

Auswirkungen allergener und mikrobieller Komponenten auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Dissertation

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

angefertigt am Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie
(Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

vorgelegt von
Christine Warmbold
aus Lüneburg

Hamburg, Februar 2010

Referent:	Prof. Dr. Thomas Roeder
Koreferent:	PD Dr. Holger Heine
Tag der mündlichen Prüfung:	29.04.2010
zum Druck genehmigt am:	29.04.2010

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“

(Johann Wolfgang Goethe)

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

aaUTP	5-(3-aminoallyl)UTP
AK	Antikörper
<i>A. lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
AMP	antimikrobielles Peptid
APC	Antigen-Presenting-Cell
α -	alpha-
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<i>B. subt.</i>	<i>Bazillus subtilis</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CG	<i>computed gene</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i>
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxyzytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DAP	Diaminopimelinsäure
ieDAP	γ -D-Glu-DAP
DC	dendritische Zelle
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DIF	<i>dorsal related immunity factor</i>
DMEM	Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DREDD	<i>death related CED-3/Nedd2-like protein</i>
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
ds-cDNA	doppelsträngige cDNA
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii / et altera</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GNBP	<i>Gram-negative binding protein</i>
GRAS	generally regarded as safe
h	<i>hour / Stunde</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
I κ B	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
IKK	I κ B-Kinase Komplex
IL	Interleukin
IM	<i>immune induced molecules</i>
IMD	<i>immune deficiency</i>
IRAK	<i>IL-1-Receptor-Associated-Kinase</i>
K	Kontrolle
k.o.	<i>knock-out</i>
LB	<i>Medium Luria Broth Medium</i>

LG	L-Glutamin
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich Repeat</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated-Proteins</i>
MD2	<i>Myeloid differentiation protein 2</i>
MDP	Muramyldipeptid
Min	Minuten
mRNA	<i>messenger-Ribonucleic -Acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	<i>Myeloid-Differentiation-factor-88</i>
NF κ -B	<i>Nuclear-Factor of kappa light chain enhancer in B cells</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
Pam ₃ C-SK ₄	synthetisches triacetyliertes Lipopeptid
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	para-Formaldehyd
PGN	Peptidoglykan
PGRP	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS	Penizillin/Streptavidin
Pwo	<i>Pyrococcus woessii</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SODD	<i>silencer of death domains</i>
SPE	Spätzle-prozessierendes Enzym

SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
T _H -Zelle	T _{Helfer} -Zelle
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TIR-Domäne	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	<i>TNF receptor associated death-domain</i>
TRAF	TNFR-associated factor
tRNA	transfer-RNA
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethylamin
Trizin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycine
U	Units/Einheiten
wt	Wildtyp
% (w/v)	<i>percent weight per volume</i>
WHO	<i>world health organization</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allergie und Allergene	1
1.1.1	Allergie	1
1.1.2	Allergene	4
1.2	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus molekularbiologischer Forschung	6
1.3	Das Immunsystem von <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.3.1	Der Toll-Signalweg	9
1.3.2	Toll-Signalwege im humanen System	10
1.3.3	Der IMD-Signalweg	12
1.3.4	Der humane TNFR-Signalweg	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und ihre Bezugsquellen	17
2.1.2	Geräte	20
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.4	Puffer und Lösungen	21
2.1.5	Kits	23
2.1.6	Stimuli	23
2.1.7	Medien	23
2.1.8	DNA-Polymerasen	25
2.1.9	Plasmide	25

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.10	Bakterien	26
2.1.11	Marker und Ladepuffer	26
2.1.12	Zelllinien	26
2.1.13	<i>Drosophila</i> -Stämme	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellzahlbestimmung	28
2.2.2	Transfektion verschiedener Zellen	29
2.2.3	Stimulation der Zelllinien	30
2.2.4	ELISA (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)	31
2.2.5	Luciferase-Assay	31
2.2.6	Durchflusszytometrie (<i>FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)	31
2.2.7	MTT-Test	32
2.2.8	RNA-Isolation	32
2.2.9	cDNA-Synthese	32
2.2.10	<i>Real-time PCR</i>	33
2.2.11	Transformation	34
2.2.12	Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen	34
2.2.13	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.2.14	DNA-Mikroarray	35
2.2.15	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.16	Inhibierung des Allergens rDer p 1	42
2.2.17	Aufzucht und Haltung der Fliegen	43
2.2.18	Präparation der Fettkörper aus den Fliegenlarven	43
2.3	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Einfluss des Häutungshormons Ecdyson auf immunkompetente Zellen der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i>	46
3.1.1	Ecdyson beeinflusst die Transfektionsrate immunkompetenter Zellen	46
3.1.2	Ecdyson beeinflusst die Zellviabilität immunkompetenter Zellen	50

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.3	Ecdyson beeinflusst die Immunantwort	51
3.2	Einfluss des Hausstaubmilbenallergens	
	Der p 1 auf das angeborene Immunsystem	53
3.2.1	Mikrobielle Kontaminationen in Der p 1	53
3.2.2	Immunantwort des angeborenen Immunsystems auf das Allergen Der p 1	57
3.2.3	Einfluss von Der p 1 auf die Immunantwort des Fettkörpers der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i>	64
3.2.4	Charakterisierung der an der Signalgebung durch Der p 1 beteiligten Signalwege	66
3.2.5	Die Immunantwort wird durch die proteolytische Aktivität ausgelöst	70
3.3	Vergleich der Transkriptome allergen- stimulierter S2-Zellen und Fettkörper	73
3.4	Einfluss des Gram-positiven Bakteriums <i>Lactococcus lactis</i> auf das Immunsystem der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i>	82
3.4.1	Reaktion des angeborenen Immunsystems auf <i>Lactococ- cus lactis</i>	82
3.4.2	Immunsupprimierender Effekt von <i>L. lactis</i> auf das ange- borene Immunsystem	84
3.4.3	“Allergieprotektiver” Effekt von <i>L. lactis</i>	86
3.5	Vergleich der Transkriptome <i>E. coli</i> - und <i>L. lactis</i> - stimulierter S2-Zellen	88
4	Diskussion	94
4.1	Einfluss des Häutungshormons Ecdyson auf immunkompetente Zellen der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i> .	95
4.2	Einfluss des Hausstaubmilbenallergens Der p 1 auf das angeborene Immunsystem	97
4.3	Einfluss des Gram-positiven Bakteriums <i>Lactococcus lactis</i> auf das Immunsystem der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i>	105
4.4	Fazit	107
5	Zusammenfassung	108

INHALTSVERZEICHNIS

6 Summary	110
Literaturverzeichnis	112
Danksagung	122
Erklärung	124

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung des Toll- und des IMD-Signalweges	8
3.1	Einfluss von Ecdyson auf die Transfektionseffizienz der S2-Zellen .	49
3.2	MTT-Test mit Ecdyson-behandelten S2-Zellen	51
3.3	Ecdyson verstärkt die Immunantwort	52
3.4	CXCL-8-Freisetzung in TLR2-CD14 und TLR4-CD14-MD2 transfizierten HEK293-Zellen	54
3.5	CXCL-8-Freisetzung von mit NOD1 und NOD2 transfizierten HEK293-Zellen	56
3.6	Der p 1 vermittelte Immunantwort	58
3.7	Kinetik der Immunantwort auf das Allergen Der p 1	60
3.8	Reduzierte Promotoraktivierung bei Zweitkontakt mit dem Allergen	62
3.9	Gesteigerte Immunantwort bei Erstkonfrontation mit einem Bakterium und Zweitkonfrontation mit dem Allergen	63
3.10	Immunantwort des Fettkörpers auf Der p 1	65
3.11	Fettkörper aus rel ko-Fliegen zeigen keine Immunantwort auf Der p 1	68
3.12	Fliegen, die im Fettkörper den Rezeptor PGRP-LC nicht exprimieren, reagieren nicht auf Der p 1	70
3.13	Inaktives Der p 1 löst in isolierten Fettkörpern keine Immunantwort aus	72
3.14	Venn-Diagramm erstellt anhand der Genlisten der bei Infektion regulierten Gene sowie der nach Allergestimulation in S2-Zellen und in isolierten Fettkörpern verstärkt (a) und vermindert (b) exprimierten Gene	74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

3.15 Infektionsrelevante Gene, die nach Allergenstimulation sowohl im Fettkörper als auch in den S2-Zellen exprimiert werden	75
3.16 Infektionsrelevante Gene, die ausschließlich im Fettkörper oder in den S2-Zellen verstärkt exprimiert werden	77
3.17 Vermindert exprimierte, infektionsrelevante Gene im Fettkörper und in den S2-Zellen	78
3.18 Nicht-infektionsrelevante, verstärkt und vermindert exprimierte Gene im Fettkörper und in den S2-Zellen	79
3.19 Gene, die nach Allergenstimulation ausschließlich im Fettkörper verstärkt exprimiert wurden und mit einer Antwort auf einen abiotischen Stimulus assoziiert sind	80
3.20 Vermindert exprimierte, nicht-infektionsrelevante Gene des Fettkörpers und der S2-Zellen	81
3.21 <i>Lactococcus lactis</i> induziert keine Immunantwort	83
3.22 <i>Lactococcus lactis</i> beeinflusst auch die Immunantwort nicht	85
3.23 <i>L. lactis</i> hat in der Taufolie keinen allergieprotektiven Effekt	87
3.24 Venn-Diagramm erstellt anhand der Genlisten der bei Infektion regulierten Gene sowie der nach Stimulation der S2-Zellen mit <i>E. coli</i> und <i>L. lactis</i> verstärkt (a) und vermindert (b) exprimierten Gene	89
3.25 Nach 24-stündiger Inkubation mit <i>E. coli</i> verstärkt und vermindert exprimierte, infektionsrelevante Gene	91
3.26 Infektionsrelevante Gene, die nach 24-stündiger Stimulation mit <i>L. lactis</i> verstärkt und vermindert exprimiert werden	92

Tabellenverzeichnis

1.1	humane TLRs und ihre Liganden	11
2.1	Übersicht der verwendeten Plasmide	26
2.2	verwendete Fliegenstämme und ihre Quellen	28
2.3	Übersicht über verwendete Expressionsprimer	33
2.4	PCR-Programm der Zweitstrangsynthese	37
2.5	Primer der Erst- und Zweitstrangsynthese	38
3.1	Transfektionsraten nach Ecdysonbehandlung	47

Kapitel 1

Einleitung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden die Auswirkungen mikrobieller und allergener Komponenten auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* untersucht. Im einleitenden Kapitel der Arbeit werden zunächst Allergien und Allergene beschrieben (Abschnitt 1.1). Der anschließende Teil behandelt den Modellorganismus, die Taufliege, sowie das angeborene Immunsystem (Abschnitte 1.2 und 1.3), wobei auch auf die homologen Signalwege im humanen System eingegangen wird. Abschließend wird auf das Ziel der Dissertation (Abschnitt 1.4) eingegangen.

1.1 Allergie und Allergene

1.1.1 Allergie

Der Begriff Allergie wurde erstmals 1906 von Clemens Freiherr von Pirquet geprägt [1]. Von Pirquet bezeichnete damit die ungewöhnliche Neigung einiger Individuen, Symptome hypersensitiver Reaktionen zu entwickeln, wenn sie mit bestimmten Substanzen konfrontiert werden. Allergie wird heute als eine abnormale adaptive Immunantwort gegen nicht-infektiöse Komponenten aus der Umwelt definiert. Diese Reaktionen sind charakterisiert durch die Beteiligung von Allergie-spezifischem Immunglobulin(Ig)E-Antikörper und T_{Helfer}2 (T_H2)-Zellen, die Allergen-spezifische Antigene erkennen [2].

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Allergien klassifiziert man als Überempfindlichkeit. Als solche werden Immunreaktionen bezeichnet, die Gewebeschäden hervorrufen und zu ernsthaften Erkrankungen führen können. Diese treten dann auf, wenn ein Individuum, das nach der ersten Konfrontation mit einem Allergen IgE-Antikörper produziert hat, erneut mit dem Allergen Kontakt hat. Das charakteristische IgE entsteht bei einer allergischen Reaktion lokal durch Plasmazellen, die aus Keimzentren stammen und sich innerhalb des entzündeten Gewebes entwickeln. Im weiteren Verlauf bindet es an spezialisierte Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen, basophilen und aktivierten eosinophilen Granulozyten [2].

An dieses IgE kann nun das Allergen binden und es erfolgt eine Quervernetzung der FcεRI-Rezeptoren an der Zelloberfläche der Mastzellen, die somit aktiviert werden. Als Folge der Aktivierung setzen sie eine Reihe von Mediatoren (darunter Histamin) und Zytokine (beispielsweise IL-4 und IL-13) frei und sind so für die Ausbildung einer allergischen Immunreaktion maßgebend. Auf diese Sofortreaktion folgen längeranhaltende Reaktionen, an denen vor allem T_H2-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten beteiligt sind [2].

Neben diesem Typ der Hypersensibilität (Typ I) werden noch drei weitere unterschieden: die Typen II-IV. Die Reaktionen des Typ II sind IgG-vermittelt und richten sich gegen Zelloberflächenantigene. Ein typisches Beispiel für eine solche Erkrankung ist eine Medikamentenallergie. Typ III -Hypersensibilitätsreaktionen sind geprägt durch die Bildung von Immunkomplexen, bestehend aus Allergen und Antikörper, welche im Blut zirkulieren. Als Beispiel für eine Erkrankung diesen Typs sei die Arthritis (Entzündung der Gelenke) angeführt. An den Reaktionen der Typen II und III ist das Komplementsystem beteiligt, dessen Aktivierung letztlich zu Gewebeschäden führt. Reaktionen des Typ IV sind T-Zell-vermittelt. Die Symptome treten hier erst relativ spät (nach 24 bis 48 Stunden) auf. Man kann diesen Reaktionstyp in drei Subtypen anhand der hauptsächlich beteiligten Zellen unterteilen. Bei dem ersten Subtyp sind dies T_H1-Zellen, die dominanten Zellen des zweiten Subtyps sind die eosinophilen Zellen und beim dritten Subtyp handelt es sich um zytotoxische T-Zellen. Die allergische Kontaktdermatitis ist ein Beispiel für eine Erkrankung des Typ IV [2].

Allergien treten häufig in westlichen Industrienationen auf, in denen Hygiene einen wesentlichen Teil des alltäglichen Lebens ausmacht. Erstmals wurde ein

Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Auftreten von Allergien und den zunehmenden hygienischen Standards sowie der geringen Anzahl an Infektionen im Kindesalter in der sogenannten "Hygiene-Hypothese" beschrieben [3]. Diese These wurde gestützt durch eine Reihe von Studien, die zeigten, dass Infektionen, seien sie viral, bakteriell oder parasitär, einen protektiven Effekt auf die Allergieentwicklung haben [4]. In weiteren Studien wurden Daten erhoben, die nachwiesen, dass Kinder, die in ländlicher Umgebung auf einem Bauernhof aufwachsen, weniger unter Allergien leiden als Kinder, die zwar auch in ländlicher Umgebung, aber nicht auf einem Bauernhof, aufwachsen. Das Immunsystem von Kleinkindern weist in den ersten Lebensmonaten eine Verschiebung des lymphozytären Gleichgewichtes in Richtung T_H2 -Dominanz auf. Diese ist vor allem während der Schwangerschaft und der Geburt wichtig, um eine Immunreaktion zwischen Mutter und Kind zu vermeiden [5]. Das gesunde Gleichgewicht, das später zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen besteht, entsteht dann in den ersten Lebensjahren. Die genannten Infektionen führen zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes, welches zwischen den T-Zellen herrscht, in Richtung T_H1 -Immunantwort [6] und unterdrücken so die T_H2 -Antwort, die allergieassoziiert ist. In einer vorherigen Arbeit wurde gezeigt, dass in Kuhstallstäuben Bakterien existieren, die immunmodulatorische Wirkung aufweisen [7]. Aus diesen Stäuben wurden zwei Stämme isoliert und näher charakterisiert. Es handelt sich hierbei um *Acinetobacter lwoffii* F78 (Gram-negativ) und *Lactococcus lactis* G121 (Gram-positiv). Debarry *et al.* (2007) [7] konnten zeigen, dass diese beiden isolierten Stämme sowohl in Mäusen allergische Reaktionen reduzieren als auch *in vitro* Zellen aktivieren und in dendritischen Zellen eine T_H1 -Antwort induzieren können. Die Untersuchungen an *Lactococcus lactis* sind von sehr großem Interesse, da dieses Bakterium zu den sogenannten "good old friends" gehört, denen eine große Bedeutung in der Entwicklung des Immunsystems zukommt [8]. Zudem hat *L. lactis* den GRAS (*generally regarded as safe*)-Status erhalten [9]. Zu klären bleibt, welchen Einfluss es auf das angeborene Immunsystem hat. Immunmodulatorische Effekte können auch den Bakterien zugeschrieben werden, die den Darm des Menschen besiedeln. In Zusammenhang mit den Darmbakterien wurde festgestellt, dass Probiotika Auswirkungen auf das Immunsystem haben, indem sie eine T_H1 -Antwort und eine regulatorische Immunantwort

induzieren [10].

1.1.2 Allergene

Viele Allergien, wie zum Beispiel die Allergien gegen Gräserpollen und Hausstaubmilben, werden durch eingeatmete Proteine ausgelöst. Jedoch führen nicht alle eingeatmeten Proteine zu einer allergischen Reaktion. Die Frage nach dem Charakteristikum eines Allergens ist derzeit noch immer ungeklärt. Es lassen sich jedoch einige allgemein gültige Regeln aufstellen:

- Die meisten Allergene sind kleine, gut lösliche Proteine, die auf trockenen Partikel (zum Beispiel Pollen oder Milbenkot) transportiert werden.
- Kommen diese Proteine mit Schleimhäuten in Kontakt, wird das lösliche Allergen vom Partikel eluiert und diffundiert in die Schleimhäute.
- Allergene wirken in sehr geringen Konzentrationen auf das Immunsystem ein.
- Allergene besitzen keine PAMPs und werden somit nicht über Mustererkennungszepatoren erkannt [11].
- Viele Allergene haben enzymatische Aktivität.

Im folgenden wird exemplarisch ein Aeroallergen (Der p 1) beschrieben.

Das Hausstaubmilbenallergen Der p 1

Die Allergie gegen Hausstaubmilben hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dies beruht auf den verbesserten Möglichkeiten der Raumabdichtung, die zu einem Anstieg der Luftfeuchtigkeit in den Wohnräumen geführt haben. Somit kommt es in den Wohnungen nicht mehr zu einem Austausch der "Außenluft" mit der "Innenluft". Häufig wird eine Luftfeuchtigkeit von über 60% gemessen. Dies stellt eine optimale Bedingung für die Vermehrung der Hausstaubmilben dar. Insgesamt existieren 19 Gruppen von Allergenen der Hausstaubmilbe, die sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit, IgE zu binden, und ihres Molekulargewichtes un-

terscheiden [12]. Das Hauptallergen im Kot der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Der p 1, ist ein Enzym. Es besteht aus einer Papain-homologen Cysteinprotease, ist 25 kDa groß, spaltet Occludin, einen Bestandteil der festen Zell-Zell-Verbindung der Epithelzellen (*tight junctions*) und zerstört damit die Barrierefunktion des Epithels [13]. Durch diese Reaktion wird es dem Allergen möglich, in die subepithelialen Schichten vorzudringen und von dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen zu werden. Die DCs wandern zu den Lymphknoten, wo sie das aufgenommene Antigen präsentieren und die Erzeugung von T_H2-Zellen stimulieren. Weiterhin werden durch das eingedrungene Allergen auch Mastzellen aktiviert, sodass eine allergische Immunantwort ausgelöst wird. Die proteolytische Aktivität des Der p 1 führt auch dazu, dass die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors, CD25, auf T-Zellen gespalten wird. Diese Reaktion, so wird vermutet, bewirkt eine Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichtes in Richtung T_H2 [14, 15].

Durch die proteolytische Aktivität von Der p 1 kann α 1-Antitrypsin inhibiert werden [16]. Dies ist ein Enzym, welches dem Schutz der Atemwege dient, da es die Aktivität verschiedener Proteasen [17], wie zum Beispiel der neutrophilen Elastase hemmt [18]. Der p 1 ist weiterhin in der Lage, das Oberflächenmolekül CD23 zu spalten [16]. Das CD23-Antigen wirkt als niedrigaffiner IgE-Rezeptor auf B-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und DCs. CD23 bindet IgE, was eine negative Rückkoppelung auf die IgE-Bildung zur Folge hat [19]. Durch die Spaltung von CD23 durch Der p 1, wird diese negative Rückkoppelung unterdrückt und die IgE-Konzentration steigt an.

Bislang ist wenig über die Wirkung von Der p 1 auf das angeborene Immunsystem bekannt. Dies sollte jedoch nicht außer acht gelassen werden, da das angeborene Immunsystem über die Schnittstelle der dendritischen Zellen in der Lage ist, die adaptive Immunantwort zu modulieren. In der vorliegenden Arbeit werden daher Untersuchungen über die Wirkung von Der p 1 auf das angeborene Immunsystem angestellt.

1.2 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus molekulargenetischer Forschung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird der Einfluss mikrobieller und allergener Komponenten auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* untersucht. In dem folgenden Abschnitt wird dieser Modellorganismus daher näher erläutert.

Der Name *Drosophila* leitet sich von den griechischen Wörtern “*drosos*” (Tau) und “*philos*” (lieb, freundlich) ab. Die schwarzbäuchige Taufliege (*Drosophila melanogaster*) wurde erstmals von Johann Wilhelm Meigen im Jahre 1830 beschrieben. Seit 1901 wird sie als Versuchstier systematisch untersucht. Zunächst von William Ernest Castle, der an ihr Inzuchtforschung betrieb, und später dann von Thomas Hunt Morgan (ab 1908). Morgan zeigte anhand dieses Modellorganismus, dass die Gene auf den Chromosomen Einheiten der Vererbung sind [20]. Er beschrieb den Mechanismus der Chromosomenstrang-Überkreuzung (Crossing-over) und konnte somit die relative Position der Gene auf *Drosophila*-Chromosomen feststellen. 1933 erhielt er für seine Entdeckungen den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Ebenfalls einen Nobelpreis erhielt 1995 Christiane Nüsslein-Volhard für die Entdeckung des Toll-Proteins und der Aufklärung seiner Rolle in der Embryonalentwicklung [21]. Dieses Protein dient sowohl zur Ausbildung der dorso-ventral Achse während der Embryonalentwicklung als auch zur Erkennung von Pathogenen, genauer gesagt Komponenten aus Grampositiven Bakterien und Pilzen.

Im Jahre 2000 wurde die Nucleotidsequenz des kompletten Genoms der Taufliege veröffentlicht. Es besteht aus mehr als 13500 Genen, von denen 60% homolog zu Genen des Menschen sind, darunter auch Gene des Immunsystems, wie zum Beispiel *toll*, *myd88*, und *imd*. Diese umfassenden Homologien zum humanen Immunsystem, sowie das Fehlen eines adaptiven Immunsystems machen die Taufliege zu einem prädestinierten Modell für Studien des angeborenen Immunsystems.

1.3 Das Immunsystem von *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster verfügt über mehrere Mechanismen der Immunabwehr. Über die zelluläre Immunabwehr werden zum Beispiel eingewanderte Fremdkörper und Parasiten abgewehrt. Dies geschieht durch Hämozyten, von denen einige in der Körperhöhle der Fliege in der Hämolymphe (Leibeshöhlenflüssigkeit) zirkulieren, andere wiederum sind sessil [22]. Man unterscheidet drei Arten von Hämozyten:

- (1) Die Plasmatozyten, die etwa 90-95 % der Hämozyten ausmachen. Sie phagozytieren abgestorbene Zellen und eingewanderte Pathogene.
- (2) Die Lamellozyten. Hierbei handelt es sich um flache, adhärente Zellen, die Fremdkörper einkapseln, welche für die Phagozytose zu groß sind. Innerhalb dieser Kapsel werden die Pathogene durch die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) abgetötet.
- (3) Die Kristallzellen machen etwa 5 % der Hämozyten aus. Sie sind nicht-phagozytierend und enthalten kristalline Einschlüsse von Enzymen, welche für die humorale Melanisierung benötigt werden.

Die systemische Immunantwort der Taufliege beruht auf der Bildung antimikrobieller Peptide und deren Freisetzung in die Hämolymphe. Sie werden hauptsächlich im Fettkörper der Fliege gebildet, einem immunkompetenten Organ, welches der menschlichen Leber ähnelt [23]. Es sind kleine (ca. 10 kDa) kationische Peptide, die ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien und Pilze aufweisen. Sie können über mehrere Tage in der Hämolymphe der Fliege persistieren und werden hauptsächlich über zwei Signalwege induziert, den Toll- und den IMD-Signalweg (Abbildung 1.1). In den folgenden Abschnitten 1.3.1 bis 1.3.4 werden beide Signalwege näher erläutert, wobei besonderes Augenmerk auf die Ähnlichkeiten zum humanen System gelegt werden soll. Für beide Signalwege der Taufliege gilt, dass sie nicht isoliert betrachtet werden können, da es unter anderem auf Transkriptionsebene zu Überschneidungen kommt. So besitzen beispielsweise einige Gene, die antimikrobielle Peptide kodieren, in ihren Promotoren Bindestellen sowohl für die Toll- als auch für die IMD-NF κ B-Derivate. Beide

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Signalwege können auf diese Weise zum Beispiel *metchnikowin* regulieren. Lau *et al.* (2003) konnten zeigen, dass der Toll-Signalweg an der Resistenz gegenüber einem Gram-negativen Bakterium, *Pseudomonas aeruginosa*, beteiligt ist [24].

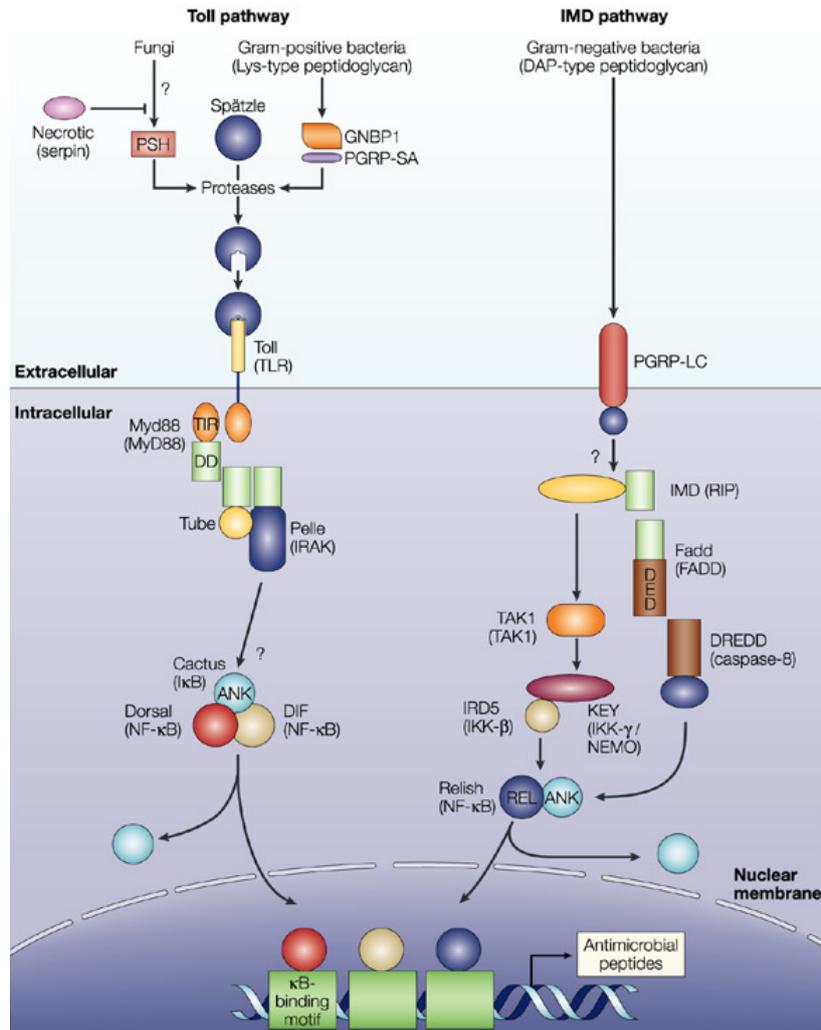


Abbildung 1.1: **Darstellung des Toll- und des IMD-Signalweges.** Der Toll-Signalweg dient hauptsächlich der Erkennung von Komponenten aus Gram-positiven Bakterien und Pilzen, während vornehmlich Komponenten aus Gram-negativen Bakterien als Liganden des Rezeptors PGRP-LC (IMD-Signalweg) dienen. Homologe zu humanen Molekülen sind in Klammern angegeben. Quelle: [25]

1.3.1 Der Toll-Signalweg

Der Toll-Signalweg ist ein evolutionär konservierter Signalweg, der eine Schlüsselrolle in der Embryogenese von *Drosophila* einnimmt [26]. Hier ist er an der Ausbildung der dorso-ventralen Achse beteiligt. Die Follikelzellen des Embryos aktivieren während der Embryogenese eine proteolytische Kaskade, welche letztlich die Spaltung der zymogenen Form von Spätzle in die aktive Form induziert [25].

Toll ist darüber hinaus für die Immunantwort essentiell. Hier dient es zur Erkennung von PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) aus Gram-positiven Bakterien und Pilzen. Solche PAMPs haben drei Merkmale, die sie zu idealen Zielen des angeborenen Immunsystems machen [11].

- PAMPs werden ausschließlich von Mikroorganismen produziert aber nicht von Wirtszellen, sodass anhand ihrer Struktur zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterschieden werden kann.
- PAMPs unterscheiden sich innerhalb verschiedener Klassen von Mikroorganismen nicht. Dies erlaubt einer geringen Anzahl von Mustererkennungsrezeptoren die Präsenz mikrobieller Pathogene zu detektieren.
- PAMPs sind beispielsweise als Komponenten von Zellwänden und Nukleinsäuren für das Überleben von Mikroorganismen (pathogenen wie nicht-pathogenen) essentiell.

In den meisten Gram-positiven Bakterien ist das wesentliche PAMP das Lysin-haltige Peptidoglykan, in den Pilzen 1,3- β -Glucan. Diese Komponenten werden durch sezernierte PGRPs (*peptidoglycan recognition proteins*) erkannt. Die PGRPs des Toll-Signalwegs stellen die kurze Form dieser Erkennungsproteine dar (PGRP-short). Es gibt sieben Proteine dieser kurzen Form, denen eine Transmembrandomäne fehlt [27]. PGRP-SA und -SD sowie GGBP1 (*Gram-negative binding protein 1*) dienen der Erkennung Gram-positiver Bakterien, während GGBP3 der Erkennung von Pilzen dient [28]. GGBPs wurden ursprünglich im Seidenspinner, *Bombyx mori*, entdeckt und haben dort eine hohe Affinität, an die Oberfläche von Gram-negativen Bakterien zu binden [29]. Der Kontakt

der GNBP mit dem zu erkennenden Molekül löst in *Drosophila* eine proteolytische Kaskade aus, die über die Protease Spirit zur Aktivierung des Spätzleprozessierenden Enzyms (SPE) führt. SPE spaltet daraufhin Spätzle in die aktivierte Form [30]. Diese ist 106 Aminosäuren (AS) groß und bindet als Dimer an den Toll-Rezeptor [31, 32], der daraufhin ebenfalls an der Plasmamembran dimerisiert. Auf zytoplasmatischer Seite wird ein Komplex aus drei Proteinen, dMyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), Tube und Pelle, an den Toll-Rezeptor rekrutiert. Das Adapterprotein MyD88 interagiert über eine Toll/Interleukin-1(IL-1)-Rezeptor-Homologie-(TIR)-Domäne, wie sie auch in dem humanen MyD88-Molekül zu finden ist, mit dem Rezeptor und wechselwirkt über die N-terminale Todesdomäne (*death-domain*) mit den Molekülen Tube und Pelle. Tube ist ein weiteres Adapterprotein (homolog dem humanen IRAK-4), während Pelle eine Serin/Threoninkinase darstellt (homologe dem humanen IRAK-1) [33, 34]. Diese Kinaseaktivität ist nötig, um das folgende Protein, Cactus, zu phosphorylieren und damit dem Abbau durch Proteasomen zugänglich zu machen [35]. In seiner dephosphorylierten Form dient Cactus dazu, ähnlich dem humanen I κ B, Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma zu halten. Dies sind Dorsal und DIF (*Dorsal related immunity factor*). Sie werden nach Abbau des Proteins freigesetzt und translozieren in den Kern, wo sie die Transkription der Gene für antimikrobielle Peptide, wie zum Beispiel *drosomycin*, anregen.

