. Diese Erkenntnisse konnten insbesondere durch *in vivo* Studien erzielt werden, in denen eine Überexpression von PGRP-LE bzw. -LC unabhängig voneinander zur Aktivierung des IMD-Signalwegs führte (Choe *et al.*, 2002, Takehana *et al.*, 2002). Sich anschließende *in vivo* Studien, die mit PGRP-LE/LC Doppelmutanten durchgeführt wurden, konnten weiterhin belegen, dass bei einer Infektion mit bestimmten gram-negativen Bakterien der IMD-Signalweg nur durch Wechselwirkung von PGRP-LE mit PGRP-LC induziert werden kann. In diesen Experimenten zeigten die PGRP-LE/LC-Doppelmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Einfachmutanten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *E. coli* (Takehana *et al.*, 2004).

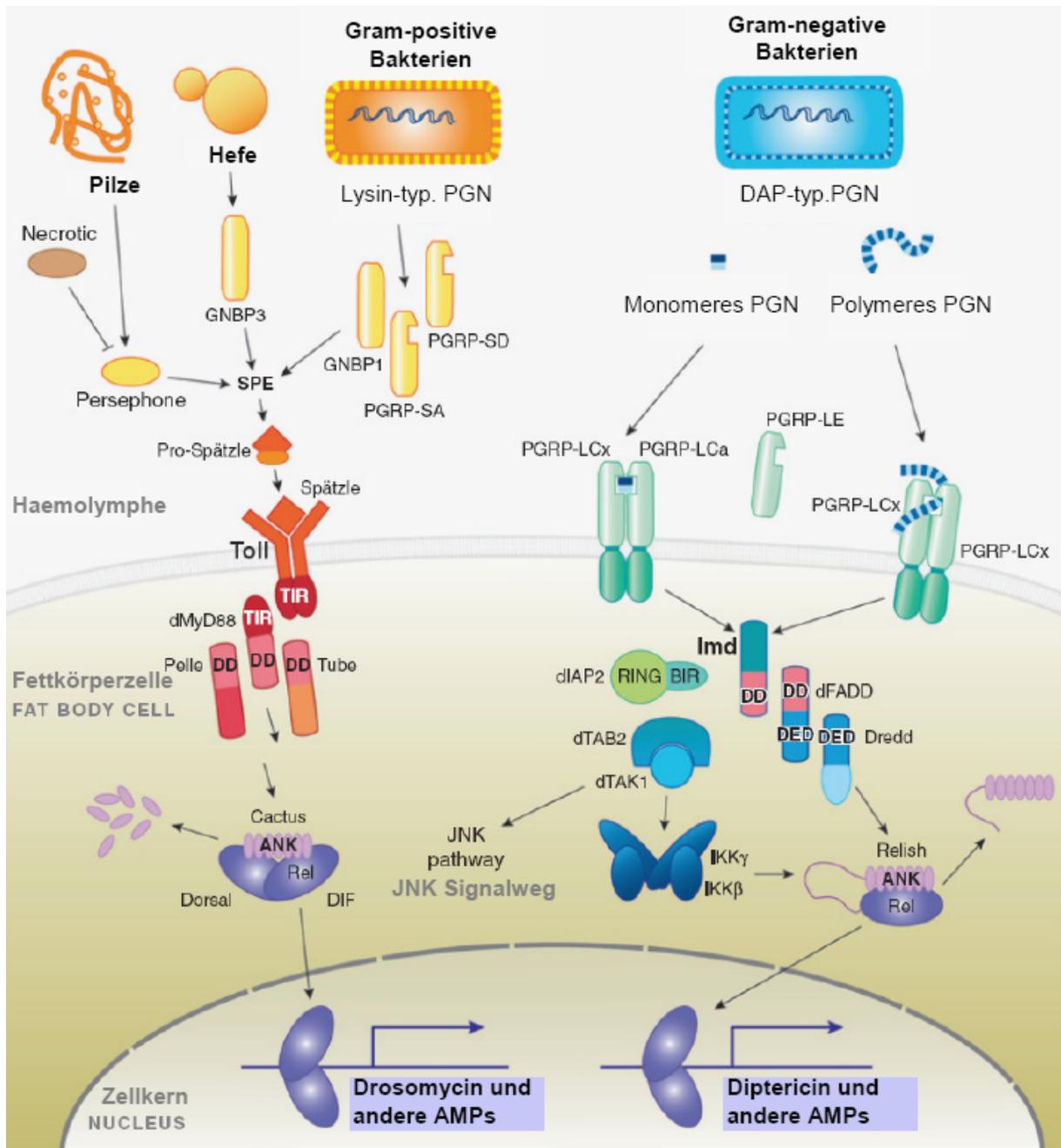


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Toll und IMD-Signalwegaktivierung. Der Toll-Signalweg wird hauptsächlich durch Pilze bzw. gram-positive Bakterien aktiviert, während der IMD-Signalweg durch gram-negative Bakterien oder stark immunogenes monomeres Peptidoglykan (PGN) induziert wird. Die monomeren Fragmente des DAP-enthaltenden Peptidoglykans werden von einigen Bakterienarten wie z.B. *Bordetella pertussis* auf natürliche Weise produziert und freigesetzt. Weitere Anmerkungen siehe Text. (Modifiziert nach: Lemaitre *et al.*, 2007).

Für den IMD-Signalweg konnten inzwischen mehrere Mechanismen identifiziert werden, die die IMD-Signalkaskade negativ regulieren. Eine Schlüsselrolle nehmen hierbei die PGRPs mit Amidase-Aktivität ein. Kürzlich veröffentlichte Studien konnten belegen, dass sowohl die Amidase PGRP-LB als auch PGRP-SC1 Peptidoglykan gram-negativer bzw. gram-positiver Bakterien degradieren und in nicht-immunogene Peptidoglykan-Fragmente umwandeln

können. Während PGRP-LB vornehmlich für den Abbau von gram-negativem Peptidoglykan verantwortlich ist, scheint PGRP-SC1 Peptidoglykan sowohl von gram-positiven als auch von gram-negativen Bakterien proteolytisch zu spalten (Mellroth *et al.*, 2003, Zaidman-Rémy *et al.*, 2006). Bei einer Infektion mit gram-negativen Bakterien wird Peptidoglykan auf diese Weise „detoxifiziert“, wodurch es als mikrobielles Strukturmotiv, nicht mehr in der Lage ist, den IMD-Signalweg weiterhin zu stimulieren. Beide Amidasen fungieren somit als Gegenspieler des IMD-Signalwegs und unterstützen durch das Abschalten des IMD-Signalwegs im Körper der Fliege die Wiederherstellung der Immunhomöostase (Bischoff *et al.*, 2006, Zaidman-Rémy *et al.*, 2006). Im Fall von PGRP-LB konnte eine Regulation durch den IMD-Signalweg nachgewiesen werden (Zaidman-Rémy *et al.*, 2006).

Der IMD-Signalweg ist allerdings nicht nur für die Regulation der Transkription verschiedener Effektormoleküle verantwortlich. Da er über die intrazelluläre Signalkomponente dTak1 mit dem MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*)-Signalweg JNK (*c-Jun N-terminal-kinase*) verknüpft ist (Abb. 1.4), bedingt seine Aktivierung gleichzeitig die von JNK (Silverman *et al.*, 2003). Ergebnisse aus Mikroarray- und Genexpressionsanalysen mit infizierten Larven bzw. adulten Fliegen ergaben, dass der JNK-Signalweg bei einer Infektion mit *E. coli* und *M. luteus* eine Vielzahl der induzierten Gene reguliert. Seine Zielgene umfassen verschiedene Struktur- und Zytoskelettproteine, die in der Immunabwehr der Fliege stets sehr früh aktiviert werden und insbesondere an Prozessen der Wundheilung beteiligt sind (Boutros *et al.*, 2002). Eine mögliche Funktion des JNK-Signalwegs bei der Regulation der systemischen AMP-Expression wird insbesondere von der Gruppe um Mika Rämetsä und Ylva Engström postuliert (Kallio *et al.*, 2005, Delaney *et al.*, 2006).

Neben den beiden NF- κ B-Signaltransduktionswegen Toll und IMD und dem MAP-Kinase Signalweg JNK existiert in *Drosophila* ein weiterer immun-relevanter Signalweg. Hierbei handelt es sich um den JAK/STAT-Signalweg (*janus kinase (JAK)/ signal transducers and activators of transcription (STAT)*), der vornehmlich eine wichtige Funktion in der Segmentierung des Embryos spielt (Binari *et al.*, 1994). Bisher scheint der JAK/STAT-Signalweg in der antifungalen bzw. antibakteriellen Abwehr, eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Genexpressionsstudien mit infizierten Larven bzw. Fliegen haben ergeben, dass die Injektion verschiedener Bakterien in die Körperhöhle zwei Gruppen von Peptiden im larvalen bzw. adulten Fettkörper wiederkehrend induziert. Neben Turandot A (Tot A), einem Stressprotein mit unbekannter Funktion, wird das Komplement ähnliche Thiolester-enthaltende Protein 2 (Tep2) exprimiert (Ekengren *et al.*, 2001, Lagueux *et al.*, 2000). Tep2 dient höchstwahrscheinlich der Opsonisierung von Bakterien und unterstützt somit die

Phagozytose durch Hämozyten (Levashina *et al.*, 2001). Seit kurzem existieren Hinweise, dass der JAK/STAT-Signalweg auch eine Schlüsselrolle in der antiviralen Abwehr übernimmt. Als zentraler Signaltransduktionsweg ist er bei einer *Drosophila* Virus C-Infektion für die Regulation der Expression des vir1-Gens verantwortlich (Dostert *et al.*, 2005).

(C) Effektuerung: Die immun-relevanten intrazellulären Signaltransduktionswege münden abhängig vom Pathogenstimulus in einer verstärkten Expression einer Vielzahl verschiedener Effektormoleküle. Haupteffektoren des Immunsystems sind die antimikrobiellen Peptide (AMP). Sie werden vornehmlich nach einer Infektion mit Bakterien bzw. Pilzen in verschiedenen immun-kompetenten Zellen bzw. Organen von *Drosophila* synthetisiert. Bei einer epithelialen Infektion übernehmen die Oberflächenepithelien diese Funktion, während bei einer systemischen Infektion als immun-kompetente Organe bzw. Zellen ausschließlich der Fettkörper bzw. die Hämozyten in Frage kommen (Abb. 1.5; Tzou *et al.*, 2000). Reguliert wird die AMP-Expression durch die NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren der beiden Signaltransduktionswege Toll und IMD. Im Fall des Toll-Signalwegs übernehmen diese Aufgabe in der Larve redundant die beiden Transkriptionsfaktoren Dorsal und Dif (*dorsal-related immunity factor*), bei der adulten Fliege hingegen nur Dif (Manfruelli *et al.*, 1999, Meng *et al.*, 1999). Der IMD-Transkriptionsfaktor Relish wird hingegen in beiden Entwicklungsstadien in seiner transkriptionell aktiven Form für die Induktion der AMP-Expression genutzt (Abb. 1.4; Dushay *et al.*, 1996).

Neben den NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren ist in der *Drosophila*-Larve eine zweite Gruppe von Transkriptionsfaktoren mitunter sowohl an der systemischen als auch epithelialen Regulation der AMP-Expression beteiligt. Hierbei handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie (GATAa-e), deren Bindungsmotiv in der Promotorregion mehrerer antimikrobieller Peptide vertreten ist. Für das antimikrobielle Peptidgen Cecropin A1 konnte bereits für die systemische Abwehr gezeigt werden, dass neben NF- κ B/Rel-Faktoren auch der kernständige GATA-Transkriptionsfaktor Serpent (dGATAB) für die Cecropin A1 Transkription im larvalen Fettkörper verantwortlich ist (Petersen *et al.*, 1999). Bei einer lokalen Infektion des larvalen Mitteldarms mit *Erwinia carotovora* steht die Expression der beiden antimikrobiellen Peptidgene *dipteracin* und *metchnikowin* hingegen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors dGATAe (Senger *et al.*, 2006).

Die etwa 20 antimikrobiellen Peptide bzw. Polypeptide, die vom Fettkörper bei einer systemischen Immunantwort produziert und in die Hämolymphe freigesetzt werden, lassen

sich aufgrund ihrer Struktur in sieben unterschiedliche Klassen einteilen (Imler *et al.*, 2005). Es handelt sich bei den antimikrobiellen Peptiden von *Drosophila* mit Ausnahme von Attacin ausschließlich um kleine (< 10 kDA), kationische Peptide, die sowohl gegen Bakterien als auch Pilze einen großen Wirkungsbereich besitzen (Imler *et al.*, 2005). Eine Untergliederung der AMPs in drei Kategorien ist hinsichtlich ihrer Pathogenspezifität möglich. So richtet sich die antibakterielle Wirkung von Diptericin, Drosocin und Attacin in erster Linie gegen gram-negative Bakterien, während Defensin ausschließlich mikrobizid gegen gram-positive Bakterien wirksam ist (Lemaitre *et al.*, 1997, Dimarcq *et al.*, 1994). Als AMPs mit exklusivem fungizidem Charakter fungieren in der Immunabwehr der Fliege Drosomycin und Metchnikowin (Lemaitre *et al.*, 1997). Cecropin A1 nimmt unter den antimikrobiellen Peptiden eine Sonderstellung ein, da sein Wirkspektrum sowohl das von Bakterien als auch Pilzen umfasst (Hedengren-Olcott *et al.*, 2004).

Das Immunsystem von *Drosophila* reagiert auf eine mikrobielle Infektion allerdings nicht nur mit einer verstärkten AMP-Produktion. Breit angelegte Analysen auf Transkriptom- bzw. Proteom-Ebene haben eindeutig gezeigt, dass nach einer Infektion mit einem Mix aus gram-positiven bzw. gram-negativen Bakterien ein breites Spektrum an Peptiden bzw. Proteinen verstärkt hergestellt wird, das nicht ausschließlich aus antimikrobiellen Peptiden besteht (Levy *et al.*, 2004). Für viele dieser Peptide bzw. Proteine ist nach wie vor unklar, welche Rolle sie in der Immunabwehr der Fliege übernehmen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings eine Gruppe von Effektormolekülen, die höchstwahrscheinlich eine entscheidende Funktion in der Eisen-Komplexierung und somit in der Hemmung des mikrobiellen Wachstums übernimmt. Zwei Transferrin-Proteine stehen *Drosophila* als körpereigene Funktionsproteine zur Verfügung, die die Menge an löslichem Eisen reduzieren und dadurch mikrobielles Wachstum verhindern (Dunkov *et al.*, 2006).

1.4.3 Lokale versus systemische Immunität

Drosophila greift bei der epithelialen bzw. systemischen Immunantwort auf unterschiedliche Abwehrmechanismen zurück, um Mikroorganismen zu beseitigen. Beiden gemein ist der humorale Zweig des Immunsystems, der sich insbesondere durch die verstärkte Synthese und Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden auszeichnet (Meister *et al.*, 2000). Im Fall der systemischen Immunantwort erfüllen diese Aufgabe der Fettkörper bzw. die Hämocyten, während bei der epithelialen Immunität das Epithelium selbst die AMP-Produktion übernimmt (Basset *et al.*, 2000, Tzou *et al.*, 2000). Dem humoralen Zweig steht im systemischen Immunsystem der zelluläre Zweig gegenüber. Er zeichnet sich durch das

Vorhandensein verschiedener mobiler und sessiler Hämocyten-Subpopulationen aus, von denen die überaus stark vertretenen Plasmatozyten für die Phagozytose der Mikroorganismen zuständig sind (Meister *et al.*, 2004). Größere Mengen von Bakterien oder parasitäre Eindringlinge werden von den Lamellozyten eingekapselt und abgetötet (Carton *et al.*, 1997). Beteiligt am Prozess der Melanisierung sind als spezialisierte Hämocyten die Kristallzellen. Sie speichern und liefern die Vorläuferkomponenten der Prophenoloxidase-Kaskade, die insbesondere bei der Wundheilung und Einkapselung von Mikroorganismen durch Lamellozyten aktiviert wird (Rizki *et al.*, 1980).

1.4.4 Die epitheliale Immunantwort

Mikroorganismen dringen bei einer natürlichen Infektion über die Oberflächenepithelien in den Körper von *Drosophila* ein. Ideale Eintrittsorte für Mikroorganismen sind in der Larve bzw. der adulten Fliege der Verdauungstrakt, die Atemwege (Tracheen) und in der adulten Fliege zusätzlich die männliche bzw. weibliche Geschlechtsöffnung (Abb. 1.5). Studien mit GFP-Reporterstämmen, bei denen *gfp* (*green fluorescent protein*) unter der transkriptionellen Kontrolle der einzelnen AMP-Promotoren steht, konnten zeigen, dass in diesen Oberflächenepithelien auf eine Infektion hin alle sieben antimikrobiellen Peptide gewebsspezifisch exprimiert werden. So sezernieren larvale Epithelzellen des Proventrikulus und des Mitteldarms nach einer Infektion durch *Erwinia carotovora* Dipterizin und Attacin in das Lumen des Verdauungstrakts, während das larvale Atemwegsepithel auf seine luminalen Seite die antimikrobiellen Peptide Drosomycin und Drosocin abgibt (Ferrandon *et al.*, 1998, Tzou *et al.*, 2000).

Anhand dieser Reporterstudien konnte das AMP-Expressionsprofil für sämtliche Epithelien der Fliege entschlüsselt werden. Sie dokumentieren, dass neben dem Darm bzw. den Tracheen auch die labelaren Drüsen, die Speicheldrüsen und die Malpighischen Gefäße gewebsspezifisch antimikrobielle Peptide produzieren (Abb. 1.5; Tzou *et al.*, 2000). Auch wenn die Epithelien dieser Gewebe keine klassische Barrierefunktion übernehmen und nicht in unmittelbarem Kontakt zu den Mikroorganismen stehen, ist auch ihre AMP-Expression induzierbar. Eine Ausnahme bilden in diesem Zusammenhang die Speicheldrüsen, die Spermatheken des weiblichen und der Ejakulationsgang des männlichen Geschlechtsorgans der adulten Fliege. In ihren Epithelien werden die antimikrobiellen Peptide konstitutiv synthetisiert (Tzou *et al.*, 2000).

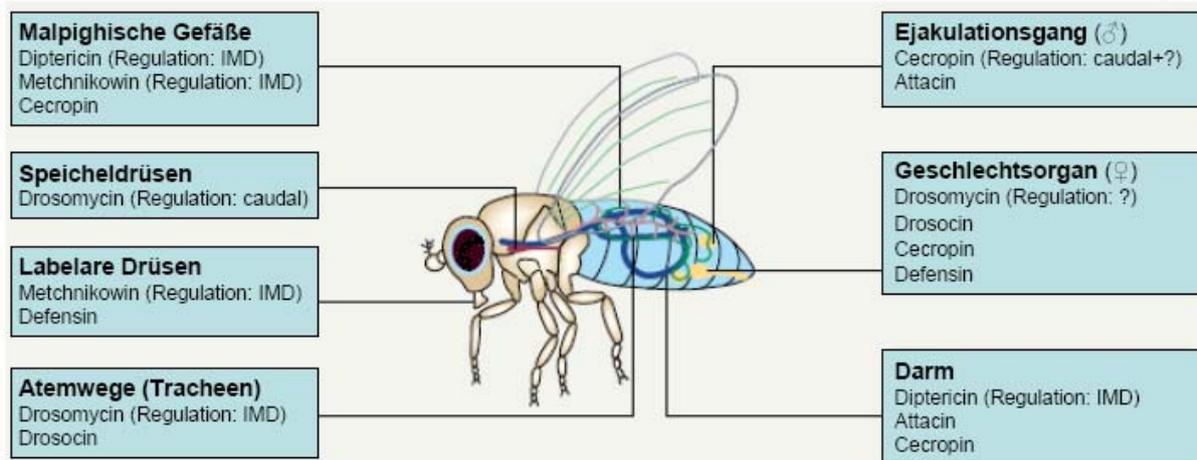


Abb. 1.5: Gewebsspezifische Expression der verschiedenen antimikrobiellen Peptide bei Adulten von *Drosophila melanogaster*. Soweit bekannt, sind neben den einzelnen antimikrobiellen Peptiden in Klammern die Regulationsmechanismen angezeigt, die zur Induktion der AMP-Expression führen. Eine Ausnahme bilden in diesem Zusammenhang der Ejakulationsgang, die Spermatheken des weiblichen Geschlechtsorgans und die Speicheldrüsen, deren Epithelien einige wenige antimikrobielle Peptide konstitutiv exprimieren (Ferrandon *et al.*, 1998, Ryu *et al.*, 2004). (Modifiziert nach: Ferrandon *et al.*, 2007).

Der Entschlüsselung der gewebsspezifischen AMP-Expression schloss sich die Frage nach den Regulationsmechanismen der epithelialen Immunantwort an. Klärung erhoffte man sich anhand von Reporterstudien, deren Linien neben den bereits erwähnten GFP-Konstrukten einen knock-out Hintergrund für den Toll- bzw. Imd-Signalweg besaßen. Diese Studien ergaben sowohl für die Larve als auch für die adulte Fliege, dass die Induktion der AMP-Expression bei einer lokalen Immunantwort IMD-abhängig ist (Tzou *et al.*, 2000). Intensive molekulare Analysen des Darms bzw. der Malpighischen Gefäße bestätigen diesen Regulationsmechanismus (Vodovar *et al.*, 2005, McGettigan *et al.*, 2005). Für das antimikrobielle Peptid Dipterizin konnte im Darm der Larve nicht nur eine IMD-abhängige, sondern auch eine dGATAe-abhängige Regulation nachgewiesen werden (Senger *et al.*, 2006). Als regulatorisches Element der konstitutiven AMP-Expression kommt im Fall der Speicheldrüsen und des Ejakulationsgangs das Homeobox-Protein caudal in Frage (Ryu *et al.*, 2004). Caudal steuert sowohl die Drosomycin- als auch die Cecropin-Expression in den Speicheldrüsen bzw. im Ejakulationsgang der adulten männlichen Fliege.

1.5 Experimentelle Vorteile des Systems *Drosophila*

1.5.1 Das binäre Gal/UAS-Expressionssystem

Das Gal4/UAS-Expressionssystem ermöglicht bei *Drosophila* die ektopische Expression von Genen in unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Expressionsmustern (Brand *et al.*, 1993). Das binäre System stammt ursprünglich aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und besteht aus dem Transkriptionsfaktor Gal4 und den zugehörigen Gal4-Bindestellen UAS (*upstream activating sequence*). Es wird in der Hefe in Anwesenheit von Galaktose aktiviert und steuert die Transkription von Genen, die für den Galaktose-Metabolismus notwendig sind. In der Fliege wird das binäre Gal4/UAS-Expressionssystem durch Transposon-Insertion in das Genom von zwei separaten transgenen Fliegenstämmen integriert, sodass man zum einen die so genannten Treiberstämme (Gal4-Stämme) und zum anderen die UAS-Effektorstämme erhält (Abb. 1.6).

Im Treiberstamm besitzt das Gal4-Transposon als regulatorisches Element grundsätzlich einen „schwachen“ Promotor. Je nach Insertionsort gelangt der „schwache“ Promotor unter die transkriptionelle Kontrolle eines zell- und/ oder entwicklungspezifischen Enhancers. Der Promotor reguliert daraufhin die Gal4-Expression Enhancer-abhängig am Insertionsort (*enhancer trapping*; Abb. 1.6).

Den Treiberstämmen stehen im Gal4/UAS-Expressionssystem die UAS-Effektorstämme gegenüber. Sie tragen als Transposon das zu exprimierende Gen X unter der regulatorischen Kontrolle des UAS-Promotors. Die Aktivierung des Gal4/UAS-Systems erfolgt in der Fliege durch Kreuzung des Treiberstamms mit dem Effektorstamm, wodurch in der F1-Generation der Transkriptionsfaktor Gal4 in räumliche Nähe des UAS-Promotors rückt, und das Zielgen abhängig vom räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster des Enhancers transkribiert wird (Abb. 1.6).

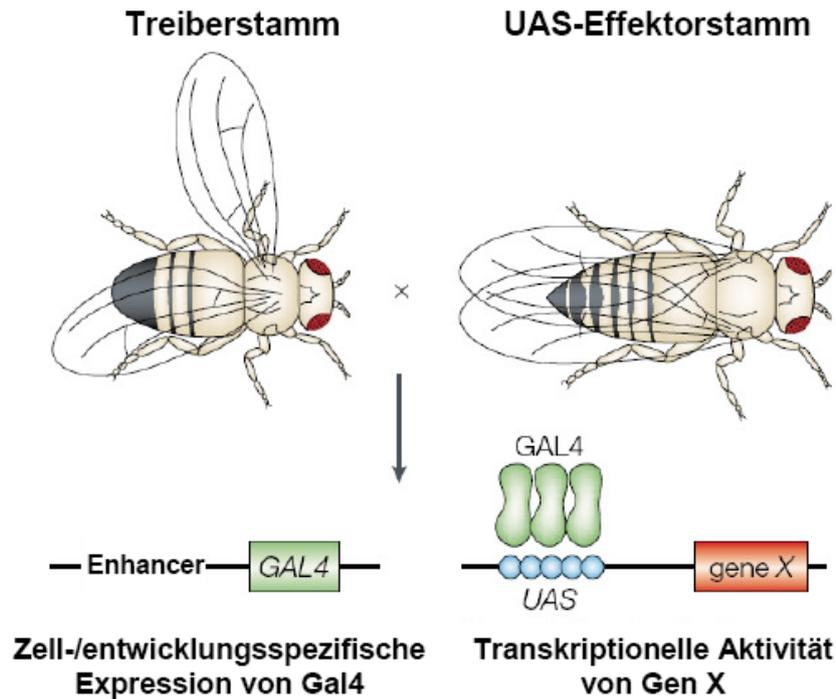


Abb. 1.6: Das binäre Gal4/UAS-Expressionssystem von *Drosophila melanogaster*. Durch zwei getrennte Transposon-Insertionen werden transgene Fliegenstämme hergestellt, die entweder Gal4 zell- und/oder entwicklungsspezifisch exprimieren (Treiberstamm) oder ein Gen von Interesse unter UAS-Kontrolle inserieren. Kreuzt man beide Stämme, kommen beide Transgene in der F1-Generation zusammen, und das Gen von Interesse wird exprimiert. (Modifiziert nach: St Johnston, 2002) .

1.5.2 Das TARGET-Expressionssystem

Ein großer Nachteil des Gal4/UAS-Expressionssystems liegt in seiner mangelnden zeitlichen Induzierbarkeit. Da sehr viele Treiberstämme den Transkriptionsfaktor Gal4 bereits sehr früh in der Embryonal- und Larvalentwicklung exprimieren, ist eine gezielte Aktivierung des Expressionssystems zu einem bestimmten Entwicklungsstadium der Fliege nahezu unmöglich. Dank der Entwicklung des Temperatur-abhängigen TARGET-Expressionssystems (*temporal and regional gene expression targeting*) besteht die Möglichkeit, diese mangelnde zeitliche Variabilität des Gal4/UAS-Systems zu umgehen (McGuire *et al.*, 2003).

Das TARGET-Expressionssystem stammt wie das Gal4/UAS-System aus der Hefe und beruht auf dem Vorhandensein eines Temperatur-sensitiven Gal80-Proteins, das in der Hefe den Transkriptionsfaktor Gal4 in Abwesenheit von Galaktose reprimiert. In der Fliege wird der inhibitorische Effekt von Gal80 gemeinsam mit der Temperatur-sensitiven Eigenschaft des Proteins genutzt, um das Gal4/UAS-System zu einem bestimmten Entwicklungsstadium zu aktivieren. Integriert man Gal80 ubiquitär in einen Gal4/UAS-Hintergrund, etabliert man in

der F1-Generation ein TARGET-System, das abhängig von der entsprechenden Umgebungstemperatur induzier- bzw. reprimierbar ist. So wird in diesem System Gal4 durch Gal80 bei 19°C optimal reprimiert, während Gal80 bei 30°C seinen inhibitorischen Effekt auf Gal4 verliert, und das Zielgen transkribiert wird (McGuire *et al.*, 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Atemwegsepithel des Menschen nimmt als immun-kompetentes Epithel in der Immunpathogenese zahlreicher chronischer Erkrankungen der oberen Atemwege eine Schlüsselstellung ein. Wiederkehrende Schädigungen des Epithels durch anhaltenden Pathogen- oder Allergenkontakt und nachfolgende Entzündungsreaktionen führen in den oberen Atemwegen und dem angrenzenden Lungenparenchym zu chronischen Wundszenerarien, die im Fall des Asthma bronchiale mit anhaltenden Entzündungsreaktionen und mit einer strukturellen Veränderung der Atemwege (*airway remodelling*) einhergehen. Da die Immunpathogenese des Atemwegsepithels aufgrund des Mitwirkens von Immunzellen des adaptiven Immunsystems sehr komplex gestaltet ist, scheint es in Wirbeltieren wie der Maus nahezu unmöglich, den Einfluss des Atemwegsepithels auf die Entstehung und den Verlauf chronischer Erkrankungen der Atemwege zu entschlüsseln.

Ein Ausweichen auf andere, einfacher gestaltete Modellorganismen, die sich insbesondere durch das Fehlen eines adaptiven Immunsystems auszeichnen, bietet die Möglichkeit, die Rolle des Atemwegsepithels bei Infektionen aufzuschlüsseln. In diesem Zusammenhang bietet sich der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* als hervorragendes Forschungsobjekt an, da *Drosophila* zum einen ein bereits gut erforschtes Immunsystem besitzt und zum anderen als Larve über ein einfach strukturiertes Atemwegsepithel verfügt. Studien mit GFP-Reporterstämmen, in denen *gfp* unter der transkriptionellen Kontrolle von Promotoren verschiedener antimikrobieller Peptidgenen steht, konnten zeigen, dass das larvale Atemwegsepithel ein immun-kompetentes Epithel ist und eine Infektion insbesondere durch die Expression von bestimmten antimikrobiellen Peptiden abwehrt. Allerdings ist bis auf die mikrobizide Wirkung der antimikrobiellen Peptide und ihre transkriptionelle Steuerung durch den NF- κ B-Signalweg IMD wenig über die Abwehrmechanismen des larvalen Atemwegsepithels bekannt. Es fehlt nahezu jegliches Wissen über die Pathogenerkennung, über weitere immun-relevante Signaltransduktionswege und ihre potentiellen Effektormoleküle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb folgenden Fragen nachgegangen:

1. Welche mustererkennenden Rezeptoren werden im larvalen Atemwegsepithel für die Pathogenerkennung genutzt?
2. Welche immun-relevanten Signaltransduktionswege regulieren im larvalen Atemwegsepithel die Immunantwort?
3. Welche antimikrobiellen Peptide werden nach einer Infektion des larvalen Atemwegsepithels signifikant exprimiert? Ist die Expression der antimikrobiellen Peptide gewebsspezifisch und stereotypisch?
4. Gibt es neben den antimikrobiellen Peptiden weitere Effektormoleküle, die in der Immunabwehr des larvalen Atemwegsepithels bei der Bekämpfung einer Infektion eine Schlüsselrolle übernehmen?
5. Welche Funktion übernimmt der IMD-Signalweg in der Immunabwehr der Fliege? Steuert er als zentraler NF- κ B Signalweg vornehmlich die Expression der antimikrobiellen Peptide und wenn ja, welcher?
6. Inwiefern unterscheidet sich das Infektionstranskriptom des larvalen Atemwegsepithels vom Transkriptom, das ausschließlich durch den NF- κ B-Signalweg IMD reguliert wird?

Während die Fragen eins bis drei und teilweise auch vier mit herkömmlichen Methoden der Molekularbiologie wie RT-PCR und qPCR gelöst werden sollten, wurden zur Klärung der Frage vier bis sechs breit angelegte Transkriptionsstudien in Form von DNA-Mikroarrays durchgeführt. Für die Aufklärung der Fragestellungen fünf und sechs wurde im Vorfeld mit dem Gal4/UAS-Expressionssystem von Brand und Perrimon ein *Drosophila*-Modell in der Larve etabliert, in dem der NF- κ B-Signalweg IMD im Epithel der Atemwege ektopisch aktiv ist.

2 Material und Methoden

2.1 Spezielle Geräte und Materialien

2.1.1 Spezielle Geräte

GenePix™ 4000B Scanner: Molecular Devices GmbH (Ismaning/ München); **LightCycler® 1.2 Instrument**: Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); **NanoDrop®** (ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer): Peqlab (Erlangen); **MasterCycler® ep gradient thermal cycler**: Eppendorf (Hamburg); **Olympus SZX12**: Olympus (Hamburg); **RoboCycler Gradient 96**: Stratagene (Amsterdam, Niederlande); **SciHypChamber**: Scienion (Berlin); **Ultraspec 1100 Pro**: GE Healthcare (München); **UV-Tisch TI3**: Biometra Biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen); **UV-Transilluminator**: FA. Vilbert Lourmat (Illkirchen, Frankreich); **Ultramikrotom E**: Reichert-Jung (Wien, Österreich); **Voyager-DE RP mass spectrometer**: Applied Biosystems (Darmstadt); **Zeiss Axiovert S 100**: Zeiss (Oberkochen); **Zeiss EM 900**: Zeiss (Oberkochen).

2.1.2 Spezielle Materialien

Ceaprenstopfen (Ø 22, 27, 36 mm): Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen); **Fixogum**: Marabuwerke GmbH und Co (Tamm); **Drosophila Kulturröhrchen** (16, 28, 68 ml): Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen); **Drosophila OLIGO_14k version 1**: Canadian Drosophila Microarray Center (Toronto, Kanada); **Glas-Homogenisator**, konisch (1ml): VWR International GmbH (Darmstadt); **LifterSlip** (22x60): Implen GmbH (München); **LightCycler® qPCR-Kapillaren-Set mit Rotor-Adaptor**: Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); **Original Schweizer Dumont Pinzetten Nr 5**: Dumont & Fils (Schweiz).

2.2 Chemikalien und Reagenzien

2.2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und AppliChem (Darmstadt) in dem Reinheitsgrad p.A. bezogen. Im nachfolgenden Absatz sind in alphabetischer Reihenfolge all die Chemikalien aufgeführt, die von anderen Herstellern stammten.

5-(3-aminoallyl)-UTPs: Applied Biosystems (Darmstadt); **10xAdvantage PCR Buffer:** BD Biosciences Clontech (Heidelberg); **Araldit:** Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg); **Bacto™ Yeast Extract:** Becton Dickinson GmbH (Heidelberg); **Blei(II)-nitrat:** Merck (Darmstadt); **Calcein:** Molecular Probes (Leiden, Niederlande); **Cy™ Dye Post-labelling Reactive Dye Pack:** GE Healthcare (München); **α-Cyano-4-hydroxymethylsäure:** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **DIG Easy Hyb:** Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); **DMSO (Dimethylsulfoxid):** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **dNTP Set:** Promega (Mannheim); **Glutaraldehyd 25%:** Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg); **Glykogen (5 mg/ml):** Applied Biosystems (Darmstadt); **Hefe-tRNA:** Applied Biosystems (Darmstadt); **Hoechst-33258:** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **Lachs-Sperma-DNA:** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **LB Agar:** Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe); **LB Broth Base:** Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe); **Mangan(II)-chlorid (MnCl₂):** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **Natriumzitat:** Merck (Darmstadt); **Nipagin (Methyl-4-hydroxybenzoat):** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **Osmiumtetroxid:** ChemPur (Karlsruhe); **Propionsäure:** Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); **Standard-Agarose:** Axon-Labortechnik (Kaiserslautern); **Terrific Broth:** Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe); **Uranylacetat:** Merck (Darmstadt).

2.2.2 Reagenziensysteme

JETQUICK PCR Purification Spin Kit: Genomed (Löhne); **NukleoSpin® RNA II:** Macherey-Nagel (Düren); **MEGAscript® High Yield T7 Transcription Kit:** Applied Biosystems (Darmstadt); **SYBR Premix Ex Taq™:** Lonza (Verviers, Belgien).

2.2.3 Enzyme und die dazugehörigen Puffer

SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/μl): Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe); **RNase Inhibitor (40 U/μl):** Applied Biosystems (Darmstadt); **SAWADY Taq DNA Polymerase (5 U/μl):** Peqlab (Erlangen); **SAWADY Pwo DNA Polymerase (1 U/μl):** Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen); **Taq DNA Polymerase (5 U/μl):** Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe).

2.2.4 Marker und Ladepuffer

Marker: GeneRuler™ 1kb DNA-Leiter, GeneRuler™ 100bp DNA-Leiter, GeneRuler™ 50bp DNA-Leiter: MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot).

Ladepuffer: 6xLoading Dye Solution: MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot); **Gel Loading Buffer II:** Applied Biosystems (Darmstadt).

2.3 Primer

2.3.1 cDNA-Primer

Die verwendeten cDNA-Primer wurden von den Firmen Eurogentec (Köln) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert. Sie sind im Folgenden in Tabelle 2.1 nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet. Ihre Sequenzen sind wie üblich in ihrer 5'→3'-Orientierung angegeben.

Tab. 2.1: cDNA-Primer

Primer	Sequenz
Erststrangsynthese CapFinder	
CapFinder-Origin-rG	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC rGrGrG
CapFinder-Sp6-rG	CAG CGG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG ArGrGrG
Erststrangsynthese Oligo-dT7	
Oligo-dT7-I (Biotin)	Biot-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA (T) ₂₅ A/C/G/
Zweitstrangsynthese CapFinder-PCR	
CapFinder-Origin-PCR	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC G
CapFinder-Sp6-PCR	CAG CGG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG
Zweitstrangsynthese Oligo-dT7-PCR	
Oligo-dT7-II	GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G

2.3.2 Expressionsprimer

Die verwendeten Expressionsprimer wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert. Generiert wurden die Sequenzen für die einzelnen Gene anhand der Datenbank Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) und des Primer Designprogramms Primer3 (v. 0.4.0; <http://frodo.wi.mit.edu/>). In den folgenden Tabellen sind all die Gene aufgeführt, für die Expressionsprimer hergestellt wurden. Die Anordnung der Gene in den einzelnen Tabellen erfolgt nach ihrer CG-Nummer und ihrer

gebräuchlichen Bezeichnung. Die Sequenzen der Primer sind wie üblich in ihrer 5'→3'-Orientierung angegeben.

Tab. 2.2: Gene von mustererkennenden Rezeptoren

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
Peptidoglykanerkennungsrezeptoren (PGRPs)		
CG 4384	PGRP-LA	GCG CCA GTA CAA CAT CAT TA TAT TCA CGT TGA AAG GCA GA
CG 14704	PGRP-LB	GCA GGG GAT TCA ATG TCA TC TAG GCA GGG TCA ATG TAG CC
CG 4432	PGRP-LC	GAA TCG TCG CAG AAG TGT GA CCG CCT TAA AAT CGG TTA CA
CG 33717	PGRP-LD	GCT GCC CTA CAA CTT TCT GG GTC CGT ATA GCT GCC CAA CA
CG 8995	PGRP-LE	GAT GGC AAC ATC TAC GAG GG GTG GGG CCA TGT CTG TAT CT
CG 4437	PGRP-LF	AAA GAT CGT TAC CCG ACC CT ACA GCT GTG ATC CCA ACC TC
CG 11709	PGRP-SA	GTT CGA TTC GGA TCT CCT TG TGA TGA TAC GCC TGC ATG TT
CG 9681	PGRP-SB1	ATT CAG TCG GAT CAC AAG GG TGT ACA GAG CAT CAC CTG GG
CG 9697	PGRP-SB2	GTC GAA TCT ACG AGG GCT TG GAA GGT GTA TTC CCG GAC AA
CG 14746	PGRP-SC1a	GCA GAG CGT CCA GAA CTA CC TAG TTG CCC AGG AAG CTG AT
CG 8577	PGRP-SC1b	GGC AAC TAC CTC AGC TAC GC GCC GAT CAG GAA GTT GTA GC
CG 14745	PGRP-SC2	TCC TGG GCA ACT ACA ATA CC ATG TAT CCG GAA ACG ATC TG
CG 7496	PGRP-SD	GTT CTC GGA CAT TGG CTA CC CCC GTT CTT CGA AGT TAC CA
Gram-negativ bindende Proteine (GNBPs)		
CG 6895	GNBP1	GGT AAC TCC GTG CTG AGG AT CTG GGA TTC TCG TCC AGT TC
CG 4144	GNBP2	CGG AAA CCA CTT ATA TGG C TAA GGC TTG ACA TCC TTG GC
CG 5008	GNBP3	GCA AAG CTG GAT CCC AAT AA GAG GAG AAC TGA GCG GTG AC

Tab. 2.3: Toll-Rezeptoren

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
CG 5490	Toll	TCC AGA CCC AGA TCA ACT CC TAG CCC AGC GAG CTA ATG TT
CG 8896	18-wheeler	TAG CAT TGT GGA GTC GCA AG ATC CTG AAA CAT GCC TAC GG
CG 1149	Toll3	GGA TAG GCT GGA ACG TGG TA CGT AGC TTG GTA GTA GCG GC
CG 18241	Toll4	ATT CGT AAA GGA GCA AGC GA GCC AAT CTC GCA GGT AGA AG
CG 7121	Tehao	TGC CAA AGT CAC CAC ATC AT GCA AGT TGG CCA AAT GTT TT

CG 7250	Toll6	CGC TCA AGT CCC AGA AAA AG CTC TTA CAC CCG GCA CAT TT
CG 8595	Toll7	CAT GGC TAC GAG TTT GAG CA TGG CGT TAA AGT CCA GCT CT
CG 6890	Tollo	ACA CGA ATT ATG CAA CAC GA AAC AAA CGG CGA GTA AAT CA
CG 5528	Toll9	GAG TAC GTG AGC AAG GAG GC TTC AGC TTA TCC CCC AGA TG

Tab. 2.4: Gene des Toll-Signaltransduktionswegs

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
CG 5490	Toll	TCC AGA CCC AGA TCA ACT CC TAG CCC AGC GAG CTA ATG TT
CG 2078	dMyd 88	GGA ACA CTT CTT GGG CAT TA TGT TGT TGG TCT CGA AGC AG
CG 10520	tube	GCC TTC TTG CCA AAT CTG AG CAA GCG TAA TCG TCG TTT GA
CG 5974	pelle	TCT ACA GCT TCG GCA TTG TG GGC CCA TCT AGT CGG TAA CA
CG 5848	cactus	GCT TTG GTG ATC CTC GCT AT TAT TCG TTT CGG ATT CCC AC
CG 6794	dif (dorsal-related immunity factor)	TTC AAT GCC AAA TTC GAT CA ATG GTC AGT TCG CTG CTC TT
CG 6667	dorsal	ACA ACC CTT TGG GCT TTC TT CTG GGC AAA CGG ATT GTA GT

Tab. 2.5: Gene des IMD-Signaltransduktionswegs

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
CG 5576	Imd	AAC CTG TTG CCC ACA ATC TAC TGG TGC TAC CCT TTC GC
CG 12297	dFaad	CTC CGT ATT GCT CCA GCT TC GCT CCT CGA TTG TGT CCA TT
CG 7486	Dredd caspase	TCA GCG AGT GCA ATT TAT CG GTC GCC ATA AAG CAG AAA GC
CG 1388	dTak1	GCA GGA CTT CAA GGA CAA GC TGC CGA CTG TGG ATG GTG AA
CG 4201	ird5	ACT ATG CCC CAG AAG TGG TG CCT CCG GAT CCT CTG TGA TA
CG 16910	kenny	ATC TAC CGC AGG GAC TTT GA TCC TCT CGC AAA TTG CTT CT
CG 11992	relish	AAA ACG AAT GGT CAG CCA TC ACA ACC CTT TGG GCT TTC TT
CG 5680	basket	CGT TAA ATG GCC GAT ATG CT TAC CGA CTG TGG ATG GTG AA
CG 4353	hemipterous	CAA ACA TTG ATC ACG GAT GC AAT TCA AGG TCG TCG TGG TC
CG 2275	Jun rel.antigen	AGA CTG AAA CCC CCT CGA AT GCT GTT CGT TAT CGC TCT CC
CG 33956	dFos/kayak	ATA ATG GCG TTG AAG CGA GT TAG CGC AAT GTT GCG TTT AG
CG 7850	puckered	CAT CTC GCC CAA TCT GAA CT GGG TGC TTA ATC CCA CAG AA

Tab. 2.6: Gene des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
CG 9696	dome	CGG CAC GTC CTC TAA GAT AC ATA TGC GGC TGA AGA TGA GT
CG 1594	hopscotch/ hop	CAT TTT CTC GCG TCT CAA CA TGT CGC TTC TAT CGA TCA CG
CG 4257	Stat 92E	GCA ACT GGG AAA TGG TGA CT TAG CGA CAC ACG TTC AGG AG

Tab. 2.7: Gene der Transkriptionsfaktoren

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
dGATA-Transkriptionsfaktoren		
CG 3978	dGATAa (pannier)	TGC ACA CGG ATA TGA AGA GC TCA GAT GTG CCT GTC CAG AG
CG 3992	dGATAB (serpent)	GAG ATG GAT CAG TCG CAA CA ATG CAT CGC ATA GTT GGT CA
CG 9656	dGATAc (grain)	TGT TCA GTT AGA GCC GCA AA TAG GAA TAG CCA GCG TTC GT
CG 5034	dGATAd	AAA CAA AAT CGG AGC CAA TG CAA ACC ACG TTG GGT AAT CC
CG 10278	dGATAe	AGC CAG CTT AAT AGC CAG CA GAT TGA CTC TGT GGC GTT GA
NF-κB-Transkriptionsfaktoren		
CG 11992	relish	AAA ACG AAT GGT CAG CCA TC ACA ACC CTT TGG GCT TTC TT
CG 6794	dif (dorsal-related immunity factor)	TTC AAT GCC AAA TTC GAT CA ATG GTC AGT TCG CTG CTC TT
CG 6667	dorsal	ACA ACC CTT TGG GCT TTC TT CTG GGC AAA CGG ATT GTA GT
Gene des Insulin-Signaltransduktionswegs		
CG 3143	foxo	CTT CAC TCC GTT TTT GCA TT AAT GCG CAT CAT TGT GTA CT
CG 8846	thor	GCA ACT GCC AAA TCC AAC TA CAG AAG TCC TCG ACG GTA TC

Tab. 2.8: Gene der antimikrobiellen Peptide

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
CG 10146	AttacinA	TCC CGT GAG ATC CAA GGT AG CAA TCT GGA TGC CAA GGT CT
CG 1373	CecropinC	AAG ATC TTC GTT TTC GTC GC GTT GCG CAA TTC CCA GTC-
CG 1385	Defensin	GCT ATC GCT TTT GCT CTG CT GCC GCC TTT GAA CCC CTT GG
CG 12763	Diptericin	GCA ATC GCT TCT ACT TTG GC TAG GTG CTT CCC ACT TTC CA
CG 10816	Drosocin	GTT CAC CAT CGT TTT CCT GC GGC AGC TTG AGT CAG GTG AT
CG 10810	Drosomycin	GTA CTT GTT CGC CCT CTT CG AGC ATC CTT CGC ACC AGC AC

CG 8175	Metchnikowin	CCA CCG AGC TAA GAT GCA A TGT TAA CGA CAT CAG CAG TGT G
---------	--------------	--

Tab. 2.9: gewebspezifische Gene

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
Fettkörper-spezifisch		
CG 3763	P6; Fat body protein 2	TGC AAA TGA ACC TCA TGG AA GGT TCC AGG CCA TAG ACA GA
Hämozyten-spezifisch		
CG 31770	Hemese	CCA AGT GAA ACG GAA TCC AC GAA CCA TAA TGG CGT CGA AT

Tab. 2.10: Sonstige Gene

CG-Nummer	Bezeichnung	Primersequenz (Sense/ Antisense-Primer)
Normalisierungen für Real-time qPCR		
CG 12051	Actin 42A	TCG AAG CAA GAG TAC GAC GA CAA TGG GTG TGT TCG ATG AG

2.4 Puffer und Lösungen

Die Puffer wurden vor der Verwendung stets für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert, die Lösungen hingegen im Fall von Paraformaldehyd steril filtriert.

2.4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

10xPBS:	137 mM NaCl; 27 mM KCl; 43 mM KH ₂ PO ₄ ; 14 mM Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O; ad 1 l; pH 7,4 eingestellt mit HCl
10xTBE:	0,89 M Tris-HCl; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA; ad 1 l; pH 8,0 eingestellt mit HCl
20xSSC:	3 M NaCl; 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; ad 1 l; pH 7,0 eingestellt mit HCl
10% Nipagin:	10 g Nipagin ad 100 ml 50% Ethanol
3M Natriumazetat:	40,8 g Natriumazetat ad 100 ml Aqua bidest; pH 5,5 eingestellt mit Eisessig
4% Paraformaldehyd:	4 g Paraformaldehyd ad 100 ml 1xPBS pH 7,3; auf 50-60°C erhitzen
10% Triton [®] X-100:	1 ml Triton [®] X-100 ad 9 ml Aqua bidest

2.4.2 Lösungen für Transmissionselektronenmikroskopie

0,2 M Cacodylatpuffer: 42,8 g Di-Methylarsinsäure-Natriumsalz ad 1 l; pH 7,2 eingestellt mit 1 N HCl

0,1 M Cacodylatpuffer: 0,2 M Cacodylatpuffer auf 0,1 M mit Aqua bidest verdünnen

3% Glutaraldehyd: 25% Glutaraldehyd auf 3% mit 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,2 verdünnen

4% Osmiumtetroxid: 0,5 g Osmiumtetroxid ad 12,5 ml Aqua bidest; einige Tage vor Gebrauch lösen

2% Osmiumtetroxid: 4% Osmiumtetroxid auf 2% Osmiumtetroxid mit 3% Glutaraldehyd verdünnen

2.5 Kultur- und Nährmedien

Die Kultur- und Nährmedien wurden vor der Verwendung stets 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

LB-Medium: 20 g LB-Broth (Lennox L Broth Base) ad 1 l Aqua bidest; pH 7,5 eingestellt mit NaOH

TB-Medium: 47 g TB (Terrific Broth) ad 1 l Aqua bidest

Drosophila-

Standardmedium: 3 g Agar in 320 ml VE-Wasser für zehn Minuten aufkochen; zusätzlich 10 g Hefeextrakt und 30,4 g Maismehl in 100 ml VE-Wasser lösen und 30 Minuten erhitzen; 8,9 g Zuckersirup in 15 ml heißem VE-Wasser lösen und zum Hefeextrakt/ Maismehl-Gemisch hinzufügen; abschließend den 3%-igen Agar untermischen und erneut aufkochen.

(Hefeextrakt, Maismehl und Zuckersirup stammten aus Reformhaus)

2.6 Bakterien

Der Bakterienstamm für die Infektionsexperimente ist in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tab. 2.11: der verwendete Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
<i>Erwinia carotovora</i> <i>carotovora</i> (Ecc 2141, Ecc-15)		Dr. Marion LE SAUX; CFBP ¹ , Beaucouzé, Frankreich

¹Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, UMR de Pathologie Végétale (INRA-INH-Universität d'Angers) Beaucouzé, Frankreich

2.7 *Drosophila*-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die verschiedenen Experimente unterschiedliche transgene *Drosophila*-Stämme eingesetzt. Die Auflistung dieser Fliegenstämme erfolgt nach Verwendungszweck in alphabetischer Reihenfolge in Tabelle 2.12. Aufgeführt sind in dieser Tabelle für die einzelnen Stämme die Bezeichnung, der Genotyp und der Spender. Als Spender kamen einzelne Labore oder so genannte *Drosophila*-Stammsammlungen in Frage. Anmerkungen und Erläuterungen zu den verschiedenen transgenen Stämmen und deren Konstrukten befinden sich in den dazugehörigen Unterkapiteln der Einleitung bzw. im Ergebnisteil.

Tab. 2.12: die verwendeten *Drosophila*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Quelle/Spender
Wildtypstämme		
Canton-S	w	Bloomington
5905	w[1118]	Bloomington
GFP-Reporterstämme		
Drosocin::GFP	w; droc-gfp-drom	Tzou <i>et al.</i> , 2000
Drosomycin::GFP	yw (P(w ⁻ , drom-gfp)D4, P(ry ⁺ , dipt-lacZ) (162:7)2	Tzou <i>et al.</i> , 2000
Metchnikowin::GFP	Pw ⁺ /Pw ⁺ (II)metch-gfp-dromA1	Tzou <i>et al.</i> , 2000
Gal4-Stämme		
NP2610	w[*]; P{GawB}NP2610 / CyO	DGRC ²
PPK4	yw67c23; ppk4-Gal4; +/+	Liu <i>et al.</i> , 2003
Gal80-Stämme		
7017	w[*]; P{tubP-Gal80[ts]}2	Bloomington
UAS-Effektorstämme		
Cam 2.1	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-Cameleon 2.1}82	Fiala A., Julius-Maximilians- Universität Würzburg
GS1608	y[1] w[67c23] P{w[+mC]=GSV1} PGRP- LE[GS1068]/Binsinscy	Takehara <i>et al.</i> , 2002
UAS-PGRP-LE	P{GSV1}PGRP-LE ^{GS1068}	Takehara <i>et al.</i> , 2002

UAS-foxo	y ¹ w [*] , P{UAS-foxo.P}2	Bloomington
UAS-foxo, GFP	w[1118]; P{UAS-foxo-gfp}	vorliegende Arbeit
UAS-PGRP-LCx	yw; P{GT1}PGRP-LC ^{BG00650}	Choe <i>et al.</i> , 2002
Doppelbalancer-Stämme		
CyO; TM2/TM6(B) (3704)	w ⁻ ; Bl/CyO;TM2/TM6(B)	Lindsley und Zimm, 1992 Klämbt C. unveröffentlicht
CyO; TM2/TM6(B)	w ⁻ ; Sp/CyO P [elav-lacZ,ry ⁺]; TM2/TM6B P[ubx-lacZ,w ⁺]	Lindsley und Zimm, 1992 Klämbt C. unveröffentlicht

²*Drosophila* Genetic Resource Center

2.7.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen

Die Aufzucht und Haltung der Fliegenstämme findet in Kulturröhrchen mit Ceaprenstopfen bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% statt. Als Futtermedium dient das *Drosophila*-Standardmedium, zusammengesetzt aus Maismehl, Zuckersirup, Trockenhefe und Agar (2.5). Um das mikrobielle Wachstum zu verhindern, wird dem Medium in der Regel sowohl 6,4 ml Propionsäure (40%) als auch 6,0 ml Nipagin (10%) zugesetzt.

Das Umsetzen der adulten Tiere in neue Kulturröhrchen findet spätestens nach 14 Tagen statt. In der Regel werden dazu die adulten Tiere mit Stickstoff betäubt und mindestens 20-30 adulte Tiere in neue Kulturröhrchen überführt.