1.3.2 Toll-Signalwege im humanen System

Die Taufliege hat insgesamt neun Arten von Toll-Molekülen, aber nur eines davon ist an der Immunantwort beteiligt. Im Gegensatz dazu finden sich im humanen System zehn homologe TLRs (*Toll-like receptors*), die an der Immunantwort beteiligt sind. Sie unterscheiden sich in ihrem Ligandenspektrum und der Lokalisation (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: **humane TLRs und ihre Liganden**

Rezeptor	Lokalisation	Ligand
TRL1/2	Zelloberfläche	triacylierte Lipopeptide
TLR2/6	Zelloberfläche	diacylierte Lipopeptide
TLR3	Zelloberfläche/Endosom	dsRNA
TLR4	Zelloberfläche	LPS
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin
TLR7/8	Endosom	ssRNA
TLR9	Endosom	CpG-Motiv der DNA
TLR10	Zelloberfläche	unbekannt

Sowohl bei dem Toll-Molekül aus *Drosophila* als auch bei den TLRs handelt es sich um transmembrane Glykoproteine, deren extrazelluläre Domäne Leucinreiche Wiederholungen (LRRs = *Leucin-rich repeats*) aufweist, welche die Ligandenbindung vermittelt. Auf der zytoplasmatischen Seite liegt eine TIR-Domäne vor, welche an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt ist. Die TIR-Domäne ist ebenfalls in MyD88 und TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*) zu finden, die über diese Domäne mit dem Rezeptor interagieren können. Das intrazelluläre Signal wird über diese Adaptorproteine, der Kinase IRAK (*IL-R1 associated kinase*) sowie TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) an Transkriptionsfaktoren und MAP-Kinasen übermittelt.

Toll-like-Rezeptoren werden beispielsweise auf der Oberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Der Signalweg resultiert in der Expression von Zytokinen, Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen. Über diese Moleküle wird das adaptive Immunsystem in seiner Entwicklung beeinflusst.

Im humanen System wird über den Signalweg der Toll-like-Rezeptoren NF κ B aktiviert [36]. Auch in der Taufliege gibt es NF κ B-Homologe. Dies sind Dorsal und Dif im Toll-Signalweg. Sie ähneln dem humanen c-Rel-Molekül.

Einen wesentlichen Unterschied zwischen dem Toll-Signalweg in der Fliege und den Signalwegen, die im Menschen mit den TLRs assoziiert sind, stellt die Aktivierung dar. Während die Toll-like-Rezeptoren des Menschen die Liganden direkt binden, liegt in der Fliege der Toll-Rezeptor als Zytokin-Rezeptor vor, der das Zytokin Spätzle in seiner aktivierten Form als Folge der Erkennung von PAMPs bindet. Ein weiterer Unterschied besteht in den freigesetzten Effektormolekülen

der Signalwege. Während es bei *Drosophila* antimikrobielle Peptide sind, die gebildet werden, sind es im humanen System neben Zytokinen und Chemokinen auch kostimulatorische Moleküle, die exprimiert werden.

1.3.3 Der IMD-Signalweg

Namensgebend für diesen Signalweg ist eine Mutation des *imd* (*immune deficiency*)-Gens, die im Jahr 1995 von Lemaitre *et al.* [37] erstmals beschrieben und 1996 von Corbo *et al.* [38] näher charakterisiert wurde. Liegt eine Mutation des *imd*-Gens vor, wird die Expression verschiedener antimikrobieller Peptide (Cecropin, Diptericin, Drosocin) reduziert. Die Expression von Drosomycin jedoch bleibt unabhängig von der Mutation stabil. Die Rezeptoren des IMD-Signalweges (lange PGRP-Formen) binden Komponenten aus Gram-negativen Bakterien und *Bazillus*-Arten. Hierbei ist das Diaminopimelinsäure (DAP)-haltige Peptidoglykan das aktivierende Motiv. Die Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt anders als beim Toll-Signalweg direkt. Es liegen drei Isoformen des membranständigen Rezeptors PGRP-LC vor. Sie werden mit PGRP-LCx, -LC α und -LC γ bezeichnet. Monomeres DAP-haltiges Peptidoglykan bindet an ein Homodimer aus PGRP-LCx, während polymeres DAP-haltiges Peptidoglykan an ein Heterodimer aus PGRP-LCx und -LC α bindet. Die dritte dieser Isoformen des PGRP-LC-Rezeptors (PGRP-LC γ) ist nicht an der Erkennung bakterieller Komponenten beteiligt. *Drosophila* weist insgesamt 13 dieser langen PGRP-Moleküle [39] auf. Diese sind bis auf wenige Ausnahmen Transmembranproteine. Die Ausnahmen, wie zum Beispiel PGRP-LE, besitzen weder eine Transmembrandomäne noch ein Signalpeptid. Sie kommen intrazellulär vor oder werden sezerniert.

Über die jeweilige Rezeptorform wird das Signal an das intrazellulär rekrutierte Adaptermolekül IMD weitergeleitet [40, 41]. IMD interagiert mit dFADD (*Fas-associated death domain*), welches an die Caspase DREDD (*death related CED-3/Nedd2-like protein*) bindet [42]. Diese Caspase spaltet nach dessen Phosphorylierung das Protein Relish [43]. Phosphoryliert wird Relish durch den IKK-Komplex [44], der selbst über dTAK1 (ein Homologe der MAP3-Kinase im humanen System) und TAB2 IMD-abhängig aktiviert wird. Dieser Komplex besteht aus zwei Untereinheiten: ird5 (IKK β), eine katalytische Untereinheit, und ken-

ny (IKK γ), eine regulatorische Untereinheit. Der C-terminale Teil von Relish verbleibt im Zytoplasma, während der N-terminale Teil in den Kern transloziert und die Transkription von Genen für antimikrobielle Peptide, wie *dipthericin*, startet.

1.3.4 Der humane TNFR-Signalweg

Dieser Signalweg ähnelt stark dem IMD-Signalweg in *Drosophila*. Der Ligand des TNF-Rezeptors ist in diesem Falle jedoch das Zytokin TNF (*tumor necrosis factor*). TNF vermittelt im humanen System Entzündungsreaktionen, reguliert Immunantworten und löst in Tumorzellen Apoptose aus. Dieses Molekül ist daher an der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie zum Beispiel Sepsis, Diabetes und Krebs beteiligt.

TNF selbst ist ein Homotrimer aus Untereinheiten von je 157 Aminosäuren und wird von aktivierten Makrophagen produziert. Es gibt zwei Moleküle, die TNF als Rezeptoren dienen, TNFR1 und TNFR2. An der Mehrheit der durch TNF angeregten Signalwege ist jedoch TNFR1 beteiligt. Als Resultat der aktivierten Signalwege werden die Transkriptionsfaktoren NF κ B und c-Jun aktiviert. Über diese Transkriptionsfaktoren werden eine Reihe wichtiger biologischer Prozesse gesteuert (Zellwachstum, Stress- und Immunantworten). Die Bindung von TNF an seinen Rezeptor löst intrazellulär die Freisetzung des inhibitorischen Proteins SODD (*silencer of death domains*) aus, woraufhin es zu einer Aggregation der intrazellulären Domäne des TNF-Rezeptors kommt. Diese Aggregation wird von einem Adapterprotein, TRADD (*TNF receptor associated death-domain*), erkannt. Im Zuge dessen werden weitere Adapterproteine, RIP (*receptor-interacting protein*), TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*) und FADD (*Fas-associated death domain*) zum Rezeptor rekrutiert. Diese Adapterproteine sorgen wiederum dafür, dass auch Schlüsselenzyme, die wichtig für die Initiation des Signalwegs sind, zum Rezeptor gelangen. Beispielsweise wird Caspase-8 über FADD zum Rezeptor rekrutiert und dort aktiviert. Diese Aktivierung löst eine proteolytische Kaskade aus, die in den Zellen den programmierten Zelltod auslöst. Über TRAF2 werden antiapoptotische Proteine (c-IAP-1 und -2) an den Rezeptor geleitet und eine MAP-Kinase-Kaskade ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung der c-Jun-NH₂-terminalen Kinase steht. Diese Kinase phosphoryliert und aktiviert c-Jun. Eine

Gemeinsamkeit dieser TNF-Signalwege ist die Aktivierung eines Multiprotein-Komplexes an der Membran. Das Adaptorprotein RIP ist für die Aktivierung des IKK-Komplexes nötig. Über diese Aktivierung erfolgt die Phosphorylierung und Degradation des I κ B-Moleküls, welches in unstimulierten Zellen den Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytoplasma hält [45].

In Abwesenheit eines Liganden kommt es zu homophilen Interaktionen zwischen einzelnen Rezeptormolekülen, die eine Aktivierung des Signalweges in Abwesenheit eines Liganden verhindern. Ist jedoch ein Ligand zugegen, kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des Rezeptorkomplexes [46], die eine Bindung an den Rezeptor erlaubt und somit die Weiterleitung des Signals vermittelt. Wie beim Toll-Signalweg besteht auch hier ein Unterschied in der Aktivierung. In *Drosophila* ist nichts über eine Komplexbildung der Rezeptormoleküle des IMD-Signalweges in Abwesenheit eines Liganden bekannt. Die wesentlichen Gemeinsamkeiten des humanen TNFR- und des IMD-Signalweges der Taufliege liegen in der Aktivierung von NF κ B-Molekülen. Auch in *Drosophila* existiert ein Homolog des IKK-Komplexes, der aktiviert werden muss, um die Translokation von Relish (ähnlich dem humanen p100 und p105) in den Kern zu gewährleisten. Ein I κ B-Molekül fehlt hier jedoch. Diese Aufgabe hat der C-terminale Teil von Relish inne.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Allergien sind weltweit eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung von *Asthma bronchiale*. Die Taufliege *Drosophila melanogaster* eignet sich als Tiermodell für die Untersuchung dieser Krankheit, da zum einen die Struktur der Atemwege der Fliege Ähnlichkeiten zum strukturellen Aufbau der Lunge hat [47, 48] und zum anderen ist es hier möglich, eine Reihe verschiedener Suszeptibilitätsgene zu untersuchen, die mit dem *Asthma bronchiale* assoziiert sind. Diese Gene sind hauptsächlich mit dem angeborenen Immunsystem verknüpft [49]. *Drosophila* besitzt ausschließlich das angeborene Immunsystem und weist Orthologe zu einigen dieser Suszeptibilitätsgene auf [50]. Da es in der Taufliege möglich ist, über die Überexpression eines Rezeptors des IMD-Signalweges

einen Asthma-ähnlichen Phänotyp zu induzieren [51], stellte sich die Frage, ob sich diese Signalwege, die in *Drosophila* zu einer Immunantwort und letztlich auch zum *airway remodeling* (einer Veränderung in Zusammensetzung, Organisation und Anzahl der Zellen und der extrazellulären Komponenten der Atemwegswände [52]) führen, auch durch Allergene stimulieren lassen. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich bekannt, dass Enzyme aus Hausstaubmilbenextrakt in Bezug auf das angeborene Immunsystem Komponenten des Komplementsystems proteolytisch spalten können [53]. Auch in *Drosophila* ist es möglich, über die Spaltung spezifischer Moleküle eine Immunantwort zu erhalten. Es war jedoch nicht bekannt, ob Allergene einen Einfluss auf das Immunsystem der Taufliege haben, da die Signalwege, durch die in *Drosophila* eine Immunreaktion ausgelöst wird, PAMPs erkennen, die Allergenen fehlen.

Es konnte gezeigt werden, dass einige Bakterien, die in Kuhställen vorkommen, einen immunmodulatorischen Effekt haben. Dieser führt dazu, dass sich die Balance, die im humanen adaptiven Immunsystem zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen herrscht, zugunsten der T_H1 -Zellen verschiebt [7]. Diese Verschiebung hat einen sogenannten „Allergieprotektiven“ Effekt, da eine Dominanz der T_H2 -Zellen mit der Entstehung allergischer Reaktionen in Verbindung gebracht wird. Zu Beginn dieser Arbeit war unbekannt, ob man diesen Effekt auch im Zusammenhang mit dem angeborenen Immunsystem sehen kann. Hier eignet sich die Taufliege ebenfalls als Modellorganismus.

Im Rahmen dieser Arbeit stellten sich hinsichtlich der oben aufgeführten Thematik folgende Fragen:

1. Ist das angeborene Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* fähig, auf Allergene zu reagieren?
2. Sollte dies der Fall sein, welche Signalwege werden aktiviert?
3. Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten ergeben sich bezüglich des Transkriptoms nach Aktivierung des Immunsystems mit einem Allergen zwischen immunkompetenten Zellen und dem Fettkörper?
4. Welchen Effekt haben isolierte immunmodulatorische Bakterien auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster*?

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Zur Beantwortung dieser Fragen dienten verschiedene Methoden, in denen zum einen die Aktivierung von Promotoren für Gene, die für antimikrobielle Peptide kodieren, untersucht wurde, und zum anderen die mRNA dieser Gene quantifiziert wurde. Zusätzlich kamen auch DNA-Mikroarrays zum Einsatz, in denen das Transkriptom mittels der Hybridisierung von cRNA an Oligonukleotide gemessen wurde.

Kapitel 2

Material und Methoden

In diesem Teil der Doktorarbeit werden alle verwendeten Materialien sowie die angewendeten Methoden eingehend beschrieben.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Zunächst werden alle verwendeten Chemikalien mitsamt ihren Bezugsquellen angeführt.

- 5-(3-aminoallyl)UTP (aaUTP): Applied Biosciences (Darmstadt, Deutschland)
- Acetyl Coenzym A: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Agarose: Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
- Alexa Fluor-555, Alexa Fluor-647: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- Ampicillin: Biomol (Hamburg, Deutschland)
- *Aqua ad injectabilia*: Braun (Melsungen, Deutschland)
- Adenosintriphosphat: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Bacto-Trypton: Otto Nordwald (Hamburg, Deutschland)

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

- Bacto-Agar: Otto Nordwald (Hamburg, Deutschland)
- Borsäure (H_3BO_3): Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- *Bovine serum albumine* (BSA): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Cellfectin: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- Coelenterazine: Promega (Mannheim, Deutschland)
- Dithiothreitol (DTT): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP): Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Ecdyson: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): Serva (Heidelberg, Deutschland)
- Ethanol: Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethidiumbromid: GIBCO-BRL (Eggenstein, Deutschland)
- fötales Kälberserum (FCS), inaktiviert bei 56 °C, sterilfiltriert: Biochrom (Berlin, Deutschland)
- Glycerol: Serva (Heidelberg, Deutschland)
- Hefe-tRNA: Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
- Heringssperma-DNA: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4): Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumchlorid (KCl): Biochemika Fluka (Buchs, Schweiz)
- Luciferin: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Magnesium-Carbonat-Hydroxid ($\text{Mg}_2\text{CO}_3 \times 3 \text{H}_2\text{O}$): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

- Mangan-Chlorid (MnCl_2): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Morpholinopropan-Sulfonsäure (MOPS): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumazid (NaN_3): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumazetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$): Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid (NaCl): Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumzitat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$): Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4): Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydroxid (NaOH): Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Nipagin (Methyl-4-hydroxybenzoat): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S) 5000U: GIBCO-BRL (Eggenstein, Deutschland)
- Polyfect: Quiagen (Hilden, Deutschland)
- Propionsäure ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- para-Formaldehyd (PFA): Biochemika Fluka (Buchs, Schweiz)
- Schwere Lösung: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
- Tris: Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)
- N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycine (Trizin): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Trypanblau: Fluka (Buchs, Schweiz)
- Triton-X-100: Serva (Heidelberg, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Für die durchgeführten Experimente wurden die folgenden Großgeräte verwendet:

- Binokular: Zeiss-Jena (Jena, Deutschland)
- Brutschrank: Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
- ChemiDoc 2000: BioRad Laboratories (München, Deutschland)
- Elisa-Tecan-Sunrise: Tecan (Crailsheim, Deutschland)
- Eppendorf BioPhotometer: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Centrifuge 5415C: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Thermomixer compact: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Thermomixer 5436: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Centrifuge 5415C: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- FACS Calibur: Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
- Gelkammer: PeqLab GmbH (Erlangen, Deutschland)
- GenePix™ 4000B Scanner: Molecular Devices GmbH (Ismaning/München, Deutschland)
- LightCycler® 480 Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)
- Mastercycler gradient: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Nano-Drop® (ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer): Peqlab GmbH (Erlangen, Deutschland)
- Dumont-Pinzetten: Bioform (Nürnberg, Deutschland)
- Plattenschüttler: Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)
- Rotanta 46RC: Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
- Rotixa 50 RS: Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
- SciHypChamber: Scienion (Berlin, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

In dieser Liste werden alle sonstigen Verbrauchsmaterialien dargestellt.

- Ceaprenstopfen (Ø 22, 27, 36 mm): Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
- 6-Well-Zellkulturplatten Nunc™: Thermo Fischer Scientific (Langenselbold, Deutschland)
- 96-Well-Zellkulturplatten, F-Form Nunc™: Thermo Fischer Scientific (Langenselbold, Deutschland)
- 96-Well-Lightcycler Platten: Biozym (Oldendorf, Deutschland)
- *Drosophila*-Kulturröhrchen (16, 28, 68 ml): Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
- *Drosophila* OLIGO_14k version 1: Canadian *Drosophila* Microarray Center (Toronto, Kanada)
- Einweg-Küvetten: Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland)
- FACS-Röhrchen: BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm²: Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- LifterSlip (22x60): Implen GmbH (München, Deutschland)
- Neubauer-Zählkammer: Braun (Ludwigshafen, Deutschland)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen werden in diesem Unterabschnitt benannt.

- Allgemeine Puffer
 - 20 x SSC: 175,3 g NaCl; 88,2 g Natriumzitat; lösen in 1 l *Aqua dest.*; pH 7,0
 - 1 x PBS: 2,7 mM KCl; 140 mM NaCl; 1,5 mM KH₂PO₄²⁻; 7,4 mM Na₂HPO₄²⁻; lösen in 1 l *Aqua dest.*

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

- 1 x TBE: 89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 1 mM EDTA (pH 8,0) lösen in 1 l *Aqua dest.*
- Lysis-Puffer (5x): Promega (Mannheim, Deutschland)
- PCR-Puffer:
 - 10 x Puffer: Promega (Mannheim, Deutschland)
 - 10 x Advantage Puffer: BD Biosciences Clontech (Heidelberg, Deutschland)
- Waschlösungen für Arrays:
 - L1: 1 x SSC
 - L2: 1 x SSC + 0,1 % Triton-X-100
 - L3: 0,1 x SSC + 0,1 % Triton-X-100
 - L4: 0,1 x SSC
 - 10 % Triton-X-100: 1 ml Triton-X-100; *Aqua bidest ad 9 ml*
- Hybridisierungspuffer:

DIG Easy Hyb: Roche (Mannheim, Deutschland)
- weitere Lösungen:
 - 10 % Nipagin: 10g Nipagin; 50 % Ethanol *ad 100 ml*
 - Natriumazetat [3M]: 40,8 g Natriumazetat; *Aqua dest. ad 100 ml* (pH 5,5)
 - Sure Clean: Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
- Firefly-Substrat:

20 mM Trizin; 2,67 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 mM EDTA (pH 8,0); 33,3 mM DTT; 0,53 mM ATP; 270 μM Acetyl-CoA; 30 mg Luciferin; *ad 222,6 ml Aqua dest.*; anschließend zugeben: 5 mM NaOH; 50 mM $\text{Mg}_2\text{CO}_3 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

2.1.5 Kits

Hier angeführt sind die für die RNA- und Plasmidisolierung sowie für die cRNA-Synthese verwendeten Kits:

- NukleoSpin RNA II: Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
- InnuPrep Plasmid-Kit Mini: Analytik Jena AG (Jena, Deutschland)
- Plasmid-Kit MaxiPrep: Invitrogen (Leek, Niederlande)
- MEGAscript® High Yield T7 Transcription Kit: Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)

2.1.6 Stimuli

Die verwendeten Substanzen zur Stimulation der humanen HEK293-Zellen, der Insektenzellen (S2- und I(2)mbn-Zellen) und der Fettkörper sind nachfolgend im Detail benannt. Die Bezugsquellen der Substanzen sind jeweils rechts daneben angegeben.

Stimulus	Bezugsquelle
<i>A. lwoffii</i> F78	Prof. Holst (FZ Borstel)
<i>B. subtilis</i> DSM 618	Prof. Holst (FZ Borstel)
<i>E. coli</i> F1111	Prof. Holst (FZ Borstel)
<i>L. lactis</i> G121	Prof. Holst (FZ Borstel)
E64 (Cysteinproteaseinhibitor)	Prof. Petersen (FZ Borstel)
ieDAP (syn. Peptidoglykanstruktur)	Prof. Fukase (Osaka, Japan)
MDP (syn. Peptidoglykanstruktur)	Prof. Kusomoto (Osaka, Japan)
PGN (Peptidoglykan aus <i>E.coli</i>)	Prof. Zähringer (FZ Borstel)
rDer p 1	Dr. Suck (Allergopharma, Reinbek)
TNF- α	Prof. Männel (Regensburg)

2.1.7 Medien

Die für die Zellkultur verschiedener Zelllinien (humane HEK-Zellen sowie Insektenzellen) verwendeten Medien sowie die Bakterienmedien und das *Drosophila*-

medium sind im Folgenden genauer beschrieben.

Bakterienmedien

- Super Broth Medium (*A. lwoffii* F78): 10 g MOPS; 20 g Hefeextrakt; 30 g Trypton, in 1 l H₂O ; Autoklavieren, anschließend zugeben: 10 ml Glucose [2 M], pH 7,0
- Trypticase Soya Broth Medium (*L. lactis* G121): TSB-Medium (Difco, Augsburg, Deutschland) mit 0,3 % Hefeextrakt, pH 6,8-7,2
- LB-Medium (*B. subtilis* DSM 618 und *E. coli* F 1111): 10 g Trypton; 5 g Hefe; 10 g NaCl; lösen in 1 l *Aqua dest.*, pH 7,0
- LB-Agar-Platten: siehe LB-Medium, zusätzlich 15 g Agar/l:
- Pen/Strep-Lösung: 1000 U/ml Penicillin; 1000 µg/ml Streptomycin in PBS

Die Kultivierung und Aufarbeitung der Bakterienpräparationen wurde von der LG Strukturbiochemie, Prof. Dr. Otto Holst, FZ Borstel, übernommen. Die Bakterien wurden in den entsprechenden Medien bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert (*A. lwoffii* F78 und *L. lactis* G121 bei 30 °C, *B. subtilis* DSM 618 und *E. coli* F1111 9-41 bei 37 °C) und dann für die Inaktivierung der Bakterien weiter aufbereitet. Um eine längere Lagerungszeit der abgetöteten Präparationen zu gewährleisten, wurden die Bakterien zunächst pelletiert und in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die Abtötung der Bakterien durch folgende Methoden:

- Hitze-Inaktivierung: Hier erfolgte das Abtöten der Bakterien durch Autoklavieren der Präparationen (20 min bei 121 °C).
- Antibiotika-Behandlung: Für die Abtötung der Bakterien mit Antibiotika wurden die Bakterienpräparationen für 30 Min. bei 37 °C mit der Pen/Strep-Lösung inkubiert.

Der Erfolg der Inaktivierung wurde durch Ausstreichen der Präparationen auf den jeweiligen Agarplatten überprüft. Ebenso erfolgte die Bestimmung der colony-forming units (cfu) durch Ausstreichen der Bakterien auf den Agarplatten und Auszählen der gewachsenen Kolonien am folgenden Tag.

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

- SOC Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,05 % (w/v) NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glucose

Zellkulturmedien

- *Drosophila*'s Schneider Medium (Genaxxon, Ulm, Deutschland): Dieses Medium diente zur Kultivierung der Insektenzellen.
- DMEM komplett: DMEM, high Glucose, with L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS: Die humanen HEK-Zellen wurden in diesem Medium gehalten.

Standardmedium für *Drosophila*

- 500 ml H₂O; 31,25 g Bierhefe; 31,25 g Maismehl; 5 g Agar-Agar (Roth; Karlsruhe, Deutschland); 10 g Glucose (Roth; Karlsruhe, Deutschland); 15 g Melasse, 15 g Zuckerrübensirup
- 5 ml Propionsäure (10 %); 15 ml Nipagin (10 %) in 70 %-igem Ethanol
- Bezugsquelle von Hefe, Maismehl und Zuckersirup: Reformhaus

2.1.8 DNA-Polymerasen

Für die konventionelle PCR wurde der Taq-Master-Mix der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieser Ansatz beinhaltet sowohl die Taq DNA-Polymerase als auch die für die PCR notwendigen dNTPs und Salze.

In Abschnitt 2.2.14 sind die für den Array verwendeten Polymerasen aufgeführt.

2.1.9 Plasmide

Folgende Plasmide wurden für HEK-Zellversuche und den Luciferase-Assay mit den Insektenzellen verwendet:

Tabelle 2.1: **Übersicht der verwendeten Plasmide**

Plasmid	Bezeichnung	Bezugsquelle
HEK-Zellen		
CD14		Prof. Golenbock (Worcester, USA)
MD2		Miyake, K. (Tokyo, Japan)
NOD1		Dr. Rosenstiel (Kiel)
NOD2		Dr. Rosenstiel (Kiel)
TLR2		Dr. Nelson (Seattle, USA)
TLR4		Dr. Nelson (Seattle, USA)
Luciferase-Assay		
pJM 647	<i>dipteracin</i> -Luciferase	Imler, J.-L., Frankreich
pJM 648	<i>drosomycin</i> -Luciferase	Imler, J.-L., Frankreich
	<i>Actin-5c-upd</i> -GFP	Imler, J.-L., Frankreich
pRL-TK	<i>thymidinkinase</i> -Renilla	Promega, USA

2.1.10 Bakterien

- *E. coli* TOP10 one shot: Invitrogen (Leek, Niederlande)

2.1.11 Marker und Ladepuffer

- DNA-Marker GeneRuler 100 bp DNA ladder plus: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
- DNA-Marker GenRuler 1 kb DNA ladder: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
- Ladepuffer: 6 x Loading Dye Solution: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.1.12 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich zwei immunkompetente Insektenzelllinien (Schneider Zelllinie 2 und L(2)mbn) verwendet, in einigen Versuchen kamen aber auch humane HEK-Zellen zum Einsatz. In diesem Abschnitt werden alle drei näher beschrieben:

Schneider Zelllinie 2 (S2)

Diese Zellen wurden ursprünglich aus 20-24 h alten *Drosophila* (Oregon R)-Embryonen isoliert. Sie sind im Durchmesser etwa 5-11 μm groß und 11-35 μm lang. Vom Erscheinungsbild her sind sie Epithel-ähnlich. Sie wachsen einschichtig [54]. Die Zellen wurden bezogen von dem *Drosophila* Genetic Resource Center (Bloomington, USA).

L(2)mbn

L(2)mbn steht für: *lethal (2) malignant blood neoplasm*. Diese zweite Zelllinie aus *Drosophila* entstammt demnach einer Fliegenlinie, die einen Blutumor trägt [55]. Es handelt sich um kleine, sich aktiv teilende, Plasmacyten-ähnliche Zellen, die in der Immunantwort den S2-Zellen ähneln. Sie wurden ebenfalls von dem *Drosophila* Genetic Resource Center (Bloomington, USA) bezogen.

Beide Insektenzelllinien wurden bei 25 °C ohne CO₂-Begasung in *Drosophila*'s Schneider Medium kultiviert. Lag eine Konfluenz von 80-90 % vor, wurden die Zellen geerntet, in einer Dichte von nicht weniger als $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in neue Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert.

HEK293-Zellen

Diese Zelllinie entstammt ursprünglich einer humanen, embryonalen Niere (*human embryonic kidney cells*). Sie wurden in DMEM komplett in Zellkulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen geerntet, in neue Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Mit dieser Zelllinie wurden verwendete Substanzen auf eventuelle Kontaminationen getestet (Abschnitt 3.2.1).

2.1.13 *Drosophila*-Stämme

Einige Experimente dieser Arbeit wurden mit den isolierten Fettkörpern aus Fliegenlarven des dritten Larvenstadiums durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Fliegenstämme eingesetzt, die in Tabelle 2.2 aufgelistet sind:

Tabelle 2.2: **verwendete Fliegenstämme und ihre Quellen**

Bezeichnung	Genotyp	Quelle/Spender
A1: Canton-S	w	Bloomington
A29: relish-ko	w[118]: Rel[38]:e[s]	Bloomington
I 63	yw; P{TG1} PGRP-LC	VDRC ¹
B52	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}FB/SNS	Kühnlein, R.; MPI Göttingen

¹Vienna *Drosophila* RNAi Center

Bei den A1-Fliegen handelt es sich um Wildtyp (wt)-Fliegen, während die A29-Fliegen eine Mutation in dem Gen tragen, welches für den Transkriptionsfaktor *relish* kodiert. B52 ist eine Treiberlinie, die den Treiber nur im Fettkörper exprimiert. In der I63-Fliegenlinie ist das Gen für den Rezeptor *pgrp-lc* über den Mechanismus der Interferenz-RNA (RNAi) ausgeschaltet. Mit den beiden letztgenannten Fliegenlinien werden Kreuzungen durchgeführt, um letztlich eine F1-Generation zu erhalten, in der der Rezeptor PGRP-LC im Fettkörper nicht exprimiert wird.

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die durchgeführten Methoden beschrieben, wobei zunächst auf die zellbiologischen und anschließend auf die molekularbiologischen Methoden verwiesen wird. Abschließend wird auf die Aufzucht und Kreuzung der Fliegen sowie auf statistische Methoden eingegangen.

Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung

In Versuchen, in denen Zellen zum Einsatz kamen, wurden standardisierte Bedingungen gewährleistet, indem die Lebendzellzahl bestimmt wurde.

Dies geschah mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die geernteten und in 5 ml Medium resuspendierten Zellen mit einer Trypanblau-Lösung

1:10 versetzt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nicht-membrangängig ist und daher lebende Zellen nicht anfärbt. Tote Zellen hingegen erscheinen nach Färbung blau. Die lebenden Zellen wurden gezählt, und die Lebendzellzahl berechnet. Die Berechnung erfolgte in den angegebenen Schritten:

- Summe der Zellen aller Quadrate der Neubauer-Kammer / 4 = Mittelwert der Zellzahl / Quadrat
- Mittelwert der Zellzahl / Quadrat x 10^4 (Kammerfaktor der Zählkammer) = Zellen / ml
- Zellen / ml x Volumen der Zellsuspension = Lebendzellzahl

2.2.2 Transfektion verschiedener Zellen

Insektenzellen

Die Transfektion von Fremd-DNA in S2- und I(2)mbn-Zellen erfolgte unter der Zuhilfenahme des Transfektionsreagens Cellfectin.

Bei Verwendung des Transfektionsreagens Cellfectin wurden zuvor $2,0 \times 10^6$ S2-/I(2)mbn-Zellen/2000 μ l Schneider Medium (+ 10 % FCS + 2 % P/S) pro Well in einer 6-Well-Platte über Nacht bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte in eine Plattenzentrifuge gestellt und einige Sekunden anzentrifugiert (900 rpm bei RT). Das Medium wurde mit einer Pipette abgesaugt. In jedes Well wurden 1400 μ l Schneider Medium (ohne FCS und P/S) auf die Zellen gegeben. Pro Transfektionsansatz wurden 275 μ l Schneider Medium und 25 μ l Cellfectin gemischt.

In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde die einzusetzenden DNA mit dem Schneider Medium vermischt. Die Plasmide für den Luciferase-Assay wurden in der Konzentration von 5 μ g eingesetzt, mit Ausnahme des Plasmids der konstitutiven Renilla-Luciferase (pRL-TK) in einer Konzentration von 1 μ g.

Anschließend wurden die DNA- sowie die Cellfectin-Lösung zusammengegeben und das Gemisch wurde bei RT 15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde es tropfenweise zu den Zellen gegeben.

HEK293-Zellen

Die Transfektion von Fremd-DNA in die HEK293-Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagenz Polyfect. Zunächst wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in 150 μ l DMEM komplett in 96-Well Platten ausgesät und am Folgetag mit Polyfect nach Angaben des Herstellers mit den angegebenen Plasmiden in den folgenden Konzentrationen transfiziert:

- TLR2, TLR4, NOD1, NOD2: 200 ng/ml
- CD14, MD2: 25 ng/ml

2.2.3 Stimulation der Zelllinien

Insektenzellen

Die Zellen wurden wie in 2.2.1 beschrieben ausgezählt und anschließend transient transfiziert (Abschnitt 2.2.2). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, in ein FACS-Röhrchen überführt und bei RT und 1290 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nun konnte das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 2000 μ l neues Medium mit 10 % fötales Kälberserum (FCS) und 2 % PS ersetzt werden.

Die transfizierten Zellen wurden aus den 6-Well-Platten in 48-Well-Platten überführt. Hierzu wurden in die Wells dieser Platten 100 μ l Medium pro well vorgelegt und mit je 100 μ l transfizierter Zellen versetzt. Die Zellen wurden nun für einige Stunden bei 25 °C inkubiert. Nach etwa 4 bis 5 h (24 h vor der eigentlichen Stimulation) erfolgte die Präinkubation der Zellen mit 50 nM des Häutungshormons Ecdyson. Dies verstärkt die Immunantwort der Zellen, sodass eine Immunantwort im nachfolgenden Luciferase-Assay besser detektiert werden kann.

HEK293-Zellen

24 h nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen gewaschen und mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und mit Hilfe des CXCL-8-ELISA die Aktivierung der Zellen analysiert.

2.2.4 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

Die Bestimmung der Konzentration des humanen Zytokins CXCL8 (CXCL-8) erfolgte anhand eines ELISAs.

Dieser Assay wurde nach Herstellerangaben (Invitrogen; Leek, Niederlande) durchgeführt und die Absorption der entwickelten Platten wurde bei 550 nm im Tecan Sunrise Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software von Magellan.

2.2.5 Luciferase-Assay

Dieser Assay wurde durchgeführt, um die Aktivierung der Promotoren nach Stimulation mit angegebenen Substanzen zu überprüfen.

Hierzu wurden die zuvor stimulierten Zellen (Abschnitt 2.2.3) in je 200 µl 1 x PLB (Lysis Puffer, Promega) lysiert, und das Lysat wurde in zwei weiße 96-Well Luminometer-Platten je 20 µl / Well transferiert. In der einen Platte wurde das Lysat mit 20 µl Coelenterazine (1:500, in 1xPBS) und in der anderen mit 20 µl des Firefly-Substrates versetzt.

Die erste Messung ermittelte die Aktivität der konstitutiven Renilla-Luciferase, die zweite die der induzierbaren Firefly-Luciferase. Die Ergebnisse der konstitutiven Renilla-Luciferase dienen zum Normalisieren der Ergebnisse für die Firefly-Luciferase, indem jeweils die Quotienten der Werte gebildet wurden.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Die zu markierenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, bei 4 °C und 1.500 rpm (Hettich Zentrifuge Rotana 45RC) für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Erfolgte die Messung der Proben nicht unmittelbar, wurden die Proben zusätzlich zum Azid-PBS (150 µl) mit 3 %-igem PFA versetzt (150 µl), um die Zellen zu fixieren. Innerhalb von sieben Tagen wurden die Proben am FACS-Calibur analysiert und die Daten mit Hilfe der Software WinMDI ausgewertet.

2.2.7 MTT-Test

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden S2-Zellen in einer 6-Well Zellkulturplatte mit 2×10^6 Zellen pro Well in 2000 μl Schneider Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen in Duplikaten mit den entsprechenden, in serumfreiem Medium gelösten Substanzen stimuliert. Nach einer Inkubation für 16 h bei 25 °C wurde das Medium verworfen und 250 μl MTT-Lösung (2 mg/ml) pro Well hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 25 °C wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen mit jeweils 1000 μl Lysis-Reagenz unter Schütteln inkubiert. Hierbei wird MTT während einer chemischen Reaktion in blaues Formazan umgewandelt. Dies ist ein Indikator für die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase in lebenden Zellen. Die Messung erfolgte bei 570 nm im Tecan Sunrise Reader.

Molekularbiologische Methoden

2.2.8 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte über das Trizol-Reagenz nach Herstellerangaben.

2.2.9 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden 2 μg der RNA mit 1 μl eines Oligo dT12-18-Mixes (Oligo dT12-18 von Invitrogen, Leek, Niederlande) und 1 μl eines dNTP-Mixes (je [10 mM]) versetzt und 5 Min. bei 65 °C inkubiert. Nach anschließender 5 minütiger Abkühlung auf Eis wurden 7 μl eines Mastermixes bestehend aus 4 μl 5 x SuperScript III-Puffer (Invitrogen Leek, Niederlande), 1 μl RNase Out Ribonuklease Inhibitor (Invitrogen, Leek, Niederlande), 1 μl Reverse Transkriptase SuperScript III (Invitrogen, Leek, Niederlande) und 1 μl DTT (Invitrogen, Leek, Niederlande) addiert. Der gesamte Ansatz wurde für 60 Min. bei 50° C inkubiert, danach wurde die Temperatur für 15 Min. auf 70° C erhöht. Die fertig synthetisierte cDNA konnte bei -20° C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

2.2.10 *Real-time PCR*

Mit Hilfe der quantitativen *Real-time PCR* ist eine relative Quantifizierung der cDNA möglich. Die Quantifizierung beruht auf der Messung von Fluoreszenzfarbstoffen, die während der Amplifikation in die DNA integriert werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu. In den durchgeführten Versuchen wurde hierfür das Mesa-Green-System der Firma Eurogentec (Köln, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mesa-Green ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, welcher bei erfolgreicher Interkalation bei 530 nm emittiert. Um eine Aussage über die relative Expression der Gene treffen zu können, wurde bei jeder *real-time PCR* ein unabhängiger Kalibrator mitgeführt. Die Expression des zu untersuchenden Genes wurde in jeder Probe und dem aus einem Probengemisch bestehenden Kalibrator gegen ein nicht reguliertes (*housekeeping*-) Gen abgeglichen. Dabei handelte es sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit um Actin42A. Weiterhin wurde die Effizienz der Primer berücksichtigt, indem für jeden Primer eine Standardkurve erstellt wurde. Die Überprüfung des Genproduktes erfolgte anhand seiner Schmelzkurve, die am Ende des PCR-Laufes bei kontinuierlicher Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 95 °C aufgezeichnet wird. Dabei macht man sich zunutze, dass jedes Genprodukt durch seine unterschiedliche Länge und Zusammensetzung der Basen bei einer bestimmten Temperatur in seine Einzelstränge zerfällt.

Tabelle 2.3 gibt die verwendeten Sequenzen der Primer an:

Tabelle 2.3: **Übersicht über verwendete Expressionsprimer**

CG-Nummer	Bezeichnung	Sequenz
CG 12763	Diptericin	CGCAATCGCTTCTACTTTGG TCCCTGAAGATTGAGTGGGTA
CG 1080	Drosomycin	GTA CTT GTT CGC CCT CTT CG AGC ATC CTT CGC ACC AGC AC
CG 12051	Actin42A	TCG AAG CAA GAG TAC GAC GA CAA TGG GTG TGT TCG ATG AG

2.2.11 Transformation

Bei der Transformation von Bakterien wird Fremd-DNA (Plasmide/Vektoren) in ein Bakterium eingebracht. Das Ziel ist, die Fremd-DNA mithilfe der Bakterien zu vervielfachen, um sie anschließend analysieren zu können.

Die Transformation chemisch kompetenter One Shot TOP10 *E. coli*-Zellen erfolgte über verschiedene Temperaturschritte. Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl der One Shot TOP10 *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, zu denen dann 3-5 µl der Fremd-DNA addiert wurde. Der Ansatz wurde 30 Min. auf Eis inkubiert, anschließend für 30 s auf 42 °C erhitzt und dann erneut auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Reaktionsgefäße bei 37 °C für genau eine Stunde unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Kolonien mittels Plasmidpräparation und Restriktionsverdau analysiert, um das Plasmid zu bestimmen.

2.2.12 Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen

Um die nach der Transformation erhaltenen Plasmide aus den Bakterien zu isolieren, wurde bei einem Bakterienkulturvolumen von max. 5 ml das MiniPrep- und bei einem Volumen von max. 200 ml das MaxiPrep-Verfahren angewendet. Dabei wurde für eine MiniPrep das Fast Plasmid Mini Kit von Analytik-Jena verwendet, für eine MaxiPrep das Plasmid Maxi Kit von Invitrogen verwendet. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ermittlung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte bei einer Extinktion von 260 nm an dem Spektralphotometer Eppendorf BioPhotometer und am Nano-Drop ND-1000 UV/VIS. Am Nano-Drop war es möglich, die Konzentration der Nukleinsäuren direkt in 1 µl der resuspendierten Lösung zu erfassen, bei Benutzung des Photometers wurden die Nukleinsäuren zuvor mit RNase freiem *Aqua dest.* verdünnt.

2.2.14 DNA-Mikroarray

Die Chips für die Mikroarrays wurden über das Canadian *Drosophila* Microarray Centre bezogen. Sie tragen die Bezeichnung Oligo_14kv1. Auf diesen Chips sind alle 14.000 *Drosophila*-Gene jeweils in doppelter Ausführung direkt nebeneinander aufgetragen. Die Gene sind in Blöcken als Subarrays (4x12) angeordnet. Als interne Kontrolle dienen *multiple sample pools* (MSPs). Dies sind zusammengefasste *Drosophila*-Transkripte, die in unterschiedlichen Konzentrationen jeweils in die letzte Reihe eines Subarrays gedruckt wurden. Die jeweils zu vergleichenden Proben wurden mittels des dualen Farben-Systems behandelt, wobei die beiden Proben mit einem unterschiedlichen Farbstoff (entweder AlexaFluor-555 oder AlexaFluor-647) angefärbt wurden. Somit konnten beide Proben auf einen Chip hybridisiert werden. Es wurden RNA-Sonden eingesetzt. Die Vorbereitung der Proben wird im Folgenden näher beschrieben.

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Insektenzellen oder Fettkörpern erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.8 erläutert.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese lässt sich in zwei Abschnitte gliedern: die Erst- und die Zweitstrangsynthese. Nachstehend werden beide Schritte eingehender beschrieben und die Primer aufgelistet:

Erststrangsynthese

Die cDNA-Synthese erfolgte über die CAP-Finder-Methode. Hierbei wird eine Reverse Transkriptase eingesetzt, die die gesamte mRNA ausgehend von einem Oligo-dT-Primer in cDNA umschreibt. Weiterhin hängt dieses Enzym zwei bis vier Cytosinreste an das 3'-Ende der synthetisierten cDNA an, sobald die CAP-Struktur am 5'-Ende der RNA erreicht wird. Diese Cytosinreste bilden mit den Guanin-Resten am 3'-Ende des CAP-Finder-Primers Basenpaarungen. Die

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

übrige Sequenz des Primers dient dann als Matrize, sodass die Reverse Transkriptase diese Sequenz dann als neue Matrize annimmt. Dies wird als *template switch* bezeichnet. Hierdurch kann nach Replikation die Sequenz des CAP-Finder-Primers in die cDNA eingebaut werden.

Die Synthese wurde mit einem Kit der Firma TaKaRa (Frankreich) durchgeführt. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

- 1 µg RNA
- 2 µl Prime Script Puffer (5x)
- 1 µl dNTPs [10 mM]
- 0,5 µl CAP-Finder Primer SP6Gr [10 pmol]
- 0,5 µl OdT T7 I [10 pmol]
- 0,25 µl MnCl₂ [40 mM]
- 0,25 µl RNase Inhibitor
- 0,5 µl Prime Script Reverse Transkriptase
- *ad* 10 µl mit *Aqua dest.*

Der Ansatz wird für 60 Min. im Hybridisierungssofen bei 42 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die cDNA bei -80 °C gelagert.

Zweitstrangsynthese

Der folgende Schritt besteht aus einer Zweitstrangsynthese, durch die das Transkriptom unter Verwendung der integrierten CAP-Finder-Primersequenz amplifiziert werden kann.

Hierzu wird sich der Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) bedient. Hierbei wird der synthetisierte Erststrang unter Zuhilfenahme von bestimmten Oligonukleotiden (Primern) unter Einbeziehung einer thermostabilen DNA-Polymerase in bestimmten Temperaturzyklen vervielfacht. Hierbei macht man sich zunutze, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus verwendet werden und somit eine exponentielle Vervielfältigung ermöglichen.

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

Der PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 μ l) hierzu sah folgendermaßen aus:

- 1 μ l cDNA
- 5 μ l Advantage-Puffer (10 x)
- 2 μ l dNTPs [10 mM]
- 1 μ l Oligo-dT-T7 II [10 pmol]
- 1 μ l Adaptor-SP6-PCR [10 pmol]
- 0,25 μ l Taq (5 U/ μ l)/Pwo (1 U/ μ l) (im Verhältnis 20:1)
- *ad* 50 μ l mit *Aqua dest.*

Bei den verwendeten Polymerasen handelt es sich um SAWADY-Polymerasen der Firma Peqlab (Erlangen).

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

Tabelle 2.4: **PCR-Programm der Zweitstrangsynthese**

T (°C)	t (Min)	Zyklen
95	1:00	1
95	0:20	35
53	0:20	
72	2:30	
72	5:00	1
4	∞	

Zunächst wurde ein 50 μ l Kontrollansatz dieser PCR durchgeführt. War dieser erfolgreich, wurde die PCR im fünf-fachen Ansatz wiederholt. Diese wurden anschließend zusammengeführt, um ausreichend Material für weitere Schritte zu erhalten.

In Tabelle 2.5 sind die verwendeten Primer für die Erst- und Zweitstrangsynthese aufgelistet.

Tabelle 2.5: **Primer der Erst- und Zweitstrangsynthese**

Primer	Sequenz
<u>Erststrangsynthese</u>	
CapFinder-Sp6-rG	CAG CGG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG ArGrGrG
Oligo-dT7-I (Biotin)	Biot-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA(T) ₂₅ A/C/G
<u>Zweitstrangsynthese</u>	
Adaptor-Sp6-PCR	CAG CGG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG
Oligo-dT7-II	GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G

Reinigung der ds-cDNA

Die Reinigung der cDNA erfolgte über SureClean der Firma Bioline nach Herstellerangaben.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

cRNA-Synthese

Die Synthese der cRNA (oder aaRNA) erfolgte über DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Diese schreiben doppelsträngige (ds) DNA in einzelsträngige (ss) RNA um.

Hierzu wird die benötigte Promotorsequenz in die cDNA eingebaut. Dieser Einbau erfolgt während der Erststrangsynthese über den CapFinder-Primer oder Oligo-dT-Primer. Die Oligomere des Oligonukleotid-Chips bestehen aus *Sense*-Proben, daher müssen für die Hybridisierung *Antisense*-Proben eingesetzt werden. Aus diesem Grund war hier der Einbau des Oligo-dT-Primers nötig.

Es wurde eine Promotorsequenz eingebaut, die zusätzlich zum Poly(T)-Schwanz an ihrem 5'-Ende eine T7-Promotorsequenz enthält. Mit diesem Promotor konnten nun die benötigten Antisense-Proben erzeugt werden. Die cRNA-Synthese erfolgte mittels des MEGAscript-Kits (Ambion) nach dem angegebenen Reaktionsansatz:

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

- 2 µl ATP [75 mM]
- 2 µl GTP [75 mM]
- 2 µl CTP [75 mM]
- 1 µl UTP [75 mM]
- 1,5 µl aaUTP [50 mM]
- 2 µl Puffer (10 x)
- 2 µl T7-Enzymmix
- 400-800 ng cDNA
- *ad 20 µl mit Aqua dest.*

Dieser Ansatz wurde im Hybridisierungssofen bei 37 °C 14-16 h inkubiert.

Um Kontaminationen vorzubeugen, wurde die cRNA mit dem NucleoSpin RNA II Kit aufgereinigt.

Fällung der RNA

Die isolierte RNA wurde mit 1/10 des Volumens an Natriumazetat [3M] pH 5,5 und 2,5 Volumeneinheiten Ethanol (96 %-100 %) gefällt. Die Fällung erfolgte bei -80 °C für mindestens 1 h. Anschließend wurden die Proben für 30 Min. bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und für 15 Min. bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde nun für einige Min. luftgetrocknet und je nach Pelletgröße in etwa 6-12 µl RNase-freies *Aqua dest.* aufgenommen. Der RNA-Gehalt wurde anschließend im Nano-Drop gemessen.

Nach der Fällung erfolgte eine Analyse der cRNA im Agarose-Gel (1 %).

Die gereinigte und gefällte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen anhand ihrer Ladung und Größe in einer Agarose-Matrix. Die negativ geladenen Moleküle wandern zum positiven Pol, wobei kleinere Moleküle aufgrund des geringeren Widerstandes des Agarosegels schneller wandern als große.

Die Agarose wurde in Konzentrationen von 1-2 % (w/v) in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und anschließend durch vorsichtiges Rühren auf ca. 60 °C abgekühlt. 5 µl der Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) wurden in 100 ml flüssige Agarose gegeben. Anschließend wurde das Gel gegossen. Nach dem Auftragen der Proben (10 µl Probe + 2 µl schwere Lösung) wurde die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 80-120 Volt in 1 x TBE gestartet. Die Dokumentation des Gels erfolgte bei UV-Licht (320 nm) und wurde mittels des ChemiDoc-Geldokumentationssystems und der Quantity One 4.1.1-Software analysiert.

Markierung der cRNA mit den Fluorophoren Alexa Fluor-555 und Alexa Fluor-647

Der indirekte Einbau dieser Farbstoffe erfolgte im alkalischen Milieu, um zu verhindern, dass die Farbstoffe im sauren bzw. neutralen Milieu mit Wasser reagieren. Des Weiteren werden unter basischen Bedingungen bevorzugt Succinimydylesterasebindungen des jeweiligen Farbstoffes an die aminoallyl-Gruppe der aaUTPs gebildet. Da die Farbstoffe außerdem Ozon-empfindlich sind, wurde die Färbung in einem klimatisierten Raum durchgeführt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 3,33 µl cRNA
- 6,67 µl NaOH ([0,3M] pH 9,0)
- 10 µl AlexaFluor-555/AlexaFluor-647 (in DMSO gelöst)

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei RT im Dunkeln.

Anschließend wurde die cRNA wie unter 2.2.14 beschrieben gereinigt, gefällt und in etwa 5 µl RNase-freies Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde abermals im Nano-Drop gemessen. Hierzu kam die Mikroarray-Software des

Nano-Drops zum Einsatz. Pro Probe sollten etwa 65-200 pmol/ μ l gefärbter cRNA vorliegen.

Hybridisierung

Im Anschluss an die Markierung der cRNA erfolgte die Hybridisierung der gefärbten cRNA auf den Chip.

Der Reaktionsansatz der Hybridisierung sah wie folgt aus:

- 54 μ l DIG Easy Hyb-Lösung
- 2,88 μ l Heringsperma-DNA [10 mg/ml]
- 2,88 μ l Hefe-tRNA [10 mg/ml]
- 150-200 pmol gefärbte cRNA pro Ansatz

Dieser Ansatz wurde zehn Min. bei 65 °C inkubiert und auf den sauberen Chip aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C für 15-18 h in einer SciHYP-Hybridisierungskammer. Um den Reaktionsansatz vor Austrocknung zu schützen, wurde zum einen DIG Easy Hyb-Lösung in die Vertiefungen der Hybridisierungskammer gegeben, zum anderen wurden Deckgläschen und Chip mit einem ablösbaren Kleber versiegelt.

Waschen des Chips

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde in 1 x SSC der Kleber vorsichtig abgelöst und das Deckglas entfernt. Alle weiteren Waschschriffe erfolgten im Dunkeln. Im Einzelnen schlossen sich folgende Waschschriffe an (die jeweiligen Lösungen wurden unter 2.1.4 beschrieben):

- 1 Stunde in L1 (RT)
- 15 Min. in L2 (60 °C)
- 15 Min. in L2 (60 °C)
- 15 Min. in L3 (37 °C)

- 15 Min. in L3 (37 °C)
- 30 s in L4 (RT)
- 10 s in H₂O
- mit H₂O spülen

Nach dem letzten Waschschrift wurde der Chip sofort mit Stickstoff getrocknet und bis zum Einlesen im Dunkeln gelagert.

Einlesen des Chips

Das Einscannen erfolgte mit dem GenePix™4000B-Scanner bei einer Auflösung von 10 µm und einer Laserkraft von 100 %. Die PMT-Werte für die Alexa Fluor-555 und Alexa Fluor-647 wurden anhand der in 2.2.14 erwähnten MSP-Signale ermittelt, die als interne Kontrolle dienten. Diese sollten für beide Kanäle eine ähnliche Fluoreszenzintensität aufweisen.

Bioinformatik

Die Auswertung der Arraydaten erfolgte mit der Software GenePixPro 6.0 (Molecular Devices). Dieses Programm macht es möglich, die Fluoreszenzbilder der *Spots* mit einem *Spot*-Gitter zu verbinden, die *Spots* zu erkennen und bestimmte *Spots* zu kennzeichnen. Die weitere Auswertung, Hintergrundkorrektur der Hybridisierungssignale, Normalisierung der Daten, etc., wurde mit der Software Aquity 4.0 (Molecular Devices) durchgeführt. Mit diesem Programm war auch eine Verknüpfung der *Spots* mit ihrer Bezeichnung und Funktion möglich. Die weitere Auswertung der Array-Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Internetseiten (www.bioinformatics.org/gvnn) und (babelomics.bioinfo.cipf.es).

2.2.16 Inhibierung des Allergens rDer p 1

Zur Inhibierung des Allergens dient der für Cysteinproteasen spezifische Inhibitor E64. Hierzu wurden 500 µg rDer p 1 mit 250 µl E64 (4mg/ml) versetzt und gevortext. Die anschließende Aufreinigung erfolgte über Hi-Trap-Desalting-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) mit einer Flussrate von 2 ml/ Min..

3 ml der Probe wurden aufgefangen und darin die Proteinmenge bestimmt. Diese lag bei 79 µg/ml. Die Inhibierung wurde durchgeführt von Frau Marisa Böttger (Laborgruppe klinische und molekulare Allergologie; FZ Borstel).

2.2.17 Aufzucht und Haltung der Fliegen

Die verwendeten Fliegenstämme wurden in Kulturröhrchen mit Ceaprenstopfen bei RT gehalten. Als Futtermedium dient das Standardmedium für *Drosophila*.

- 500 ml H₂O auf etwa 60 °C erwärmen; etwas H₂O abnehmen, um darin Melasse und Zuckerrübensirup zu lösen. In dem restlichen H₂O die Bierhefe, das Maismehl, Agar-Agar und Glucose lösen. Die gelöste Melasse und den gelösten Sirup hinzugeben; für 15-30 Min. Autoklavieren. Um das Wachstum von Mikroben zu verhindern, wird dem Medium nach Abkühlen auf ca. 50 °C Propionsäure (10 %) und Nipagin (10 %) zugesetzt.

Die adulten Tiere wurden je nach Eiablage, spätestens jedoch alle 14 Tage in neue Kulturröhrchen umgesetzt. Hierzu wurden die Tiere in den alten Röhrchen für etwa 5 Minuten auf Eis gestellt. Dies diente dazu, die Tiere zu betäuben, um sie dann in neue Röhrchen zu überführen. Die Anzahl der Tiere pro Röhrchen betrug 15-20 Tiere.

2.2.18 Präparation der Fettkörper aus den Fliegenlarven

Wie unter 2.2.17 bereits beschrieben wurden die Fliegen auf einem Nährboden gehalten, in den sie nach einigen Tagen auch ihre Eier ablegten. Nach einem Zeitraum von etwa fünf bis sieben Tagen waren die Larven aus den Eiern geschlüpft und hatten nach Durchlaufen des ersten und zweiten Larvenstadiums das abschließende dritte erreicht. Die drei Larvenstadien grenzen sich durch zwei Häutungen voneinander ab. Außerdem unterscheiden sie sich durch die Anzahl der offenen Stigmenöffnungen voneinander. Das erste Larvenstadium ist metapneustisch. Hier existiert nur eine offene Stigmenöffnung am Ende des Hinterleibs. Die zwei folgenden Larvenstadien sind amphipneustisch. Sie verfügen über jeweils eine offene Stigmenöffnung am Vorder- und Hinterende.

Larven des dritten Stadiums wurden dem Behälter entnommen und zunächst zweimal in Schneider Medium gewaschen.

Unter einem Binokular wurden nun mithilfe zweier Pinzetten die beiden Enden der Larve festgehalten geöffnet. Anschließend konnte der Fettkörper entfernt und in die Wells einer 96-Well-Platte überführt werden, in die zuvor 90 µl des *Drosophila's* Schneider Mediums vorgelegt worden waren. Hierbei erhielt jedes Well die Fettkörper aus zwei Larven.

2.3 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben, sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) dargestellt. Es wurden generell One-Way-ANOVA-Analysen durchgeführt, um die Signifikanz zu ermitteln. Eine Ausnahme bildeten hier die Analysen der Kinetiken. Diese wurden mit der Two-Way-ANOVA-Analyse durchgeführt. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) als signifikant angesehen.

Kapitel 3

Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Thema „Auswirkungen mikrobieller und allergener Komponenten auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster*“ vorgestellt. Ausgehend von der in Abschnitt 1.4 benannten Zielsetzung, bei der es hauptsächlich um die Fragen geht, ob das angeborene Immunsystem der Taufliege durch Allergene induziert werden kann und inwieweit immunmodulatorische Bakterien ein solch ursprüngliches Immunsystem beeinflussen können, soll hier zunächst durch Vorversuche geklärt werden, welchen Effekt das Häutungshormon Ecdyson auf die verwendeten immunkompetenten Zellen hat (Abschnitt 3.1).

Anschließend wird die Induktion des angeborenen Immunsystems durch das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 untersucht. Dies geschieht sowohl in immunkompetenten Zellen als auch in *Ex-vivo*-Versuchen an isolierten Fettkörpern (Abschnitt 3.2). Den abschließenden Teil der Arbeit bilden Experimente, die erneut mit immunkompetenten Zellen durchgeführt worden sind und den Einfluss des immunmodulatorischen Bakteriums, *Lactococcus lactis*, auf das Immunsystem von *Drosophila* aufzeigen (Abschnitt 3.4). Diesem Gram-positiven Bakterium konnte im humanen System immunmodulatorische Wirkung nachgewiesen werden, welche in *Drosophila* nicht beobachtet werden konnte.

Es stellte sich heraus, dass Ecdyson sich sowohl verstärkend auf die Transfektionsrate als auch auf die Immunantwort auswirkt, jedoch negativen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Des Weiteren konnte in Experimenten mit dem Hausstaub-

milbenallergen Der p 1 gezeigt werden, dass das angeborene Immunsystem durch das Allergen induziert werden kann.

3.1 Einfluss des Häutungshormons Ecdyson auf immunkompetente Zellen der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Ecdyson ist ein Steroidhormon, welches in *Drosophila* sowohl die Entwicklung und die Metamorphose als auch die Reproduktion und das Altern reguliert [56]. In der Entwicklung der Fliege erreicht Ecdyson während des dritten Larvenstadiums die höchste Konzentration. Es wirkt verstärkend auf die zelluläre und humorale Immunantwort [57]. In den folgenden Experimenten wird der Effekt dieses Häutungshormons auf die Zellviabilität, die Transfektionsrate und die Immunantwort analysiert. Um den aus der Literatur bekannten Effekt ausnutzen zu können, wurden die immunkompetenten Zellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, jeweils 12 Stunden vor der eigentlichen Stimulierung mit dem Häutungshormon Ecdyson präinkubiert.

3.1.1 Ecdyson beeinflusst die Transfektionsrate immunkompetenter Zellen

Ecdyson wirkt verstärkend auf die phagozytotische Aktivität der immunkompetenten Zellen [57]. Es stellte sich für die durchzuführenden Experimente die Frage, ob die Transfektionsrate der S2-Zellen mit Ecdyson ebenfalls erhöht werden kann, da es sich ebenso wie bei der Phagozytose um einen Aufnahmemechanismus handelt. Es wurden daher S2-Zellen 12 Stunden vor der Transfektion mit Ecdyson präinkubiert und anschließend transfiziert. Das verwendete Konstrukt (Actin5c-Upd-GFP) eignete sich für eine Kontrolle der Transfektionseffizienz, da hier ein Promotor (Actin5c), der konstitutiv aktiviert wird, an ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) gekoppelt ist. Somit konnte die Rate der Transfektion anhand der Fluoreszenz des GFP am FACS (beschrieben in Abschnitt

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

2.2.6) analysiert werden. Tabelle 3.1 stellt die ermittelten Transfektionsraten nach unterschiedlichen Behandlungen dar.

Wurden Zellen als Kontrolle nur mit Medium behandelt, wiesen lediglich 0,4 % der Zellen eine Eigenfluoreszenz auf, die über den GFP-Kanal detektiert werden kann. Für Zellen, welche ohne Ecdyson-Vorbehandlung mit 5 µg DNA transfiziert wurden, konnte eine Transfektionsrate von 1,7 % ermittelt werden.

Mit zunehmender Ecdyson-Konzentration stieg die Prozentzahl transfizierter Zellen an. Wurden die Zellen beispielsweise mit 12,5 nM Ecdyson behandelt, so wurden 4 % transfiziert, eine Behandlung mit 50 nM Ecdyson ergab eine Transfektionsrate von 6,9 %. Die Verwendung von Ecdyson in den Konzentrationen 100 nM und 1000 nM führten zu jeweils geringen Steigerungen der Transfektionsrate auf 7,1 % beziehungsweise 7,9 %.

Tabelle 3.1: Transfektionsraten nach Ecdysonbehandlung. Die Transfektionsraten wurden ermittelt aus zwei unabhängigen Messungen am FACS.

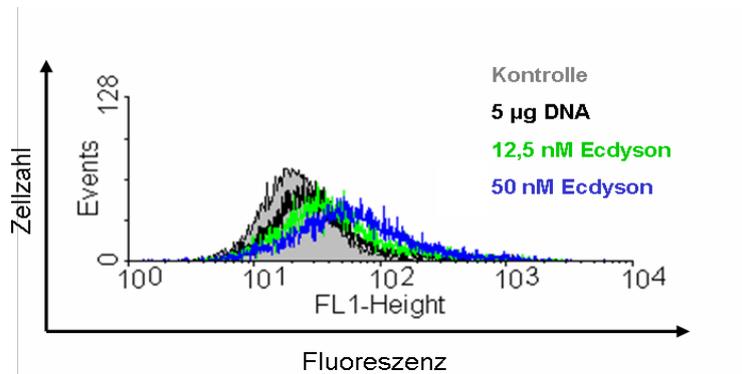
Behandlung	Transfektionsrate [%]
Kontrolle	0,4
5 µg DNA	1,7
12,5 nM Ecdyson	4,0
50 nM Ecdyson	6,9
100 nM Ecdyson	7,1
1000 nM Ecdyson	7,9

Abbildung 3.1 stellt die Ergebnisse der Transfektionen dar, wobei auf der y-Achse die Anzahl der untersuchten Zellen aufgetragen ist und auf der x-Achse die Fluoreszenz. Eine Verschiebung der Graphen nach rechts bedeutet in diesem Fall eine Zunahme der Fluoreszenz. Durch die grau-unterlegte Kurve sind in den drei Unterabbildungen 3.1a bis 3.1c diejenigen Zellen dargestellt, die nicht transfiziert wurden und somit als Kontrolle dienten. Die schwarze Kurve stellt Zellen dar, die ohne Ecdyson-Vorbehandlung transfiziert wurden. Zellen, die mit aufsteigenden Konzentrationen an Ecdyson behandelt wurden, werden durch Kurven unterschiedlicher Farben dargestellt.

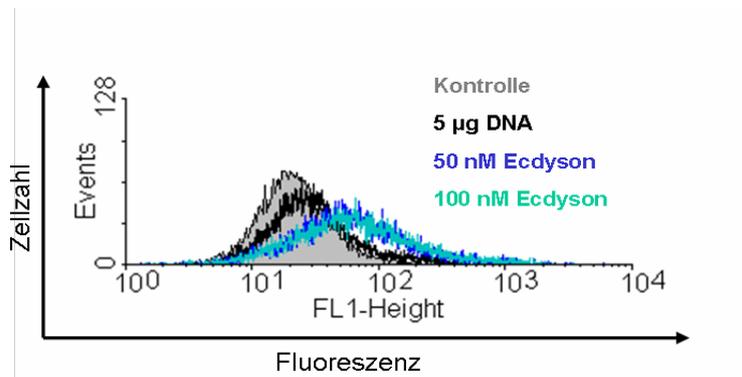
KAPITEL 3. ERGEBNISSE

Zunächst wurde der Effekt von Ecdyson in geringen Konzentrationen von 12,5 nM (grüne Kurve) und 50 nM (blaue Kurve) analysiert (Abbildung 3.1a). Es werden hier Transfektionsraten von 4 % beziehungsweise 6,9 % erreicht. Bei Verwendung einer nochmals gesteigerten Konzentration (100 nM Ecdyson; türkise Kurve in Abbildung 3.1b) wird der mit 50 nM erreichte Anteil transfizierter Zellen kaum gesteigert (7,1 %). Auch eine weitere Steigerung der Ecdysonkonzentration auf 1000 nM erzielt nur eine geringe Erhöhung der Transfektionsrate. Es werden 7,9 % der Zellen transfiziert (rote Kurve in Abbildung 3.1c). Dies ist die höchste ermittelte Transfektionsrate.

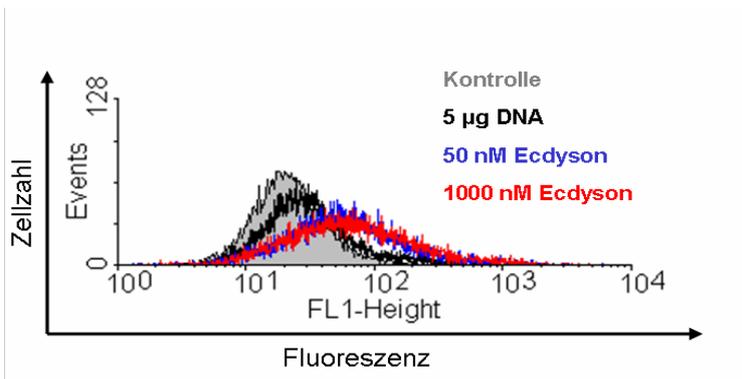
KAPITEL 3. ERGEBNISSE



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.1: **Einfluss von Ecdyson auf die Transfektionseffizienz der S2-Zellen.** S2-Zellen wurden 12 Stunden vor der Transfektion mit aufsteigenden Konzentrationen an Ecdyson behandelt. Anschließend erfolgte die transiente Transfektion (siehe Abschnitt 2.2.2) mit dem Konstrukt p-Act5c-Upd-GFP.