2.7.2 Kreuzungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Kreuzungen mit verschiedenen transgenen Fliegenstämmen durchgeführt. Der Kreuzungsansatz bestand grundsätzlich aus mindestens drei Tage alten, jungfräulichen Weibchen des Treiberstamms und drei Tage alten Männchen des UAS-Effektorstamms. Die Haltung der adulten Tiere zur Eiablage und die Anzucht der F1-Generation erfolgten auf *Drosophila*-Standardmedium in Kulturröhrchen bei 25°C (2.7.1).

2.8 Infektionsversuche

2.8.1 Kultivierung von *Erwinia carotovora carotovora*

Die Infektionsversuche wurden ausschließlich mit dem Bakterienstamm *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc 2141*, *Ecc-15*) durchgeführt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in TB-Medium über Nacht (20h) im Schüttler bei 37°C und 220 rpm. Für die Infektionsversuche wurde die Übernachtskultur sedimentiert, vom Überstand getrennt und mit 1xPBS auf eine optische Dichte von circa 100 (2 x 10¹¹ Zellen pro ml) eingestellt.

2.8.2 Infektionsversuche mit *Erwinia carotovora carotovora*

Die Infektionsversuche mit *Erwinia carotovora carotovora* wurden mit frühen L3-Larven des Reporterstamms Drosomycin::GFP durchgeführt (Ferrandon *et al.*, 1998). Für diesen Versuchsansatz wurden in einem 2,0 ml Eppendorf-Röhrchen etwa 200 L3-Larven mit 400 µl autoklavierter Banane und 200 µl konzentrierter Bakterienkultur ($OD_{\approx 100}$) versetzt. Als Kontrolle diente ein Versuchsansatz, der statt der konzentrierten Bakterienkultur 200 µl 1xPBS enthielt. Die Inkubation dieser Versuchsansätze erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Anschließend wurden die Versuchsansätze auf Standardmedium überführt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert (Basset *et al.*, 2000). Am Folgetag wurden die L3-Larven vom Kulturmedium getrennt, mit 1xPBS gewaschen, auf Eis betäubt und unter dem Fluoreszenzstereomikroskop beobachtet.

2.9 Präparation der Tracheen

Für die Präparation der Tracheen wurden L3-Larven des Kontroll- bzw. Versuchsansatzes einzeln auf Blockschälchen überführt. Die Präparation der einzelnen Tiere erfolgte stets in eisgekühltem 1xPBS bei einer 25-50-fachen Vergrößerung unter dem Stereomikroskop. Zuerst wurden mit Hilfe zweier Pinzetten der gesamte Kopf von der Larve abgetrennt und der Darm bzw. die Malpighischen Gefäße aus dem Tier entfernt. Anschließend wurden die beiden posterior gelegenen Stigmen freigelegt, die Larve ventral mit einer Pinzette fixiert und die Stigmen sowie die mit ihnen verbundenen Haupt- und Nebenäste mit Hilfe einer weiteren Pinzette aus dem restlichen Tier herausgezogen. Sämtliche adhärierende, nicht tracheale Gewebereste, wie z.B. Fettkörpergewebe, wurden vor der Überführung der Tracheen in 350 µl Lysispuffer (RA1-Puffer) entfernt. Abschließend wurden die Tracheen (etwa 20 Paare) mit Hilfe eines Glashomogenisators homogenisiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.10 Gewinnung der Gesamt-RNA

2.10.1 Isolierung und Reinigung der RNA

Die Isolierung und Reinigung der RNA aus den Tracheen (2.9) erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel. Hierbei wurde sich exakt an das vorgeschriebene Versuchsprotokoll (Protokoll 5.1) gehalten, mit Ausnahme der Inkubationszeit für die DNase, die auf 30 Minuten ausgeweitet wurde.

2.10.2 Fällung der RNA

Aufgrund der geringen RNA-Menge wurden die eluierten Proben mit 1/10 Volumeneinheiten 3 M Natriumazetat pH 5,5 und 2,5 Volumeneinheiten absolutem Ethanol gefällt. Als Fällhilfe diente Glykogen, das in einer Endkonzentration von 20 µg/ml eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 14 000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Um eine saubere RNA-Reinigung zu gewährleisten, wurde das Präzipitat nach Abnahme des Überstands mit 500 µl 70%-igem Ethanol versetzt und für 15 Minuten bei 4°C und 14 000 rpm gewaschen. Das saubere Präzipitat wurde im Anschluss für einige Minuten luftgetrocknet, in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis auf weiteres bei -80°C gelagert.

Bevor weitere molekularbiologische Experimente durchgeführt werden konnten, wurde der RNA-Gehalt der einzelnen Proben photometrisch im Nanodrop bestimmt (2.10.3).

2.10.3 Bestimmung der RNA bzw. DNA-Konzentration im Nanodrop

Die RNA bzw. DNA-Konzentration der verschiedenen Proben wurde im Nanodrop ND-1000 UV/VIS Spektralphotometer bestimmt, der gegenüber den üblich verwendeten UV/VIS Spektralphotometern den Vorteil hat, dass nur eine geringe Menge des Probenvolumens (1 µl) für die Messung verwendet werden muss. Zur Bestimmung der RNA bzw. DNA-Konzentration wurde wie für Nukleinsäuren üblich die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Anhand des molaren Absorptionskoeffizienten $A_{260} = 1$, der bei einer Schichtdicke von $d = 1$ cm einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml bzw. einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml entspricht, wurde die Ist-Konzentration der Nukleinsäure-Probe berechnet. Um über den Reinheitsgrad der Probe eine Aussage treffen zu können, wurde die Protein-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Das Verhältnis aus OD_{260} zur OD_{280} zeigte den Reinheitsgrad der Proben an und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.11 cDNA-Synthese

Für die weiteren anstehenden molekularbiologischen Experimente war die Etablierung von cDNA-Banken zwingend notwendig. Die Synthese der cDNA-Banken erfolgte aufgrund der geringen Menge an mRNA in den einzelnen Proben mit der so genannten CapFinder-Methode (Schmidt *et al.*, 1999). Diese Methode umfasst den ersten Schritt der cDNA-Synthese, die so genannte Erststrangsynthese und garantiert eine erfolgreiche reverse Transkription der gesamten mRNA.

Bei der CapFinder-Methode wird als Reverse Transkriptase eine M-MLV (*moloney murine leukemia virus*) Reverse Transkriptase verwendet, die die gesamte mRNA von einem Oligo-d(T)-Primer aus in cDNA umschreibt und die Eigenschaft besitzt, zwei bis vier Cytosinreste an das 3'-Ende der synthetisierten cDNA anzuhängen, sobald die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA erreicht wird. Diese zusätzlichen Cytosinreste gehen mit dem CapFinder-Primer über Guaninreste stabile Basenpaarungen ein, da dieser an seinem 3'-Ende Oligo(rG)s besitzt. Die restliche Sequenz des CapFinder-Primers dient der Reversen Transkriptase als neue Matrize (*template switch*), wodurch die CapFinder-Primersequenz vollständig repliziert und in die cDNA-Sequenz am 3'-Ende integriert werden kann.

Dieser Erststrangsynthese schließt sich der zweite Schritt der cDNA-Synthese, die so genannte Zweitstrangsynthese, an, durch die das gesamte Transkriptom unter Verwendung der integrierten CapFinder-Primersequenz amplifiziert werden kann. Demnach besteht die cDNA-Synthese aus zwei Schritten, der so genannten Erststrangsynthese und der sich anschließenden Zweitstrangsynthese (Abb. 2.1).

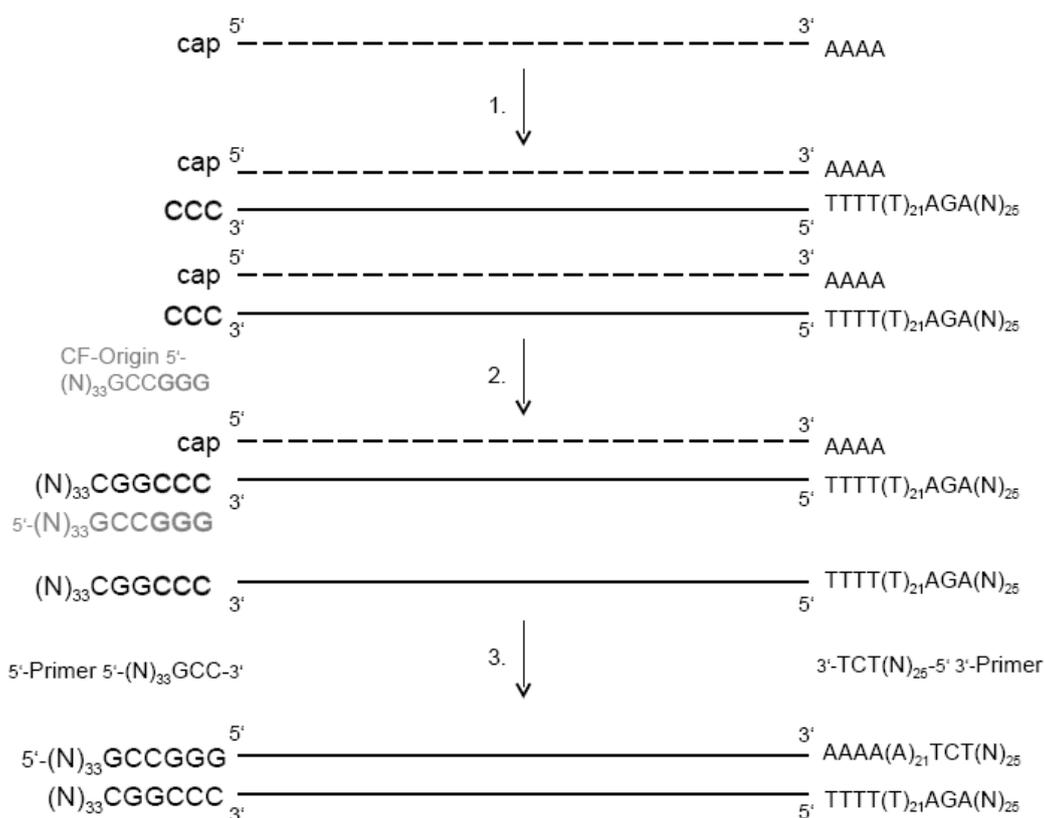


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Erst- und Zweitstrangsynthese der cDNA unter Verwendung der so genannten CapFinder-Methode. Die Schritte 1 und 2 der Abbildung umfassen die Einzelstrangsynthese der cDNA, wohingegen Schritt 3 die Synthese des Zweitstrangs darstellt. Grau unterlegt in Schritt 1 und 2 ist der eingesetzte CapFinder-Primer der Erststrangsynthese. Weitere ausführlichere Erklärungen zu dieser Abbildungen befinden sich im Text unter 2.11. (Modifiziert nach: Schramm *et al.*, 2000).

2.11.1 Erststrangsynthese

Für die Erststrangsynthese wurden abhängig von der Ausbeute an gesamt-RNA zwischen 20-40 ng RNA eingesetzt. Die Durchführung der Synthese erfolgte mit den Kit-Komponenten der SuperScript III Reversen Transkriptase, Manganchlorid und den entsprechenden Erststrangsyntheseprimern Oligo-dT7-I und CapFinder-Origin-rG bzw. SP6-rG. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde parallel zu jeder Probe ein Kontroll-Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase (minus RT) angesetzt. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese umfasste ein Volumen von 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz für Erststrangsynthese:

2,0 µl 5x Erststrangpuffer
 1,0 µl DTT (100 mM)
 0,2 µl MnCl₂ (40 mM)
 1,0 µl dNTPs (10 mM)
 0,5 µl Oligo-dT7-I (10 pmol/µl)
 0,5 µl CapFinder-Origin-rG / Sp6-rG (10 pmol/µl)
 0,25 µl RNase Inhibitor (10 Units)
 0,5 µl Superscript III (100 Units)
 20-40 ng RNA
 auf 10 µl mit Aqua bidest

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für eine Stunde im Hybridisierungsofen bei 42°C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die einzelsträngige cDNA aufgrund ihrer Instabilität bei -80°C gelagert.

2.11.2 Zweitstrangsynthese

Bei der Zweitstrangsynthese der cDNA wird die einzelsträngige cDNA (ss-cDNA) mittels PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert und in doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) umgeschrieben. Die Vermehrung der ss-cDNA ist aus zwei Gesichtspunkten nicht zu umgehen. Zum einen ist die ds-cDNA weitaus stabiler als die ss-cDNA und zum anderen ist

die Menge an trachealer ss-cDNA zu gering, um weitere molekularbiologische Experimente wie z.B. die quantitative PCR erfolgreich durchführen zu können.

Bei der verwendeten Methode für die Zweitstrangsynthese handelt es sich um eine so genannte LA-PCR (*long and accurate PCR*; Barnes, 1994). Diese Form der PCR wird dann angewendet, wenn die gesamte ss-cDNA amplifiziert und eine erhöhte Ausbeute an „full length“-Klonen erzielt werden soll. Verwendet werden bei dieser PCR die bei der Erststrangsynthese integrierten Primersequenzen des Oligo-dT-Primers bzw. des CapFinder-Primers. Der PCR-Ansatz für die LA-PCR umfasste ein Volumen von 50 µl und setzt sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz für Zweitstrangsynthese:

5,0 µl 10x Advantage PCR-Puffer
8,0 µl dNTPs (10 mM)
1,0 µl Oligo-dT7-II (10 pmol/µl)
1,0 µl CapFinder-Origin-PCR/ SP6-PCR (10 pmol/µl)
0,5 µl Taq/PWO Polymerase (20:1)
1,0 µl ss-cDNA
auf 50 µl mit Aqua bidest

Die LA-PCR wurde im Robocycler Gradient 96 oder im Mastercycler durchgeführt und mit dem nachfolgenden Reaktionsprofil amplifiziert. Die Anzahl der Zyklen während der ds-cDNA-Synthese lag bei durchschnittlich dreißig Stück. Von dieser Zyklenzahl wurde nur dann abgewichen, wenn sich nach der Gelanalyse der LA-PCR-Proben herausstellte(2.11.3), dass die Ausgangsmenge an ss-cDNA in den verschiedenen Proben stark variierte. Eine Mengengleichung zwischen eigentlicher Probe und Kontrollprobe war daher notwendig, bevor das Material für weitere molekularbiologische Experimente eingesetzt werden konnte.

Reaktionsprofil:

Denaturierung:	95°C 1 min	
ds-cDNA Synthese:	95°C 20 sek	(Denaturierung)
(Ø 30 Zyklen)	58°C 20 sek	(Primeranlagerung)
	72°C 2 min 30 sek	(Elongation)
Nachsynthese:	72°C 5 min	

2.11.3 Analytische Gelelektrophorese

Die Analyse der Zweitstrangsynthese erfolgte in Agarosegelen mittels Elektrophorese. Diese Methode wird üblicherweise eingesetzt, um Nukleinsäuren nach ihrer molekularen Größe aufzutrennen. Das Agarosegel stellt dabei eine Art engmaschiges Netz mit gleicher Porengröße dar, in dem sich die Nukleinsäuren in Richtung des elektrischen Feldes bewegen. Die Migrationsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren im Gel ist abhängig von der Konzentration des verwendeten Agarosegels und der molekularen Größe der einzelnen Nukleinsäuren.

Die PCR-Proben der Zweitstrangsynthese wurden in einem 1%-igen Agarosegel analysiert. Hierfür wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1xTBE Puffer aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in die Gießkammer gefüllt. Nach Aushärtung der Agarose wurden 5 µl der LA-PCR-Proben mit 1 µl 6x Ladepuffer versetzt und gemeinsam mit 2 µl einer 1 kb Leiter, die als DNA-Größenstandard diente, auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1xTBE bei einer Spannung von durchschnittlich 90 Volt in der Gelelektrophoresekammer. Da Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert, konnten die PCR-Proben in einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und somit ausgewertet werden.

2.11.4 Reinigung der ds-cDNA

Für weitere molekularbiologische Experimente wie RT-PCR, qPCR oder cRNA-Synthese musste die ds-cDNA aus der Zweitstrangsynthese gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte mit Säulen des JETQUICK PCR Purification Spin Kits. Um ausreichend Material für die Folgeexperimente zu erhalten, wurden mindestens drei PCR-Ansätze pro Probe auf eine Säule aufgetragen, gewaschen und mit Aqua bidest eluiert. Für die cRNA-Synthese wurden die Proben mit der unter 2.10.2 beschriebenen Methode gefällt, gewaschen und das Präzipitat in

10 µl aufgenommen. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte im Nanodrop (2.10.3).

2.12 RT-PCR

RT-PCR steht für Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und ist die Kombination aus zwei Methoden der Molekularbiologie, um die Expression von spezifischen Genen in Zellen oder Geweben nachzuweisen. Der Expressionsnachweis der einzelnen Gene erfolgte im Rahmen meiner Arbeit nicht wie üblich mit einzelsträngiger cDNA aus der Reversen Transkription sondern aufgrund der Materialknappheit mit der amplifzierten cDNA aus der Zweitstrangsynthese (2.11.2).

Die PCR-Reaktion wurde nach Mullis *et al.* durchgeführt und erlaubte aufgrund der sehr ähnlich gewählten Schmelztemperaturen der Primer und der geringen Größe der PCR-Produkte ein nahezu einheitliches Reaktionsprofil (Mullis *et al.*, 1992). Um Kontaminationen mit nicht trachealem Gewebe auszuschließen, wurden zusätzlich Primerpaare für Hämocyten- bzw. Fettkörper-spezifische Gene eingesetzt. Diese Proben fungierten daher als Positivkontrolle für die jeweiligen Gewebe, wohingegen als Negativkontrolle eine cDNA-Probe eingesetzt wurde, deren Erststrangsynthese ohne Reverse Transkriptase (minus RT) durchgeführt wurde. Der PCR-Ansatz für die RT-PCR umfasste ein Volumen von 25 µl und setzte sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz für RT-PCR

2,5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer S [einschließlich MgCl₂ (15 mM)]
 0,5 µl dNTPs (10 mM)
 0,5 µl Sense-Primer (10 pmol/µl)
 0,5 µl Antisense-Primer (10 pmol/µl)
 0,25 µl Taq Polymerase (1,25 Units)
 1,0 µl ds-cDNA
 auf 25 µl mit Aqua bidest

Die RT-PCR wurde im Robocycler Gradient 96 oder im MasterCycler durchgeführt und mit dem nachfolgenden Reaktionsprofil amplifiziert.

Reaktionsprofil:

Denaturierung:	95°C	1 min
Synthese:	95°C	30 sek (Denaturierung)
(Ø 35 Zyklen)	55°C	30 sek (Primeranlagerung)
	72°C	1 min (Elongation)
Nachsynthese:	72°C	5 min

Die Analyse der RT-PCR erfolgte aufgrund der geringen Größe der PCR-Produkte in einem 2%-igen Agarosegel nach dem unter 2.11.3 aufgeführten Standardprotokoll. In diesem Fall diente eine 50 bp Leiter als DNA-Größenstandard. Anhand dieser Leiter konnten die molekularen Größen der einzelnen PCR-Produkte bestimmt und mit den postulierten molekularen Größen aus den Primer-Datenbanken verglichen werden.

2.13 Real-time qPCR

Eine Fortentwicklung der PCR ist die quantitative PCR, kurz qPCR, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR-Methode beruht und zusätzlich die Möglichkeit bietet, das amplifizierte Material zu quantifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine besondere Form der qPCR verwendet, die so genannte Real-time qPCR, die sich dadurch auszeichnet, dass der in die doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff am Ende jedes Syntheszykluses gemessen wird. Sie nutzt daher im Gegensatz zur „endpoint qPCR“ die exponentielle Phase der PCR und ist somit eine sehr sensible und reproduzierbare qPCR-Methode.

Die Quantifizierung der DNA in den qPCR-Proben erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1, der während der Elongationsphase der PCR in die doppelsträngige DNA interkaliert bzw. eingebaut wird. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes ist nach dem Einbau messbar und proportional zur amplifizierten DNA-Menge.

Die Fragmentspezifität der einzelnen PCR-Produkte und somit die Identität der Proben wurde anhand der Schmelzkurven bestimmt. Bei dieser Analyse wurden die doppelsträngigen DNA-Moleküle nach Ablauf der PCR wieder in einzelsträngige DNA-Moleküle zerlegt, indem die Temperatur schrittweise von 58°C auf 95°C erhöht wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Basenzusammensetzungen besaß jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur, die von unspezifischen Produkten wie z.B. Primerdimeren abwich und somit die Spezifität des PCR-Produkts sicherstellte.

Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte mittels relativer Quantifizierung, was die Verwendung eines Normalisierungsgens sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der zu untersuchenden Gruppe voraussetzt. Grundsätzlich fungierte als Normalisierungsgen das Haushaltsgen Aktin 42A. Für die relative Quantifizierung der Proben wurden die CT-Werte (*cycle threshold*) der einzelnen Proben herangezogen, die ein Maß für den signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität zu Beginn der exponentiellen Phase darstellen. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgte mit der delta-delta CT-Methode (Pfaffl, 2001) und wurde als n-fache Expression angegeben.

Für das Normalisierungsgen und das eigentlich zu untersuchende Gen wurden pro Gruppe grundsätzlich Duplikate angesetzt. Als Negativkontrolle fungierte ein Reaktionsansatz ohne DNA-Matrix mit den jeweiligen Primern. Der PCR-Ansatz für die Real-time qPCR umfasste ein Volumen von 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz pro Kapillare für Real-time qPCR

10 µl SYBR Premix Ex TaqTM (2 x)
 1 µl Sense-Primer (5 pmol/µl)
 1 µl Antisense-Primer (5 pmol/µl)
 1 µl ds-cDNA
 auf 20 µl mit Aqua bidest

Die Real-time qPCR wurde unter Verwendung des LightCycler Kapillarsystems im Lightcycler durchgeführt. Aufgrund der sehr ähnlich gewählten Schmelztemperaturen der Primer und der geringen Größe der PCR-Produkte konnte ein einheitliches Reaktionsprofil für die Real-time qPCR gewählt werden.

Reaktionsprofil der Real-time qPCR

Denaturierung:	95°C 30 sek	
Synthese:	95°C 10 sek	(Denaturierung)
(Ø 40 Zyklen)	58°C 15 sek	(Primeranlagerung)
	72°C 15 sek	(Elongation)
Schmelzkurve:	95°C 15 sek	} bei einer Heizrate von 0,1°C/sek
	58°C 15 sek	

2.14 DNA-Mikroarray

Für die Mikroarray-Experimente wurde der kommerziell erhältliche Oligonukleotid-Chip Oligo_14k1 eingesetzt, der alle 14 000 *Drosophila*-Gene enthält und somit das gesamte Genom abdeckt. Die Gene dieses Chips sind als 62-65mere in 48 (4x12) Subarrays angeordnet und stets in doppelter Ausführung nebeneinander auf dem Chip vertreten. Zusätzlich enthält dieser Oligonukleotid-Chip eine Reihe von internen und externen Kontrollen, von denen die so genannten MSPs (*multiple sample pools*) als interne Kontrollen für die Auswertung herangezogen wurden. Die MSPs umfassen einen Gesamtpool an verschiedenen *Drosophila*-Transkripten und wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in die letzte Reihe jedes Subarrays gedruckt.

Für die Mikroarray-Experimente wurde auf das duale Farben-System der Mikroarrays (*two-colour microarrays*) zurückgegriffen, bei dem die Hybridisierung der beiden zu vergleichenden Proben (z.B. infiziertes Gewebe versus Kontrollgewebe) auf ein und demselben Chip erfolgt. Als Sonden wurden RNA-Sonden eingesetzt, die durch cRNA-Synthese aus der Zweitstrangsynthese (2.11.2) hervorgingen. Die Synthese der cRNA erfolgte grundsätzlich mithilfe einer T7-DNA-abhängigen RNA-Polymerase, die die komplementären RNA-Stränge zu den Oligomeren des Chips erzeugt. Da fluoreszenzmarkierte Sonden für die Hybridisierung verwendet werden sollten, wurde die cRNA-Synthese mit modifizierten UTPs, so genannten aminoallyl-UTPs (aaUTPs) durchgeführt, die über ihre aminoallyl-Gruppen einen indirekten Einbau der später verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 bzw. Cy5 ermöglichten.

2.14.1 cRNA-Synthese

DNA-abhängige RNA-Polymerasen sind in der Lage ds-cDNA in einzelsträngige RNA umzuschreiben. Eine erfolgreiche Transkription kann allerdings nur dann stattfinden, wenn die Promotorsequenz der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in der ds-cDNA integriert ist. In der Regel erfolgt der Einbau dieser Promotorsequenz während der Erststrangsynthese über den CapFinder-Primer oder Oligo-dT-Primer. Da die Oligomere des Oligonukleotid-Chips aus Sense-Proben (5'→3') bestehen und für die Hybridisierung Antisense-Proben (3'→5') eingesetzt werden müssen, war der Einbau einer Promotorsequenz über den Oligo-dT-Primer in die ss-cDNA bzw. ds-cDNA zwingend notwendig. Demnach wurden sämtliche cDNA-Synthesen mit dem Oligo-T7-I-Primer durchgeführt, der zusätzlich zum Poly(T)-Schwanz an seinem 5'-Ende eine T7-Promotorsequenz besitzt. Unter Verwendung einer T7-RNA-

Polymerase in der cRNA-Synthese konnten somit die für eine Hybridisierung notwendigen Antisense-Proben erzeugt werden.

Die cRNA-Synthese wurde mit dem MEGAscript High Yield T7 Transcription Kit durchgeführt und enthielt zusätzlich zu den unten aufgeführten Komponenten die bereits erwähnten modifizierten aaUTPs. Die eingesetzte Menge an gefällter ds-cDNA lag pro cRNA-Probe durchschnittlich zwischen 200-300 ng (2.11.4). Abhängig von der Anzahl der geplanten Mikroarray-Hybridisierungen wurde ein einfacher (20 µl) oder doppelter Reaktionsansatz (40 µl) angesetzt.

Einfacher Reaktionsansatz für cRNA-Synthese

2,0 µl ATP (75 mM)
2,0 µl CTP (75 mM)
2,0 µl GTP (75 mM)
1,0 µl UTP (75 mM)
1,5 µl aaUTP (50 mM)
2,0 µl 10x T7-Reaktionspuffer
2,0 µl T7-RNA-Polymerase
200-300 ng ds-cDNA
auf 20 µl mit RNase-freiem Wasser

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für zwölf bis maximal 14 Stunden im Hybridisierungsofen bei 37°C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die aacRNA aufgrund ihrer Thermosensibilität bei -80°C gelagert.

2.14.2 Reinigung, Gelanalyse und Fällung der aacRNA

Die Reinigung der aacRNA aus der *in vitro* Transkription erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit. Hierbei wurde sich exakt an das vorgeschriebene Versuchsprotokoll (Protokoll 5.9) gehalten, mit Ausnahme des Elutionsvolumens, das bei 100 µl lag.

Die Analyse der aacRNA-Proben erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel (2.11.3) ohne Zusatz von denaturierenden Detergenzien. Hierfür wurden 2,5 µl der aacRNA-Probe mit 5 µl 2x Ladepuffer versetzt und auf 10 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Als Standard diente eine 1 kb DNA-Leiter, von der 2 µl für den Lauf eingesetzt wurden.

Nach der Gelanalyse wurden die Proben mit der unter 2.10.2 aufgeführten Methode gefällt, gewaschen und das Präzipitat in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Abschließend wurde der RNA-Gehalt der aacRNA-Proben im Nanodrop (2.10.3) photometrisch bestimmt und die Proben bis auf weiteres bei -80°C gelagert.

2.14.3 Markierung der aacRNA mit den Fluorophoren Cy3 bzw. Cy5

Die aacRNA-Proben wurden grundsätzlich mit den Fluorophoren Cy3 bzw. Cy5 markiert. Der indirekte Einbau dieser Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte stets unter alkalischen Bedingungen, da die Farbstoffe im sauren bzw. neutralen Bereich auch mit Wasser reagieren können. Weiterhin unterstützt dieser alkalische pH-Wert die Ausbildung der so genannten Succinimidylesterasebindung, die sich zwischen der Succinimidyl-Gruppe des Farbstoffs und der aminoallyl-Gruppe der aacRNA, genauer gesagt der aaUTPs, ausbildet. Um die Markierungseffizienz der aacRNA zu erhöhen, bestand der Reaktionsansatz zusätzlich aus 50% sterilem DMSO (t'Hoen *et al.*, 2003), in dem die Farbstoffe auch gelöst wurden.

Für die Markierung der aacRNA Probe wurden pro Hybridisierung durchschnittlich 10 µg aacRNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz umfasste stets ein Volumen von 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz für Markierung

3,33 µl aacRNA (Ø 10 µg)
6,67 µl NaHCO₃ (0,3 M, pH 9,0)
10,0 µl Cy3/ Cy5 (in DMSO gelöst)

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden im Dunkeln inkubiert.

2.14.4 Reinigung und Fällung der markierten aaRNA

Die Reinigung der Cy3 bzw. Cy5-markierten aacRNA erfolgte mit dem vorgeschriebenen Versuchsprotokoll (Protokoll 5.9) des NucleoSpin RNA II Kits. Abgeändert wurden lediglich die Waschschritte und das Elutionsvolumen des RNase-freien Wassers. So wurden die Proben statt mit RA3-Puffer dreimal mit 80%-igem Ethanol gewaschen und anschließend mit 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Nach der Reinigung wurden die Proben mit der unter 2.10.2

aufgeführten Methode gefällt, gewaschen und das Präzipitat in 5 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.14.5 Bestimmung der Markierungseffizienz

Die Qualität der fluoreszenzmarkierten aacRNA-Proben ist für eine erfolgreiche Mikroarray-Hybridisierung von entscheidender Bedeutung. Ausschlaggebend für eine gute Qualität der Proben ist die Markierungseffizienz, die die Anzahl der eingebauten Farbstoffmoleküle angibt und sich aus der RNA und Farbstoff-Absorption berechnen lässt. In der Regel besitzen die aacRNA-Proben eine gute Markierungseffizienz, wenn jede zwölfte bis 20 Base mit einem Fluorophor markiert ist.

Die Ermittlung der RNA bzw. Farbstoff-Absorption erfolgte im Nanodrop unter Verwendung der Mikroarray-Software. Die Absorptionsmessung fand für die einzelnen Fluorophore bei ihrer charakteristischen Emissionswellenlänge statt. Demnach wurde die Absorption für Cy3-markierte Proben bei einer Wellenlänge von 570 nm und für Cy5-markierte Proben bei einer Wellenlänge von 670 nm bestimmt. Die Absorptionsmessung der aacRNA erfolgte hingegen, wie für Nukleinsäuren üblich, bei 260 nm.

Für die Messung wurden 0,2 µl Probe (2.14.4) 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und im Nanodrop bei der entsprechenden Wellenlänge detektiert. Im Anschluss wurde die Markierungseffizienz anhand des Beer-Lambert Gesetzes unter Zuhilfenahme der Korrekturfaktoren für 260 nm (Cy3: 0,03; Cy5: 0,00) und der Extinktionskoeffizienten (ϵ_{Cy3} : 150,000 cm⁻¹M⁻¹; ϵ_{Cy5} : 239,000 cm⁻¹M⁻¹; $\epsilon_{\text{RNA-Base}}$: 8250 cm⁻¹M⁻¹) berechnet.

Korrekturberechnung:

$$A_{\text{Base}} = A_{260} - (A_{\text{Farbstoff}} \times \text{KF}_{260})$$

Berechnung der Markierungseffizienz

$$\text{Base : Farbstoff} = (A_{\text{Base}} \times \epsilon_{\text{Farbstoff}}) / (A_{\text{Farbstoff}} \times \epsilon_{\text{Base}})$$

Aufgrund der unterschiedlichen Konfiguration der Cy3 bzw. Cy5-Farbstoffe kam es während der Markierung der aacRNA stets zu ungleichen Einbauraten der Farbstoffe, die sich auch in der Markierungseffizienz niederschlugen. Um eine Verfälschung der Mikroarray Daten zu

verhindern, wurden vor der Hybridisierung die Farbstoffkonzentrationen der Proben aneinander angeglichen.

2.14.6 Hybridisierung

Der Reaktionsansatz für die Hybridisierung setzte sich stets aus den Cy3 bzw. Cy5-markierten Proben, den Blockierungsreagenzien und der Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb zusammen. Als Blockierungsreagenzien wurden Lachs-Sperma-DNA und Hefe-tRNA eingesetzt und im Hybridisierungspuffer verdünnt. Der Ansatz umfasste ein Volumen von nahezu 60 µl und setzte sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz für Hybridisierung

54,0 µl DIG Easy Hyb
2,88 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml)
2,88 µl Lachs-Sperma-DNA (10 mg/ml)

Die verwendete Farbstoffmenge für die Hybridisierung lag durchschnittlich bei 150 bzw. 200 pmol pro Farbstoff. Für die Hybridisierung wurden die entsprechenden Mengen an Cy3 bzw. Cy5-markierten Proben (2.14.4) gemischt, mit RNase-freiem Wasser auf 2,5 µl aufgefüllt und mit 42,5 µl des oben aufgeführten Reaktionsansatzes versetzt. Im Anschluss wurde der Ansatz für zehn Minuten bei 65°C erhitzt und auf den Chip aufgetragen.

Die Hybridisierung des Mikroarrays wurde in der Hybridisierungskammer sciHYPChamber durchgeführt. Hierfür wurde dem Chip auf die bedruckte Oberfläche ein spezielles Deckglas der Größe 22x60 mm aufgelegt. Es sparte aufgrund von Stegen an seinen Längsseiten ein maximales Volumen von 45 µl zwischen Chip und Deckglas aus und erlaubte somit das Auftragen des gesamten Reaktionsvolumens. Abschließend wurden zum Schutz vor Austrocknung Chip und Deckglas mit einem wieder ablösbaren Kleber versiegelt und die Hybridisierungskammer verschlossen. Die Hybridisierung des Mikroarray-Chips erfolgte im Hybridisierungsofen bei 42°C über Nacht für maximal 15 bis 18 Stunden.

2.14.7 Waschen des Chips

Nach der Hybridisierung wurde der Kleber entfernt, das Deckglas in 1xSSC vom Chip abgelöst und der Chip für eine Stunde in 1xSSC gewaschen. Für die Stringenzwaschschritte

wurden unterschiedlich konzentrierte und temperierte SSC/Triton-X-100 Waschlösungen eingesetzt. Sie entfernten je nach Salzgehalt die Hybridisierungslösung und die schwach gebundenen Proben auf dem Chip.

Die einzelnen Waschschriffe wurden stets in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf einem Rundschüttler im Dunklen durchgeführt. Sie setzten sich zu folgendem Waschprotokoll zusammen.

1. Waschschriff: 2x 15 min in 1xSSC und 0,1% Triton-X-100 bei 60°C
2. Waschschriff: 2x 15 min in 0,1xSSC und 0,1% Triton-X-100 bei 37°C
3. Waschschriff: 1x 30 sek in 0,1xSSC

Nach dem Waschen wurde der Chip mit Aqua bidest abgspült, mit Stickstoff trocken geblasen und bis zum Einlesen im Dunklen gelagert.

2.14.8 Einlesen des Chips

Die Digitalisierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit dem GenePix™ 4000B Scanner bei einer Auflösung von 10 µm und einer Laserkraft von 100%. Die PMT-Werte für die Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenzkanäle wurden anhand der bereits erwähnten MSP-Signale (2.14) bestimmt, die als interne Kontrollen fungierten und für beide Kanäle eine sehr ähnliche Fluoreszenzintensität aufweisen sollten.

2.14.9 Bioinformatik

Die Auswertung der Primärdaten erfolgte mit der Mikroarray-Software GenePixPro 6.0 der Firma Molecular Devices. Dieses Programm wurde insbesondere für die Verknüpfung der generierten Fluoreszenzbilder mit dem Spot-Muster, für die Spot-Erkennung und für die Markierung bestimmter Hybridisierungssignale herangezogen.

Für die Hintergrundkorrektur der Hybridisierungssignale, die Normalisierung der Daten und das Filtern der Datensätze nach definierten Parametern (Anzahl der Signale, Mittelwert der log₂ Ratio, Kovarianz) wurde die Mikroarray-Software GeneTraffic™ 3.2-11 von Iobion verwendet. Anhand dieses Programms war die Annotierung der Gene und somit die Verknüpfung der „gespotteten“ Oligos mit ihrer Bezeichnung und Funktion möglich.

Die statistische Analyse der normalisierten Genetrafic-Daten erfolgte mit einer modifizierten Form des t-Tests anhand des SAM (*significance analysis of microarrays*) Programms (Tusher

et al., 2001). Die signifikant regulierten Gene eines Projekts wurden nach der Analyse als externe Datensätze erneut in Genetraffic eingelesen, mit den gefilterten Datensätzen abgeglichen und für die hierarchische Stammbaumanalysen (Cluster-Analysen) herangezogen. Die zweidimensionale graphische Darstellung der Stammbäume erfolgte ebenfalls mit Genetraffic. Um Genlisten verschiedener Mikroarray-Projekte miteinander vergleichen zu können, wurde auf das Internet-Programm GeneVene zurückgegriffen (<http://www.bioinformatics.org/gvenn/>) und die ausgewerteten Datensätze in Form von so genannten Venn-Diagrammen dargestellt (Pirooznia *et al.*, 2007). Nach der Auswertung eines Projektes wurden die Daten einzelner Mikroarray-Experimente (insgesamt vier Replikate einschließlich biologischer bzw. technischer) in der Datenbank GEO (*gene expression omnibus*; Edgar *et al.*, 2002) nach dem MIAME-Standard (*minimum information about a microarray experiment*) abgespeichert. Die Daten können auf der Oligo_14k-Plattform (GPL3603) eingesehen und abgerufen werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

2.15 Untersuchungen am Fluoreszenz-Stereomikroskop bzw. Mikroskop

Die Fluoreszenz-Stereomikroskopie fand im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie ihre Anwendung in der Visualisierung verschiedener GFP-markierter Proteine (*green fluorescent protein*), die in bestimmten Zell- oder Gewebetypen unterschiedlicher transgener Fliegenstämmen exprimiert wurden. Für die Visualisierung der GFP-markierten Proteine im ganzen Tier wurden die L1-L3-Larven auf Eis in 1xPBS betäubt und unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop der Firma Olympus analysiert.

Die Fluoreszenz-Stereomikroskopie fand im Rahmen dieser Arbeit weiterhin ihre Anwendung in der Visualisierung verschiedener Zellbestandteile der Tracheen, die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und somit sichtbar gemacht werden konnten. Um eine spezifische Anfärbung der Zellbestandteile zu ermöglichen, wurden die Tracheen aus den Larven präpariert (2.9), in 4%-igem Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert und in 1xPBS gewaschen. Die nachfolgende Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst-33258, während die Anfärbung des Zytoplasmas mit dem Farbstoff Calcein durchgeführt wurde, der in lebenden Zellen erst nach der enzymatischen Hydrolysierung durch ubiquitäre Esterasen zu fluoreszieren beginnt. Die Endkonzentration der Farbstoffe lag für Hoechst-33258 bei 2,5 µg/ml und für Calcein bei 4,0 µM. Für die Färbung wurden die vorfixierten Tracheen mit den verdünnten Farbstoffen versetzt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1xPBS gewaschen. Für die Analyse am Fluoreszenz-Stereomikroskop bzw. am Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss

wurden die Tracheen in 70%-igem Glycerin eingedeckelt. Die Aufnahme, Archivierung und Dokumentation der Bilder erfolgte am Stereomikroskop anhand der Cell[^]B-Software von Olympus und am Mikroskop anhand der AxioVision Rel. 4.6-Software von Zeiss.

2.16 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Herstellung der Präparate für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte nach Zissler & Sander und wurde in Kooperation mit Prof. H. Fehrenbach durchgeführt (Abteilung Pneumologie, Philipps-Universität Marburg; Zissler *et al.*, 1973). Für die EM-Präparation wurden frühe L3-Larven verwendet, die an ihrem anterior und posterior gelegenen Ende geöffnet waren und bis auf die Tracheen und einige Fettkörperlappen keine weiteren Organe mehr besaßen (2.9). Im ersten Schritt der EM-Präparation wurden die Larven mit 1,5%-igem Glutaraldehyd und 2%-igem Osmiumtetroxid in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,2) für 90 Minuten auf Eis fixiert (Fehrenbach *et al.*, 1994). Dann wurden die vorfixierten Larven in 0,1 M Cacodylatpuffer für 60 Minuten gewaschen (4x 15 min) und mit 1%-igem Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer für drei Stunden auf Eis nachfixiert. Anschließend wurden die Larven 30 Minuten (3x 10 min) in 0,1 M Cacodylatpuffer und weitere zehn Minuten (2x 5 min) in destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbung der Larven erfolgte *en bloc* über Nacht in einer zur Hälfte gesättigten Uranylacetat-Lösung. Die Präparate wurden nach der Färbung 20 Minuten (4x 5 min) mit destilliertem Wasser gewaschen, über eine steigende Azetonreihe (70%, 90%, 100% je zweimal für 10 min) entwässert und für eine Stunde in eine Azeton-Araldit Lösung (1:1) überführt, bevor sie über Nacht bei 4°C in reinem Araldit gelagert wurden. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Larven in frisches Araldit überführt und die Blöcke bei 60°C für drei Tage auspolymerisiert. Ultradünnschnitte wurden an einem Ultramikrotom E angefertigt, auf beschichtete Kupfernetze übertragen und für die Kontrastierung mit Bleizitrat gefärbt. Die anschließende Analyse der Ultradünnschnitte erfolgte mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM 900.

2.17 MALDI-ToF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight*) Massenspektrometrie-Experimente wurden in Kooperation mit Dr. C. Wegener (Abteilung Neurobiologie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Hierfür wurden die Tracheen nach der unter 2.9 aufgeführten Methode präpariert, mit 1xPBS gespült und auf den MALDI-Träger gelegt. Um Salze zu entfernen, wurden die angetrockneten Tracheen mit 1 µl Aqua

bidest gespült, die Flüssigkeit abgezogen und die Tracheen mit wenigen Nanolitern Matrix versetzt. Als Matrix diente eine verdünnte oder gesättigte rekristalline α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (CHCA), die in 60%-igem Methanol/ 0,1%-ige Trifluoressigsäure gelöst war. Die Analyse der Proben erfolgte an einem Voyager DE RP Massenspektrometer des Max-Planck-Instituts für Terrestrische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg.

3 Ergebnisse

3.1 Struktur und Organisation des larvalen Atemwegsepithels

Das larvale Atemwegsepithel der Taufliege *Drosophila melanogaster* ist im Vergleich zum Atemwegsepithel des Menschen sehr einfach strukturiert und organisiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von primären, sekundären und tertiären Ästen des Tracheensystems zeigen, dass das gesamte Atemwegsepithel aus offensichtlich homogenen Zellen aufgebaut ist, die nur eine einzige Zelllage bilden (Abb. 3.1). Diese Epithelschicht kleidet die luftgefüllten Hohlräume des Tracheensystems aus und umschließt damit einen, vom proximalen bis zum distalen Ende, enger werdenden Luftraum.

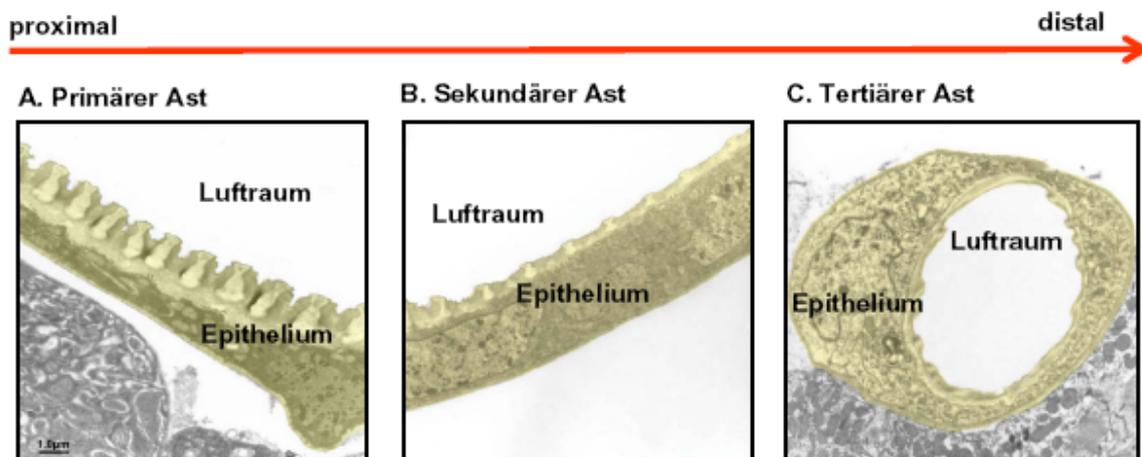


Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten primärer (A), sekundärer (B) und tertiärer (C) Äste des larvalen Tracheensystems des Wildtypstamms Canton-S. In diesen Abbildungen sind das Atemwegsepithel und das sich anschließende Fettkörpergewebe grau bzw. blau unterlegt. Die Ultradünnschnitte wurden in Kooperation mit Prof. H. Fehrenbach angefertigt und von ihm in der Elektronenmikroskopie dokumentiert.

3.2 Die Architektur des larvalen trachealen Immunsystems

Das Atemwegsepithel der Larve übernimmt als Barriereepithel eine wichtige Rolle in der epithelialen Immunabwehr von *Drosophila*. Um die Architektur des trachealen Immunsystems aufdecken zu können, ging ich zu Beginn meiner Arbeit der Frage nach, welche immun-relevanten Gene in den Epithelzellen exprimiert sind. In Betracht kamen insbesondere Gene, deren Produkte eine entscheidende Rolle bei der systemischen Immunantwort von *Drosophila* übernehmen und entweder an Prozessen und Mechanismen der Erkennung oder an der Signaltransduktion beteiligt sind. Der Expressionsnachweis dieser Gene wurde in der RT-PCR anhand amplifizierter cDNA erbracht, deren RNA aus larvalen

Tracheen des Fliegenstamms YW DD1 stammte. Um eine Kontamination mit nicht trachealen Zellen wie Hämozyten und Fettkörperzellen ausschließen zu können, wurden die Proben zuerst auf das Vorhandensein des Fettkörper-spezifischen Gens *P6* (Fat body protein 2) bzw. des Hämozyten-spezifischen Gens *hemese* überprüft. Erst wenn die entsprechenden Nachweise negativ ausfielen, wurden diese Proben für die weiteren RT-PCR Experimente eingesetzt.

3.2.1 Das Expressionsprofil der mustererkennenden Rezeptoren im larvalen Atemwegsepithel

Die mustererkennenden Rezeptoren umfassen, wie bereits erwähnt, zwei Gruppen von Rezeptoren, die maßgeblich an der PAMP-Erkennung beteiligt sind. Zu diesen beiden Gruppen zählen die 13 Peptidoglykanerkennungsproteine (PGRP) und die drei Gram-negativ-bindenden Proteine GGBP 1-3. Der Expressionsnachweis für die entsprechenden Rezeptorgene erstreckte sich auf das gesamte PGRP- bzw. GGBP-Repertoire und wurde mit trachealer cDNA durchgeführt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde als Kontrolle tracheale cDNA eingesetzt, deren Erststrangsynthese ohne Reverse Transkriptase durchgeführt wurde.

Die in Abbildung 3.2 dargestellten RT-PCR Ergebnisse zeigen, dass nahezu alle Gene, die mustererkennende Rezeptoren kodieren, im larvalen Atemwegsepithel exprimiert werden. Komplette vorhanden sind im trachealen Epithel die mRNAs aller membranständigen PGRPs (PGRP-L), einschließlich derjenigen für PGRP-LE und PGRP-LB. Von den kleinen löslichen PGRPs (PGRP-S) fehlen lediglich die Transkripte für PGRP-SB1 und -SB2 und von den Gram-negativ-bindenden Rezeptorgenen werden bis auf *gnbp2* alle *gnbp*-Gene konstitutiv exprimiert (*gnbp1* und *gnbp3*).

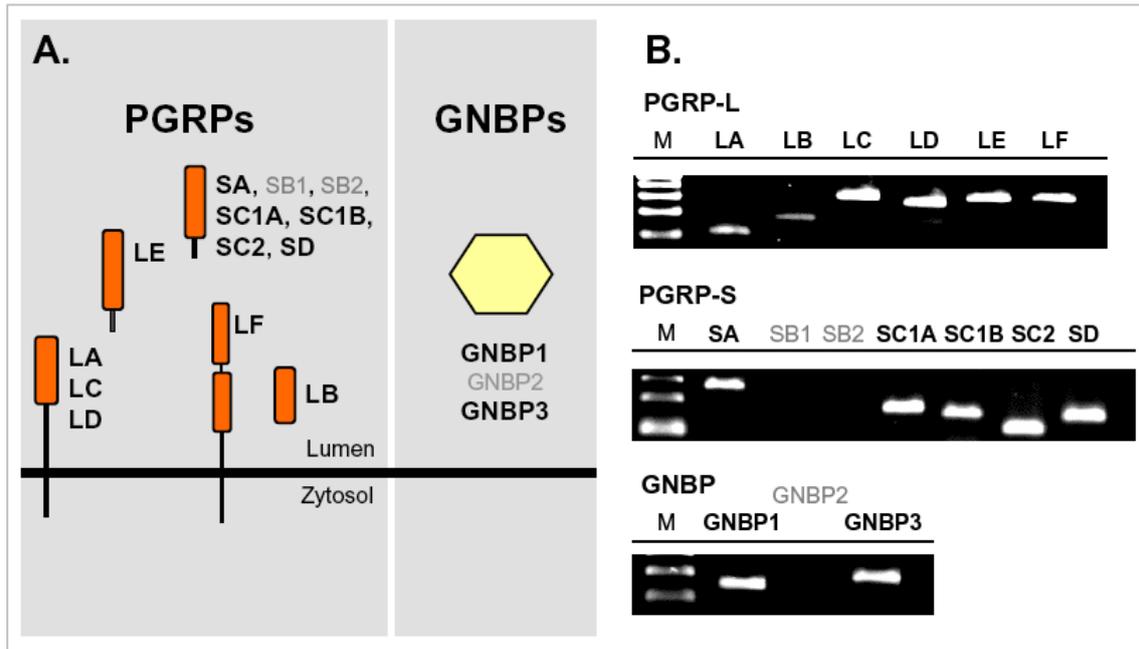


Abb. 3.2: Die mustererkennenden Rezeptoren des larvalen Atemwegsepithels. (A) Schematische Darstellung der mustererkennenden Rezeptoren PGRPs (links) und GNBPs (rechts). (B) Dokumentation der larvalen trachealen PRR-Genexpression anhand eines 2,0%-igen Agarosegels. Als Größenstandard diente ein 100 bp Marker (PGRPs: 400, 300, 200, 100 bp; GNBPs: 300, 200 bp). Schwarz unterlegt sind in beiden Abbildungen die Bezeichnungen all der Rezeptoren, die im trachealen Epithel der Larve nachgewiesen werden konnten, grau unterlegt sind hingegen all die Rezeptoren, die nicht vorhanden sind.

3.2.2 Das Expressionsprofil der Toll-Rezeptoren im larvalen Atemwegsepithel

Da der Toll-Signaltransduktionsweg und insbesondere Toll in der systemischen Immunabwehr der Fliege eine entscheidende Funktion übernimmt, wurde mittels RT-PCR das Expressionsprofil der Toll-Rezeptor-Genfamilie analysiert. Getestet wurden in der RT-PCR alle neun Mitglieder dieser Rezeptorgenfamilie. Von diesen neun Rezeptoren konnten im larvalen Atemwegsepithel die Transkripte des eigentlichen Toll-Rezeptors *toll* und dreier weiterer Toll-Rezeptoren nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Es handelte sich dabei um *18-wheeler*, *toll7* und *tollo* (*toll8*).

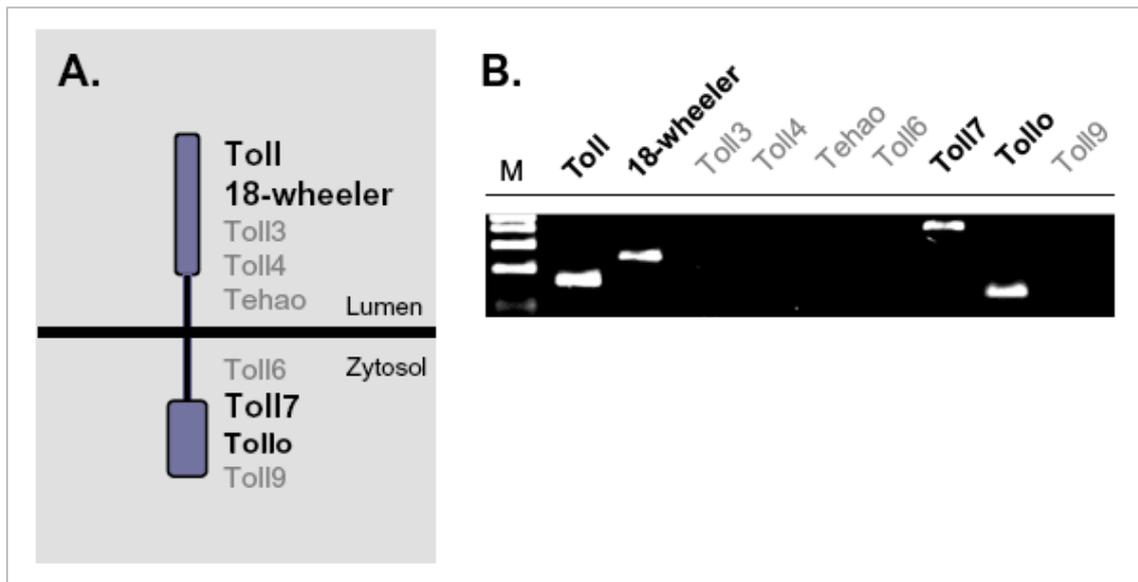


Abb. 3.3: Toll-Rezeptoren des larvalen Atemwegsepithels. (A) Schematische Darstellung der Toll-Rezeptoren. (B) Dokumentation der larvalen trachealen Toll-Rezeptor-Genexpression anhand eines 2%-igen Agarosegels. Als Größenstandard diente ein 100 bp Marke (500, 400, 300, 200, 100 bp). Schwarz unterlegt sind in beiden Abbildungen die Bezeichnungen all der Rezeptoren, die im trachealen Epithel der Larve nachgewiesen werden konnten, grau unterlegt sind hingegen all die Rezeptoren, die nicht vorhanden sind.

3.2.3 Das Expressionsprofil der immun-relevanten Signaltransduktionswege im larvalen Atemwegsepithel

Die systemische Immunantwort der Fliege wird von vier Signaltransduktionswegen gesteuert. Bei diesen vier Signalwegen handelt es sich um die beiden NF- κ B-Signalwege Toll und IMD, und um die beiden Signalwege JNK und JAK/STAT, die auf unterschiedliche Art und Weise in die Immunabwehr der Fliege eingreifen. Um die immun-relevanten Signalwege zu ermitteln, die im larvalen Atemwegsepithel vorhanden sind, wurde mittels RT-PCR überprüft, welche der vier Signalkaskaden komplett im trachealen Epithel vorliegen. Der Transkriptnachweis für die einzelnen Signalwege erstreckte sich auf ihre Rezeptoren, ihre intrazellulären Komponenten und auf ihre Transkriptionsfaktoren.