3.1.2 Ecdyson beeinflusst die Zellviabilität immunkompetenter Zellen

Dimarcq *et al.* [57] konnten zeigen, dass Ecdyson zum einen die Immunantwort verstärkt, sich zum anderen aber auch negativ auf die Zellviabilität auswirkt. Um für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen die in Bezug auf die Zellviabilität optimale Konzentration zu ermitteln, wurde ein MTT-Test durchgeführt (Abschnitt 2.2.7 und Abbildung 3.2). Es wurde mit diesem Test untersucht, in welcher Konzentration und über welchen Zeitraum das Ecdyson für die Präinkubation in weiteren Versuche einzusetzen ist. MTT ist ein gelber Farbstoff, der von lebenden Zellen zu blauem Formazan umgesetzt wird. Die entstandene Blaufärbung kann photometrisch im ELISA-Reader erfasst werden und ist ein Maß für die Zellatmung in den lebenden Zellen.

Die verwendeten Zellen wurden in diesem Experiment entweder 12 (graue Balken) oder 48 Stunden (schraffierte Balken) mit Ecdyson behandelt. Die dargestellten Ergebnisse (Abbildung 3.2) wurden im ELISA-Reader anhand technischer Duplikate ermittelt. Es wurden hier die Konzentrationen 50 nM und 1000 nM gewählt, da sich 50 nM bei der Ermittlung der Transfektionsrate als diejenige Konzentration erwies, nach der die Rate der transfizierten Zellen kaum noch anstieg. Die Konzentration von 1000 nM ergab die höchste Transfektionsrate und wurde als Richtwert aus vorherigen Studien [57] angenommen.

Zellen, welche mit Medium ohne Ecdyson inkubiert wurden, dienten hier als Kontrolle (K). Die Werte, die für diese Zellen ermittelt wurden, entsprechen demnach 100 %. Durch den Vergleich mit dieser Kontrolle, konnte so die Rate der überlebenden Zellen ermittelt werden.

Wurden die Zellen mit 50 nM Ecdyson stimuliert, so lag die Rate der lebenden Zellen nach 12 Stunden bei 74 % und nach 48 Stunden bei 54 %. Bei einer Stimulation mit 1000 nM Ecdyson, hatten nach 12 Stunden 72 % der Zellen überlebt, nach 48-stündiger Stimulation mit Ecdyson jedoch nur 17 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zellen in allen weiteren Versuchen für 12 Stunden mit 50 nM Ecdyson vorstimuliert.

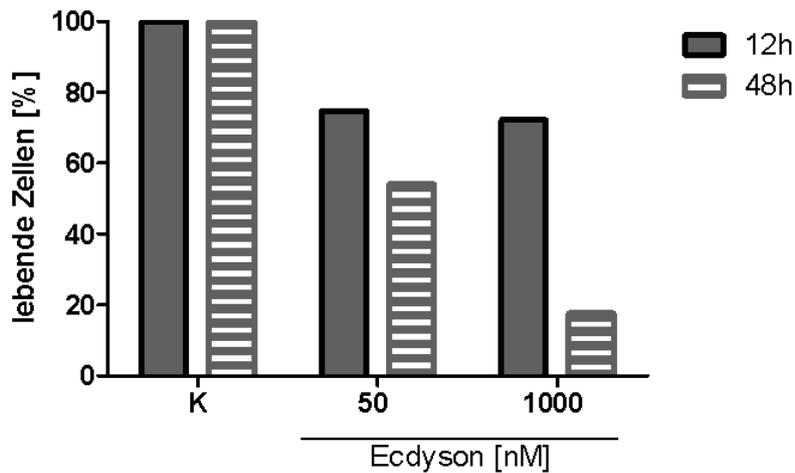


Abbildung 3.2: **MTT-Test mit Ecdyson-behandelten S2-Zellen.** Mittels des MTT-Tests wurde der Einfluss von Ecdyson auf das Überleben der Zellen überprüft. Die Daten entsprechen Resultaten photometrischer Messungen aus technischen Duplikaten.

3.1.3 Ecdyson beeinflusst die Immunantwort

In den Abschnitten 3.1.2 und 3.1 konnte gezeigt werden, dass sich Ecdyson in einer Konzentration von 50 nM am besten eignet, um Zellen zu präinkubieren. In dieser Konzentration schädigt es die Zellen auch über eine längere Inkubationsdauer am wenigsten, und die Transfektionsrate ist ausreichend hoch.

Im nächsten Experiment wurde anhand eines Luciferase-Assays untersucht, wie sich Ecdyson auf die Immunantwort auswirkt. Hierzu wurden immunkompetente Zellen der Taufliege *Drosophila melanogaster* mit 50 nM Ecdyson präinkubiert und nach 12 Stunden mit dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* stimuliert (schraffierte Balken). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (graue Balken). Angegeben ist auf der y-Achse die Promotoraktivierung als relative Einheit (RLU = *relative light unit*). Die RLU wurde aus dem Quotienten der induzierbaren und konstitutiven Luciferase ermittelt. Abbildung 3.3 stellt die durch Ecdyson gesteigerte Immunantwort dar.

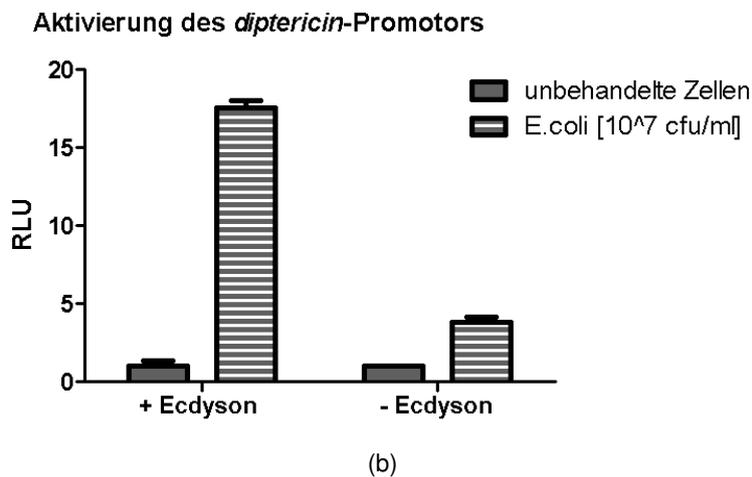
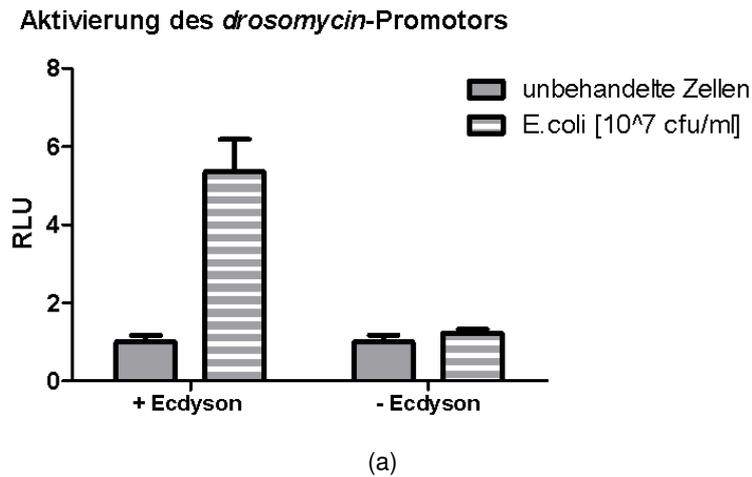


Abbildung 3.3: **Ecdyson verstärkt die Immunantwort.** immunkompetente Zellen wurden transient transfiziert, mit 50 nM Ecdyson präinkubiert und 12 Stunden später mit *E.coli* stimuliert. Dargestellt sind die Daten von Luciferase-Assays dreier unabhängiger Versuche.

Der Toll-Signalweg wird durch Gram-negative Bakterien deutlich schwächer induziert. Zellen, welche mit Ecdyson präinkubiert wurden, weisen hier eine Promotoraktivierung auf, die fünfmal höher ist als das Kontrollniveau. Im Gegensatz dazu kann in Zellen, welche nicht mit Ecdyson präinkubiert wurden, keine Aktivierung des *drosomycin*-Gens festgestellt werden (Abbildung 3.3a). Der IMD-Signalweg wird durch Gram-negative Bakterien stärker induziert. Die Aktivierung

des *diptericin*-Promotors in den Zellen, welche mit Ecdyson und anschließend mit *E. coli* stimuliert wurden, ist 18-mal höher als das Kontrollniveau. Die Immunantwort der Zellen hingegen, die nicht mit Ecdyson vorbehandelt wurden, ist nur etwa fünfmal höher als das Kontrollniveau (Abbildung 3.3b).

3.2 Einfluss des Hausstaubmilbenallergens Der p 1 auf das angeborene Immunsystem

Das Majorallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* ist ein Verdauungsenzym, welches im Kot der Milbe zu finden ist [58]. Dieses Allergen weist Sequenzhomologien zur Cysteinprotease Papain auf. Im humanen System gelangt es über die Spaltung von Occludin in den Zell-Zell-Verbindungen der Epithelzellen in der Lunge in die subepithelialen Bereiche [13]. Hier interagiert das Allergen mit dendritischen Zellen, die es aufnehmen und prozessieren, mit B- und T-Zellen, deren Oberflächenrezeptoren es spaltet, und auch mit Mastzellen, an deren gebundenes IgE es binden kann [59]. Durch all diese Interaktionen wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst. Es ist hingegen wenig darüber bekannt, wie Der p 1 auf das angeborene Immunsystem wirkt. Mit den folgenden Versuchen soll hier ein Einblick gegeben werden. Zunächst wird die verwendete Charge auf eventuelle Kontaminationen getestet, um sicherzustellen, dass diese nicht den Auslöser für eine etwaige Immunantwort darstellen. Im Anschluss daran wird untersucht, ob Der p 1 eine Immunantwort in *Drosophila* auslösen kann. Dies wird mit Hilfe von Zellkulturen und isolierten Fettkörpern analysiert.

3.2.1 Mikrobielle Kontaminationen in Der p 1

Da es sich bei diesem Allergen um ein rekombinantes Allergen (rDer p 1) handelt, wurde zunächst untersucht, ob die verwendete Charge mikrobielle Kontaminationen aufwies (Abbildung 3.4). Dafür wurden HEK293-Zellen verwendet, die transient mit TLR2 (Rezeptor für Lipopeptide) und dem Korezeptor CD14 transfiziert wurden (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Ergebnisse dieses Experiments wurden anhand eines CXCL-8-ELISAs (Abschnitt 2.2.4) erhoben. CXCL-8 ist ein proin-

flammatorisches Zytokin, dessen Freisetzung eine generelle Aktivierung der Zellen anzeigt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Zellen (wt), die nicht mit den genannten Rezeptoren oder Korezeptoren transfiziert wurden, sowie Zellen, die mit Medium inkubiert wurden. In diesem Experiment wurden die Zellen als Positivkontrolle mit TNF- α stimuliert.

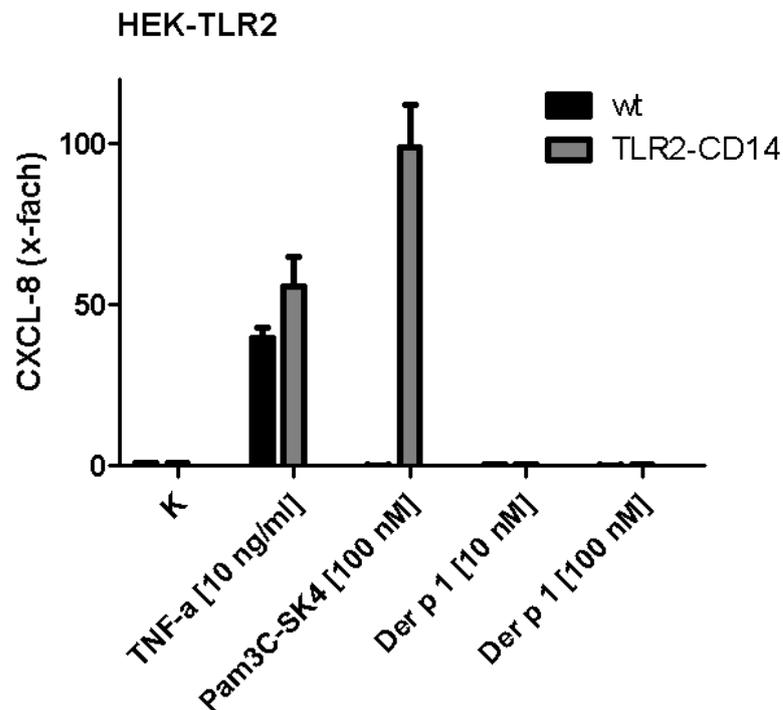


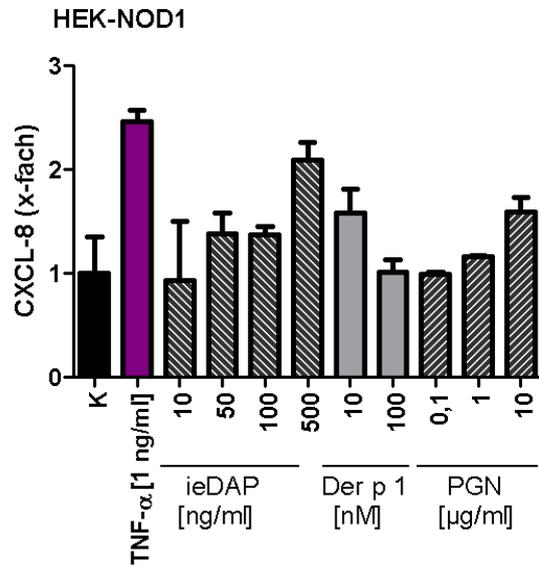
Abbildung 3.4: CXCL-8-Freisetzung in TLR2-CD14 und TLR4-CD14-MD2 transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert, stimuliert und anschließend wurde mittels eines ELISAs die CXCL-8-Freisetzung im Überstand der Zellkultur anhand zweier technischer Replikate gemessen.

Die verwendeten Wildtyp-Zellen zeigten nur nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α eine Freisetzung des Zytokins CXCL-8 (48-mal mehr als die Kontrolle). Bei allen anderen verwendeten Stimulantien kam es nicht zu einer Aktivierung der Zellen.

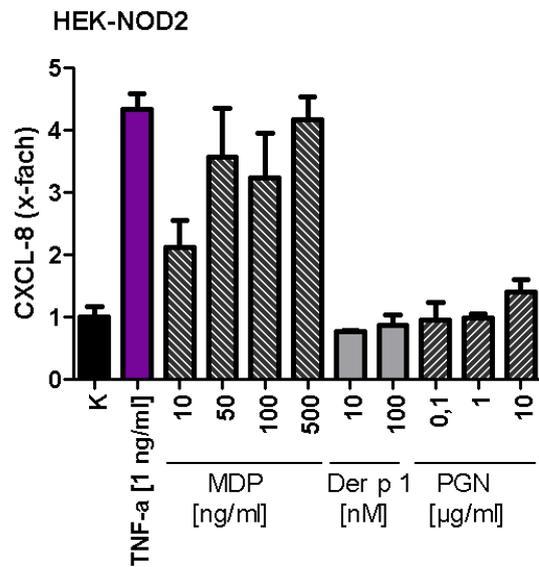
Zellen, welche mit TLR2-CD14 transfiziert wurden, setzten CXCL-8 sowohl nach Stimulation mit TNF- α (50-fach über Kontrollniveau) als auch mit 100 nM des triacylierten Lipopeptids Pam₃C-SK₄ (100-fach über Kontrollniveau) frei. Wurden diese Zellen jedoch mit den anderen Stimuli (LPS [100 ng/ml] und Der p 1 [10 und 100 nM]) konfrontiert, kam es nicht zu einer CXCL-8-Freisetzung. Es wurden keine Tests auf eine mögliche Lipopolysaccharid (LPS)-Kontamination durchgeführt, da LPS in diesem Modellorganismus keine Immunantwort auslöst.

Da in der Taufliede Peptidoglykane als Aktivatoren des Immunsystems gelten, wurde das verwendete Der p 1 ebenfalls auf diese Kontaminanten getestet (Abbildung 3.5). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit NOD1 und NOD2 (NOD = *nucleotide-binding oligomerization domain*) transient transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2). NOD1 und NOD2 sind intrazelluläre Rezeptoren und dienen der Erkennung von γ -D-Glu-Diaminopimelinsäure (ieDAP; Ligand für NOD1) und Muramyl-dipeptid (MDP; Ligand für NOD2). TNF- α wurde hier erneut als Kontrolle für die Aktivierung der Zellen eingesetzt. Die Daten ergaben sich aus technischen Replikaten eines ELISAs.

HEK293-Zellen, die mit NOD1 transfiziert wurden (Abbildung 3.5a), reagierten bei einer Stimulation mit TNF- α [1 ng/ml] mit einer Freisetzung von CXCL-8, die zweieinhalbfach über Kontrollniveau lag. In diesem Bereich wurde dieses Zytokin auch nach Stimulation mit der höchsten verwendeten Konzentration von ieDAP [500 ng/ml] freigesetzt (zweifach über Kontrollniveau). Wurden die Zellen mit Peptidoglykan (PGN) stimuliert, so führte auch hier die höchste Konzentration [10 μ g/ml] zu einer etwas höheren Freisetzung von CXCL-8. Dieses Zytokin wird nach Stimulation mit dem Allergen bei der verwendeten geringeren Konzentration von 10 nM freigesetzt, nicht jedoch bei der höheren Konzentration von 100 nM.



(a)



(b)

Abbildung 3.5: CXCL-8-Freisetzung von mit NOD1 und NOD2 transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden transient mit NOD1 und NOD2 transfiziert und anschließend mit den angegebenen Substanzen stimuliert. Die Daten des ELISA stammen aus zwei technischen Replikaten.

NOD2-transfizierte HEK293-Zellen (Abbildung 3.5b) weisen bei Stimulation mit MDP eine dosisabhängige Freisetzung von CXCL-8 auf. Nach Konfrontation mit 10 ng/ml MDP ergab sich eine Freisetzung von CXCL-8, die zweifach über der Kontrolle lag. Eine Stimulation mit 50 ng/ml MDP resultierte in einer Freisetzung des Zytokins, die dem Vierfachen des Kontrollniveaus entsprach. Mit höheren Konzentrationen an MDP [100 und 500 ng/ml] stellte sich keine weitere Steigerung der Zytokinfreisetzung ein. Eine Stimulation dieser Zellen mit dem Allergen Der p 1 und Peptidoglykan hingegen führte in beiden Fällen nicht zu einer Freisetzung von CXCL-8.

Diese Experimente mit den HEK293-Zellen ergaben somit keine Hinweise auf Lipopeptid- oder Peptidoglykan-Kontaminationen, so dass für alle folgenden Versuche davon ausgegangen wird, dass eine Immunantwort allein durch das Allergen ausgelöst wird.

3.2.2 Immunantwort des angeborenen Immunsystems auf das Allergen Der p 1

Nach Analyse etwaiger Kontaminationen in der verwendeten Allergenpräparation, sollte nun die Frage beantwortet werden, ob Der p 1 die Signalwege der angeborenen Immunität in *Drosophila* aktivieren kann. Dafür wurde zunächst untersucht, ob immunkompetente Zellen der Taufliege in der Lage sind, auf das Allergen mit einer Immunantwort zu reagieren. Hierzu erfolgte eine transiente Transfektion der Zellen mit Konstrukten, die eine Analyse per Luciferase-Assay möglich machten (Tabelle 2.1).

Für den Toll-Signalweg wurde ein Konstrukt gewählt, welches den Promotor für das Gen des antimikrobiellen Peptids *drosomyacin* an Luciferase koppelt, so dass im Falle einer Aktivierung eine Biolumineszenz gemessen werden kann. Die Aktivierung des IMD-Signalweges wurde über ein Konstrukt analysiert, indem der Promotor für das Gen des antimikrobiellen Peptids *diptericin* mit der Luciferase fusioniert wurde. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

In diesem Versuch wurden zum einen Zellen als Kontrolle verwendet, die mit Medium und zum anderen Zellen, die mit BSA inkubiert wurden. BSA diente hier als Nachweis dafür, dass die Aktivierung der Signalwege allergen-spezifisch ist. Die Stimulation der Zellen mit BSA resultierte in einer Promotoraktivierung (gemessen in RLU), die jeweils unter dem Kontrollniveau lag (Abbildung 3.6a und 3.6b).

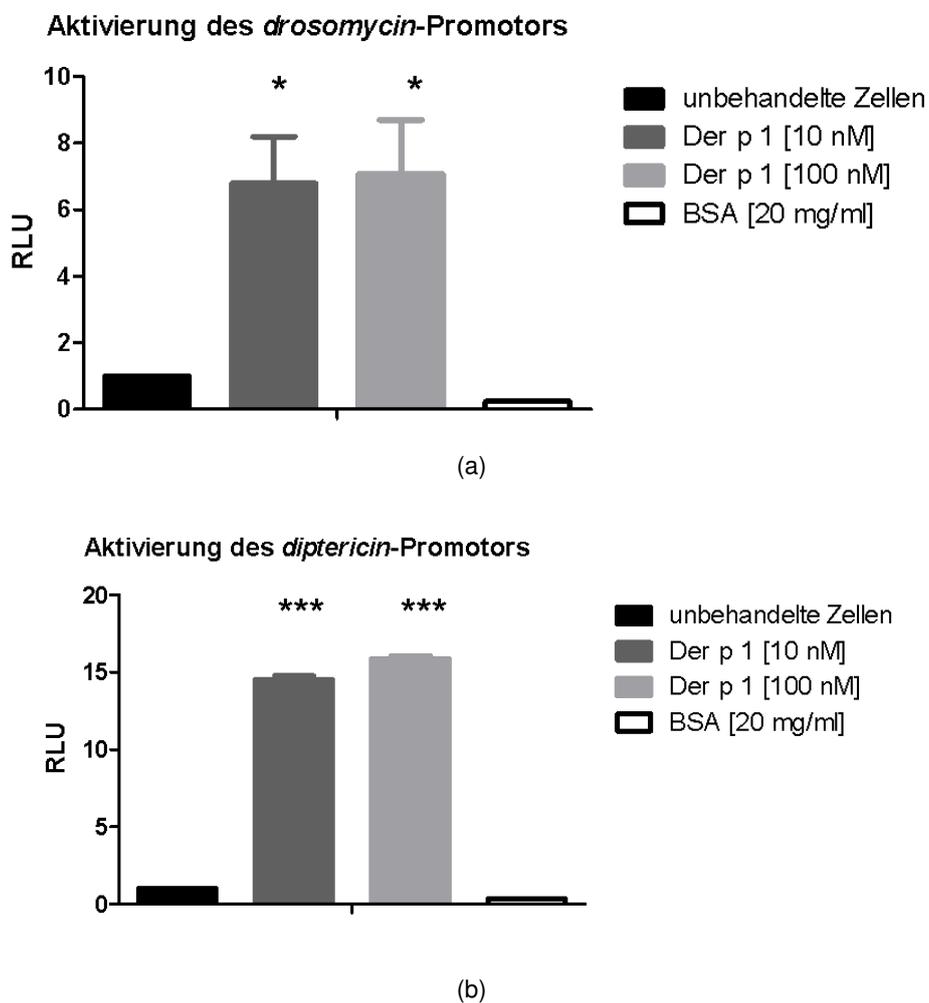


Abbildung 3.6: **Der p 1 vermittelte Immunantwort.** immunkompetente Zellen wurden transient transfiziert und anschließend mit Der p 1 oder BSA in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Daten des Luciferase-Assays wurden anhand von drei biologischen Replikaten erstellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

In Abbildung 3.6a sind die Ergebnisse dargestellt, welche für den Toll-Signalweg ermittelt wurden. Das Hausstaubmilbenallergen ist in den beiden eingesetzten Konzentrationen von 10 und 100 nM in der Lage, den *drosomycin*-Promotor signifikant zu aktivieren.

Signifikant bedeutet in diesem Fall, dass die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Promotor im Widerspruch zu den experimentell ermittelten Daten, nicht durch Der p 1 aktiviert wird, kleiner ist als 5 % ($p < 0,05$). Diese Signifikanz wird durch einen Stern über dem Balken angezeigt. Die ermittelten Werte für die RLU liegen etwa achtfach über dem Kontrollniveau. Die Werte, die für die Aktivierung des *diptericin*-Promotors ermittelt werden konnten (Abbildung 3.6b), liegen 15-fach über Kontrollniveau. Auch in diesem Fall war die Promotoraktivierung signifikant. Diese Versuche konnten zeigen, dass das Allergen Der p 1 in der Lage ist, eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems in *Drosophila* zu induzieren.

Kinetik der Immunantwort immunkompetenter Zellen nach Stimulation mit Der p 1

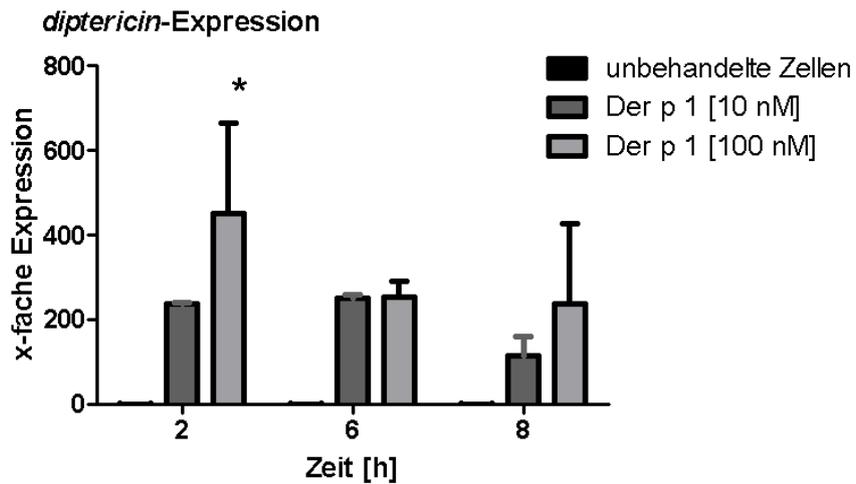
Im Luciferase-Assay können keine Kinetiken untersucht werden, da hier das Protein über die Zeit im Zytoplasma akkumuliert. Aus diesem Grund wurde der zeitliche Ablauf der Immunantwort mit Hilfe der quantitativen *Real-time PCR* (qRT-PCR, beschrieben in Abschnitt 2.2.10) ermittelt (Abbildung 3.7).

Diese Abbildung stellt die Expression der Gene *drosomycin* und *diptericin* nach Stimulation mit Der p 1 dar. Hierbei ist das Expressionsniveau jeweils als Vielfaches der Kontrolle angegeben. Der Verlauf der Immunantwort ähnelt sich für die Expressionsniveaus beider Gene: Die Expression des *diptericin*-Gens liegt nach zwei Stunden etwa 400-fach (signifikant) über dem Kontrollniveau, während das *drosomycin*-Gen bezogen auf die Kontrolle etwa 100-mal stärker exprimiert wird. Nach achtstündiger Inkubationsdauer ist die Expression des *diptericin*-Gens noch etwa 100-mal höher als die Kontrolle, während die Expression des *drosomycin*-Gens nach dieser Zeit auf Kontrollniveau liegt.

Anhand dieser Versuche konnte dokumentiert werden, dass die Immunantwort der immunkompetenten Zellen schnell eintritt.



(a)



(b)

Abbildung 3.7: Kinetik der Immunantwort auf das Allergen Der p 1. Hierzu wurden immun-kompetente Zellen mit dem Allergen Der p 1 stimuliert, und die Expression der Gene *drosomycin* und *dipteracin* mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$).

Immunantwort nach Zweitkontakt mit Der p 1

Im vorherigen Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass das Immunsystem der Taufliege fähig ist, auf ein Allergen wie Der p 1 zu reagieren. Im humanen System erfolgt eine allergische Reaktion erst bei einem Zweitkontakt mit dem Allergen. Die Immunantwort ist dann stärker als die des Erstkontaktes. Es stellte sich daher im Folgenden die Frage, ob *Drosophila* auch über eine Art immunologisches Gedächtnis verfügt, welches bei einem Zweitkontakt eine stärkere Immunantwort auslösen würde.

Um diese Frage zu beantworten, wurden die immunkompetenten Zellen zunächst zweimal mit dem Allergen stimuliert (Abbildung 3.8). Die zweite Konfrontation fand 24 Stunden nach der ersten statt. In einem weiteren Experiment erfolgte zunächst eine Konfrontation mit einem Gram-negativen Bakterium (*E. coli*) und anschließend mit Der p 1 (Abbildung 3.9). Ermittelt wurden diese Daten wiederum durch einen Luciferase-Assay.

Die wiederholte Konfrontation mit dem Allergen Der p 1 (Abbildung 3.8) führte nicht zu einer verstärkten Immunantwort. Zunächst wurden die Zellen mit Der p 1 in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM konfrontiert. Hier konnte eine achtfache Aktivierung des *drosomycin*-Promotors bezogen auf die Kontrolle ermittelt werden (Abbildung 3.8a), die Aktivierung des *dipterocin*-Promotors betrug das 15-fache der Kontrolle (Abbildung 3.8b). Der Zweitkontakt (dargestellt durch schraffierte bzw. gepunktete Balken) mit dem Allergen in Konzentrationen von 10 nM beziehungsweise 100 nM erfolgte, nachdem die Zellen zuvor mit 10 nM Der p 1 konfrontiert wurden. Es stellte sich keine gesteigerte Immunantwort ein. Die Aktivierung des *drosomycin*-Promotors lag nach Zweitkontakt um 25 % reduziert vor, die des *dipterocin*-Promotors war um 48 % reduziert.

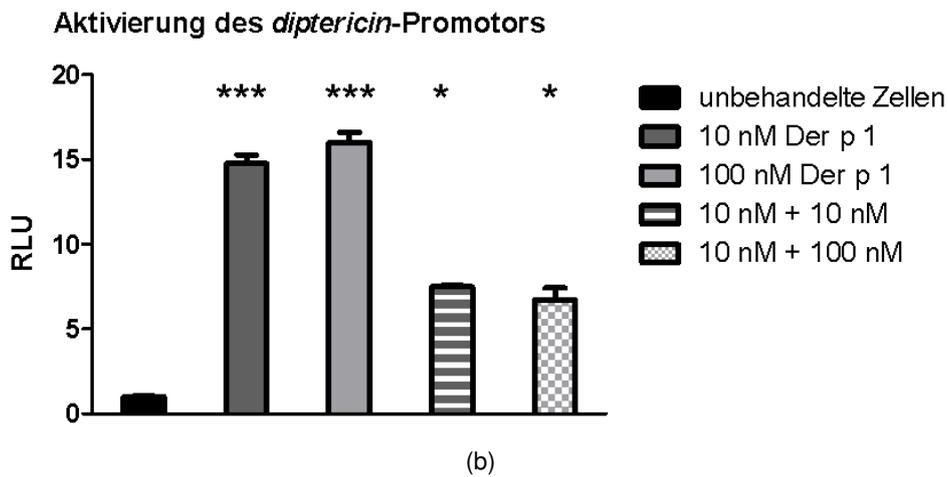
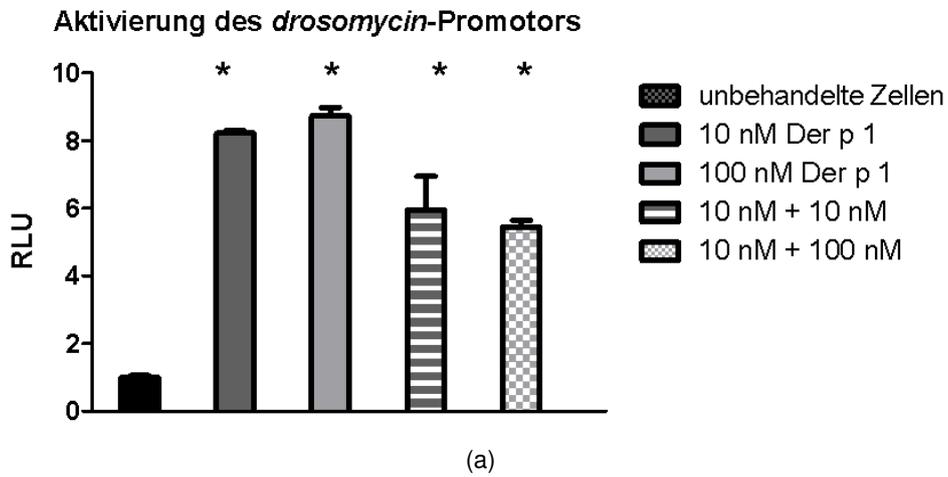


Abbildung 3.8: **Reduzierte Promotoraktivierung bei Zweitkontakt mit dem Allergen.** Die Promotoraktivierung wurde mittels Luciferase-Assays bestimmt und als x-fache Induktion zur Kontrolle angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Die Stimulation der Zellen entweder mit *E.coli* oder mit Der p 1 alleine resultierte in einer vergleichbaren Immunantwort. Die Aktivierung des *drosomycin*-Promotors ist jeweils zehnfach stärker als in Zellen, welche in Medium inkubiert wurden (Abbildung 3.9a), der *dipteracin*-Promotor wird 20-mal stärker aktiviert (Abbildung 3.9b). Beide Aktivierungen sind hier signifikant.