Die in Abbildung 3.4 dargestellten RT-PCR Ergebnisse zeigen, dass im larvalen Atemwegsepithel die gesamte Signalkaskade der Signalwege IMD, JNK und JAK/STAT vorhanden ist. Der Toll-Signalweg liegt im trachealen Epithel hingegen nicht komplett vor. Lediglich für den Toll-Adaptor *myd88* und die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren *dif* (*dorsal-related immunity factor*) und *dorsal* konnte ein Expressionsnachweis in der RT-PCR erbracht werden.

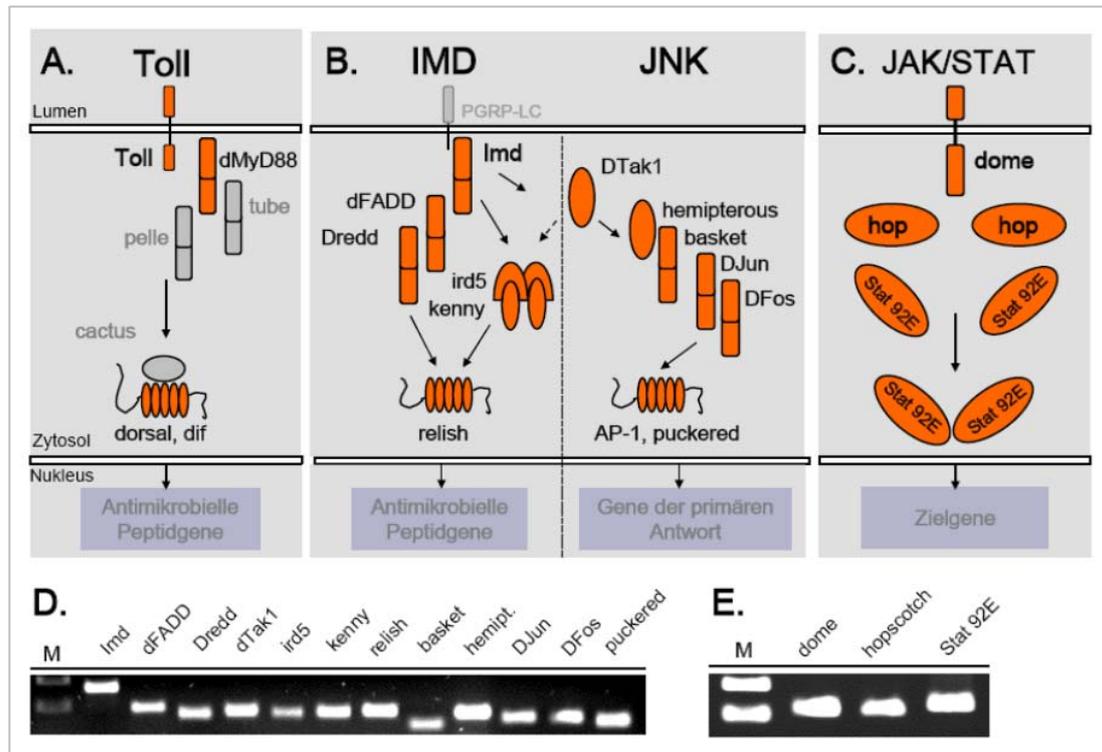


Abb. 3.4: Immun-relevante Signaltransduktionswege des larvalen Atemwegsepithels. (A-C) Schematische Darstellung der verschiedenen immun-relevanten Signalwege von *Drosophila*. (D, E) Dokumentation der IMD/JNK und der JAK/STAT-Genexpression anhand eines 2%-igen Agarosegels. Als Größenstandard wurde ein 1 kb (500 bp, 250 bp) bzw. 100 bp Marker eingesetzt (200 bp, 100 bp). Schwarz unterlegt sind in den Abbildungen die Bezeichnungen der Gene, die im larvalen Atemwegsepithel vorhanden sind, grau unterlegt sind hingegen all die Gene, für die in der RT-PCR kein Nachweis erbracht werden konnte.

3.2.4 Das Expressionsprofil der immun-relevanten Transkriptionsfaktoren im larvalen Atemwegsepithel

Die Signalkaskaden der einzelnen immun-relevanten Signalwege münden in der Aktivierung eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren. Im Fall der antimikrobiellen Immunabwehr werden zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren mobilisiert und rekrutiert, welche die Expression dieser Effektormoleküle regulieren. Bei diesen beiden Gruppen handelt es sich zum Einen um die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren Relish, Dif und Dorsal und zum Anderen um die dGATA-Transkriptionsfaktoren dGATAa-e.

Aus den Abbildungen 3.4 und 3.5 geht hervor, dass alle drei NF- κ B-Transkriptionsfaktoren im Atemwegsepithel der Larve verfügbar sind. Obwohl der Toll-Signalweg unvollständig im trachealen Epithel vorliegt, konnte in der RT-PCR für seine Transkriptionsfaktoren *dorsal* und *dif* ein positiver Nachweis erbracht werden. Von der zweiten Gruppe der Transkriptionsfaktoren dGATA fehlen lediglich zwei der fünf Faktoren im larvalen

Atemwegsepithel. Unter den nachgewiesenen Transkriptionsfaktoren befanden sich *pannier* (*dGATAa*), *grain* (*dGATAc*) und *dGATAd* (Abb. 3.5).

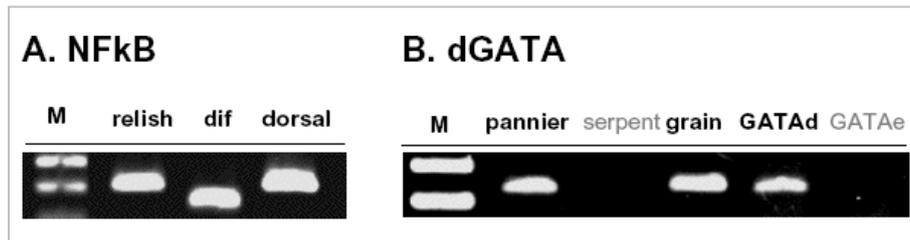


Abb. 3.5: Transkriptionsfaktoren des larvalen Atemwegsepithels. (A, B) Dokumentation der NF- κ B (A) und dGATA-Genexpression (B) anhand eines 2%-igen Agarosegels. Als Größenstandard diente ein 100 bp Marker (300, 200 bp). Schwarz unterlegt sind die Bezeichnungen aller der Gene, die im larvalen Atemwegsepithel nachgewiesen werden konnten, grau unterlegt sind hingegen die Gene, für die in der RT-PCR kein Nachweis erbracht werden konnte.

3.2.5 Das Immunrepertoire des larvalen Atemwegsepithels

Die in der RT-PCR nachgewiesenen, immun-relevanten Gene umfassen nur einen Bruchteil der Gene, die für eine erfolgreiche Immunabwehr benötigt werden. Um weitere Gene zu identifizieren, die zum Immunrepertoire des larvalen Atemwegsepithels gehören, wurden Transkriptionsanalysen anhand von DNA-Mikroarrayexperimenten durchgeführt. Für die Experimente wurde tracheale cRNA von frühen L3-Larven des Fliegenstamms YW DD1 eingesetzt. L3-Larven desselben Fliegenstamms, denen vor der RNA-Extraktion die primären und sekundären Tracheenäste entnommen worden waren, dienten als Kontrolle.

Da das Immunrepertoire des larvalen Atemwegsepithels nur anhand des gesamten trachealen Expressionsprofils identifiziert werden konnte, flossen in die weiteren Analysen nur Gene ein, die entweder Tracheen-spezifisch waren oder keine differentielle Expression zeigten. Zu den Tracheen-spezifischen Genen gehörten alle die Gene, die im larvalen Atemwegsepithel mindestens 1,5-fach stärker exprimiert wurden als in dem Kontrollgewebe. Anhand dieses Kriteriums konnten 418 Tracheen-spezifische Gene identifiziert werden. Die ersten 50 annotierten Gene dieser Kohorte befinden sich, sortiert nach absteigenden log₂-Verhältnissen, in Tabelle 8.1 im Anhang. Weiterhin beinhaltet das Transkriptom des larvalen Atemwegsepithels eine große Zahl an Genen, die keine differentielle Expression zeigen. In diese Gruppe flossen alle die Gene ein, deren Hybridisierungssignale, abzüglich des Hintergrunds, einen Mindestpixelwert von 150 besaßen. Insgesamt setzte sich das Tracheentranskriptom, einschließlich der 418 Tracheen-spezifischen Gene, aus ungefähr 3100 Genen zusammen. Mehrere dieser 3100 Gene konnten aufgrund ihrer bereits beschriebenen Funktion als immun-relevant bezeichnet werden. Unter ihnen befanden sich verschiedene

Effektormoleküle des Immunsystems, die bei einer humoralen Abwehrreaktion typischerweise exprimiert bzw. reguliert werden. Zu ihnen zählten insbesondere die antimikrobiellen Peptide (AMPs), von denen allein fünf (AttacinA, Defensin, Diptericin, Drosomycin und Metchnikowin) im larvalen Atemwegsepithel konstitutiv vorhanden sind. Als weitere Effektormoleküle konnten drei (LysS, LysB und LysX) der acht Lysozyme zum Immunrepertoire des larvalen Atemwegsepithels gezählt werden.

Weitere wichtige immun-relevante Moleküle des larvalen Atemwegsepithels sind enzymatische Antioxidantien, welche die Detoxifizierung reaktiver Sauerstoff-(ROS) bzw. Stickstoffspezies (RNS) bewältigen können. Zu ihnen gehören zwei Superoxid-Dismutasen, vier der fünf Peroxireduktasen, eine Katalase und mehrere Glutathion-S-Transferasen. Weiterhin wird die ROS-bildende Oxidase Duox konstitutiv im larvalen Atemwegsepithel exprimiert. Eine Übersicht über die wichtigsten enzymatischen Antioxidantien und ROS-bildenden Enzyme des larvalen Atemwegsepithels, die im Rahmen dieser Transkriptionsanalyse identifiziert wurden, bietet Abbildung 3.6. Bei den dort aufgelisteten Enzymen handelt es sich sowohl um Tracheen-spezifische als auch um nicht-differenziell exprimierte Gene.

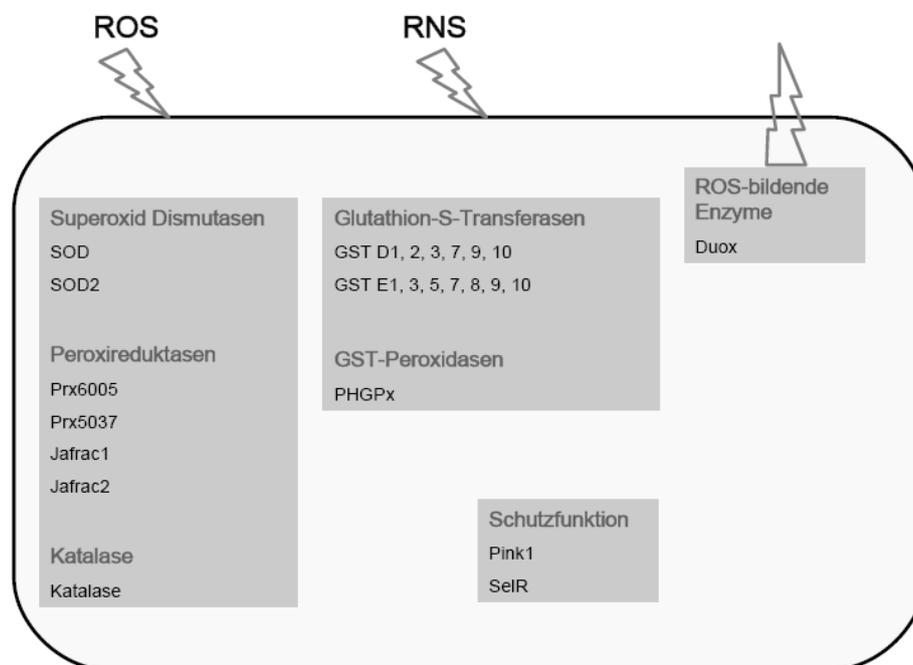


Abb. 3.6: Schematische Auflistung der antioxidativen und ROS-bildenden Enzyme des larvalen Atemwegsepithels. Grau unterlegt sind die verschiedenen Gruppen der antioxidativen Enzyme bzw. der ROS-bildenden Enzyme, schwarz unterlegt hingegen die zu den Gruppen gehörenden Enzyme. ROS: reaktive Sauerstoffspezies; RNS: reaktive Stickstoffspezies; GST: Glutathion-S-Transferase.

3.3 Die Infektion der larvalen Atemwege

Das larvale Tracheensystem steht über seine beiden paarigen Atemöffnungen (Stigmen) direkt mit der Außenwelt in Verbindung und stellt demnach einen potentiellen Eintrittsort für Pathogene dar, die die Epitheloberfläche besiedeln und das immun-kompetente Epithel infizieren können.

Die als Folge einer Infektion ausgelöste epitheliale Immunantwort umfasste einen Teil meiner Doktorarbeit und sollte im larvalen Tracheensystem anhand verschiedener Methoden untersucht und aufgeklärt werden. Hierbei konnte ich in erster Linie zeigen, dass das Atemwegsepithel der Larve über seine anterior und posterior gelegenen Stigmen infiziert und eine Immunantwort im Epithel induziert werden kann. Trat nach Infektion im larvalen Atemwegsepithel eine Immunreaktion ein, wurden die infizierten Bereiche des Epithels für weitere molekularbiologische Untersuchungen eingesetzt. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf den unter 3.2 aufgeführten mustererkennenden Rezeptoren, auf den Transkriptionsfaktoren der einzelnen Signalwege und auf den als Effektormoleküle fungierenden antimikrobiellen Peptiden. Ihr Expressionsniveau wurde im infizierten Epithel mithilfe von Mikroarray- und qPCR-Experimenten bestimmt und auf diese Weise entschieden, inwieweit diese immun-relevanten Gene die Immunantwort im larvalen Tracheensystems regulieren bzw. terminieren.

3.3.1 Das larvale Atemwegsepithel kann durch verschiedene Pathogene infiziert und lokal eine Immunantwort induziert werden

Um eine Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel sichtbar zu machen, wurden für die Infektionsversuche verschiedene transgene Fliegenstämme verwendet. Diese Fliegenstämme (GFP-Reporterstämme) tragen als Transposon ein P-Element, das *gfp* (*green fluorescent protein*) unter der transkriptionellen Kontrolle eines bestimmten AMP-Promotors exprimieren kann. Kommt es während einer Immunantwort zur Aktivierung dieser Promotorregion, geht in Larven dieser Fliegenstämmen die Expression des entsprechenden antimikrobiellen Peptids direkt einher mit der Expression von GFP.

Bereits vor Beginn meiner Doktorarbeit wurden von Herrn Prof. T. Roeder Infektionsversuche mit verschiedenen Pathogenen durchgeführt. Für diese Experimente wurden verschiedene GFP-Reporterstämme verwendet, die mit jeweils einem Vertreter einer Pathogenklasse infiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden. Als Pathogene kamen in diesen Experimenten das gram-positive Bakterium *Staphylococcus*

aureus, das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* und der Pilz *Candida albicans* in Frage und zum Einsatz.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von diesen Vorversuchen konnten zeigen, dass alle drei Pathogene im larvalen Atemwegsepithel eine Immunreaktion auslösen konnten. Das GFP-Expressionsmuster war in den infizierten Larven für alle drei Versuchsansätze stereotyp- und mosaikartig (Abb. 3.7). Besonders augenfällig war, dass lediglich die äußeren Bereiche des larvalen Tracheensystems eine GFP-Expression aufzeigen konnten und demnach nur das Epithel der Atemöffnung und der sich anschließenden primären Verzweigung immunologisch aktiv waren.

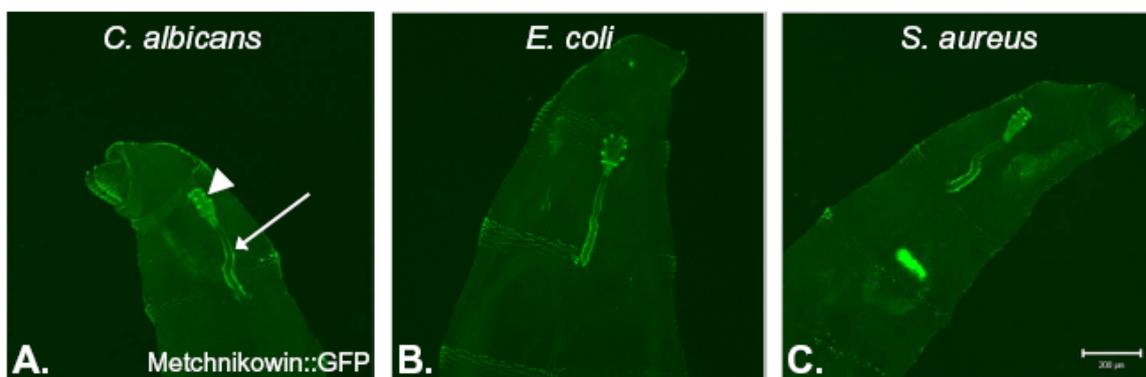


Abb. 3.7: Visualisierung der Immunantwort im larvalen Tracheensystem. (A-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von L3-Larven des GFP-Reporterstamms Metchnikowin::GFP nach Infektion mit (A) *Candida albicans*, (B) *Escherichia coli* und (C) *Staphylococcus aureus*. (A) Pfeilspitze: anterior gelegene Atemwegsöffnung (Stigma) des larvalen Tracheensystems. Pfeil: primärer Ast des larvalen Tracheensystems.

3.3.2 Im gesamten Atemwegsepithel der Larve kann eine Immunantwort induziert werden

Das larvale Atemwegsepithel kann von verschiedenen Pathogenen infiziert werden (Abb. 3.7). Ein wichtiges *Drosophila*-Pathogen stellt in diesem Zusammenhang das gram-negative Bakterium *Erwinia carotovora carotovora* (Ecc 2141) dar, das im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich für die Infektionsexperimente eingesetzt wurde. Um die Anzahl an infizierten Larven zu erhöhen, wurde die Bakteriensuspension erst nach dem Erreichen ihrer stationären Wachstumsphase geerntet und auf eine optische Dichte von OD₁₀₀ eingestellt. Als Fliegenstamm wurde für die Infektionsversuche der GFP-Reporterstamm YW DD1 eingesetzt, der ein P-Element trägt, das *gfp* unter der transkriptionellen Kontrolle des *drosomycin*-Promotors exprimiert. Eine als Folge der Infektion induzierte Expression des

drosomycin-Gens konnte somit durch eine GFP-Expression im larvalen Atemwegsepithel sichtbar gemacht werden.

Um eine Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel zu induzieren, wurden frühe L3-Larven mit einer konzentrierten Bananen-Bakterien-Suspension versetzt, auf Standardmedium überführt und nach etwa 24 Stunden unter dem Fluoreszenzstereomikroskop analysiert. In einem typischen Infektionsexperiment zeigten 30% dieser Larven eine Expression von GFP im larvalen Atemwegsepithel. Die restlichen Larven entwickelten in den meisten Fällen keine GFP-Expression. Nur vereinzelt wurden Larven im Versuchsansatz gefunden, die GFP auch im Fettkörper exprimierten und somit auf die Infektion mit einer systemischen Immunantwort reagierten.

Die Expression von GFP im larvalen Atemwegsepithel beschränkte sich auf unterschiedliche Bereiche des Tracheensystems. So konnte häufig im Epithel der posterior gelegenen Stigmen und ihrer angrenzenden trachealen Verzweigungen eine GFP-Expression lokalisiert werden (Abb. 3.8 A, B). Häufig wiesen beide Stigmen, einschließlich ihrer angrenzenden Äste eine GFP-Expression auf. Im Bereich der anterior gelegenen Stigmen konnte ebenfalls mit GFP eine Immunreaktion sichtbar gemacht werden. Die GFP-Expression war in diesem Bereich der Tracheen allerdings strikt auf das die Stigmen umgebende Epithel beschränkt (Abb. 3.8 A).

Etwa 10% der L3-Larven verzeichneten nach der Infektion mit *Erwinia* eine GFP-Expression im gesamten Tracheensystem (Abb. 3.8 C). In der Fluoreszenzmikroskopie fiel bei entsprechender Vergrößerung auf, dass sich die GFP-Expression bei diesen Larven von den primären bis hin zu den tertiären Verzweigungen erstreckte. Eine genauere Betrachtung der Verzweigungen ergab, dass jede Epithelzelle immunologisch aktiv war (Abb. 3.8 D, E).

Die Kontrolltiere, die statt der Bananen-Bakterien-Suspension mit 1xPBS versetzt worden waren, exprimierten hingegen kein GFP im Tracheensystem. Nur in sehr wenigen Einzelfällen konnte im Bereich der posterior oder anterior gelegenen Stigmen eine GFP-Expression lokalisiert werden. Diese war jedoch nur auf das die Stigmen umgebende Epithel begrenzt war (Abb. 3.8 F).

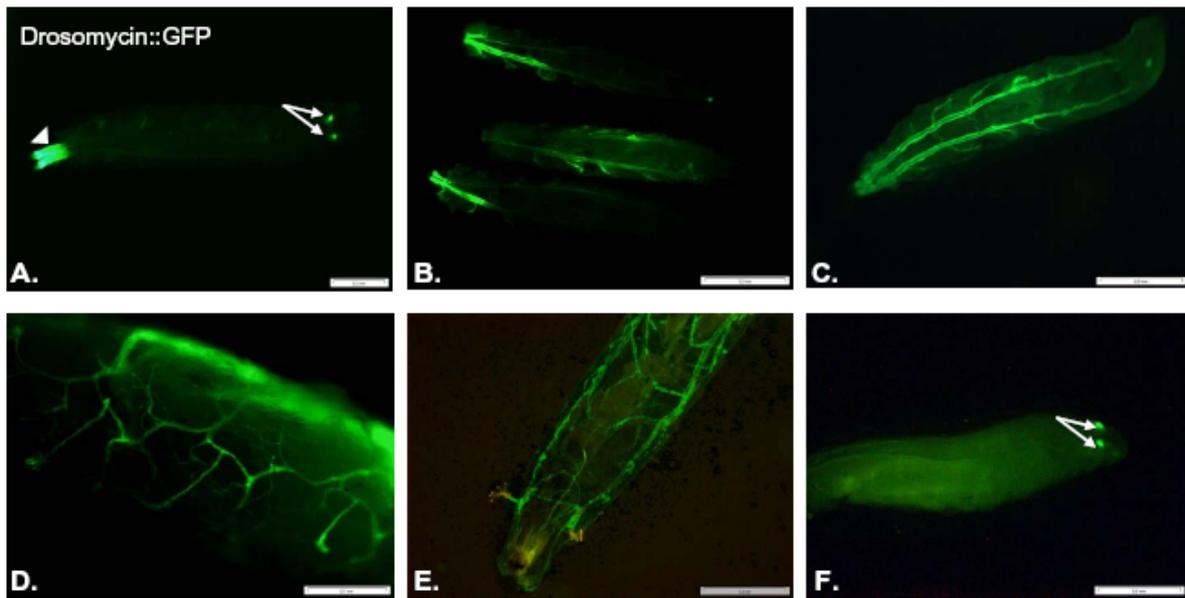


Abb. 3.8: Visualisierung der Immunantwort im larvalen Tracheensystem des Reporterstamms YW DD1. (A-F) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von frühen und späten L3-Larven des GFP-Reporterstamms YW DD1, deren GFP-Expression im larvalen Atemwegsepithel durch eine Infektion mit *Erwinia* induziert wurde. (A, B) Lokal begrenzte GFP-Expression in verschiedenen Regionen des larvalen Tracheensystems. (A) Pfeile: anterior gelegene Stigmen, Pfeilspitze: posterior gelegene Stigmen. (C-E) GFP-Expression im gesamten larvalen Tracheensystem. (F) Kontrollarve, die im Bereich der anterior gelegenen Stigmen eine GFP-Expression verzeichnen konnte.

Für die weiteren molekularbiologischen Analysen wurden nur die L3-Larven verwendet, die nahezu im gesamten Tracheensystem eine Immunreaktion anzeigten. Hierbei war wichtig, dass nur die Bereiche des Tracheensystems isoliert und weiterverarbeitet wurden, wo eine GFP-Expression vorhanden war. Kontrollarven, deren Epithel im Bereich der anterior und posterior gelegenen Stigmen immunologisch aktiv war, blieben von der Präparation ebenfalls ausgeschlossen.

3.3.3 Die membranständigen mustererkennenden Rezeptoren PGRP-LA und PGRP-LF werden nach einer Infektion mit *Erwinia* im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimiert

Zum Immunrepertoire des larvalen Atemwegsepithels gehören nahezu alle membranständigen und löslichen PGRPs (Abb. 3.2). Um die PGRPs zu identifizieren, die im Rahmen einer *Erwinia*-induzierten trachealen Immunantwort an der Erkennung und Weiterleitung der Infektion beteiligt sind, wurden infizierte Tracheen aus dem Fliegenstamm YW DD1 in qPCR-Experimente eingesetzt und das Expressionsniveau der einzelnen *pgrp*-Gene bestimmt. Hierbei konzentrierte ich mich bewusst auf die membranständigen PGRPs, einschließlich PGRP-LB und PGRP-LE, da diese mustererkennenden Rezeptoren Teil der IMD-induzierten

Immunantwort sind, und die IMD-Signalkaskade als einzige NF- κ B-Signalkaskade im larvalen Atemwegsepithel vollständig vorhanden ist.

Als Kontrolle wurden in den qPCR-Experimenten nicht-infizierte Tracheen aus L3-Larven desselben Fliegenstamms eingesetzt. Die Normalisierung der Daten erfolgte in beiden Gruppen anhand des Haushaltgens Aktin 42A, das während einer *Erwinia*-induzierten Immunantwort keiner Regulation unterlag.

Die Ergebnisse der qPCR in Abbildung 3.9 zeigen, dass in infizierten Tracheen zwei der fünf untersuchten *pgrp*-Gene signifikant stärker exprimiert werden als in nicht-infizierten Tracheen. Es handelt sich bei diesen *pgrp*-Genen um die beiden Peptidoglykanerkennungsrezeptoren LA und LF.

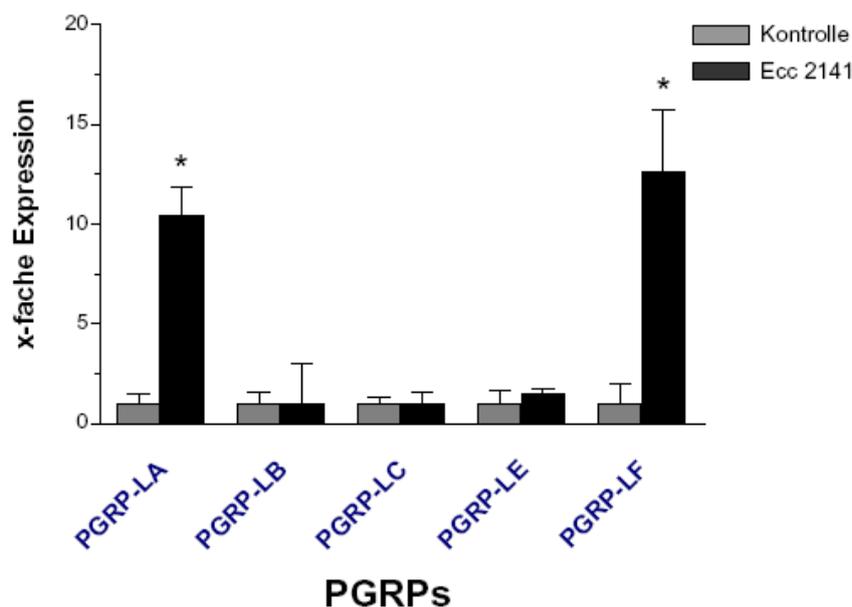


Abb. 3.9: Verstärkte Expression der *pgrp*-Gene PGRP-LA und PGRP-LF im larvalen Atemwegsepithel nach Infektion mit *Erwinia*. Das Expressionsniveau der einzelnen *pgrp*-Gene wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der RT-qPCR-Experimente wurden anhand von zwei biologischen Replikaten generiert, die aus infizierten bzw. nicht-infizierten Tracheen des Fliegenstamms YW DD1 stammten. Nicht-infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (grauer Graph); infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (schwarzer Graph). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$).

3.3.4 Der NF- κ B-Signalweg IMD reguliert die antimikrobielle Immunantwort im Atemwegsepithel der Larve

Die Regulation der AMP-Expression erfolgt in *Drosophila* durch die beiden NF- κ B-Signalwege Toll und IMD. Da die Signalkaskade des IMD-Signalwegs im Gegensatz zum Toll-Signalweg vollständig im Atemwegsepithel der Larve vorhanden war, wurde nur das

Genexpressionsniveau des Transkriptionsfaktors *relish* im infizierten Atemwegsepithel bestimmt.

Die in Abbildung 3.10 dargestellten qPCR-Daten für den Transkriptionsfaktor *relish* zeigen eine verstärkte *relish* Expression in infizierten Tracheen.

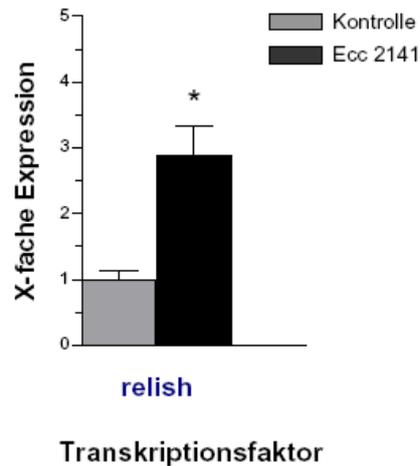


Abb. 3.10: Verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors *relish* im larvalen Atemwegsepithel nach Infektion mit *Erwinia*. Das Expressionsniveau von *relish* wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR-Experimente wurden anhand von zwei biologischen Replikaten generiert, die aus infizierten bzw. nicht-infizierten Tracheen des Fliegenstamms YW DD1 stammten. Nicht-infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (grauer Graph); infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (schwarzer Graph). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$).

3.3.5 Die Gene der antimikrobiellen Peptide Drosomycin, Drosocin und Metchnikowin werden nach einer Infektion mit *Erwinia* im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimiert

Drosophila steuert seine Immunreaktion über eine Reihe verschiedener Effektormoleküle, zu denen auch antimikrobielle Peptide gehören. Während einer epithelialen Immunantwort des larvalen Tracheensystems können verschiedene, für antimikrobielle Peptide kodierende Gene verstärkt exprimiert werden. Aus den Aufnahmen von Abbildung 3.8 geht deutlich hervor, dass nach einer Infektion mit *Erwinia* im Atemwegsepithel von YW DD1-Larven das antimikrobielle Peptid Drosomycin exprimiert wurde. Um weitere antimikrobielle Peptide zu identifizieren, die an einer *Erwinia*-induzierten Immunreaktion im larvalen Atemwegsepithel beteiligt waren, wurde das Expressionsniveau der einzelnen AMP-Gene in der qPCR bestimmt.

Die in Abbildung 3.11 dargestellten qPCR-Daten zeigen, dass die Infektion mit *Erwinia* die verstärkte Expression von zwei weiteren antimikrobiellen Peptidgenen im larvalen Atemwegsepithel bedingt. Ersichtlich ist anhand der Daten, dass neben *drosomycin*, die AMP-Gene *drosocin* und *metchnikowin* signifikant stärker transkribiert werden.

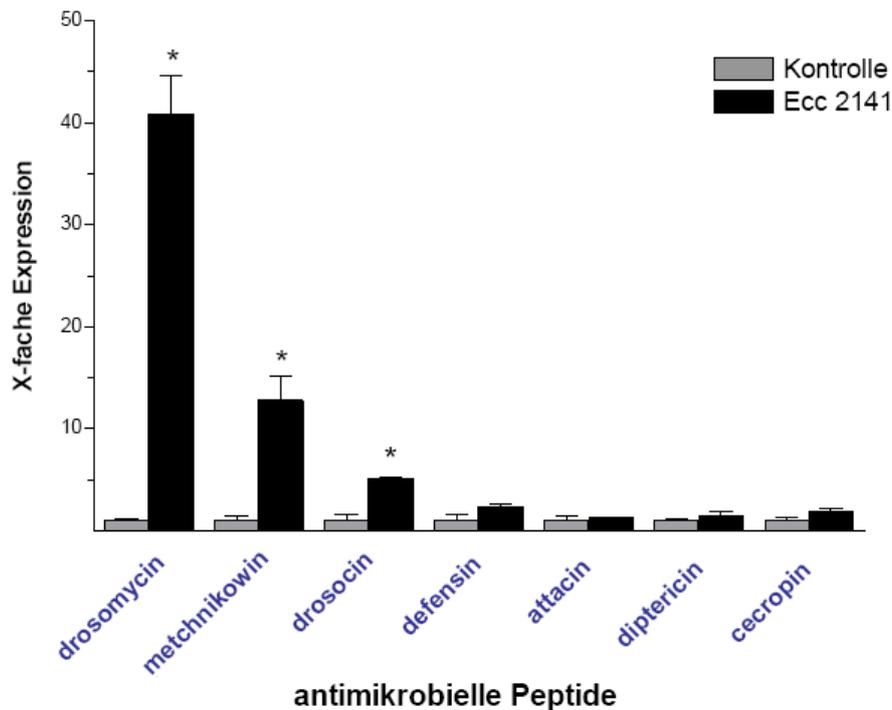


Abb. 3.11: Verstärkte Expression der antimikrobiellen Peptidgene *drosomycin*, *metchnikowin* und *drosocin* im larvalen Atemwegsepithel nach Infektion mit *Erwinia*. Das Expressionsniveau der einzelnen antimikrobiellen Peptidgene wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Actin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR-Experimente wurden anhand von zwei biologischen Replikaten generiert, die aus infizierten bzw. nicht-infizierten Tracheen des Fliegenstamms YW DD1 stammten. Nicht-infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (grauer Graph); infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (schwarzer Graph). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$).

Um die beobachtete verstärkte Expression der drei AMP-Gene auch auf Peptidebene darzustellen, wurden Tracheen aus infizierten bzw. nicht-infizierten Larven isoliert und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Beim Vergleichen der beiden Graphen stellte sich heraus, dass die drei antimikrobiellen Peptide Drosomycin, Drosocin und Metchnikowin auch auf Peptidebene verstärkt exprimiert wurden und somit mit den Daten der qPCR-Experimente übereinstimmen (Abb. 3.12). Die molekularen Größen für die drei antimikrobiellen Peptide lagen zwischen 2,409 und 4,890 kDa und entsprachen aufgrund der starken Glykosylierung der Peptide nicht den theoretisch berechneten Werten. Anhand bereits bekannter molekularer Größen für glykosylierte AMPs konnten die drei antimikrobiellen Peptide trotzdem identifiziert werden. Demnach konnten

die Signale 1-3 Drosocin, Metchnikowin und Drosomycin mit molekularen Größen von 2,402.0, 3,046.6 und 4,890.8 kDa zugeordnet werden (Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998).

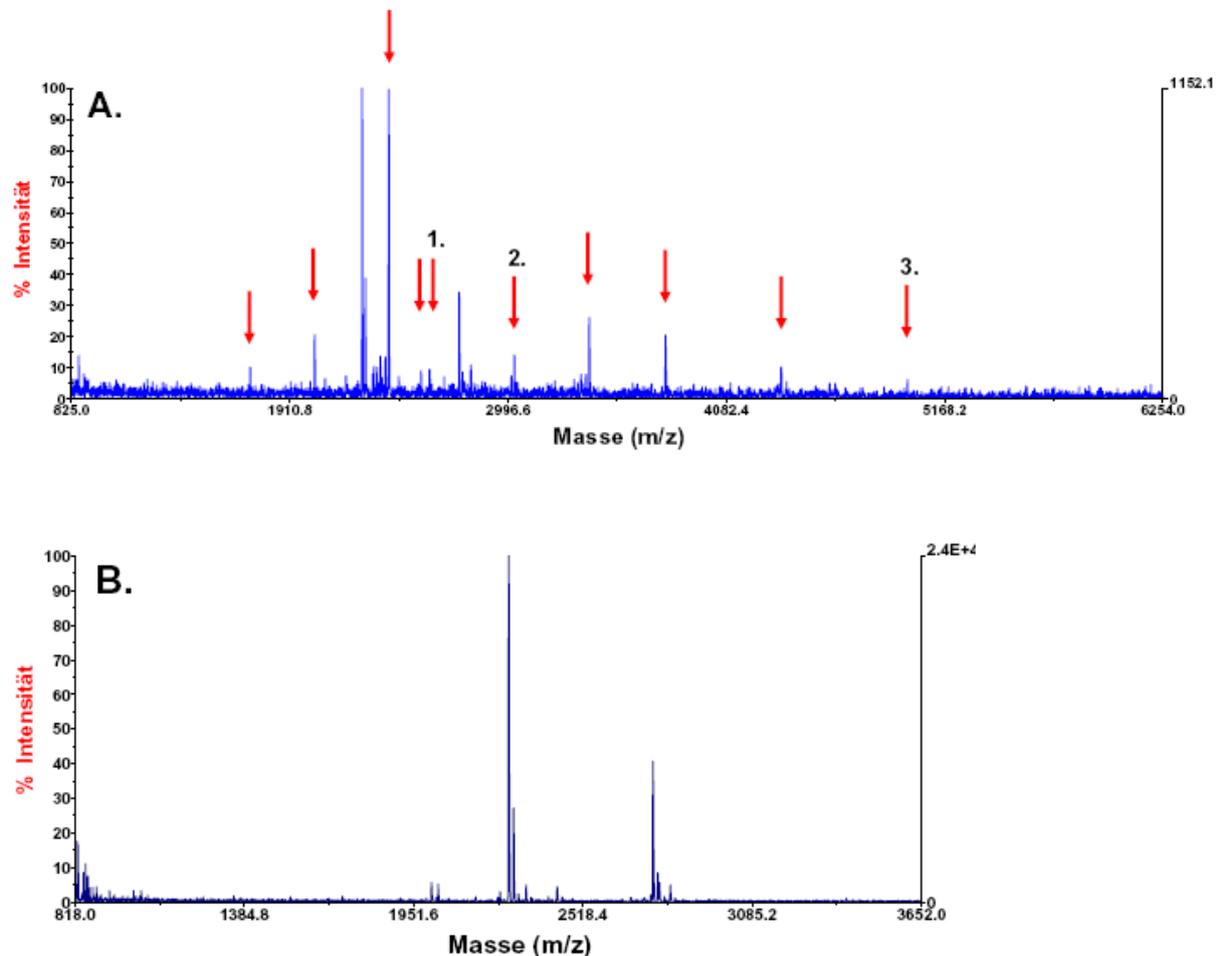


Abb. 3.12: Verstärkte Synthese der antimikrobiellen Peptide Drosocin, Metchnikowin und Drosomycin im larvalen Atemwegsepithel nach Infektion mit *Erwinia*. Das Expressionsniveau der antimikrobiellen Peptide wurde im MALDI-TOF-Massenspektrometer bestimmt und die Signale mit bereits bekannten molekularen Größen glykosylierter AMPs verglichen (Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998). (A) Infizierte Tracheen, die aus L3-Larven des GFP-Reporterstamm YW DD1 stammten, Signal 1: Drosocin (2,402.9 kDa), Signal 2: Metchnikowin (3,046.6 kDa) und Signal 3: Drosomycin (4,890.8 kDa). Die weiteren Pfeile markieren unbekannte Peptide (DIMs), deren Expression während der Immunantwort im larvalen Tracheensystem induziert wurde. (B) Nicht-infizierte Tracheen, die aus L3-Larven des GFP-Reporterstamms YW DD1 stammten.

3.3.6 Der Insulin-Signalweg wird während der Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel inhibiert

Infektionen können die Epithelien eines Gewebes schädigen und die physiologische Funktion des Gewebes beeinträchtigen. Um die physiologische Funktion des Epithels trotz einer Infektion, weiterhin aufrechterhalten zu können, werden während einer Immunantwort verschiedenen Gene aktiviert, die eine gezielte körpereigene Eliminierung von geschädigtem Epithel verhindern und somit die Lebensspanne des Epithels erhöhen. In diesem Zusammenhang sind die beiden Transkriptionsfaktoren Foxo und Thor von entscheidender

Bedeutung, da sie die zentralen Schalter darstellen, die Zellwachstum und Zellproliferation regulieren.

Um klären zu können, ob diese beiden Transkriptionsfaktoren während einer Infektion mit *Erwinia* einer Regulation unterliegen, wurde ihr Expressionsniveau in der qPCR bestimmt. Die in Abbildung 3.13 dargestellten Daten aus diesen Experimenten zeigen, dass sowohl *foxo* als auch *thor* in infizierten Tracheen signifikant stärker exprimiert wurden als in nicht-infizierten.

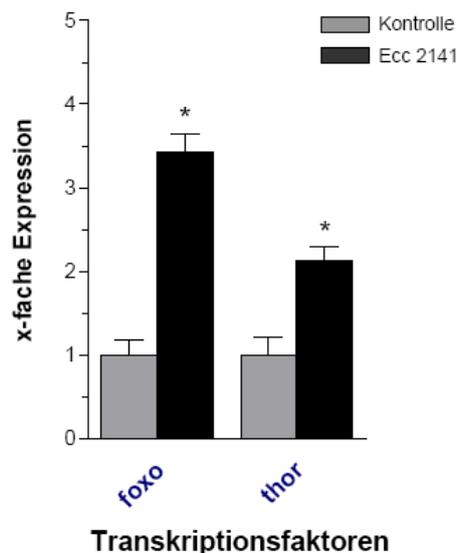


Abb. 3.13: Verstärkte Expression der Transkriptionsfaktor-Gene *foxo* und *thor* im larvalen Atemwegsepithel nach Infektion mit *Erwinia*. Das Expressionsniveau der beiden Gene wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR-Experimente wurden anhand von zwei biologischen Replikaten generiert, die aus infizierten bzw. nicht-infizierten Tracheen des Fliegenstamms YW DD1 stammten. Nicht-infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (grauer Graph); infiziertes Atemwegsepithel aus L3-Larven (schwarzer Graph). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$).

3.3.7 Das Atemwegsepithel der Larve unterliegt während der epithelialen Immunantwort lokal begrenzten morphologischen Veränderungen

Während der Beobachtung und Dokumentation der isolierten, infizierten Tracheen unter dem Fluoreszenzmikroskop fiel auf, dass einige Bereiche des larvalen Atemwegsepithels eine stärkere GFP-Expression aufwiesen als andere (Abb. 3.14 A, D). Durchlichtaufnahmen dieser Epithelbereiche konnten sichtbar machen, dass das Epithel in diesen trachealen Verzweigungen verdickt und demnach im Vergleich zum angrenzenden Epithel vermeintlich angeschwollen war (Abb. 3.14 C). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, welche die Dokumentation der Zellkerne ermöglichten, wiesen darauf hin, dass im Bereich des

verdickten Epithels mehr Zellkerne vorhanden waren als in unverdickten Bereichen und dass diese durchschnittlich größer waren als die „normalen“ Zellkerne (Abb. 3.14 B, D).

Diese Beobachtungen deuteten daraufhin, dass es sich bei diesen verdickten Epithelbereichen des larvalen Tracheensystems höchstwahrscheinlich um meta- und hyperplastische Epithelzellen handelte, deren nicht endgültig ausdifferenzierter Zustand an den durchschnittlich größeren, transkriptionell aktiven Zellkernen auszumachen war.

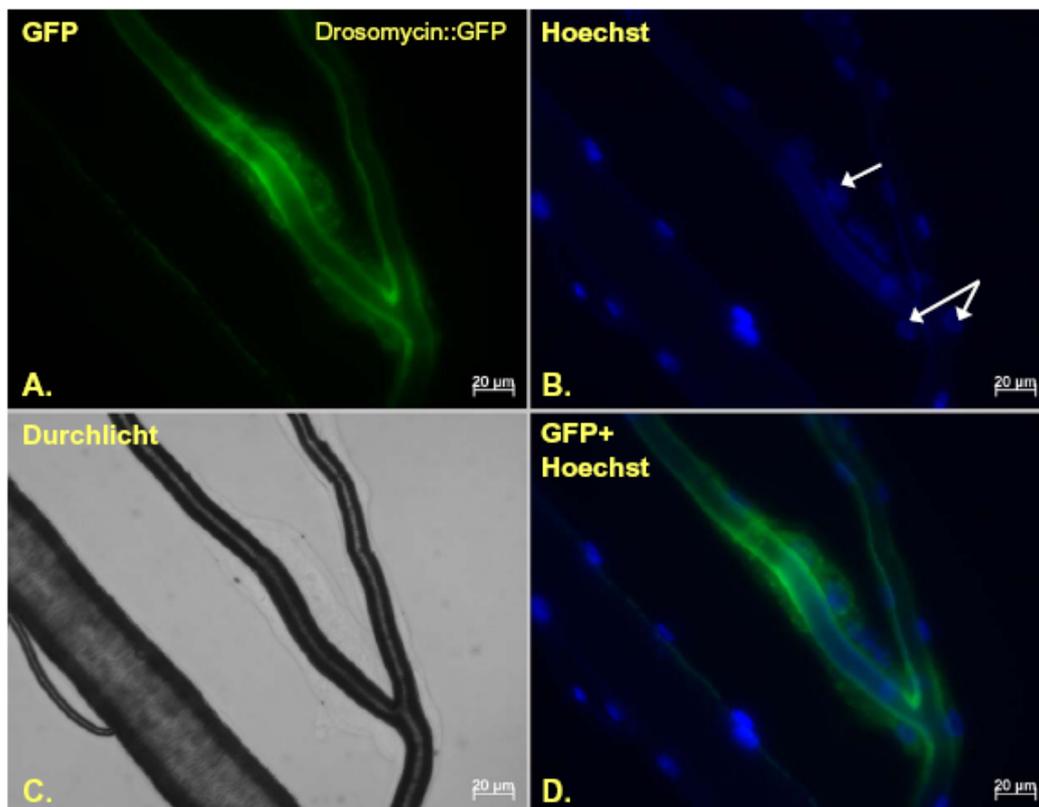


Abb. 3.14: Mikroskopische Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen von isolierten Tracheen nach Infektion mit *Erwinia*. (A-D) Bereiche eines primären und sekundären Tracheenasts aus infizierten L3-Larven des Fliegenstamm YW DD1. (A) Fluoreszenzaufnahme im GFP-Kanal: starke Expression von GFP in Epithelbereichen des sekundären Tracheenasts und seiner Verzweigung. (B) Fluoreszenzaufnahme im Hoechst-Kanal: vergrößerte Zellkerne in den GFP-exprimierenden Epithelbereichen, Pfeile: Beispiele für vergrößerte Zellkerne. (C) Durchlichtaufnahme: Verdickung des Atemwegsepithels in den GFP-exprimierenden Epithelbereichen des sekundären Tracheenasts. (D) Überlagertes Bild generiert anhand der Fluoreszenzaufnahmen der Abbildung A und B.

3.3.8 An der epithelialen Immunantwort des larvalen Tracheensystems sind nur wenige klassische immun-relevante Gene beteiligt

Die antibakterielle Immunantwort, die in erster Linie über die mustererkennenden Rezeptoren und die klassischen NF- κ B-Signalwege gesteuert wird, umfasst nur einen Bruchteil der immun-relevanten Gene, die während einer Infektion einer Regulation unterliegen. Um das gesamte immunologische Repertoire an Genen zu erhalten, das im larvalen Atemwegsepithel

nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora carotovora* signifikant reguliert wird, wurden Transkriptionsanalysen anhand von DNA-Mikroarrayexperimenten durchgeführt.

Für die Experimente wurde cRNA infizierter Tracheen verwendet, die von L3-Larven des GFP-Reporterstamms YW-DD1 stammten. Tracheen von L3-Larven desselben Fliegenstamms, die statt mit der Bakterien-Bananen-Suspension mit 1xPBS versetzt worden waren, dienten als Kontrolle.

Da in diesem Projekt nur die differentiell exprimierten Gene ermittelt werden sollten, flossen aus den primären Datensätzen in die weiteren Analysen nur die Gene ein, die einer signifikanten Regulation unterlagen. Dieses Kriterium konnte sowohl von verstärkt als auch vermindert exprimierten Genen erfüllt werden, deren normalisierte Expressionsdaten für das Verhältnis aus Infektion versus Kontrolle über 1,5 bzw. unter 0,66 lagen. Insgesamt konnten anhand dieses Kriteriums 694 Gene identifiziert werden, von denen nach einer Infektion mit *Erwinia* im larvalen Atemwegsepithel 358 verstärkt und 336 vermindert exprimiert wurden.

Um die immun-relevanten Gene zu identifizieren, die sich unter den 358 verstärkt exprimierten Genen befanden, wurde ein Venn-Diagramm erstellt, in das sowohl die verstärkt exprimierten Gene als auch all diejenigen Gene einfließen, die bisher mit der *Drosophila*-Immunität in Verbindung gebracht werden konnten (http://www.cgm.cnrs-gif.fr/immunity/drosophila_immunity_genes.html).

Bei Betrachtung der Schnittmenge des Venn-Diagramms fällt auf, dass lediglich 34 der verstärkt exprimierten Gene des larvalen Atemwegsepithels als klassische „Immungene“ zu bezeichnen sind (Abb. 3.15). Die Gene umfassen neben einigen nicht-annotierten Genen eine Reihe bekannter Gene, die auf den ersten Blick zur antibakteriellen Immunantwort gezählt werden können. Unter ihnen befinden sich einige antimikrobielle Peptide (AttacinA, Defensin, Drosomycin-4 und Metchnikowin), Vorläuferpeptide zweier immun-induzierender Peptide (IM2, IM10), zwei mustererkennende Rezeptoren der Kategorie PGRP (PGRP-SD) und GGBP (GGBP3) und der NF- κ B-Inhibitor des Toll Signalwegs Cactus.

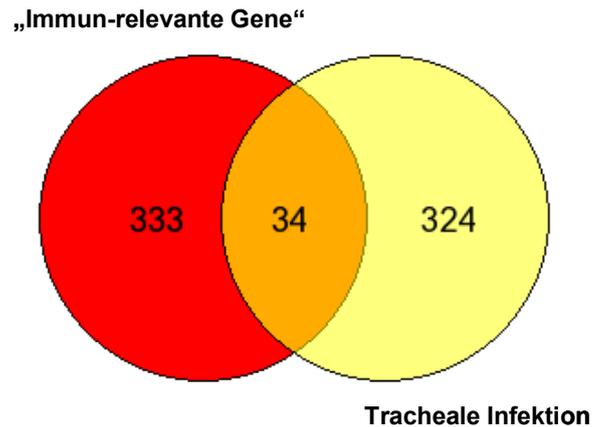


Abb. 3.15: Venn-Diagramm erstellt anhand der Genlisten der verstärkt exprimierten Gene des trachealen Infektionstranskriptoms und der klassischen „immun-relevanten Gene“, die mit der *Drosophila*-Immunität assoziiert werden. Die Schnittmenge der beiden Kreise enthält all die Gene, die nach einer Infektion mit *Erwinia* im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimiert wurden und als typische tracheale „Immungene“ identifiziert werden konnten.

Da während einer Infektion mit *Erwinia* im larvalen Atemwegsepithel nur wenige immun-relevante Gene aktiviert wurden, konzentrierte ich mich im Rahmen dieses Projekts auch auf die restlichen 324 Gene, die keinen direkten Bezug zur Immunantwort aufzeigen konnten. Bei näherer Betrachtung dieser Genliste fiel insbesondere eine Kohorte an Genen auf, die zu den pro-apoptotischen Genen gezählt werden kann (*Atg1*, *debcl*, *wrinkled*, *salvador*, *larp* und *Ice*; Scott *et al.*, 2007, Meier *et al.*, 2000, Tapon *et al.*, 2002). Auch wenn auf histologischer Ebene in den infizierten Atemwegsepithelzellen vermeintlich keine apoptotischen Prozesse zu beobachten waren, konnte auf transkriptioneller Ebene eine verstärkte Expression dieser Gene registriert werden.

Diesen Apoptosegenen steht eine Kategorie von Genen gegenüber, die die Funktionalität des Atemwegsepithels weiterhin aufrechterhalten kann, indem sie den pro-apoptotischen Prozessen entgegentritt. Zu diesen, im infizierten Atemwegsepithel verstärkt exprimierten Genen, gehören insbesondere verschiedene Glutathion-S-Transferasen (GST-D1, -D2, -D3, -D9 und -E7), welche körperfremde Stoffe detoxifizieren und somit verhindern, dass das larvale Atemwegsepithel nachhaltig geschädigt wird. Die signifikant regulierten Gene, die im Rahmen dieser Transkriptionsanalyse ermittelt wurden, befinden sich, sortiert nach ihren absteigenden log₂-Verhältnissen, in Tabelle 8.2 bzw. 8.3 im Anhang.

3.4 Die ektopische Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs IMD im larvalen Atemwegsepithel

Das Atemwegsepithel der Larve erfährt durch die Infektion mit dem gram-negativen Bakterium *Erwinia carotovora carotovora* auf transkriptioneller Ebene eine Vielzahl von Veränderungen. Diese Veränderungen erfassen nicht nur die bei *Drosophila* gut beschriebenen immunologischen Funktionskreise, sondern auch molekulare Mechanismen und Prozesse, die bisher nicht mit der epithelialen Immunabwehr assoziiert wurden. In diesem Zusammenhang kommt dem IMD-Signalweg besondere Bedeutung zu, da es sich um den einzigen Signalweg des Atemwegsepithels handelt, der auf NF- κ B-Faktoren konvergiert.

Da nach einer Infektion mit *Erwinia* im larvalen Atemwegsepithel sowohl auf transkriptioneller Ebene antimikrobielle Abwehrmechanismen aktiviert werden als auch Epithelzellen auf phänotypischer Ebene lokal meta- und hyperplastische Veränderungen zeigen, lag es nahe, die IMD-induzierte Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel genauer zu untersuchen.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung des IMD-Signalwegs schlossen sich drei Fragen an, die im Rahmen meiner Doktorarbeit anhand verschiedener molekularbiologischer aber auch histologischer Untersuchungen geklärt werden sollten:

1.) Welche antimikrobiellen Peptide werden im larvalen Atemwegsepithel durch den IMD-Signalweg reguliert? Induziert der IMD-Signalweg die Expression der membranständigen PGRPs, einschließlich PGRP-LB und -LE? 2.) Welche immunologischen Prozesse steuert der IMD-Signalweg neben der antimikrobiellen Peptidsynthese? Welche Gene des Infektionstranskriptoms unterliegen seiner Regulation? 3.) Ist der IMD-Signalweg im larvalen Atemwegsepithel verantwortlich für die lokal auftretende Hyperplasie der Epithelzellen?