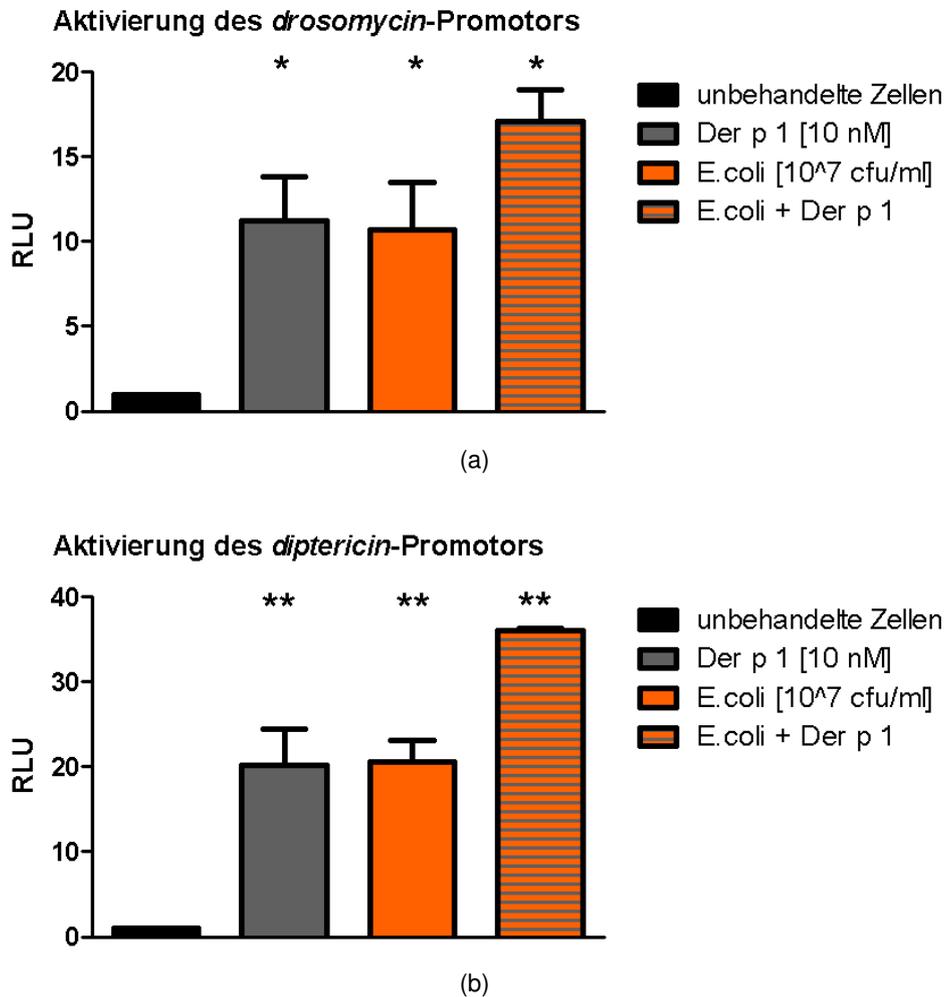


Abbildung 3.9: **Gesteigerte Immunantwort bei Erstkonfrontation mit einem Bakterium und Zweitkonfrontation mit dem Allergen.** Die Zellen wurden hier mit einem Gram-negativen Bakterium stimuliert, welches die Signalwege in ähnlicher Weise aktiviert, wie das Allergen. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Replikate \pm S.E.M. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

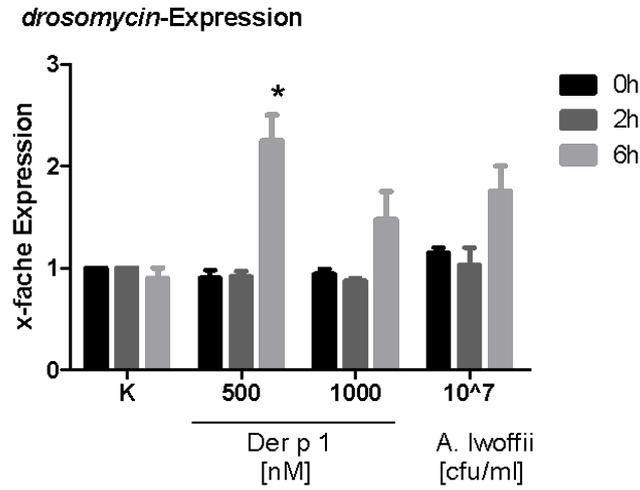
Eine Konfrontation der Zellen mit dem Bakterium und eine anschließende zweite mit dem Allergen führt zu einer gesteigerten Immunantwort. Diese wird vor allem in der Aktivierung des *dipteracin*-Promotors deutlich, da hier eine Steigerung auf das 40-fache der Kontrolle vorliegt. Dieser verstärkende Effekt der ersten Konfrontation mit dem Bakterium fällt etwas schwächer aus, betrachtet man die Aktivierung des *drosomycin*-Promotors. Diese liegt nun 15-fach über dem Kontrollniveau.

3.2.3 Einfluss von Der p 1 auf die Immunantwort des Fettkörpers der Taufliege *Drosophila melanogaster*

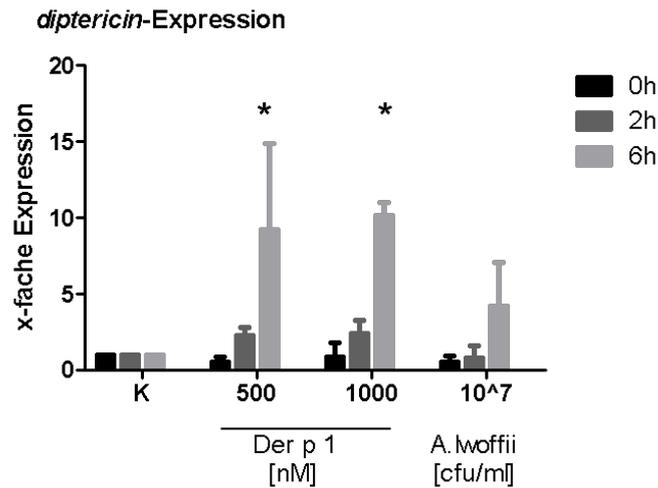
Da Zellkulturen immer ein artifizielles System darstellen, sollen die zuvor erhobenen Daten anhand von *Ex-vivo*-Versuchen verifiziert werden. Dazu kommen isolierte Fettkörper zum Einsatz. Der Fettkörper stellt das wichtigste immunkompetente Organ der Taufliege dar. Mit diesen Experimenten soll die Frage beantwortet werden, ob durch Hämocyten sezernierte Komponenten für die Immunantwort auf Der p 1 von Bedeutung sind. Für die Durchführung dieses Experiments wurden - wie unter Abschnitt 2.2.18 erläutert - Fettkörper aus Fliegen isoliert und diese anschließend mit Medium, Der p 1 oder *A. Iwoffii* über einen Zeitraum von sechs Stunden inkubiert. Die Expression der beiden Gene *drosomycin* und *diptericin* wurde nach null, zwei und sechs Stunden über die *Real-time-PCR* ermittelt und als Vielfaches zur Kontrolle angegeben.

Der Toll-Signalweg wird in diesem Versuch lediglich mit der eingesetzten Der p 1-Konzentration von 500 nM über eine Inkubationsdauer von sechs Stunden signifikant induziert (Abbildung 3.10a). Sie liegt hier etwa dreifach über Kontrollniveau. Die Expression des *drosomycin*-Gens ist bei Verwendung von 1000 nM Der p 1 und *A. Iwoffii* über die ganze Versuchsdauer hinweg schwach ausgeprägt. Die Immunantwort des IMD-Signalweges hingegen (Abbildung 3.10b), die mittels der Expression des *diptericin*-Gens analysiert wurde, ist stärker als die des Toll-Signalweges und ist nach sechs Stunden Inkubationszeit bei Verwendung von 500 nM und 1000 nM Der p 1 signifikant. Bei Stimulation mit dem Allergen in den Konzentrationen von 500 nM und 1000 nM über diese Zeit wird das *diptericin*-Gen am stärksten exprimiert (zehnfach über Kontrollniveau). Betrachtet man die Expression dieses Gens nach Stimulation mit *A. Iwoffii* über sechs Stunden, so ist diese nicht signifikant, jedoch auch um etwa das fünffache erhöht.

Auch die *Ex-vivo*-Versuche an isolierten Fettkörpern belegen, dass das Immunsystem der Taufliege durch Der p 1 induzierbar ist. Der zeitliche Verlauf ist verzögerter als in den Versuchen mit den immunkompetenten Zellen.



(a)



(b)

Abbildung 3.10: **Immunantwort des Fettkörpers auf Der p 1.** Die Fettkörper aus je zwei Fliegen wurden mit der jeweiligen angegebenen Substanz stimuliert. Die Daten wurden per *qRT-PCR* erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (* $p < 0,05$).

3.2.4 Charakterisierung der an der Signalgebung durch Der p 1 beteiligten Signalwege

Wie in den Abschnitten 3.2.2 und 3.2.3 bereits dargestellt wurde, ist der IMD-Signalweg stärker an der Immunantwort auf Der p 1 beteiligt als der Toll-Signalweg. Dies konnte sowohl in den Versuchen mit den immunkompetenten Zellen anhand des Luciferase-Assays und der *qRT-PCR* gezeigt werden als auch in den Experimenten, in denen die isolierten Fettkörper zum Einsatz kamen. In den folgenden Experimenten wird der IMD-Signalweg daher eingehender untersucht. Es werden Fliegenlinien verwendet, die in zwei verschiedenen Molekülen dieses Signalwegs Mutationen tragen.

***rel ko*-Mutanten**

Die erste dieser beiden verwendeten Fliegenlinien trägt eine Mutation im *relish*-Gen. *Relish* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der stromabwärts (in der Signaltransduktion unterhalb des Adapterproteins) von IMD für die Signalübermittlung erforderlich ist (siehe Abbildung 1.1). In dieser Mutante wird *relish* nicht exprimiert. Es kommen erneut Fettkörper zum Einsatz, die aus diesen Mutanten isoliert und anschließend stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten Fettkörper, die in Medium inkubiert wurden. Die Ergebnisse wurden per *Real-time-PCR* ermittelt. Abbildung 3.11 stellt die Ergebnisse dieses Experiments dar.

Die mit Der p 1 stimulierten Fettkörper aus den Wildtyp-Fliegen zeigen eine Immunantwort, wie sie in vorigen Versuchen schon zu beobachten war (Abbildung 3.10). Der Toll-Signalweg wird schwach induziert. Die Immunantwort ist hier kaum stärker als zweifach über Kontrollniveau (Abbildung 3.11a). Sie ist jedoch signifikant, wenn mit 1000 nM Der p 1 über sechs Stunden stimuliert wird. Der IMD-Signalweg zeigt die stärkste Immunantwort nach sechs Stunden Inkubation mit dem Allergen. Hier ist das Expressionsniveau bezogen auf die Kontrolle signifikant, wenn mit 500 nM (dunkelgrauer Balken) beziehungsweise 1000 nM (hellgrauer Balken) Der p 1 stimuliert wurde (Abbildung 3.11b). Dabei wird das Gen 15-mal stärker exprimiert, wenn mit einer Konzentration von 500 nM Der p 1 stimuliert wurde. Bei Stimulation mit 1000 nM Der p 1 lag das Expressionsniveau 10-fach über dem Kontrollniveau. In beiden Fällen sind die Ergebnisse signifi-

kant.

Im Gegensatz dazu sind Fettkörper aus *rel ko*-Fliegen nicht in der Lage, auf eine Stimulation mit dem Allergen oder dem Bakterium mit einer Immunantwort zu reagieren. Die Ergebnisse, die mit den Fettkörpern aus diesen Fliegen erzielt wurden, sind mit schraffierten Balken dargestellt. Die Immunantwort des Toll-Signalweges in den *rel ko*-Fliegen liegt für alle verwendeten Stimuli auf Kontrollniveau (Abbildung 3.11a). Wildtyp-Fliegen zeigen in diesem Versuch eine schwache Induktion des Toll-Signalwegs, die kaum zweifach über der Kontrolle liegt. Eine Ausnahme bilden hier die Ergebnisse, die mit 1000 nM Der p 1 nach zwei Stunden Inkubation ermittelt wurden. Hier liegt die Expression des *drosomycin*-Gens dreifach über der Kontrolle.

Bei einem Vergleich der beiden untersuchten Signalwege, lässt sich ein Unterschied zwischen den *rel ko*- und Wildtyp-Fliegen verzeichnen. Während sich bezogen auf den Toll-Signalweg die Immunantworten beider Fliegen ähneln, ist ein deutlicher Unterschied zu verzeichnen betrachtet man die Resultate für den IMD-Signalweg. Dessen Induktion wird über die *diptericin*-Expression analysiert und liegt in den *rel ko*-Fliegen auch nach sechs Stunden Inkubation auf Kontrollniveau (schraffierte Balken). Insofern sind die *rel ko* Fliegen im Gegensatz zu den Wildtyp-Fliegen nicht in der Lage auf Der p 1 mit einer Immunantwort zu reagieren.

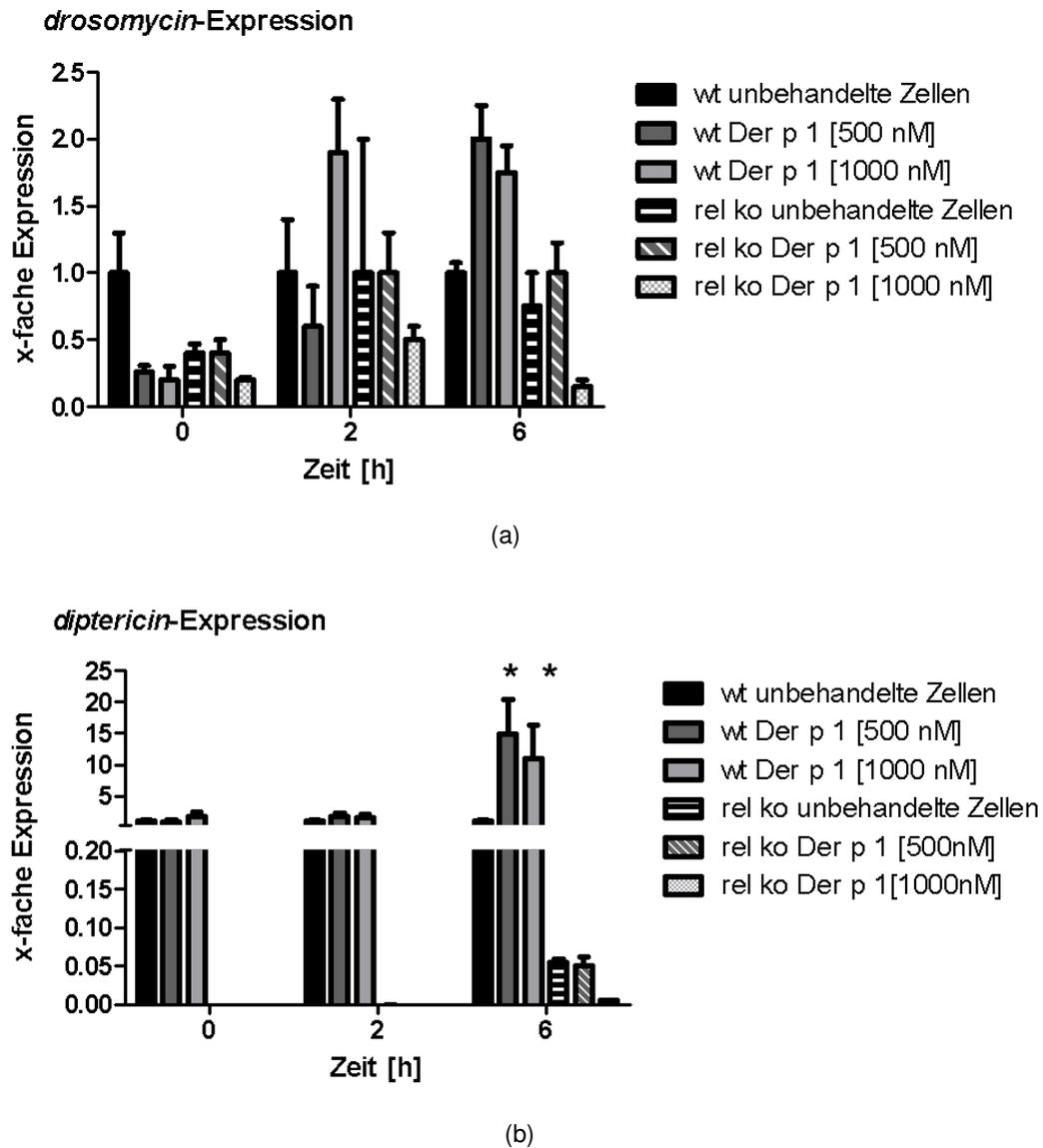


Abbildung 3.11: **Fettkörper aus *rel ko*-Fliegen zeigen keine Immunantwort auf Der p 1.** Im Gegensatz zu dem verwendeten Wildtyp-Fliegenstamm, zeigen die Fliegen mit der Mutation im *relish*-Gen keine Immunantwort auf Der p 1. Fettkörper zweier Fliegen wurden mit den jeweiligen Substanzen stimuliert. Angegeben sind die Resultate der *qRT-PCR* aus drei unabhängigen Versuchen (Mittelwerte \pm S.E.M. ; * $p < 0,05$)

PGRP-LC-Mutanten

Da der Transkriptionsfaktor *relish* im IMD-Signalweg stromabwärts des Rezeptors PGRP-LC liegt, ist eine Mutation in diesem Gen nur bedingt für eine weitere Untersuchung der Signalwege geeignet, da noch weitere „Überschneidungen“ zu anderen Signalwegen stromaufwärts von *relish* vorhanden sein könnten.

Aus diesem Grund wurden Experimente mit einer Fliegenlinie durchgeführt, welche keine Expression von PGRP-LC aufweisen. Die Fettkörper dieser Fliegen kamen dann wiederum in *Ex-vivo*-Experimenten zum Einsatz und wurden sechs Stunden mit Der p 1 und *A. Iwoffii* stimuliert. Die dargestellten Daten wurden erneut unter Verwendung der *qRT-PCR* ermittelt (Abbildung 3.12).

Abbildung 3.12a stellt die für den Toll-Signalweg ermittelten Daten dar. Die Fettkörper aus den Wildtyp-Fliegen zeigen keine signifikante Immunantwort nach Stimulation mit dem Allergen (dunkelgrauer und hellgrauer Balken) oder mit *A. Iwoffii* (weißer Balken). Die Expression des *drosomycin*-Gens liegt hier jeweils zweifach über dem Kontrollniveau.

Die PGRP-LC-Mutanten zeigen jedoch bezogen auf die Kontrolle einen signifikanten Anstieg der *drosomycin*-Expression bei Stimulation mit 500 nM Der p 1 (etwa dreieinhalbfach, dunkelgrauer Balken). Der IMD-Signalweg wird hingegen in den Fettkörpern aus Wildtyp-Fliegen sowohl bei Stimulation mit dem Allergen in beiden Konzentrationen als auch bei Stimulation mit dem Bakterium signifikant induziert (Abbildung 3.12b). Das *diptericin*-Gen wird 15-mal stärker induziert bei Verwendung von 500 nM Der p 1, 12-mal stärker bei 1000 nM Der p 1 und 7-mal stärker als die Kontrolle bei Verwendung des Bakteriums. In den mutierten Fliegen kann keine signifikante Expression dieses Gens beobachtet werden. Die Expressionslevel liegen alle auf Kontrollniveau. Diese Experimente zeigen einen Zusammenhang zwischen Der p 1 und dem Rezeptor PGRP-LC, der dadurch deutlich wird, dass die *knock-out*-Fliegen nicht in der Lage sind auf das Allergen zu reagieren.

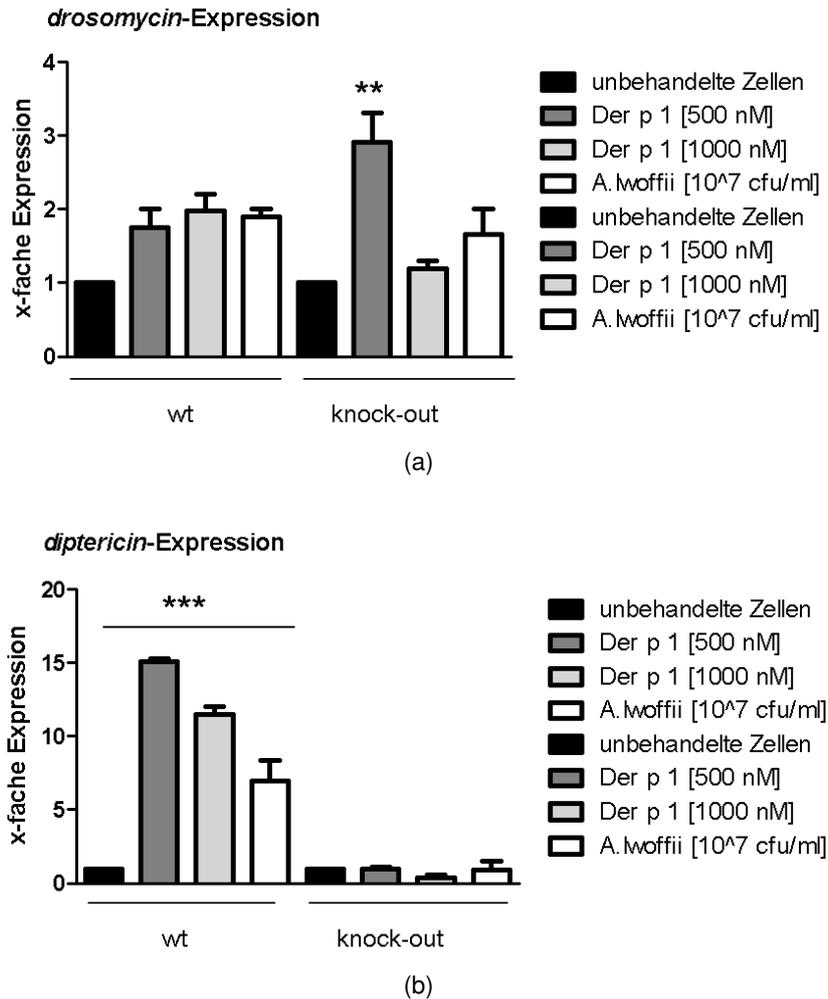


Abbildung 3.12: Fliegen, die im Fettkörper den Rezeptor PGRP-LC nicht exprimieren, reagieren nicht auf Der p 1. Die Fettkörper zweier Fliegen wurden mit den jeweiligen Substanzen stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte der quantitativen *Real-time-PCR* aus biologischen Triplikaten \pm S.E.M (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.2.5 Die Immunantwort wird durch die proteolytische Aktivität ausgelöst

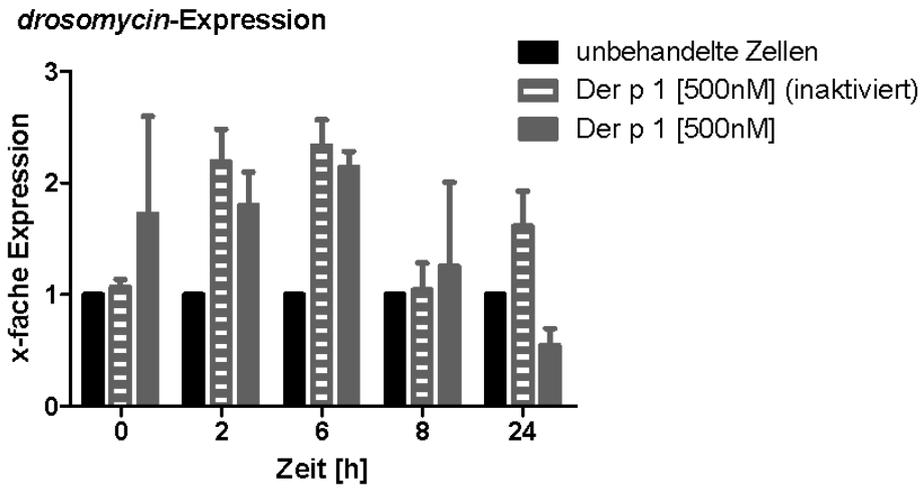
Der p 1 ist eine Cysteinprotease. In Abschnitt 3.2.1 wurde die verwendete rekombinante Charge auf mikrobielle Kontaminationen getestet, um auszuschließen,

dass diese eine Aktivierung des Immunsystems der Taufliege hervorrufen. Es ist nun zu klären, ob die proteolytische Aktivität des Allergens ausschlaggebend ist für die Auslösung der Immunantwort in *Drosophila*. Hierzu wurden wiederum isolierte Fettkörper verwendet und mit inaktiviertem Allergen stimuliert. Die Inaktivierung erfolgte über die vorhergehende Inkubation des Allergens mit dem für Cysteinproteasen spezifischen Inhibitor E64. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente, wobei die schwarzen Balken jeweils die Kontrollen darstellen, die grau-schraffierten die Stimulation mit dem inaktiven Der p 1, und die grauen Balken geben die Ergebnisse mit dem aktiven Der p 1 wieder.

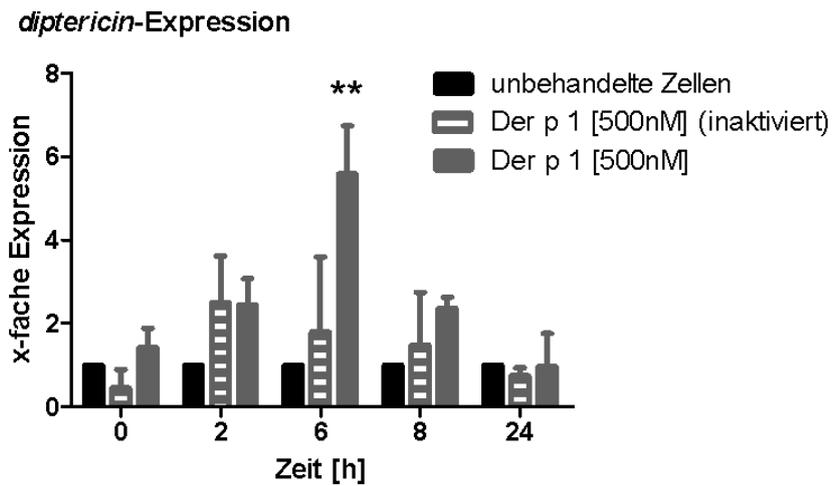
Mit dem Cysteinprotease-Inhibitor inaktiviertes Der p 1 ist nicht in der Lage in isolierten Fettkörpern eine Immunantwort auszulösen. In Abbildung 3.13a sind die Ergebnisse für den Toll-Signalweg dargestellt. Es lässt sich hier weder durch aktives noch durch inaktives Allergen (je 500 nM) ein signifikanter Anstieg des *drosomycin*-Expressionsniveaus feststellen. Dieser bleibt über sechs Stunden Inkubationsdauer etwa zweifach über dem Kontrollniveau und nimmt bei längeren Inkubationszeiten (18 und 24 Stunden) ab.

Im Gegensatz dazu zeigen die Resultate, die für den IMD-Signalweg ermittelt wurden (Abbildung 3.13b), nach sechsständiger Inkubation mit aktivem Der p 1 einen signifikanten Anstieg des *diptericin*-Expressionsniveaus, der auch in anderen Versuchen schon zu beobachten war (Abbildung 3.10 und 3.11). Bei einer Inkubation mit inaktivem Der p 1 konnte solch ein signifikanter Anstieg nicht beobachtet werden.

Es lässt sich feststellen, dass die Aktivierung des Immunsystems hauptsächlich auf der proteolytischen Aktivität des Der p 1 beruht, denn das inaktive Allergen ist nicht in der Lage eine signifikante Immunantwort auszulösen.



(a)



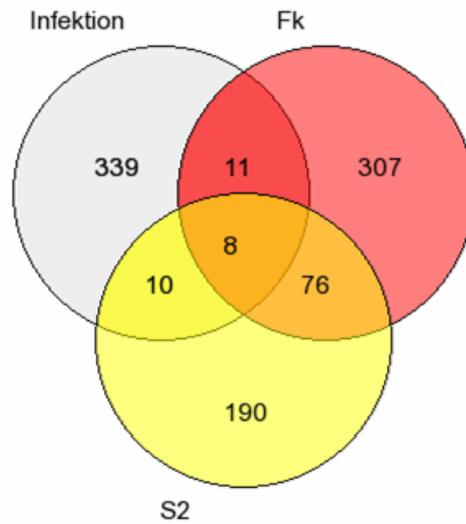
(b)

Abbildung 3.13: **Inaktives Der p 1 löst in isolierten Fettkörpern keine Immunantwort aus.** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. der *Real-time-PCR* aus zwei biologischen Replikaten (** $p < 0,01$).

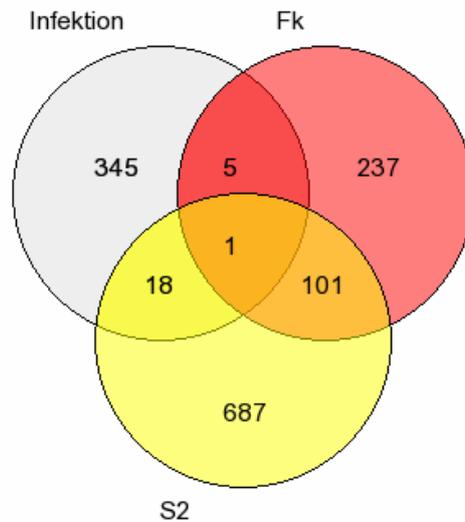
3.3 Vergleich der Transkriptome allergen-stimulierter S2-Zellen und Fettkörper

Im Unterschied zu dem System der Zellkultur, ähneln die Bedingungen in isolierten Fettkörpern stärker den realen Bedingungen in der Fliege. Nach Stimulation mit Der p 1 wird, wie in den Abschnitten 3.2.2 bis 3.2.4 deutlich wurde, vor allem der IMD-Signalweg stark reguliert, nicht so sehr der Toll-Signalweg. Dies konnte sowohl in immunkompetenten Zellen als auch in isolierten Fettkörpern gezeigt werden.

In diesem Abschnitt sollen vor allem Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Transkriptome beider Systeme herausgestellt werden, die sich nicht mit den zuvor verwendeten Assays analysieren ließen. Um hier einen Einblick zu erhalten, wurden Mikroarrays - wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben - durchgeführt. Es wurden alle Gene in die Auswertung einbezogen, die signifikant reguliert wurden. Dieses Kriterium traf für Gene zu, die bezogen auf die Kontrolle, mindestens ein- einhalbfach stärker oder vermindert exprimiert wurden. Als Kontrolle fungierten in Experimenten mit den S2-Zellen unbehandelte Zellen und in Experimenten mit isolierten Fettkörpern in Medium inkubierte Fettkörper. Da es in der Reaktion auf das Allergen sowohl in den S2-Zellen als auch in den Fettkörpern zu einer Immunantwort kommt, die vergleichbar ist mit der auf Gram-negative Bakterien (Abbildung 3.9 und 3.10), werden für die Transkriptomanalyse Gene herangezogen, die mit einer bakteriellen Infektion verknüpft sind. Es werden anhand dieser Daten und den Daten der durchgeführten Mikroarrays Venn-Diagramme erstellt. Venn-Diagramme eignen sich, um Schnittmengen darzustellen. In diesem Fall sind diese Schnittmengen Gene, die unter den drei untersuchten Bedingungen (Infektion, Allergen-stimulierte S2-Zellen, Allergen-stimulierte Fettkörper) reguliert werden oder nur in jeweils zwei der Fälle.



(a)



(b)

Abbildung 3.14: Venn-Diagramm erstellt anhand der Genlisten der bei Infektion regulierten Gene sowie der nach Allergestimulation in S2-Zellen und in isolierten Fettkörpern verstärkt (a) und vermindert (b) exprimierten Gene. Die Schnittmenge der drei Kreise, gibt die Gene an, welche bei einer Infektion und in stimulierten S2-Zellen und Fettkörpern reguliert sind. Weiterhin angegeben sind gemeinsam regulierte Gene in S2-Zellen und den Fettkörpern sowie bei einer Infektion im Vergleich zu S2-Zellen und Fettkörpern.

Die Abbildung 3.14 stellt zwei Venn-Diagramme dar, wobei in Abbildung 3.14a diejenigen Gene, welche bei einer Infektion, der Allergenkonfrontation der S2-Zellen sowie des Fettkörpers verstärkt exprimiert werden, berücksichtigt werden. Abbildung 3.14b basiert hingegen auf den vermindert exprimierten Genen. Bei einer Konfrontation mit dem Allergen werden in den S2-Zellen sowie im Fettkörper acht Gene verstärkt exprimiert, die auch im Falle einer Infektion reguliert werden (Abbildung 3.15). Es handelt sich hierbei vor allem um Gene, die an der Abwehr von Bakterien beteiligt sind. Es sind die folgenden: *diphtericin*, *attacin A*, *cecropin A2* und *metchnikowin*. In den S2-Zellen sind diese Gene etwas stärker exprimiert, als im Fettkörper.