3.4.1 Der IMD-Signalweg kann durch Überexpression des mustererkennenden Rezeptors PGRP-LE im larvalen Atemwegsepithel aktiviert werden

Das binäre Gal4/UAS-System der Hefe ermöglicht in *Drosophila* die ektopische Expression von Genen in unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Expressionsmustern (1.5.1). Unter Verwendung dieses Systems konnte in der Larve bereits gezeigt werden, dass der IMD-Signalweg durch Überexpression der mustererkennenden Rezeptoren PGRP-LE bzw. PGRP-LC_x aktiviert werden kann (Takehara *et al.*, 2004).

Da das binäre Gal4/UAS-System im Atemwegsepithel der Larve etabliert werden sollte, war die Wahl des Treiberstamms von entscheidender Bedeutung. Wichtig war in diesem

Zusammenhang, dass der Hefe-spezifische Transkriptionsfaktor Gal4 im gesamten Tracheensystem der Larve exprimiert wurde und weitere immun-kompetente Zellen, wie Hämocyten und Fettkörperzellen von der Gal4-Expression ausgeschlossen waren. Hierfür wurde zu Beginn der Arbeit als Treiberstamm der Fliegenstamm NP2610 verwendet, der Gal4 unter der transkriptionellen Kontrolle des Genpromotors CG30320 im larvalen Tracheensystem und zusätzlich noch in den Speicheldrüsen exprimierte. Als UAS-Effektorstamm wurde für die Kreuzungsexperimente der Fliegenstamm UAS-PGRP-LE eingesetzt, der die Expression von PGRP-LE durch den Hefe-spezifischen UAS-Promotor regulierte. Somit konnte im binären Gal4/UAS-System der UAS-Promotor aktiviert, PGRP-LE überexprimiert und der IMD-Signalweg im Tracheensystem und den Speicheldrüsen der Larven angeschaltet werden. Da der UAS-Effektorstamm neben dem PGRP-LE Konstrukt weiterhin ein *gfp*-Konstrukt besaß, das unter der transkriptionellen Kontrolle des *drosomycin*-Promotors stand, wurde die IMD-induzierte Immunantwort, die in der AMP-Expression mündet, anhand der Expression von GFP visualisiert (Abb. 3.16).

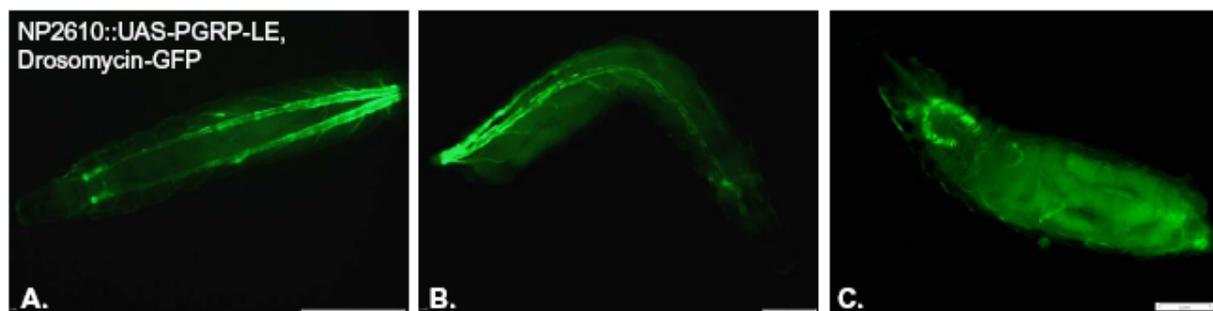


Abb. 3.16: Visualisierung der ektopischen Aktivierung des IMD-Signaltransduktionswegs im larvalen Tracheensystem (A, B) und in den Speicheldrüsen (C). (A-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von L2 und L3-Larven, die aus der F1-Generation der Kreuzung NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP stammten. Der Imd-Signaltransduktionsweg wurde in diesen Larven ektopisch durch das binäre Gal4/UAS-System aktiviert. Als Treiberstamm fungierte der Fliegenstamm NP2610, der Gal4 sowohl in den Tracheen als auch in den Speicheldrüsen exprimierte. Als UAS-Effektorstamm wurde für die Kreuzung der Fliegenstamm UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP eingesetzt. Die Aktivierung des IMD-Signalwegs im binären Gal4/UAS-System konnte demnach anhand der GFP-Expression visualisiert werden. (A) Dorsale, (B) laterale und (C) ventrale Ansicht auf eine L3-Larve.

Für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Tracheen aus L3-Larven der F1-Generation des Kreuzungsansatzes NP2610:UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP isoliert. Als Kontrolle fungierten in diesem Fall Tracheen aus L3-Larven des Mutterstamms NP2610, die zeitlich versetzt präpariert und parallel zu den Tracheen aus dem Kreuzungsansatz weiterverarbeitet wurden.

3.4.2 Die NP2610-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs geht mit einer verstärkten Expression aller sieben antimikrobiellen Peptidgene einher

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.16 geht hervor, dass der IMD-Signalweg im larvalen Atemwegsepithel die Expression des *drosomycin*-Gens reguliert. Um die antimikrobiellen Peptidgene zu identifizieren, die im larvalen Atemwegsepithel weiterhin einer Regulation durch den IMD-Signalweg unterliegen, wurde das Expressionsniveau der einzelnen AMPs in den Tracheen transheterozygoter Larven bestimmt. Die Normalisierung der aus der qPCR stammenden Daten erfolgte sowohl für die Tracheen aus dem Mutterstamm als auch für die Tracheen aus dem transheterozygoten Stamm anhand des Haushaltsgens Aktin 42A, das während der IMD-vermittelten Immunantwort keiner Regulation unterlag. Die normalisierten qPCR-Daten sind in Abbildung 3.17 dargestellt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrollgruppe angegeben.

Bei der Betrachtung der Daten in Abbildung 3.17 fällt auf, dass alle sieben, für antimikrobielle Peptide kodierenden Gene nach Induktion des IMD-Signalwegs in den Tracheen des transheterozygoten Stamms stärker exprimiert werden als in den Tracheen des Mutterstamms. Zum Zeitpunkt der Tracheenentnahme wurden im larvalen Atemwegsepithel besonders stark die AMP-Gene *drosomycin* und *defensin* transkribiert.

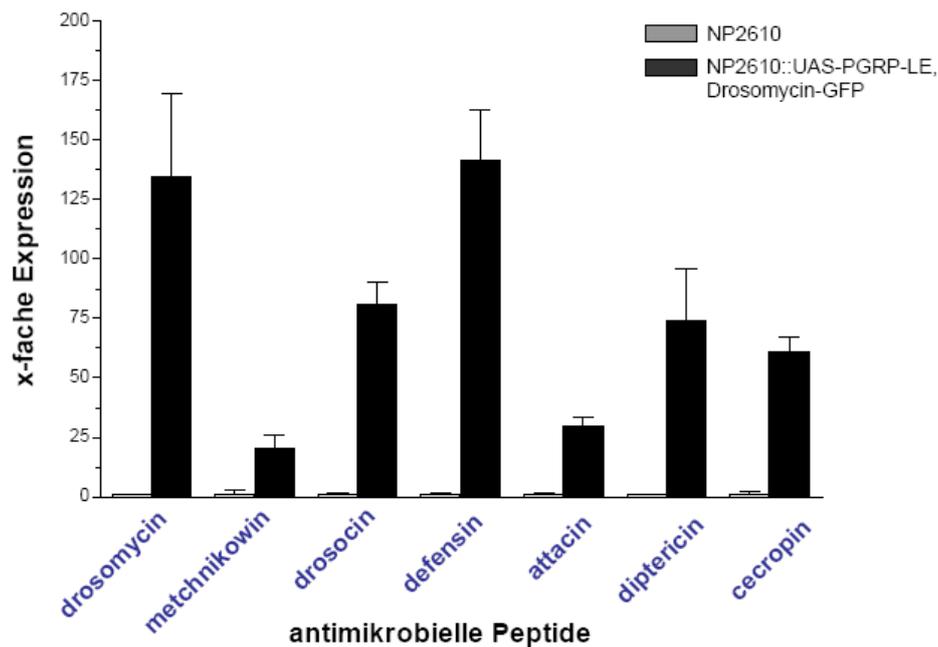


Abb. 3.17: Verstärkte Expression der antimikrobiellen Peptidgene im larvalen Atemwegsepithel nach ektopischer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs IMD durch den Treiberstamm NP2610. Das Expressionsniveau der einzelnen antimikrobiellen Peptidgene wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR wurden anhand von drei biologischen Replikaten generiert, die aus larvalen Tracheen des Mutterstamms NP2610 und des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP stammten. Grauer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Mutterstamms NP2610; schwarzer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., alle Vertreter der sieben AMP-Peptidgene werden signifikant verstärkt exprimiert ($p < 0,05$).

3.4.3 Die NP2610-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs führt im larvalen Atemwegsepithel zu einer verstärkte Expression von PGRP-LA

Nach einer Infektion mit dem gram-negativen Bakterium *Erwinia* werden im larvalen Atemwegsepithel verstärkt die membranständigen PGRPs PGRP-LA und -LF exprimiert (Abb. 3.9). Bisher ist unklar, welcher Regulation die PGRP-Expression unterliegt. Lediglich für PGRP-LB konnte gezeigt werden, dass seine Expression während der Immunantwort im Darm durch den IMD-Signalweg dirigiert wird (Zaidman-Rémy *et al.*, 2006).

Um eine positive Rückkopplung zwischen dem IMD-Signalweg und der PGRP-Expression entschlüsseln zu können, wurde das Expressionsniveau der membranständigen *pgrp*-Gene, einschließlich derjenigen für PGRP-LB und -LE in Tracheen transheterozygoter Larven bestimmt. Tracheen des Mutterstamms NP2610 fungierten auch in diesem qPCR-Experiment als Kontrolle. Die Daten wurden anhand des nicht-regulierten Gens Aktin 42A normalisiert.

Die qPCR-Daten in Abbildung 3.18 zeigen, dass lediglich das *pgrp-la* Gen im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven verstärkt exprimiert wurde und somit einer positiven Regulation durch den IMD-Signalweg unterliegt. Für das Gen des PGRP-LC Rezeptors konnte hingegen gezeigt werden, dass die Überexpression von PGRP-LE zu einer verminderten Transkriptionsrate führt.

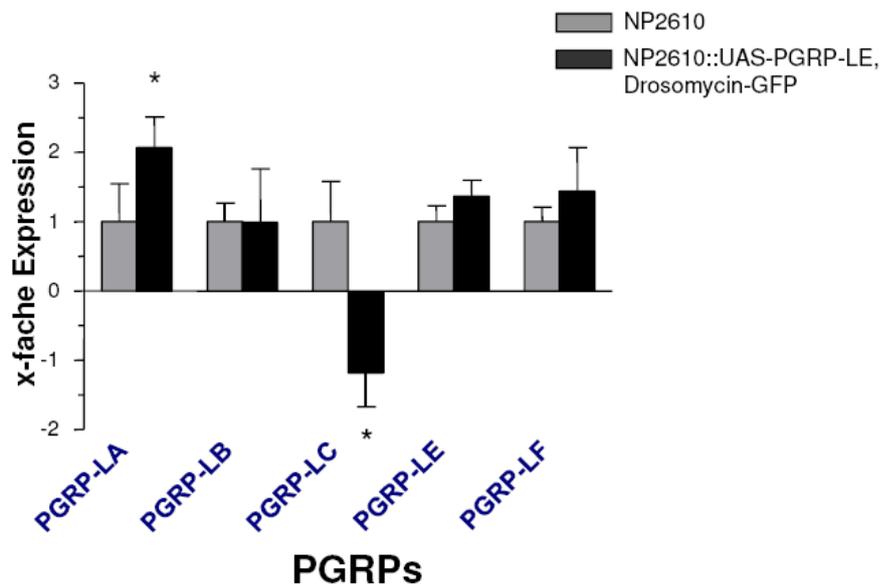


Abb. 3.18: Signifikant verstärkte bzw. verminderte Expression von *pgrp-la* bzw. *pgrp-lc* im larvalen Atemwegsepithel nach ektopischer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs IMD. Das Expressionsniveau der membranständigen *pgrp*-Gene, einschließlich derjenigen für die Rezeptoren PGRP-LB und -LE wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR wurden anhand von drei biologischen Replikaten generiert, die aus larvalen Tracheen des Mutterstamms NP2610 und des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP stammten. Grauer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Mutterstamms NP2610; schwarzer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$).

3.4.4 Die NP2610-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs ruft im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven keine phänotypischen Veränderungen hervor

Larvale Atemwegsepithelzellen können nach einer Infektion mit *Erwinia* in Bereichen starker AMP- bzw. GFP-Expression massiv verdickt sein (Abb. 3.14). Die Verdickung dieser epithelialen Bereiche geht höchstwahrscheinlich auf meta- und hyperplastische Epithelzellen des larvalen Tracheensystems zurück. Um die Rolle des NF- κ B-Signalwegs IMD in der Regulation der Proliferation von Epithelzellen klären zu können, wurden von Tracheen transheterozygoter Larven Ultradünnschnitte angefertigt und in der Elektronenmikroskopie

analysiert. Tracheen aus L3-Larven des Mutterstamms NP2610 fungierten hierbei als Kontrolle.

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.19 geht eindeutig hervor, dass die ektopische Aktivierung des IMD-Signalwegs durch den Treiberstamm NP2610 keinen Einfluss auf die Struktur des larvalen Atemwegsepithels hat. Der Epitheldurchmesser liegt sowohl für die trachealen Verzweigungen des Mutterstamms als auch für die trachealen Verzweigungen des transheterozygoten Stamms bei durchschnittlich 1,2 μm .

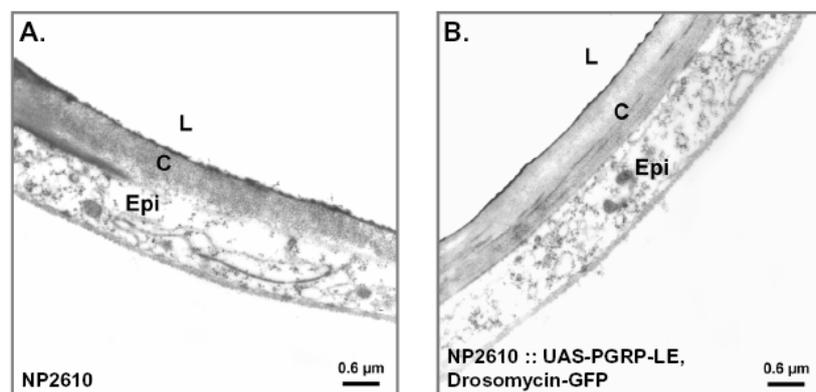


Abb. 3.19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten einer sekundären trachealen Verzweigung des transheterozygoten Stamms NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP und seines Mutterstamms. (A) Atemwegsepithelzelle aus L3-Larve des Mutterstamms NP2610. (B) Atemwegsepithelzelle aus L3-Larve des transheterozygoten Stamms NP2610::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. (A, B) L: Lumen; C: Cuticula und Epi: Epithel. Die Ultradünnschnitte wurden in Kooperation mit Prof. H. Fehrenbach angefertigt und von ihm in der Elektronenmikroskopie dokumentiert.

3.4.5 Der zeitliche Expressionsverlauf des Hefe-spezifischen Transkriptionsfaktors Gal4 im Tracheensystem des Treiberstamms PPK4

Um ausschließen zu können, dass das Fehlen der hyperplastischen Epithelzellen im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven nicht auf den Treiberstamm und einen zeitlich begrenzten Expressionsverlauf von Gal4 zurückzuführen ist, wurde der IMD-Signalweg mit einem Tracheen-spezifischen Treiberstamm ektopisch erneut aktiviert, der Gal4 während der gesamten Larvalentwicklung exprimiert (Liu *et al.*, 2003).

Bei diesem verwendeten Treiberstamm handelte es sich um den Stamm PPK4, der die Synthese von Gal4 durch den Promotor des Gens PPK4 (CG8178) reguliert. PPK4 oder auch *pickpocket4* kodiert einen der neun epithelialen Natriumkanäle (ENaC), die im larvalen Tracheensystem exprimiert werden.

Um den zeitlichen Expressionsverlauf von Gal4 im larvalen Tracheensystem aufzuklären, wurde der PPK4-Treiberstamm mit dem UAS-Effektorstamm UAS-Cam 2.1 gekreuzt. Dieser

Stamm trägt als Transposon das P-Element Cameleon 2.1, das unter der transkriptionellen Kontrolle des UAS-Promotors steht. Bei dem Genprodukt von Cameleon 2.1 handelt es sich um eine GFP-Chimäre, die im GFP-Kanal des Fluoreszenzmikroskops zu beobachten ist.

Die in Abbildung 3.20 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen transheterozygoter Larven der Kreuzung PPK4::UAS-Cam 2.1 zeigen, dass Gal4 während der gesamten larvalen Entwicklung im Tracheensystem exprimiert wird. Durch die permanente Promotoraktivität von PPK4 konnte somit für die folgende Gal4/UAS-Kreuzung PPK4::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP garantiert werden, dass der IMD-Signalweg im Tracheensystem während der gesamten Larvalentwicklung aktiviert sein wird.

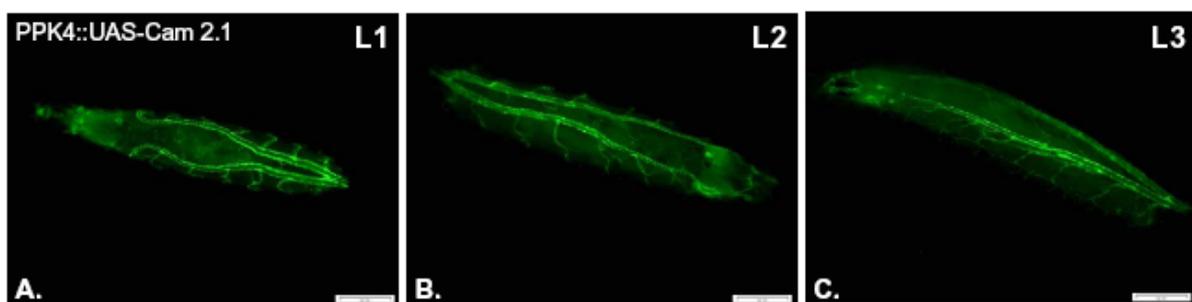


Abb. 3.20: Visualisierung der ektopischen Expression der GFP-Chimäre Cameleon 2.1 im larvalen Tracheensystem. (A-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Larvenstadien, die aus der F1-Generation der Kreuzung PPK4::UAS-Cam 2.1 stammten. Die Cameleon 2.1 Expression wurde in diesen Larven durch das binäre Gal4/UAS-System aktiviert. (A) L1-Larve, (B) L2-Larve und (C) L3-Larve aus der F1-Generation der Kreuzung PPK4::UAS-Cam 2.1.

3.4.6 Der Treiberstamm PPK4 induziert ektopisch den IMD-Signalweg im larvalen Atemwegsepithel

Nachdem der zeitliche Expressionsverlauf von Gal4 im larvalen Atemwegsepithel des Treiberstamms PPK4 aufgeklärt worden war, wurde der Treiberstamm PPK4 mit dem UAS-Effektorstamm PGRP-LE, Drosomycin-GFP gekreuzt. Die Aktivierung des IMD-Signalwegs im Atemwegsepithel der Larve konnte auch diesmal anhand des integrierten Drosomycin-GFP-Reporterkonstrukts visualisiert werden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.21 zeigen, dass der IMD-Signalweg auch im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven aktiviert werden kann, die als parentalen Stamm den Treiberstamm PPK4 besaßen. Weiterhin geht aus diesen Aufnahmen eindeutig hervor, dass der IMD Signalweg in allen Verzweigungstypen des larvalen Tracheensystems induziert wird und somit jede Epithelzelle von der Aktivierung betroffen ist.

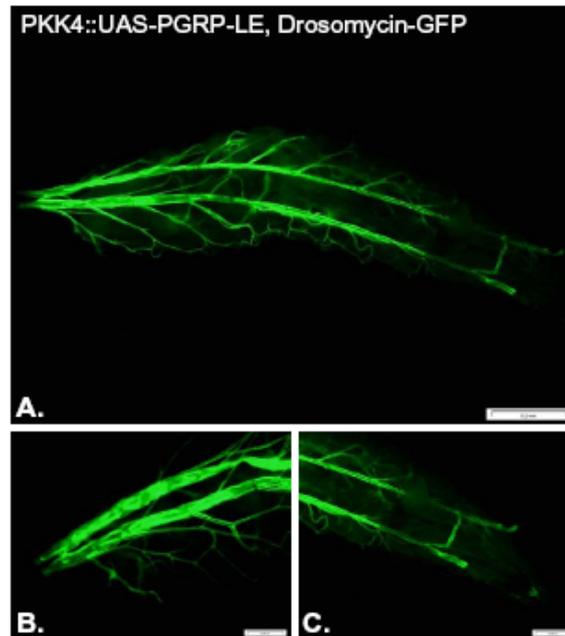


Abb. 3.21: Ektopische Aktivierung des IMD-Signalwegs im larvalen Tracheensystem durch den Treiberstamm PPK4. (A-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einer L3-Larve der F1-Generation der Kreuzung PPK4::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. Der IMD-Signalweg wurde in dieser Larve ektopisch durch das binäre Gal4/UAS-System aktiviert. Als Treiberstamm fungierte der Fliegenstamm PPK4, der Gal4 im gesamten Tracheensystem exprimiert. Als UAS-Effektorstamm wurde der Fliegenstamm UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP eingesetzt. Die Aktivierung des IMD-Signalwegs konnte somit anhand einer GFP-Expression sichtbar gemacht werden. (A) L3-Larve; (B) posteriores Ende einer L3-Larve und (C) anteriores Ende einer L3-Larve.

3.4.7 Die PPK4-induzierte Aktivierung des Imd-Signalwegs geht mit einer verstärkten Expression aller sieben antimikrobiellen Peptidgene einher

Die Überexpression des mustererkennenden Rezeptors PGRP-LE führt im Atemwegsepithel der Larve unabhängig vom gewählten Treiberstamm zur Aktivierung der antimikrobiellen Immunantwort (Abb. 3.16 und 3.21). Für die transheterozygoten Larven, die als parentalen Stamm den Treiberstamm NP2610 besaßen, konnte in qPCR-Experimenten gezeigt werden, dass während einer IMD-induzierten Immunantwort alle sieben antimikrobiellen Peptidgene im Atemwegsepithel verstärkt exprimiert werden (Abb. 3.17). Um den Einfluss der PPK4-getriebenen PGRP-LE Expression auf die antimikrobielle Peptidsynthese entschlüsseln zu können, wurde im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven das Expressionsniveau der einzelnen AMP-Gene bestimmt. Hierfür wurden die Tracheen aus L3-Larven der F1-Generation des Kreuzungsansatzes PPK4::UAS-PGRP-LE isoliert und parallel zu trachealem Gewebe aufgearbeitet, das aus L3-Larven des Mutterstamms PPK4 stammte und als Kontrollgewebe fungierte. Die Normalisierung der qPCR-Daten erfolgte sowohl für die Tracheen aus dem Mutterstamm als auch für die Tracheen aus dem transheterozygoten Stamm anhand des Haushaltgens Aktin 42A, da Aktin 42A auch während der PPK4-induzierten

IMD-Immunantwort keiner Regulation unterliegt. Die normalisierten qPCR-Daten sind in Abbildung 3.22 aufgeführt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrollgruppe angegeben.

Aus den qPCR-Daten in Abbildung 3.22 geht hervor, dass alle sieben antimikrobiellen Peptidgene verstärkt im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven des Gal4/UAS-Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE exprimiert wurden. Zum Zeitpunkt der Tracheenpräparation wurde im larvalen Atemwegsepithel verstärkt das AMP-Gen *diptericin* transkribiert.

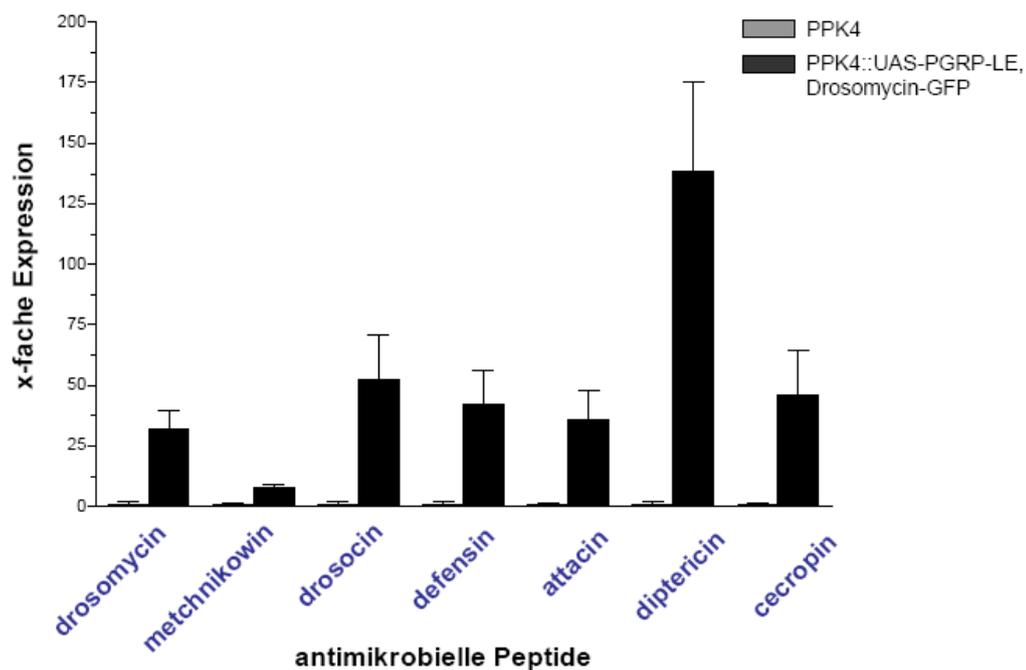


Abb. 3.22: Verstärkte Expression der antimikrobiellen Peptidgene im larvalen Atemwegsepithel nach ektopischer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs IMD durch des Treiberstamm PPK4. Das Expressionsniveau der einzelnen antimikrobiellen Peptidgene wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR wurden anhand von drei biologischen Replikaten generiert, die aus larvalen Tracheen des Mutterstamms PPK4 und des Kreuzungsansatzes PPK4::UAS-PGRP-LE stammten. Grauer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Mutterstamms PPK4; schwarzer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Kreuzungsansatzes PPK4::UAS-PGRP-LE. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., alle Vertreter der sieben AMP-Peptidgene werden signifikant verstärkt exprimiert, ($p < 0,05$).

3.4.8 Die PPK4-induzierte Aktivierung des IMD-Signalwegs ruft im Tracheensystem transheterozygoter Larven eine Verdickung des Atemwegsepithels hervor

Um zu klären, ob die permanente Aktivierung des IMD-Signalwegs während der gesamten Larvalentwicklung einen Einfluss auf die Struktur und Organisation des Atemwegsepithels

hat, wurden die Tracheen aus L3-Larven des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Aus den mikroskopischen Bildern in Abbildung 3.23 geht eindeutig hervor, dass die permanente Aktivierung des IMD-Signalwegs während der gesamten Larvalentwicklung mit einer Verdickung des Atemwegsepithels einhergeht. Aufnahmen von verschiedenen Verzweigungstypen des Tracheensystems bestätigen, dass sämtliche Bereiche des Atemwegsepithels von der phänotypischen Veränderung betroffen sind. Augenfällig ist die Verdickung des Atemwegsepithels insbesondere im Bereich der primären Verzweigung, deren Epithel durchschnittlich viermal so dick ist wie in der vergleichbaren Verzweigung des Mutterstamms. Entgegen der primären Verzweigungen besitzen die sekundären und tertiären Äste des larvalen Tracheensystems eine weitaus geringere Verdickung des Epithels. Hier liegt der Faktor für die durchschnittliche sekundäre bzw. tertiäre Epitheldicke lediglich bei 1,6 bzw. 1,4.

Beobachtet man die Zellkerne des transhetero- bzw. homozygoten Atemwegsepithels und vergleicht man ihre Größen untereinander, fällt auf, dass die Zellkerne des transheterozygoten Epithels weitaus größer sind als die des homozygoten. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die aus der Kreuzung stammenden Atemwegsepithelzellen transkriptionell aktiver sind als die des Mutterstamms.

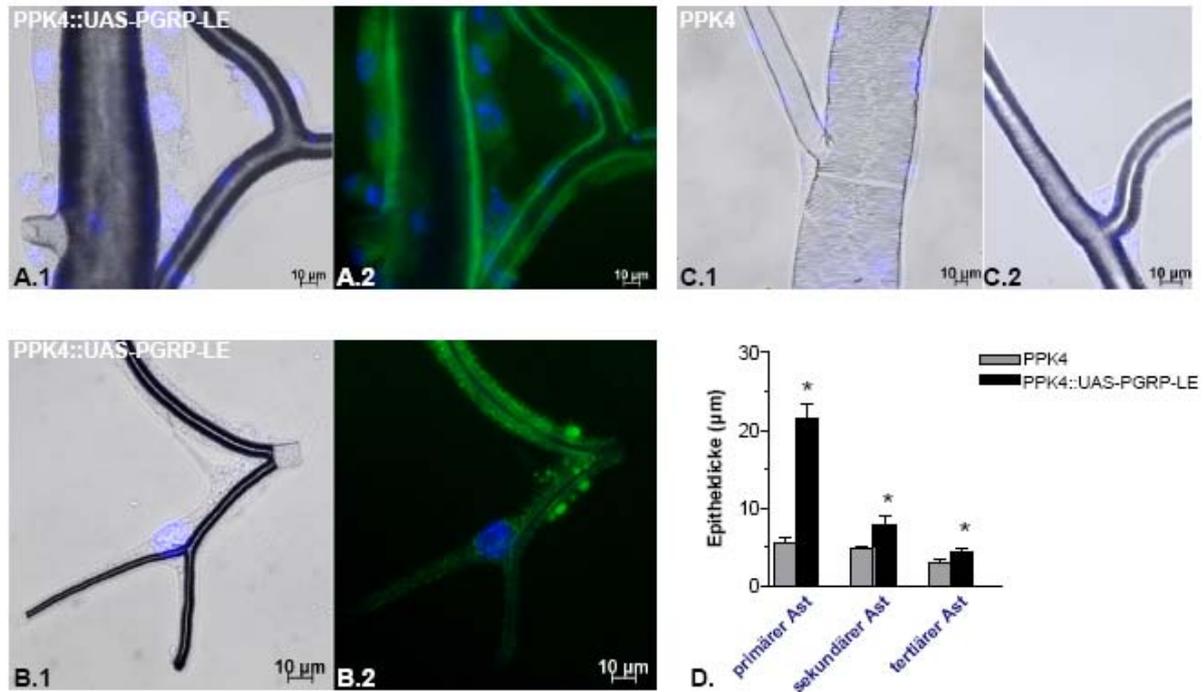


Abb. 3.23: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Verzweigungen des larvalen Tracheensystems. (A-C) Überlagerte Bilder generiert anhand entsprechender licht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. (A.1, B.1, C) Durchlichtaufnahme überlagert mit Hoechst-33258-Aufnahme. (A.2, B.2) Hoechst-33258-Aufnahme überlagert mit Calcein-Aufnahme, die im GFP-Kanal dokumentiert wurde. (A, C.1) Primärer und sekundärer Tracheenast aus L3-Larve des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE (A) bzw. des Mutterstamm PPK4 (C.1). (B, C.2) Tertiärer Tracheenast aus L3-Larve des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE (B) bzw. des Mutterstamm PPK4 (C.2). (D) Durchschnittliche Epitheldicke verschiedener Tracheenäste, die aus transhetero- und homozygoten Larven stammten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$).

Die in der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie erkennbaren Unterschiede zwischen dem transhetero- bzw. homozygoten Atemwegsepithel konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen einzelner Atemwegsepithelzellen bestätigt werden (Abb. 3.24). So ist die transheterozygote Atemwegsepithelzelle insbesondere im Bereich des stark vergrößerten Zellkerns verdickt. Die Vergrößerung des Zellkerns wirkt sich aber nicht nur auf die Epitheldicke aus. Betrachtet man den von der Atemwegsepithelzelle ausgesparten Luftraum, fällt auf, dass der Durchmesser des Luftraums im transheterozygoten Epithel lediglich ca. 70% des Wertes entspricht, der in Kontrolltieren zu beobachten ist.

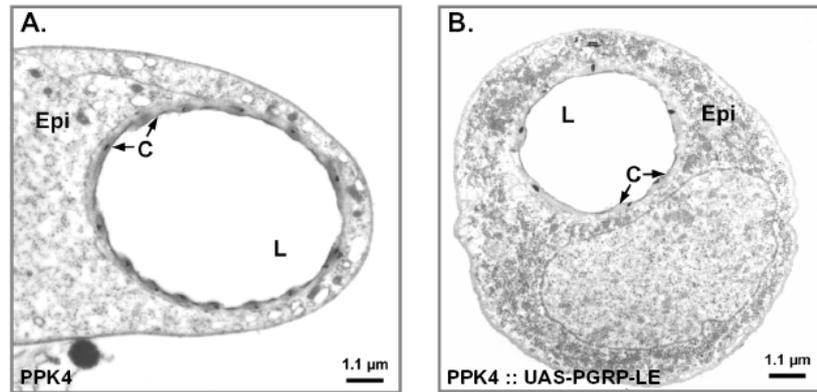


Abb. 3.24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten einer tertiären trachealen Verzweigung des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE und seines Mutterstamms. (A) Atemwegsepithelzelle aus L3-Larve des Mutterstamms PPK4. (B) Atemwegsepithelzelle aus L3-Larve des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE. (A, B) L: Lumen; C: Cuticula und Epi: Epithel. Die Ultradünnschnitte wurden in Kooperation mit Prof. H. Fehrenbach angefertigt und von ihm in der Elektronenmikroskopie dokumentiert.

Tracheales Gewebe besitzt im unstimulierten Zustand ein hohes Maß an Elastizität und Zugfestigkeit. Diese strukturellen Eigenschaften des Tracheensystems gehen insbesondere auf die Cuticula zurück, die der luminalen Seite des Atemwegsepithels anliegt und die luftgefüllten Hohlräume des Tracheensystems auskleidet.

Schon während der Präparation der transheterozygoten Larven fällt auf, dass die Tracheen weitaus weniger elastisch und zugfest sind als die der parentalen Stämme. Aufgrund der fehlenden Elastizität sind sie demnach sehr brüchig (Abb. 3.25 A). Bei genauerer Betrachtung der isolierten primären Äste fällt auf, dass die Cuticula in einigen Bereichen des Atemwegsepithels unregelmäßig angeordnet ist oder in manchen Bereichen sogar vollständig fehlt. Veränderungen in der cuticulären Anordnung sind auch in den EM-Aufnahmen sichtbar. Während die Cuticula in homozygoten Atemwegsepithelzellen zu kleinen Falten aufgeworfen ist, scheinen diese Strukturen in Atemwegsepithelzellen transheterozygoter Larven nahezu vollständig zu fehlen (Abb. 3.24).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass eine Verdickung des larvalen Atemwegsepithels zu einer asymmetrischen Anordnung der Cuticula führt, die wiederum mit einem Verlust an Elastizität und Zugfestigkeit einhergeht.

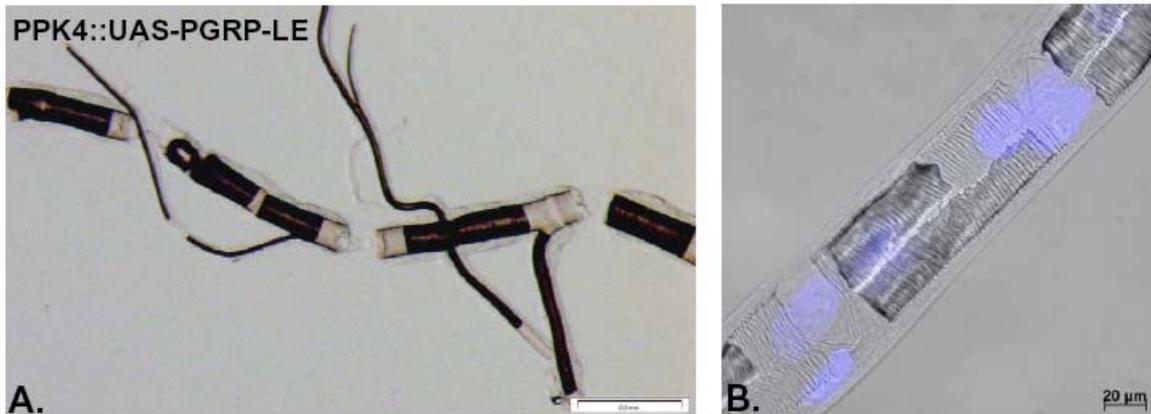


Abb. 3.25: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen Tracheenästen transheterozygoter Larven **PPK4::UAS-PGRP-LE**. (A) Primärer Tracheenäst mit sekundären Verzweigungen. Die dunklen Bereiche der Tracheenäste sind nach wie vor mit Luft gefüllt; die transparenten hingegen enthalten keine Luft mehr. (B) Überlagertes Bild generiert anhand der entsprechenden Durchlichtaufnahme und der Hoechst-33258-Aufnahme. Auch wenn das Atemwegsepithel dieses primären Tracheenästs nicht all zu sehr verdickt ist, ist in diesem Bereich des Astes eine asymmetrische Anordnung der Cuticula erkennbar.

3.4.9 Der IMD-Signalweg steuert im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven des Mutterstamms **PPK4** die Proliferation des Epithels

Wie bereits erwähnt, sind die Zellkerne des transheterozygoten Atemwegsepithels stark vergrößert und transkriptionell aktiv (Abb. 3.23). Diese hohe transkriptionelle Aktivität der Zellkerne mündet letztendlich in der Umgestaltung und Vergrößerung jeder einzelnen Atemwegsepithelzelle. Um klären zu können, ob die Vergrößerung der Atemwegsepithelzellen auf hyperplastische Prozesse im Atemwegsepithel zurückzuführen sind, wurden in Tracheen transheterozygoter Larven die Anzahl an Zellen bestimmt, die einen definierten Abschnitt eines primären Asts umspannen. Hierfür wurden die Tracheen transheterozygoter bzw. homozygoter L3-Larven entnommen, die Zellkerne mit Hoechst-33258 gefärbt und die Anzahl der Kerne unter dem Fluoreszenzstereomikroskop bestimmt.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist offensichtlich, dass in den transheterozygoten Tracheen die Anzahl der Zellkerne größer ist als in den korrespondierenden Kontrollen (Abb. 3.26 B). Zählt man die Anzahl der Kerne über einen definierten Abschnitt des primären Asts, zeigt der transheterozygote Stamm eine 1,25-fach höhere Anzahl an Zellkernen im Atemwegsepithel als der homozygote Stamm (Abb. 3.26 C). Auch in dieser Aufnahme sind die für das transheterozygote Atemwegsepithel charakteristisch vergrößerten Zellkerne erkennbar (Abb. 3.26 B).

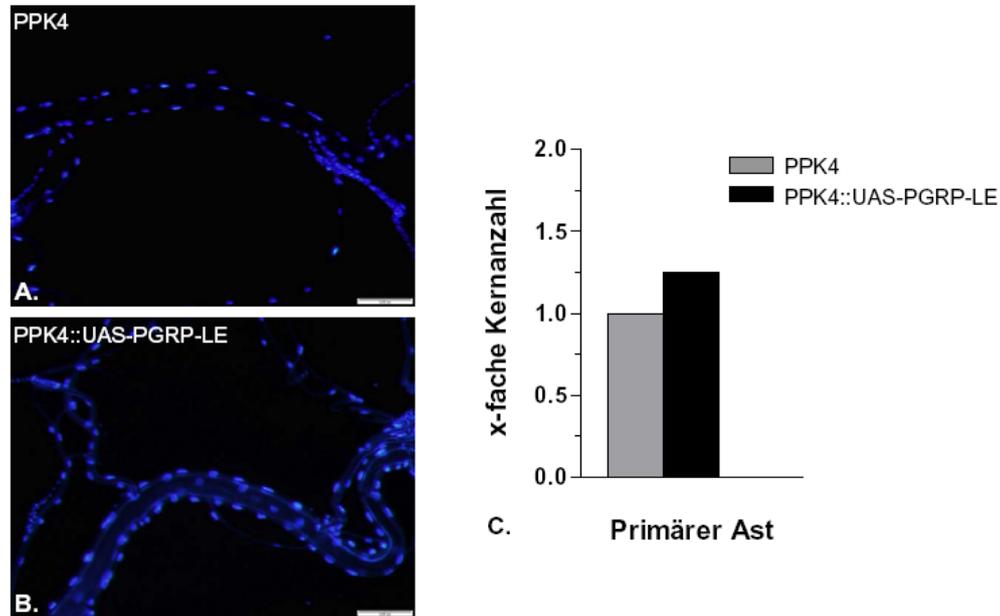


Abb. 3.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von larvalen primären und sekundären Tracheenästen. (A, B) Die Tracheen wurden aus L3-Larven des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE und des Mutterstamms PPK4 isoliert, die Zellkerne mit Hoechst-33258 gefärbt und im Hoechst-Kanal dokumentiert. (A) Tracheenäst aus Mutterstamms PPK4, (B) Tracheenäst aus transheterozygotem Stamm PPK4::UAS-PGRP-LE, (C) x-fache Anzahl der Kerne im primären Ast transheterozygoter bzw. homozygoter L3-Larven.

3.4.10 Die phänotypische Veränderung des transheterozygoten Atemwegsepithels beruht nicht auf einem entwicklungsspezifischen Defekt während der Embryogenese

Ein Nachteil des binären Gal4/UAS-Systems ist die mangelnde Regulation des zeitlichen Expressionsverlaufs von Gal4. So exprimieren einige Treiberstämme bereits während der Embryonalentwicklung den Hefe-spezifischen Transkriptionsfaktor Gal4. Eine frühzeitige Aktivierung des Gal4/UAS-Systems kann in transheterozygoten Larven zu erheblichen Störungen in der Embryonalentwicklung führen, die nicht selten in letalen Defekten enden.

Um ausschließen zu können, dass die phänotypische Veränderung des Atemwegsepithels mit einem entwicklungsspezifischen Defekt einhergeht, wurde auf das TARGET-Genexpressionssystem (*temporal and regional gene expression targeting*) von *Drosophila* zurückgegriffen. In diesem Expressionssystem wird das konventionelle binäre Gal4/UAS-System durch ein Temperatur-sensitives Gal80-Allel reguliert (1.5.2).

Für die Etablierung des TARGET-Systems musste zuerst ein stabiler Fliegenstamm generiert werden, der homozygot sowohl den Hefe-spezifischen Transkriptionsfaktor Gal4 als auch den Gal4-reprimierenden Faktor Gal80 exprimiert. Dieser Stamm wurde aus dem Tracheen-spezifischen Gal4-Stamm PPK4 und dem ubiquitär exprimierenden Gal80-Stamm α Tubulin

84b hergestellt. Um Rekombinationen zu vermeiden und eine genotypische Identifikation der Fliegen anhand des Phänotyps zu ermöglichen, wurde der Gal4/Gal80-Stamm unter Zuhilfenahme von zwei Doppelbalancer-Stämmen generiert. Durch sie konnte die Anzahl an Zwischenkreuzungen auf zwei begrenzt und die Etablierung einer stabilen homozygoten Gal4/Gal80-Linie gewährleistet werden (Kreuzungsschema unter 8.2 im Anhang).

Um das TARGET-Expressionssystem zu aktivieren und einen entwicklungspezifischen Defekt im Atemwegsepithel transheterozygoter Larven ausschließen zu können, wurde der PPK4/ α Tubulin 84b-Stamm mit dem UAS-Effektorstamm UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP gekreuzt und 24 Stunden nach Eiablage mehrere Tage sowohl bei 19°C als auch bei 28°C gehalten, bis die Larven das frühe L3-Stadium erreicht hatten. Anschließend wurde die Funktionsfähigkeit des TARGET-Expressionssystems unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Da der UAS-Effektorstamm auch diesmal über ein GFP-Reporterkonstrukt verfügte, konnte im Atemwegsepithel die Temperatur-abhängige Aktivierung des IMD-Signalwegs anhand einer fehlenden oder vorhandenen GFP-Expression sichtbar gemacht werden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.27 dokumentieren anschaulich die Temperatur-abhängige Funktionsfähigkeit des TARGET-Expressionssystems. Während die Haltung der transheterozygoten Larven bei 19°C zu keiner GFP-Expression im larvalen Atemwegsepithel führt, zeigen Larven desselben transheterozygoten Stamms, die bei 28°C aufgezogen wurden, eine GFP-Synthese im gesamten Epithel (Abb. 3.27 C, D). Als Kontrollen fungierten Larven des Kreuzungsansatzes PPK4::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP, deren GAL4-Expression im konventionellen GAL4/UAS-Hintergrund weitgehend Temperatur-unabhängig war (Abb. 3.27 A, B).

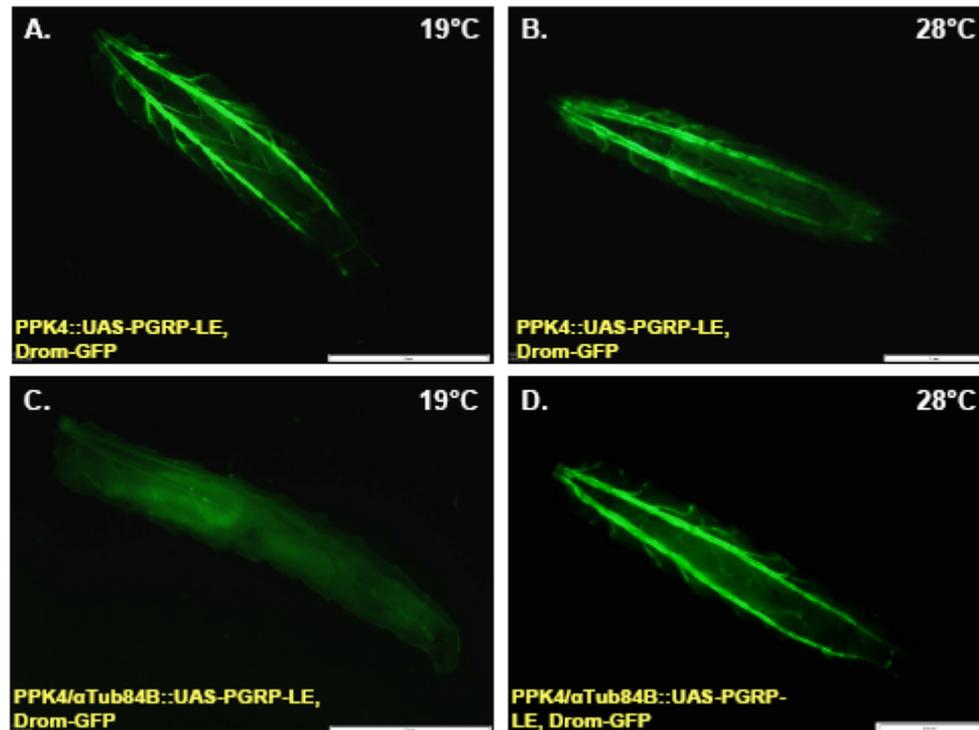


Abb. 3.27: Visualisierung der ektoptischen Aktivierung bzw. Reprimierung des IMD-Signalwegs im larvalen Tracheensystem. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von L3-Larven des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP (A, B) und des Stamms PPK4/ α Tub84B::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. (C, D) In den Larven des Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP wurde der IMD-Signalweg ektoptisch durch das konventionelle binäre Gal4/UAS-System aktiviert. In den Larven des Stamms PPK4/ α Tub84B::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP wurde der IMD-Signalweg ektoptisch durch das TARGET-Expressionssystem Temperatur-abhängig reprimiert (C) bzw. aktiviert (D). Aufzucht und Haltung der Larven bei 19°C (A, C) und bei 28°C (B, D).

Die Tracheen aus den L3-Larven der transheterozygoten Stämme in Abbildung 3.27 wurden isoliert und licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Tracheen, die aus der Temperatur-abhängigen Target-Linie stammten, ging die bei 19°C nicht-nachweisbare GFP-Expression mit einer fehlenden phänotypischen Veränderung des Atemwegsepithels einher. Die Tracheen aus diesem Stamm waren nicht verdickt und besaßen demnach denselben Phänotyp wie das Atemwegsepithel ihrer parentalen Stämme (Abb. 3.28 C). Betrachtete man hingegen lichtmikroskopisch Tracheen von L3-Larven, die bei 28°C aufgewachsen waren, zeigte sich auf phänotypischer Ebene deutlich eine Verdickung des Atemwegsepithels (Abb. 3.28 D). Larvale Tracheen mit konventionellem Gal4/UAS-Hintergrund wiesen hingegen in den Atemwegsepithelien unabhängig von der Aufzuchtstemperatur den charakteristischen Phänotyp auf, der für den IMD-Signalweg nach ektoptischer Aktivierung typisch ist (Abb. 3.28 A, B).

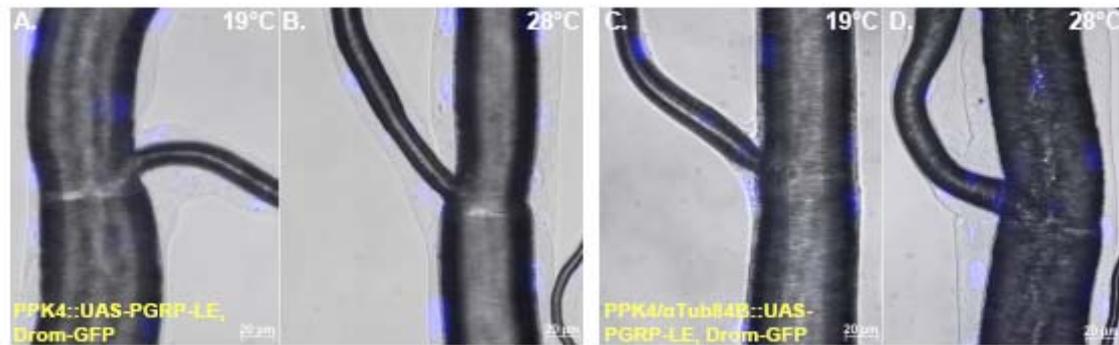


Abb. 3.28: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von larvalen primären und sekundären Tracheenästen nach Aktivierung bzw. Reprimierung des IMD-Signalwegs. (A-D) Überlagerte Bilder generiert anhand von Durchlichtaufnahmen und Hoechst-33258-Aufnahmen. (A, B) Tracheen aus L3-Larven des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. In diesen Larven wurde der IMD-Signalweg ektopisch durch das konventionelle Gal4/UAS-System aktiviert. (C, D) Tracheen aus L3-Larven des Stamms PPK4/ α Tub84B::UAS-PGRP-LE, Drosomycin-GFP. In diesen Larven wurde der IMD-Signalweg ektopisch durch das TARGET-Expressionssystem Temperatur-abhängig reprimiert (C) bzw. aktiviert (D). Aufzucht und Haltung der Larven bei 19°C (A, C) und bei 28°C (B, D).

3.5 Vergleich verschiedener Transkriptome immunologisch aktiver Atemwegsepithelien

3.5.1 Der IMD-Signalweg dirigiert im larvalen Atemwegsepithel nur einen Bruchteil der regulierten Gene des Infektionstranskriptoms

Das larvale Atemwegsepithel erfährt sowohl durch die Infektion mit dem gram-negativen Bakterium *Erwinia carotovora carotovora* als auch durch die ektopische Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs IMD zahlreiche Veränderungen auf transkriptioneller Ebene. Da der IMD-Signalweg als einziger NF- κ B-Signalweg in der epithelialen Immunantwort eine Schlüsselrolle übernimmt, lag es nahe, das Transkriptom larvaler Atemwegsepithelien zu ermitteln, in denen der IMD-Signalweg ektopisch aktiviert worden war.

Daher wurde das Transkriptom von Tracheen transheterozygoter Larven ermittelt, die als parentalen Stamm den Treiberstamm NP2610 besaßen. Als Kontrolle fungierten hierbei Tracheen, die aus Larven vergleichbaren Alters der Treiberlinie stammten.

Auch bei diesem DNA-Mikroarray-Projekt flossen aus den Rohdaten in die weiteren Analysen all die Gene ein, die einer signifikanten Regulation unterlagen. Dieses Kriterium konnte sowohl von verstärkt als auch vermindert exprimierten Genen erfüllt werden, deren normalisierte Expressionsdaten für das Verhältnis aus „ektopischer Aktivierung“ versus Kontrolle über 1,5 bzw. unter 0,66 lagen. Insgesamt konnten anhand dieses Kriteriums 244 Gene identifiziert werden, von denen im larvalen Atemwegsepithel allein 187 verstärkt und

57 vermindert exprimiert wurden. Die Gene dieser beiden Kohorten befinden sich, sortiert nach absteigenden log₂-Verhältnissen, in Tabelle 8.4 bzw. 8.5 im Anhang.

Vergleicht man die Expressionsdaten der signifikant regulierten Gene, mit denen des Infektionstranskriptoms, fällt in der „Heat-Map“ auf, dass in beiden Transkriptomen zahlreiche Gene dieselbe Regulationsrichtung erfahren. Das gilt insbesondere für viele der verstärkt exprimierten Gene der IMD-vermittelten Immunantwort. Allerdings gibt es im Expressionsmuster beider Transkriptome auch zahlreiche Unterschiede. So werden viele Gene, die während einer Infektion einer starken Regulation unterliegen, in der IMD-vermittelten Immunantwort nicht oder konstitutiv transkribiert (Abb. 3.29).