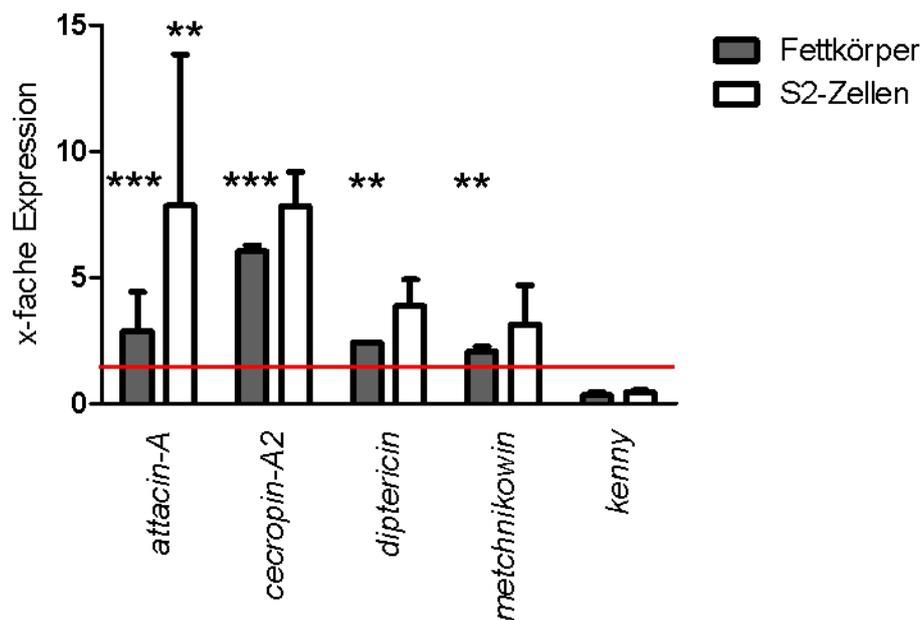


Abbildung 3.15: Infektionsrelevante Gene, die nach Allergenstimulation sowohl im Fettkörper als auch in den S2-Zellen exprimiert werden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) der Daten mindestens zweier Arrays.

Bezogen auf das *diphtericin* decken sich die Ergebnisse mit denen, die auch in den *Real-Time-PCR*-Experimenten ermittelt werden konnten (Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3). Wie bei *diphtericin*, wird auch die Expression von *attacin A* und *cecropin A2* über den IMD-Signalweg vermittelt [60], während die Expression von *metchnikowin* sowohl durch den IMD- als auch den Toll-Signalweg induziert werden kann [61]. Im Gegensatz dazu wird nur ein infektionsrelevantes Gen im Fettkörper und in den S2-Zellen nach Stimulation mit Der p 1 vermindert exprimiert (Abbildung 3.14b). Dieses Gen ist *kenny*, das IKK γ -Homolog in *Drosophila*, welches die Translokation von Relish in den Zellkern steuert [62].

Einige der Gene, welche zwar Infektionsrelevanz besitzen, jedoch nur im Fettkörper oder nur in den S2-Zellen verstärkt exprimiert werden, sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Es werden in beiden Fällen Gene verstärkt exprimiert, die für antimikrobielle Peptide kodieren, aber auch solche Gene, welche bei Stressantworten reguliert werden - wie zum Beispiel das Gen *turandot M*, welches über den JAK/STAT-Signalweg reguliert wird. Im Fettkörper werden ebenfalls die Gene *pelle* und *dorsal*, die in der Signaltransduktion des Toll-Signalweges eine Rolle spielen, verstärkt exprimiert. In den S2-Zellen hingegen nicht. Betrachtet man die Gene, welche in den S2-Zellen exprimiert werden, so fällt hier das Gen *scavenger receptor C* auf. Dieses Gen kodiert für einen Phagozytoserezeptor, der bei Stimulation mit einem Gram-negativen Bakterium reguliert wird. Dies belegt erneut, dass die durch das Allergen ausgelöste Immunantwort vergleichbar ist mit einer durch Gram-negative Bakterien ausgelösten Immunantwort.

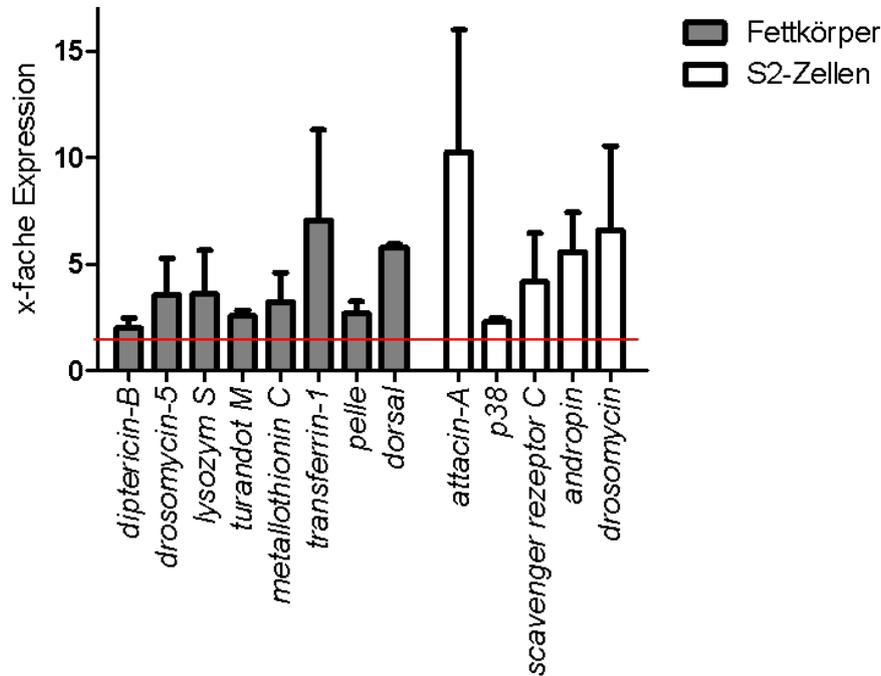


Abbildung 3.16: Infektionsrelevante Gene, die ausschließlich im Fettkörper oder in den S2-Zellen verstärkt exprimiert werden. Es sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus Daten mindestens zweier Arrays dargestellt.

Auf der Seite der vermindert exprimierten Gene findet sich eine gleich große Zahl von infektionsrelevanten Genen. In den stimulierten S2-Zellen werden jedoch etwa dreimal so viel Gene nach Allergenkonfrontation vermindert exprimiert, wie im Fettkörper. Unter den im Fettkörper vermindert exprimierten Genen, finden sich vier, die nicht benannt sind (CG10345, CG13641, CG16772 und CG30062). Bei dem hier dargestellten fünften Gen handelt es sich um das *skpA*, welches eine Rolle in der Regulation der *dipteracin*-Expression spielt [63].

Unter den Genen, die in den S2-Zellen vermindert exprimiert werden, befindet sich auch das Gen für das Gram-negative-bindende Protein 2 (GNBP2), welches bezogen auf die Kontrolle etwa sechsmal vermindert exprimiert wird, sowie das Gen *serrate*. Letzteres kodiert für ein Protein, welches als Ligand für den Notch-Rezeptor fungiert [64].

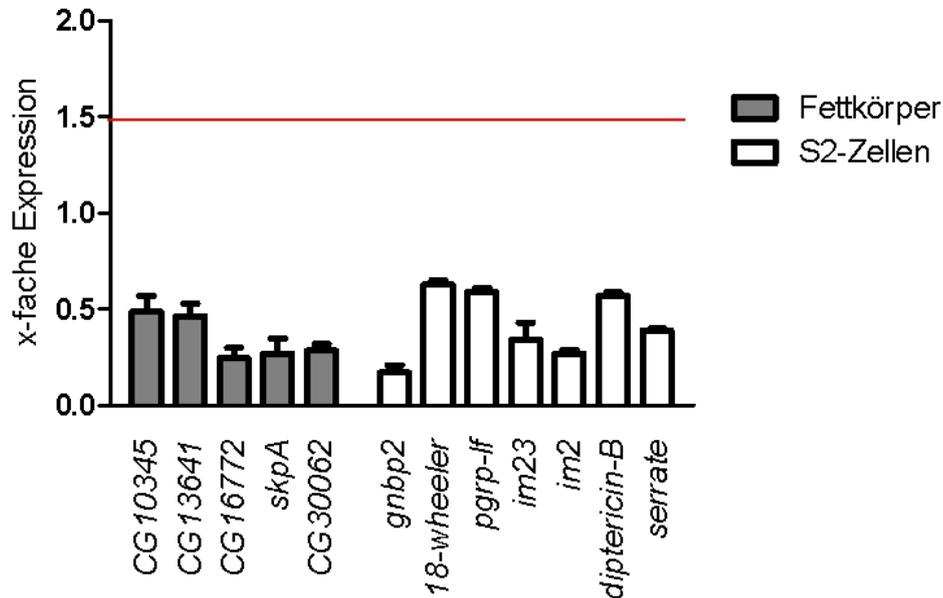


Abbildung 3.17: **Vermindert exprimierte, infektionsrelevante Gene im Fettkörper und in den S2-Zellen.** Es sind die Resultate aus mindestens zwei Arrays (Mittelwerte \pm S.E.M.) dargestellt.

Unter den 76 Genen die durch die Allergenkonfrontation sowohl im Fettkörper als auch in den S2-Zellen verstärkt exprimiert werden, jedoch nicht Infektionsrelevant sind (Abbildung 3.14a), sind Gene vertreten, die als Antwort auf einen Autophagie-vermittelten Zelltod reguliert werden. Darunter befindet sich beispielsweise das Gen *broad*. Diese Gene sind alle nicht signifikant reguliert.

Unter den 101 Genen, die vermindert exprimiert werden, fallen die G-Proteingekoppelten Rezeptoren als Gruppe auf. Unter diesen sind neben Geruchsrezeptoren auch Geschmacksrezeptoren zu finden. Die zu dieser Gruppe gehörenden Gene des Fettkörpers werden zumeist signifikant reguliert, während dies für Gene der S2-Zellen nicht zutrifft.

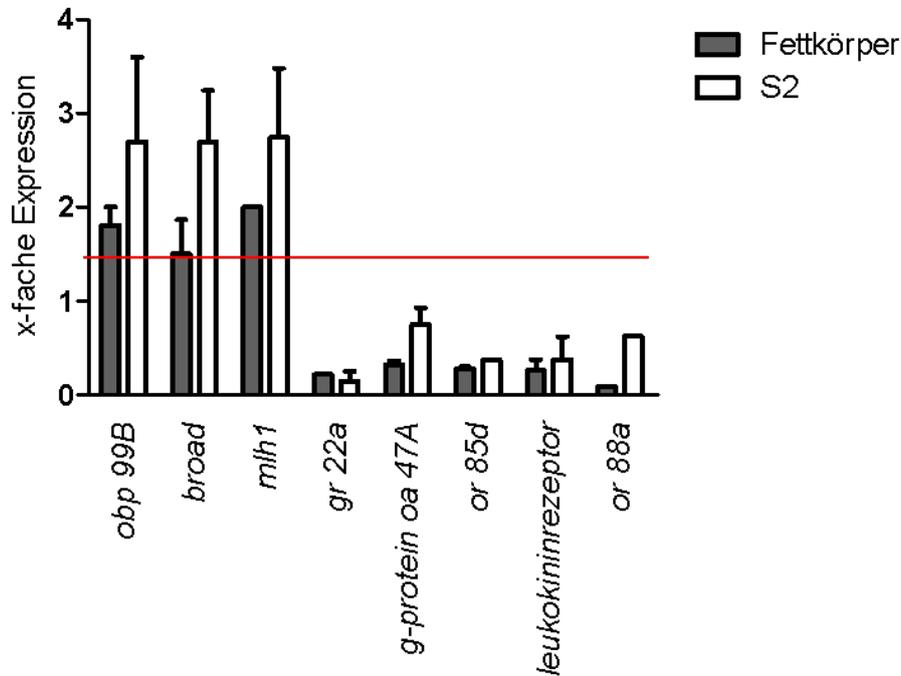


Abbildung 3.18: Nicht-infektionsrelevante, verstärkt und vermindert exprimierte Gene im Fettkörper und in den S2-Zellen. Aus mindestens zwei Arrays sind jeweils die Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. *odorant binding protein* (obp); *gustatory receptor* (gr); *odorant receptor* (or)

Während unter den 190 Genen, die nicht-infektionsrelevant sind und in den S2-Zellen verstärkt exprimiert wurden, keine Gruppe besonders hervorstach, waren im Fettkörper nach Allergenkonfrontation vor allem Gene verstärkt exprimiert, die ebenfalls bei einer Antwort auf einen abiotischen Stimulus, in diesem Fall, einem Temperaturstimulus, stärker exprimiert wurden. Unter diesen ist auch *arrestin-2* zu finden, welches an der Regulation der G-Protein-gekoppelten-Signalwege beteiligt ist [65]. Ebenfalls von Interesse ist das Gen *calcineurin*. Dieses Gen gehört nicht zur Gruppe derer, die durch einen abiotischen Stimulus induziert werden, ist aber ebenso verstärkt exprimiert. Calcineurin ist ein Enzym, welches die Induktion der angeborenen Immunabwehr fördert [66].

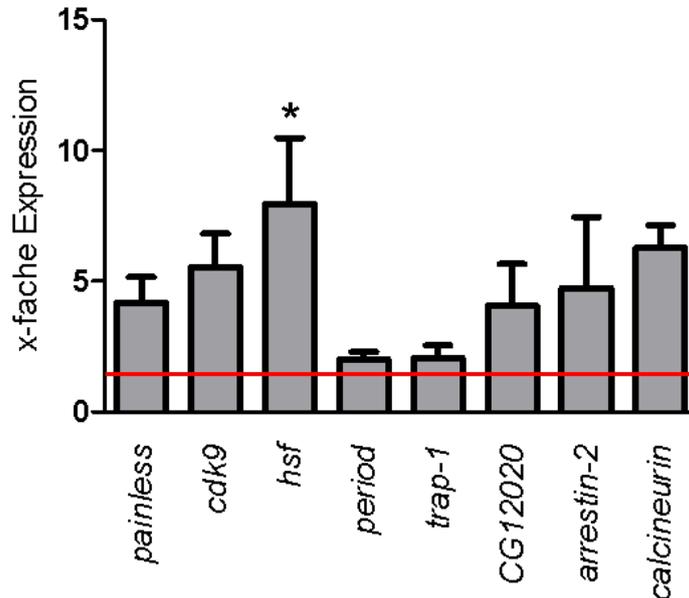


Abbildung 3.19: Gene, die nach Allergenstimulation ausschließlich im Fettkörper verstärkt exprimiert wurden und mit einer Antwort auf einen abiotischen Stimulus assoziiert sind. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$) mindestens zweier Arrays. *cyclin-dependent kinase9* (cdk9); *heat shock factor* (hsf)

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gelegt, deren Gene nach Allergenstimulation im Fettkörper und in den S2-Zellen vermindert exprimiert wurden. Diese Gene sind unter den 237 Genen des Fettkörpers beziehungsweise 687 Genen der S2-Zellen zu finden, welche nicht-infektionsrelevant sind. Im Fettkörper sind dies hauptsächlich Gene gustatorische Rezeptoren, in den S2-Zellen sind es Bombesinrezeptoren. Hierbei fällt auf, dass alle diese Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kodieren.

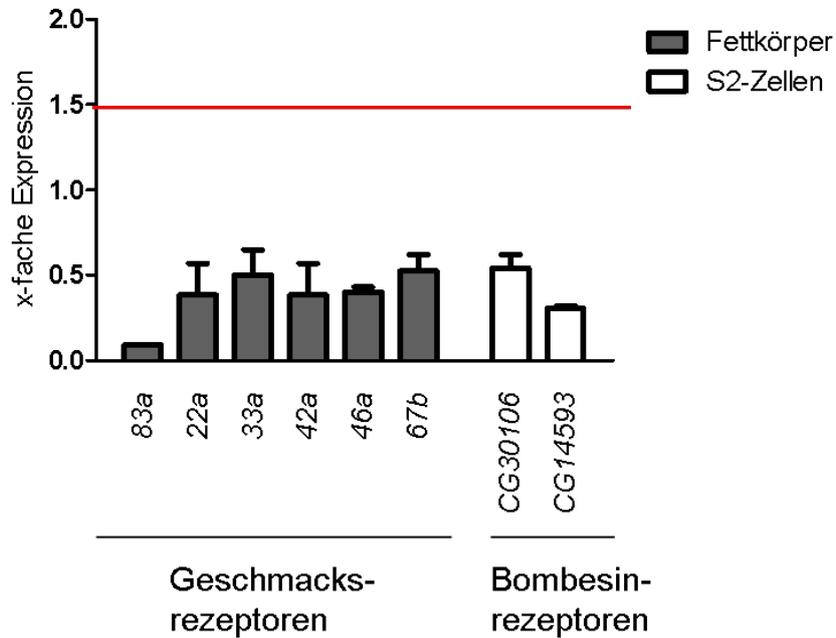


Abbildung 3.20: **Vermindert exprimierte, nicht-infektionsrelevante Gene des Fettkörpers und der S2-Zellen.** Daten aus mindestens zwei Arrays wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. angegeben.

Durch die Mikroarray-Analysen konnte festgestellt werden, dass zum einen in den S2-Zellen durch die Allergenkonfontation mehr Gene vermindert exprimiert werden (687 Gene) als verstärkt (190 Gene). Im Falle der Fettkörper ist kein solch großer Unterschied zu verzeichnen. Es werden 307 Gene verstärkt und 237 Gene vermindert exprimiert. Auffällig ist, dass sowohl im Fettkörper als auch in den S2-Zellen Gene für IMD-vermittelte antimikrobielle Peptide verstärkt exprimiert werden, während vor allem Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermindert exprimiert werden. Somit konnten die zuvor durch den Luciferase-Assay und die *Real-Time-PCR* ermittelten Ergebnisse verifiziert werden. Außerdem ergaben sich in Bezug auf die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren neue Aspekte.

3.4 Einfluss des Gram-positiven Bakteriums *Lactococcus lactis* auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Im humanen System wurden Studien durchgeführt, deren Daten bestimmten Bakterien immunmodulatorische Wirkung zuwiesen, darunter auch das Gram-positive Bakterium *Lactococcus lactis*. Dieses Bakterium ist in der Lage, die Balance der T_H1/T_H2 -Zellen in Richtung T_H1 -Zellen zu verschieben. Diese Verschiebung wirkt sich protektiv auf die Entwicklung von Allergien aus [7]. Wie in Abschnitt 3.2 gezeigt werden konnte, löst das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 in *Drosophila* eine Immunantwort aus, in der vor allem der IMD-Signalweg induziert wird. In diesem System kann sich eine immunmodulatorische Wirkung eines Bakteriums nicht über eine Verschiebung des Gleichgewichts der T_{Helfer} -Zellen bemerkbar machen, da *Drosophila* kein adaptives Immunsystem besitzt. In den folgenden Experimenten sollte daher herausgefunden werden, ob *Lactococcus lactis* das angeborene Immunsystem ebenfalls beeinflusst.

3.4.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems auf *Lactococcus lactis*

In diesem Abschnitt werden zunächst Experimente beschrieben, die die Frage beantworten sollen, ob *L. lactis* in *Drosophila* eine Immunantwort induziert. Zu diesem Zweck wurden immunkompetente Zellen der Taufliege mit verschiedenen Bakterien in den Konzentrationen von 1×10^5 cfu/ml (ausgefüllte Balken) und 1×10^7 cfu/ml (schraffierte Balken) stimuliert (Abbildung 3.21). Anschließend wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Der Übersicht halber wurde jedes der verwendeten Bakterien in einer anderen Farbe dargestellt.

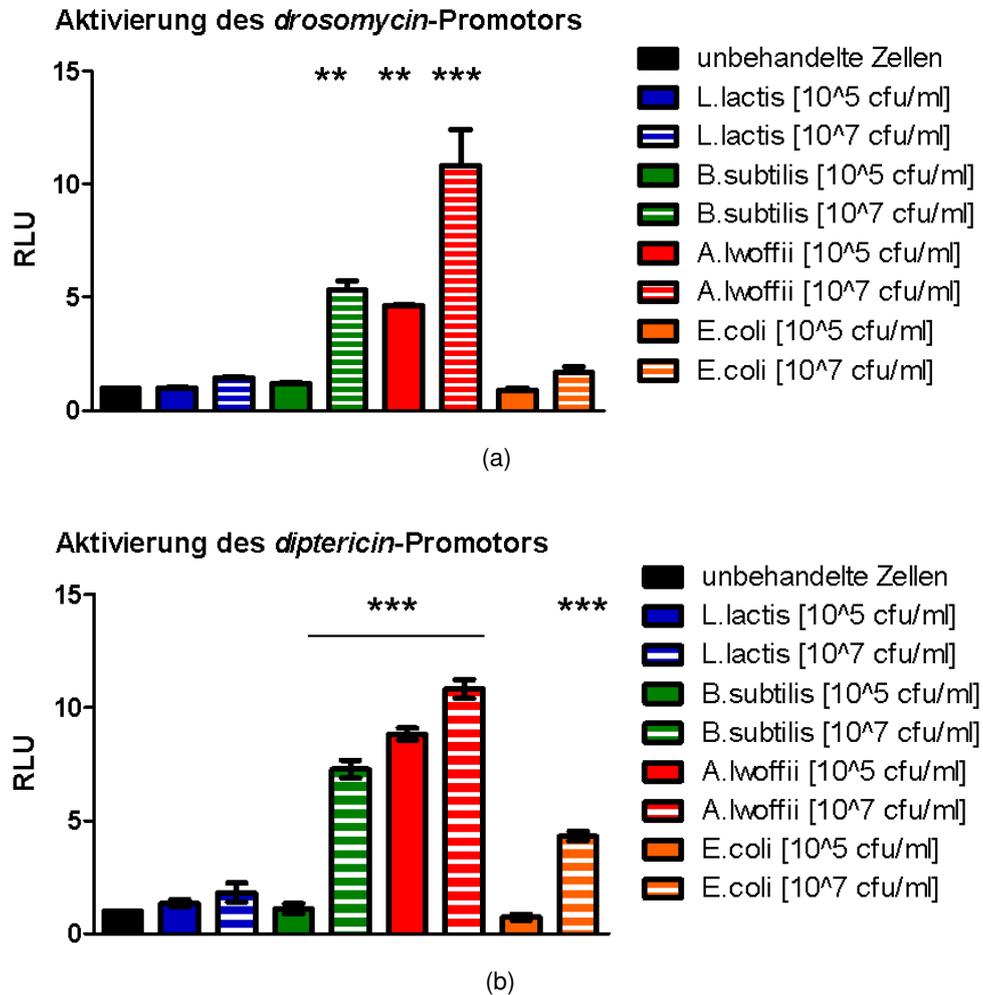


Abbildung 3.21: *Lactococcus lactis* induziert keine Immunantwort. Die Promotoraktivierung wurde mittels des Luciferase-Assays bestimmt und als x-fache Induktion zur Kontrolle angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

In Abbildung 3.21a sind die Ergebnisse für den Toll-Signalweg anhand der Aktivierung des *drosomycin*-Promotors dargestellt. Eine Stimulation der Zellen mit *L. lactis* und *E. coli* führte mit den beiden verwendeten Konzentrationen nicht zu einer Induktion dieses Signalweges. Wurden die Zellen hingegen mit *B. subtilis* in der Konzentration von 1×10^7 cfu/ml und *A. lwoffii* mit beiden verwendeten Konzentrationen stimuliert, konnte eine signifikante Promotoraktivierung

verzeichnet werden. Diese lag bei *B. subtilis* [1×10^7 cfu/ml] und *A. lwoffii* [1×10^5 cfu/ml] siebenfach über Kontrollniveau. Wurde *A. lwoffii* in der höheren Konzentration eingesetzt, wurde der *drosomycin*-Promotor 12-fach stärker aktiviert als das Kontrollniveau.

Für die Induktion des IMD-Signalweges, gemessen über die Aktivierung des *diptericin*-Promotors, ergab sich ein ähnliches Bild (Abbildung 3.21b). *L. lactis* konnte diesen Signalweg im Gegensatz zu den anderen verwendeten Bakterien nicht induzieren. *B. subtilis* und *E. coli* waren dazu in der Lage, wurden die Zellen in den Konzentrationen von jeweils 1×10^7 cfu/ml konfrontiert. Die Aktivierung des *diptericin*-Promotors war jeweils signifikant. Sie lag bei Stimulation mit *B. subtilis* achtfach über der Kontrolle, mit *E. coli* fünffach. *A. lwoffii* war ebenfalls in der Lage, den IMD-Signalweg signifikant zu induzieren. Die Aktivierung des Promotors war mit der geringeren eingesetzten Konzentration neunfach höher als das Kontrollniveau, und mit der höheren Konzentration ergab sich eine 12-fach stärkere Promotoraktivierung bezogen auf die Kontrolle.

Somit konnte mit diesem Versuch festgestellt werden, dass *L. lactis* weder den Toll- noch den IMD-Signalweg induzieren kann.

3.4.2 Immunsupprimierender Effekt von *L. lactis* auf das angeborene Immunsystem

Da *Lactococcus lactis* selbst keine Immunantwort induzieren kann, soll im Folgenden untersucht werden, ob dieses Bakterium anderweitigen Einfluss auf eine Immunantwort besitzt. Hier stellte sich zunächst die Frage, ob das Bakterium immunsupprimierende Wirkung hat.

Für dieses Experiment wurden immunkompetente Zellen eingesetzt, die direkt mit den jeweiligen Bakterien stimuliert oder aber 24 Stunden vor der Stimulation mit *Lactococcus lactis* präinkubiert wurden. In diesem Versuch ging es darum, herauszufinden, ob *L. lactis* einen Einfluss auf die Immunantwort hat, der mit dem verwendeten Assay nicht analysiert werden kann, sich aber eventuell in einer nachgeschalteten Stimulation bemerkbar macht.

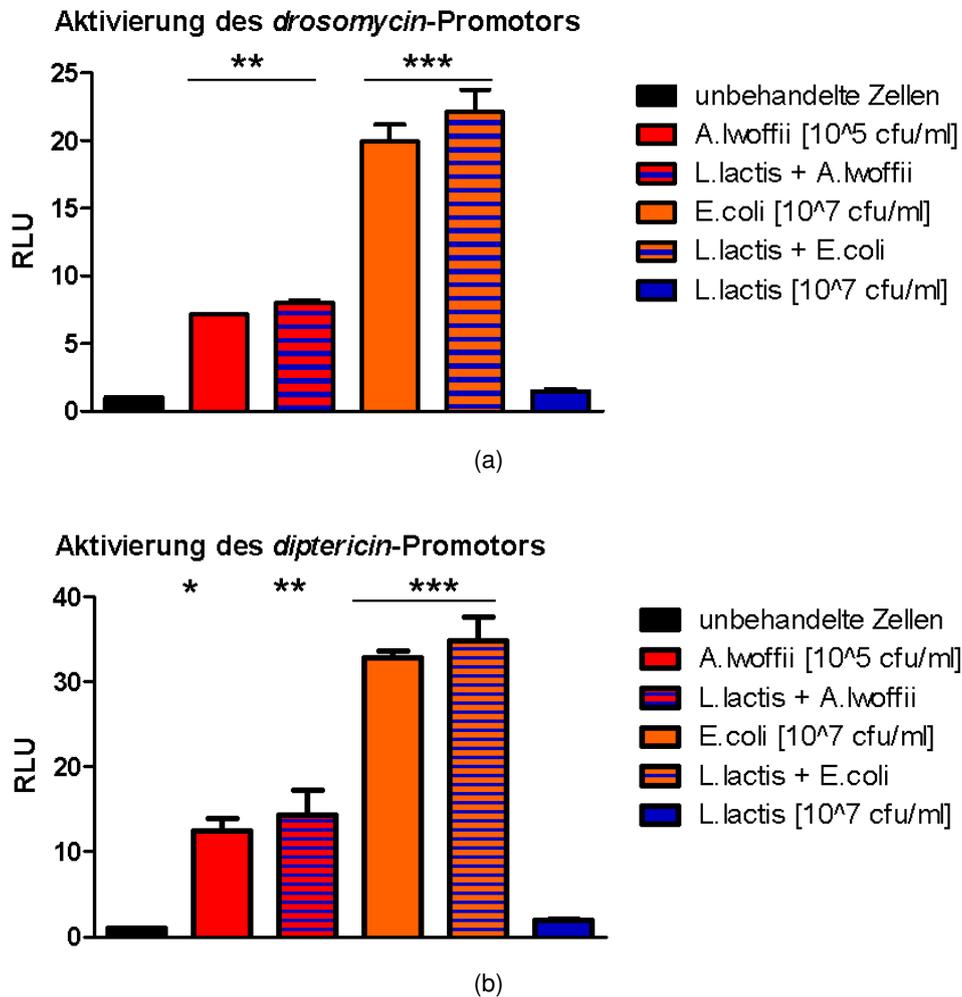


Abbildung 3.22: *Lactococcus lactis* beeinflusst auch die Immunantwort nicht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Luciferase-Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die verwendeten Zellen wurden jeweils mit *A. lwoffii* (rot), *E. coli* (orange) und *L. lactis* (blau) allein stimuliert, oder es kamen Kombinationen der beiden Gram-negativen Bakterien mit *L. lactis* zum Einsatz. In diesem Fall wurden die Zellen dann mit *L. lactis* präinkubiert. Die einfarbigen Balken geben in Abbildung 3.22 die Stimulierung der Zellen mit den jeweiligen Bakterien ohne Präinkubation mit *L. lactis* an. Die schraffierten Balken stellen die Ergebnisse der Stimulierung mit

Präinkubation dar.

Die Promotoren beider Gene (*drosomycin* und *diptericin*) werden durch *A. lwoffii* und *E. coli* signifikant aktiviert. Die Aktivierung ist im Falle des *drosomycins* etwas schwächer (für *A. lwoffii* achtfach (** $p < 0,01$) über Kontrollniveau, für *E. coli* 20-fach (***) $p < 0,001$), als im Falle des *diptericin*-Gens, bei dem der Promotor durch *A. lwoffii* 12-mal stärker als die Kontrolle (* $p < 0,05$) aktiviert und durch *E. coli* 32-mal stärker (***) $p < 0,001$) aktiviert wird. Ein Effekt der Präinkubation macht sich in beiden Signalwegen bei der Stimulierung mit *E. coli* nicht bemerkbar. Die Vorbehandlung wirkt sich auch bei der Stimulation mit *A. lwoffii* nicht auf die Promotoraktivierung des *drosomycin*-Gens aus (Abbildung 3.22a). Aus den durch Abbildung 3.22b dargestellten Experimenten geht hervor, dass es nach Präinkubation mit *L. lactis* zu einer leicht stärkeren Promotoraktivierung des *diptericin*-Gens kommt (15-fach gegenüber der Kontrolle; ** $p < 0,01$), wenn mit *A. lwoffii* stimuliert wird. Eine Präinkubation mit *L. lactis* wirkt sich schwach auf nachgeschaltete Stimulationen aus. Ein immunsupprimierender Effekt konnte nicht festgestellt werden.

3.4.3 “Allergieprotektiver” Effekt von *L. lactis*

Im humanen System konnte ein allergieprotektiver Effekt von *L. lactis* nachgewiesen werden [7]. Da *Drosophila* ebenfalls in der Lage ist, auf Allergene mit einer Immunantwort zu reagieren (Abschnitt 3.2), sollte geklärt werden, ob sich durch Präinkubation der immunkompetenten Zellen mit *Lactococcus lactis* ebenfalls ein allergieprotektiver Effekt nachstellen lässt (dokumentiert in Abbildung 3.23). Hierbei wurde ein weiteres Mal der Luciferase-Assay durchgeführt. Zellen, welche mit Medium allein stimuliert wurden, dienten als Kontrolle (schwarze Balken). Die grauen Balken geben die Ergebnisse an, welche bei Stimulation mit dem Allergen allein erzielt wurden, wobei dunkelgrau für 10 nM Der p 1 steht und hellgrau für 100 nM Der p 1. Die beiden darauf folgenden blauen Balken stellen die Experimente dar, in denen mit *L. lactis* präinkubiert wurde und anschließend eine Stimulation mit Der p 1 folgte. Hierbei zeigt der blaue Balken die Stimulation mit 10 nM Der p 1 dar, der hellblaue die Stimulation mit 100 nM Der p 1. In dunkelblau und blau-schraffiert sind die Ergebnisse dargestellt, die mit *L. lactis* in

aufsteigender Konzentration erzielt wurden.

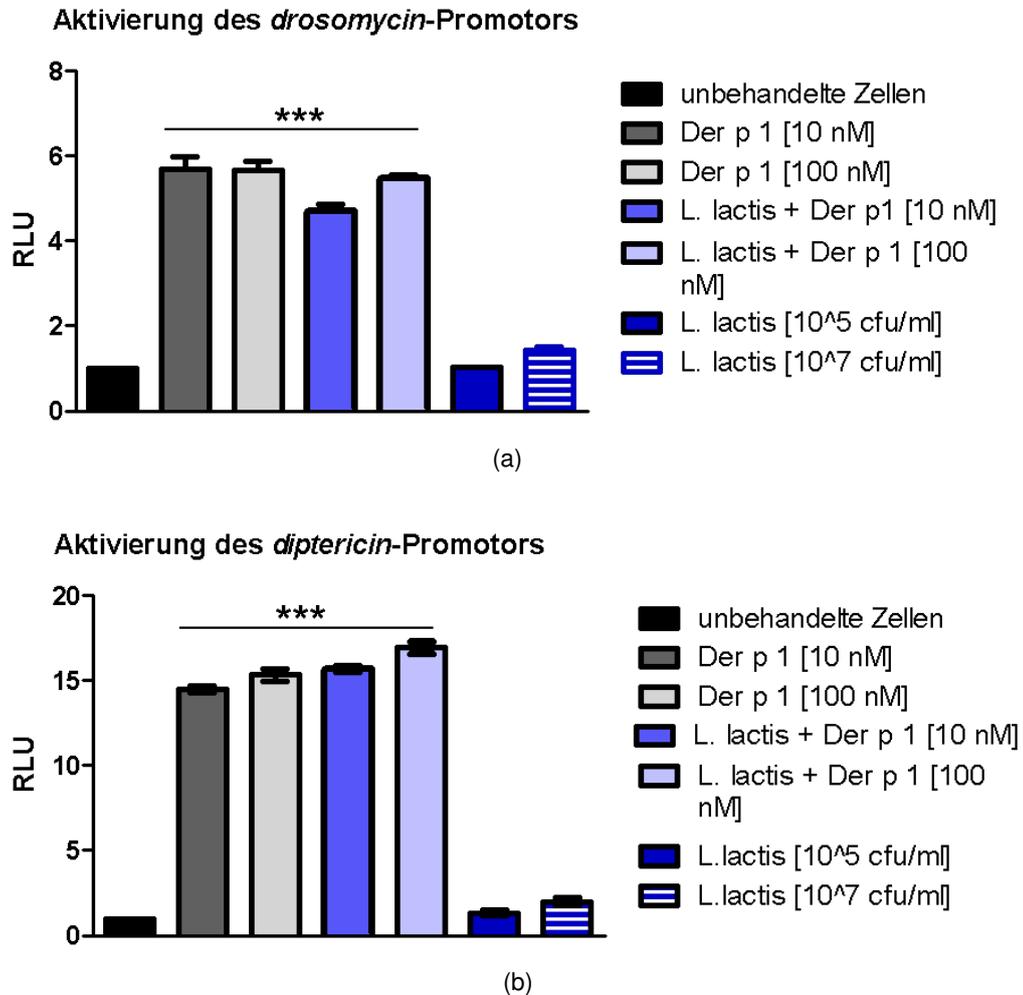


Abbildung 3.23: *L. lactis* hat in der Tauflege keinen allergieprotektiven Effekt. Die dargestellten Resultate wurden mittels des Luciferase-Assays ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (***) $p < 0,001$

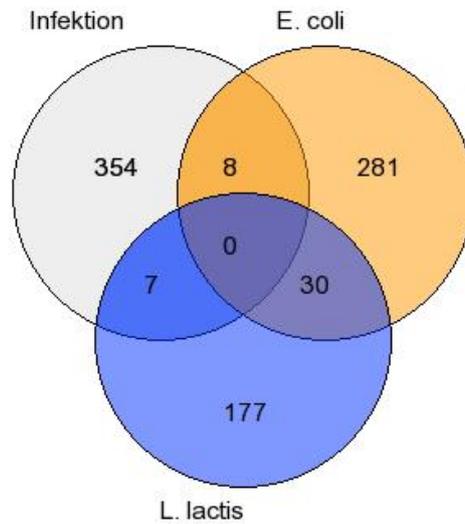
Beide Signalwege weisen hier ein ähnliches Induktionsmuster auf. Sie werden signifikant induziert, wenn die Zellen mit dem Allergen allein stimuliert werden. Die Aktivierung des *drosomycin*-Promotors ist dabei um die Hälfte geringer (sechsmal höher als die Kontrolle) als die des *dipteracin*-Gens (15-mal höher als die

Kontrolle). Erfolgte die Stimulation mit dem Allergen nach Präinkubation mit *L. lactis*, so konnte keine Erhöhung der Signale festgestellt werden. *Lactococcus lactis* allein konnte keinen der beiden Signalwege induzieren. Somit kann in *Drosophila* der im humanen System erwiesene "allergieprotektive" Effekt nicht nachgewiesen werden.

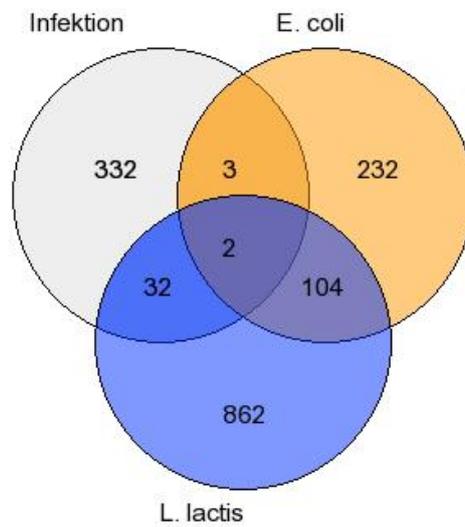
3.5 Vergleich der Transkriptome *E. coli*- und *L. lactis*-stimulierter S2-Zellen

Mit dem verwendeten Luciferase-Assay ließ sich kein Einfluss des Gram-positiven Bakteriums *Lactococcus lactis* auf das angeborene Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* ermitteln. Um die Frage zu beantworten, welchen Effekt dieses Bakterium hat, wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden S2-Zellen 24 Stunden mit *E. coli* oder *L. lactis* stimuliert. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da im humanen System nachgewiesen werden konnte, dass sich ein immunmodulatorischer Effekt dieses Bakteriums nach einer längeren Inkubationsdauer einstellte [7]. Im Anschluß an die Inkubation wurde die RNA gewonnen und wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben eine Analyse per Mikroarray durchgeführt.

Abbildung 3.24 zeigt zwei Venn-Diagramme dieser Versuche. In diese Analyse flossen Daten aus denjenigen Genlisten ein, die anhand von verstärkt und vermindert exprimierten Genen erstellt werden konnten. Erneut wurden hier die Gene, welche im Laufe einer Infektion verstärkt exprimiert wurden einbezogen. Diese wurden mit Genen verglichen, die entweder bei Stimulation mit *E. coli* oder mit *L. lactis* oder aber mit beiden Bakterien verstärkt exprimiert wurden.



(a)



(b)

Abbildung 3.24: Venn-Diagramm erstellt anhand der Genlisten der bei Infektion regulierten Gene sowie der nach Stimulation der S2-Zellen mit *E. coli* und *L. lactis* verstärkt (a) und vermindert (b) exprimierten Gene. Angegeben sind gemeinsam regulierte Gene in den mit den Bakterien stimulierten S2-Zellen sowie die im Laufe einer Infektion regulierten Gene verglichen mit der jeweiligen bakteriellen Stimulation.

Da in dieser Arbeit untersucht werden soll, wie *L. lactis* das angeborene Immunsystem der Taufliege beeinflusst, wird hier hauptsächlich auf diejenigen Gene eingegangen, die auch bei einer Infektion von Bedeutung sind und durch dieses Bakterium reguliert werden.

Abbildung 3.24a stellt die Gene dar, die 24 Stunden nach einer Infektion sowohl mit *E. coli* als auch mit *L. lactis* verstärkt exprimiert werden. Nach diesem Inkubationszeitraum gibt es kein Gen, das unter allen drei Bedingungen (Stimulation mit *E. coli* und *L. lactis* oder bei einer anderweitigen Infektion) verstärkt exprimiert wird. Betrachtet man die Abbildung 3.24b so gibt es nur wenig Gene, die unter den genannten Bedingungen vermindert exprimiert werden. Dies sind die Gene *mpk2* und *CG2278*, dessen Funktion nicht bekannt ist. Mpk2 kodiert für eine *mitogen-activated-protein-(MAP-)Kinase2*.

Nach 24-stündiger Inkubation mit *E. coli* werden acht Gene verstärkt und drei Gene vermindert exprimiert, die infektionsrelevant sind. Abbildung 3.25 stellt diese Gene dar. Signifikant exprimiert werden die Gene *metallothionin C* und *CG8358*, dem eine Funktion bei der Proteolyse zugesprochen wird. Metallothionin C bindet Zink-Ionen, die als Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren fungieren, und ist außerdem als anti-apoptotisch wirkendes Protein bekannt [67].

Vermindert exprimiert werden die Gene *im23*, *CG17019* und *CG8492*, welches für ein Protein mit Lysozym-Aktivität kodiert. IM23 wird nach einer bakteriellen Infektion Toll-abhängig induziert.

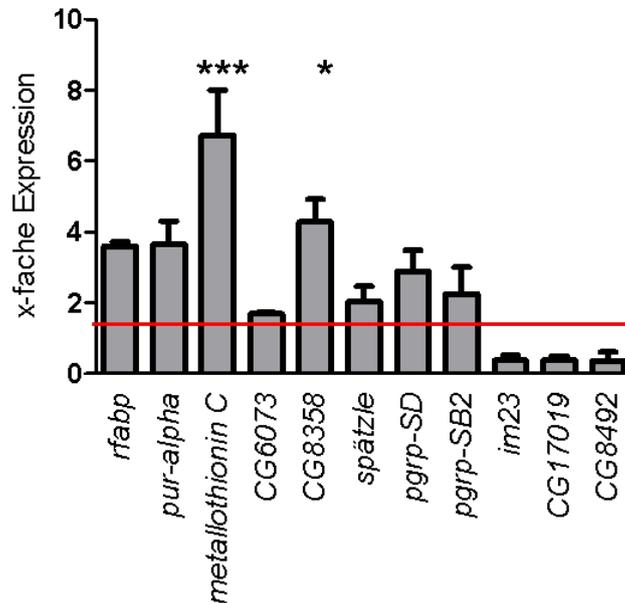


Abbildung 3.25: Nach 24-stündiger Inkubation mit *E. coli* verstärkt und vermindert exprimierte, infektionsrelevante Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) der Daten aus zwei Arrays. *retinoid- and fatty acid binding protein* (rfabp); *purin-rich binding protein α* (pur-alpha)

Bei Stimulation mit *L. lactis* sind nach 24 Stunden die folgenden Gene (Abbildung 3.26) verstärkt exprimiert: *drosomyacin-4*, *metchnikowin*, die beide für antimikrobielle Peptide kodieren, *serinprotease 7*, welches für ein Protein kodiert, das an der Melanisierungsreaktion beteiligt ist, *transferrin-1*, *turandot A*, *inhibitor of apoptosis 2* und *CG15065* (ein Gen mit unbekannter Funktion), wobei jedoch nur *drosomyacin-4* signifikant exprimiert wird. Hier liegt das Expressionsniveau 13-fach über dem Kontrollniveau. Das Expressionsniveau von *transferrin-1* und *metchnikowin* ist ebenfalls erhöht (fünffach höher als das Kontrollniveau), jedoch nicht signifikant.

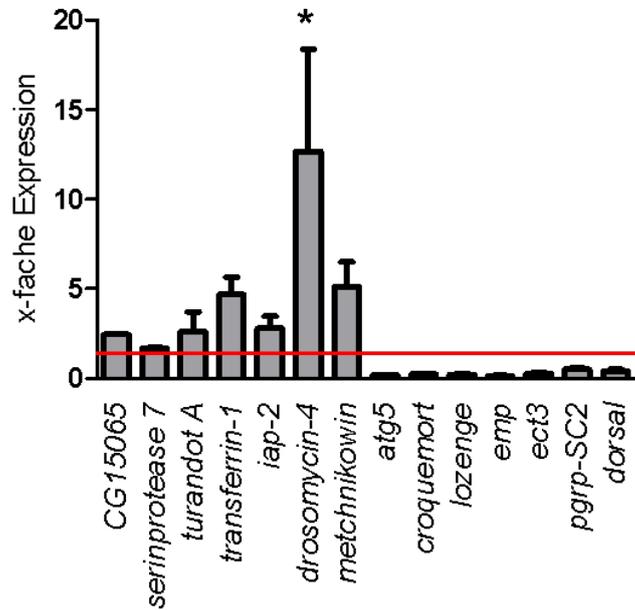


Abbildung 3.26: Infektionsrelevante Gene, die nach 24-stündiger Stimulation mit *L. lactis* verstärkt und vermindert exprimiert werden. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$) der Daten zweier Arrays.

Unter den sechs nach 24 Stunden vermindert exprimierten Genen werden vier signifikant reguliert. Diese Gene sind mit dem Zelltod assoziiert, wobei das Gen, welches für das Protein Croquemort kodiert, ebenfalls an der Immunantwort beteiligt ist. An diesem Prozess sind weiterhin die nicht signifikant regulierten Gene *pgrp-SC2* und *dorsal* beteiligt. PGRP-SC2 besitzt Amidase-Aktivität und hemmt den IMD-Signalweg, während Dorsal ein Transkriptionsfaktor im Toll-Signalweg ist.

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

Unter Zuhilfenahme dieser Mikroarray-Analysen sollte herausgefunden werden, wie *L. lactis* die Immunantwort der Taufliege *Drosophila melanogaster* beeinflusst. Daher wurden vor allem diejenigen Gene näher analysiert, die infektiionsrelevant sind. Unter den verstärkt exprimierten Genen fiel *drosomycin-4* (Drosomycin-ähnlich) als verstärkt exprimiertes Gen auf, dessen Funktion jedoch nicht geklärt ist. Bei den vermindert exprimierten Genen waren vor allem solche signifikant reguliert, die mit dem Zelltod assoziiert sind. Ein Vergleich mit Genen, die nach der Stimulation mit *E. coli* exprimiert wurden, erbrachte keine Gemeinsamkeiten. Es konnte somit auch mit der Array-Analyse keine Aussage über den Einfluss von *L. lactis* auf das Immunsystem der Taufliege getroffen werden.

Kapitel 4

Diskussion

Allergien werden im Allgemeinen über Reaktionen charakterisiert, die mit dem adaptiven Immunsystem in Verbindung stehen [68]. Sie treten häufig in westlichen Industrieländern auf, in denen der hygienische Standard vergleichsweise hoch ist. Hierdurch sind die Menschen weniger von Infektionen betroffen, die jedoch nachweislich vor der Entwicklung von Allergien [6] schützen. Der protektive Effekt basiert auf Reaktionsmechanismen des adaptiven Immunsystems, bei denen im Falle einer Infektion das Gleichgewicht zwischen den T_H1 - und den T_H2 -Zellen zugunsten der T_H1 -Zellen verschoben wird. Die Balance zwischen den T_H -Subtypen entwickelt sich innerhalb der ersten Lebensjahre. Frühkindliche Infektionen, die zu der genannten Verschiebung des lymphozytären Gleichgewichts führen, unterdrücken so die allergieassoziierte T_H2 -Antwort.

Über die Rolle des angeborenen Immunsystems im Verlaufe einer allergischen Reaktion ist wenig bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit anhand des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, dem ein adaptives Immunsystem fehlt, herausgefunden werden, inwieweit das angeborene Immunsystem bei allergischen Reaktionen, die auch zu allergischem *Asthma bronchiale* führen können, involviert ist. Daher wurden Experimente mit immunkompetenten Zellen und isolierten Fettkörpern durchgeführt, in denen diese jeweils mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1 stimuliert wurden. Anschließende Mikroarray-Analysen sollten die zuvor erhobenen Daten verifizieren und weitere Einblicke in den Einfluss des Allergens auf das Immunsystem der Taufliede gewähren.

In diesem Teil der Arbeit werden nun die Ergebnisse anhand von Erkenntnissen aus der Literatur diskutiert. Zunächst wird dabei auf die Vorversuche mit dem Häutungshormon Ecdyson eingegangen, es folgt die Diskussion der Daten, die anhand der Versuche mit Der p 1 ermittelt wurden sowie eine Diskussion, die sich auf die Versuche mit *L. lactis* bezieht. Den Abschluss bildet ein Fazit der gesamten Arbeit.

4.1 Einfluss des Häutungshormons Ecdyson auf immunkompetente Zellen der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Ecdyson bezeichnet das Häutungshormon der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Es erreicht in der larvalen Entwicklung während des dritten Larvenstadiums kurz vor der Verpuppung seine maximale Konzentration. Doch nicht nur auf die Häutung hat dieses Hormon Einfluss, sondern auch auf die Differenzierung von Immunzellen in Makrophagen-ähnliche Zellen und auf die Expression von immunrelevanten Genen. Ein weiterer Effekt dieses Häutungshormons besteht in der möglichen Induktion von Apoptosemechanismen [57] in lebenden Zellen.

In den Experimenten (Abschnitt 3.1), die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass Ecdyson die Transfektionsrate der eingesetzten Zellen erhöht, die Immunantwort verstärkt, aber bei längerer Inkubation auch zum Tod der Zellen führt.

In der Literatur wird Ecdyson meistens in hohen Konzentrationen eingesetzt. So verwenden Dimarq *et al.* [57] Ecdyson in einer Konzentration von 1 μM und Meister *et al.* [69] in einer Konzentration von 10 μM . Im Gegensatz dazu haben die in Abschnitt 3.1 durchgeführten FACS-Analysen gezeigt, dass Ecdyson in einer Konzentration von 50 nM ausreicht, um eine hohe Transfektionsrate zu erzielen (Abbildung 3.1) und dass diese Konzentration die Zellen auch bei längerer Inkubationszeit (hier: 48 Stunden) nur geringfügig schädigt (Abbildung 3.2).

In dem entsprechenden Versuch wurden die dargestellten Konzentrationen von 50 nM und 1000 nM verwendet. Die Konzentration von 1000 nM wurde als Re-

ferenzwert aus der Literatur gewählt [57]. Denkbar ist, dass auch der Einsatz anderer Konzentrationen - wie 100 nM - im Vergleich zu 50 nM die Prozentzahl lebender Zellen nicht signifikant verändern würde. Mit 50 nM wurde jedoch eine relativ hohe Transfektionsrate erzielt, die auch mit höheren Konzentrationen nicht mehr deutlich gesteigert werden konnte. Es wurde daher auf den Einsatz von Ecdyson in anderen Konzentrationen verzichtet.

In einem weiteren Versuch mit den immunkompetenten Zellen wurden diese entweder 24 Stunden vor der bakteriellen Stimulation mit 50 nM Ecdyson präinkubiert oder in Medium ohne Ecdysonzugabe inkubiert und anschließend stimuliert. Es konnte bei den mit Ecdyson vorbehandelten Zellen eine deutlich stärkere Immunantwort nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Insgesamt bestätigt die vorliegende Arbeit, dass Ecdyson die Expression bestimmter immunrelevanter Gene verstärkt und gleichzeitig zum Tod der Zellen führt. Abweichend von der zitierten Literatur wird in dieser Arbeit jedoch Ecdyson nur im nanomolaren Bereich verwendet, der für die Versuche ausreichend ist.

Die Präinkubation der Zellkulturzellen mit Ecdyson ist weiterhin wichtig, um in diesem artifiziellen System die natürlichen Bedingungen nachzustellen, da die Zellen *in vivo* in der Larve ebenso Kontakt zu diesem Hormon hätten. Wird Ecdyson in *Drosophila*-Larven produziert, macht sich dies in einer gesteigerten Protein-Aufnahme in den Fettkörper bemerkbar [70]. Auch im humanen System lässt sich eine ähnliche hormonelle Regulation der antimikrobiellen Immunantwort beobachten. Hier induziert Vitamin D₃ neben der Expression von CD14 auch die Expression der humanen antimikrobiellen Peptide Cathelicidin und Defensin β 2 beispielsweise in Keratinozyten und Monozyten [71].

4.2 Einfluss des Hausstaubmilbenallergens

Der p 1 auf das angeborene Immunsystem

Der p 1 wirkt auf das humane Immunsystem, indem es beispielsweise die Degranulierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten hervorruft und die Synthese sowie die Sekretion des Zytokins IL-4 stimuliert [72]. Dieser Effekt beruht auf der proteolytischen Aktivität des Allergens und beeinflusst über CD40L die IgE-Produktion, da Mastzellen und basophile Granulozyten die IgE-Synthese durch die Freisetzung von IL-4 und IL-13 unterstützen [73]. Des Weiteren spaltet Der p 1 CD23, den niedrig-affinen IgE Fc-Rezeptor, der auf der Oberfläche von B-Zellen, eosinophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird. Es wird angenommen, dass Der p 1 die Synthese von IgE unterstützt, indem es die negative Rückkopplung unterbricht, welche durch die Bindung von IgE an CD23 hervorgerufen wird [74, 19]. Neben CD23 wird außerdem die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25), der auf T-Zellen exprimiert wird, gespalten. Die Spaltung dieses Rezeptors bewirkt eine verminderte Proliferation sowie eine verringerte IFN- γ -Produktion. Auf Grund dessen wird davon ausgegangen, dass die Spaltung von CD25 die Immunantwort in Richtung T_H2-Dominanz verschiebt [14, 15].

Bevor das für diese Arbeit verwendete rekombinante Allergen für die Experimente eingesetzt werden konnte, musste es auf mikrobielle Kontaminationen überprüft werden. Dies geschah unter Zuhilfenahme von HEK293-Zellen, die mit verschiedenen Rezeptoren (für Lipopeptide und Peptidoglykane) transfiziert und anschließend stimuliert wurden.

Während bekannt ist, dass das Immunsystem der Taufleie auf Peptidoglykane mit einer Immunantwort reagiert [75], ist der Literatur nichts darüber zu entnehmen, ob es auch durch Lipopeptide aktiviert werden kann. Um daher sicherzustellen, dass die verwendete Allergenpräparation keine solchen Verunreinigungen aufwies, wurden erneut HEK293-Zellen verwendet, die jeweils mit Rezeptoren für Peptidoglykane (NOD1 und NOD2) und Lipopeptide (TLR2) transfiziert wurden (Abbildungen 3.4 und 3.5a).

Eine Überprüfung der Der p 1-Präparation hinsichtlich einer Kontamination mit LPS, einem bekannten Aktivator des humanen Immunsystems [76], wurde nicht

durchgeführt, da das Immunsystem der Taufliede nicht auf diesen Stimulus reagiert [75]. Es ist hier zu vermuten, dass Lipid A, die reaktive Komponente des LPS, nicht durch die Rezeptoren des Immunsystems erkannt wird.

Für alle folgenden Versuche mit dem Allergen kann also davon ausgegangen werden, dass eine Induktion des Immunsystems allein durch Der p 1 hervorgerufen wird.

In Abschnitt 3.2.2 werden Experimente beschrieben, in denen anhand eines Luciferase-Assays analysiert wird, ob das Allergen eine Immunantwort in *Drosophila* induzieren kann. Es zeigte sich, dass BSA keine Induktion hervorruft, während Der p 1 induzierend wirkt. Somit konnte hier erstmals nachgewiesen werden, dass für den Menschen beschriebene Allergene eine Antwort des ursprünglichen Immunsystems von *Drosophila* auslösen können. Interessant ist der zeitliche Ablauf der Immunantwort (Abbildung 3.7). In den verwendeten Zellen kommt es schnell zu einer verstärkten Expression der Gene *drosomycin* und *diptericin*. Hierbei fällt auf, dass nach zweistündiger Inkubationsdauer das *diptericin*-Gen signifikant stärker exprimiert wird. Die Expression schwächt sich bei längerer Inkubationsdauer ab und ist dann nicht mehr signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Demgegenüber ist die Expression des *drosomycin*-Gens während der ganzen Versuchsdauer nicht signifikant verändert.

Dieser relativ schnelle Zeitverlauf der Reaktion ist nicht erstaunlich, denn auch im humanen System ist Der p 1 sehr reaktiv. So dokumentierten sowohl Hewitt *et al.* [19] als auch Takai *et al.* [77], dass eine einstündige Inkubation mit Der p 1 ausreichend ist, um den humanen Fc-Rezeptor (CD23) zu spalten. Dies geschah mit einer weit höheren Konzentration von 5 µg/ml. Demgegenüber stehen 500 nM und 1000 nM Der p 1, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Vermutlich ist diese Abweichung auch der Grund dafür, dass eine verstärkte Expression der Gene in den Versuchen der vorliegenden Arbeit erst nach zwei Stunden gemessen werden konnte.

Die Symptome einer Allergie treten im humanen System erst nach einem Zweitkontakt mit dem Allergen auf. Es hat sich nach dem ersten Kontakt ein immunologisches Gedächtnis gebildet, welches bei einer darauf folgenden Konfrontation schneller mit dem Allergen reagieren kann und zu einer stärkeren Immunant-

wort führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die ebenfalls nachweisen sollten, ob *Drosophila* in Bezug auf das Allergen über eine Art immunologisches Gedächtnis verfügt (Abschnitt 3.2.2). Denkbar wäre ein spezifischer "priming" Effekt für Der p 1 gewesen, wie Pham *et al.* [78] ihn für eine Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* zeigen konnten. Hier führte der Erstkontakt zur Auslösung eines protektiven Effekts bezogen auf eine anschließende Stimulation mit demselben Bakterium. Dies konnte für eine Stimulation mit Der p 1 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.8). Es trat sogar der gegenteilige Fall ein. Die proteolytische Aktivität des Allergens führte zu einer verminderten Immunantwort. Es wird vermutet, dass das Allergen Rezeptoren spaltet, die im Nachhinein nicht mehr für eine Immunantwort zur Verfügung stehen. Dafür spricht auch, dass in den Versuchen, in denen zunächst mit abgetöteten *E. coli* und anschließend mit dem Allergen stimuliert wurde, für beide Signalwege eine Erhöhung der Immunantwort zu beobachten war (Abbildung 3.9). Die abgetöteten *E. coli*-Bakterien wirken nicht proteolytisch. Somit war es hier möglich, mit dem Erstkontakt mehr Rezeptormoleküle zu generieren, die dem Zweitkontakt mit dem Allergen nach Entfernen der Bakterien durch Waschen zur Verfügung standen.

Aus diesen Experimenten kann jedoch nicht darauf geschlossen werden, ob *Drosophila* über eine Art immunologisches Gedächtnis verfügt. Denkbar wäre, dass ein Zweitkontakt bei anderen Allergenen, die nicht proteolytisch aktiv sind, anders verlief und beispielsweise in einer gesteigerten Immunantwort resultieren könnte.

Da Zellkulturen dem Problem unterliegen, nicht genau dem natürlichen System zu entsprechen, wurden Versuche an isolierten Fettkörpern durchgeführt. Dies diente der Verifizierung der Daten aus den Versuchen mit den immunkompetenten Zellen und der Beantwortung der Frage, ob Hämocyten die Immunantwort auf Der p 1 beeinflussen (Abschnitt 3.2.3). Erste Versuche mit dem Allergen wurden anhand von Zellen durchgeführt, die von Hämocyten abstammen. Diese setzen Zytokine - wie Unpaired3 (Upd3) und Spätzle - frei, welche entscheidend für die Immunantwort sind, da sie als Liganden für Rezeptoren, wie Domeless und Toll, dienen. In den Versuchen mit isolierten Fettkörpern spielen Hämocy-

ten eine untergeordnete Rolle, da sie zum einen größtenteils bei der Präparation der Tiere weggespült werden und zum anderen durch das Inkubationsmedium erheblich verdünnt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie die Immunantwort nicht doch beeinflussen.

Zu beachten ist, dass in den Versuchen mit den Fettkörpern mit deutlich höheren Allergenkonzentrationen als in den Versuchen mit den immunkompetenten Zellen gearbeitet wurde. Dies liegt daran, dass die Versuche zeitlich voneinander getrennt abliefen. Während dieser Zeit verlor das Allergen seine Reaktivität durch die Lagerung. Daraus ergab sich, dass in den Versuchen mit den Fettkörpern höhere Konzentrationen erforderlich waren.

Die Immunantwort der Fettkörper (Abbildung 3.10) verläuft deutlich langsamer und in Bezug auf die erreichten Expressionsniveaus schwächer als die Antwort der Zellkultur. Erst nach sechs Stunden können hier signifikante Anstiege des Expressionsniveaus von *diptericin* und *drosomycin* dokumentiert werden. Dies mag an der Zugänglichkeit der Fettkörperzellen liegen, die sich unter einer Schicht extrazellulärer Matrix befinden [79]. Somit wären die Rezeptoren dem Allergen nicht sofort ausgesetzt, anders als die Hämozyten, bei denen die Rezeptoren auf der Zelloberfläche frei zugänglich sind. Die Unterschiede im Zeitverlauf könnten auch auf den bereits erwähnten freigesetzten Zytokinen der Hämozyten beruhen. Neben den bekannten Zytokin-ähnlichen Molekülen Spätzle und Upd3 ist es durchaus denkbar, dass es noch weitere solche Moleküle gibt, die von Hämozyten sekretiert werden und somit die Immunantwort beeinflussen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche liefern keinen Hinweis darauf, ob die Immunantwort des Fettkörpers durch sekretierte Komponenten der Hämozyten beeinflusst wird. Um dies zu beantworten, bedarf es weiterer Versuche, die sich auf eben diese Komponenten konzentrieren müssten.

Wie schon in den Versuchen mit den immunkompetenten Zellen beobachtet werden konnte, ist die Expression des *drosomycin*-Gens geringer als die des *diptericin*-Gens. Dies lässt vermuten, dass die Immunantwort auf das Allergen IMD-vermittelt ist.

Um die aufgestellte Vermutung zu verifizieren, wurden Versuche durchgeführt, in denen zum einen *Relish-knock-out*-Fliegen und zum anderen *PGRP-LC-knock-out*-Fliegen eingesetzt wurden.

In den *rel k.o.*-Fliegen trägt das Gen *relish* eine Deletion, sodass es nicht zur Expression dieses Transkriptionsfaktors, welcher hauptsächlich über den IMD-Signalweg induziert wird, kommt. Wurden die Fettkörper aus diesen Fliegen für *Ex-vivo*-Versuche verwendet, konnte im Gegensatz zum Wildtyp keine Induktion des IMD-Signalwegs beobachtet werden (Abschnitt 3.2.4). Da es jedoch auf Transkriptionsebene zu Überschneidungen der untersuchten Signalwege kommen kann [24], wurden die Ergebnisse dieser Versuche anhand weiterer Experimente mit einer PGRP-LC-*knock-out*-Linie verifiziert (Abschnitt 3.2.4). Diese Fliegen verfügen nicht über den Rezeptor PGRP-LC. Demzufolge kam es hier nicht zu einer Induktion des IMD-Signalweges durch Der p 1. Der Toll-Signalweg wurde weder in den Versuchen mit den *rel k.o.*- noch mit den PGRP-LC-*k.o.*-Fliegen aktiviert. Dies zeigt, dass die Immunantwort auf Der p 1 tatsächlich IMD-vermittelt ist.

In durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des IMD-Signalweges auf der proteolytischen Aktivität des Allergens beruht (Abschnitt 3.2.2). Des Weiteren wurde nun die proteolytische Aktivität des Der p 1 irreversibel mit einem Cysteinprotease-spezifischen Inhibitor (E64) unterbunden (Abschnitt 3.2.5). E64 wurde erstmals 1987 aus Kulturen des Pilzes *Aspergillus japonicus* isoliert [80] und als Cysteinprotease-Inhibitor charakterisiert. Der p 1 und E64 bilden einen Thioether, indem es zu einer kovalenten Bindung zwischen dem Cystein des aktiven Zentrums im Allergen und der Epoxy-Gruppe des E64 kommt [81]. Mit dem so inhibierten Allergen wurde der Toll-Signalweg ähnlich wie mit aktivem Der p 1 nur schwach induziert (etwa zweifach über der Kontrolle; Abbildung 3.13a). Der Effekt der Inaktivierung machte sich bei Analyse der *diptericin*-Expression (Abbildung 3.13b) stärker bemerkbar. Im Gegensatz zum aktiven Allergen führte eine Stimulation mit E64-behandeltem Allergen nicht zu einer signifikanten Expression dieses Gens. Auch dies bestätigt, dass die Immunantwort durch Der p 1 IMD-vermittelt ist und einzig auf der proteolytischen Aktivität des Allergens beruht.

Die Mikroarray-Analysen des Abschnitts 3.3 unterstützen diese Behauptung ebenfalls. Es konnte anhand dieser Mikroarrays sowohl in S2-Zellen als auch in isolierten Fettkörpern nachgewiesen werden, dass vor allem Gene, die für antimikrobielle Peptide kodieren und durch den IMD-Weg induziert werden (*diptericin*,

attacin-A, *cecropin-A2*) nach Stimulation mit Der p 1 verstärkt exprimiert werden. Auffällig ist jedoch, dass das einzige Gen, das sowohl infektionsrelevant ist als auch in S2-Zellen und im Fettkörper vermindert exprimiert wird, das Homologe des humanen IKK γ , *kenny*, ist. Dieses Gen kodiert für die regulatorische Untereinheit des IKK-ähnlichen Komplexes. Denkbar wäre, dass diese Untereinheit nicht für die Transkription der Gene benötigt wird und daher die Synthese eingestellt wird, oder aber, dass ein weiteres Regulationsprotein die Synthese verhindert, indem es die Transkription blockiert. Aggarwal und Silverman geben 2008 die Rolle des IKK-Komplexes in *Drosophila* in Bezug auf die Kontrolle von Relish als unklar an [82]. Dieser Transkriptionsfaktor kann neben der Spaltung durch den IKK-Komplex auch von der Caspase DREDD in seine aktive Form gebracht werden. Die Rolle des IKK-Komplexes ist noch aufzuklären.

Zudem weisen die Mikroarray-Analysen auf einen weiteren Aspekt der Auswirkungen von Der p 1 hin. Eine Konfrontation sowohl der S2-Zellen als auch der Fettkörper resultiert in einer verminderten Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Es sind vor allem Geruchsrezeptoren und Bombesinrezeptoren, die reguliert werden. Sie gehören zur Familie A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sich durch eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Rhodopsin auszeichnet [83]. Einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden aktiviert, indem extrazelluläre Rezeptorfragmente durch eine Protease (beispielsweise Der p 1) abgespalten werden und sich an den noch vorhandenen Rezeptor binden [84]. Nach der Ligandenbindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor ist eine Abschaltung des ausgelösten Signals wichtig. Dies kann durch mehrere Mechanismen geschehen. Zum einen durch eine vom Rezeptor ausgelöste (homologe) Desensibilisierung oder durch die von anderen "Signalen" ausgelöste (heterologe) Desensibilisierung. An der homologen Desensibilisierung sind Arrestine beteiligt, die in der Lage sind, sich an den phosphorylierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu binden [83]. Dieser Komplex kann anschließend an Clathrin binden. Somit kann die Internalisierung des Proteinkomplexes durch Membranvesikel erfolgen [85]. Es ist anhand der Array-Daten ebenfalls plausibel, eine Arrestinbeteiligung zu vermuten, da das Gen *arrestin-2* (*arr2*) im Fettkörper verstärkt (fünffach) exprimiert wird (Abbildung 3.19). Die Mechanismen der homologen und

heterologen Desensibilisierung dienen vor allem der kurzfristigen Abschaltung nach Rezeptorstimulation.

Langanhaltende oder auch chronische Stimulationen, wie sie im Falle einer Allergie oder bei chronischem Asthma auftreten können [86], resultieren in längerfristigen Regulationen, die auch die transkriptionelle Ebene betreffen [87, 88]. Die Regulationsmechanismen, die anhand der Mikroarray-Analysen nachgewiesen werden konnten, sprechen sowohl für eine kurzfristige Regulation, an der Arrestin-2 beteiligt ist, als auch für eine längerfristige Regulation auf Ebene der mRNA, da hier die Gene dieser Rezeptoren vermindert exprimiert werden.

Auch die verstärkte Expression (siebenfach) von Calcineurin im Fettkörper deutet auf eine Induktion G-Protein-gekoppelter Signalwege durch das Allergen hin. Calcineurin wird ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induziert [89] und fördert die Induktion der Immunantwort in *Drosophila*, indem es die Translokation des Transkriptionsfaktors Relish in den Kern unterstützt [66]. Dies erklärt, dass das Expressionsniveau bei Stimulation mit dem inaktiven Allergen leicht erhöht ist (Abbildung 3.13).

2008 wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigt, dass der IMD-Signalweg nicht nur durch direkte Ligandenbindung an den Rezeptor PGRP-LC aktiviert werden kann, sondern auch durch die proteolytische Spaltung der Ektodomäne [90]. Gemäß dieser Studie und den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten, kann man davon ausgehen, dass der IMD-Signalweg durch die proteolytische Spaltung der Ektodomäne aktiviert wird und die enzymatische Aktivität des Allergens weiterhin für die Internalisierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren verantwortlich ist.

Anders als in isolierten Fettkörpern ist in den S2-Zellen kein Hinweis auf eine solche Reaktion vorhanden. Hier werden auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermindert exprimiert. *Calcineurin* und *arrestin-2* sind jedoch nicht zusätzlich verstärkt exprimiert. Denkbar wäre, dass Arrestin in den S2-Zellen nicht an der Regulation beteiligt sind, wie dies beispielsweise bei der heterologen Desensibilisierung der Fall ist. Eine Regulation auf transkriptioneller Ebene findet dennoch statt, da auch hier die Gene der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermindert exprimiert sind.

Die für diese Rezeptoren ermittelten Daten zeigen eine Übereinstimmung zu den

Daten, die im humanen System erhoben werden konnten. Der p 1 ist hier ebenfalls in der Lage, eine Signalweiterleitung durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren zu induzieren. In diesem Fall handelt es sich um den PAR-2 Rezeptor, der zwei Stunden nach Allergenexposition internalisiert wird [91].

Interessanterweise wird in den S2-Zellen das Gen *serrate* nach Allergenkonfrontation vermindert exprimiert (Abbildung 3.17). *Serrate* ist ein Homolog des humanen Jagged-Molekül und Ligand des Notch-Rezeptors. Der Notch-Signalweg ist für Differenzierungsprozesse von Bedeutung. Im humanen System konnte kürzlich auch eine Verbindung zur Entwicklung der Lunge festgestellt werden. Hierbei ist der Notch-Signalweg wichtig für die Balance zwischen Zellen, die Zilien tragen und solchen, die keine Zilien tragen [92]. In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass dieser Signalweg bei Lungenerkrankungen herunterreguliert ist [93]. Die Regulation von *Serrate* ist in der vorliegenden Arbeit der einzige Hinweis auf eine Beeinflussung des Notch-Signalweges durch das Allergen. Für statistisch abgesicherte Aussagen sind an dieser Stelle weitere Versuche nötig.

Weiterhin ist zu beobachten, dass nach der Stimulation mit dem Allergen Autophagie-assoziierte Gene verstärkt exprimiert werden (Abbildung 3.18), darunter auch das Gen *broad*. Für dieses Gen konnte gezeigt werden, dass es Ecdyson-abhängig reguliert wird [94]. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die Expression dieser Gene durch das Allergen oder durch das Ecdyson zustande kommt. Daher wird diese Regulation nicht näher untersucht.

In einer Arbeit von Wagner *et al.* [51] wurden diejenigen Signalwege aufgeklärt, die in der lokalen Immunantwort der Atemwege der Taufliege von Bedeutung sind. Hierbei scheint der Toll-Signalweg eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Gene *tube* und *pelle* nicht exprimiert werden. Somit ist in der trachealen Immunabwehr der IMD-Signalweg von zentraler Bedeutung.

Da sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt hat, dass Allergene das angeborene Immunsystem über diesen Signalweg beeinflussen, ist es naheliegend, in einem weiteren Schritt zu untersuchen, wie sich eine Konfrontation mit dem Allergen auf die Atemwege der Taufliege auswirkt.

Wagner *et al.* lieferten Daten, die zeigen, dass eine Infektion der Atemwege in einem *airway remodeling* resultiert, welches Ähnlichkeiten zu den Prozessen aufweist, die bei humanen Atemwegserkrankungen ablaufen. So kann unter ande-

rem eine Verdickung der Epithelschicht der Atemwege beobachtet werden [95]. Hier wäre beispielsweise von Interesse, ob Der p 1 ebenfalls eine solche Veränderung der Atemwege hervorrufen kann.

4.3 Einfluss des Gram-positiven Bakteriums *Lactococcus lactis* auf das Immunsystem der Tafliege *Drosophila melanogaster*

Lactococcus lactis ist ein Gram-positives Milchsäurebakterium. Der in dieser Arbeit eingesetzte Stamm G121 ist einer der häufigsten Stämme in Kuhstallstäuben und wurde aus solchen isoliert. *L. lactis* wird im humanen System über den intrazellulären Rezeptor NOD2 erkannt. Dies setzt voraus, dass das Bakterium in die Zelle aufgenommen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass *L. lactis* nicht in der Lage ist, eine Immunantwort in *Drosophila* auszulösen. Mit dem verwendeten Luciferase-Assay konnte weder eine Induktion des Toll-Signalwegs noch eine Induktion des IMD-Signalwegs ermittelt werden (Abschnitt 3.4.1). Auch die Experimente, die zur Aufklärung eines immunmodulatorischen Effekts dienen sollten, ließen einen solchen nicht erkennen. Es konnte weder ein immunsupprimierender (Abschnitt 3.4.2) noch ein "allergieprotektiver" Effekt (Abschnitt 3.4.3) nachgewiesen werden. Hierbei konnten auch die Mikroarray-Analysen keinen näheren Aufschluss geben.

Während in diesen Analysen nach einer 24-stündigen Inkubation mit *E. coli* Gene wie *metallothionin*, *spätzle*, *pgrp-SD* und *-SB2* verstärkt exprimiert werden, werden mit *L. lactis* ganz andere Gene verstärkt exprimiert (*serinprotease 7*, *turandot A*, *transferrin1*, *iap-2*, *metchnikowin*, *drosomycin-4*). Unter den hier angegebenen wird nur *drosomycin-4* signifikant reguliert. Dieses ist ein Drosomycin-ähnliches Gen, über dessen Funktion bisher nichts bekannt ist.

Auffällig ist, dass unter den nach Stimulation mit *L. lactis* vermindert exprimierten Genen hauptsächlich diejenigen signifikant reguliert werden, die mit dem Zelltod assoziiert sind. Es handelt sich um *croquemort*, einen Rezeptor, dessen Aktivierung zur Phagozytose apoptotischer Zellen führt [96], *lozenge*, welches die Ent-

wicklung der Kristallzellen steuert [97], *emp*, das Gen für ein epitheliales Membranprotein mit vergleichbarer Funktion wie Croquemort [98] und *ect3*, welches mit Kältestress assoziiert ist [99]. Es wäre für weitere Untersuchungen mit diesem Bakterium interessant, sich anzuschauen, inwieweit eine Stimulation mit *L. lactis* die Lebensspanne der Zellen und der Fliege an sich beeinflusst.

Debarry *et al.* [7] wiesen unter anderem diesem Bakterium immunmodulatorische Wirkung nach. Es kommt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes der T_H-Zellen in Richtung T_H1-Dominanz. Eine solche Verschiebung wirkt der Entwicklung von Allergien entgegen. Mit den in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Versuchen sollte ein möglicher „allergieprotektiver“ Effekt auf das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden. Dies ist nicht gelungen, da die Immunantwort der Zellen auf das Allergen nach Präinkubation mit *L. lactis* nahezu identisch ist zu der Immunantwort, die ohne Präinkubation ermittelt wurde. In einer 2007 erhobenen Studie von Hibergues *et al.* geht erstmals hervor, dass ein ähnliches Milchsäurebakterium (*Lactobacillus plantarum* NCIMB8826) immunmodulatorisch auf eine nachgeschaltete Konfrontation mit Der p 1 wirkt [100]. Es wird anhand von Mausversuchen beschrieben, dass eine nasale Koapplikation von Bakterium und Allergen zu einer Induktion von T_H1-assoziierten IgG2a-Antikörpern führt, jedoch keine Allergie-spezifische IgE-Antwort detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu führte eine Konfrontation mit dem Allergen allein zu einer Induktion von T_H2-assoziierten IgG1-Antikörpern.

In *Drosophila* jedoch konnte keine signifikante Immunantwort auf *L. lactis* G121 nachgewiesen werden. Derzeit wird davon ausgegangen, dass dieses Bakterium in Bezug auf den Modellorganismus *Drosophila* biologisch inert ist. Um dies auszuschließen, bedarf es weiterer Untersuchungen, die mehrere Zeitpunkte der Stimulation (beispielsweise Inkubationsdauern von sechs und 12 Stunden) analysieren und sich auch der Aufnahme der Bakterien widmen.

4.4 Fazit

Allergie wird im humanen System gleichgesetzt mit einer Induktion des adaptiven Immunsystems. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen auf die Möglichkeit hin, dass auch das humane angeborene Immunsystem im Verlaufe einer Allergie eine größere Rolle spielt als bisher vermutet.

Diese Arbeit gewährt neue Einblicke in die Induzierbarkeit des Immunsystems der Taufliege und zeigt, dass sich *Drosophila* als Modellorganismus für Studien zu allergischen Reaktionen eignet, da in der Antwort auf das Allergen Der p 1 ähnliche Mechanismen aktiviert werden wie im humanen System.

Im Gegensatz dazu zeigte das angeborene Immunsystem der Taufliege keine signifikante Reaktion auf eine Konfrontation mit dem immunmodulatorischen Bakterium *Lactococcus lactis*. Gleichwohl wird das adaptive Immunsystem durch dieses Bakterium induziert, wodurch hier noch Raum für weitere Untersuchungen bleibt.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Allergien sind weltweit auf dem Vormarsch. Waren in den 1920er Jahren noch rund ein bis zwei Prozent der Bevölkerung von Heuschnupfen betroffen, sind es heute bereits 12 Prozent. Etwa 40 Prozent der Bevölkerung westlicher Industrienationen sind nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) IgE-positiv für Aeroallergene. Aufgrund dieser Entwicklung ist es erforderlich, die Mechanismen, die zur Entstehung einer Allergie beitragen, näher zu untersuchen, denn Allergien sind häufig eine Vorstufe von chronischem *Asthma bronchiale*.

Betrachtet man die Definition der allergischen Reaktion genauer, so fällt auf, dass diese vor allem auf Reaktionen des adaptiven Immunsystems basiert. Das angeborene Immunsystem wird nicht mit einbezogen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, dem ein adaptives Immunsystem fehlt, den Einfluss eines Aeroallergens auf das angeborene Immunsystem zu untersuchen. Das hierzu verwendete Hausstaubmilbenallergen Der p 1 gehört zu den am besten charakterisierten Aeroallergenen.

In einem weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit wurde analysiert, ob das immunmodulatorische Bakterium *Lactococcus lactis* ebenfalls einen Einfluss auf das angeborene Immunsystem hat. Diesem Bakterium wurde im humanen System eine „allergieprotektive“ Wirkung nachgewiesen.

Nachdem zunächst in Vorversuchen mit HEK293-Zellen mikrobielle Kontaminationen der Allergenpräparation erfolgreich ausgeschlossen werden konnten, wur-

de sowohl durch einen Luciferase-Assay als auch durch *qRT-PCR* und Mikroarray-Analysen herausgefunden, dass das Immunsystem der Taufliege durch Der p 1 induziert werden kann. Es gelang nachzuweisen, dass die Immunantwort IMD-vermittelt ist und durch die Spaltung des PGRP-LC-Rezeptors ausgelöst wird. Auch im humanen System können Rezeptorspaltungen durch Der p 1 (beispielsweise CD23 und CD25) beobachtet werden.

Ebenfalls über Mikroarray-Analysen wurde eine weitere Gemeinsamkeit in der Immunreaktion des Menschen und der Fliege auf das Allergen entdeckt. Diese besteht aus der Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sowohl in der Fliege sowie im humanen System beobachtet werden konnte.

Lediglich in der Untersuchung der Wirkung von *L. lactis* ließ sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungsmethoden (Luciferase-Assay, Mikroarray-Analysen) kein Effekt nachweisen. Es wird daher vermutet, dass sich der eingangs erwähnte immunmodulatorische Effekt lediglich in Bezug auf das adaptive Immunsystem bemerkbar macht.

Zusammenfassend betrachtet, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass das Immunsystem der Taufliege *Drosophila melanogaster* bei Allergenkonfrontation ähnliche Reaktionen zeigt wie das humane Immunsystem. Dies macht die Taufliege zu einem idealen Modellorganismus für Untersuchungen allergischer Reaktionen. Da sie außerdem genetisch einfach zu manipulieren ist, bleibt hier Spielraum für vielfältige molekularbiologische Studien.

Kapitel 6

Summary

The incidence of allergic diseases is rising in most parts of the world. To give an example, in the 1920s about one or two percent of the population suffered from hay fever, today 12 percent are affected. According to a statement of the world health organization (WHO) about 40 percent of the population of western industrial nations are IgE-positive to aeroallergens. Therefore it is necessary to characterize the mechanisms in detail that lead to the development of allergic diseases. Moreover the knowledge about these mechanism is important because allergies such as hay fever are often a preliminary stage of chronical *Asthma bronchiale*.

Allergic reactions are thought to rely solely on the adaptive immunity whereas an involvement of innate immunity has not been considered yet. The aim of this study was to analyze the effect on an aeroallergen on the innate immune system of *Drosophila melanogaster* which lacks the adaptive immunity. Therefore we used the well-characterized house dust mite allergen Der p 1.

We further focused on the influence of the immunomodulatory bacterium *Lactococcus lactis* on the innate immune system. This bacterium is known to have allergy-protective activities in the human system.

In preliminary experiments we excluded microbial contaminations of our allergen preparation and we were able to figure out that Der p 1 induces the fruit-fly's immune system. This could be seen via three independent assays, namely a luciferase-assay, qRT-PCR and microarray-analysis. However, we proved that

KAPITEL 6. SUMMARY

this immune response is IMD-dependent and triggered by cleavage of the receptor PGRP-LC. Receptor-cleavage by Der p 1 is also known to be operational in the human system where CD23 and CD25 are affected.

Via microarray-analysis we observed another similarity of the immune systems of human and fly regarding the response to this allergen; namely the activation of G-protein-coupled receptors, which is documented in both systems.

The assays used in this study do not show any signs for a modulatory effect of *L. lactis* on the innate immune system of the fly. Therefore we assume that the described immunomodulatory effect relies on an interaction with the adaptive immune response.

In summary, we could show for the first time in this study that the immune system of the fruitfly *Drosophila melanogaster* shows immune responses to Der p 1 that resemble those of the human system. Therefore the fruitfly is well suited to study the primary effects that occur between allergens (at least some of them) and the innate immune system.

Literaturverzeichnis

- [1] Silverstein, A. Clemens Freiherr von Pirquet: Explaining immune complex disease in 1906. *Nature Immunology* **1**, 453–455 (2000).
- [2] Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie* (Spektrum, Akad. Verlag, 2002).
- [3] Strachan, D. Family size, infection and atopy: the first decade of the hygiene hypothesis. *Thorax* **55**, S2–10 (2000).
- [4] Weiss, S. Eat dirt - the hygiene hypothesis and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* **347**, 930–931 (2002).
- [5] Levy, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 379–390 (2007).
- [6] Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* **112**, 352–363 (2004).
- [7] Debarry, J. *et al.* *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowshed possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1514–1521 (2007).
- [8] Rook, G. & Brunet, L. Old friends for breakfast. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 841–842, (2005).
- [9] Wu, C. *et al.* Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on T_H1/T_H2 balance in ovalbumin (ova)-induced asthma model mice. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 610–615 (2006).

LITERATURVERZEICHNIS

- [10] Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. & Gorbato, N. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* **78**, 1597–1606 (1995).
- [11] Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135–145 (2001).
- [12] Thomas, W., Smith, W., Hales, B., Mills, K. & O'Brien, R. Characterization and Immunobiology of house dust mite allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 1–18 (2002).
- [13] Wan, H. *et al.* Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest.* **104**, 123–133 (1999).
- [14] Schulz, O., Sewell, H. & Shakib, F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.* **187**, 271–5 (1998).
- [15] Ghaemmaghami, A., Robins, A., Gough, L., Sewell, H. & Shakib, F. Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN- γ . *Eur J Immunol* **31**, 1211–1216 (2001).
- [16] Sharma, S., Lackie, P. & Holgate, S. Uneasy breather: the implications of dust mite allergen. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 163–165 (2003).
- [17] Carlson, J. *et al.* Multiple tissues express α 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J. Clin. Invest.* **82**, 26–36 (1988).
- [18] van Steenberg, W. Alpha 1-antitrypsin deficiency: an overview. *Acta Clin. Belg.* **48**, 171–189 (1993).
- [19] Hewitt, C., Brown, A., Hart, B. & Pritchard, D. A major house dust mite allergen disrupts the Immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J. Exp. Med* **182**, 1537–1544 (1995).
- [20] Morgan, T. The theory of the gene. *The Am. Nat.* **51**, 513–544 (1917).

LITERATURVERZEICHNIS

- [21] Anderson, K., Jürgens, G. & Nüsslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies of the role of the Toll gene product. *Cell* **42**, 779–789 (1985).
- [22] Markus, R. *et al.* Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 4805–4809 (2009).
- [23] Boman, H., Nilsson, I. & Rasmuson, B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* **237**, 232–235 (1972).
- [24] Lau, G. *et al.* The *Drosophila melanogaster* Toll pathway participates in resistance to infection by the Gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **71**, 4059–4066 (2003).
- [25] Lemaitre, B. The road to Toll. *Nat.Rev.Immunol.* **4**, 521–527 (2004).
- [26] Belvin, M. & Anderson, K. A conserved signalling pathway: the *Drosophila* Toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 393–416 (1996).
- [27] Steiner, H. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol. Reviews* **198**, 83–96 (2004).
- [28] Gottar, M. *et al.* Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* **127**, 1425–1437 (2006).
- [29] Lee, W., Lee, J., Kravchenko, W., Ulevitch, R. & Brey, P. Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 7888–7893 (1996).
- [30] Kambris, Z. *et al.* *Drosophila* immunity: a large scale in-vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr. Biol.* **16**, 808–813 (2006).
- [31] Weber, A. *et al.* Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signalling. *Nat. Immunol.* **4**, 794–800 (2003).

LITERATURVERZEICHNIS

- [32] Hu, X., Yagi, Y., Tanji, T., Zhou, S. & Ip, Y. Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 9369–93674 (2004).
- [33] Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. & Imler, J. *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and gram-positive bacterial infections. *Nat. Immunol.* **3**, 91–97 (2002).
- [34] Towb, P., Huaiyu, S. & Wasserman, S. Tube is an IRAK-4 homolog in a Toll pathway adapted for development and immunity. *J. Innate. Immun.* **1**, 309–321 (2009).
- [35] Nicolas, E., Reichhart, J., Hoffmann, J. & Lemaitre, B. *In vivo* regulation of the I κ B homologue cactus during the immune response of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **273**, 10463–10469 (1998).
- [36] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Jr, C. J. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–3397 (1997).
- [37] Lemaitre, B. *et al.* A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9365–9469 (1995).
- [38] JC, C. & M, L. Characterization of an immunodeficiency mutant in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **55**, 211–220 (1996).
- [39] Werner, T. *et al.* A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 13772–13777 (2000).
- [40] Kaneko, T. *et al.* PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *Drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol.* **7**, 715–723 (2006).
- [41] Choe, K. & Anderson, K. *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1122–1126 (2005).

LITERATURVERZEICHNIS

- [42] Hu, S. & Yabg, X. dFADD, a novel death domain-containing adaptor protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J. Biol. Chem.* **275**, 30761–30764 (2000).
- [43] Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y. & Hultmark, D. Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor relish by rapid endoproteolytic cleavage. *Embo Rep.* **1**, 347–352 (2000).
- [44] Silverman, N. *et al.* A *Drosophila* I κ B kinase complex required for relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev.* **14**, 2461–2471 (2000).
- [45] Chen, G. & Goeddel, D. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**, 1634–1635 (2002).
- [46] Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* **10**, 45–65 (2003).
- [47] Liu, L., Johnson, W. & Welsh, M. *Drosophila* DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 2128–2133 (2003).
- [48] Uv, A., Cantera, R. & Samakovlis, C. *Drosophila* tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems. *Trends Cell Biol.* **13**, 301–309 (2003).
- [49] Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 169–182 (2003).
- [50] Roeder, T., Isermann, K. & Kabesch, M. *Drosophila* in asthma research. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 979–983 (2009).
- [51] Wagner, C., Isermann, K., Fehrenbach, H. & Roeder, T. Molecular architecture of the fruit fly's airway epithelial immune system. *BMC Genomics* **9** (2008).
- [52] Warner, S. & Knight, D. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr. Op. in Allergy and Clin. Immunol.* **8**, 44–48 (2008).

LITERATURVERZEICHNIS

- [53] Maruo, K., Akaike, T., Ono, T., Okamoto, T. & Maeda, H. Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease. *J. All. Clin. Immunol.* **100**, 253–260 (1997).
- [54] Schneider, I. Cell lines from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. exp. Morph.* **27**, 353–365 (1972).
- [55] Gateff, E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **200**, 1448–1459 (1978).
- [56] Kozlova, T. & Thummel, C. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab.* 276–280 (2000).
- [57] Dimarcq, J. *et al.* Treatment of I(2)mbn tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial gene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 877–886 (1997).
- [58] Tovey, E., Chapman, M. & Platts-Mills, T. Mite faeces are the major source of house dust mite allergens. *Nature* **289**, 592–593 (1981).
- [59] Kay, A. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**, 30–37 (2001).
- [60] Lemaitre, B., Reichhart, J. & Hoffmann, J. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 14614–14619 (1997).
- [61] Levashina, E., Ohresser, S., Lemaitre, B. & Imler, J. Two distinct pathways can control the expression of the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J. Mol. Biol.* **278**, 515–527 (1998).
- [62] Rutschmann, S. *et al.* Role of *Drosophila* ikk gamma in a Toll-independent antibacterial immune response. *Nat. Immunol.* **1**, 342–347 (2000).

LITERATURVERZEICHNIS

- [63] Khush, R., Cornwell, W., Uram, J. & Lemaitre, B. A ubiquitin-proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficiency signaling cascade. *Current Biology* **12**, 1728–1737 (2002).
- [64] Klein, T. & Arias, A. M. Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during *Drosophila* wing development. *Dev.* **125**, 2951–2962 (1998).
- [65] Dolph, P. *et al.* Arrestin function in inactivation of G-protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. *Science* **260**, 1910–1916 (1993).
- [66] Dijkers, P. & O'Farrell, P. *Drosophila* calcineurin promotes induction of innate immune responses. *Curr. Biol.* **17**, 2087–2093 (2007).
- [67] Shimoda, R. *et al.* Metallothionin is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol. Sciences* **73**, 294–300 (2003).
- [68] Galli, S., Tsai, M. & Piliponsky, A. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–454 (2008).
- [69] Meister, M. & Richards, G. Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipterecin gene in *Drosophila* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 155–160 (1996).
- [70] Lefesant, J., Kejzlarova-Lefesant, J. & Garen, A. Ecdysone-inducible functions of larval fat bodies in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 5570–5574 (1978).
- [71] Wang, T. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D-3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* **173**, 2909–2912 (2004).
- [72] Machado, D., Horton, D. & Harrop, R. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2972–2980 (1996).
- [73] Gauchat, J., Henchoz, S. & Mazzei, G. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* **365**, 340–343 (1993).

LITERATURVERZEICHNIS

- [74] Shakib, F., Schulz, O. & Sewll, H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. *Immunol. today* **19**, 313–316 (1998).
- [75] Kaneko, T. *et al.* Monomeric and polymeric Gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* **20**, 637–649 (2004).
- [76] Alexander, C. & Rietschel, E. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endtox. Res.* **7**, 167–202 (2001).
- [77] Takai, T. *et al.* Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25 and α_1 -Antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **137**, 194–200 (2005).
- [78] Pham, L., Dionne, M., Shirasu-Hiza, M. & Schneider, D. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLOS Pathogens* **3**, 1–8 (2007).
- [79] Hultmark, D. & Borge-Renberg, K. *Drosophila* immunity: is antigen processing the first step? *Current Biol.* **17**, R22–24 (2006).
- [80] Hanada, K. *et al.* Isolation and characterization of E64, a new thiol protease inhibitor. *Agricol. Biol. Chem.* **42**, 523–528 (1978).
- [81] Yamamoto, D. *et al.* Refined x-ray structure of papain-E64-c complex at 2.1-Å. *Biol Chem* **266**, 14771–14777 (1991).
- [82] Aggarwal, K. & Silverman, N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB reports* **41**, 267–277 (2008).
- [83] Pierce, K., Premont, R. & Lefkowitz, R. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 639–650 (2002).
- [84] Ji, T., Grossmann, M. & Ji, I. G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 17299–17302 (1998).

LITERATURVERZEICHNIS

- [85] Goodman, O., Krupnick, J., Gurevich, V., Benovic, J. & Keen, J. Arrestin/clathrin interaction. *J. Biol. Chem.* **272**, 15017–15022 (1997).
- [86] Szentivanyi, A., Heim, O. & Schultze, P. Changes in adrenoreceptor densities in membranes of lung tissue and lymphocytes from patients with atopic disease. *Ann. NY Acad. Sci.* **332**, 295–298 (1979).
- [87] Danner, S., Frank, M. & Lohse, M. Agonist regulation of human β 2-adrenergic receptor mRNA stability occurs via a specific AU-rich element. *J. Biol. Chem.* **273**, 3223–3229 (1998).
- [88] Hadcock, J., Ros, M. & Malbon, C. Agonist regulation of β -adrenergic receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* **264**, 13956–13961 (1989).
- [89] Rusnak, F. & Mertz, P. Calcineurin: Form and function. *Physiol. Rev.* **80**, 1483–1521 (2000).
- [90] Schmidt, R., Trejo, T., Plummer, T., Platt, J. & Tang, A. Infection-induced proteolysis of PGRP-LC controls the IMD activation and melanization cascades in *Drosophila*. *The FASEB Journal* **22**, 918–929 (2008).
- [91] Asokanathan, N. *et al.* House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J. Immunol.* **169**, 4572–4578 (2002).
- [92] Tsao, P. *et al.* Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Dev.* **136**, 2297–2307 (2009).
- [93] Tilley, A. *et al.* Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium is associated with smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **179**, 457–466 (2009).
- [94] Karim, F., Guild, G. & Thummel, C. The *Drosophila* broad-complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Dev.* **118**, 977–988 (1993).

LITERATURVERZEICHNIS

- [95] Wagner, C., Isermann, K. & Roeder, T. Infection induces a survival program and local remodeling in the airway of the fruitfly. *FASEB J* **23**, 2045–2054 (2009).
- [96] Franc, N., Dimarcq, J., Lagueux, M., Hoffmann, J. & Ezekowitz, R. Croquemort, a novel hemocyte macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431–443 (1996).
- [97] Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L. & Haenlin, M. Cooperation between the GATA and RUNX factors serpent and lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *The EMBO Journal* **22**, 6516–6525 (2003).
- [98] Hart, K. & Wilcox, M. A *Drosophila* gene encoding an epithelial membrane protein with homology to CD36/LIMP-II. *J. Mol. Biol.* **234**, 249–253 (1993).
- [99] Qin, W., Neal, J., Robertson, R., Westwood, J. & Walkes, V. Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* **14**, 607–613 (2005).
- [100] Hisbergues, M. *et al.* *In vivo* and *in vitro* immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by *Lactobacillus plantarum* bacteria. *Clin. and Exp. Allergy* **37**, 1286–1295 (2007).

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn **Prof. Dr. Thomas Roeder** für die Bereitstellung des Themas, die Bereitschaft einmal die Woche in das kleine, fast schon gallisch anmutende Dorf Borstel zu fahren, um dort die Externen zu betreuen und natürlich für die Diskussionsbereitschaft während der ganzen Zeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Artur Joachim (“Jochen”) Ulmer**, der mich als Drosophile (“Drosi”) in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat.

Für die Übernahme meiner Betreuung und des Koreferats sowie fruchtbare Diskussionen bedanke ich mich bei **PD Dr. Holger Heine**.

Bei **Dr. Thomas Scholzen** bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und Thomas...:“Entschuldige, dass ich Dich vergaß.“

Den “Hühnern” **Dr. Ellen Andresen, Dr. Jörn Bullwinkel, Dr. Jennifer Debarry, Dr. Katja Farhat, Dr. Sabine Riekenberg, Dr. Kristina Röschmann, Christine Fahrenkrog, Kimberley Kallsen, Karina Stein** und **Karin Uliczka** danke ich für eine schöne und vor allem lustige Zeit im Labor und so manchen schönen Abend. Ohne euch wäre zum Beispiel unser Sprüchebuch nie entstanden. Ich werde all die kleinen Doppeldeutigkeiten vermissen.

Bei den TAs **Suhad Al-Badri, Ina Goroncy** und **Katrin Sprenger** möchte ich mich für die Unterstützung (vor allem mit den humanen Zellen) und die gute Stimmung im Labor bedanken. Suhad: Danke für deine Arme bei gefühlten tausend Malen des Brutschrank-Umstellens.

Frau **Marisa Böttger** danke ich für die Inhibierung des Der p 1.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen nicht namentlich erwähnten Azubis und ehemaligen Mitarbeitern der Laborgruppe.

Danksagung

Für ihre Unterstützung möchte ich mich auch bei den Kieler “Mädels” **Dr. Kerstin Isermann, Christine Fink, Julia Hoffmann** und **Renja Romey** bedanken, die mir als externer Mitarbeiterin so einige Information beschafft haben und vor allem mit den Arrays eine große Hilfe waren.

Für die moralische Unterstützung und nette Abende möchte ich mich herzlich bei **Dr. Christina Wagner** bedanken.

Meiner **Familie** und meinen **Freunden** danke ich für die Unterstützung und das Verständnis vor allem auch während der Phase des Aufschreibens. Ohne euch wäre es nicht gegangen. Danke für alle willkommenen Ablenkungen.

Großer Dank geht an **Frank**, den unverbesserlichen Optimisten an meiner Seite! Danke für die Hilfe bei allen Computerdingen, dass Du als Fachfremder immer wieder meine Texte gelesen hast und nie müde wurdest, konstruktive Kritik zu üben. Es ist schön, Dich bei mir zu wissen!

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und wurde weder in Gänze noch in Teilen zur Veröffentlichung eingereicht.

Weiterhin ist diese Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) entstanden.

Hamburg, 25. Februar 2010

Christine Warmbold