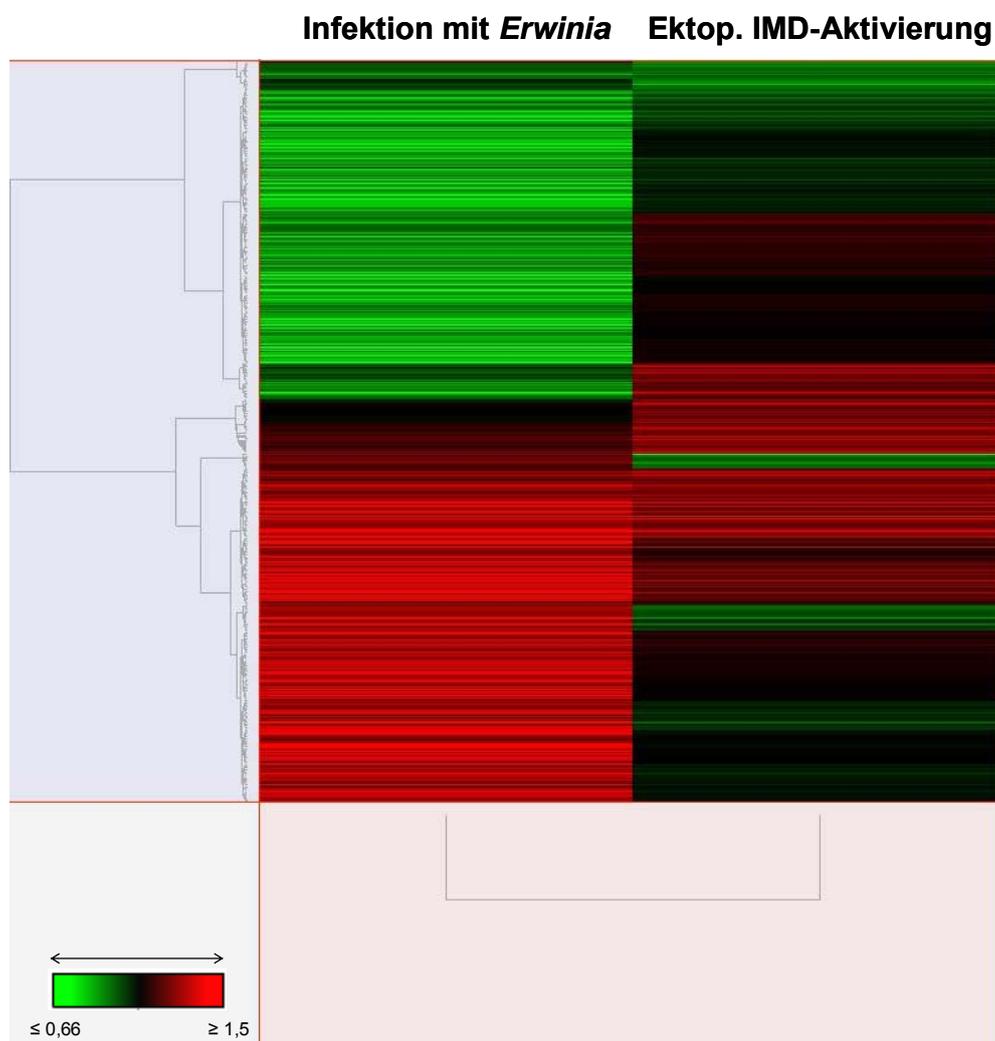


Abb. 3.29: Graphische Darstellung der hierarchischen „Cluster-Analyse“ generiert anhand der Expressionsdaten des Infektionstranskriptoms und des ektopisch induzierten IMD-Transkriptoms. Die Datensätze aus der hierarchischen Cluster-Analyse sind in Form einer modifizierten „Heat-Map“ dargestellt, in die alle signifikant regulierten Gene der beiden Mikroarray-Projekte einfließen. Für die Transkriptionsanalyse der IMD-induzierten Immunantwort wurden transheterozygote Tracheen des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE verwendet.

Um all die Gene im larvalen Atemwegsepithel zu identifizieren, die im Rahmen einer Infektion einer Regulation durch den IMD-Signalweg unterliegen, wurden Venn-Diagramme erstellt, in die die regulierten Gene des Infektionstranskriptoms bzw. des ektopisch induzierten IMD-Transkriptoms einfließen. Im Fall der verstärkt exprimierten Gene wurde das Diagramm zusätzlich anhand der klassischen Immungene erstellt, die bereits für die Auswertung des Infektionstranskriptoms herangezogen worden waren (3.3.8).

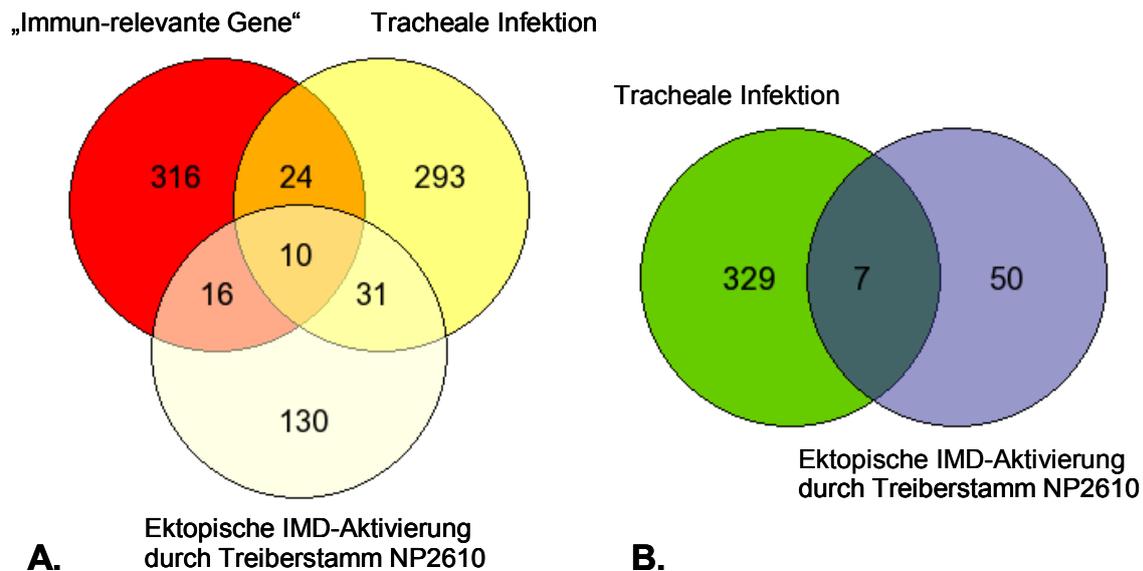


Abb. 3.30: Venn-Diagramme erstellt anhand der Genlisten signifikant regulierter Gene des Infektionstranskriptoms und des ektopisch induzierten *Imd*-Transkriptoms. (A) Venn-Diagramm für die im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimierten Gene. In dieses Venn-Diagramm fließen zusätzlich die klassischen „immun-relevanten Gene“ ein, die mit der *Drosophila*-Immunität bisher assoziiert werden. (B) Venn-Diagramm für die im larvalen Atemwegsepithel reduziert exprimierten Gene. Für die Transkriptionsanalyse der IMD-induzierten Immunantwort wurden transheterozygote Tracheen des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE verwendet.

Die Ergebnisse der Venn-Diagramme veranschaulichen deutlich, dass während einer Infektion nur wenige Gene im larvalen Atemwegsepithel eine Regulation durch den IMD-Signalweg erfahren (Abb. 3.30). Diese Beobachtung gilt sowohl für die verstärkt als auch vermindert exprimierten Gene, deren gemeinsame Genzahl bei 41 bzw. sieben liegt. Vergleicht man die 41 verstärkt exprimierten IMD-typischen Gene mit den „immun-relevanten“ Genen von *Drosophila*, fällt weiterhin auf, dass nur zehn der 41 Gene zu den Immungenen gezählt werden können. In diese Kategorie von Genen fallen lediglich vier der unter 3.3.8 bereits identifizierten klassischen Immungene der Infektion (*AttacinA*, *Defensin*, *Drosomycin-4* und *PGRP-SD*). Aber auch bei der Gegenüberstellung der „immun-relevanten“ Gene mit den ektopisch IMD-induzierten wird deutlich, dass nur ein geringer Bruchteil (26 Gene) der bereits bekannten Immungene durch den IMD-Signalweg dirigiert wird. Unter

diesen 26 teilweise annotierten Genen befinden sich 16 „immun-relevante“ Gene, die bei einer Infektion nicht verstärkt exprimiert werden. Zu ihnen zählen verschiedene antimikrobielle Peptide (AttacinC/D, CecropinA2, Diptericin, DiptericinB), der Transkriptionsfaktor des IMD-Signlwegs Relish und das Genprodukt des Eisenionenbindenden Proteins Transferrin1.

Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang auch die große Anzahl der IMD-regulierten Gene, die weder mit den „immun-relevanten“ Genen noch mit der trachealen Infektion in Verbindung gebracht werden konnte (130 Gene). Bei genauerer Betrachtung dieser Gene stellt sich heraus, dass die meisten dieser Gene an primären metabolischen Prozessen des larvalen Atemwegsepithels beteiligt sind.

Da zwischen dem Infektionstranskriptom und dem ektopisch IMD-induzierten Transkriptom nur wenige Gemeinsamkeiten existieren, konzentrierte ich mich bei der weiteren Auswertung der Datensätze auf bestehende Unterschiede in der Modulation verschiedener funktioneller Genkategorien und Signaltransduktionswege. Hierfür wurden die Genlisten der regulierten Gene beider Transkriptome mit Genen verglichen, die eine wichtige Rolle bei der Tracheenentwicklung, dem Zellzyklus und der Modulation des JAK/STAT-Signalwegs spielen. Während bei der trachealen Infektion einige Gene signifikant reguliert exprimiert werden, die mit der Tracheenentwicklung assoziiert werden können ((↑): *ventral veins lacking*, *corksrew*, *spalt major*, *headcase*, *coracle* und *walrus*, (↓): *punt*; Affolter *et al.*, 2000, Ghabrial *et al.*, 2003, Paul *et al.*, 2003), taucht im ektopisch induzierten IMD-Transkriptom bei keinem dieser Gene ein signifikanter Unterschied im Transkriptniveau auf. Ähnlich verhält es sich mit Genen, die durch den JAK/STAT-Signalweg moduliert werden. Viele seiner Zielgene unterliegen bei einer trachealen Infektion einer signifikanten Regulation ((↑): *enoki mushroom*, *samuel*, *transportin* und *ventral veins lacking*, (↓): *domeless*, *moira*, CG 13298 und CG 31324; Baeg *et al.*, 2005, Mueller *et al.*, 2005). Bei der ektopischen IMD-Aktivierung hingegen werden nur zwei der JAK/STAT-Zielgene im larvalen Atemwegsepithel schwächer transkribiert (*echinoid* und *samuel*). Betrachtet man zuletzt die Gene, die den Zellzyklus modulieren, fällt auf, dass im Gegensatz zur ektopischen IMD-Aktivierung viele dieser Gene während einer Infektion eine Regulation erfahren (Infektion: (↑) 14, (↓) 16; ektopische IMD-Aktivierung: (↑) 4, (↓) 4; Abb. 3.31).

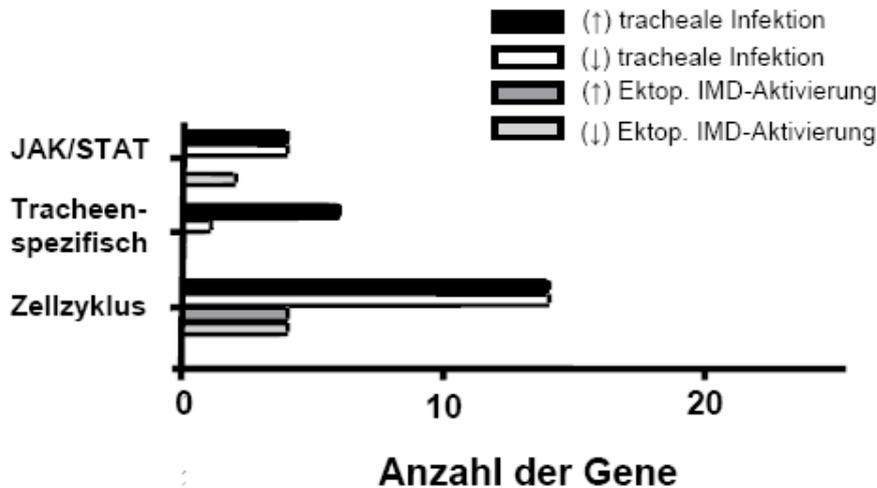


Abb. 3.31: Modulation verschiedener funktioneller Genkategorien und des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs des larvalen Atemwegsepithels nach Infektion mit *Erwinia carotovora carotovora* bzw. nach ektopischer IMD-Aktivierung. Für die Transkriptionsanalyse der IMD-induzierten Immunantwort wurden transheterozygote Tracheen des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE verwendet.

3.5.2 Die beiden ektopisch induzierten IMD-Transkriptome besitzen nur einen geringen Überlappungsbereich in ihren Expressionsmustern

Der NF- κ B-Signalweg IMD kann ektopisch durch die zwei Treiberstämme NP2610 bzw. PPK4 im Atemwegsepithel der Larve induziert werden. Beide Treiberstämme aktivieren in diesem Zusammenhang die IMD-vermittelte antimikrobielle Immunantwort, die unabhängig vom Treiberstamm in einer verstärkten Expression der sieben antimikrobiellen Peptidgene gipfelt (Abb. 3.17 und 3.22). Im Fall des Treiberstamms PPK4 geht die IMD-Aktivierung ferner mit einer phänotypischen Veränderung des Atemwegsepithels einher, die sich in einer Verdickung des gesamten Epithels äußert (Abb. 3.24).

Um das komplette Repertoire an Genen zu erhalten, das einer Regulation durch den IMD-Signalweg unterliegt, wurden Transkriptionsanalysen mit transheterozygoten Tracheen durchgeführt, die als Mutterstamm den Treiberstamm NP2610 bzw. PPK4 besaßen. In beiden Fällen wurden Tracheen als Kontrollgewebe eingesetzt, die aus Larven vergleichbaren Alters der Treiberlinie stammten. Als signifikant reguliert wurden in diesen Transkriptionsanalysen all die Gene betrachtet, deren normalisierte Expressionsdaten für das Verhältnis aus „ektopischer Aktivierung“ versus Kontrolle über 1,5 bzw. unter 0,66 lagen. Sie befinden sich, sortiert nach absteigenden log₂-Verhältnissen, in Tabelle 8.6 bzw. 8.7 im Anhang. Durch die Gegenüberstellung der beiden Transkriptome sollte das gesamte Genrepertoire der IMD-vermittelten antibakteriellen Immunantwort erfasst und die Unterschiede aufgedeckt werden, die zu der vermeintlich meta- und hyperplastischen Veränderung des Atemwegsepithels

führen. Vergleicht man die Expressionsdaten der signifikant regulierten Gene beider Transkriptome in einer modifizierten „Heat-Map“, fällt auf, dass in beiden Transkriptomen zahlreiche Gene dieselbe Regulationsrichtung erfahren. Das gilt insbesondere für die verstärkt exprimierte Gene aus der starken Überexpression, die als Mutterstamm den Treiberstamm PPK4 besaßen. Viele dieser Gene besitzen auch in der schwachen Überexpression ein ähnliches Expressionsmuster. Ein Unterschied zwischen den beiden Transkriptomen besteht in der Anzahl der signifikant regulierten Gene. So vermittelt der IMD-Signalweg im larvalen Atemwegsepithel eine signifikante Verminderung der Expression vieler Gene, wenn er durch den starken Treiberstamm PPK4 induziert wird (Abb. 3.32).

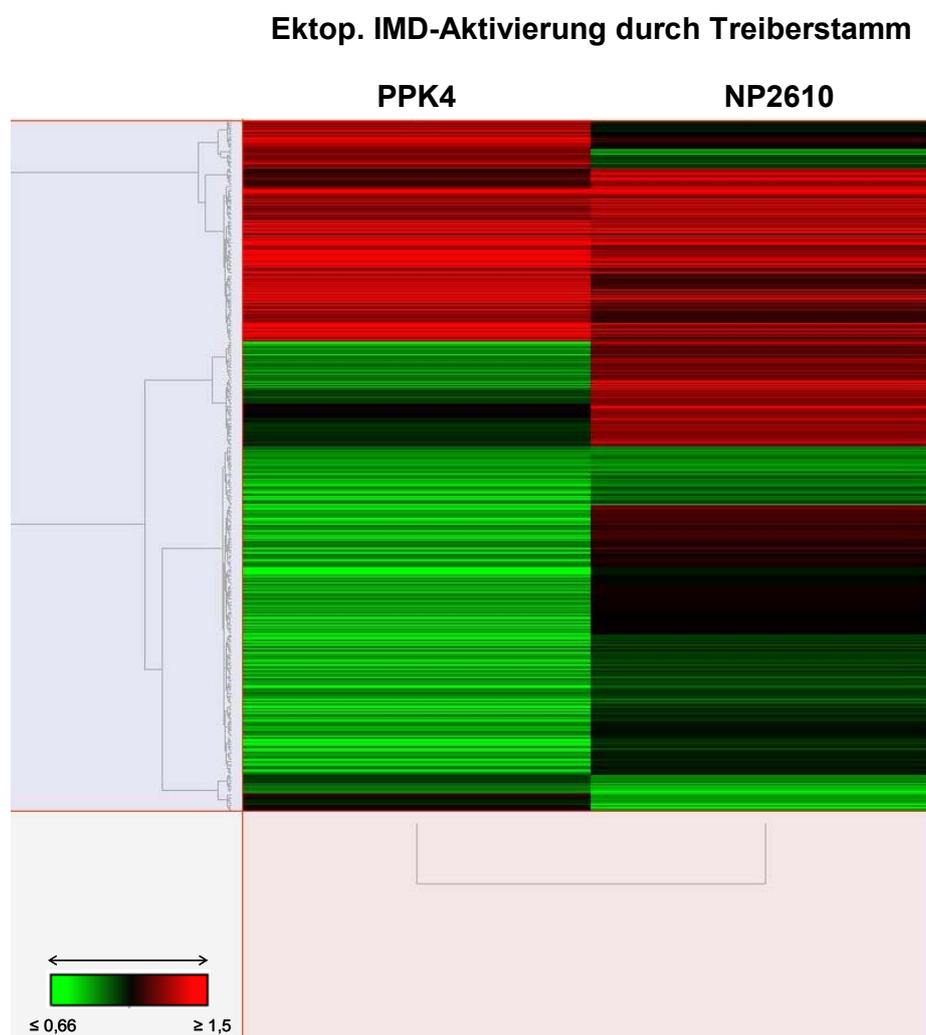


Abb. 3.32: Graphische Darstellung der hierarchischen „Cluster-Analyse“ generiert anhand der Expressionsdaten des PPK4 bzw. NP2610-induzierten IMD-Transkriptoms. Die Datensätze aus der hierarchischen „Cluster-Analyse“ sind in Form einer modifizierten „Heat-Map“ dargestellt, in die alle signifikant regulierten Gene der beiden Mikroarray-Projekte einfließen. Für die Transkriptionsanalyse wurden transheterozygote Tracheen verwendet, die aus L3-Larven der Kreuzung NP2610::UAS-PGRP-LE bzw. PPK4::UAS-PGRP-LE stammten.

Um das gesamte Repertoire an Genen zu erfassen, das während einer IMD-induzierten Immunantwort einer Regulation unterliegt, wurden Venn-Diagramme erstellt, in die die signifikant regulierten Gene beider IMD-Transkriptome einfließen (Abb. 3.33). Im Fall der verstärkt exprimierten Gene wurde das Venn-Diagramm erneut unter Einbeziehung der „immun-relevanten“ Gene von *Drosophila* erstellt (3.3.8).

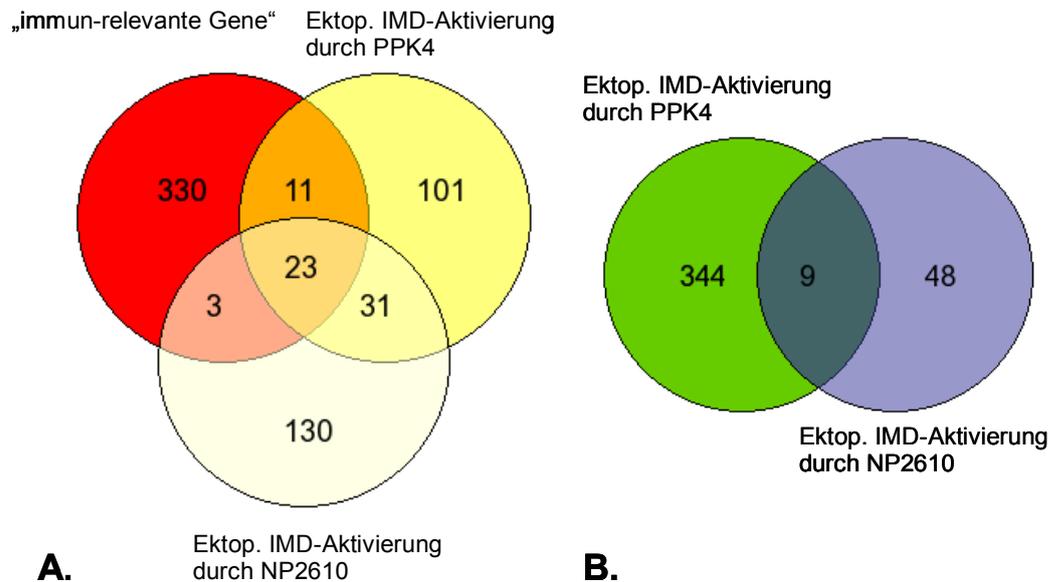


Abb. 3.33: Venn-Diagramme erstellt anhand der Genlisten signifikant regulierter Gene des PPK4 bzw. NP2610-induzierten Imd-Transkriptoms. (A) Venn-Diagramm für die im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimierten Gene. In dieses Venn-Diagramm fließen zusätzlich die klassischen „immun-relevanten Gene“ ein, die mit der *Drosophila*-Immunität bisher assoziiert werden. (B) Venn-Diagramm für die im larvalen Atemwegsepithel reduziert exprimierten Gene. Für die Transkriptionsanalysen der IMD-induzierten Immunantwort wurden transheterozygote Tracheen des Kreuzungsansatzes NP2610::UAS-PGRP-LE bzw. PPK4::UAS-PGRP-LE verwendet.

Die Venn-Diagramme in Abbildung 3.33 verdeutlichen anschaulich, dass nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen dem PPK4 bzw. NP2610-induzierten IMD-Transkriptom bestehen. Diese Beobachtung gilt insbesondere für die vermindert exprimierten Gene, deren gemeinsame Anzahl gerade mal bei neun liegt (Abb. 3.33 B). Betrachtet man die 54 Gene, die in beiden ektopischen IMD-Transkriptomen verstärkt transkribiert werden, fällt auf, dass 23 dieser Gene zu den klassischen „immun-relevanten“ Genen gezählt werden können. Die meisten dieser Gene konnten, sofern sie annotiert sind, bereits in den vorangegangenen Transkriptionsanalysen mit dem NP2610-induzierten IMD-Transkriptom in Verbindung gebracht werden (3.5.1). Da diese Gene aber auch klassische „immun-relevante“ Gene des PPK4-induzierten IMD-Transkriptoms darstellen, sind sie in diesem Zusammenhang erneut zu nennen: PGRP-SA, AttacinA (C, D), CecropinA2, Defensin, Drosomycin4, DiptericinB, Relish, Transferrin1, PebIII, Dopadecarboxylase und CG 17278. PPK4-typische IMD-Gene

(11 Gene) sind hingegen AttacinB, Drosomycin5, die gram⁺-spezifische Serin-Protease grass und die Serin-Protease7.

Allerdings reguliert der PPK4-induzierte IMD-Signalweg auch eine große Kohorte an Genen ((↑): 101, (↓): 344), die mit der IMD-vermittelten antibakteriellen Immunantwort nicht assoziiert werden kann. Auch durch intensive Betrachtung der reguliert exprimierten Gene konnten bisher keine Funktionskreise ermittelt werden, die auf den ersten Blick für die Ausprägung des Phänotyps und somit für die vermeintliche Proliferation des Epithels verantwortlich sein könnten.

3.6 Die Rolle des Transkriptionsfaktors Foxo bei der epithelialen Immunantwort des larvalen Tracheensystems

Das Atemwegsepithel der Larve erfährt nach der Infektion mit dem gram-negativen Bakterium *Erwinia carotovora carotovora* auf transkriptioneller Ebene eine Vielzahl von Veränderungen, die unter anderem in einer verstärkten Expression der Transkriptionsfaktoren Foxo und Thor münden (Abb. 3.13).

Um den Einfluss der verstärkten Foxo-Expression auf die epitheliale Immunantwort klären zu können, wurde Foxo im larvalen Atemwegsepithel ektopisch durch das binäre Gal4/UAS-System synthetisiert und der Effekt der Überexpression auf transkriptioneller und phänotypischer Ebene untersucht.

3.6.1 Der Transkriptionsfaktor Foxo reguliert im larvalen Atemwegsepithel die Expression des *drosomycin* Gens

In der epithelialen Immunantwort wird die antimikrobielle Peptidsynthese in erster Linie durch den NF-κB-Signalweg IMD reguliert, dessen Signalkaskade in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Relish endet. Um den Effekt von Foxo auf die antimikrobielle Immunantwort analysieren zu können, wurde das Expressionsniveau der einzelnen antimikrobiellen Peptidgene in Tracheen transheterozygoter Larven bestimmt, die Foxo im Atemwegsepithel verstärkt exprimierten. Tracheen aus dem Mutterstamm PPK4 fungierten auch in diesem qPCR-Experiment als Kontrolle. Die Normalisierung der qPCR-Daten erfolgte wiederholt mit dem Haushaltsgen Aktin 42A, das auch in diesem GAL4/UAS-Hintergrund keiner Regulation unterlag.

Aus den normalisierten qPCR-Daten in Abbildung 3.34 geht hervor, dass in Foxo-stimulierten Atemwegsepithelien nur das Gen des antimikrobiellen Peptids Drosomycin signifikant stärker exprimiert wird als im Kontrollepithel. Demnach erfährt das *drosomycin* Gen im Atemwegsepithel der Larve sowohl durch den IMD-spezifischen Transkriptionsfaktor Relish als auch durch den Transkriptionsfaktor Foxo eine Regulation.

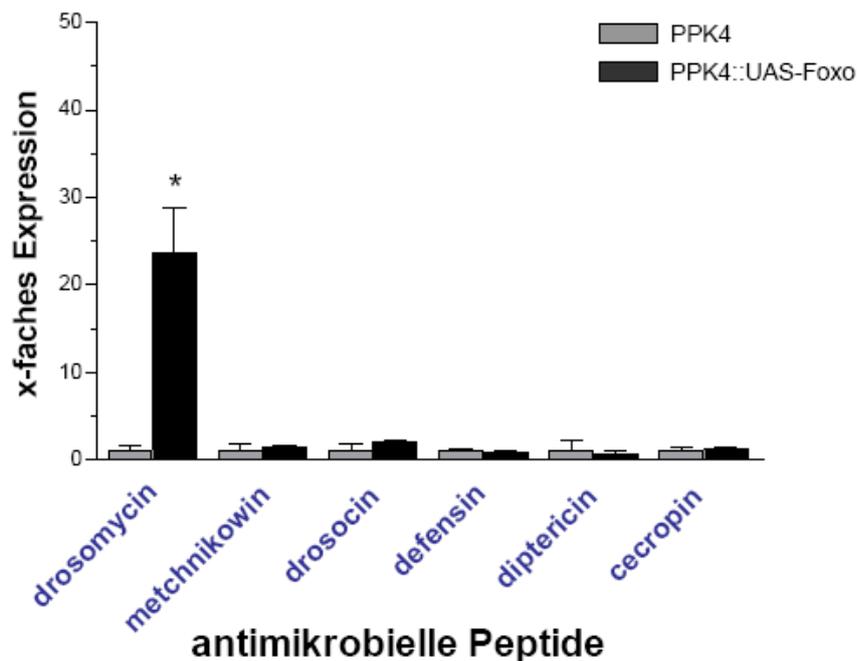


Abb. 3.34: Verstärkte Expression des antimikrobiellen Peptidgens *drosomycin* im larvalen Atemwegsepithel nach ektopischer Expression des Transkriptionsfaktors Foxo. Das Expressionsniveau der einzelnen antimikrobiellen Peptidgene wurde in der RT-qPCR bestimmt und als x-fache Expression gegenüber der Kontrolle angegeben. Um Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurden beide Proben gegen das Haushaltsgen Aktin 42A normalisiert. Die Daten der qPCR wurden anhand von drei biologischen Replikaten generiert, die aus larvalen Tracheen des Mutterstamms PPK4 und des Kreuzungsansatzes PPK4::UAS-Foxo stammten. Grauer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Mutterstamms PPK4; schwarzer Graph: Atemwegsepithel aus L3-Larven des Kreuzungsansatzes PPK4::UAS-Foxo. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (*, $p < 0,05$).

3.6.2 Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Foxo korreliert auf phänotypischer Ebene mit einer mäßigen Verdickung des larvalen Atemwegsepithels

Schon während der Präparation der transheterozygoten Larven PPK4::UAS-Foxo fiel auf, dass die Tracheen sehr fragil waren und keinem mechanischen Druck standhalten konnten. Daher wurden auch von diesen Tracheen Ultradünnschnitte angefertigt und die Schnitte in der Elektronenmikroskopie dokumentiert. Ultradünnschnitte von Tracheen des Mutterstamms PPK4 fungierten hierbei als Kontrolle.

Die EM-Schnitte in Abbildung 3.35 zeigen für die transheterozygoten Tracheen ähnlich wie für die transheterozygoten Tracheen aus der PPK4-induzierten PGRP-LE-Überexpression eine Veränderung auf phänotypischer Ebene, die sich in einer Verdickung des Epithels äußert. Auch wenn die Aufnahmen unterschiedliche Vergrößerungen aufweisen und demnach verschiedene Skalierungen zeigen, geht aus den Aufnahmen deutlich hervor, dass das transheterozygote Atemwegsepithel auf der ventralen Epithelseite circa 1,9-mal dicker ist als in der vergleichbaren Region des Kontrollepithels.

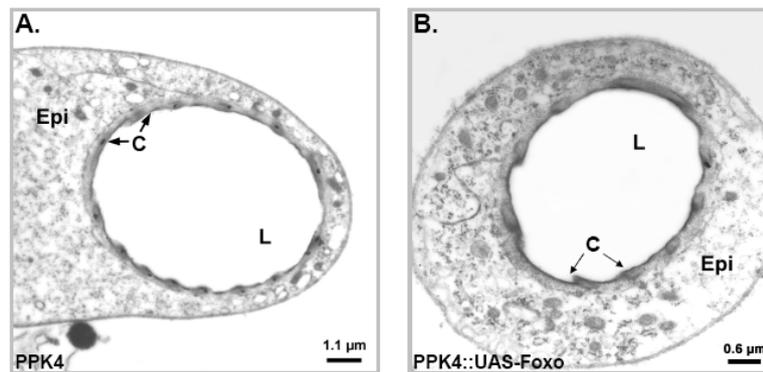


Abb. 3.35: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten einer tertiären trachealen Verzweigung des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-Foxo und seines Mutterstamms. (A) Atemwegsepithelzelle aus L3-Larve des Mutterstamms PPK4. (B) Atemwegsepithelzelle aus L3-Larve des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-Foxo. (A, B) L: Lumen; C: Cuticula und Epi: Epithel. Die Ultradünnschnitte wurden in Kooperation mit Prof. H. Fehrenbach angefertigt und von ihm in der Elektronenmikroskopie dokumentiert.

3.6.3 Der Transkriptionsfaktor Foxo wird im larvalen Atemwegsepithel bei einer Kälte-induzierten Stressantwort aktiviert

Extreme Temperaturschwankungen wie z.B. große Kälte sind neben Infektionen einer von vielen Stressoren, die zur Aktivierung des Immunsystems führen können. In diesem Zusammenhang scheint der Transkriptionsfaktor Foxo ebenfalls eine wichtige Rolle zu übernehmen. Hält man L3-Larven, die den Transkriptionsfaktor Foxo im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimieren, auf Eis, fällt auf, dass Foxo nach etwa einer Stunde vom Cytosol in den Kern transloziert und sich dort akkumuliert. Eine Visualisierung der zytosolischen bzw. nukleären Akkumulation von Foxo war in diesen transheterozygoten Larven durch einen GFP-Reporter möglich, der in den P-Element Vektor pUAST-Foxo integriert war und zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Foxo im binären Gal4/UAS-Hintergrund exprimiert wurde (Abb. 3.36).

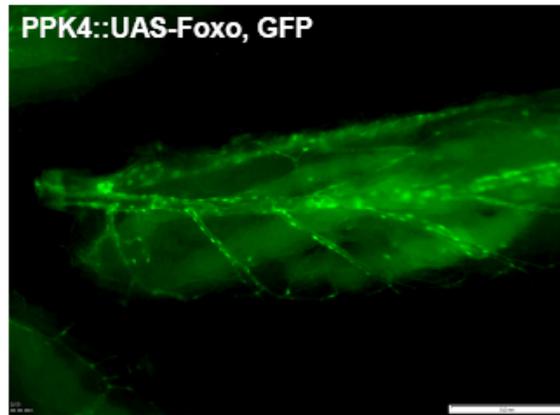


Abb. 3.36: Visualisierung der Kernlokation des Transkriptionsfaktors Foxo im larvalen Atemwegsepithel nach Kälteschock. Posteriores Ende einer L3-Larve des transheterozygoten Stamms PPK4::UAS-Foxo, GFP. Als parentale Stämme fungierten der Tracheen-spezifische Treiberstamm PPK4 und der UAS-Effektorstamm UAS-Foxo, GFP, der als P-Element den *gfp*-gekoppelten Transkriptionsfaktor *foxo* trägt. Im binären Gal4/UAS-System konnte die Foxo-Expression und Lokalisation im larvalen Atemwegsepithel durch GFP visualisiert werden.

4 Diskussion

Epithelien vermitteln den Kontakt zur Außenwelt und stellen somit ideale Eintrittsorte für unterschiedliche Klassen von Mikroorganismen dar. Effektive Abwehrmechanismen an diesen Epithelien beseitigen in der Regel die Mehrzahl der potentiellen Infektionen und verhindern eine mikrobielle Besiedelung des Epithels. Sind die epithelialen Abwehrmechanismen allerdings geschwächt, rufen Mikroorganismen Schädigungen hervor, welche die normale physiologische Funktion des Epithels nachhaltig beeinträchtigen. Eine effiziente lokale Immunabwehr verhindert jedoch nicht nur eine Schädigung des Epithels, sondern beugt durch die Eliminierung der Mikroorganismen im Epithel gleichzeitig einer Ausbreitung der Infektion im gesamten Organismus vor.

Besonders gefährdet sind die Epithelien der Atmungsorgane, da ihre Funktion erfordert, dass sie großflächig angelegt sind und in den Regionen intensivsten Gasaustauschs lediglich als einreihige Epithelbereiche vorliegen. Damit vereinen Atemwegsepithelien aufgrund ihrer physiologischen Funktion zwei Eigenschaften, die den Anforderungen eines effizienten Immunsystems diametral gegenüberstehen und eine rasche Eliminierung von Mikroorganismen erschweren.

Auch das Atemwegsepithel von *Drosophila*-Larven reagiert auf eine mikrobielle Infektion mit einer lokalen Immunreaktion. Die Infektion wird im Atemwegsepithel der Fliege insbesondere durch die mikrobizide Wirkung der antimikrobiellen Peptide (AMPs) abgewehrt (Ferrandon *et al.*, 1998). Eine entscheidende Rolle fällt bei der Regulation der AMP-Transkription dem NF- κ B-Signalweg IMD zu (Tzou *et al.*, 2000). Allerdings ist bis auf die mikrobizide Wirkung der antimikrobiellen Peptide und ihrer transkriptionellen Regulation durch den IMD-Signalweg nichts über das Immunsystem des Atemwegsepithels bekannt. Nur zwei Arbeiten hatten sich zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit rudimentär mit der epithelialen Immunität der larvalen bzw. adulten Atemwege auseinandergesetzt (Ferrandon *et al.*, 1998, Tzou *et al.*, 2000). Nach wie vor fehlte zu Beginn meiner Arbeit nahezu sämtliches Wissen über die Mechanismen der Pathogenerkennung, der Signaltransduktion und über weitere Effektormoleküle des larvalen Atemwegsepithels.

4.1 Die Immunkompetenz des larvalen Atemwegsepithels

4.1.1 Die mustererkennenden Rezeptoren

Peptidoglykanerkennungsproteine (PGRPs) bzw. Gram-negativ-bindende Proteine (GNBPs) sind in der Fliege als mustererkennende Rezeptoren maßgeblich an der Pathogenerkennung beteiligt. Auch im Atemwegsepithel fällt diesen Rezeptoren bei der Pathogenerkennung eine wichtige Rolle zu, da die Transkripte für die einzelnen mustererkennenden Rezeptoren bis auf die von PGRP-SB1/2 bzw. GGBP2 im larvalen Atemwegsepithel vertreten sind. Unter den nachgewiesenen Transkripten des Atemwegsepithels nimmt der lösliche Rezeptor PGRP-LE dabei eine Sonderstellung ein, da seine Expression im larvalen Atemwegsepithel bereits immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (Takehana *et al.*, 2004). Eine Identifizierung von PGRP-LE auf der luminalen Seite der Tracheen war durch diese immunhistochemischen Studien erst möglich (Takehana *et al.*, 2004). Ein Nachweis auf Proteinebene für die anderen mustererkennenden Rezeptoren des larvalen Atemwegsepithels steht noch aus.

Hinweise darauf, dass mustererkennende Rezeptoren im Epithel bei der Pathogenerkennung eine wichtige Rolle übernehmen, konnten Expressionsstudien mit anderen Epithelien bereits belegen. So ist auch im Epithel des Darms bzw. der Malpighischen Gefäße in Abwesenheit einer Infektion der membranständige Rezeptor PGRP-LC konstitutiv vorhanden (Zaidman-Rémy *et al.*, 2006, McGettigan *et al.*, 2005). Für das Darmepithel konnten mittels Northern Blot-Analysen außerdem die Transkripte für *pgrp-le*, *-lb* und *-sc1/2* nachgewiesen werden (Werner *et al.*, 2000).

Betrachtet man die Gesamtheit an mustererkennenden Rezeptoren des larvalen Atemwegsepithels, fällt auf, dass unter den Rezeptoren all jene vorhanden sind, die bei einer systemischen Immunantwort für die Erkennung der unterschiedlichen mikrobiellen Struktur motive verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang hält sich die Hypothese schon lange, dass für die Erkennung unterschiedlicher mikrobieller Struktur motive verschiedene Rezeptorkombinationen genutzt werden können. So besteht aufgrund des Vorhandenseins von PGRP-SA, -SD, -LC und -LE bzw. von GGBP1 und 3 auch im Atemwegsepithel die Möglichkeit, dass Peptidoglykan gram-positiver Bakterien über PGRP-SA, -SD bzw. GGBP1 und Peptidoglykan gram-negativer Bakterien über PGRP-LC oder PGRP-LE erkannt werden (Michel *et al.*, 2001, Bischoff *et al.*, 2004, Takehana *et al.*, 2004). Für das Anzeigen einer potentiellen Pilzinfektion steht dem Atemwegsepithel mit GGBP3 ein Erkennungsrezeptor für fungale Struktur motive zur Verfügung (Gottar *et al.*, 2006).

Da sich das Repertoire an mustererkennenden Rezeptoren im Atemwegsepithel der Larve sowohl aus membranständigen als auch löslichen Rezeptoren zusammensetzt, ist eine Beseitigung der Pathogene über zellautonome bzw. nicht-zellautonome Abwehrmechanismen möglich. Im Fall einer nicht-zellautonomen Abwehr kann eine Ausbreitung der Infektion auf benachbarte Atemwegsepithelzellen somit effizient verhindert werden. Der lösliche Rezeptor PGRP-LE steuert als extrazelluläres Protein im larvalen Atemwegsepithel diesen nicht-zellautonomen Effekt (Takehana *et al.*, 2004).

Unter den *pgrp*-Transkripten des larvalen Atemwegsepithels befinden sich jedoch nicht nur Transkripte, die für die klassischen Erkennungsrezeptoren kodieren. Auch *pgrp*-Transkripte wie *-lb* bzw. *-sc1b*, die Proteine mit katalytischer Domäne kodieren, sind im Atemwegsepithel der Larve vorhanden. Es wird angenommen, dass ihnen bei der intestinalen Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Peptidoglykan zukommt, um ein Überschießen der Immunreaktion zu verhindern und schnellstmöglich die Immunhomöostase wiederherzustellen (Zaidman-Rémy *et al.*, 2006, Bischoff *et al.*, 2006). Es ist nicht auszuschließen, dass auch PGRP-LB bzw. -SC1B in der Immunabwehr des larvalen Atemwegsepithels diese Funktion übernehmen. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass das Darmepithel unter den verschiedenen Epithelien eine Sonderstellung einnimmt, da der Darm über eine eigene Mikroflora verfügt, was dazu führt, dass Epithelzellen permanent mit bakteriellen Signaturen konfrontiert werden. Ein unmittelbarer Vergleich zwischen dem Epithel des Darms und dem der Atemwege ist demnach nur eingeschränkt möglich.

4.1.2 Die Toll-Rezeptoren

Im larvalen Atemwegsepithel werden neben dem Transkript für den eigentlichen Toll-Rezeptor die Transkripte *18-wheeler (toll2)*, *toll7* und *tollo (toll8)* konstitutiv exprimiert. Auch wenn die vier in den Tracheen vorhandenen Toll-Rezeptoren in anderen immun-kompetenten Organen der Larve wie z.B. dem Fettkörper ebenfalls vertreten sind (Kambris *et al.*, 2002), ist im Atemwegsepithel eine Beteiligung dieser Toll-Rezeptoren an der Immunabwehr eher unwahrscheinlich. Eine Ausnahme bildet in diesem Zusammenhang höchstens der Toll-Rezeptor selbst. Er steht dem Atemwegsepithel der Larve als potentieller Zytokin-Rezeptor zur Verfügung, da im Epithel auch das Transkript für das Zytokin Spätzle nachgewiesen werden konnte (Daten im Ergebnisteil nicht gezeigt).

Im Gegensatz zum Toll-Rezeptor scheinen die anderen nachgewiesenen Transkripte in der Immunabwehr des larvalen Atemwegsepithels eher eine untergeordnete Rolle zu übernehmen. Auch wenn *18-wheeler* zu Beginn der Erforschung der Toll-Rezeptor-Familie in der Larve

eine Funktion als Sensor einer gram-negativen Infektion zugeschrieben wurde, konnten spätere Experimente sowohl an Larven als auch an adulten Fliegen diese Hypothese nicht verifizieren (Williams *et al.*, 1997). Unterstützt wurde diese Beobachtung insbesondere durch Versuche mit adulten 18-wheeler Mutanten, die gegenüber einer Infektion mit verschiedenen Pathogenen einschließlich gram-negativer Bakterien genauso anfällig waren wie der Wildtyp (Ligoxygakis *et al.*, 2002). Ähnliches zeichnete sich für den Toll-Rezeptor Tollo ab, dessen Mutante auch nach einer Infektion mit Pilzen bzw. Bakterien dieselbe Überlebensrate aufweist wie der Wildtyp (Capovilla und Imler, unveröffentlichte Daten).

Für das Vorhandensein der drei Toll-Rezeptoren 18-wheeler, Toll7 und Tollo im larvalen Atemwegsepithel gibt es eine weitere Erklärung, die allerdings fernab von einer möglichen Funktion dieser Rezeptoren in der epithelialen Immunantwort liegt. Intensive Studien mit Mutanten für die einzelnen Rezeptoren der Toll-Rezeptor-Familie konnten zeigen, dass die meisten Toll-Rezeptoren zeit- und gewebsspezifisch während der gesamten Entwicklung der Fliege exprimiert werden. In der Larve konnten im L3-Stadium neben Toll5 auch die im larvalen Atemwegsepithel vorhandenen Transkripte für 18-wheeler, Toll7 und Tollo nachgewiesen werden (Tauszig *et al.*, 2000). Ihnen fällt eine wichtige Rolle bei der Häutung der Larve zu (Tauszig *et al.*, 2000). Da die Cuticula des Atemwegsepithels beim Übergang in das nachfolgende Larvalstadium mitgehäutet wird, ist das Vorhandensein dieser Transkripte im Atemwegsepithel der Larve nicht überraschend.

Dennoch sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass neben Toll auch Toll5 (Tehao) und Toll9 eine Rolle in der antimikrobiellen Immunantwort von *Drosophila* zugeschrieben wird. Für beide Rezeptoren konnte in Zellkulturexperimenten bereits gezeigt werden, dass ihre Überexpression in S2-Zellen zu einer verstärkten Synthese des antimikrobiellen Peptids Drosomycin führt (Tauszig *et al.*, 2000, Ooi *et al.*, 2002).

4.1.3 Die immun-relevanten Signaltransduktionswege

Im Atemwegsepithel der Larve sind die intrazellulären Signalkaskaden der immun-relevanten Signaltransduktionswege IMD, JNK und JAK/STAT vertreten. Einen funktionsfähigen Toll-Signalweg besitzt das Atemwegsepithel hingegen nicht, da dem Epithel die Transkripte für die intrazellulären Komponenten Tube, Pelle und Cactus fehlen. Die Tatsache, dass im Atemwegsepithel der Larve nur die intrazelluläre Signalkaskade des IMD-Signalwegs, nicht jedoch des Toll-Signalwegs vertreten ist, unterstützt die weitläufig anerkannte Hypothese, dass in den Epithelien nur der NF- κ B-Signalweg IMD für die Regulation der AMP-Expression verantwortlich ist (Ferrandon *et al.*, 1998, Tzou *et al.*, 2000).

Eine Erklärung für das Fehlen des Toll-Signalwegs im Atemwegsepithel der Larve findet sich bei der Betrachtung seiner mustererkennenden Rezeptoren. Da der Toll-Signalweg im Gegensatz zum IMD-Signalweg über keinen membranständigen mustererkennenden Rezeptor verfügt, bleibt seine Aktivierung nicht lokal beschränkt. Eine im Atemwegsepithel lokal auftretende Infektion wäre in Anwesenheit eines funktionsfähigen Toll-Signalwegs daher grundsätzlich mit einer Ausweitung und einem Überschießen der Immunreaktion im ganzen Atemwegsepithel der Larve verbunden.

Trotz des Fehlens eines funktionsfähigen Toll-Signalwegs sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass einige wenige Komponenten wie die Transkriptionsfaktoren Dif und Dorsal im Epithel vertreten sind. Es ist nicht auszuschließen, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren im Epithel der larvalen Atemwege auch an anderen immunologischen Regulationsmechanismen beteiligt sind.

Dass dem IMD-Signalweg bei der Regulation der AMP-Expression im Atemwegsepithel eine entscheidende Rolle zufällt, zeigten nicht zuletzt Studien, die mit infizierten Mutanten für das Adaptorproteingen *imd* durchgeführt wurden (Tzou *et al.*, 2000). Seit diesen Studien galt der IMD-Signalweg als alleiniger Regulator der epithelialen AMP-Expression. Da der IMD-Signalweg jedoch über dTAK1 mit dem MAP-Kinase Signalweg JNK verknüpft ist, und dem JNK-Signalweg seit kurzem in der Regulation der systemischen AMP-Expression eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird, ist nicht auszuschließen, dass in infizierten Bereichen des Atemwegsepithels die Regulation der AMP-Expression auch durch den JNK-Signalweg erfolgt (Delaney *et al.*, 2006).

Da der JAK/STAT-Signalweg in der systemischen Immunabwehr bisher eine untergeordnete Rolle zu übernehmen scheint, ist eine Einordnung in Funktionskreise der epithelialen Immunabwehr schwierig. Aufgrund des Vorhandenseins seiner intrazellulären Signalkaskade in den Atemwegen der Larve steht er dem Epithel als potentieller antiviraler Signalweg zur Verfügung (Dostert *et al.*, 2005).

4.1.4 Die immun-relevanten Transkriptionsfaktoren

Die Promotorregionen vieler immun-relevanter Gene enthalten neben NF- κ B-Bindestellen auch GATA-Bindestellen. Auch in den regulatorischen Regionen vieler antimikrobieller Peptidgene konnten bereits Bindestellen für beide Klassen von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Senger *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass im Atemwegsepithel der Larve die Transkripte für alle drei NF- κ B Faktoren (Dorsal, Dif, Relish) und drei der fünf GATA-

Faktoren (pannier, grain, GATAd) vertreten sind, lässt vermuten, dass beide Klassen von Transkriptionsfaktoren auch im Atemwegsepithel der Larve die AMP-Expression regulieren. Unterstützt wird diese Vermutung insbesondere durch Infektionsexperimente, die mit *Erwinia carotovora* am Darm durchgeführt wurden. In diesen Experimenten konnte anschaulich gezeigt werden, dass die induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids Metchnikowin im Epithel des Vorderdarms synergistisch durch Relish und GATAe reguliert wird (Senger *et al.*, 2006). GATAe ist allerdings nicht der einzige GATA-Faktor, der im Darmepithel exprimiert wird. Genauso wie im Atemwegsepithel konnten im Epithel des Darms die Transkripte für grain und GATAd in verschiedenen Bereichen detektiert werden (Senger *et al.*, 2006). Auch wenn GATAe im Atemwegsepithel der Larve nicht nachgewiesen werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass einer der anderen im Atemwegsepithel vertretenen GATA-Transkripte die Funktion von GATAe übernimmt.

Für die erfolgreiche Transkription der antimikrobiellen Peptidgene sind die NF- κ B Faktoren mitverantwortlich. In diesem Zusammenhang fällt dem NF- κ B Faktor Relish eine bedeutende Rolle zu, da er der zentrale Transkriptionsfaktor des IMD-Signalwegs ist (Dushay *et al.*, 1996, Hedengren *et al.*, 1999), und der IMD-Signalweg als einziger NF- κ B-Signalweg im Atemwegsepithel vollständig vertreten ist. Seine Beteiligung an der Regulation der induzierbaren AMP-Expression ist im Atemwegsepithel von *Drosophila* unerlässlich (Tzou *et al.*, 2000). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass auch die anderen beiden NF- κ B Faktoren Dorsal und Dif die AMP-Transkription im Epithel der Atemwege kontrollieren. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Tatsache, dass einige auch im Epithel der Atemwege induziert exprimierte antimikrobielle Peptide in ihren Promotorregionen sowohl über Relish- als auch über Dorsal/Dif-Bindestellen verfügen. Ein besonderes Augenmerk fällt hierbei auf die beiden antimikrobiellen Peptidgene *drosomycin* und *defensin*, für die in der Zellkultur bereits gezeigt werden konnte, dass ihre Expression synergistisch durch Relish und Dif bzw. Dorsal kontrolliert wird (Han *et al.*, 1999, Tanji *et al.*, 2007).

4.1.5 Die konstitutiven Abwehrmechanismen

Das larvale Atemwegsepithel verfügt sowohl über konstitutive als auch induzierbare Abwehrmechanismen, um Mikroorganismen und ihre Abbauprodukte erfolgreich zu eliminieren. Für die konstitutive Abwehr stehen dem Atemwegsepithel der Larve eine Reihe von antimikrobiellen Peptiden (AttacinA, Defensin, Diptericin, Drosomycin und Metchnikowin) und Lysozymen zur Verfügung (LysS, LysB und LysX), die im Epithel der Atemwege geringfügig exprimiert werden. Aufgrund der Ausstattung mit einer Vielzahl von

konstitutiv exprimierten Effektormolekülen verhält es sich mit dem Atemwegsepithel der Larve demnach ähnlich wie mit dem Epithel der menschlichen Atemwege. Auch im Atemwegsepithel der Lunge werden antimikrobielle Peptide und Lysozyme konstitutiv exprimiert, um Mikroorganismen sofort nach Eintritt in die Atemwege zu eliminieren (Bals *et al.*, 2004). Da sich unter den geringfügig exprimierten AMPs antimikrobielle Peptide mit unterschiedlicher Wirkspezifität befinden (Lemaitre *et al.*, 1997), können im Atemwegsepithel der Larve verschiedene Klassen von Mikroorganismen abgewehrt werden, noch bevor das epitheliale Immunsystem aktiviert wird.

Allerdings verhindern diese konstitutiv exprimierten Effektormoleküle durch ihre mikrobizide Wirkung nicht nur die mikrobielle Besiedelung des Epithels. Da während des Abtötens der Mikroorganismen hoch immunogene Fragmente wie z.B. Peptidoglykan freigesetzt werden, tragen die konstitutiv exprimierten Effektormoleküle im larvalen Atemwegsepithel sicherlich auch indirekt zur Aktivierung der induzierbaren Abwehrmechanismen bei. Antimikrobielle Peptide sind somit auch an der Prozessierung von mikrobiellen Strukturmotiven beteiligt. Diese indirekte Funktion der AMPs erklärt unter anderem auch die Freisetzung von Peptidoglykan (PGN) aus gram-negativen Bakterien, das in der Fliege im Gegensatz zum Lipopolysaccharid ein hoch immunogenes mikrobielles Strukturmotiv darstellt (Kaneko *et al.*, 2004). Da sich das PGN von gram-negativen Bakterien unter der Lipopolysaccharidschicht befindet, ist es für die mustererkennenden Rezeptoren in der Regel erst zugänglich, wenn die Bakterien lysiert werden.

Neben den konstitutiv exprimierten AMPs und Lysozymen verfügt das Epithel der larvalen Atemwege über eine Reihe verschiedener antioxidativer Enzyme. Da die luminale Seite des Atemwegsepithels den höchsten Sauerstoffpartialdrücken im Körper ausgesetzt ist, und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale direkt über die Luft aufgenommen werden, ist die große Zahl an antioxidativen Enzymen (zwei Superoxid-Dismutasen, vier Peroxidasen, eine Katalase) im Epithel der larvalen Atemwege nicht überraschend. Sie werden im Epithel der Atemwege höchstwahrscheinlich in dieser Vielzahl exprimiert, um das Epithel vor nachhaltigen Schädigungen durch ROS zu schützen. Welche Rolle die antioxidativen Enzyme bei der epithelialen Immunabwehr allerdings übernehmen, ist bisher unklar.

Dem Atemwegsepithel steht für die unmittelbare Abwehr von Mikroorganismen auch das ROS-bildende Enzym Duox zur Verfügung. Duox nimmt in der intestinalen Immunabwehr eine Schlüsselrolle ein, da Duox im Darm der Hauptlieferant von reaktiver Sauerstoffspezies

ist und bei einer mikrobiellen Infektion verstärkt exprimiert wird, um Mikroorganismen durch ROS abzutöten (Ha *et al.*, 2005). Im larvalen Atemwegsepithel wird Duox allerdings nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* nicht verstärkt produziert. Eine Erklärung für die konstitutive, aber nicht induzierbare Expression liegt möglicherweise in der Struktur des Atemwegsepithels begründet, das im Gegensatz zum Darm einschichtiger Natur ist und luminal nicht über eine schützende peritrophe Membran verfügt. Eine erhöhte Menge an endogenem ROS würde das Atemwegsepithel der Larve eher nachhaltig schädigen, statt vor Mikroorganismen schützen. Dass Duox bei der konstitutiven epithelialen Abwehr eine wichtige Rolle zufällt, unterstützen auch Studien, die am Epithel der menschlichen Atemwege durchgeführt wurden. Sie konnten zeigen, dass (h)Duox auf der luminalen Seite der Bronchialzellen konstitutiv exprimiert wird, und der Hauptlieferant von endogener reaktiver Sauerstoffspezies ist (Superoxid-Anion bzw. H_2O_2 ; Schwarzer *et al.*, 2004, Forteza *et al.*, 2005).

Vor einer mikrobiellen Besiedelung des Atemwegsepithels schützt aber nicht nur Duox bzw. die von ihm produzierte reaktive Sauerstoffspezies. Ein viel wichtigeres Gen in diesem Zusammenhang ist das *transferrin*-Gen, das im larvalen Atemwegsepithel zu den am stärksten konstitutiv transkribierten Genen gehört (Tabelle 8.1 (1) im Anhang). Da bekannt ist, dass Transferrin an der Komplexierung von Eisen beteiligt ist, und Eisen gleichzeitig für das mikrobielle Wachstum essentiell ist, trägt seine konstitutive Expression sicherlich zum amikrobiellen Milieu im Atemwegsepithel der Larve bei, indem es Eisen bindet und es somit den Mikroorganismen für das Wachstum entzieht (Yoshiga *et al.*, 1999).

4.2 Die Immunantwort des larvalen Atemwegsepithels

Die Atemwege der Larve können von verschiedenen Klassen von Mikroorganismen infiziert werden. Vom Grad der Pathogenität hängt unter anderem ab, inwieweit das Epithel vom Mikroorganismus besiedelt und infiziert werden kann und ob Abwehrmechanismen den Infektionsherd erfolgreich beseitigen können. Auch für *Drosophila* sind zahlreiche Mikroorganismen unterschiedlich infektiös. Im Fall der Atemwege konnte die unterschiedliche Infektiosität der einzelnen Mikroorganismen am Grad der im Atemwegsepithel ausgelösten Immunantwort festgemacht werden. Dabei zeigten die natürlicherweise nicht als *Drosophila*-Pathogene vorkommenden Erreger (*C. albicans*, *E. coli* und *S. aureus*) in Infektionsexperimenten mit GFP-Reporterstämmen eine stereotypische und mosaikartige Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel an. Sie war ausschließlich auf das Epithel der Stigmen und das der unmittelbar angrenzenden primären Äste begrenzt. Eine

Ausweitung der Immunantwort auf sämtliche Verzweigungstypen bzw. auf das gesamte Epithel des Tracheensystems war nur bei einer Infektion mit dem natürlich vorkommenden Pathogen *Erwinia carotovora carotovora* zu beobachten. Dass *Erwinia carotovora* für *Drosophila* pathogen ist, zeigten nicht nur Infektionsexperimente bei Larven sondern auch Studien, die die Identifizierung von zwei Virulenzfaktoren erst ermöglichten (Basset *et al.*, 2000, 2003).

4.2.1 Zellautonome versus nicht-zellautonome Abwehr

Dem Atemwegsepithel der Larve stehen zellautonome und nicht-zellautonome Abwehrmechanismen zur Verfügung. Im Fall der zellautonomen Abwehr bleibt die Immunreaktion auf den Ort der Infektion und somit auf die Stigmen beschränkt, während sie sich bei der nicht zell-autonomen Abwehr auf weite Bereiche oder auf das gesamte Atemwegsepithel erstreckt.

Grundvoraussetzung für diese beiden unterschiedlichen Formen der Abwehr ist das Vorhandensein von sowohl membranständigen als auch löslichen mustererkennenden Rezeptoren. Würde das Atemwegsepithel nur über einen der beiden Rezeptortypen verfügen, wäre die Immunreaktion entweder auf den Ort der Infektion beschränkt oder würde sich stets auf weite Bereiche des Atemwegsepithels ausbreiten. Ein Abstimmen der Immunreaktion auf den Grad der Infektion wäre somit nicht möglich. Diese Beobachtung verdeutlicht nochmals die zentrale Rolle des IMD-Signalwegs in der epithelialen Immunität, da nur der IMD-, nicht aber der Toll-Signalweg, sowohl über membranständige als auch lösliche mustererkennende Rezeptoren verfügt. Für den löslichen Rezeptor PGRP-LE konnte bereits gezeigt werden, dass -LE einen nicht-zellautonomen Effekt auf das Atemwegsepithel hat (Takehana *et al.*, 2004). Als potentieller membranständiger Rezeptor für das Auslösen einer lokal begrenzten Immunreaktion, kommt PGRP-LC in Frage, da PGRP-LC auch im Atemwegsepithel den IMD-Signalweg ektopisch aktivieren kann (Wagner *et al.*, unveröffentlicht). Ein experimenteller Nachweis für den zellautonomen Effekt von PGRP-LC auf das Epithel der larvalen Atemwege steht jedoch noch aus.

4.2.2 Das „Priming“ der Immunantwort

Eine Vielzahl von Genen unterliegt im larvalen Atemwegsepithel nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* einer signifikanten Regulation. Auch die Gene von zwei membranständigen mustererkennenden Rezeptoren (PGRP-LA, PGRP-LF) werden nach

Pathogenkontakt im Epithel der larvalen Atemwege verstärkt exprimiert. Beide membranständigen PGRPs verfügen über keine katalytische Domäne und fungieren im larvalen Atemwegsepithel somit als klassische Erkennungsrezeptoren für Pathogene und ihre Struktur motive (Werner *et al.*, 2000, 2003). Das *pgrp-la* Gen wird jedoch nicht nur bei einer Infektion verstärkt transkribiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass bei einer ektopischen Aktivierung des IMD-Signalwegs, *pgrp-la* in den larvalen Atemwegen ebenfalls verstärkt exprimiert wird. Demnach ist die erhöhte Transkription von *pgrp-la* nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* IMD-abhängig und wird durch den IMD-Signalweg positiv reguliert. Von Zaidman-Rémy *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass der IMD-Signalweg die Expression von einzelnen *pgrp*-Gene reguliert (Zaidman-Rémy *et al.*, 2006). Welches Strukturmotiv PGRP-LA erkennt, ist nach wie vor unklar und somit bleibt auch offen, ob PGRP-LA der zentrale mustererkennende Rezeptor für das Anzeigen einer *Erwinia* Infektion ist.

Da das Gen des Transkriptionsfaktors Relish eine erhöhte Transkriptionsrate aufweist, führt die verstärkte Expression einzelner mustererkennender Rezeptoren auch im larvalen Atemwegsepithel zu einem „Priming“ der Immunantwort und demnach zu einer verstärkten Aktivierung des IMD-Signalwegs. Inwieweit beide Rezeptoren das „Priming“ der Immunantwort im larvalen Atemwegsepithel initiieren, bleibt offen. Allerdings nimmt der Rezeptor PGRP-LF in diesem Prozess eher eine untergeordnete Rolle ein, da für seine intrazelluläre Domäne postuliert wird, dass sie aufgrund ihrer geringen Größe an intrazellulären Signalvorgängen nicht beteiligt sein kann (Persson *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu PGRP-LA nimmt PGRP-LF unter den Peptidoglykanerkennungsrezeptoren eine Sonderstellung ein. Dies beruht nicht nur auf der geringen Größe seiner intrazellulären Signaldomäne, sondern auch auf der Tatsache, dass PGRP-LF über zwei extrazelluläre PGRP-Domänen verfügt, die im Gegensatz zu den anderen PGRPs unterschiedliche Formen von Peptidoglykan erkennen und binden können (Persson *et al.*, 2007). Da eine Überexpression von PGRP-LF in Anwesenheit von Mikroorganismen in der Zellkultur zu einer reduzierten Transkription der beiden antimikrobiellen Peptidgene *attacin* und *cecropin* führt, wird von Persson *et al.* für PGRP-LF eine Funktion als negativer Regulator des IMD-Signalwegs postuliert (Persson *et al.*, 2007). Unterstützt wird dieses Postulat von früheren Zellkulturstudien von Werner *et al.*, die zeigen konnten, dass eine „Loss-of-function“-Mutation von PGRP-LF nach Zugabe eines mikrobiellen Stimulus zu einer erhöhten Transkription einiger antimikrobieller Peptidgene führt (Werner *et al.*, 2003). Für den IMD-Signalweg sind bereits zahlreiche Gene bekannt, die den IMD-Signalweg negativ regulieren

und somit ein Abstimmen der Immunantwort auf den Infektionsverlauf ermöglichen (Khush *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2006). Allerdings beziehen sich diese Erkenntnisse nur auf die systemische Immunreaktion. Doch gerade für das sehr fein strukturierte und einschichtige Atemwegsepithel scheint eine Abstimmung der Immunantwort notwendig zu sein, um eine nachhaltige Schädigung des Epithels durch eine zu „aggressive“ Immunreaktion zu verhindern. Eine Abstimmung der Immunantwort über PGRP-LF scheint aufgrund seiner verstärkten Expression im larvalen Atemwegsepithel möglich zu sein. In diesem Zusammenhang wird für PGRP-LF spekuliert, dass er immunogenes Peptidoglykan neutralisiert, indem es beiden extrazellulären Domänen abfangen und binden (Persson *et al.*, 2007).

Bei einer Infektion der larvalen Atemwege mit *Erwinia carotovora* werden neben PGRP-LA und PGRP-LF noch zwei weitere mustererkennende Rezeptorgene (*pgrp-sa* und *gnbp3*) verstärkt exprimiert. Auf den ersten Blick erscheint die verstärkte Transkription dieser beiden Rezeptorgene verwirrend, da aufgrund ihrer Affinität zu gram-positivem Peptidoglykan bzw. β -1,3-Glucan eine gram-negative Infektion über sie nicht angezeigt werden kann (Michel *et al.*, 2001, Gottar *et al.*, 2006). Strukturanalysen aus den letzten Jahren haben allerdings ergeben, dass PGRPs nicht nur DAP- und Lys-Typ Peptidoglykan erkennen und binden können (Stenbak *et al.*, 2004). Es ist durchaus möglich, dass beide Rezeptoren auch im Epithel der larvalen Atemwege nicht nur die bereits bekannten mikrobiellen Struktur motive erkennen können. Auch diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das Immunsystem der Fliege für die Erkennung der verschiedenen Pathogene unterschiedliche Rezeptorkombinationen nutzt.

4.2.3 Die antimikrobielle Abwehr

Im Rahmen der Infektion mit *Erwinia carotovora* werden drei verschiedene antimikrobielle Peptide (Drosomycin, Drosocin und Metchnikowin) verstärkt synthetisiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Tzou *et al.* weitgehend überein, die im Rahmen von aufwendigen Infektionsexperimenten mit GFP-Reporterlinien erzielt werden konnten (Tzou *et al.*, 2000). Eine Ausnahme bildet in diesem Fall das antimikrobielle Peptid Metchnikowin, für das erst in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass es nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* in den Atemwegen der Larve verstärkt synthetisiert wird.

Interessanterweise besitzen diese drei im larvalen Atemwegsepithel verstärkt exprimierten antimikrobiellen Peptide unterschiedliche Wirkspektren (Lemaitre *et al.*, 1997). In diesem

Zusammenhang ist Drosocin das einzige antimikrobielle Peptid, das eine Wirksamkeit gegenüber gram-negativen Bakterien und demnach *Erwinia carotovora* besitzt (Lemaitre *et al.*, 1997). Die starke Expression von Drosomycin im Rahmen der Infektion erscheint auf den ersten Blick demnach völlig überflüssig, da sich die mikrobizide Wirkung dieses antimikrobiellen Peptids explizit gegen Pilze und nicht gegen gram-negative Bakterien richtet (Lemaitre *et al.*, 1997). Eine Erklärung für die starke Expression von Drosomycin im Atemwegsepithel trotz Abwesenheit einer Pilzinfektion liefert die Hypothese von Hancock und Scott, die eine synergistische Wirkung für antimikrobielle Peptide unterschiedlicher Wirksamkeit postuliert, um die mikrobizide Wirkung gegen Pathogene zu erhöhen (Hancock *et al.*, 2000).

Die Hypothese von Hancock und Scott liefert aber nicht die einzige Erklärung für die verstärkte Expression von Drosomycin und Metchnikowin im infizierten Atemwegsepithel. Wie aus Studien mit Wirbeltieren bekannt ist, übernehmen antimikrobielle Peptide bei einer Immunreaktion nicht nur eine mikrobizide Funktion. Sie können gleichzeitig als Chemokine und Zytokine fungieren und an Entzündungs- und Wundheilungsprozessen beteiligt sein (Bals *et al.*, 2004). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass auch im Rahmen einer Immunantwort in den Atemwegen Drosomycin und Metchnikowin diese Funktion übernehmen und deshalb verstärkt exprimiert werden.

Die Transkription der AMP-Gene *drosomycin*, *drosocin* und *metchnikowin* wird bei einer Infektion mit *Erwinia carotovora* im larvalen Atemwegsepithel IMD-abhängig reguliert. Das beweisen in erster Linie die Ergebnisse aus den Überexpressionsstudien, in denen unabhängig vom Treiberstamm alle Vertreter der einzelnen AMP-Genklassen verstärkt exprimiert werden. Demnach übernimmt der IMD-Signalweg in der epithelialen Abwehr zusätzlich die Regulation von antimikrobiellen Peptidgenen, die bei einer systemischen Immunantwort klassische Zielgene des Toll-Signalwegs sind (Lemaitre *et al.*, 1997). Die anerkannte Hypothese, dass bei einer epithelialen Immunantwort der IMD-Signalweg die induzierbare AMP-Expression übernimmt, wird durch diese Daten erneut unterstützt (Tzou *et al.*, 2000).

Im Fall des antimikrobiellen Peptids Drosomycin ist aber nicht nur eine transkriptionelle Regulation durch den IMD-Signalweg möglich. Da *drosomycin* als einziges AMP-Gen bei einer Überexpression von Foxo verstärkt transkribiert wird, reguliert auch der Transkriptionsfaktor Foxo die Expression von *drosomycin*. Promotorstudien über potentielle Foxo-Bindestellen im *drosomycin* Gen liegen allerdings noch nicht vor.

4.2.4 Überlebensstrategien des larvalen Atemwegsepithels

Lang anhaltende Immunreaktionen führen zu chronischen Entzündungsprozessen, die körpereigenes Gewebe nachhaltig schädigen können. Um die Immunreaktion abzuschalten und die Schädigung eines Gewebes längerfristig zu verhindern, leiten Zellen häufig Apoptose ein. Auch im larvalen Atemwegsepithel werden nach einer Infektion mit *Erwinia carotovora* einige pro-apoptotische Gene verstärkt exprimiert (*Atg1*, *debcl*, *wrinkled*, *salvador*, *larp* und *Ice*; Scott *et al.*, 2007, Meier *et al.*, 2000, Tapon *et al.*, 2002). Allerdings wirkt sich die verstärkte Expression dieser Gene nicht auf phänotypischer Ebene aus, da in keinem Bereich der infizierten Atemwege, apoptotische Prozesse zu beobachten waren. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der apoptotischen Zellen in immun-reaktiven Bereichen des Atemwegsepithels liefert eine weitere Gruppe von verstärkt exprimierten Genen, die als „Survival“-Gene bekannt sind, und das Überleben der geschädigten Zellen garantieren. Das Entgegenreten apoptotischer Prozesse mit einer verstärkten Expression verschiedener „Survival“-Gene erscheint insbesondere für das Atemwegsepithel äußerst bedeutend zu sein, da das Epithel seine physiologische Funktion nur dann vollständig entfalten kann, wenn das einschichtige Epithel über eine große Fläche intakt bleibt.

Unter den verstärkt exprimierten „Survival“-Genen befinden sich unter anderem der Transkriptionsfaktor Foxo und der Translationsregulator Thor. Von Jünger *et al.* wurde bereits postuliert, dass der Transkriptionsfaktor Foxo und seine Zielgene Zellen vor oxidativem Stress schützen (Jünger *et al.*, 2003). Dass Foxo bei einer Stressantwort aktiviert wird, belegen auch die Reporterstudien, die im Rahmen dieser Arbeit mit „gain-of-function“-Mutanten durchgeführt wurden. Allerdings wurde diese Stressantwort nicht durch eine Infektion sondern durch Kälte induziert. Welche Rolle der Transkriptionsfaktor Foxo bei der Immunantwort genau einnimmt und welches Genrepertoire er reguliert, ist bisher allerdings unklar. Eines seiner möglichen Zielgene stellt der Translationsregulator Thor dar, da das *thor*-Gen über Foxo-Bindestellen in seiner Promotorregion verfügt und gleichzeitig bei einer bakteriellen Infektion systemisch verstärkt exprimiert wird (Bernal *et al.*, 2000).

Unterstützt werden Foxo und Thor in ihrer Funktion als „Survival“-Gene womöglich von verschiedenen Glutathion-S-Transferasen (GST-D1, -D2, -D3, -D9 und -E7). Sie entfernen eine große Vielzahl von Fremdstoffen, die das Atemwegsepithel nachhaltig schädigen können und verhindern dadurch indirekt auch die Einleitung von apoptotischen Prozessen. Unterstützt wird diese Erklärung durch Ergebnisse, die am *Drosophila* Parkinson-Modell erzielt werden konnten. Diese Studien konnten zeigen, dass eine GST-Überexpression im Gehirn die Überlebensrate von dopaminergen Neuronen in bestimmten Gehirnarealen so moduliert, dass

viele dieser Neurone nicht in Apoptose übergehen (Whitworth *et al.*, 2005). Eine direkte Verbindung zwischen Atemwegserkrankungen und einer Beteiligung von GSTs deckte insbesondere die Populationsstudie von Imboden *et al.* auf, die zeigen konnte, dass bei einer erhöhten Atemwegsüberempfindlichkeit die Prävalenz, an Asthma bronchiale zu erkranken, zunimmt, wenn für die im Atemwegsepithel am stärksten exprimierte Glutathion-S-Transferase (GSTP1) ein seltener Polymorphismus vorliegt (Imboden *et al.*, 2007). Da Glutathion-S-Transferasen auch im NP2610-induzierten IMD-Transkriptom unter den verstärkt exprimierten Genen auftauchen (GST-E1, -E6 und -E7), stellt der IMD-Signalweg einen der zentralen Regulatoren der GST-Expression dar. Die Aktivierung von NF- κ B im Rahmen der Infektion führt demnach nicht nur zu einer verstärkten Expression der verschiedenen Effektormoleküle, sondern gleichzeitig auch zur Aktivierung eines Überlebensprogramms, das Apoptose verhindert. Unterstützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen an Atemwegsepithelien fötaler Mäuse, die zeigen konnten, dass eine verstärkte epitheliale NF- κ B-Aktivierung die Zellen vor Apoptose schützt (Londhe *et al.*, 2008).

4.2.5 Wundheilungsprozesse im larvalen Atemwegsepithel

Chronische externe Reize wie Allergene oder Pathogene sowie lang anhaltende Entzündungsreaktionen schädigen das Atemwegsepithel des Menschen nachhaltig und initiieren gleichzeitig ein Wundheilungsprogramm in den Atemwegen, bei dem das verletzte Epithel durch neues ersetzt und untereinander vernetzt wird. Sinn und Zweck dieses Wundheilungsprozesses ist die Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion. Experimentelle Studien an Mäusen mit Asthma-ähnlichen Symptomen haben gezeigt, dass am Wundheilungsprozess der Atemwege und demnach auch an der Wundheilung des Atemwegsepithels viele Reparaturmoleküle beteiligt sind, die bereits im Fötus für die Entwicklung der Lunge und insbesondere für die Verzweigung der Atemwege verantwortlich sind (Bousquet *et al.*, 2000, Kasper *et al.*, 2000). Auch während der Infektion mit *Erwinia carotovora* wird im larvalen Atemwegsepithel eine Reihe von Genen verstärkt transkribiert, die mit der Tracheenentwicklung assoziiert werden können (*ventral veins lacking*, *corksrew*, *spalt major*, *headcase*, *coracle* und *walrus*; Affolter *et al.*, 2000, Ghabrial *et al.*, 2003, Paul *et al.*, 2003). Wenn der Wundheilungsprozess die Reaktivierung von entwicklungsbiologischen Prozessen beinhaltet, gibt eine verstärkte Transkription von Tracheenentwicklungsspezifischen Genen in den larvalen Atemwegen einen ersten Hinweis auf Wundheilungsprozesse, die als Folge der Infektion ablaufen. Da die Tracheenentwicklungs-

spezifischen Gene nur für das Infektionstranskriptom nicht jedoch für das NP2610-induzierte IMD-Transkriptom charakteristisch sind, werden Prozesse der „Wundheilung“ im Fall des schwachen Treiberstamms (NP2610) nicht vom IMD-Signalweg reguliert.

Die Reparaturprozesse im Atemwegsepithel sind abhängig vom Grad der Verletzung. Bei der schweren und teilweise auch milden Form des Asthma bronchiale äußert sich die Schädigung des Atemwegsepithels unter anderem in einer Schwellung und Ablösung der Epithelzellen von ihrer Basalmembran und dem Verlust der epithelialen Barrierefunktion (Holgate *et al.*, 2000). Teil des epithelialen Wundheilungsprozesses im Asthma bronchiale ist die Hypertrophie sowie Hyperplasie der Atemwegsepithelzellen (Cohen *et al.*, 2007), die zu einer Verdickung des Epithels und somit zu einer strukturellen Veränderung des Atemwegsepithels führen (*remodelling*). Auch im Atemwegsepithel der infizierten Larve können immunologisch sehr aktive Epithelbereiche angeschwollen erscheinen und verdickt sein. Auch wenn ein experimenteller Nachweis auf immunohistochemischer Ebene nach wie vor fehlt, der belegen kann, dass es sich in diesen immunologisch sehr aktiven Bereichen der Atemwege, um hyperplastische Epithelzellen handelt, gibt die sowohl verstärkte als auch verminderte Expression von Zellzyklus-spezifischen Genen einen ersten Hinweis, dass auch als Folge eines externen Reizes eine Proliferation im Atemwegsepithel stattfinden kann ((↑): 14, (↓): 16). Da im NP2610-induzierten IMD-Transkriptom das Expressionsniveau von nur wenigen Zellzyklus-spezifischen Genen signifikant moduliert wird ((↑): 4, (↓): 4), und das Atemwegsepithel im Gegensatz zum infizierten Epithel keinen morphologischen Veränderungen unterliegt, reguliert der IMD-Signalweg im Fall des schwachen Treiberstamms (NP2610) nicht das „Remodelling“ des Atemwegsepithels, das als Teil des Wundheilungsprogramms verstanden werden kann.

Dass im Atemwegsepithel infizierter Larven die Barrierefunktion des Epithels über eine große Fläche intakt bleibt, indiziert die verstärkte Expression von Genen, die durch den JAK/STAT-Signalweg reguliert werden. Da im Epithel die intrazellulären Komponenten des JAK/STAT-Signalwegs auf der apikalen Seite der Epithelzelle lokalisiert sind, und eine Fehlverteilung von apikalen Strukturproteinen gleichzeitig zu einem Verlust der JAK/STAT-Signalgebung führt, weist die verstärkte Transkription von JAK/STAT-Zielgenen in den infizierten Atemwegen der Larve unter anderem auf einen über weite Bereiche intakten Zellverband hin (Sotillos *et al.*, 2008).

4.3 Die IMD-vermittelte Immunantwort

4.3.1 Der PPK4-induzierte IMD-Phänotyp

Das wohl außergewöhnlichste Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit stellt der durch den Treiberstamm PPK4 induzierte IMD-Phänotyp dar, der sich in den gesamten larvalen Atemwegen sowohl durch ein verdicktes Atemwegsepithel als auch durch eine Deorganisation des Chitingerüsts auszeichnet, wodurch die Atemwege an Stabilität und Flexibilität verlieren. Induziert werden diese strukturellen wie auch morphologischen Veränderungen in den larvalen Atemwegen sowohl durch den mustererkennenden Rezeptor PGRP-LE als auch über PGRP-LC (Daten im Ergebnisteil nicht gezeigt). Da nur der starke Treiberstamm PPK4, nicht jedoch der schwache Treiberstamm NP2610 die phänotypischen Veränderungen in den Atemwegen initiiert, ist die Stärke der Gal4-Expression für die Ausprägung des IMD-Phänotyps verantwortlich. Weiterhin beruht der PPK4-induzierte Phänotyp nicht auf einem entwicklungsbiologischen Defekt, wie Reporterstudien mit dem etablierten TARGET-Expressionssystem bestätigen konnten. Er geht vielmehr auf die permanente bzw. chronische Aktivierung von IMD während der gesamten Larvalentwicklung zurück und ist demnach kein Artefakt der Überexpression. Dass der IMD-Phänotyp eine Folge der Immunreaktion ist, bestätigen auch die mikroskopischen Bilder infizierter Tracheen, deren Atemwegsepithel insbesondere in Regionen starker Drosomycin bzw. GFP-Expression ebenfalls verdickt ist.

Wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Querschnitten verschiedener trachealer Verzweigungen zeigen, geht die Verdickung des Atemwegsepithels im PPK4-induzierten Phänotyp unter anderem auf eine Vergrößerung der einzelnen Atemwegsepithelzelle zurück. Durch die Calceinfärbung wird bestätigt, dass es sich bei diesen morphologisch veränderten Epithelzellen nach wie vor um lebensfähige Zellen handelt. Eine mögliche Ursache für die Verdickung der Zellen ist der vergrößerte Zellkern, der auf eine erhöhte transkriptionelle Aktivität hinweist. Hypertrophe Epithelzellen sind im Zusammenhang mit einem chronischen Reiz häufig ein Hinweis auf metaplastische Veränderungen. Die permanente Aktivierung von IMD durch Überexpression eines der mustererkennenden Rezeptoren stellt für das larvale Atemwegsepithel solch einen chronischen Reiz dar. Ähnlich verhält es sich mit der Infektion. Auch dort initiiert der IMD-Signalweg in Regionen starker Drosomycin bzw. GFP-Expression morphologische Veränderungen im Epithel, wie sie auch beim PPK4-induzierten Phänotyp zu beobachten sind.

In der Fliege existieren leider nach wie vor keine vergleichbaren „gain-of-function“ Studien, in denen eine NF- κ B-Aktivierung zu morphologischen bzw. strukturellen Veränderungen

epithelialer Zellen führt. Lediglich für Fettkörperzellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Toll-Signalwegs ebenfalls zu einer Deorganisation des Gewebes führt, indem das eigentlich einschichtige Organ mehrschichtig wird und sich vergrößerte Zellen bzw. Zellkerne bilden (Senger *et al.*, 2006). Demnach sind die phänotypischen Veränderungen sowohl im Fall der Toll als auch der IMD gain-of-function“ Mutante NF- κ B-spezifisch. Auch im murinen Atemwegsepithel führt eine Aktivierung von NF- κ B zu einer Metaplasie der im Flimmerepithel eingelagerten Becherzellen (Pantano *et al.*, 2008, Poynter *et al.*, 2004). Metaplastische Prozesse sind im murinen Atemwegsepithel typisch für Wund- und Regenerationsprozesse und gehen im Atemwegsepithel unter anderem auf die hohe Plastizität von spezifischen Epithelzellen zurück, die sich am Ort der Verletzung transdifferenzieren, um die Heilung des geschädigten Epithels voranzutreiben (Park *et al.*, 2006). Wird dieser Wundheilungsprozess durch einen externen chronischen Reiz oder eine anhaltende Entzündungsreaktion verzögert bzw. unterbunden, wird dieser dynamische Prozess aus Verletzung und Regeneration im Epithel gestört und mündet in einer unvollständigen Reparatur, die Entzündungsprozesse erneut initiiert (Puchelle *et al.*, 2006). Ähnlich verhält es sich womöglich mit dem Epithel der larvalen Atemwege, das durch die permanente Aktivierung von IMD keine Möglichkeit hat, den metaplastischen Zustand bzw. „Wundheilungszustand“ zu verlassen.

Im PPK4-induzierten IMD-Phänotyp geht die Verdickung des Atemwegsepithels aber nicht nur auf eine stark vergrößerte Atemwegsepithelzelle zurück. Kernfärbungen ergaben in diesem Zusammenhang, dass die Anzahl an Epithelzellen in Tracheen transheterozygoter Larven höher war als in den korrespondierenden Kontrollen. Demnach initiiert die IMD-Aktivierung in den larvalen Atemwegen nicht nur eine morphologische Veränderung der einzelnen Epithelzelle, sondern auch Proliferation, die ebenfalls zu einer strukturellen Veränderung des gesamten Epithels beiträgt. Diese Beobachtung ist umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, dass das „normale“ Atemwegsepithel während der gesamten Larvalentwicklung über eine konstante Zellzahl verfügt, und die Zellen ausschließlich an Größe zunehmen (Ghabrial *et al.*, 2003). Hyperplasie tritt im menschlichen Atemwegsepithel als Teil eines gestörten Wundheilungsprozesses auf und mündet in einer irregulären Anordnung des Atemwegsepithels (Cohen *et al.*, 2007). Von Poynter *et al.* konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass der zentrale Regulator für die Becherzellhyperplasie im murinen Atemwegsepithel NF- κ B ist, da trotz wiederholtem Allergenkontakt die Anzahl an Becherzellen drastisch reduziert bleibt, wenn NF- κ B im Epithel der Atemwege reprimiert wird (Poynter *et al.*, 2004).

Metaplastische und hyperplastische Prozesse sind für Wund- und Regenerationsprozesse im menschlichen Atemwegsepithel charakteristisch. Der PPK4-induzierte IMD-Phänotyp der larvalen Atemwege spiegelt auf morphologischer Ebene scheinbar beide zellulären Veränderungen wider. Der zentrale Regulator für die phänotypischen Veränderungen in den Atemwegsepithelien des Menschen wie auch der Fliege scheint auf jeden Fall NF- κ B zu sein (Hart *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, die molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, die für die phänotypischen Veränderungen der larvalen Atemwege verantwortlich sind. Eine intensive Untersuchung und Auswertung der bereits vorhandenen Primärdaten des PPK4-induzierten IMD-Transkriptoms ist demnach zwingend notwendig und eines der ersten geplanten Projekte, die sich dieser Arbeit unmittelbar anschließen.

4.3.2 Das wissenschaftliche Potential des PPK4-induzierten IMD-Modells

Die Ergebnisse dieser Arbeit und insbesondere die Ergebnisse aus den Infektionsexperimenten zeigen deutlich, wie vielschichtig das Immunsystem der larvalen Atemwege gestaltet ist. Der geringe Grad an Übereinstimmung zwischen dem Infektionstranskriptom und dem IMD-Transkriptom des schwachen Treiberstamms deckt insbesondere die Komplexität der Infektion auf. Auch die Tatsache, dass nur wenige klassische immun-relevante Gene der systemischen Immunantwort in den infizierten Atemwegen verstärkt exprimiert werden, macht deutlich, dass auch in Abwesenheit eines adaptiven Immunsystems nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen der systemischen und epithelialen Immunantwort existieren.

Trotz des geringen Überlappungsgrads zwischen Infektion und ektopischer IMD-Aktivierung übernimmt der Signalweg IMD eine Vielzahl an Funktionen in der epithelialen Abwehr der larvalen Atemwege. So reguliert er zum einen die Expression der einzelnen Klassen an antimikrobiellen Peptiden, verschiedene Glutathion-S-Transferasen, um pro-apoptische Prozesse zu inhibieren und Gene, die bei einer starken Aktivierung gleichzeitig die morphologischen Veränderungen im Atemwegsepithel induzieren. Allein die Tatsache, dass der IMD-Signalweg abhängig vom Grad der Aktivierung im Rahmen einer Infektion diese unterschiedlichen Prozesse im Atemwegsepithel zeitgleich reguliert, unterstreicht nochmals die Berechtigung und Notwendigkeit der beiden etablierten *in vivo* IMD-Modelle. Hierbei birgt insbesondere das PPK4-induzierte IMD-Modell gemeinsam mit dem TARGET-Expressionssystem vielfältige Möglichkeiten, um zahlreichen Fragestellungen nachzugehen.

Da durch das TARGET-Expressionssystem der IMD-Signalweg zeitlich begrenzt und somit zu einem bestimmten Entwicklungsstadium der Larve aktiviert werden kann, ist die Untersuchung eines akuten wie auch chronischen Verlaufs einer Immunreaktion in den larvalen Atemwegen möglich. Ein Transkriptomvergleich auf der Basis von Mikroarray-Experimenten würde insbesondere den Unterschied zwischen einer akuten bzw. chronischen Immunreaktion in den Atemwegen aufdecken, und Gene enthüllen, die für die beiden unterschiedlichen Formen der Immunreaktion bezeichnend sind. Dank des PPK4-induzierten IMD-Modells und seiner Induzierbarkeit während der gesamten Larvalzeit kann aber auch der Beginn, die Entwicklung und der Verlauf einer chronischen Immunreaktion untersucht werden. Beim Vergleich der Transkriptome unterschiedlicher larvaler Entwicklungsstadien könnten insbesondere die Zielgene identifiziert werden, die für die strukturellen Veränderungen im Atemwegsepithel mitverantwortlich sind. Da im L3-Stadium die phänotypischen Veränderungen bereits ausgeprägt sind, kann es sehr gut sein, dass sich zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung viele Gene nicht mehr unter den signifikant regulierten befinden, die für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sind. Die Untersuchung und der Vergleich von Tracheentranskriptomen, deren Ausgangsmaterial aus L1- bzw. L2-Larven des PPK4-induzierten IMD-Modells stammt, erscheinen demnach sinnvoller.

Da die morphologischen Veränderungen bei der Infektion auf Epithelbereiche der larvalen Atemwege zurückzuführen sind, die mit einer starken IMD-Aktivierung einhergehen, erlaubt das PPK4-induzierte IMD-Modell weiterhin die Untersuchung von zellulären Veränderungen im Epithel, wie sie auch bei einer Infektion auftreten. Der Einsatz des BrdU-Systems wird eine Überprüfung der Hypothese ermöglichen, dass die bei einer ektopischen IMD-Aktivierung auftretenden Verdickungen auf Proliferationsprozesse im Epithel zurückzuführen sind.

Das PPK4-induzierte IMD-Modell erlaubt somit die Klärung einer Vielzahl von Fragen, denen ohne die Etablierung des Modells bzw. des TARGET-Expressionssystems nicht nachgegangen werden könnte. Allein die Vielzahl an Fragen, die mit diesem *Drosophila*-Modell und seinem Phänotyp korrelieren, spiegelt wider, wie komplex allein die Immunreaktion des NF- κ B-Signalwegs IMD im Atemwegsepithel der Larve gestaltet ist.

5 Zusammenfassung

Das Atemwegsepithel besitzt als immun-kompetentes Epithel zahlreiche effiziente Abwehrmechanismen, um sich vor Infektionen und somit vor einer mikrobiellen Besiedelung zu schützen. Der zentrale Regulator der immunologischen und inflammatorischen Prozesse im menschlichen Atemwegsepithel ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Fehlregulationen in der angeborenen Immunität des Atemwegsepithels, insbesondere im NF- κ B-Signalweg, führen im Epithel sowie in den Atemwegen in zunehmendem Maße zu Schädigungen und strukturellen Umgestaltungen und unterstützen beim Menschen die Entstehung von Krankheiten wie Asthma und COPD. Da die Immunpathogenese des Atemwegsepithels aufgrund des Mitwirkens von klassischen Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sehr komplex gestaltet ist, scheint es in Wirbeltieren ausgesprochen schwierig zu sein, den Einfluss des Atemwegsepithels auf die Entstehung und den Verlauf akuter bzw. chronischer Erkrankungen der Atemwege zu entschlüsseln. Ein Ausweichen auf andere, einfach gestaltete Modellorganismen erscheint daher sinnvoll. Die Taufliege *Drosophila melanogaster*, der ein adaptives Immunsystem fehlt und die gleichzeitig über ein einfach strukturiertes Atemwegsepithel verfügt, bietet sich für die Entschlüsselung elementarer Mechanismen der angeborenen Immunität geradezu an.

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit über die Organisation des epithelialen Immunsystems der Taufliege noch nichts bekannt war, wurde zunächst deren gesamtes Immunrepertoire ermittelt. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen, dass das Atemwegsepithel der Larve über nahezu alle mustererkennenden Rezeptoren verfügt, die für die Pathogenerkennung auch im Rahmen einer systemischen Immunantwort essentiell sind. Zentraler Regulator immunologischer Prozesse ist hierbei der NF- κ B-Signalweg *immune deficiency* (IMD), nicht jedoch Toll, der bei einer systemischen Immunabwehr synergistisch mit IMD die Expression der antimikrobiellen Peptidgene reguliert. Neben dem NF- κ B-Signalweg IMD sind auch die mit der angeborenen Immunität in Verbindung stehenden Signalwege JAK/STAT und JNK im Atemwegsepithel der Larve vertreten. Als konstitutive Abwehrmechanismen stehen dem larvalen Atemwegsepithel verschiedene antimikrobielle Peptide, Lysozyme, enzymatische Antioxidantien und das ROS-bildende Enzym Duox zur Verfügung. Besonders hervorzuheben ist das eisenbindende Protein Transferrin, da es im larvalen Atemwegsepithel in sehr hohen Mengen konstitutiv vorhanden ist, voraussichtlich um einer mikrobiellen Besiedelung effizient vorzubeugen. Um die induzierbaren Abwehrmechanismen des Atemwegsepithels zu entschlüsseln, wurden die Atemwege der Larve mit unterschiedlichen Pathogenen infiziert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass

verschiedene Pathogene die larvalen Tracheen über die Atemwegsöffnungen infizieren und im Epithel eine Immunantwort induzieren. Allerdings konnte in diesem Zusammenhang nur das natürlich vorkommende Pathogen *Erwinia carotovora* im gesamten Epithel der larvalen Atemwege eine Immunantwort auslösen. Transkriptom- und Proteomanalysen ergaben, dass nach einer Infektion mit *Erwinia*, die drei antimikrobiellen Peptide Drosomycin, Metchnikowin und Drosocin verstärkt synthetisiert werden, und dass die Transkriptionsrate der mustererkennenden Rezeptorgene *pgrp-la* und *-lf* signifikant erhöht ist. Um die Rolle des NF- κ B-Signalwegs IMD in der Immunabwehr der larvalen Atemwege zu entschlüsseln, wurde ein *Drosophila-Modell* etabliert, in dem der IMD-Signalweg ektopisch im Atemwegsepithel der Larve aktiv ist. Transkriptomanalysen auf der Basis von RT-PCR- und Mikroarray-Experimenten konnten zeigen, dass der IMD-Signalweg durch den mustererkennenden Rezeptor PGRP-LE aktiviert wird und die Expression aller sieben verschiedenen antimikrobiellen Peptidgenklassen reguliert. Beim Vergleich der beiden Transkriptome fiel auf, dass im infizierten Atemwegsepithel nur wenige kanonische immunrelevante Gene verstärkt exprimiert werden und nur wenige dieser Gene eine Regulation durch IMD erfahren. Zu den Genen des IMD-Transkriptoms gehören neben den antimikrobiellen Peptidgenen und mustererkennenden Rezeptorgenen wie z.B. *pgrp-la* und auch mehrere, für Glutathion-S-Transferasen kodierende Gene. Ihnen fällt genauso wie für die im infizierten Atemwegsepithel verstärkt exprimierten Gene *foxo* und *thor* als „Survival-Gene“ eine Rolle beim Zellschutz und somit bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion des Epithels zu. In immunologisch sehr aktiven Bereichen der infizierten Atemwege wirken sich die Veränderungen auf Transkriptomebene auch auf phänotypischer Ebene aus. Die phänotypischen Veränderungen äußern sich insbesondere in einer Verdickung des Atemwegsepithels und können ebenfalls durch starke IMD-Aktivierung im gesamten Epithel der larvalen Atemwegen des *Drosophila-Modells* induziert werden. Die genauere histologische Analyse dieser Tracheen ergab, dass die Verdickung des Epithels mit einer Vergrößerung jeder einzelnen Atemwegsepithelzelle einhergeht und unter anderem auf hyperplastische Epithelzellen zurückzuführen ist. Wie Reporterstudien mit einem etablierten TARGET-Expressionssystem bestätigen konnten, geht der Phänotyp nicht auf einen entwicklungsbiologischen Defekt zurück und kann im Hintergrund des TARGET-Systems während der Larvalentwicklung gerichtet aktiviert bzw. reprimiert werden. Die Untersuchung eines akuten wie auch chronischen Verlaufs der Immunreaktion ist somit möglich und erlaubt durch den Transkriptomvergleich „akut versus chronisch“ die Identifizierung von Genen, die für die phänotypischen Veränderungen des larvalen Atemwegsepithels verantwortlich sind.

6 Summary

The airway epithelium is an immune-competent tissue and is equipped with numerous efficient defence mechanisms in order to protect the epithelium against infections and microbial colonisation. In the human airway epithelium the transcription factor NF- κ B represents the crucial regulator of immunological and inflammatory processes. Dysfunctions of the innate immune system of the airway epithelium, in particular dysfunctions of the signalling pathway NF- κ B cause epithelial damage and structural changes within the airway epithelium and airways in general and facilitate the development of chronic diseases such as asthma and COPD. Since classical immune cells of the innate and adaptive immune system are present in the airways of vertebrate animal models, it appears to be nearly impossible to elucidate the impact of the airway epithelium itself on the origin and development of acute and chronic airway diseases. Therefore, it makes sense to examine the elementary immune mechanisms of the airway epithelium in a model organism like *Drosophila melanogaster* because its airway epithelium is simply designed and does not contain any immune-competent cells.

Since next to nothing was known about the immune system of the larval airways at the beginning of this work, at first the whole immune repertoire was investigated of the airways. The results of these studies demonstrated that the larval airway epithelium is equipped with most of the pattern recognition receptors being essential for pathogen recognition during the systemic response. The crucial regulator of the immunological processes in the airways of the larva is the NF- κ B signalling pathway immune deficiency (IMD) and not Toll regulating synergistically the antimicrobial peptide expression during the systemic response. Beside the IMD signalling pathway also the classical immune pathways JAK/STAT and JNK are present in the larval airways.

The larval airway epithelium provides several antimicrobial peptides, lysozymes, antioxidant enzymes and the reactive oxygen species producing enzyme Duox as constitutive defence mechanisms. The highly expressed gene of the iron-binding protein Transferrin receives a key function in the immune response of the larval airways since, probably, it prevents microbial colonisation of the epithelium without affecting the inducible mechanisms of the immune response. In order to discover the inducible defence mechanisms of the airway epithelium, we infected the airways of larvae with different pathogens. Hereby, we could show that different pathogens can infect the airways through the spiracular openings and evoke an immune response in the airway epithelium. In this context, however, the only pathogen which could induce an immune response in the whole epithelium of the larval airways was the naturally

occurring pathogen *Erwinia carotovora*. Transcriptome and proteome analysis showed that the three antimicrobial peptides Drosomycin, Metchnikowin and Drosocin were highly expressed during an infection with *Erwinia* and that the transcriptional rate of the pattern recognition receptor genes *pgrp-la* and *pgrp-lf* is significantly upregulated. In order to decipher the function of the NF- κ B signalling pathway IMD in the immune defence of the larval airway epithelium, a *Drosophila* model was established, where the IMD signalling pathway is ectopically active in the larval airways. Analysis at the transcriptional level based on RT-PCR and microarray experiments revealed that the IMD signalling pathway can be activated by the pattern recognition receptor PGRP-LE and that it regulates the expression of all seven different classes of antimicrobial peptides genes. Comparing the infection transcriptome with the ectopically induced IMD transcriptome it became apparent that only a few classical immune-relevant genes are upregulated in the infected airway epithelium and that the expression of very few of them is controlled by the signalling pathway IMD. The IMD transcriptome comprises genes encoding antimicrobial peptides, pattern recognition receptors like e.g. *pgrp-la* and genes encoding several glutathion S-transferases (GSTs). Like the genes *foxo* and *thor* whose expression is significantly increased in the infected airway epithelium, GSTs function as survival genes protecting cells against apoptosis and maintain the physiological function of the airway epithelium. In particular in areas of the infected epithelium, where the immune response appeared to be very strong, changes at the transcriptional level also affected the phenotype of the airways. The phenotypical features manifest themselves in a swelling of the airway epithelium and can also be induced in the whole airway epithelium of the *Drosophila* model by strong activation of IMD. The histological analysis of these tracheae revealed that the swelling of the epithelium correlates with an enlargement of each single airway epithelial cell and among other things with a hyperplastic epithelium. Reporter studies with an established TARGET gene expression system could confirm that the IMD phenotype is not a genetic defect in oogenesis and can directly be induced or repressed during the larval development by using the TARGET system. In the background of this genetically modified airway epithelium the investigation of an acute or chronic immune process is possible and allows the identification of genes which are responsible for the phenotypical changes of the airway epithelium by comparing the “acute” transcriptome with the “chronic” one.

7 Literatur

- Affolter M, Shilo BZ.** (2000) Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Curr Opin Cell Biol.* **12**:731-5.
- Baeg GH, Zhou R, Perrimon N.** (2005) Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev.* **19**:1861-70.
- Bals R, Hiemstra PS.** (2004) Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.* **23**:327-33.
- Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM.** (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:9541-6.
- Barnes WM.** (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:2216-20.
- Basset A, Khush RS, Braun A, Gardan L, Boccard F, Hoffmann JA, Lemaitre B.** (2000) The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:3376-81.
- Basset A, Tzou P, Lemaitre B, Boccard F.** (2003) A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep.* **4**:205-9.
- Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH.** (2000) CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem.* **275**:29731-6.
- Bernal A, Kimbrell DA.** (2000) *Drosophila* Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:6019-24.
- Binari R, Perrimon N.** (1994) Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* **8**:300-12.
- Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J.** (2004) Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.* **5**:1175-80.
- Bischoff V, Vignal C, Duvic B, Boneca IG, Hoffmann JA, Royet J.** (2006) Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.* **2**:e14.

- Bonizzi G, Karin M.** (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**:280-8.
- Bousquet J, Yssel H, Vignola AM.** (2000) Is allergic asthma associated with delayed fetal maturation or the persistence of conserved fetal genes? *Allergy.* **55**:1194-7.
- Boutros M, Agaisse H, Perrimon N.** (2002) Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell.* **3**:711-22.
- Brand AH, Perrimon N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* **118**:401-15.
- Broide DH, Lawrence T, Doherty T, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Karin M.** (2005) Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:17723-8.
- Bungeroth U.** (2005) BASICS Pulmologie. 1 Auflage. Elsevier Verlag.
- Carton Y, Nappi AJ.** (1997) *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol Today.* **13**:218-27.
- Cheng DS, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park GY, Sheller JR, Polosukhin VV, Christman JW, Yull FE, Blackwell TS.** (2007) Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *J Immunol.* **178**:6504-13.
- Choe KM, Werner T, Stöven S, Hultmark D, Anderson KV.** (2002) Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science.* **296**:359-62.
- Cohen L, E X, Tarsi J, Ramkumar T, Horiuchi TK, Cochran R, DeMartino S, Schechtman KB, Hussain I, Holtzman MJ, Castro M; and the NHLBI Severe Asthma Research Program (SARP).** (2007) Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **176**:138-45.
- Delaney JR, Stöven S, Uvell H, Anderson KV, Engström Y, Mlodzik M.** (2006) Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *EMBO J.* **25**:3068-77.
- Diamond G, Legarda D, Ryan LK.** (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev.* **173**:27-38.
- Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M, Bulet P, Lanot R, Reichhart JM, Hoffmann JA.** (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur J Biochem.* **221**:201-9.

- Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL.** (2005) The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol.* **6**:946-53.
- Dunkov B, Georgieva T.** (2006) Insect iron binding proteins: insights from the genomes. *Insect Biochem Mol Biol.* **36**:300-9.
- Dushay MS, Asling B, Hultmark D.** (1996) Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:10343-7.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE.** (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **30**:207-10.
- Ekengren S, Tryselius Y, Dushay MS, Liu G, Steiner H, Hultmark D.** (2001) A humoral stress response in *Drosophila*. *Curr Biol.* **11**:714-8.
- Fehrenbach H, Riemann D, Wahlers T, Hirt SW, Haverich A, Richter J.** (1994) Scanning and transmission electron microscopy of human donor lungs: fine structure of the pulmonary parenchyma following preservation and ischemia. *Acta Anat.* **151**:220-31.
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA.** (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol.* **7**:862-74.
- Ferrandon D, Jung AC, Criqui M, Lemaitre B, Uttenweiler-Joseph S, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann JA.** (1998) A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.* **17**:1217-27.
- Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R, Conner GE.** (2005) Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **32**:462-9.
- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG.** (2001) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**:1819-21.
- Ghabrial A, Luschnig S, Metzstein MM, Krasnow MA.** (2003) Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**:623-47.
- Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D.** (2003) Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science.* **302**:2126-30.

- Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart JM, Wang C, Butt TM, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D.** (2006) Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. **127**:1425-37.
- Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ.** (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*. **310**:847-50.
- Han ZS, Ip YT.** (1999) Interaction and specificity of Rel-related proteins in regulating *Drosophila* immunity gene expression. *J Biol Chem*. **274**:21355-61.
- Hancock RE, Scott MG.** (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:8856-61.
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM.** (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **22**:714-21.
- Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF.** (1998) Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **158**:1585-92.
- Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D.** (1999) Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell*. **4**:827-37.
- Hedengren-Olcott M, Olcott MC, Mooney DT, Ekengren S, Geller BL, Taylor BJ.** (2004) Differential activation of the NF-kappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem*. **279**:21121-7.
- Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsukura S.** (1998) Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun*. **249**:943-7.
- Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL.** (2000) Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **105**:193-204.
- Imboden M, Rochat T, Brutsche M, Schindler C, Downs SH, Gerbase MW, Berger W, Probst-Hensch NM; SAPALDIA Team.** (2007) Glutathione S-transferase genotype increases risk of progression from bronchial hyperresponsiveness to asthma in adults. *Thorax*. **63**: 322-8.
- Imler JL, Bulet P.** (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy*. **86**:1-21.

- Ishimoto H, Mukae H, Date Y, Shimbara T, Mondal MS, Ashitani J, Hiratsuka T, Kubo S, Kohno S, Nakazato M.** (2006) Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J.* **27**:253-60.
- Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, Wasserman JD, Végh M, Radimerski T, Greenberg ME, Hafen E.** (2003) The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol.* **2**:20.1-20.17.
- Kallio J, Leinonen A, Ulvila J, Valanne S, Ezekowitz RA, Rämetsä M.** (2005) Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect.* **7**:811-9.
- Kambris Z, Hoffmann JA, Imler JL, Capovilla M.** (2002) Tissue and stage-specific expression of the Toll in *Drosophila* embryos. *Gene Expr Patterns.* **2**:311-7.
- Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, Harley W, Fox A, Golenbock D, Silverman N.** (2004) Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity.* **20**:637-49.
- Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim JH, Ueda K, Oshima Y, Peach C, Erturk-Hasdemir D, Goldman WE, Oh BH, Kurata S, Silverman N.** (2006) PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *Drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol.* **7**:715-23.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM.** (2004) The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* **3**:17-26.
- Kasper M, Fehrenbach H.** (2000) Immunohistochemical evidence for the occurrence of similar epithelial phenotypes during lung development and radiation-induced fibrogenesis. *Int J Radiat Biol.* **76**:493-501.
- Khush RS, Cornwell WD, Uram JN, Lemaitre B.** (2002) A ubiquitin-proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficiency signaling cascade. *Curr Biol.* **12**:1728-37.
- Khush RS, Leulier F, Lemaitre B.** (2001) *Drosophila* immunity: two paths to NF-kappaB. *Trends Immunol.* **22**:260-4.
- Kim MS, Byun M, Oh BH.** (2003) Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat Immunol.* **4**:787-93.
- Kim M, Lee JH, Lee SY, Kim E, Chung J.** (2006) Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:16358-63.

- Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA.** (2000) Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:11427-32.
- Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G.** (2006) Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol.* **306**:153-82.
- Lemaitre B, Hoffmann J.** (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* **25**:697-743.
- Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, Nicolas E, Meister M, Georgel P, Reichhart JM, Hoffmann JA.** (1995) A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:9465-9.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **86**:973-83.
- Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA.** (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:14614-9.
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B.** (2003) The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol.* **4**:478-84.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC.** (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell.* **104**:709-18.
- Levashina EA, Ohresser S, Lemaitre B, Imler JL.** (1998) Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J Mol Biol.* **278**:515-27.
- Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L.** (2004) Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol Cell Proteomics.* **3**:156-66.
- Ligoxygakis P, Bulet P, Reichhart JM.** (2002) Critical evaluation of the role of the Toll-like receptor 18-Wheeler in the host defense of *Drosophila*. *EMBO Rep.* **3**:666-73.
- Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichhart JM.** (2002) Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science.* **297**:114-6.
- Lindsley DL, Zimm GC.** (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc., San Diego, CA.

- Liu L, Johnson WA, Welsh MJ.** (2003) *Drosophila* DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:2128-33.
- Londhe VA, Nguyen HT, Jeng JM, Li X, Li C, Tiozzo C, Zhu N, Minoo P.** (2008) NF- κ B induces lung maturation during mouse lung morphogenesis. *Dev Dyn.* **237**:328-38.
- Lubarsky B, Krasnow MA.** (2003) Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell.* **112**:19-28.
- Manfrulli P, Reichhart JM, Steward R, Hoffmann JA, Lemaitre B.** (1999) A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. *EMBO J.* **18**:3380-91.
- McGettigan J, McLennan RK, Broderick KE, Kean L, Allan AK, Cabrero P, Regulski MR, Pollock VP, Gould GW, Davies SA, Dow JA.** (2005) Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem Mol Biol.* **35**:741-54.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL.** (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science.* **302**:1765-8.
- McGuire SE, Roman G, Davis RL.** (2004) Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet.* **20**:384-91.
- Meier P, Finch A, Evan G.** (2000) Apoptosis in development. *Nature.* **407**:796-801.
- Meister M.** (2004) Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol.* **16**:10-5.
- Meister M, Hetru C, Hoffmann JA.** (2000) The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol.* **248**:17-36.
- Melk JP, Govind S.** (1999) Developmental analysis of *Gnaspis xanthopoda*, a larval parasitoid of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* **202**:1885-96.
- Mellroth P, Karlsson J, Steiner H.** (2003) A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem.* **278**:7059-64.
- Mellroth P, Steiner H.** (2006) PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **350**:994-9.
- Meng X, Khanuja BS, Ip YT.** (1999) Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor. *Genes Dev.* **13**:792-7.
- Metzger RJ, Krasnow MA.** (1999) Genetic control of branching morphogenesis. *Science.* **284**:1635-9.

- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J.** (2001) *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*. **414**:756-9.
- Mueller P, Kuttenukeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP, Boutros M.** (2005) Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature*. **436**:871-5.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. **24**:17-27.
- Ooi JY, Yagi Y, Hu X, Ip YT.** (2002) The *Drosophila* Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense. *EMBO Rep*. **3**:82-7.
- Pantano C, Ather JL, Alcorn JF, Poynter ME, Brown AL, Guala AS, Beuschel SL, Allen GB, Whittaker LA, Bevelander M, Irvin CG, Janssen-Heininger YM.** (2008) Nuclear factor-kappaB activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. **177**:959-69.
- Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, Whitsett JA.** (2006) Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **34**:151-7.
- Paul SM, Ternet M, Salvaterra PM, Beitel GJ.** (2003) The Na⁺/K⁺ ATPase is required for septate junction function and epithelial tube-size control in the *Drosophila* tracheal system. *Development*. **130**:4963-74.
- Persson C, Oldenvi S, Steiner H.** (2007) Peptidoglycan recognition protein LF: a negative regulator of *Drosophila* immunity. *Insect Biochem Mol Biol*. **37**:1309-16.
- Petersen UM, Kadalayil L, Rehorn KP, Hoshizaki DK, Reuter R, Engström Y.** (1999) Serpent regulates *Drosophila* immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. *EMBO J*. **18**:4013-22.
- Pfaffl MW.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. **29**:e45.
- Pirooznia M, Nagarajan V, Deng Y.** (2007) GeneVenn - A web application for comparing gene lists using Venn diagrams. *Bioinformatics*. **1**:420-2.
- Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R.** (2004) Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J.Immunol*. **173**:1219-1223.
- Poynter ME, Cloots R, van Woerkom T, Butnor KJ, Vacek P, Taatjes DJ, Irvin CG, Janssen-Heininger YM.** (2004) NF-kappa B activation in airways modulates allergic inflammation but not hyperresponsiveness. *J Immunol*. **173**:7003-9.

- Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C.** (2006) Airway epithelial repair, regeneration and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* **3**:726-33.
- Rastogi D, Ratner AJ, Prince A.** (2001) Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. *Paediatr Respir Rev.* **2**:245-52.
- Rhoades & Pflanzner.** (1996) Human Physiology, 3rd edition, Saunders College Publishing, Harcourt & Brace College Publishers, Orlando.
- Rizki T, Rizki M, Grell E.** (1980) A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Bio.* **188**:91-99.
- Rühle, H.** (1932) Das larvale Tracheensystem von *Drosophila melanogaster* Meigen und seine Variabilität. *Z. Wiss. Zool.* **141**:159 -245.
- Ryu JH, Nam KB, Oh CT, Nam HJ, Kim SH, Yoon JH, Seong JK, Yoo MA, Jang IH, Brey PT, Lee WJ.** (2004) The homeobox gene Caudal regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* epithelia. *Mol Cell Biol.* **24**:172-85.
- Schmidt WM, Mueller MW.** (1999) CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **27**:e31.
- Schmidt R & Thews G.** (1997) Physiologie des Menschen. 27 Auflage. Springer Verlag.
- Schramm G, Bruchhaus I, Roeder T.** (2000) A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Res.* **28**:E96.
- Schwarzer C, Machen TE, Illek B, Fischer H.** (2004) NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells. *J Biol Chem.* **279**:36454-61.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP.** (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol.* **17**:1-11.
- Senger K, Armstrong GW, Rowell WJ, Kwan JM, Markstein M, Levine M.** (2004) Immunity regulatory DNAs share common organizational features in *Drosophila*. *Mol Cell.* **13**:19-32.
- Senger K, Harris K, Levine M.** (2006) GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:15957-62.
- Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP.** (2004) Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **31**:358-64.
- Silverman N, Maniatis T.** (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**:2321-42.

- Silverman N, Zhou R, Erlich RL, Hunter M, Bernstein E, Schneider D, Maniatis T.** (2003) Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J Biol Chem.* **278**:48928-34.
- Sotillos S, Díaz-Meco MT, Moscat J, Castelli-Gair Hombría J.** (2008) Polarized subcellular localization of Jak/STAT components is required for efficient signaling. *Curr Biol.* **18**:624-9.
- Stenbak CR, Ryu JH, Leulier F, Pili-Floury S, Parquet C, Hervé M, Chaput C, Boneca IG, Lee WJ, Lemaitre B, Mengin-Lecreulx D.** (2004) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J Immunol.* **173**:7339-48.
- St Johnston D.** (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet.* **3**:176-88.
- Storch V & Welsch U.** (2003) Kurzes Lehrbuch der Zoologie. 7 Auflage. Spektrum Verlag.
- Takehana A, Katsuyama T, Yano T, Oshima Y, Takada H, Aigaki T, Kurata S.** (2002) Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:13705-10.
- Takehana A, Yano T, Mita S, Kotani A, Oshima Y, Kurata S.** (2004) Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.* **23**:4690-700.
- Tanji T, Hu X, Weber AN, Ip YT.** (2007) Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* **27**:4578-88.
- Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber DA, Hariharan IK.** (2002) salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell.* **110**:467-78.
- Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL.** (2000) Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:10520-5.
- 't Hoen PA, de Kort F, van Ommen GJ, den Dunnen JT.** (2003) Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Res.* **31**:e20.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G.** (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:5116-21.

- Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, Hoffmann JA, Imler JL.** (2000) Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*. **13**:737-48.
- Uttenweiler-Joseph S, Moniatte M, Lagueux M, Van Dorsselaer A, Hoffmann JA, Bulet P.** (1998) Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**:11342-7.
- Vodovar N, Vinals M, Liehl P, Basset A, Degrouard J, Spellman P, Boccard F, Lemaitre B.** (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**:11414-9.
- Werner T, Borge-Renberg K, Mellroth P, Steiner H, Hultmark D.** (2003) Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem*. **278**:26319-22.
- Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D.** (2000) A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:13772-7.
- Whitworth AJ, Theodore DA, Greene JC, Benes H, Wes PD, Pallanck LJ.** (2005) Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 8024-9.
- Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, Eldon ED.** (1997) The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J*. **16**:6120-30.
- Yoshiga T, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH.** (1999) *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur J Biochem*. **260**:414-20.
- Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B.** (2006) The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*. **24**:463-73.
- Zhao C, Wang I, Lehrer RI.** (1996) Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*. **396**:319-22.
- Zissler D and Sander K.** (1973) The cytoplasmic architecture of the egg cell of *Smittia spec.* (Diptera, Chironomidae). I. Anterior and posterior pole regions. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **172**:175-186.

8 Anhang

8.1 Mikroarray-Daten

8.1.1 L3-Tracheentranskriptom

Tab. 8.1: die ersten 50 annotierten Tracheen-spezifischen Gene

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CG6186	Tsf1		4.1	0.05
2	CG18105	ETH	Ecdysis triggering hormone	3.61	0.06
3	CG2520	lap	like-AP180	3.32	0.08
4	CG10279	Rm62	Rm62	2.99	0.27
5	CG2139	aralar1	aralar1	2.37	0.03
6	CG9020	Aats-arg	Arginyl-tRNA synthetase	2.32	0.18
7	CG1780	ldgf4	Imaginal disc growth factor 4	2.28	0.09
8	CG7539	Edg91	Ecdysone-dependent gene 91	2.26	0.23
9	CG3284	RpII15	RNA polymerase II 15kD subunit	2.21	0.19
10	CG18076	shot	short stop	2.16	0.27
11	CG14887	Dhfr	Dihydrofolate reductase	2.1	0.35
12	CG9334	Spn3	Serine protease inhibitor 3	2.1	0.13
13	CG1743	Gs2	Glutamine synthetase 2	2.09	0.24
14	CG8409	Su(var)205	Suppressor of variegation 205	2.06	0.26
15	CG13098	mRpL51	mitochondrial ribosomal protein L51	1.98	0.24
16	CG6302	l(3)01239	lethal (3) 01239	1.96	0.06
17	CG13628	Rpb10	Rpb10	1.9	0.09
18	CG10944	RpS6	Ribosomal protein S6	1.89	0.28
19	CG3054	l(2)k05819	lethal (2) k05819	1.81	0.25
20	CG4337	mtSSB	mitochondrial single stranded DNA-binding protein	1.8	0.11
21	CG5258	NHP2	NHP2	1.8	0.06
22	CG30498	boca	boca	1.78	0.07
23	CG4665	Dhpr	Dihydropteridine reductase	1.78	0.29
24	CG11797	Obp56a	Odorant-binding protein 56a	1.75	0.17
25	CG16792	DebB	Developmental embryonic B	1.73	0.12
26	CG3949	hoip	hoi-polloi	1.72	0.19
27	CG4457	Srp19	Signal recognition particle protein 19	1.72	0.2
28	CG5170	Dp1	Dodeca-satellite-binding protein 1	1.66	0.07
29	CG4464	RpS19a	Ribosomal protein S19a	1.64	0.07
30	CG11921	fd96Ca	forkhead domain 96Ca	1.63	0.24
31	CG9670	fal	falten	1.63	0.15
32	CG10679	Nedd8	Nedd8	1.62	0.21
33	CG8604	Amph	Amphiphysin	1.61	0.06
34	CG10624	sinu	sinuous	1.6	0.17
35	CG11271	RpS12	Ribosomal protein S12	1.59	0.45
36	CG10603	mRpL13	mitochondrial ribosomal protein L13	1.57	0.38
37	CG12665	Obp8a	Odorant-binding protein 8a	1.57	0.46
38	CG4584	dUTPase	Deoxyuridine triphosphatase	1.57	0.29

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
39	CG10596	Msr-110	Msr-110	1.55	0.12
40	CG11979	Rpb5	Rpb5	1.53	0.39
41	CG11482	Mlh1	Mlh1	1.52	0.1
42	CG3379	His4r	Histone H4 replacement	1.51	0.12
43	CG16869	Ance-2	Ance-2	1.5	0.23
44	CG4494	smt3	smt3	1.45	0.17
45	CG3035	cm	carmine	1.44	0.07
46	CG7977	RpL23A	Ribosomal protein L23A	1.44	0.47
47	CG3751	RpS24	Ribosomal protein S24	1.43	0.15
48	CG3595	sqh	spaghetti squash	1.42	0.11
49	CG3450	l(2)k03203	lethal (2) k03203	1.41	0.32
50	CG32854	mRpS21	mitochondrial ribosomal protein S21	1.4	0.41

8.1.2 Infektionstranskriptom (*Erwinia carotovora carotovora*)

Tab. 8.2: die signifikant verstärkt exprimierten Gene des larvalen Tracheensystems nach Infektion mit *Erwinia carotovora carotovora*

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CG10118	ple	pale	4.36	0.17
2	CG32282	dro4	drosomycin-4	4.16	0.09
3	CG13969	bwa	brain washing	3.4	0.7
4	CG15096	CG15096	CG15096	3.31	0.19
5	CG31362	Jon99Ciii	Jonah 99Ciii	3.16	0.36
6	CG11413	CG11413	CG11413	3.01	0.27
7	CG9080	CG9080	CG9080	2.99	0.26
8	CG1385		Defensin	2.84	0.54
9	CG2342	Ccp84Ag	Ccp84Ag	2.78	0.39
10	CG4757	CG4757	CG4757	2.76	0.58
11	CG10697	Ddc	Dopa decarboxylase	2.73	0.59
12	CG11241	CG11241	CG11241	2.68	0.19
13	CG3954	csw	corkscrew	2.65	0.68
14	CG10822	CG10822	CG10822	2.6	0.44
15	CG5723	Ten-m	Tenascin major	2.59	0.83
16	CG8666	Tsp39D	Tetraspanin 39D	2.55	0.34
17	CG15152	CG15152	CG15152	2.54	0.44
18	CG15422	CG15422	CG15422	2.46	0.31
19	CG10374	Lsd-1	Lipid storage droplet-1	2.45	0.5
20	CG8256	l(2)k05713	lethal (2) k05713	2.42	0.34
21	CG13887	CG13887	CG13887	2.39	0.69
22	CG8871	Jon25Biii	Jonah 25Biii	2.29	0.37
23	CG30497	CG30497	CG30497	2.28	0.24
24	CG31955	CG31955	CG31955	2.28	0.21
25	CG32042	PGRP-LA	Peptidoglycan recognition protein LA	2.27	0.18
26	CG10082	CG10082	CG10082	2.26	0.49
27	CG10799	CG10799	CG10799	2.23	0.36
28	CG8048	Vha44	Vacuolar H	2.23	0.48
29	CG9090	CG9090	CG9090	2.23	0.5

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
30	CG11375	baf180	baf180	2.21	0.29
31	CG32593	Flo-2	flotillin 2	2.17	0.63
32	CG17278	CG17278	CG17278	2.16	0.29
33	CG4381	GstD3	Glutathione S transferase D3	2.15	0.49
34	CG6850	Ugt	UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase	2.14	0.66
35	CG12066	Pka-C2	cAMP-dependent protein kinase 2	2.13	0.89
36	CG15282	CG15282	CG15282	2.13	0.57
37	CG5310	nmdyn-D6	nmdyn-D6	2.12	0.51
38	CG18816	Tsp42Eb	Tetraspanin 42Eb	2.11	0.79
39	CG8630	CG8630	CG8630	2.11	0.54
40	CG32017	CG32017	CG32017	2.1	0.85
41	CG11607	NA	NA	2.09	0.41
42	CG13324	CG13324	CG13324	2.09	0.49
43	CG15009	ImpL2	Ecdysone-inducible gene L2	2.09	0.56
44	CG5729	Dgp-1	Dgp-1	2.09	0.49
45	CG6464	salm	spalt major	2.09	0.76
46	CG18106	IM2	Immune induced molecule 2	2.07	0.24
47	CG2901	CG2901	CG2901	2.07	0.43
48	CG33115	CG33115	CG33115	2.05	0.29
49	CG14322	CG14322	CG14322	2.03	0.37
50	CG30438	CG30438	CG30438	2.03	0.45
51	CG1937	sip3	septin interacting protein 3	2.01	0.33
52	CG9445	CG9445	CG9445	2.01	0.41
53	CG8927	CG8927	CG8927	2	0.4
54	CG17894	cnc	cap-n-collar	1.99	0.73
55	CG10037	vvl	ventral veins lacking	1.97	0.28
56	CG10091	GstD9	Glutathione S transferase D9	1.95	0.6
57	CG6283	CG6283	CG6283	1.95	0.72
58	CG9485	CG9485	CG9485	1.95	0.42
59	CG7953	CG7953	CG7953	1.94	0.77
60	CG8611	CG8611	CG8611	1.94	0.52
61	CG1259	CG1259	CG1259	1.93	0.85
62	CG14906	CG14906	CG14906	1.93	0.34
63	CG18279	IM10	Immune induced molecule 10	1.93	0.2
64	CG17646	CG17646	CG17646	1.92	0.2
65	CG17255	CG17255	CG17255	1.91	0.32
66	CG11015	CG11015	CG11015	1.89	0.99
67	CG31769	CG31769	CG31769	1.88	0.55
68	CG8627	Dbi	Diazepam-binding inhibitor	1.88	0.31
69	CG32564	CG32564	CG32564	1.87	0.27
70	CG9943	Surf1	Surfeit 1	1.87	0.78
71	CG7016	CG7016	CG7016	1.84	0.28
72	CG31410	CG31410	CG31410	1.83	0.75
73	CG3943	kraken	kraken	1.83	0.32
74	CG8144	ps	pasilla	1.83	0.48
75	CG8175	Mtk	Metchnikowin	1.83	0.78
76	CG4032	Abl	Abl tyrosine kinase	1.82	0.68
77	CG5010	CG5010	CG5010	1.82	0.51
78	CG30092	jbug	jitterbug	1.81	0.9
79	CG9877	CG9877	CG9877	1.79	0.3
80	CG13403	CG13403	CG13403	1.77	0.46

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
81	CG6296	CG6296	CG6296	1.76	0.71
82	CG10910	CG10910	CG10910	1.75	0.47
83	CG7296	CG7296	CG7296	1.75	0.3
84	CG31789	CG31789	CG31789	1.74	0.33
85	CG32196	CG32196	CG32196	1.74	0.47
86	CG5417	CG5417	CG5417	1.74	0.53
87	CG10067	Act57B	Actin 57B	1.73	0.82
88	CG3850	sug	sugarbabe	1.73	0.34
89	CG5938	CG5938	CG5938	1.73	0.46
90	CG7496	PGRP-SD	PGRP-SD	1.73	0.77
91	CG10960	CG10960	CG10960	1.71	0.42
92	CG12171	CG12171	CG12171	1.71	0.67
93	CG8195	CG8195	CG8195	1.71	0.74
94	CG10126	CG10126	CG10126	1.69	0.54
95	CG8891	CG8891	CG8891	1.69	0.8
96	CG1049	Cct1	CTP:phosphocholine cytidyltransferase 1	1.68	0.37
97	CG31121	CG31121	CG31121	1.68	0.73
98	CG3743	MTF-1	MTF-1	1.68	0.41
99	CR31400			1.67	0.27
100	CG1112	NA	NA	1.66	0.94
101	CG14938	crol	crooked legs	1.66	0.23
102	CG15825	CG15825	CG15825	1.66	0.23
103	CG3635	CG3635	CG3635	1.66	0.59
104	CG6195	CG6195	CG6195	1.66	0.46
105	CG10263	CG10263	CG10263	1.65	0.35
106	CG11076	CG11076	CG11076	1.65	0.49
107	CG12532	Bap	NA	1.65	0.43
108	CG31839	CG31839	CG31839	1.65	0.4
109	CG8834	CG8834	CG8834	1.65	0.92
110	CG33134	debcl	death executioner Bcl-2 homologue	1.64	0.64
111	CG10562	CG10562	CG10562	1.63	0.38
112	CG7664	crp	cropped	1.63	0.57
113	CG9470	MtnA	Metallothionein A	1.63	0.6
114	CG32954	NA	NA	1.62	0.56
115	CG7778	CG7778	CG7778	1.61	0.33
116	CG8913	CG8913	CG8913	1.61	0.38
117	CG11138	CG11138	CG11138	1.6	0.43
118	CG11797	Obp56a	Odorant-binding protein 56a	1.6	0.93
119	CG32645	CG32645	CG32645	1.6	0.41
120	CG3907	CG3907	CG3907	1.6	0.52
121	CG5809	CaBP1	CaBP1	1.59	0.26
122	CG12825	CG12825	CG12825	1.58	0.34
123	CG9434	Fst	Frost	1.57	0.45
124	CG12410	cv	crossveinless	1.56	0.55
125	CG8952	CG8952	CG8952	1.56	0.73
126	CG12012	CG12012	CG12012	1.55	0.63
127	CG5634	dsd	distracted	1.55	0.86
128	CG12690	CHES-1-like	Checkpoint suppressor homologue	1.54	0.74
129	CG15065	CG15065	CG15065	1.54	0.92
130	CG7223	htl	heartless	1.54	0.72

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
131	CG11798	chn	charlatan	1.53	0.42
132	CG10719	brat	brain tumor	1.52	0.91
133	CG13631	CG13631	CG13631	1.52	0.25
134	CG3017	Alas	Aminolevulinate synthase	1.52	0.35
135	CG3624	CG3624	CG3624	1.52	0.49
136	CG16833	CG16833	CG16833	1.51	0.37
137	CG18349	CG18349	CG18349	1.51	0.6
138	CG3752	Aldh	Aldehyde dehydrogenase	1.51	0.44
139	CG32217	Su(Tpl)	Su(Tpl)	1.5	0.59
140	CG13315	CG13315	CG13315	1.49	0.2
141	CG7748	OstStt3	Oligosaccharyl transferase 3	1.48	0.73
142	CG10155	NA	NA	1.47	0.18
143	CG11837	CG11837	CG11837	1.47	0.82
144	CG14066	larp	La related protein	1.47	0.85
145	CG8286	CG8286	CG8286	1.47	0.95
146	CG3001	Hex-A	Hexokinase A	1.46	0.27
147	CG5848	cact	cactus	1.46	0.45
148	CG9441	Pu	Punch	1.46	0.64
149	CG5675	X11L	X11L	1.45	0.72
150	CG7077	CG7077	CG7077	1.45	0.83
151	CG33193	sav	salvador	1.44	0.53
152	CG5210	Chit	Chitinase-like	1.44	0.38
153	CG5518	sda	slamdance	1.44	0.59
154	CG12896	CG12896	CG12896	1.43	0.76
155	CG7245	NA	NA	1.43	0.84
156	CG4147	Hsc70-3	Heat shock protein cognate 3	1.42	0.35
157	CG4181	GstD2	Glutathione S transferase D2	1.42	0.69
158	CG8861	CG8861	CG8861	1.42	0.99
159	CG31758	CG31758	CG31758	1.41	0.9
160	CG33254	NA	NA	1.41	0.21
161	CG6223	NA	NA	1.4	0.95
162	CG9412	rin	rasputin	1.39	0.5
163	CG17108	CG17108	CG17108	1.38	0.76
164	CG6981	CG6981	CG6981	1.38	0.32
165	CG31659	CG31659	CG31659	1.37	0.64
166	CG3348	CG3348	CG3348	1.36	0.95
167	CG10967	Atg1	Autophagy-specific gene 1	1.35	0.55
168	CG15829	CG15829	CG15829	1.35	0.77
169	CG8532	lqf	liquid facets	1.35	0.6
170	CG3002	Gga	Gga	1.34	0.55
171	CG31868	Samuel	SAM-motif ubiquitously expressed punctatedly localized protein	1.34	0.84
172	CG1007	emc	extra macrochaetae	1.33	0.31
173	CG11290	enok	enoki mushroom	1.33	0.8
174	CG11961	CG11961	CG11961	1.33	0.65
175	CG15784	CG15784	CG15784	1.33	0.56
176	CG1600	CG1600	CG1600	1.33	0.34
177	CG7590	scyl	scylla	1.33	0.65
178	CG9132	CG9132	CG9132	1.33	0.4
179	CG12290	CG12290	CG12290	1.32	0.68
180	CG13807	CG13807	CG13807	1.32	0.46
181	CG1412	RhoGAP19D	RhoGAP19D	1.32	0.74

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
182	CG5896	CG5896	CG5896	1.32	0.27
183	CG33002	mRpL27	mitochondrial ribosomal protein L27	1.31	0.72
184	CG8024	NA	NA	1.31	0.86
185	CG15093	CG15093	CG15093	1.3	0.2
186	CG17746	CG17746	CG17746	1.29	0.28
187	CG11958	Cnx99A	Calnexin 99A	1.28	0.95
188	CG4162	lace	lace	1.28	0.23
189	CG8369	CG8369	CG8369	1.28	0.74
190	CG10132	CG10132	CG10132	1.27	0.75
191	CG15369	CG15369	CG15369	1.27	0.66
192	CG13868	CG13868	CG13868	1.26	0.26
193	CG17943	comm	commissureless	1.26	0.84
194	CG41056			1.26	0.73
195	CG10327	TBPH	TBPH	1.25	0.87
196	CG13545	CG13545	CG13545	1.25	0.73
197	CG16985	CG16985	CG16985	1.25	0.59
198	CG7188	CG7188	CG7188	1.25	0.84
199	CG10845	CG10845	CG10845	1.24	0.65
200	CG11390	PebIII	Ejaculatory bulb protein III	1.24	0.6
201	CG13124	CG13124	CG13124	1.24	0.26
202	CG1648	CG1648	CG1648	1.24	0.95
203	CG7398	Trn	Transportin	1.24	0.87
204	CG9042	Gpdh	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase	1.24	0.8
205	CG11833	Ssl2	Strictosidine synthase-like 2	1.23	0.75
206	CG14566	CG14566	CG14566	1.23	0.2
207	CG7539	Edg91	Ecdysone-dependent gene 91	1.23	0.91
208	CG13323	CG13323	CG13323	1.22	0.59
209	CG31005	CG31005	CG31005	1.22	0.8
210	CG5517	Ide	Insulin degrading metalloproteinase	1.22	0.95
211	CG5730	AnnIX	Annexin IX	1.22	0.39
212	CG9764	yrt	yurt	1.22	0.61
213	CG1311	CG1311	CG1311	1.2	0.43
214	CG15112	ena	enabled	1.2	0.95
215	CG17544	CG17544	CG17544	1.2	0.61
216	CG1765	EcR	Ecdysone receptor	1.2	0.65
217	CG8446	CG8446	CG8446	1.2	0.75
218	CG32446	CG32446	CG32446	1.17	0.31
219	CG33170	CG33170	CG33170	1.17	0.58
220	CG6224	dbo	diablo	1.17	0.86
221	CG7580	CG7580	CG7580	1.17	0.92
222	CG7959	Bgb	Big brother	1.17	0.76
223	CG8713	CG8713	CG8713	1.17	0.47
224	CG8918	CG8918	CG8918	1.17	0.95
225	CG10146	AttA	Attacin-A	1.16	0.86
226	CG10781	ng1	new glue 1	1.16	0.68
227	CG14959	CG14959	CG14959	1.16	0.56
228	CG9350	CG9350	CG9350	1.16	0.71
229	CG10359	CG10359	CG10359	1.15	0.74
230	CG17531	GstE7	Glutathione S transferase E7	1.15	0.65
231	CG7765	Khc	Kinesin heavy chain	1.15	0.98

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
232	CG10625	CG10625	CG10625	1.14	0.8
233	CG10348	CG10348	CG10348	1.13	0.88
234	CG5590	CG5590	CG5590	1.13	0.31
235	CG6467	Jon65Aiv	Jonah 65Aiv	1.13	0.68
236	CG2174	Myo10A	unconventional myosin class XV	1.12	0.74
237	CG32594	CG32594	CG32594	1.12	0.66
238	CG6016	CG6016	CG6016	1.12	0.78
239	CG6154	CG6154	CG6154	1.12	0.33
240	CG8544	sd	scalloped	1.12	0.52
241	CG10527	CG10527	CG10527	1.11	0.56
242	CG11981	NA	NA	1.11	0.86
243	CG1303	agt	O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase	1.11	0.6
244	CG5547			1.11	0.37
245	CG8441	CG8441	CG8441	1.11	0.53
246	CG11278	Syx13	Syntaxin 13	1.1	0.73
247	CG4726	CG4726	CG4726	1.1	0.97
248	CG8628	CG8628	CG8628	1.1	0.9
249	CG9674	CG9674	CG9674	1.1	0.83
250	CR31696			1.1	0.66
251	CG1954	Pkc98E	Protein C kinase 98E	1.09	0.56
252	CG1299	CG1299	CG1299	1.08	0.68
253	CG2054	Cht2	Chitinase 2	1.08	0.56
254	CG3397	CG3397	CG3397	1.08	0.76
255	CG4789	CG4789	CG4789	1.08	0.44
256	CG12333	CG12333	CG12333	1.07	0.62
257	CG9887	VGlut	Vesicular glutamate transporter	1.07	0.76
258	CG15785	NA	NA	1.06	0.92
259	CG30122	CG30122	CG30122	1.06	0.93
260	CG3365	drongo	drongo	1.06	0.62
261	CG3683	CG3683	CG3683	1.06	0.39
262	CG5734	CG5734	CG5734	1.06	0.8
263	CG5887	desat1	desat1	1.06	0.31
264	CG1753	CG1753	CG1753	1.05	0.43
265	CG33196	dp	dumpy	1.05	0.43
266	CG13795	CG13795	CG13795	1.04	0.38
267	CG1877	lin19	lin-19-like	1.04	0.96
268	CG4262	elav	embryonic lethal	1.04	0.62
269	CG5123	W	Wrinkled	1.04	0.94
270	CG5652	NA	NA	1.04	0.62
271	CG30192	CG30192	CG30192	1.03	0.82
272	CG8479	CG8479	CG8479	1.03	0.63
273	CG10033	for	foraging	1.02	0.56
274	CG12724	CG12724	CG12724	1.02	0.39
275	CG18445	CG18445	CG18445	1	0.67
276	CG33297	NA	NA	1	0.51
277	CG6300	CG6300	CG6300	1	0.87
278	CG6933	CG6933	CG6933	1	0.82
279	CG33214	CG33214	CG33214	0.99	0.66
280	CG7988	CG7988	CG7988	0.99	0.9
281	CG8562	CG8562	CG8562	0.99	0.63
282	CG9391	CG9391	CG9391	0.99	0.33

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
283	CG4703	Arc42	Arc42	0.98	0.49
284	CG6206	CG6206	CG6206	0.98	0.96
285	CG12355	NA	NA	0.96	0.61
286	CG3413	wdp	windpipe	0.96	0.24
287	CG6562	synj	synaptojanin	0.96	0.65
288	CG7642	ry	rosy	0.96	0.55
289	CG32137	CG32137	CG32137	0.95	0.54
290	CG4389	CG4389	CG4389	0.94	0.32
291	CG11888	Rpn2	Rpn2	0.93	0.66
292	CG12101	Hsp60	Heat shock protein 60	0.93	0.35
293	CG15532	hdc	headcase	0.93	0.99
294	CG32918	NA	NA	0.93	0.62
295	CG5793	CG5793	CG5793	0.93	0.83
296	CG6028	CG6028	CG6028	0.93	0.74
297	CG6643	CG6643	CG6643	0.93	0.76
298	CG30028	NA	NA	0.92	0.44
299	CG32816	CG32816	CG32816	0.92	0.54
300	CG3886	Psc	Posterior sex combs	0.92	0.89
301	CG10617	CG10617	CG10617	0.91	0.73
302	CG13117	CG13117	CG13117	0.91	0.95
303	CG5884	par-6	par-6	0.91	0.19
304	CG1024	CG1024	CG1024	0.89	0.93
305	CG10916	CG10916	CG10916	0.89	0.79
306	CG11949	cora	coracle	0.89	0.53
307	CG33503	Cyp12d1-d	Cyp12d1-d	0.89	0.3
308	CG8862	CG8862	CG8862	0.89	0.58
309	CG17691			0.88	0.77
310	CG3153	CG3153	CG3153	0.88	0.89
311	CG12367	CG12367	CG12367	0.87	0.68
312	CG2656	CG2656	CG2656	0.87	0.73
313	CG4013	Smr	Smrter	0.87	0.56
314	CG7788	Ice	Ice	0.87	0.8
315	CG7968	CG7968	CG7968	0.87	0.8
316	CG2182	CG2182	CG2182	0.84	0.56
317	CG12847	Tsp42Ec	Tetraspanin 42Ec	0.83	0.84
318	CG9581	CG9581	CG9581	0.83	0.88
319	CG17246	Scs-fp	Succinyl coenzyme A synthetase flavoprotein subunit	0.82	0.69
320	CG1837	CG1837	CG1837	0.82	0.91
321	CG4951	CG4951	CG4951	0.82	0.7
322	CG5804	CG5804	CG5804	0.82	0.59
323	CG12008	kst	karst	0.81	0.57
324	CG13046	CG13046	CG13046	0.81	0.82
325	CG8996	wal	walrus	0.81	0.93
326	CG10639	CG10639	CG10639	0.8	0.99
327	CG2469	CG2469	CG2469	0.8	0.89
328	CG31649	NA	NA	0.8	0.72
329	CG5996	NA	NA	0.8	0.39
330	CG11885	CG11885	CG11885	0.79	0.91
331	CG32307	CG32307	CG32307	0.78	0.41
332	CG6584	SelR	SelR	0.78	0.36
333	CG9503	CG9503	CG9503	0.78	0.88

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
334	CG30051	CG30051	CG30051	0.76	0.95
335	CG9298	CG9298	CG9298	0.76	0.76
336	CG5516	CG5516	CG5516	0.74	0.54
337	CG6084	CG6084	CG6084	0.74	0.67
338	CG1088	NA	NA	0.73	0.51
339	CG1161	CG1161	CG1161	0.73	0.51
340	CG5008	GNBP3	Gram-negative bacteria binding protein 3	0.73	0.34
341	CG10060	NA	NA	0.72	0.67
342	CG32633	CG32633	CG32633	0.72	0.48
343	CG5958	CG5958	CG5958	0.71	0.97
344	CG6673	CG6673	CG6673	0.71	0.89
345	CG11055	CG11055	CG11055	0.7	0.71
346	CG5767	CG5767	CG5767	0.69	0.63
347	CG8583	CG8583	CG8583	0.69	0.99
348	CG9277	NA	NA	0.69	0.74
349	CG15251	CG15251	CG15251	0.68	0.49
350	CG3283	SdhB	Succinate dehydrogenase B	0.68	0.75
351	CG7592	Obp99b	Odorant-binding protein 99b	0.68	0.89
352	CG10045	GstD1	Glutathione S transferase D1	0.67	0.84
353	CG8912	Psi	P-element somatic inhibitor	0.65	0.85
354	CG10540	CG10540	CG10540	0.64	0.33
355	CG8788	CG8788	CG8788	0.64	0.65
356	CG11840	Spp	Signal peptide protease	0.63	0.7
357	CG3129	Rab-RP4	Rab-related protein 4	0.63	0.5
358	CG9248	CG9248	CG9248	0.63	0.71

Tab. 8.3: die signifikant vermindert exprimierten Gene des larvalen Tracheensystems nach Infektion mit *Erwinia carotovora carotovora*

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CG1660	Tim9a	Tim9a	-2.76	0.19
2	CG18619	CG18619	CG18619	-2.61	0.23
3	CG11686	CG11686	CG11686	-2.57	0.48
4	CG7519	CG7519	CG7519	-2.53	0.43
5	CG12276	Aos1	Aos1	-2.52	0.61
6	CG10753	snRNP69D	small nuclear ribonucleoprotein at 69D	-2.47	0.36
7	CG17272	CG17272	CG17272	-2.26	0.19
8	CG9740	CG9740	CG9740	-2.26	0.57
9	CG2021	CG2021	CG2021	-2.19	0.25
10	CG2813	CG2813	CG2813	-2.19	0.36
11	CG17988	NA	NA	-2.18	0.19
12	CG5757	CG5757	CG5757	-2.18	0.24
13	CG7048	CG7048	CG7048	-2.12	0.18
14	CG11522	RpL6	Ribosomal protein L6	-2.1	0.14
15	CG17508	CG17508	CG17508	-2.1	0.45
16	CG7637	CG7637	CG7637	-2.1	0.31
17	CG15317	CG15317	CG15317	-2.08	0.37
18	CG14792	sta	stubarista	-2.06	0.38
19	CG17950	HmgD	High mobility group protein D	-2.06	0.25
20	CG4210	CG4210	CG4210	-2.02	0.16

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
21	CG10685	CG10685	CG10685	-2.01	0.56
22	CR32862			-2.01	0.53
23	CG10635	CG10635	CG10635	-2	0.19
24	CG2663	CG2663	CG2663	-2	0.77
25	CG2168	RpS3A	Ribosomal protein S3A	-1.99	0.85
26	CG3450	l(2)k03203	lethal (2) k03203	-1.98	0.47
27	CG7713	CG7713	CG7713	-1.98	0.43
28	CG32069	CG32069	CG32069	-1.97	0.54
29	CG3527	CG3527	CG3527	-1.97	0.72
30	CG31450	mRpS18A	mitochondrial ribosomal protein S18A	-1.96	0.19
31	CR32864			-1.96	0.3
32	CG12324	RpS15Ab	Ribosomal protein S15Ab	-1.94	0.24
33	CG2050	mod	modulo	-1.94	0.3
34	CG16926	CG16926	CG16926	-1.93	0.2
35	CG11606	NA	NA	-1.91	0.55
36	CG5242	mRpL40	mitochondrial ribosomal protein L40	-1.88	0.3
37	CG4866	CG4866	CG4866	-1.83	0.75
38	CG10679	Nedd8	Nedd8	-1.82	0.47
39	CG14903	CG14903	CG14903	-1.81	0.38
40	CG4634	Nurf-38	Nucleosome remodeling factor - 38kD	-1.81	0.04
41	CG31184	CG31184	CG31184	-1.8	0.44
42	CG7904	put	punt	-1.8	0.85
43	CG8854	CG8854	CG8854	-1.8	0.78
44	CG15081	l(2)03709	lethal (2) 03709	-1.79	0.3
45	CG1702	CG1702	CG1702	-1.77	0.36
46	CG18495	NA	NA	-1.77	0.91
47	CG13365	CG13365	CG13365	-1.75	0.9
48	CG17218	CG17218	CG17218	-1.75	0.68
49	CG11611	Tim13	Tim13	-1.73	0.12
50	CG14283	mRpL55	mitochondrial ribosomal protein L55	-1.73	0.59
51	CG30000	CG30000	CG30000	-1.72	0.52
52	CG7200	CG7200	CG7200	-1.71	0.21
53	CG9261	nrv2	nervana 2	-1.71	0.37
54	CG5323	CG5323	CG5323	-1.7	0.25
55	CG17600	CG17600	CG17600	-1.69	0.83
56	CG30007	CG30007	CG30007	-1.68	0.91
57	CG5277	Ip259	Intronic Protein 259	-1.68	0.16
58	CG11154	NA	NA	-1.67	0.31
59	CG12346	cag	cag	-1.67	0.48
60	CG14226	dome	domeless	-1.67	0.76
61	CG14981	mge	maggie	-1.67	0.63
62	CG1558	l(1)G0237	lethal (1) G0237	-1.67	0.16
63	CG8396	Ssb-c31a	Single stranded-binding protein c31A	-1.67	0.17
64	CG17949	His2B:CG17949	His2B:CG17949	-1.64	0.38
65	CG8498	CG8498	CG8498	-1.64	0.53
66	CG13434	CG13434	CG13434	-1.63	0.3
67	CG2525	Hus1-like	Hus1-like	-1.6	0.27
68	CG30285	CG30285	CG30285	-1.6	0.67

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
69	CG6398	CG6398	CG6398	-1.6	0.66
70	CG40486			-1.59	0.8
71	CG8233	CG8233	CG8233	-1.59	0.32
72	CG2986	oho23B	overgrown hematopoietic organs at 23B	-1.58	0.59
73	CG12449			-1.57	0.58
74	CG31710	CG31710	CG31710	-1.57	0.21
75	CG32856	CG32856	CG32856	-1.57	0.3
76	CG33123	CG33123	CG33123	-1.57	0.32
77	CG33144	CG33144	CG33144	-1.57	0.95
78	CG5825	NA	NA	-1.57	0.46
79	CG6310	CG6310	CG6310	-1.57	0.49
80	CG6802	Cyp313a4	Cyp313a4	-1.57	0.9
81	CG14855	CG14855	CG14855	-1.56	0.72
82	CG13567	CG13567	CG13567	-1.55	0.72
83	CG10071	RpL29	Ribosomal protein L29	-1.54	0.22
84	CG14211	CG14211	CG14211	-1.54	0.6
85	CG11854	CG11854	CG11854	-1.53	0.31
86	CG18740	mor	moira	-1.53	0.68
87	CG1891	sax	saxophone	-1.53	0.92
88	CG8121	CG8121	CG8121	-1.53	0.5
89	CG14210	CG14210	CG14210	-1.52	0.48
90	CG10447	CG10447	CG10447	-1.51	0.44
91	CG14716	Ho	Heme oxygenase	-1.5	0.26
92	CG17996	CG17996	CG17996	-1.5	0.86
93	CG18004	CG18004	CG18004	-1.5	0.77
94	CG10392	Ogt	O-glycosyltransferase	-1.49	0.84
95	CG7025	CG7025	CG7025	-1.49	0.43
96	CG7498	CG7498	CG7498	-1.49	0.61
97	CG13418	Rpl12	Rpl12	-1.48	0.49
98	CG30029	CG30029	CG30029	-1.48	0.65
99	CG4602	Srp54	Srp54	-1.48	0.51
100	CG6554	Art1	Arginine methyltransferase 1	-1.48	0.12
101	CG9344	CG9344	CG9344	-1.47	0.26
102	CG31908	CG31908	CG31908	-1.46	0.27
103	CG3240	NA	NA	-1.46	0.43
104	CG11175	CG11175	CG11175	-1.45	0.26
105	CG13628	Rpb10	Rpb10	-1.45	0.45
106	CG17420			-1.45	0.26
107	CG18591	CG18591	CG18591	-1.45	0.15
108	CG6957	Oscillin	Oscillin	-1.44	0.45
109	CG9366	RhoL	rho-like	-1.44	0.54
110	CG11650	Lcp1	Larval cuticle protein 1	-1.43	0.36
111	CG16817	CG16817	CG16817	-1.43	0.3
112	CG6801	l(3)j2D3	lethal (3) j2D3	-1.43	0.43
113	CG18316	CG18316	CG18316	-1.42	0.34
114	CG17493			-1.4	0.4
115	CG9543	CG9543	CG9543	-1.4	0.86
116	CG9353	mRpL54	mitochondrial ribosomal protein L54	-1.39	0.82
117	CG31651	pgant5	polypeptide GalNAc transferase 5	-1.38	0.91
118	CG5474	NA	NA	-1.38	0.42

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
119	CG5554	CG5554	CG5554	-1.37	0.74
120	CG6770	CG6770	CG6770	-1.36	0.27
121	CG2207	NA	NA	-1.35	0.2
122	CG32163	CG32163	CG32163	-1.35	0.38
123	CG32530	NA	NA	-1.35	0.2
124	chic			-1.35	0.56
125	CG18649	NA	NA	-1.34	0.65
126	CG40045			-1.34	0.93
127	CG5330	Nap1	Nucleosome assembly protein 1	-1.34	0.55
128	CG7966	CG7966	CG7966	-1.34	0.37
129	CG8320	CG8320	CG8320	-1.34	0.29
130	CG10144	CG10144	CG10144	-1.33	0.59
131	CG17026	CG17026	CG17026	-1.33	0.42
132	CG7137	CG7137	CG7137	-1.33	0.43
133	CG8507	CG8507	CG8507	-1.33	0.5
134	CG11455	CG11455	CG11455	-1.32	0.61
135	CG14464			-1.32	0.86
136	CG30197	CG30197	CG30197	-1.32	0.97
137	CG5497			-1.32	0.2
138	CG8580	NA	NA	-1.32	0.53
139	CG13001	CG13001	CG13001	-1.31	0.39
140	CG4097	Pros26	Proteasome 26kD subunit	-1.31	0.54
141	CG7272	CG7272	CG7272	-1.31	0.51
142	CG8885	CG8885	CG8885	-1.31	0.66
143	CG9401	mago	mago nashi	-1.31	0.66
144	CG3186	eIF-5A	eIF-5A	-1.3	0.13
145	CG5677	CG5677	CG5677	-1.29	0.38
146	CG10778	CG10778	CG10778	-1.28	0.49
147	CG4946	CG4946	CG4946	-1.28	0.56
148	CG6180	CG6180	CG6180	-1.28	0.33
149	CG12656	CG12656	CG12656	-1.27	0.84
150	CG2767	CG2767	CG2767	-1.27	0.63
151	CG40440			-1.27	0.27
152	CG5515	CG5515	CG5515	-1.27	0.23
153	CG11887	CG11887	CG11887	-1.26	0.38
154	CG30169	CG30169	CG30169	-1.26	0.7
155	CG31901	CG31901	CG31901	-1.26	0.22
156	CG11985	CG11985	CG11985	-1.25	0.52
157	CG6865	CG6865	CG6865	-1.25	0.69
158	CG10128	tra2	transformer 2	-1.24	0.8
159	CG6755	EloA	Elongin A	-1.24	0.97
160	CG8743	CG8743	CG8743	-1.24	0.52
161	CG13059	CG13059	CG13059	-1.23	0.46
162	CG18247	shark	Src homology 2	-1.23	0.91
163	CG12975	CG12975	CG12975	-1.22	0.34
164	CG15917	CG15917	CG15917	-1.22	0.35
165	CG4912	NA	NA	-1.21	0.51
166	CG6672	CG6672	CG6672	-1.21	0.93
167	CG6773	sec13	sec13	-1.21	0.48
168	CG8998	Roc2	Roc2	-1.21	0.81
169	CG30154	CG30154	CG30154	-1.2	0.54
170	CG6984	CG6984	CG6984	-1.2	0.22

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
171	CG7281	CycC	Cyclin C	-1.2	0.8
172	CG31392	CG31392	CG31392	-1.19	0.99
173	CG6494	h	hairy	-1.19	0.85
174	CG3058	CG3058	CG3058	-1.18	0.76
175	CG9916	Cyp1	Cyclophilin 1	-1.18	0.74
176	CG12006	CG12006	CG12006	-1.17	0.75
177	CG17486			-1.16	0.61
178	CG6151	CG6151	CG6151	-1.16	0.91
179	CG10311	CG10311	CG10311	-1.15	0.44
180	CG3661	RpL23	Ribosomal protein L23	-1.15	0.99
181	CG9570	CG9570	CG9570	-1.15	0.78
182	CG10244	Cad96Ca	Cad96Ca	-1.14	0.82
183	CG2976	CG2976	CG2976	-1.14	0.58
184	CG6000	CG6000	CG6000	-1.14	0.58
185	CG18081	CG18081	CG18081	-1.13	0.23
186	CG2013	UbcD6	Ubiquitin conjugating enzyme	-1.13	0.6
187	CG6272	CG6272	CG6272	-1.13	0.42
188	CG16869	Ance-2	Ance-2	-1.12	0.43
189	CG5861	CG5861	CG5861	-1.12	0.53
190	CG8804	wun	wunen	-1.12	0.24
191	CG12895	CG12895	CG12895	-1.11	0.88
192	CG30080	CG30080	CG30080	-1.11	0.14
193	CG30173	SIP1	Syntaxin Interacting Protein 1	-1.11	0.35
194	CG4204	Elongin-B	Elongin B	-1.11	0.53
195	CG5219	mRpL15	mitochondrial ribosomal protein L15	-1.11	0.92
196	CG5630	CG5630	CG5630	-1.11	0.56
197	CG6692	Cp1	Cysteine proteinase-1	-1.11	0.75
198	CG1102	CG1102	CG1102	-1.1	0.67
199	CG11217	CanB2	Calcineurin B2	-1.1	0.74
200	CG11589	NA	NA	-1.1	0.58
201	CG5499	His2Av	Histone H2A variant	-1.1	0.7
202	CG6705	tsl	torso-like	-1.1	0.52
203	CG30430	CG30430	CG30430	-1.09	0.75
204	CG4279	CG4279	CG4279	-1.09	0.46
205	CG1703	CG1703	CG1703	-1.08	0.6
206	CG5203	CHIP	CHIP	-1.08	0.41
207	CG5537	CG5537	CG5537	-1.08	0.45
208	CG5580	sbb	scribbler	-1.08	0.71
209	CG5851	sds22	sds22	-1.08	0.59
210	CG15386	CG15386	CG15386	-1.07	0.45
211	CG2611	CG2611	CG2611	-1.07	0.84
212	CG32278	CG32278	CG32278	-1.07	0.74
213	CG14803	CG14803	CG14803	-1.06	0.14
214	CG14894	CG14894	CG14894	-1.06	0.86
215	CG2520	lap	like-AP180	-1.06	0.49
216	CG7072	CG7072	CG7072	-1.06	0.78
217	CG32267	CG32267	CG32267	-1.05	0.94
218	CG7787	CG7787	CG7787	-1.05	0.49
219	CG8472	Cam	Calmodulin	-1.05	0.51
220	CG9066	NA	NA	-1.05	0.45
221	CG11501	CG11501	CG11501	-1.03	0.33

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
222	CG15863	CG15863	CG15863	-1.03	0.52
223	CG6831	rhea	rhea	-1.03	0.79
224	CG7911	CG7911	CG7911	-1.03	0.26
225	CG8328	NA	NA	-1.03	0.83
226	CG10470	CG10470	CG10470	-1.02	0.9
227	CG2227	Gip	GIP-like	-1.02	0.71
228	CG40439			-1.02	0.95
229	CG8439	Cct5	T-complex Chaperonin 5	-1.02	0.58
230	CG9888	Fib	Fibrillarin	-1.02	0.3
231	CR32886			-1.02	0.57
232	CG6852	CG6852	CG6852	-1.01	0.48
233	CG7424	RpL36A	Ribosomal protein L36A	-1.01	0.81
234	CG14482	CG14482	CG14482	-1	0.89
235	CG5163	TfIIA-S	Transcription-factor-IIA-S	-1	0.27
236	CG6510	RpL18A	Ribosomal protein L18A	-1	0.3
237	CG12938	CG12938	CG12938	-0.99	0.91
238	CG17737	CG17737	CG17737	-0.99	0.32
239	CG6998	ctp	cut up	-0.98	0.83
240	CG12304	CG12304	CG12304	-0.97	0.7
241	CG1320	mRpL23	mitochondrial ribosomal protein L23	-0.97	0.77
242	CG2249	CG2249	CG2249	-0.97	0.76
243	CG3584	qkr58E-3	quaking related 58E-3	-0.97	0.82
244	CG31324	CG31324	CG31324	-0.96	0.82
245	CG33479	NA	NA	-0.96	0.52
246	CG6818	MESR6	Misexpression suppressor of ras 6	-0.96	0.34
247	CG10375	CG10375	CG10375	-0.95	0.68
248	CG10581	CG10581	CG10581	-0.95	0.89
249	CG13688	lpk2	lpk2	-0.94	0.64
250	CG8128	CG8128	CG8128	-0.94	0.66
251	CG12220	mRpL32	mitochondrial ribosomal protein L32	-0.93	0.86
252	CG1572	CG1572	CG1572	-0.93	0.84
253	CG18550	yellow-f	yellow-f	-0.93	0.52
254	CG4035	eIF-4E	Eukaryotic initiation factor 4E	-0.93	0.72
255	CG5869	CG5869	CG5869	-0.93	0.86
256	CG9115	myotubularin	myotubularin	-0.93	0.7
257	CG13603	CG13603	CG13603	-0.92	0.21
258	CG1234	CG1234	CG1234	-0.91	0.71
259	CG18188	Damm	Death associated molecule related to Mch2	-0.91	0.61
260	CG9358	NA	NA	-0.91	0.5
261	CG10576	CG10576	CG10576	-0.9	0.9
262	CG17712	NA	NA	-0.9	0.93
263	CG18174	Rpn11	Rpn11	-0.9	0.78
264	CG1100	Rpn5	Rpn5	-0.89	0.7
265	CG1149	MstProx	MstProx	-0.89	0.62
266	CG11780	NA	NA	-0.89	0.46
267	CG1639	l(1)10Bb	lethal (1) 10Bb	-0.89	0.28
268	CG4921	Rab4	Rab-protein 4	-0.89	0.59
269	CG5184	mRpS11	mitochondrial ribosomal protein S11	-0.88	0.52
270	CG31126	CG31126	CG31126	-0.87	0.98

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
271	CG40084			-0.87	0.5
272	CG4535	FKBP59	FK506-binding protein FKBP59	-0.87	0.39
273	CG5335	NA	NA	-0.87	0.51
274	CG16784	pr	purple	-0.86	0.68
275	CG6779	RpS3	Ribosomal protein S3	-0.86	0.57
276	CG10112	CG10112	CG10112	-0.85	0.92
277	CG11134	CG11134	CG11134	-0.85	0.53
278	CG7933	janA	janus A	-0.85	0.82
279	CG9946	NA	NA	-0.85	0.86
280	CG10951	niki	nimA-like kinase	-0.84	0.97
281	CG11784	CG11784	CG11784	-0.84	0.49
282	CG13880	mRpL17	mitochondrial ribosomal protein L17	-0.84	0.51
283	CG13695	gk	geko	-0.83	0.88
284	CG31289	Dph5	Diphthamide methyltransferase	-0.83	0.6
285	CG3625	CG3625	CG3625	-0.83	0.71
286	CG9829	poly	poly	-0.83	0.77
287	CG1359	CG1359	CG1359	-0.82	0.98
288	CG3560	CG3560	CG3560	-0.82	0.94
289	CG5258	NHP2	NHP2	-0.81	0.88
290	CG9373	CG9373	CG9373	-0.8	0.65
291	CG33320	NA	NA	-0.79	0.99
292	CG3420	CG3420	CG3420	-0.79	0.68
293	CG5013	CG5013	CG5013	-0.79	0.61
294	CG6776	CG6776	CG6776	-0.79	0.45
295	CG6840	Rpb11	Rpb11	-0.79	0.65
296	CG9853	CG9853	CG9853	-0.79	0.41
297	CG11061	GM130	GM130	-0.78	0.86
298	CG13278	CG13278	CG13278	-0.78	0.28
299	CG11563	CG11563	CG11563	-0.77	0.98
300	CG30105	CG30105	CG30105	-0.77	0.82
301	CG32276	CG32276	CG32276	-0.77	0.86
302	CG16792	DebB	Developmental embryonic B	-0.76	0.54
303	CG1901	mav	maverick	-0.76	0.86
304	CG5384	CG5384	CG5384	-0.76	0.91
305	CG15736	Chrac-16	Chrac-16	-0.75	0.87
306	CG17347	CG17347	CG17347	-0.75	0.76
307	CG9765	tacc	transforming acidic coiled-coil protein	-0.75	0.88
308	CG1227	CG1227	CG1227	-0.74	0.38
309	CG12400	CG12400	CG12400	-0.74	0.47
310	CG18679	CG18679	CG18679	-0.74	0.65
311	CG4254	tsr	twinstar	-0.74	0.3
312	CG1683	Ant2	Adenine nucleotide translocase 2	-0.73	0.82
313	CG7867	NA	NA	-0.73	0.47
314	CG10214	CG10214	CG10214	-0.72	0.88
315	CG30293	CG30293	CG30293	-0.72	0.79
316	CG32920	NA	NA	-0.72	0.77
317	CG6459	CG6459	CG6459	-0.72	0.91
318	CG15261	CG15261	CG15261	-0.71	0.79
319	CG6090	RpL34a	Ribosomal protein L34a	-0.71	0.5
320	CG10287	Gasp	Gasp	-0.7	0.8

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
321	CG1081	NA	NA	-0.7	0.48
322	CG13298	CG13298	CG13298	-0.7	0.33
323	CG7625	NA	NA	-0.7	0.58
324	CG8134	CG8134	CG8134	-0.7	0.86
325	CG8331	CG8331	CG8331	-0.7	0.76
326	CG30338	CG30338	CG30338	-0.69	0.94
327	CG5855	cni	cornichon	-0.69	0.76
328	CG1789	CG1789	CG1789	-0.68	0.67
329	CG2816	CG2816	CG2816	-0.68	0.87
330	CG4062	Aats-val	Valyl-tRNA synthetase	-0.68	0.91
331	CG6302	I(3)01239	lethal (3) 01239	-0.68	0.94
332	CG9091	RpL37a	Ribosomal protein L37a	-0.66	0.74
333	CG17358	Taf12	TBP-associated factor 12	-0.65	0.83
334	CG5920	sop	string of pearls	-0.65	0.68
335	CR31931			-0.65	0.68
336	CG9160	mtacp1	mitochondrial acyl carrier protein 1	-0.59	0.75

8.1.3 IMD-Transkriptom induziert durch Treiberstamm NP2610

Tab. 8.4: die signifikant verstärkt exprimierten Gene des larvalen Tracheensystems nach ektopischer Aktivierung des IMD-Signalwegs durch den Treiberstamm NP2610

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CG11983	CG11983	CG11983	2.05	0.46
2	CG4740	AttC	Attacin-C	2.02	0.26
3	CG13934	CG13934	CG13934	1.94	0.67
4	CG15096	CG15096	CG15096	1.93	0.34
5	CG10697	Ddc	Dopa decarboxylase	1.92	0.42
6	CG4757	CG4757	CG4757	1.87	0.22
7	CG10146	AttA	Attacin-A	1.84	0.23
8	CG30378	CG30378	CG30378	1.79	0.97
9	CG15282	CG15282	CG15282	1.77	0.37
10	CG11413	CG11413	CG11413	1.68	0.79
11	CG1367	CecA2	Cecropin A2	1.68	0.25
12	CG11422	Os-E	Olfactory-specific E	1.67	0.82
13	CG10112	CG10112	CG10112	1.64	0.07
14	CG32368	CG32368	CG32368	1.64	0.28
15	CG10120	Men	Malic enzyme	1.63	0.22
16	CG1532	CG1532	CG1532	1.63	0.25
17	CG15394	CG15394	CG15394	1.63	0.27
18	CG12839	Tsp42En	Tetraspanin 42En	1.6	0.56
19	CG13545	CG13545	CG13545	1.57	0.53
20	CG32274	Drs-l	Drosomycin-like	1.54	0.5
21	CG10332	CG10332	CG10332	1.49	0.34
22	CG9296	CG9296	CG9296	1.49	0.34
23	CG14956	CG14956	CG14956	1.48	0.21
24	CG32282	dro4	drosomycin-4	1.48	0.57
25	CG9080	CG9080	CG9080	1.48	0.51
26	CG1678	CG1678	CG1678	1.42	0.64
27	CG13403	CG13403	CG13403	1.41	0.54
28	CG15213	CG15213	CG15213	1.41	0.32

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
29	CG2901	CG2901	CG2901	1.41	0.32
30	CG8441	CG8441	CG8441	1.41	0.5
31	CG17530	GstE6	Glutathione S transferase E6	1.39	0.24
32	CG14551	CG14551	CG14551	1.38	0.56
33	CG13163	CG13163	CG13163	1.36	0.71
34	CG4471	Tsp42Ep	Tetraspanin 42Ep	1.36	0.87
35	CG5518	sda	slamdance	1.36	0.32
36	CG9090	CG9090	CG9090	1.35	0.31
37	CG3604	CG3604	CG3604	1.34	0.33
38	CG13840	CG13840	CG13840	1.33	0.58
39	CG10245	Cyp6a20	Cyp6a20	1.31	0.42
40	CG11797	Obp56a	Odorant-binding protein 56a	1.3	0.81
41	CG11814	CG11814	CG11814	1.3	0.25
42	CG10822	CG10822	CG10822	1.29	0.48
43	CG15351	NA	NA	1.29	0.3
44	CG12548	nompB	no mechanoreceptor potential B	1.27	0.22
45	CG4463	Hsp23	Heat shock protein 23	1.27	0.54
46	CR32881			1.27	0.55
47	CG1084	Cont	Contactin	1.26	0.42
48	CG15398	CG15398	CG15398	1.24	0.6
49	CG30090	CG30090	CG30090	1.24	0.21
50	CG7570	hale	hale-bopp	1.24	0.56
51	CG12763	Dpt	Diptericin	1.2	0.25
52	CG30119	CG30119	CG30119	1.19	0.7
53	CG7496	PGRP-SD	PGRP-SD	1.17	0.61
54	CG30036	CG30036	CG30036	1.15	0.49
55	CG13640	CG13640	CG13640	1.12	0.91
56	CG17781	CG17781	CG17781	1.12	0.62
57	CG8526	CG8526	CG8526	1.12	0.63
58	CG9877	CG9877	CG9877	1.11	0.46
59	CG12773	CG12773	CG12773	1.1	0.58
60	CG15523	CG15523	CG15523	1.1	0.93
61	CG31990	NA	NA	1.1	0.83
62	CG12290	CG12290	CG12290	1.09	0.54
63	CG17531	GstE7	Glutathione S transferase E7	1.09	0.87
64	CG8726	CG8726	CG8726	1.08	0.97
65	CG1385	Def	Defensin	1.07	0.87
66	CG9119	CG9119	CG9119	1.07	0.88
67	CG1623	CG1623	CG1623	1.06	0.7
68	CG17982	CG17982	CG17982	1.05	0.57
69	CG7450	CrebA	Cyclic-AMP response element binding protein A	1.05	0.79
70	CG8785	CG8785	CG8785	1.04	0.42
71	CR32999			1.04	0.86
72	CR18775			1.03	0.96
73	CG17738	CG17738	CG17738	1.02	0.51
74	CG18348	CG18348	CG18348	1.02	0.58
75	CG8910	CG8910	CG8910	1.02	0.51
76	CG1965	CG1965	CG1965	1.01	0.71
77	CG31730	CG31730	CG31730	1.01	0.68
78	CG12868	CG12868	CG12868	1	0.59
79	CG13822	CG13822	CG13822	1	0.74

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
80	CG5773	CG5773	CG5773	0.99	0.5
81	CG9020	Aats-arg	Arginyl-tRNA synthetase	0.98	0.27
82	CG3348	CG3348	CG3348	0.97	0.75
83	CG7629			0.97	0.32
84	CG11010	Ent3	Equilibrative nucleoside transporter 3	0.96	0.95
85	CG11992	Rel	Relish	0.96	0.73
86	CG32485	CG32485	CG32485	0.96	0.57
87	CG10126	CG10126	CG10126	0.95	0.68
88	CG30183	CG30183	CG30183	0.95	0.29
89	CG8809	NA	NA	0.94	0.53
90	CG10132	CG10132	CG10132	0.93	0.68
91	CG1124	CG1124	CG1124	0.93	0.37
92	CG14401	CG14401	CG14401	0.93	0.33
93	CG9261	nrv2	nervana 2	0.93	0.76
94	CG11123	CG11123	CG11123	0.92	0.93
95	CG13922	mRpL46	mitochondrial ribosomal protein L46	0.91	0.5
96	CG4878	eIF3-S9	eIF3-S9	0.91	0.49
97	CG7738	NA	NA	0.91	0.42
98	CG9819	CanA-14F	Calcineurin A at 14F	0.91	0.64
99	CG12073	5-HT7	Serotonin receptor 7	0.9	0.88
100	CG8764	ox	oxen	0.9	0.43
101	CG32626	CG32626	CG32626	0.89	0.55
102	CG8834	CG8834	CG8834	0.89	0.44
103	CG8892	CG8892	CG8892	0.89	0.53
104	CG10383	CG10383	CG10383	0.87	0.88
105	CG16815	CG16815	CG16815	0.87	0.95
106	CG17029	CG17029	CG17029	0.87	0.94
107	CG10794			0.86	0.41
108	CG14567	CG14567	CG14567	0.86	0.53
109	CG14695	CG14695	CG14695	0.86	0.6
110	CG2121	CG2121	CG2121	0.86	0.78
111	CG13377	CG13377	CG13377	0.85	0.7
112	CG31849	CG31849	CG31849	0.85	0.85
113	CG3564	CG3564	CG3564	0.85	0.55
114	CG6195	CG6195	CG6195	0.84	0.73
115	CG8851	CG8851	CG8851	0.84	0.39
116	CG8891	CG8891	CG8891	0.84	0.36
117	CG9312	CG9312	CG9312	0.84	0.82
118	CG30269	CG30269	CG30269	0.83	0.66
119	CG8800	CG8800	CG8800	0.83	0.56
120	CG11390	PebIII	Ejaculatory bulb protein III	0.82	0.42
121	CG18228	CG18228	CG18228	0.82	0.91
122	CG2216	Fer1HCH	Ferritin 1 heavy chain homologue	0.82	0.63
123	CG6224	dbo	diablo	0.82	0.83
124	CG15152	CG15152	CG15152	0.81	0.63
125	CG8908	CG8908	CG8908	0.81	0.55
126	CG1865	Spn43Ab	Serine protease inhibitor 43Ab	0.8	0.46
127	CG31839	CG31839	CG31839	0.8	0.83
128	CG5745	CG5745	CG5745	0.8	0.91
129	CG7021	Ela	Elastin-like	0.8	0.59

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
130	CG14564	CG14564	CG14564	0.79	0.78
131	CG12112	CG12112	CG12112	0.78	0.81
132	CG33144	CG33144	CG33144	0.78	0.85
133	CG10913	Spn6	Serine protease inhibitor 6	0.77	0.42
134	CG8946	Sply	Sphingosine-1-phosphate lyase	0.77	0.55
135	CG11874	CG11874	CG11874	0.76	0.43
136	CG12724	CG12724	CG12724	0.76	0.86
137	CG33116	CG33116	CG33116	0.76	0.83
138	CG6523	CG6523	CG6523	0.76	0.42
139	CG17061	mthl10	methuselah-like 10	0.75	0.66
140	CG2033			0.75	0.35
141	CG4265	Uch	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase	0.75	0.87
142	CG5041	Tfb4	Tfb4	0.75	0.7
143	CG8156	Arf51F	ADP ribosylation factor 51F	0.75	0.97
144	CG11310	CG11310	CG11310	0.74	0.34
145	CG5778	CG5778	CG5778	0.74	0.74
146	CG6272	CG6272	CG6272	0.74	0.33
147	CG6579	CG6579	CG6579	0.74	0.65
148	CG17278	CG17278	CG17278	0.73	0.94
149	CG18358	CG18358	CG18358	0.73	0.18
150	CG11885	CG11885	CG11885	0.72	0.51
151	CG11913	CG11913	CG11913	0.72	0.61
152	CG14569	CG14569	CG14569	0.72	0.29
153	CG18349	CG18349	CG18349	0.72	0.92
154	CG30010	CG30010	CG30010	0.72	0.85
155	CG30440	CG30440	CG30440	0.72	0.63
156	CG30178	CG30178	CG30178	0.71	0.5
157	CG5164	GstE1	Glutathione S transferase E1	0.71	0.47
158	CG5507	T48	Transcript 48	0.71	0.9
159	CG7207	CG7207	CG7207	0.71	0.8
160	CG31549	CG31549	CG31549	0.7	0.73
161	CG6186	Tsf1	Transferrin 1	0.7	0.57
162	CG10967	Atg1	Autophagy-specific gene 1	0.69	0.61
163	CG11883	CG11883	CG11883	0.69	0.68
164	CG11975	CG11975	CG11975	0.69	0.78
165	CG14619	CG14619	CG14619	0.69	0.38
166	CG8893	Gapdh2	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 2	0.69	0.75
167	CG9990	CG9990	CG9990	0.68	0.53
168	CG3365	drongo	drongo	0.67	0.43
169	CG40067			0.67	0.83
170	CG8945	CG8945	CG8945	0.67	0.42
171	CG11858	CG11858	CG11858	0.66	0.53
172	CG11859	CG11859	CG11859	0.66	0.68
173	CG32109	CG32109	CG32109	0.65	0.55
174	CG1299	CG1299	CG1299	0.64	0.31
175	CG30382	CG30382	CG30382	0.63	0.71
176	CG8927	CG8927	CG8927	0.63	0.71
177	CG3793	CG3793	CG3793	0.62	0.58
178	CG12079	CG12079	CG12079	0.61	0.66
179	CG32640	CG32640	CG32640	0.61	0.36

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
180	CG8604	Amph	Amphiphysin	0.61	0.72
181	CG1024	CG1024	CG1024	0.6	0.63
182	CG11906	CG11906	CG11906	0.59	0.61
183	CG12093	CG12093	CG12093	0.59	0.63
184	CG14132	CG14132	CG14132	0.59	0.52
185	CG5214	CG5214	CG5214	0.59	0.47
186	CG8918	CG8918	CG8918	0.59	0.33
187	CG9506	slam	slow as molasses	0.59	0.6

Tab. 8.5: die signifikant vermindert exprimierten Gene des larvalen Tracheensystems nach ektopischer Aktivierung des IMD-Signalwegs durch den Treiberstamm NP2610

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CR32895			-1.65	0.62
2	CG12676	ed	echinoid	-1.61	0.49
3	CG18030	Jon99Fi	Jonah 99Fi	-1.58	0.76
4	CG11650	Lcp1	Larval cuticle protein 1	-1.47	0.33
5	CG8697	Lcp2	Larval cuticle protein 2	-1.34	0.35
6	CG4281	CG4281	CG4281	-1.24	0.31
7	CG5137	Cyp312a1	Cyp312a1	-1.19	0.41
8	CG17702			-1.16	0.67
9	CG41124			-1.15	0.33
10	CG7434	RpL22	Ribosomal protein L22	-1.14	0.63
11	CG32405	CG32405	CG32405	-1.13	0.69
12	CG8825	gkt	glaiKit	-1.12	0.53
13	CG10261	aPKC	atypical protein kinase C	-1.09	0.73
14	CG6803	NA	NA	-1.09	0.68
15	CG30029	CG30029	CG30029	-1.05	0.72
16	CG10719	brat	brain tumor	-1.04	0.64
17	CG15218	CycK	Cyclin K	-0.98	0.82
18	CG15731	CG15731	CG15731	-0.97	0.83
19	CR40456			-0.97	0.67
20	CG13369	CG13369	CG13369	-0.95	0.46
21	CG14792	sta	stubarista	-0.95	0.89
22	CG14803	CG14803	CG14803	-0.95	0.79
23	CG4396	fne	found in neurons	-0.95	0.88
24	CG4502	CG4502	CG4502	-0.95	0.73
25	CG5634	dsd	distracted	-0.95	0.91
26	CG7828	NA	NA	-0.95	0.93
27	CR32665			-0.95	0.54
28	CG12758	sano	serrano	-0.94	0.32
29	CG4183	Hsp26	Heat shock protein 26	-0.91	0.66
30	CG7214	CG7214	CG7214	-0.88	0.3
31	CG6530	mthl3	methuselah-like 3	-0.87	0.67
32	CG6859	CG6859	CG6859	-0.87	0.84
33	CG6806	Lsp2	Larval serum protein 2	-0.86	0.47
34	CG8676	Hr39	Hormone receptor-like in 39	-0.86	0.75
35	CG1489	Pros45	Pros45	-0.84	0.7
36	CG17988	NA	NA	-0.84	0.66
37	CG32099	eap	ebony activating protein	-0.84	0.69
38	CG6818	MESR6	Misexpression suppressor of ras 6	-0.83	0.6

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
39	CG31868	Samuel	SAM-motif ubiquitously expressed punctatedly localized protein	-0.82	0.53
40	CG32085	CG32085	CG32085	-0.82	0.64
41	CG17597	CG17597	CG17597	-0.81	0.76
42	CG14998	CG14998	CG14998	-0.8	0.42
43	CG16975	CG16975	CG16975	-0.78	0.79
44	CG30349	CG30349	CG30349	-0.77	0.59
45	CG33229	NA	NA	-0.77	0.53
46	CG5562	gbb	glass bottom boat	-0.77	0.6
47	CG2051	CG2051	CG2051	-0.74	0.34
48	CG31676	CG31676	CG31676	-0.73	0.65
49	CG11550	CG11550	CG11550	-0.72	0.54
50	CG14411	CG14411	CG14411	-0.7	0.59
51	CG1702	CG1702	CG1702	-0.7	0.32
52	CG17381	CG17381	CG17381	-0.69	0.91
53	CG17919	CG17919	CG17919	-0.69	0.39
54	CG5804	CG5804	CG5804	-0.68	0.24
55	CG4089	CG4089	CG4089	-0.67	0.31
56	CG5812	GCR(ich)	GCR(ich)	-0.66	0.23
57	CG3314	RpL7A	Ribosomal protein L7A	-0.65	0.59

8.1.4 IMD-Transkriptom induziert durch Treiberstamm PPK4

Tab. 8.6: die signifikant verstärkt exprimierten Gene des larvalen Tracheensystems nach ektopischer Aktivierung des IMD-Signalwegs durch den Treiberstamm PPK4

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CG14190	CG14190	CG14190	4.22	0.19
2	CG4757	CG4757	CG4757	3.54	0.29
3	CG3876	CG3876	CG3876	3.14	0.11
4	CG33480	NA	NA	3.05	0.4
5	CG32368	CG32368	CG32368	3.03	0.18
6	CG15394	CG15394	CG15394	2.91	0.12
7	CG15784	CG15784	CG15784	2.84	0.33
8	CG12763	Dpt	Diptericin	2.77	0.2
9	CG32274	Drs-I	Drosomycin-like	2.59	0.39
10	CG10822	CG10822	CG10822	2.58	0.27
11	CG3427	Epac	Epac	2.57	0.22
12	CG15282	CG15282	CG15282	2.54	0.49
13	CG1385	Def	Defensin	2.51	0.72
14	CG32185	CG32185	CG32185	2.38	0.17
15	CG1367	CecA2	Cecropin A2	2.3	0.21
16	CG15096	CG15096	CG15096	2.28	0.29
17	CG10697	Ddc	Dopa decarboxylase	2.18	0.38
18	CG10126	CG10126	CG10126	2.14	0.23
19	CG4740	AttC	Attacin-C	2.14	0.62
20	CG4463	Hsp23	Heat shock protein 23	2.11	0.25
21	CG7496	PGRP-SD	PGRP-SD	2.11	0.25
22	CG9312	CG9312	CG9312	2.02	0.1
23	CG18348	CG18348	CG18348	2.01	0.22

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
24	CG1084	Cont	Contactin	1.99	0.45
25	CG11797	Obp56a	Odorant-binding protein 56a	1.97	0.14
26	CG11814	CG11814	CG11814	1.97	0.37
27	CG6357	CG6357	CG6357	1.95	0.06
28	CG13840	CG13840	CG13840	1.91	0.15
29	CG13545	CG13545	CG13545	1.88	0.18
30	CG31960	CG31960	CG31960	1.82	0.43
31	CG10794			1.81	0.53
32	CG15277	CG15277	CG15277	1.76	0.59
33	CG13922	mRpl46	mitochondrial ribosomal protein L46	1.75	0.21
34	CG13403	CG13403	CG13403	1.73	0.16
35	CG6903	CG6903	CG6903	1.72	0.39
36	CG15152	CG15152	CG15152	1.71	0.4
37	CG5773	CG5773	CG5773	1.71	0.45
38	CG6224	dbo	diablo	1.7	0.46
39	CG6195	CG6195	CG6195	1.69	0.4
40	CG6579	CG6579	CG6579	1.68	0.27
41	CG8048	Vha44	Vacuolar H	1.67	0.59
42	CG10332	CG10332	CG10332	1.66	0.31
43	CG18372	AttB	Attacin-B	1.62	0.49
44	CG4746	mab-2	mab-2	1.62	0.68
45	CG7738	NA	NA	1.6	0.42
46	CG14365	CG14365	CG14365	1.53	0.53
47	CG4347	UGP	UGP	1.52	0.62
48	CG32543	CG32543	CG32543	1.51	0.52
49	CG3588	CG3588	CG3588	1.51	0.17
50	CG10812	dro5	drosomycin-5	1.5	0.27
51	CG14567	CG14567	CG14567	1.46	0.28
52	CG9877	CG9877	CG9877	1.46	0.27
53	CG10146	AttA	Attacin-A	1.42	0.47
54	CG30285	CG30285	CG30285	1.4	0.39
55	CG3604	CG3604	CG3604	1.39	0.42
56	CG9691	NA	NA	1.38	0.35
57	CG14401	CG14401	CG14401	1.37	0.23
58	CG15785	NA	NA	1.37	0.33
59	CG32282	dro4	drosomycin-4	1.36	0.45
60	CG7629			1.34	0.38
61	CG9296	CG9296	CG9296	1.32	0.54
62	CR32880			1.29	0.21
63	CG11455	CG11455	CG11455	1.28	0.38
64	CG14619	CG14619	CG14619	1.28	0.42
65	CG17278	CG17278	CG17278	1.26	0.57
66	CG14569	CG14569	CG14569	1.24	0.28
67	CG9080	CG9080	CG9080	1.24	0.36
68	CG1532	CG1532	CG1532	1.23	0.75
69	CG7665	Fsh	Fsh-Tsh-like receptor	1.21	0.5
70	CG4665	Dhpr	Dihydropteridine reductase	1.2	0.4
71	CG15730	CG15730	CG15730	1.19	0.43
72	CG4760	bol	boule	1.18	0.62
73	CR31615			1.18	0.89
74	CG14678	CG14678	CG14678	1.16	0.48

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
75	CG11482	Mlh1	Mlh1	1.15	0.31
76	CG12567			1.15	0.5
77	CG1242	Hsp83	Heat shock protein 83	1.13	0.54
78	CG12724	CG12724	CG12724	1.1	0.66
79	CG41133			1.1	0.42
80	CG12443	ths	thisbe	1.09	0.82
81	CG13318	CG13318	CG13318	1.09	0.29
82	CG6206	CG6206	CG6206	1.08	0.83
83	CG7016	CG7016	CG7016	1.08	0.68
84	CG7296	CG7296	CG7296	1.07	0.33
85	CG4111	RpL35	Ribosomal protein L35	1.06	0.31
86	CG8588			1.04	0.63
87	CG9617	CG9617	CG9617	1.03	0.39
88	CG7365	CG7365	CG7365	1.01	0.79
89	CG5969	CG5969	CG5969	1	0.59
90	CG17738	CG17738	CG17738	0.99	0.54
91	CG33339	CG33339	CG33339	0.98	0.5
92	CG9911	CG9911	CG9911	0.98	0.56
93	CG6186	Tsf1	Transferrin 1	0.97	0.46
94	CG1890	CG1890	CG1890	0.96	0.35
95	CG32626	CG32626	CG32626	0.96	0.66
96	CG33469	NA	NA	0.96	0.62
97	CG5896	CG5896	CG5896	0.96	0.73
98	CG33477	NA	NA	0.95	0.86
99	CG9796	CG9796	CG9796	0.94	0.39
100	CG33349	ppk25	pickpocket 25	0.93	0.53
101	CG7748	OstStt3	Oligosaccharyl transferase 3	0.9	0.75
102	CG12491	CG12491	CG12491	0.89	0.4
103	CG15098	CG15098	CG15098	0.89	0.62
104	CG5988	upd2	unpaired 2	0.89	0.5
105	CG40228			0.88	0.7
106	CG9921	CG9921	CG9921	0.88	0.62
107	CG10117	ttv	tout-velu	0.87	0.87
108	CG9875	CG9875	CG9875	0.87	0.75
109	CG17108	CG17108	CG17108	0.86	0.15
110	CG31469	CG31469	CG31469	0.86	0.38
111	CG7778	CG7778	CG7778	0.86	0.59
112	CG15304	NA	NA	0.85	0.74
113	CG11027	Arf102F	ADP ribosylation factor 102F	0.84	0.87
114	CG1633	Jafrac1	thioredoxin peroxidase 1	0.84	0.29
115	CG7330	CG7330	CG7330	0.84	0.74
116	CG17527	GstE5	Glutathione S transferase E5	0.83	0.47
117	CG5855	cni	cornichon	0.83	0.34
118	CG7054	CG7054	CG7054	0.83	0.44
119	CR40454			0.83	0.42
120	CG16894	CG16894	CG16894	0.8	0.81
121	CG3352	ft	fat	0.8	0.64
122	CG6871	Cat	Catalase	0.79	0.85
123	CG9812	CG9812	CG9812	0.79	0.62
124	CG11142	CG11142	CG11142	0.78	0.85
125	CG32171	Lmpt	Limpet	0.77	0.54
126	CG33172	CG33172	CG33172	0.77	0.28

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
127	CG9856	PTP-ER	Protein tyrosine phosphatase-ERK/Enhancer of Ras1	0.76	0.77
128	CG15204	CG15204	CG15204	0.75	0.89
129	CR32314			0.75	0.63
130	CG10055	CG10055	CG10055	0.73	0.62
131	CG13224	CG13224	CG13224	0.72	0.69
132	CG11390	PebIII	Ejaculatory bulb protein III	0.71	0.72
133	CG11788	CG11788	CG11788	0.71	0.67
134	CG13335	CG13335	CG13335	0.7	0.7
135	CG7188	CG7188	CG7188	0.7	0.83
136	CG8068	Su(var)2-10	Suppressor of variegation 2-10	0.7	0.84
137	CG17293	CG17293	CG17293	0.69	0.67
138	CG14996	Chd64	Chd64	0.68	0.81
139	CG15337	CG15337	CG15337	0.68	0.2
140	CG3066	CG3066	CG3066	0.68	0.58
141	CG4381	GstD3	Glutathione S transferase D3	0.68	0.9
142	CG11992	Rel	Relish	0.67	0.91
143	CG13941	CG13941	CG13941	0.67	0.27
144	CG3348	CG3348	CG3348	0.67	0.69
145	CG40293			0.67	0.93
146	CG4265	Uch	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase	0.67	0.74
147	CG5452	dnk	deoxyribonucleoside kinase	0.67	0.85
148	CG7539	Edg91	Ecdysone-dependent gene 91	0.67	0.82
149	CG7462	Ank2	Ank2	0.66	0.8
150	CG7685	CG7685	CG7685	0.66	0.82
151	CG31729	CG31729	CG31729	0.65	0.6
152	CG3781	CG3781	CG3781	0.64	0.82
153	CG8927	CG8927	CG8927	0.64	0.52
154	CG10922	La	La autoantigen-like	0.63	0.89
155	CG14959	CG14959	CG14959	0.63	0.73
156	CG15362	CG15362	CG15362	0.63	0.46
157	CG33495	NA	NA	0.63	0.6
158	CG1527	RpS14b	Ribosomal protein S14b	0.62	0.53
159	CG31715	CG31715	CG31715	0.62	0.82
160	CG10692	Dnmt2	DNA methyltransferase 2	0.61	0.94
161	CG11824	CG11824	CG11824	0.59	0.69
162	CG12012	CG12012	CG12012	0.59	0.59
163	CG1528	NA	NA	0.59	0.58
164	CG17273	CG17273	CG17273	0.59	0.77
165	CG7830	CG7830	CG7830	0.59	0.88
166	CG9012	Chc	Clathrin heavy chain	0.59	0.35

Tab. 8.7: die signifikant vermindert exprimierte Gene des larvalen Tracheensystems nach ektopischer Aktivierung des IMD-Signalwegs durch den Treiberstamm PPK4

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
1	CG14045	CG14045	CG14045	-3.43	0.33
2	CG7941	CG7941	CG7941	-2.9	0.24
3	CG13615	CG13615	CG13615	-2.38	0.27
4	CG17475	CG17475	CG17475	-2.32	0.74
5	CG32405	CG32405	CG32405	-2.24	0.19

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
6	CG8515	CG8515	CG8515	-2.24	0.18
7	CG13063	CG13063	CG13063	-2.19	0.45
8	CG32266	CG32266	CG32266	-2.08	0.27
9	CG3338	CG3338	CG3338	-2.01	0.28
10	CG17906	CG17906	CG17906	-1.98	0.38
11	CG12665	Obp8a	Odorant-binding protein 8a	-1.9	0.41
12	CG13255	CG13255	CG13255	-1.83	0.37
13	CG12023	GV1	GV1	-1.8	0.3
14	CG33124	CG33124	CG33124	-1.78	0.58
15	CG5867	CG5867	CG5867	-1.77	0.17
16	CG7224	NA	NA	-1.76	0.54
17	CG18140			-1.74	0.41
18	CG30383	CG30383	CG30383	-1.74	0.14
19	CG5210	Chit	Chitinase-like	-1.74	0.66
20	CG5201	Dad	Daughters against dpp	-1.73	0.26
21	CG32407	CG32407	CG32407	-1.71	0.39
22	CG8498	CG8498	CG8498	-1.69	0.69
23	CG11281	CG11281	CG11281	-1.67	0.28
24	CG6426	CG6426	CG6426	-1.66	0.12
25	CG15884	CG15884	CG15884	-1.63	0.31
26	CG10570	CG10570	CG10570	-1.62	0.43
27	CG12643	CG12643	CG12643	-1.62	0.37
28	CR32665			-1.62	0.42
29	CG18105	ETH	Ecdysis triggering hormone	-1.61	0.26
30	CG7214	CG7214	CG7214	-1.61	0.31
31	CG1651	Ank	Ankyrin	-1.6	0.36
32	CG6878	CG6878	CG6878	-1.6	0.42
33	CG2043	Lcp3	Larval cuticle protein 3	-1.57	0.23
34	CG7712	CG7712	CG7712	-1.57	0.87
35	CG13504	CG13504	CG13504	-1.56	0.34
36	CG15757	CG15757	CG15757	-1.55	0.47
37	CG6074	CG6074	CG6074	-1.54	0.41
38	CG7973	NA	NA	-1.53	0.45
39	CG4325	CG4325	CG4325	-1.52	0.27
40	CG11241	CG11241	CG11241	-1.51	0.19
41	CG4982	CG4982	CG4982	-1.51	0.26
42	CG9588	CG9588	CG9588	-1.51	0.2
43	CG13059	CG13059	CG13059	-1.49	0.22
44	CG3757	y	yellow	-1.49	0.37
45	CG7049	NA	NA	-1.49	0.41
46	CG1743	Gs2	Glutamine synthetase 2	-1.48	0.21
47	CG2342	Ccp84Ag	Ccp84Ag	-1.48	0.43
48	CG11051	Nplp2	Neuropeptide-like precursor 2	-1.45	0.88
49	CG4178	NA	NA	-1.45	0.51
50	CG13160	CG13160	CG13160	-1.43	0.35
51	CG8012	CG8012	CG8012	-1.43	0.46
52	CG15357	CG15357	CG15357	-1.42	0.44
53	CG18188	Damm	Death associated molecule related to Mch2	-1.42	0.28
54	CG1179	LysB	Lysozyme B	-1.41	0.51
55	CG13445	CG13445	CG13445	-1.41	0.8
56	CG10530	Lcp65Ag1	Lcp65Ag1	-1.4	0.53

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
57	CG7077	CG7077	CG7077	-1.4	0.59
58	CG5827	RpL37A	Ribosomal protein L37A	-1.38	0.93
59	CG11218	Obp56d	Odorant-binding protein 56d	-1.35	0.27
60	CG4019	CG4019	CG4019	-1.35	0.25
61	CG7216	Acp1	Adult cuticle protein 1	-1.35	0.34
62	CG12519	CG12519	CG12519	-1.34	0.44
63	CG1317	CG1317	CG1317	-1.34	0.29
64	CG13578	CG13578	CG13578	-1.34	0.71
65	CG32954	NA	NA	-1.31	0.84
66	CG11377	CG11377	CG11377	-1.3	0.49
67	CG17896	CG17896	CG17896	-1.3	0.42
68	CG30338	CG30338	CG30338	-1.3	0.06
69	CG11550	CG11550	CG11550	-1.29	0.33
70	CG40486			-1.29	0.44
71	CG1019	Mlp84B	Muscle LIM protein at 84B	-1.28	0.24
72	CG15251	CG15251	CG15251	-1.27	0.53
73	CG16704	CG16704	CG16704	-1.27	0.73
74	CG30281	CG30281	CG30281	-1.27	0.58
75	CG9734	glob1	globin 1	-1.27	0.33
76	CG14760	CG14760	CG14760	-1.26	0.37
77	CG18773	Lcp65Ab2	Lcp65Ab2	-1.26	0.29
78	CG31436	CG31436	CG31436	-1.26	0.66
79	CG10939	Sip1	SRY interacting protein 1	-1.25	0.52
80	CG5065	CG5065	CG5065	-1.25	0.29
81	CG11306	CG11306	CG11306	-1.24	0.26
82	CG13678	CG13678	CG13678	-1.24	0.26
83	CG5596	Mlc1	Myosin alkali light chain 1	-1.22	0.63
84	CG7252	CG7252	CG7252	-1.22	0.59
85	CG2530	corto	corto	-1.21	0.52
86	CG14258	CG14258	CG14258	-1.2	0.4
87	CG32581	CG32581	CG32581	-1.2	0.47
88	CG40269			-1.2	0.46
89	CG14096	CG14096	CG14096	-1.19	0.75
90	CG14430	CG14430	CG14430	-1.19	0.41
91	CG14743	CG14743	CG14743	-1.19	0.39
92	CG10067	Act57B	Actin 57B	-1.18	0.56
93	CG17919	CG17919	CG17919	-1.18	0.12
94	CG32031	Argk	Arginine kinase	-1.18	0.95
95	CG17325	CG17325	CG17325	-1.17	0.44
96	CG18777	CG18777	CG18777	-1.17	0.4
97	CG30372	CG30372	CG30372	-1.17	0.08
98	CG30000	CG30000	CG30000	-1.16	0.59
99	CG31710	CG31710	CG31710	-1.16	0.53
100	CG8628	CG8628	CG8628	-1.16	0.83
101	CG11413	CG11413	CG11413	-1.15	0.3
102	CG14131	CG14131	CG14131	-1.15	0.16
103	CG40166			-1.15	0.27
104	CG4962	CG4962	CG4962	-1.15	0.43
105	CG9427	CG9427	CG9427	-1.15	0.35
106	CR32957			-1.15	0.83
107	CG11853			-1.13	0.16
108	CR32777			-1.13	0.5

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
109	CG14872	CG14872	CG14872	-1.12	0.65
110	CG30457	CG30457	CG30457	-1.12	0.58
111	CG32599	CG32599	CG32599	-1.12	0.56
112	CG3777	CG3777	CG3777	-1.12	0.76
113	CR33328			-1.11	0.53
114	CG1124	CG1124	CG1124	-1.1	0.57
115	CG13110	CG13110	CG13110	-1.1	0.33
116	CG14715	CG14715	CG14715	-1.1	0.74
117	CG16747	Oda	Ornithine decarboxylase antizyme	-1.1	0.86
118	CG2227	Gip	GIP-like	-1.1	0.42
119	CG32039	CG32039	CG32039	-1.1	0.68
120	CG10992	CG10992	CG10992	-1.09	0.29
121	CG5001	CG5001	CG5001	-1.08	0.62
122	CG11301	Mes4	Mes4	-1.07	0.66
123	CG18349	CG18349	CG18349	-1.07	0.28
124	CG8121	CG8121	CG8121	-1.07	0.99
125	CG8627	Dbi	Diazepam-binding inhibitor	-1.07	0.3
126	CG11686	CG11686	CG11686	-1.06	0.6
127	CG1298	CG1298	CG1298	-1.06	0.47
128	CG14815	CG14815	CG14815	-1.06	0.63
129	CG17026	CG17026	CG17026	-1.06	0.58
130	CG17029	CG17029	CG17029	-1.06	0.67
131	CG31289	Dph5	Diphthamide methyltransferase	-1.06	0.19
132	CG32528	CG32528	CG32528	-1.06	0.62
133	CG5515	CG5515	CG5515	-1.06	0.62
134	CG6450	lva	lava lamp	-1.06	0.74
135	CG9470	MtnA	Metallothionein A	-1.06	0.89
136	CG11854	CG11854	CG11854	-1.05	0.45
137	CG3035	cm	carmine	-1.05	0.37
138	CG2852	CG2852	CG2852	-1.04	0.52
139	CG2977	inx7	innexin 7	-1.04	0.74
140	CG9769	CG9769	CG9769	-1.04	0.62
141	CG11921	fd96Ca	forkhead domain 96Ca	-1.03	0.38
142	CG30411	CG30411	CG30411	-1.03	0.19
143	CG8338	mRpS16	mitochondrial ribosomal protein S16	-1.03	0.74
144	CG17190	CG17190	CG17190	-1.02	0.15
145	CG18000	sw	short wing	-1.02	0.48
146	CG13055	CG13055	CG13055	-1.01	0.53
147	CG14516	NA	NA	-1.01	0.54
148	CG14757	CG14757	CG14757	-1.01	0.22
149	CG8610	Cdc27	Cdc27	-1	0.62
150	CG11412	CG11412	CG11412	-0.98	0.82
151	CG12155	CG12155	CG12155	-0.98	0.81
152	CG15119	mip40	Myb-interacting protein 40	-0.98	0.51
153	CG18211	NA	NA	-0.98	0.32
154	CG31717	CG31717	CG31717	-0.98	0.68
155	CG13471	CG13471	CG13471	-0.97	0.56
156	CG3612	blw	bellwether	-0.97	0.46
157	CG6772	Slob	Slowpoke binding protein	-0.97	0.44
158	CG7528			-0.97	0.61
159	CG8208	MBD-like	MBD-like	-0.97	0.57

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
160	CG9990	CG9990	CG9990	-0.97	0.79
161	CG16707	vsg	visgun	-0.96	0.78
162	CG40497			-0.96	0.31
163	CG7196	CG7196	CG7196	-0.96	0.31
164	CG13096	CG13096	CG13096	-0.95	0.23
165	CG14421	CG14421	CG14421	-0.95	0.52
166	CG17218	CG17218	CG17218	-0.95	0.84
167	CG5378	Rpn7	Rpn7	-0.95	0.7
168	CG18619	CG18619	CG18619	-0.94	0.55
169	CG2759	w	white	-0.94	0.48
170	CG4511	CG4511	CG4511	-0.94	0.47
171	CG30278	CG30278	CG30278	-0.93	0.56
172	CG8238	Buffy	Buffy	-0.93	0.34
173	CG1812	CG1812	CG1812	-0.92	0.48
174	CG7072	CG7072	CG7072	-0.92	0.62
175	CG17618	CG17618	CG17618	-0.91	0.5
176	CG5516	CG5516	CG5516	-0.91	0.7
177	CG11650	Lcp1	Larval cuticle protein 1	-0.9	0.65
178	CG17950	HmgD	High mobility group protein D	-0.9	0.78
179	CG3058	CG3058	CG3058	-0.9	0.41
180	CG31937	CG31937	CG31937	-0.89	0.32
181	CG32208	825-Oak	825-Oak	-0.89	0.15
182	CG5670	NA	NA	-0.89	0.43
183	CG5825	NA	NA	-0.89	0.7
184	CG30219	CG30219	CG30219	-0.88	0.95
185	CG14482	CG14482	CG14482	-0.87	0.32
186	CG15387	CG15387	CG15387	-0.87	0.93
187	CG15829	CG15829	CG15829	-0.87	0.71
188	CG13098	mRpL51	mitochondrial ribosomal protein L51	-0.86	0.41
189	CG30195	CG30195	CG30195	-0.86	0.68
190	CG33178	CG33178	CG33178	-0.86	0.61
191	CG3989	ade5	ade5	-0.86	0.7
192	CG5184	mRpS11	mitochondrial ribosomal protein S11	-0.86	0.43
193	CG9035	NA	NA	-0.86	0.8
194	CG12404	CG12404	CG12404	-0.85	0.89
195	CG15030	CG15030	CG15030	-0.85	0.63
196	CG8194	RNaseX25	Ribonuclease X25	-0.85	0.6
197	CG18466	Nmdmc	NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	-0.84	0.37
198	CG2079	l(1)G0331	lethal (1) G0331	-0.84	0.67
199	CG33002	mRpL27	mitochondrial ribosomal protein L27	-0.84	0.62
200	CG13779	CG13779	CG13779	-0.83	0.54
201	CG17931	CG17931	CG17931	-0.83	0.43
202	CG15715	CG15715	CG15715	-0.82	0.97
203	CG16799	CG16799	CG16799	-0.82	0.61
204	CG17737	CG17737	CG17737	-0.82	0.67
205	CG18096	TepI	Thiolester containing protein I	-0.82	0.9
206	CG31705	CG31705	CG31705	-0.82	0.7
207	CG32550	CG32550	CG32550	-0.82	0.41

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
208	CG32590	CG32590	CG32590	-0.82	0.6
209	CG8472	Cam	Calmodulin	-0.82	0.19
210	CG12220	mRpL32	mitochondrial ribosomal protein L32	-0.81	0.6
211	CG14821	CG14821	CG14821	-0.81	0.79
212	CG17903	Cyt-c-p	Cytochrome c proximal	-0.81	0.75
213	CG2070	CG2070	CG2070	-0.81	0.74
214	CG30100	CG30100	CG30100	-0.81	0.28
215	CG3991	TppII	tripeptidyl-peptidase II	-0.81	0.62
216	CG5108	mRpS7	mitochondrial ribosomal protein S7	-0.81	0.76
217	CG9132	CG9132	CG9132	-0.81	0.9
218	CG18416	CG18416	CG18416	-0.8	0.73
219	CG5310	nmdyn-D6	nmdyn-D6	-0.8	0.81
220	CG5793	CG5793	CG5793	-0.8	0.59
221	CG6802	Cyp313a4	Cyp313a4	-0.8	0.85
222	CG7168	CG7168	CG7168	-0.8	0.65
223	CG8697	Lcp2	Larval cuticle protein 2	-0.8	0.25
224	CG8871	Jon25Biii	Jonah 25Biii	-0.8	0.67
225	CG13628	Rpb10	Rpb10	-0.79	0.58
226	CG18321	miple2	miple2	-0.79	0.47
227	CG32267	CG32267	CG32267	-0.79	0.64
228	CG6028	CG6028	CG6028	-0.79	0.27
229	CG6764	CG6764	CG6764	-0.79	0.28
230	CG17922	CG17922	CG17922	-0.78	0.63
231	CG4051	egl	egalitarian	-0.78	0.74
232	CG6287	CG6287	CG6287	-0.78	0.87
233	CG8509	CG8509	CG8509	-0.78	0.83
234	CG9882	Art7	Arginine methyltransferase 7	-0.78	0.83
235	CG11370	CG11370	CG11370	-0.77	0.78
236	CG18294	CG18294	CG18294	-0.77	0.5
237	CG32212	CG32212	CG32212	-0.77	0.65
238	CG6921	CG6921	CG6921	-0.77	0.59
239	CG9954	maf-S	maf-S	-0.77	0.59
240	CG14830	CG14830	CG14830	-0.76	0.59
241	CG17333	CG17333	CG17333	-0.76	0.79
242	CG1944	Cyp4p2	Cyp4p2	-0.76	0.75
243	CG31142	CG31142	CG31142	-0.76	0.78
244	CG5219	mRpL15	mitochondrial ribosomal protein L15	-0.76	0.76
245	CG5393	apt	apontic	-0.76	0.86
246	CG6697	CG6697	CG6697	-0.76	0.32
247	CG9338	CG9338	CG9338	-0.76	0.23
248	CG11471	Aats-ile	Isoleucyl-tRNA synthetase	-0.75	0.8
249	CG13042	CG13042	CG13042	-0.75	0.58
250	CG18731	CG18731	CG18731	-0.75	0.59
251	CG7181	CG7181	CG7181	-0.75	0.82
252	CG8013	Su(z)12	Su(z)12	-0.75	0.72
253	CG12389	Fpps	Farnesyl pyrophosphate synthase	-0.74	0.66
254	CG1318	Hexo1	Hexosaminidase 1	-0.74	0.76
255	CG1913	NA	NA	-0.74	0.82
256	CG2140	Cyt-b5	Cyt-b5	-0.74	0.45
257	CG3625	CG3625	CG3625	-0.74	0.57

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
258	CG6808	CG6808	CG6808	-0.74	0.76
259	CG10219	CG10219	CG10219	-0.73	0.48
260	CG15191	e(y)2	enhancer of yellow 2	-0.73	0.27
261	CG32649	CG32649	CG32649	-0.73	0.64
262	CG3450	l(2)k03203	lethal (2) k03203	-0.73	0.55
263	CG3663	CG3663	CG3663	-0.73	0.65
264	CG6779	RpS3	Ribosomal protein S3	-0.73	0.28
265	CG8511	CG8511	CG8511	-0.73	0.9
266	CG9867	NA	NA	-0.73	0.35
267	CG10217	CG10217	CG10217	-0.72	0.65
268	CG11134	CG11134	CG11134	-0.72	0.45
269	CG17484			-0.72	0.72
270	CG30358	CG30358	CG30358	-0.72	0.34
271	CG7009	CG7009	CG7009	-0.72	0.81
272	CG8306	CG8306	CG8306	-0.72	0.7
273	CG8604	Amph	Amphiphysin	-0.72	0.79
274	CG11779	CG11779	CG11779	-0.71	0.6
275	CG12212	peb	pebbled	-0.71	0.59
276	CG15308	CG15308	CG15308	-0.71	0.75
277	CG5849	CG5849	CG5849	-0.71	0.54
278	CG9372	CG9372	CG9372	-0.71	0.97
279	CG10732	CG10732	CG10732	-0.7	0.79
280	CG11844	CG11844	CG11844	-0.7	0.52
281	CG1844	SelG	Selenoprotein G	-0.7	0.35
282	CG7998	CG7998	CG7998	-0.7	0.73
283	CG9353	mRpl54	mitochondrial ribosomal protein L54	-0.7	0.51
284	CG13044	CG13044	CG13044	-0.69	0.59
285	CG14199	CG14199	CG14199	-0.69	0.63
286	CG30196	CG30196	CG30196	-0.69	0.89
287	CG30197	CG30197	CG30197	-0.69	0.9
288	CG7981	NA	NA	-0.69	0.55
289	CG9890	CG9890	CG9890	-0.69	0.74
290	CG11985	CG11985	CG11985	-0.68	0.64
291	CG31109	CG31109	CG31109	-0.68	0.84
292	CG32448	CG32448	CG32448	-0.68	0.42
293	CG4692	CG4692	CG4692	-0.68	0.75
294	CG6598	Fdh	Formaldehyde dehydrogenase	-0.68	0.48
295	CG6913	Fer3	48 related 3	-0.68	0.86
296	CG9506	slam	slow as molasses	-0.68	0.65
297	CG9815	CG9815	CG9815	-0.68	0.8
298	CG16916	Rpt3	Rpt3	-0.67	0.83
299	CG32189	CG32189	CG32189	-0.67	0.81
300	CG5562	gbb	glass bottom boat	-0.67	0.4
301	CG1057	MED31	Mediator complex subunit 31	-0.66	0.42
302	CG15093	CG15093	CG15093	-0.66	0.36
303	CG30183	CG30183	CG30183	-0.66	0.4
304	CG3224	CG3224	CG3224	-0.66	0.7
305	CG4279	CG4279	CG4279	-0.66	0.36
306	CG9790	Cks85A	Cyclin-dependent kinase subunit 85A	-0.66	0.68
307	CG12363	Dlc90F	Dynein light chain 90F	-0.65	0.62

	Gen-ID	UniGen-Symbol	UniGen-Name	Ø Log2 Ratio	Kovarianz
308	CG1742	Mgstl	Microsomal glutathione S-transferase-like	-0.65	0.51
309	CG5812	GCR(ich)	GCR(ich)	-0.65	0.33
310	CG5860	CG5860	CG5860	-0.65	0.32
311	CG7518	CG7518	CG7518	-0.65	0.82
312	CG8544	sd	scalloped	-0.65	0.47
313	CG9327	Pros29	Proteasome 29kD subunit	-0.65	0.35
314	CG11852	CG11852	CG11852	-0.64	0.87
315	CG11858	CG11858	CG11858	-0.64	0.8
316	CG14981	mge	maggie	-0.64	0.79
317	CG3527	CG3527	CG3527	-0.64	0.47
318	CG4070	Tis11	Tis11 homolog	-0.64	0.63
319	CG8930	rk	rickets	-0.64	0.53
320	CG12918	CG12918	CG12918	-0.63	0.95
321	CG31917	CG31917	CG31917	-0.63	0.9
322	CG41107			-0.63	0.85
323	CG9231	CG9231	CG9231	-0.63	0.75
324	CG11258	mRpl20	mitochondrial ribosomal protein L20	-0.62	0.89
325	CG11851	CG11851	CG11851	-0.62	0.79
326	CG5903	CG5903	CG5903	-0.62	0.56
327	CG7637	CG7637	CG7637	-0.62	0.75
328	CG8526	CG8526	CG8526	-0.62	0.44
329	CG8877	CG8877	CG8877	-0.62	0.86
330	CG10691	l(2)37Cc	lethal (2) 37Cc	-0.61	0.41
331	CG11804	ced-6	ced-6	-0.61	0.76
332	CG12276	Aos1	Aos1	-0.61	0.88
333	CG12373			-0.61	0.54
334	CG1921	sty	sprouty	-0.61	0.85
335	CG2901	CG2901	CG2901	-0.61	0.29
336	CG30279	CG30279	CG30279	-0.61	0.65
337	CG3109	NA	NA	-0.61	0.53
338	CG31901	CG31901	CG31901	-0.61	0.88
339	CG32217	Su(Tpl)	Su(Tpl)	-0.61	0.75
340	CG5163	TfIIA-S	Transcription-factor-IIA-S	-0.61	0.33
341	CG5474	NA	NA	-0.61	0.39
342	CG12384	CG12384	CG12384	-0.6	0.79
343	CG15760	CG15760	CG15760	-0.6	0.43
344	CG17173	CG17173	CG17173	-0.6	0.95
345	CG30380	CG30380	CG30380	-0.6	0.68
346	CG32278	CG32278	CG32278	-0.6	0.89
347	CG32856	CG32856	CG32856	-0.6	0.82
348	CG11525	CycG	Cyclin G	-0.59	0.68
349	CG13746	MrgBP	MrgBP	-0.59	0.72
350	CG14270	CG14270	CG14270	-0.59	0.42
351	CG2976	CG2976	CG2976	-0.59	0.61
352	CG9295	CG9295	CG9295	-0.59	0.91
353	CG9336	CG9336	CG9336	-0.59	0.63

8.2 Kreuzungsschema des homozygoten Gal4/ Gal80-Fliegenstamms PPK4/ α Tubulin 84B

F1 (1):

rote Augen

$$\frac{w^+ \text{ Gal4; } +}{y \text{ ; Gal4; } +} \quad \times \quad \frac{w \text{ Sp} \text{ TM2}}{y \text{ ; Cyo; } \text{TM6b}}$$

weiße Augen, gewellte Flügel,
verdickte Halteren, lange Borsten
an Humeri

$$\Rightarrow \frac{w^+ (w^+) \text{ Gal4} \text{ } +}{y (w^+); \text{Cyo; } \text{TM6b}}$$

rote Augen, gewellte
Flügel, lange Borsten an
Humeri

F1 (2):

rote Augen

$$\frac{w^+ \text{ } + \text{ Gal80}}{y \text{ ; } +; \text{Gal80}} \quad \times \quad \frac{w \text{ Bl} \text{ TM2}}{y \text{ ; Cyo; } \text{TM6B}}$$

weiße Augen, gewellte Flügel,
verdickte Halteren, lange
Borsten an Humeri

X

$$\Rightarrow \frac{w^+ (w^+) \text{ Cyo} \text{ TM2}}{y (w^+); \text{ } + \text{ ; Gal80}}$$

rote Augen, gewellte Flügel,
verdickte Halteren

F2:

$$\frac{w^+ \text{ Gal4} \text{ TM6B}}{y \text{ ; Cyo; } +} \quad \times \quad \frac{w^+ \text{ Cyo} \text{ TM2}}{y \text{ ; } + \text{ ; Gal80}}$$

rote Augen, gewellte Flügel,
lange Borsten
an Humerirote Augen, gewellte Flügel,
verdickte Halteren

$$\Rightarrow \frac{w^+ (w^+) \text{ Cyo} \text{ TM6B}}{y (w^+); \text{Gal4; } \text{Gal80}}$$

rote Augen, gewellte Flügel,
lange Borsten an Humeri

F3:

$$\frac{w^+ \text{ Cyo} \text{ TM6B}}{y \text{ ; Gal4; } \text{Gal80}} \quad \times \quad \frac{w^+ \text{ Cyo} \text{ TM6B}}{w^+; \text{Gal4; } \text{Gal80}}$$

$$\Rightarrow \frac{w^+ (w^+) \text{ Gal4} \text{ Gal80}}{y (w^+); \text{Gal4; } \text{Gal80}}$$

rote Augen

9 Erklärung

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

Kiel, den 28 Mai 2008

(Christina Wagner)

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt insbesondere folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder danke ich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit, die stetige Bereitschaft zur Diskussion und nicht zuletzt für die Begutachtung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach für die Anfertigung der Ultradünnschnitte und ihrer Dokumentation in der Elektronenmikroskopie bedanken. Die Aufnahmen haben insbesondere zum besseren Verständnis des *Drosophila*-Modells meiner Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Zak Razak an der Universität Toronto in Kanada, der mir über eine längere Zeit sämtliche Fragen die Auswertung von Mikroarrays betreffend beantwortet hat.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei der Arbeitsgruppe klinische Chemie und molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg, wo ich ein „unbeschwertes“ erstes Doktorandenjahr verbrachte. Danke Tanja für die unkomplizierte und intensive Versorgung mit Fachliteratur besonders in der Endphase der Arbeit.

Ein Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe Zoophysiologie in Kiel und hierbei besonders an Dr. Kerstin Isermann, Sebastian Schneider und Christine Fink und an Frau Gaby König und Frau Meike Dibbern.

Für die „moralische“ Unterstützung, in „toughen“ Zeiten den wissenschaftlichen Optimismus zu bewahren und ihn immer wieder zu generieren, besonders in der finalen Arbeitsphase, meinen lieben Dank an Kirstin Gerber, Silja Fuchs und insbesondere Heide M. Brandtner.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, dass sie mich in vollem Vertrauen in jeglicher Hinsicht unterstützt hat und zu jeder Zeit verlässliche Ansprechpartner waren.

Zuallerletzt möchte ich mich bei Michael bedanken, der mich in meiner Entscheidung, in den hohen Norden zu gehen, unterstützt hat und am Ende meiner Promotionszeit doch kühn genug war, sich auf einen wissenschaftlichen Diskurs mit einer „Drosophilen“ einzulassen.

11 Curriculum vitae

	Christina Wagner, Diplombiologin
Geburtsdatum	21 November 1976
Geburtsort	Heidelberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
	Ausbildung
03.2004-02.2008	<p>Beginn der Doktorarbeit in der Abteilung für klinische Chemie und molekulare Diagnostik an der Philipps-Universität Marburg und seit Mai 2005 Fortführung der Arbeit in der Abteilung für Zoophysiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Prof. Dr. T. Roeder)</p> <p>Thema: Die Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i> als Modell für die Analyse entzündlicher Erkrankungen der Atemwege</p>
09.2002-05.2003	<p>Diplomarbeit in der Abteilung für spezielle Zoologie an der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. M. Hassel</p> <p>Thema: Untersuchungen zum räumlich-zeitlichen Proteinexpressionsmuster der Rezeptortyrosinkinase bei <i>Hydra vulgaris</i></p>
1999-2002	<p>Hauptstudium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Fächer: Zoologie, Entwicklungsbiologie, Molekularbiologie und Zellbiologie) mit Abschluss Diplom</p>
1997-1999	<p>Grundstudium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg</p>
1987-1996	Gymnasium: Hölderlin Gymnasium Heidelberg
1983-1987	Grundschule: Kirchwaldschule Gaiberg

12 Abstracts

- 09/2005** **Wagner C.** and Roeder T. The role of *Drosophila* respiratory epithelium in immune defense. (2005) *Immunobiology*. **210**: 6-8.
- 10/2005** **Wagner C.** and Roeder T. Immune response of *Drosophila* respiratory epithelium. (2005) 98th Meeting of the German Zoological Society in Bayreuth.
- 11/2005** **Wagner C.** and Roeder T. Pathogen-induced transcriptome of the respiratory epithelium of *Drosophila melanogaster*. (2005) 28th Meeting of the Northern Society of Immunology in Borstel.
- 10/2007** **Wagner C.**, Fehrenbach H. and Roeder T. Creation of an animal model to study the basic aspects of chronic asthma. Symposium of the SFB/ Transregio 22 in Rauschholzhausen, Marburg.
- Preise**
- 11/2005** Biosource Award für die beste Präsentation auf der 28. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen