

Vergleichende Untersuchungen zum Hämocytenbild  
von Larve und Puppe des Tabakswärmers  
*Manduca sexta* L.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie

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

Vorgelegt von Susann Beetz

Dekan: Prof. Dr. J. Janek  
Erstkorrektor: Prof. Dr. T. Trenczek  
Zweitkorrektor: Prof. Dr. A. Dorrestijn

Gießen, im März 2002

*"Von den Gestalten zu künden,  
die einst sich verwandelt in neue Körper,  
so treibt mich der Geist."*

*Ovid: Metamorphosen.*

*"So ist das mit der Metamorphose -  
danach erinnert man sich an nichts mehr."*

*Paul Shipton: Die Wanze. Ein Insektenkrimi.*



(<http://zebra.sc.edu/moth/manduca.html>)

## Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

SCHOLZ F.R., BEETZ S., LESCH C., HOLTHUSEN T. & TRENCZEK T. (1999):

Wie wehren sich Insekten gegen Krankheitserreger? Immunreaktionen bei Insekten. *Spiegel der Forschung* (16)1: 46-52

BEETZ S., HOLTHUSEN T.K. & TRENCZEK T. (in Vorbereitung):

Correlation of hemocyte counts to different physiological developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm *Manduca sexta*.

### *Beiträge zu Tagungen*

BEETZ S. & TRENCZEK T. (1998):

The change in hemocyte pattern during metamorphosis in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Verh Dtsch Zool Ges* 91: 19

HOLTHUSEN T.K., BEETZ S. & TRENCZEK T. (1999):

Is there a correlation between the changes of the hemocyte pattern and the time course of the development in insects? *Verh Dtsch Zool Ges* 92: 22

HOLTHUSEN T.K., BEETZ S., KOOLMANN J. & TRENCZEK T. (2000):

Hemolymph changes at the beginning of the metamorphosis with special reference to the ecdysone titer in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Verh Dtsch Zool Ges* 93: 8

BEETZ S. & TRENCZEK T. (2000):

The hemocytes of the tobacco hornworm *Manduca sexta* from the developmental point of view. Proceedings of the Annual Meeting of the Arbeitskreis Comparative Immunology of the DGfI, Rauschholzhausen / Germany

ANDERL I., BEETZ S. & TRENCZEK T. (2001):

Morphological changes in plasmatocyte appearance during infection and development suggests different plasmatocyte subtypes in *Manduca sexta*. *Verh Dtsch Zool Ges* 94: 11

BEETZ S., HARENGEL-WEINLICH M. & TRENCZEK T. (2002, in Vorbereitung):

Changes in morphology and cell types of the hematopoietic organ during the last larval instar of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Annual Meeting of the DZG

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Die Blutzellen der Insekten.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Hämozyten während der Embryogenese .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Hämozyten im Larvenstadium.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Hämozyten im Puppen- und Adultstadium.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Moleküle mit Bedeutung für Abwehr- und Entwicklungsprozesse.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 Methodische Ansätze zur Charakterisierung der Hämozyten.....</b>	<b>12</b>
<b>1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation .....</b>	<b>13</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Versuchstiere.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Allgemeine Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Häufig verwendete Lösungen.....	16
2.2.2 Aufbereitung der Hämozyten und des Hämolympplasmas .....	18
2.2.2.1 Gewinnung der Hämolymphe .....	18
2.2.2.2 Aufbereitung der Hämozyten für die Transmissionselektronenmikroskopie.....	18
2.2.2.3 Herstellung von Hämozytenmonolayern für die Immunhistochemie.....	19
2.2.2.4 Aufbereitung der Hämozyten für die Gelelektrophorese .....	20
2.2.3 Tierpräparation und Gewebeschnitte .....	20
2.2.3.1 Vorbereitung der Tiere zur Präparation.....	20
2.2.3.2 Herstellung von Ganztierschnitten.....	20
2.2.3.3 Organpräparationen für die Gelelektrophorese .....	21
2.2.4 Immunhistochemie .....	22
2.2.5 Mikroskopie und Fotografie .....	23
2.2.6 Elektrophorese und Western-Blot-Analyse .....	24
2.2.6.1 SDS-PAGE.....	24
2.2.6.2 Native PAGE.....	26
2.2.6.3 Gelfärbungen.....	26
2.2.6.4 Semi-Dry Western Blot.....	28
2.2.6.5 Chemilumineszenz und Strippen von Western-Blot-Membranen.....	31
2.2.6.6 Berechnung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine .....	32
2.2.7 Hybridomazellkultur .....	32
2.2.7.1 Routinehaltung der Hybridomakulturen.....	32
2.2.7.2 Subklonieren der Hybridomazellkulturen.....	34
2.2.8 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) .....	34
2.2.9 Proteinfällung mit Ammoniumsulfat .....	35
<b>2.3 Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen .....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Screening der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994).....	35
2.3.2 Western-Blot-Analyse von Hämozytenlysaten und Hämolympplasma.....	36
2.3.3 Nachweis der Zusammengehörigkeit von Antikörpern.....	36
2.3.4 Test der Antikörperbindung an Geweben.....	37

<b>2.4 Bindungseigenschaften von Lektinen an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen.....</b>	<b>37</b>
2.4.1 Screening von Lektinen .....	37
2.4.2 Western-Blot-Analyse von Hämozytenlysaten und Hämolymp plasma.....	38
2.4.3 Test der Lektinbindung an Geweben .....	39
<b>2.5 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität auf Larven- und Puppen-hämozyten .....</b>	<b>40</b>
2.5.1 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität in der Immunhistochemie .....	40
2.5.2 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität in der Western-Blot-Analyse.....	40
<b>2.6 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zum <i>Arachis hypogaea</i>-Lektin.....</b>	<b>41</b>
2.6.1 Charakterisierung des Liganden zum <i>Arachis hypogaea</i> -Lektin .....	41
2.6.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung.....	43
2.6.3 Herstellung einer Affinitätschromatographiesäule mit dem <i>Arachis hypogaea</i> -Lektin.....	44
2.6.4 Affinitätschromatografie mit der Lektin-Säule .....	45
<b>2.7 Charakterisierung und Reinigung des korrespondierenden Antigens zu MS#75 .....</b>	<b>45</b>
2.7.1 Charakterisierung des Liganden zu MS#75.....	45
2.7.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung.....	46
2.7.3 Reinigung des Antikörpers MS#75 .....	47
2.7.4 Immunpräzipitation mit MS#75 .....	48
2.7.5 Größenausschlußchromatografie.....	48
2.7.6 Herstellung einer Affinitätschromatographiesäule mit MS#75.....	49
2.7.7 Affinitätschromatografie mit der MS#75-Säule.....	49
<b>2.8 Trennung von Hämozyten über Dichtegradientenzentrifugation.....</b>	<b>50</b>
2.8.1 Vorbereitung der Percollösung.....	50
2.8.2 Trennung von Hämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten.....	51
2.8.2.1 Herstellung eines kontinuierlichen Percollgradienten.....	51
2.8.2.2 Vorbereitung der Hämozyten und Auftrag auf den Gradienten .....	52
2.8.2.3 Abtragen des Percollgradienten.....	52
2.8.2.4 Auswertung der Zelltrennung .....	53
2.8.3 Trennung von Hämozyten über einen diskontinuierlichen Percollgradienten.....	54
2.8.3.1 Herstellung eines diskontinuierlichen Percollgradienten .....	54
2.8.3.2 Abtragen des Percollgradienten.....	54
<b>2.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>55</b>
2.9.1 Probenvorbereitung .....	55
2.9.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	55
2.9.3 Zweite Dimension: SDS-PAGE .....	56
2.9.4 Silberfärbung der Fertiggele .....	57
<b>2.10 In vitro-Kultivierung von Hämozyten in Anwesenheit von b-Ecdyson.....</b>	<b>59</b>
2.10.1 Gewinnung der Hämozyten.....	59
2.10.2 Kultivierung der Hämozyten.....	59
2.10.3 Auswertung der Hämozytenkulturen.....	61
<b>2.11 Untersuchungen zur Hämatopoiese im fünften Larvenstadium.....</b>	<b>62</b>
2.11.1 Präparation der hämatopoietischen Organe .....	62
2.11.2 Aufbereitung der hämatopoietischen Organe für weitere Untersuchungen.....	62
2.11.3 Untersuchungen zur Zellteilungsaktivität der Hämozyten.....	64
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Allgemeine Beobachtungen zu Hämozyten von Larven und Puppen.....</b>	<b>65</b>
3.1.1 Licht- und elektronenmikroskopischer Vergleich der Hämozyten von Larven und Puppen .....	65
3.1.2 Bestimmung von THC und DHC .....	66
<b>3.2 Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen .....</b>	<b>71</b>
3.2.1 Screening der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994).....	71

3.2.2 Monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppenhämozyten: Immunhistologische Bilder und Western-Blot-Analysen .....	77
3.2.3 Nachweis der Zusammengehörigkeit von Antikörpern .....	104
3.2.4 Test der Antikörperbindung an Geweben .....	106
<b>3.3 Bindungseigenschaften von Lektinen an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen.....</b>	<b>128</b>
3.3.1 Screening der Lektine .....	128
3.3.2 Lektine mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppen-hämozyten: Immunhistologische Bilder und Western Blots .....	129
3.3.3 Test der Lektinbindung an Geweben .....	132
<b>3.4 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität auf Larven- und Puppen-hämozyten .....</b>	<b>134</b>
3.4.1 Einsatz der Antikörper gegen <i>Manduca sexta</i> -Lipophorin und <i>Hyalophora cecropia</i> -Arylphorin.....	134
3.4.2 Einsatz der Antikörper gegen muskelspezifisches Myosin aus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	137
3.4.3 Einsatz der Antikörper gegen <i>Manduca sexta</i> -Ecdysonrezeptoren.....	137
<b>3.5 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zum <i>Arachis hypogaea</i>-Lektin.....</b>	<b>140</b>
3.5.1 Charakterisierung des Liganden zum <i>Arachis hypogaea</i> -Lektin .....	140
3.5.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung .....	143
3.5.3 Affinitätschromatografie mit der Lektin-Säule .....	145
<b>3.6 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zu MS#75 .....</b>	<b>148</b>
3.6.1 Charakterisierung des Liganden zu MS#75.....	148
3.6.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung.....	149
3.6.3 Reinigung des Antikörpers MS#75 .....	151
3.6.4 Immunpräzipitation mit MS#75 .....	151
3.6.5 Größenausschlußchromatografie.....	152
3.6.6 Herstellung einer Affinitätschromatografiesäule mit MS#75.....	154
3.6.7 Affinitätschromatografie mit der MS#75-Säule.....	154
<b>3.7 Trennung von Hämozyten über Percollichtgradientenzentrifugation.....</b>	<b>156</b>
3.7.1 Trennung von Hämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten.....	156
3.7.1.1 Allgemeine Bemerkungen.....	156
3.7.1.2 Trennung von Larvenhämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten.....	157
3.7.1.3 Trennung von Puppenhämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten.....	159
3.7.1.4 Vergleich der Trennungen larvaler und pupaler Hämozyten.....	161
3.7.2 Trennung von Hämozyten über einen diskontinuierlichen Gradienten.....	161
<b>3.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>163</b>
3.8.1 Allgemeine Bemerkungen .....	163
3.8.2 Vergleich der Lysate von Larven- und Puppenhämozyten.....	163
3.8.3 Vergleich der Lysate der Larvenhämozyten und der hämatopoietischen Organe.....	164
3.8.4 Vergleich der Lysate der Hämozytenfraktionen aus dem diskontinuierlichen Percollgradienten.....	164
<b>3.9 In vitro-Kultivierung von Hämozyten in Anwesenheit von b-Ecdyson.....</b>	<b>167</b>
3.9.1 Vorversuche zur <i>in vitro</i> -Kultivierung.....	167
3.9.2 Auswertung der <i>in vitro</i> -Kultur in den 96-Loch-Platten.....	168
3.9.3 Auswertung der <i>in vitro</i> -Kultur auf den Zellkulturobjektträgern.....	168
<b>3.10 Untersuchungen zur Hämatopoiese im fünften Larvenstadium.....</b>	<b>172</b>
3.10.1 Allgemeine Beobachtungen in Bezug auf das hämatopoietische Organ .....	172
3.10.2 Nachweis der Zellteilungsaktivität in den hämatopoietischen Organen und frei flottierenden Hämozyten .....	173
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>175</b>
<b>4.1 Allgemeine Beobachtungen zu Hämozyten von Larven und Puppen.....</b>	<b>175</b>
4.1.1 Licht- und elektronenmikroskopischer Vergleich der Hämozyten von Larven und Puppen .....	175
4.1.2 Bestimmung von THC und DHC .....	178

<b>4.2 Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper an Hämozyten von Larven und Puppen .....</b>	<b>180</b>
4.2.1 Screening der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994).....	180
4.2.2 Monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppenhämozyten .....	184
4.2.2.1 Hämozyten und Basallamina .....	188
4.2.2.2 Hämozyten und Fettkörper.....	191
4.2.2.3 Hämozyten, Integument und kutikuläre Strukturen.....	192
4.2.2.4 Hämozyten und Hämolymp plasma.....	192
4.2.2.5 Hämozyten und Dorsalgefäß.....	194
4.2.2.6 Hämozyten und Nervengewebe .....	195
4.2.2.7 Hämozyten und Malpighische Gefäße .....	195
4.2.2.8 Hämozyten und Speicheldrüsen.....	196
4.2.2.9 Hämozyten und Muskeln.....	197
4.2.2.10 Hämozyten und hämatopoietisches Organ.....	197
<b>4.3 Bindungseigenschaften von Lektinen an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen.....</b>	<b>198</b>
4.3.1 Screening der Lektine .....	198
4.3.2 Lektine mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppen-hämozyten.....	200
<b>4.4 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität auf Larven- und Puppen-hämozyten .....</b>	<b>201</b>
4.4.1 Einsatz der Antikörper gegen <i>Manduca sexta</i> -Lipophorin und <i>Hyalophora cecropia</i> -Arylphorin.....	201
4.4.2 Einsatz der Antikörper gegen muskelspezifisches Myosin aus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	203
4.4.3 Einsatz der Antikörper gegen <i>Manduca sexta</i> -Ecdysonrezeptoren.....	204
<b>4.5 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zum <i>Arachis hypogaea</i>-Lektin.....</b>	<b>206</b>
4.5.1 Charakterisierung des Liganden zum <i>Arachis hypogaea</i> -Lektin .....	206
4.5.2 Solubilisierung und Anreinigung des Liganden.....	208
<b>4.6 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zu MS#75 .....</b>	<b>209</b>
4.6.1 Charakterisierung des Liganden zu MS#75.....	209
4.6.2 Solubilisierung und Anreinigung des Liganden.....	211
<b>4.7 Trennung von Hämozyten über Percoll-dichtegradientenzentrifugation.....</b>	<b>212</b>
<b>4.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....</b>	<b>214</b>
<b>4.9 In vitro-Kultivierung von Hämozyten in Anwesenheit von b-Ecdyson.....</b>	<b>218</b>
4.9.1 Bemerkungen zur <i>in vitro</i> -Kultivierung der Hämozyten.....	218
4.9.2 Adhärenz und Migrationsverhalten der Hämozyten <i>in vitro</i> , Einfluß von $\beta$ -Ecdyson .....	219
4.9.3 Apoptose unter dem Einfluß von $\beta$ -Ecdyson.....	220
4.9.4 Weitere mögliche $\beta$ -Ecdysonwirkungen.....	222
<b>4.10 Untersuchungen zur Hämatopoese im fünften Larvenstadium.....</b>	<b>223</b>
4.10.1 Aufbau der hämatopoietischen Organe.....	223
4.10.2 Theorien zur Hämatopoese.....	226
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>231</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>233</b>
<b>7 Abkürzungen .....</b>	<b>249</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>251</b>
Anhang 1 .....	251
Anhang 2 .....	254
Anhang 3 .....	271
Anhang 4 .....	273
Anhang 5 .....	275

## 1 Einleitung

Die Klasse der Insekten ist das arten- und individuenreichste Taxon im Tierreich. Mit Ausnahme von Habitaten in und unter dem offenen Meer besiedeln die Insekten alle Gebiete unserer Erde. Ihr Erfolg beruht zum einen auf dem außerordentlich widerstandsfähigen Panzer, dem Exoskelett, und den diversen Anhängen, die als Antennen, Mundwerkzeuge, Beine und Flügel die unterschiedlichsten Funktionen erfüllen. Zum anderen können sie mit ihrer kurzen Reproduktionsphase schnell auf veränderte Umweltbedingungen "reagieren", d.h. für die jeweilige Situation "vorteilhaften" Mutationen breiten sich schnell aus. Vom evolutionären Standpunkt aus gesehen ist diese Tiergruppe flexibel. Besonders interessant scheint dabei die "Erfindung" der Metamorphose der Insekten. Hierbei entwickelt sich das erwachsene Tier aus der Larve über ein Nymphen- bzw. Puppenstadium. Insbesondere bei den holometabolen Insekten eröffnet sich für jedes Individuum innerhalb eines Lebens die Möglichkeit, verschiedene Lebensräume zu nutzen, d.h. Larve und Imago sind keine Nahrungs- und Platzkonkurrenten.

Insekten sind extrem resistent gegenüber Infektionen. Einen besonderen Schutz bietet der feste Chitinpanzer als erste Barriere gegen viele potentielle Pathogene. Er umkleidet das Insekt außen und weite Bereiche des Darmes. Gelingt es einem Pathogen diese Barriere zu überwinden, wird seine weitere Verbreitung und Vermehrung im Körper durch ein effektives Immunsystem eingedämmt bzw. unterbunden. Wie bei allen Invertebraten beruht das Immunsystem der Insekten auf Mechanismen, die der "natürlichen" oder "angeborenen" Immunität zugeordnet werden. "Adaptive" Immunität, wie sie Vertebraten besitzen, gibt es bei Insekten nicht.

Die immunologischen Prozesse werden in humorale und zelluläre Mechanismen unterteilt. Zu den humoralen Immunreaktionen zählen die Synthese antimikrobieller Proteine, die Phenoloxidasekaskade, an deren Ende Melanin steht, und die Koagulation ("Clotting") der Hämolymphe, dem Blut der Insekten. Besonders die Synthese antimikrobieller Proteine und ihre Regulation über vorgeschaltete Signaltransduktionskaskaden ist seit langem Objekt intensiver Forschung. Das Wissen über zelluläre Abwehrmechanismen erscheint dagegen fragmentarisch.



## 1.1 Die Blutzellen der Insekten

Die Träger des zellulären Immungeschehens sind die Hämocyten, die Blutzellen der Insekten. Sie können durch Phagozytose, Nodulibildung und Einkapselung potentielle Pathogene aus dem Kreislauf entfernen. Darüber hinaus sind sie am Wundverschluß beteiligt und Syntheseort verschiedener für das Abwehrgeschehen wichtiger Proteine (RATCLIFFE & ROWLEY 1979, LACKIE 1988, GILLESPIE et al. 1997, TRENZCEK 1998). Eine allgemein gültige Nomenklatur für die Hämocyten aller Insektenspezies gibt es nicht. Die große Vielfalt von Lebensstrategien und Entwicklungsprozessen spiegelt sich auch in der vielfältigen Erscheinung und Zusammensetzung der Hämocytenpopulationen wider, so daß eine Verallgemeinerung allenfalls auf der Stufe der Ordnungen (z.B. Lepidoptera, Diptera) - und auch hier nicht immer - möglich ist. Deshalb soll im weiteren hauptsächlich auf die Forschungsergebnisse in Bezug auf die Gruppen der Lepidoptera - der Tabakswärmer *Manduca sexta* als Vertreter dieser Ordnung war Gegenstand der hier präsentierten Arbeit - und der Diptera - zu dieser Ordnung gehört *Drosophila melanogaster*; die Forschung an diesem Modell erbrachte bisher die detailliertesten Ergebnisse - eingegangen werden.

Bei den Lepidoptera können rein morphologisch fünf Hämocytentypen unterschieden werden (HOROHOV & DUNN 1982): granuläre Zellen (GR), Plasmatozyten (PL), Oenocytoide (OE), sphärule Zellen (SP) und Prohämocyten. Granuläre Zellen und Plasmatozyten sind die beiden Zelltypen, die hauptsächlich im Immungeschehen involviert sind (GILLESPIE et al. 1997, TRENZCEK 1998). Plasmatozyten sind fibroblastenähnliche Zellen, die in ihrer Gestalt und auch Funktion an die Makrophagen der Mammalia erinnern. Granuläre Zellen erhielten ihre Bezeichnung durch die vielen granulären Einschlüsse im Cytoplasma. Neben diversen Enzymen scheinen sich u.a. auch Proteine der Clotting-Kaskade in den Granulen zu befinden (ROWLEY & RATCLIFFE 1976, THEOPOLD et al. 2002). Oenocytoide sind der Syntheseort der Prophenoloxidase, des Schlüsselenzyms der Prophenoloxidasekaskade, das die Melaninbildung katalysiert (IWAMA & ASHIDA 1986, ASHIDA & BREY 1995). Den sphärulen Zellen konnte bisher keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. In ihren auffällig großen Sphärulen wurden saure Mucopolysaccharide nachgewiesen. Eine Beteiligung dieser Zellen an der Bildung der extrazellulären Matrix wird angenommen (ASHHURST 1982). Prohämocyten werden als Vorläufer- oder Stammzellen einiger oder aller Hämocytentypen diskutiert. So gelang YAMASHITA und IWABUCHI (2001) der Nachweis von Prohämocyten in *Bombyx mori* und ihre Differenzierung in andere Blutzelltypen, vornehmlich in Plasmatozyten und granuläre Zellen, durch *in vitro*-Kultivierung.

In *D. melanogaster* (Diptera) sind drei Hämozytentypen bekannt: Plasmatozyten, Kristallzellen und Prohämozyten (RIZKI & RIZKI 1984, SHRESTA & GATEFF 1982a). Die Kristallzellen enthalten einen oder mehrere nicht membrangebundene Kristalle, von denen angenommen wird, daß sie Enzyme oder auch Substrate für die Melanisierung enthalten. Somit können sie mit den Oenozytoiden der Lepidoptera verglichen werden. Ein zusätzlicher Blutzelltyp, die Lamellozyten, tritt in *Drosophila*-Larven im letzten Larvenstadium kurz vor der Metamorphose auf und ebenso, wenn größere Pathogene eingekapselt werden (RIZKI & RIZKI 1982, SHRESTA & GATEFF 1982a, RUSSO et al. 1996). Diese Zellen sind flach und sehr groß und enthalten wenige Zellorganellen (RIZKI & RIZKI 1982, SHRESTA & GATEFF 1982a).

## **1.2 Hämozyten während der Embryogenese**

Über die embryonale Herkunft der Hämozyten der Insekten gibt es nur wenige Daten (Zusammenfassung siehe MORI 1979). Die aktuelleren Untersuchungen wurden an *D. melanogaster* durchgeführt. In der Mitte der Embryogenese differenzieren sich einige wenige Zellen aus dem vorderen Mesoderm und bewegen sich in festgelegten Bahnen durch den Embryo bis eine mehr oder minder gleichmäßige Verteilung im gesamten Embryo erreicht ist. Diese Zellen werden phagozytotisch aktiv und daher als embryonale Makrophagen bezeichnet. Sie entfernen apoptotische Zellen (TEPASS et al. 1994). Ungefähr zur selben Zeit differenziert sich eine kleine Gruppe von Zellen und bleibt anterior vom Darm. Aus diesen Zellen gehen die embryonalen Kristallzellen hervor (LEBESTKY et al. 2000). Der Differenzierungsprozeß beider Zellgruppen benötigt den GATA-Transkriptionsfaktor Serpent (REHORN et al. 1996, LEBESTKY et al. 2000). Spezifisch für die phagozytotisch aktiven Zellen ist der Transkriptionsfaktor Glial cells missing (BERNARDONI et al. 1997, LEBESTKY et al. 2000), während der Transkriptionsfaktor der Runt-Familie Lozenge wichtig für die Herausbildung der embryonalen Kristallzellen ist (LEBESTKY et al. 2000).

Gegen Ende der Embryogenese bildet sich dorsal das zukünftige larvale hämatopoietische Organ aus lateralen Mesodermzellen (LEBESTKY et al. 2000). Dort findet die Bildung der larvalen Blutzellen statt. Zumindest für die embryonalen Kristallzellen ist nachgewiesen, daß diese nicht bis in das Larvenstadium überdauern (LEBESTKY et al. 2000).

Auch für die Lepidoptera wird von einer mesodermalen Herkunft der Blutzellen ausgegangen (MORI 1979). Über den weiteren Differenzierungsprozeß der Hämozyten oder über die Entstehung des hämatopoietischen Organs während der Embryogenese ist für diese Insektengruppe bisher noch nichts bekannt.

### 1.3 Hämozyten im Larvenstadium

Das hämatopoietische Organ von *D. melanogaster* werden als Hauptbildungsort der larvalen Hämozyten beschrieben (SHRESTHA & GATEFF 1982a; RIZKI & RIZKI 1984; LANOT et al. 2001). Es besteht aus vier bis sechs Lobenpaaren entlang des Dorsalgefäßes (Herz). Diese Loben enthalten hauptsächlich Prohämozyten, die in der Lage sind, sich sowohl für eine dauernde Hämozytengenerierung als auch als Reaktion auf bestimmte Umstände (Infektion, Metamorphose) in die verschiedenen Blutzelltypen zu differenzieren (CARTON & NAPPI 1997, LANOT et al. 2001). Im hämatopoietischen Organ von *D. melanogaster* wurden außerdem die sogenannten sekretorischen Zellen identifiziert, die sich nicht unter den frei flottierenden Hämozyten befinden. Diese Zellen scheinen proteinsynthetisch hoch aktiv zu sein (LANOT et al. 2001).

Sowohl im hämatopoietischen Organ als auch in den frei flottierenden Hämozyten von *D. melanogaster* gelang der Nachweis der Transkriptionsfaktoren Glial cells missing in den Plasmatozyten und Lozenge in den Kristallzellen (LEBESTKY et al. 2000). Dies veranlaßte die Autoren zum einen, die embryonalen Zellen mit vergleichbarem Expressionsmuster entsprechend den larvalen Blutzellen zu bezeichnen (siehe oben), und zum anderen, eine ähnliche Regulation der Blutzelldifferenzierung im Larvenstadium im Vergleich zum Embryo anzunehmen.

In den Larven der Lepidoptera befinden sich Organe mit hoher Zellteilungsaktivität dicht an den vier Flügelanlagen im meso- und metathorakalen Segment. Diese Organe können sehr verschiedene, artspezifische Formen haben (HINKS & ARNOLD 1977). Aufgrund morphologischer Übereinstimmungen der Zellen dieser Organe mit frei flottierenden Hämozyten wird allgemein davon ausgegangen, daß es sich dabei um die hämatopoietischen Organe der Lepidoptera handelt (ARNOLD & HINKS 1977, MONPEYSSIN & BEAULATON 1978). Ein Nachweis für diese Hypothese mit anderen z.B. cytologischen, immunologischen oder molekularbiologischen Methoden ist bisher noch nicht erfolgt. Erste Untersuchungen mit neueren Techniken wurden von GARDINER und STRAND (2000) an *Pseudoplusia includens* und *Spodoptera frugiperda* durchgeführt. Welche Zellen sich in den Loben der hämatopoietischen Organe befinden, ist noch nicht geklärt, genauso wie es keinen Konsensus über die "Verwandtschaftsbeziehungen" der verschiedenen Hämozytentypen gibt. Es wird angenommen, daß sich hauptsächlich die pluripotenten Prohämozyten in den hämatopoietischen Organen befinden. HINKS und ARNOLD (1977) schlagen vor, daß sich aus diesen Prohämozyten vor allem Plasmatozyten entwickeln. Die Beobachtungen von BEAULATON (1979) und GARDINER und STRAND (2000) bestätigen diese Hypothese.

AKAI und SATO (1971) beschrieben für das dritte, vierte und fünfte Larvenstadium von *Bombyx mori*, daß das Volumen der hämatopoietischen Organe nur innerhalb eines Larvenstadiums zunimmt, wogegen es während der Übergänge von einem zum nächsten Larvenstadium abnimmt. Diese Beobachtungen korrelieren mit den hohen THC-Werten ("total hemocyte count", Zelltiter) vor den Häutungen, wie sie für viele Arten beschrieben wurden (z.B. für *B. mori* - NITTONO 1960).

Während der letzten Tage des letzten Larvenstadiums verkleinert sich das Volumen der hämatopoietischen Organe in *B. mori* (AKAI & SATO 1971). Kurz nach der Verpuppung konnten keine Loben mehr nachgewiesen werden. Ähnliches wurde für *D. melanogaster* beobachtet: Mit Beginn der Metamorphose entleeren sich die Loben des hämatopoietischen Organs, mit Beginn des Puppenstadiums sind sie leer und nur wenige Stunden nach der Verpuppung verschwinden sie ganz (LANOT et al. 2001).

Hinsichtlich der in der Hämolymphe frei flottierenden Hämozyten, gemessen am THC und DHC ("differential hemocyte count", differentieller Titer), gibt es eine Reihe von Untersuchungen in den Larven vieler Insektengruppen, z.B.: Hemiptera (BAHADUR & PATHAK 1971, JONES 1967), Orthoptera (OGEL 1955, HOFFMANN 1970b), Blattodea (PATTON & FLINT 1959, WHEELER 1963), Diptera (JONES 1956, RIZKI 1957, LANOT et al. 2001) und Lepidoptera (NITTONO 1960, GARDINER & STRAND 2000). Auch wenn ein direkter Vergleich der Werte nicht möglich ist, so fällt doch bei allen Untersuchungen eine Korrelation der Titerveränderungen mit anderen Entwicklungsvorgängen, z.B. Wachstum, Häutung und phänotypische Eigenheiten bestimmter Entwicklungsstadien auf.

Da die Veränderungen der ermittelten Hämozytentiter einem bestimmten zeitlichen Muster folgen, ist anzunehmen, daß die Blutzellen unter der Kontrolle der häutungs- und entwicklungssteuernden Hormone stehen. Erste Ergebnisse zeigen den direkten Zusammenhang zwischen einem erhöhten  $\beta$ -Ecdyson-Titer und der morphologischen Veränderung von Hämozyten in *D. melanogaster* (LANOT et al. 2001).

Auch die Syntheseaktivität der Hämozyten scheint den Entwicklungsprozessen angepaßt zu sein. SASS und Mitarbeiter (1994) fanden in der Larve des Schmetterlings *Calpododes ethlius* diverse Peptide, die von Hämozyten synthetisiert wurden und nach der Häutung in der Basallamina und sogar der Kutikula nachgewiesen werden konnten.

Trotz allem scheint ungeklärt, ob Hämozyten allein auf die Veränderung der Hormontiter reagieren oder auch auf sich änderndes z.B. apoptotisches Gewebe innerhalb des Insekts. Für letzteres gibt es Hinweise aus Untersuchungen in *Drosophila*-Embryonen. Mit Hilfe von Mutanten konnte nachgewiesen werden, daß bestimmte embryonale Zellen phagozytotisch

aktiv werden, wenn das umliegende Gewebe apoptotisch wird (TEPASS et al. 1994). Dabei spielt der Scavenger-Rezeptor Croquemort eine Rolle (FRANC et al. 1996, 1999). *In vitro*-Kultivierungen von larvalen und pupalen Hämocyten aus der Fleischfliege *Sarcophaga peregrina* mit Fettkörper verschiedener Entwicklungsstadien deuten auf beide Möglichkeiten hin, d.h. daß sowohl eine Veränderung der Hämocyten als auch des zu dissoziierenden Gewebes zur Phagozytoseaktivität der Hämocyten führt (KURATA et al. 1989).

#### **1.4 Hämocyten im Puppen- und Adultstadium**

Während des Puppenstadiums von *D. melanogaster* nimmt die Zahl der Kristallzellen in der Hämolymphe ab. In der Hämolymphe der adulten Fliegen können sie nicht mehr nachgewiesen werden. Unter *in vitro*-Bedingungen sind die pupalen im Vergleich zu den larvalen Plasmatozyten wesentlich adhäsiver. Die Plasmatozyten adulter Tiere zeigen keine Mitoseaktivität mehr und sind nur noch eingeschränkt phagozytotisch aktiv (LANOT et al. 2001).

Über die Hämocyten in Puppen und Imagines der Lepidoptera ist nur sehr wenig bekannt. Erst kürzlich wurde beschrieben, daß die Hämocyten adulter *M. sexta* Tintepartikel phagozytieren können (JONES & SCHWARTZ 2001).

Es gibt nur einige wenige Untersuchungen über die Funktion der Hämocyten bei der Umgestaltung von Geweben während der Metamorphose (WIGGLESWORTH 1956, 1973, 1979a, 1979b, ASHHURST 1979, WHITTEN 1964, 1969). In neueren Arbeiten stehen besonders drei Prozesse im Mittelpunkt: die Flügelentwicklung, die Umgestaltung der Muskulatur und die Dissoziation bestimmter Bereiche des Fettkörpers. Während der Flügelentwicklung phagozytieren die Hämocyten offensichtlich die Basallamina bzw. apoptotische epidermale Zellen und produzieren Bestandteile der neuen adulten Basallamina (*M. sexta* - NARDI & MIKLASZ 1989, NARDI et al. 2001, *D. melanogaster* - KIGER et al. 2001). Bei der Umgestaltung der Muskulatur wurde beobachtet, wie Hämocyten Muskelfibrillen phagozytierten bzw. die Basallamina von Muskelfibrillen abbauten (*Calliphora erythrocephala* - CROSSLEY 1968, *M. sexta* - RHEUBEN 1992, *D. melanogaster* - LANOT et al. 2001). Der Arbeitsgruppe um Natori gelang aus *Sarcophaga peregrina* die Isolation und Charakterisierung zweier Membranproteine und einer Protease der Hämocyten. Diese Proteine stehen in direktem Zusammenhang mit der Dissoziation des pupalen Fettkörpers (NATORI et al. 1999, HORI et al. 2000, NISHIKAWA & NATORI 2001).

Die Hämocyten sind sowohl an immunologischen als auch an entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. Besonders im Larven- und Puppenstadium scheinen die Hämocyten beide Funktionen zu erfüllen. Einerseits können sie während einer Immunreaktion zwischen "Selbst" und "Nicht-Selbst" unterscheiden und das "Nicht-Selbst" entfernen, andererseits reagieren sie in Vorbereitung auf und während der Metamorphose gegen "Selbst". In beiden Fällen spielt der entwicklungsgeschichtlich alte Prozeß der Phagozytose eine wesentliche Rolle. Daher sind Veränderungen im Cytoskelett, in der Ausstattung mit Enzymen, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und anderen Molekülen von Signaltransduktionskaskaden bei den Hämocyten anzunehmen bzw. schon beobachtet worden.

### **1.5 Moleküle mit Bedeutung für Abwehr- und Entwicklungsprozesse**

Die wohl beeindruckendste Überschneidung von immun- und entwicklungsrelevanten Prozessen ist die Signaltransduktion über transmembranständige Rezeptoren der Toll-Familie und induzierbare Transaktivatorproteine der *rel/NF-κB*-Familie. Das erste in *D. melanogaster* identifizierte Toll-Protein, welches dieser Familie den Namen gab, und das in der nachgeschalteten Signalkaskade relevante NF-κB-Protein Dorsal spielen eine Schlüsselrolle bei der Festlegung der Dorsoventralachse im Embryo. Im Immungeschehen sind diese und weitere Proteine dieser Familien erforderlich, damit die Gene der verschiedenen Immunproteine transkribiert werden (siehe Zusammenfassung IMLER & HOFFMANN 2000, 2001).

Bei vielen immunrelevanten Proteinen wurde eine Veränderung der Expression im Verlauf der Individualentwicklung festgestellt (Lysozym in *Heliothis virescens* – CHUNG & OURTH 2000; Hemolin in *Hyalophora cecropia* - TRENCZEK 1998; Cecropin in *D. melanogaster* – SAMAKOVLIS et al. 1990; Sarcotoxin Ia in *Sarcophaga peregrina* – NANBU et al. 1988). Bei diesen Untersuchungen lagen die entsprechenden Titer in den Puppen stets höher als in den Larven. Die Veränderung solcher Expressionsmuster konnte zumindest für *D. melanogaster* mit dem Einfluß von  $\beta$ -Ecdyson in Verbindung gebracht werden, das offensichtlich direkt in den NF-κB-Signaltransduktionsweg eingreift (MEISTER & RICHARDS 1996, DIMARCQ et al. 1997).

Interessanterweise ändert sich die Bedeutung der Syntheseorte für einige Immunproteine während der Entwicklung. So ist in *M. sexta* für Lysozym (RUSSELL & DUNN 1991) und Hemolin (YU & KANOST 1999) bekannt, daß die erhöhte Produktion der beiden Proteine mit Beginn der Metamorphose in den epidermalen Zellen des Mitteldarmes stattfindet.

### **1.6 Methodische Ansätze zur Charakterisierung der Hämocyten**

Die Klassifizierung der Hämocyten erfolgte historisch zunächst nach morphologischen Gesichtspunkten mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie. Darüber hinaus wurden unterschiedliche histologische Färbereigenschaften und Aktivitätsunterschiede bei immunologischen Prozessen wie z.B. der Phagozytose zur Typisierung herangezogen (JONES 1962, ROWLEY & RATCLIFFE 1981, LACKIE 1988). Auf diese Weise wurde zumindest eine einheitliche Nomenklatur für die Hämocyten auf der Ebene der Insektenordnungen erreicht. Eine Klassifizierung nach diesen Kriterien wird allerdings schwierig, wenn sich im Verlauf der untersuchten Prozesse die Hämocyten entweder morphologisch oder deren Inhaltsstoffe verändern. Am beeindruckendsten geschieht dies bei einer Einkapselungsreaktion, bei der die Hämocyten stark abflachen und so eine dichte Kapsel um den Eindringling bilden (PECH & STRAND 1996, WIEGAND et al. 2000). Deshalb war es wichtig, spezifische biochemische Marker zu kreieren bzw. zu nutzen, um eine objektive Klassifizierung der Hämocyten zu erreichen. Zunächst wurde die Bindung von Lektinen an spezifische Kohlenhydratkomponenten ausgenutzt (RIZKI & RIZKI 1983, NAPPI & SILVERS 1984, LI & CHRISTENSEN 1990, MCKENZIE & PRESTON 1992). Ein weiterer Ansatz war die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die nun in einer Reihe von Laboratorien zum Einsatz kommen (TRENCZEK & BENNICHI 1992, CHAIN et al. 1992, MULLETT et al. 1993, WILLOTT et al. 1994, STRAND & JOHNSON 1996, HORI et al. 1997). Gerade in Hinblick auf die Erfolge in der Vertebratenhämatologie scheint der methodische Ansatz mit monoklonalen Antikörpern sehr vielversprechend. Neben der Identifizierung der Zellen ist es mit Hilfe dieser Antikörper möglich z.B. Zellen über ein FACS-Gerät (Fluorescence Asssembled Cell Sorting; z.B. NARDI et al. 2001) oder magnetische Kugeln zu sortieren oder Zellfunktionen durch die Interaktion der Antikörper mit den entsprechenden Antigenen zu beeinflussen (z.B. KURATA et al. 1991, WIEGAND et al. 2000). Darüber hinaus bieten monoklonale Antikörper die Möglichkeit, Proteine, die spezifisch für eine Hämocytenpopulation sind oder beim Vergleich zweier Zustände unterschiedlich exprimiert auftreten, zu isolieren und zu charakterisieren, wie in der vorliegenden Arbeit. Über die Identität bzw. Eigenschaften einzelner Proteine lassen sich dann Rückschlüsse auf die Funktionen der Zellen ziehen.

Um einzelne Hämocytenpopulationen voneinander zu trennen, wurde bisher hauptsächlich die Separation über Dichtegradientenzentrifugation genutzt (MEAD et al. 1986, HUXHAM & LACKIE 1988, MCKENZIE & PRESTON 1992, PECH et al. 1994). Eine weitere Optimierung dieser oder der oben genannten Separationsmethoden scheint sinnvoll, denn die Trennung von

funktionell unterschiedlichen Zelltypen könnte u.a. zur Aufklärung der Interaktionen der Hämocyten untereinander beitragen.

In den letzten Jahren gab es entscheidende methodische Fortschritte in der Zellbiologie. So ist es möglich, eine differentielle Genexpression auf der Ebene der mRNA (Differential Display, DNA-Microarrays) und auch auf Proteinebene (zweidimensionale Gelelektrophorese, MALDI-TOF) darzustellen. Auf beiden Wegen gibt es im Bereich der Insektenimmunologie und -entwicklungsbiologie erste Erfolge (Beispiele: mRNA-Ebene - ASLING et al. 1995, DE GREGORIO et al. 2001, IRVING et al. 2001, Proteinebene - UTTENWEILER-JOSEPH et al. 1998, ERICSSON 1999, HAN et al. 1999). In diesen methodischen Ansätzen liegt sehr viel Potential, um letztendlich die Herkunft, Differenzierung und Funktion der Hämocyten zu entschlüsseln.

### **1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation**

Zum Zeitpunkt der Formulierung der Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation war über die Blutzellen der Insekten im Allgemeinen und der Lepidoptera im Speziellen aus entwicklungsbiologischer Sicht wenig bekannt. Die Literatur, die zunächst Grundlage dieser Arbeit war, war vor allem aufgrund der nicht einheitlichen Nomenklatur der Hämocyten schwer vergleichbar und teilweise widersprüchlich. Neueste Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der zellulären Immunität der Insekten und bedeutende Hinweise auf Verknüpfungen von immunologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen rückten die Hämocyten erneut in den Mittelpunkt entwicklungsbiologischer Forschungsarbeiten.

Ziel der Dissertation war es, Erkenntnisse zur Entwicklung der Blutzellen der Lepidoptera zu erlangen. Die Untersuchungen konzentrierten sich vor allem auf einen Vergleich zwischen den Blutzellen des letzten Larvenstadiums und der ersten Tage des Puppenstadiums des Tabakswärmers *Manduca sexta*. In diesen Entwicklungsstadien beginnt die Metamorphose, was ein "Umprogrammieren" vieler Zellen und Gewebe im Insektenorganismus bedeutet.

Neben einer allgemeinen vergleichenden Charakterisierung der Larven- und Puppenhämocyten durch Licht- und Elektronenmikroskopie stand vor allem die Charakterisierung der Zellen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern und Lektinen im Vordergrund. Dabei wurden alle zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper aus der Arbeit von WILLOTT und Mitarbeitern (1994) genutzt und eine Reihe von Lektinen mit unterschiedlicher Zuckerspezifität ausgewählt. Durch dieses Screenen waren verschiedene Ergebnisse vorstellbar:



- 1) eine quantitative Veränderung der Bindungseigenschaften des Antikörpers oder Lektins, in dem Sinne, daß derselbe Hämozytentyp in derselben Struktur in veränderter Intensität markiert ist.
- 2) eine qualitative Veränderung der Bindungseigenschaften des Antikörpers oder Lektins, in dem Sinne, daß eine Markierung von den Larven- zu den Puppenhämozyten nicht mehr vorhanden bzw. neu aufgetreten ist bzw. eine andere Struktur im gleichen Hämozytentyp markiert ist.

Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte eine Gruppe von Antikörpern und Lektinen für weitere biochemische und histologische Untersuchungen ausgewählt werden. Die Isolierung und Charakterisierung eines besonders interessanten Liganden sollte angestrebt werden.

Parallel dazu kamen weitere methodische Ansätze zur Determination der Unterschiede zwischen larvalen und pupalen Hämozyten zur Anwendung: Dichtegradientenzentrifugation, *in vitro*-Kultivierung, zweidimensionale Gelelektrophorese.

Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Hypothesen aufgrund von Beobachtungen in Bezug auf Hämatopoiese sowie Differenzierung und Funktion der Blutzellen entwickelt und geprüft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Als Untersuchungsobjekt diente der Amerikanische Tabakswärmer *Manduca sexta*. Eier zum Start der Zucht wurden von AgrEvo (Dr. Knauf) bezogen. Die Hälterung erfolgte weitestgehend wie bei FERNANDO-WARNAKULASURIYA und Mitarbeitern (1988) beschrieben. Die Larven wurden bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16h:8h bei 22°C und ca. 75% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit einer artifiziellen Nahrung gefüttert. Wenn die Larven ins Wanderstadium eintraten und ihren Körper einzuspeicheln begannen, wurden die entsprechenden Zuchtbehälter mit Papierhandtüchern ausgelegt. Die Puppen wurden kurz vor dem Schlupf der Falter in einen Insektenkäfig gelegt. In jedem Käfig befand sich eine Tabakpflanze, meist der Art *Nicotiana tabacum*, an die die Falter die Eier ablegen konnten. Diese wurden dreimal pro Woche abgesammelt.

Ab dem späten L4 Stadium wurden die Larven vereinzelt und ihr Alter im 24-Stunden-Rhythmus bestimmt. Für die einzelnen Experimente standen so Larven definierten Alters zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit waren vor allem Larven des fünften und letzten Larvenstadiums zwei Tage nach der letzten Larvalhäutung (L5d2) und Puppen einen Tag nach der Larval-Pupal-Häutung (Pd1) interessant.

#### **Manduca sexta Diät (nach YAMAMOTO 1969)**

40 g Agar

160 g Weizenkeime

72 g Casein

64 g Saccharose

24 g Salzmischung

32 g Hefe

7 g Cholesterin

4 g Sorbinsäure

2 g Hydroxybenzolsäure-Methylester

mit 2 l A. dest. auffüllen, 30 min kochen, auf 70°C abkühlen lassen

weiterhin hinzufügen:

- 8 g Ascorbinsäure
- 40 ml 4% Formol
- 20 ml Vitaminlösung
- 8 g Leinöl
- 0,4 g Streptomycin

Die Vitaminlösung besteht aus (für 200 ml):

- 200 mg Nicotinsäure
- 100 mg Riboflavin
- 46 mg Thiaminhydrochlorid
- 48 mg Pyridoxinhydrochlorid
- 46 mg Folsäure
- 4 mg Biotin

## 2. 2 Allgemeine Methoden

### 2.2.1 Häufig verwendete Lösungen

#### Vollsaline für *Manduca sexta*, pH 6,5

	g/l	mM
NaCl	0,23	4
KCl	2,98	40
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	3,66	18
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,44	3
Saccharose	50,0	146
Polyvinylpyrollidon (PVP-40)	1	
Pipes	0,58	1,7

in A. dest. lösen, einstellen des pH mit NaOH-KOH-Mischung (1:1)

**Ca/Mg-freie Saline für *Manduca sexta*, pH 6,5**

	<b>g/l</b>	<b>mM</b>
NaCl	0,23	4
KCl	2,98	40
Saccharose	50,0	146
Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)	1	
Pipes	0,58	1,7

in A. dest. lösen, einstellen des pH mit NaOH-KOH-Mischung (1:1)

**Antikoagulan (AC)-Saline für *Manduca sexta*, pH 6,5**

	<b>g/l</b>	<b>mM</b>
NaCl	0,23	4
KCl	2,98	40
Saccharose	50,0	146
Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)	1	
EDTA	2,978	8
Zitronensäure-1-hydrat	1,985	9,5
Natriumcitrat	7,980	27
Pipes	0,58	1,7

in A. dest. lösen, einstellen des pH mit NaOH-KOH-Mischung (1:1)

**TBS (= Tris-buffered saline), pH 7,5**

	<b>g/l</b>	<b>mM</b>
Tris	2,42 g	20
NaCl	29,22 g	500

in A. dest. lösen, einstellen des pH mit NaOH

**Fixierlösungen**3,5% bzw. 6% Paraformaldehyd-Fixierlösung

3,5 g bzw. 6 g Paraformaldehyd wurden mit 100 ml Ca/Mg-freier Saline gemischt und unter Rühren auf 70°C unter einem Abzug erwärmt, bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert und aliquotiert.

### 2,5% Glutaraldehyd-Fixierlösung

5 ml einer 50%igen Glutaraldehydlösung wurden mit 95 ml Ca/Mg-freie Saline unter einem Abzug gemischt und aliquotiert.

## **2.2.2 Aufbereitung der Hämozyten und des Hämolymphtasmas**

### 2.2.2.1 Gewinnung der Hämolymphe

Die zu untersuchenden Tiere wurden durch Lagerung im Kühlschrank für mindestens 20 min abgekühlt und ihre Oberfläche mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde bei Larven ein Kranzfüßchen angeschnitten und bei Puppen die Flügeldecken sowie der dorsale thorakale Bereich angeritzt. Die Hämolymphe jedes Tieres wurde direkt in 5 ml eisgekühlte AC-Saline getropft und vorsichtig durchmischt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 200 x g für 10 min bei 4°C pelletiert und danach dreimal mit eiskalter AC-Saline (mindestens 2 ml) durch vorsichtiges Resuspendieren und anschließender Zentrifugation gewaschen.

### 2.2.2.2 Aufbereitung der Hämozyten für die Transmissionselektronenmikroskopie

Sollten Hämozyten für die Transmissionselektronenmikroskopie gewonnen werden, wurde wie unter 2.2.2.1 beschrieben verfahren; die AC-Saline enthielt 3,5% Paraformaldehyd. Das Pellet nach der letzten Zentrifugation wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für zwei Stunden in einem speziellen Fixativ unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal á 20 min mit TBS gewaschen. Die Postfixierung erfolgte in 2% Osmiumtetroxid in TBS für 2 h. Nach dreimaligem Spülen mit TBS á 20 min wurde das Hämozytenpellet mit 30% Ethanol in TBS überschichtet und fortlaufend jeweils zweimal 20 min in den aufsteigenden Ethanolstufen in TBS inkubiert (30%, 50%, 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol). In der 70%igen Ethanolstufe konnten die Zellen über Nacht gelagert werden.

Die Einbettung erfolgte in LR-White-Harz (PLANO). Hierzu wurde 96% Ethanol in TBS mit dem LR-White-Harz 1:1 (v/v) gemischt und das Hämozytenpellet darin eine Stunde bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß inkubiert. Danach wurde die Lösung gegen 100% LR-White-Harz ausgetauscht und das Präparat eine Stunde im Eisbad im Kühlschrank inkubiert. Die Gefäße blieben hierzu geöffnet. Der LR-White-Harz wurde einmal ausgetauscht und über Nacht auf den Zellen belassen. Die Einbettung erfolgte in geschlossenen

Gelatinekapseln bei maximal 50°C für 48 bis 72 Stunden.

Aus den fertigen Blöckchen wurden zunächst 1 µm dicke Schnitte angefertigt, mit Toluidinblau angefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um die Schnittebene zu bestimmen. Die Ultradünnschnitte aus der gewünschten Ebene wurden auf Kupfernetzchen aufgefangen. Nach dem Kontrastieren (modifiziert nach REYNOLDS 1963) mit 1% Uranylacetat in A. bidest. für 20 min und anschließend mit 0,35% Bleicitrat in 10 mM NaOH für 10 min waren die Präparate fertig für die Auswertung am Elektronenmikroskop (EM 9A, ZEISS).

### **Fixativ für die Elektronenmikroskopie**

Paraformaldehyd 3,5 g

Glutaraldehyd 50% 5 ml

Paraformaldehyd in ca. 80 ml Ca/Mg-freier Saline unter Erhitzen auf 70°C lösen, abkühlen lassen und filtrieren, Glutaraldehyd hinzufügen, mit Ca/Mg-freier Saline auf 100 ml auffüllen und aliquotieren.

#### 2.2.2.3 Herstellung von Hämocytenmonolayern für die Immunhistochemie

Für die Herstellung von Hämocytenmonolayern wurde das Hämocytenpellet nach dem letzten Waschschritt in Grace-Insektenmedium aufgenommen und zumeist auf Mehrlochobjektträger (ICN bzw. ROTH) aufgetragen. Dabei wurde der erste Tropfen unter dem Lichtmikroskop nach einer angemessenen Zelldichte beurteilt und wenn nötig die Zellsuspension mit Grace-Insektenmedium weiter verdünnt. Als günstig erwies sich eine Zelldichte von ca.  $1 - 1,5 \times 10^6$  Zellen/ml.

Nach 10 min Inkubationszeit, in der sich die Zellen absetzen konnten, wurden die Präparate mit 3,5% Paraformaldehyd in Ca/Mg-freier Saline für 10 min fixiert und danach das Fixativ zweimal mit TBS entfernt. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation mit 3% BSA in TBS, um die freien Aldehydgruppen zu blockieren und einen Frostschutz zu gewährleisten. Nach dem Entfernen aller Flüssigkeit wurden die Objektträger bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für besondere Fragestellungen wurden die Präparate mit 0,5% Triton X-100 in 3% BSA in TBS für 5 min behandelt, um die Zellmembranen durchlässig zu machen. Als Nebeneffekt wurden leicht assoziierte, z.B. periphere Membranproteine von der Membran abgewaschen. Nach der Permeabilisierung wurden die Objektträger zweimal mit TBS gewaschen und mit 3% BSA in TBS blockiert.

#### 2.2.2.4 Aufbereitung der Hämozyten für die Gelelektrophorese

Während des letzten Waschschrilles wurde das Hämozytenpellet in genau einem Milliliter AC-Saline resuspendiert und der Zelltitel mit einer "Neubauer improved"-Zählkammer bestimmt. Nach der letzten Zentrifugation wurde ein Titer von  $3 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und zu á 30 µl in Eppendorf-GefäÙe aliquotiert. Zu jedem Aliquot wurden 3 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (SIGMA) gegeben. Die Zellen wurden aufgebrochen, indem sie bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren und nach dem Auftauen viermal für 15 s im Ultraschallbad auf Eis behandelt wurden. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt. Nach dem letzten Zyklus wurde jedes Aliquot mit SDS-Probenpuffer incl. Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  gekocht. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Hämolymp plasma wurde direkt nach dem ersten Waschschrill bei der Hämozytenaufbereitung gewonnen. Da in den meisten Fällen ca. 1 ml Hämolymphe pro Tier gewonnen werden konnte, wurde eine Verdünnung des Plasmas in AC-Saline (5 ml) von 1:5 erreicht. Das Plasma wurde in 30 µl Aliquots aufgeteilt und mit je 3 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (SIGMA) versetzt, mit Probenpuffer gekocht und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.3 Tierpräparation und Gewebeschnitte**

#### 2.2.3.1 Vorbereitung der Tiere zur Präparation

Entsprechend der Fragestellung wurden Larven verschiedenen Alters, Puppen (Pd1) und einzelne Organe, z.B. die Flügelanlagen für Gewebeschnitte aufbereitet. Dazu wurden die Tiere für mindestens 20 min im Kühlschrank abgekühlt und ihnen anschließend 6% Paraformaldehyd in Ca/Mg-freier Saline injiziert. Dabei mußte zügig gearbeitet und das Fixativ in ausreichenden Mengen appliziert werden, um ein unnötiges Leiden der Tiere zu verhindern. Nach 30-60 min Inkubation wurden die Tiere entsprechend der Fragestellung präpariert.

#### 2.2.3.2 Herstellung von Ganztierschnitten

Nach der Vorfixierung wurden die Tiere quer in einzelne Abschnitte geteilt und weiter in 3,5% Paraformaldehyd in Ca/Mg-freier Saline unter leichtem Schütteln für mindestens 2 h inkubiert. Danach wurden die Objekte dreimal á 20 min in TBS gewaschen und danach je eine Stunde in den aufsteigenden Ethanolstufen in TBS inkubiert (30%, 50%, 70%, 90% und

96% Ethanol). In der 70%igen Ethanolstufe konnten die Objekte über Nacht gelagert werden. Nach dem letzten Ethanolinkubationsschritt wurden die Objekte in 99% Isopropanol überführt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung noch einmal für weitere 6h gewechselt. Nach 10 min Inkubation in einem 1:1 (v/v) Gemisch Isopropanol : Paraffin wurden die Objekte für 3 h bei 51°C in Paraffin eingebettet. Das Paraffin wurde dreimal gewechselt. Die angefertigten Schnitte waren 7 µm dick und wurden auf Gelatine-Chromalaun-beschichteten Objektträgern aufgefangen.

Alternativ zur Paraformaldehydfixierung wurde eine Bouin-Fixierung getestet. Dazu wurde dieses Fixativ kurz vor der Präparation der Tiere angesetzt. Die so fixierten Larven wurden nicht mit Paraformaldehyd vorfixiert.

Da nicht alle Antikörper auf den so hergestellten Schnitten eine Markierung zeigten, wurden einzelne Individuen in Tissue Tec<sup>®</sup> (SAKURA) eingebettet. Hierzu wurden die vorfixierten Tiere bei -20°C eingefroren, die zu untersuchenden Teile herausgeschnitten und in entsprechend der Größe geformte Behälter aus Aluminiumfolie in Tissue Tec<sup>®</sup> eingebettet. Nach ein bis zwei Stunden waren die Objekte durchgefroren und konnten im Kryostaten (SLEE/Mainz) in 12 µm dicke Scheiben geschnitten werden. Die Schnitte wurden auf Objektträgern mit geladener Oberfläche aufgefangen (SuperFrost<sup>®</sup>Plus, MENZEL-GLÄSER).

### **Gelatine-Chromalaun-Lösung**

Gelatine	0,5 g
Chromalaun	0,2 g
A. dest.	100 ml

### **BOUIN-Fixierlösung**

Wäßrige gesättigte Pikrinsäure	25 ml
37% Formaldehyd	10 ml

#### 2.2.3.3 Organpräparationen für die Gelelektrophorese

Die vorfixierten Tiere wurden vom Abdomen her dorsal seitlich am Herzen entlang bis zum Kopf geöffnet und in einer Präparierschale unter TBS aufgespannt. Die einzelnen Organe bzw. Teile von Organen wurden entnommen, in TBS gewaschen und in je 200 µl TBS mit 5 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (SIGMA) in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Danach



erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Organteile mit einem Stößel. Die Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, nach einiger Zeit wieder aufgetaut, viermal á 15 s im Ultraschallbad auf Eis behandelt und wieder eingefroren. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Vor der Proteinbestimmung wurden die Proben für einige Zeit im Kühlschrank gelagert, damit größere Bruchstücke sedimentieren konnten. Der Überstand wurde anschließend für 5 min bei  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Aus diesem Überstand wurden die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet, d.h. mit SDS-Probenpuffer für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  gekocht. Jede Probe (für eine Spur) enthielt ca.  $12 \mu\text{g}$  Protein.

#### 2.2.4 Immunhistochemie

Tiefgefrorene Präparate wurden unter TBS aufgetaut und erneut mit 3% BSA in TBS blockiert. Andere Präparate wurden direkt nach dem letzten Waschschrift benutzt bzw. mit TBS rehydriert. Auf die entsprechenden Präparate wurde als primärer Antikörper Überstand aus den Hybridoma-Kulturen gegeben und dieser Ansatz über Nacht bei  $10^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubiert. Daneben wurden auch andere Antikörper getestet, die in der angegebenen Konzentration auf das Präparat gebracht werden mußten (siehe 2.5.1).

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Präparate viermal mit TBS für á 15 min gewaschen und danach der sekundäre Antikörper entsprechend dem primären, in der Regel durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert, in 0,5% BSA in TBS verdünnt dazugegeben. Diese Inkubation erfolgte für eine Stunde im Dunkeln. Nach viermaligem Waschen mit TBS für á 15 min wurden die Präparate mit DABCO-Glycerin eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

Die getesteten Lektine waren direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Ansätze wurden hier ein bis zwei Stunden inkubiert und konnte nach viermaligem Waschen und Eindeckeln direkt ausgewertet werden.

Als Negativkontrollen wurden je nach Experimentalumfang ein bis zwei Präparate nur mit dem sekundären Antikörper behandelt. Pro Ansatz blieb ein Präparat unbehandelt. Das war besonders bei Organpräparaten wichtig, denn z.B. alle Chitin-haltigen Strukturen wie Tracheen und Kutikula haben eine sehr hohe Eigenfluoreszenz.

In einigen Fällen wurde der EnVision<sup>TM</sup> Kit der Firma DAKO verwendet. Die Detektion mit diesem Kit ist besonders sensitiv und erfolgt über eine Farbreaktion, die an die Substratumsetzung durch alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Der Kit enthielt eine gebrauchsfertige Anti-Maus/Kaninchen-Antikörperlösung gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, die für ca.

30 min auf den Präparaten belassen werden mußte, und drei Komponenten für die Farbentwicklung (Substratpuffer, Fuchsin Chromogen, Aktivierungsreagenz). Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Entfernen der Färbelösung gestoppt. Nach zweimaligem Spülen mit TBS wurden die Objektträger eingedeckelt und ausgewertet.

### Verwendete sekundäre Antikörper

Spezifität (Anti-)	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung	Firma
Maus IgG,A,M	FITC	1:250	SIGMA
Maus IgG & M	Cy3	1:300	DAKO
Maus IgG	FITC	1:250	DIANOVA
Maus IgG	TRITC	1:200	SIGMA
Kaninchen IgG	FITC	1:200	SIGMA
Kaninchen IgG	TRITC	1:200	SIGMA

### DABCO-Glycerin

Glycerin	90%
50 mM Tris pH 7,6	10%
DABCO (1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octane)	2,5% (w/v)

### 2.2.5 Mikroskopie und Fotografie

Zur Auswertung der Präparate wurde das Forschungsmikroskop BX60 mit Fluoreszenzeinrichtung der Firma OLYMPUS benutzt. Damit konnten die Präparate im Durchlicht, Phasenkontrast und differentiellm Interferenzkontrast betrachtet werden. Für die Auswertung der Fluoreszenz standen verschiedene Einzel- und Doppelfilter zur Verfügung.

Zur Dokumentation der mikroskopischen Beobachtungen wurde eine dem Mikroskop aufgesetzte Kamera verwendet. Für die Fluoreszenzbilder eignete sich der Elite 400 ASA-Diafilm der Firma KODAK am besten. Für die weitere Auswertung wurden einige der Diapositive eingescannt und mit Corel Photo Paint™ und Corel Draw™ bearbeitet.

### Verwendete Fluoreszenzfilter

Bezeichnung	Eigenschaften	Anregung (nm)	Sperre (nm)
U-M 51000	Dualbandfilter für DAPI/FITC	o.A.	o.A.
U-M 51004	Dualbandfilter für FITC/TRITC	o.A.	o.A.
U-MNG (NG)	Schmalbandfilter für rote Fluoreszenz	530-550	590
U-MNU (NU)	Schmalbandfilter für blaue Fluoreszenz	360-370	420
U-MWIB (WIB)	Breitbandfilter für grüne Fluoreszenz	460-490	515

## 2.2.6 Elektrophorese und Western-Blot-Analyse

### 2.2.6.1 SDS-PAGE

Im Allgemeinen wurde eine Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI (1969) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde die Mini-Protean II-Zelle der Firma BIORAD verwendet. Die Gelgröße betrug 60 x 90 x 0,75 mm. Es wurden Gelkämme für 10 und 15 Taschen pro Gel verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, kräftig durchmischt, 5 min bei 95°C erhitzt, zentrifugiert und in die Geltaschen einpipettiert. Parallel wurden Markerproteine (SIGMA) aufgetragen. Zur Fokussierung der Proben im Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 50 V angelegt. Danach erfolgte die Trennung bei konstant 100 V.

### Pipettierschema der Lösungen der Trenn- und Sammelgele

(ausreichend für 2 Gele)

<b>Trenngel</b>	5%	6%	8%	10%	12%
Acrylamid-Stammlösung	1,65 ml	2 ml	2,65 ml	3,33 ml	4 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
A. bidest.	3,25 ml	2,95 ml	2,3 ml	1,63 ml	0,96 ml
TEMED	5 µl	5 µl	4 µl	3 µl	3 µl
APS 10%	30 µl	30 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Endvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

<b>Sammelgel</b>	3%	4%	5%
Acrylamid-Stammlösung	0,5 ml	0,68 ml	0,85 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
A. bidest.	1,95 ml	1,75 ml	1,6 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
APS 10%	40 µl	40 µl	40 µl
Endvolumen	5 ml	5 ml	5 ml

### **Acrylamid-Stammlösung**

Acrylamid	30 g
Bis-acrylamid	0,8 g
A. bidest.	ad 100 ml

### **Trenngelpuffer pH 8,8 (0,75 M Tris)**

Tris	77 g
Trisaminomethansäure	18,5 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2 g
A. bidest.	ad 1 l

### **Sammelgelpuffer pH 6,8 (0,33 M Tris)**

Tris	39,4 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2 g
A. bidest.	ad 1 l

### **Elektrodenpuffer (25 mM Tris / 192 mM Glycin)**

Tris	6,06 g
Glycin	14,4 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	1 g
A. dest.	ad 1 l

Dieser Puffer wird üblicherweise in zehnfacher Konzentration angesetzt und vor Gebrauch verdünnt.

**APS 10%**

Ammoniumpersulfat (APS)	1 g
A. bidest.	ad 10 ml

**5facher Probenpuffer**

Sammelgelpuffer	2,5 ml
Glycerin	5 ml
Mercaptoethanol	2,5 ml
Bromphenolblau	0,2 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	1 g

(Für einige Versuche wurden statt Mercaptoethanol weitere 2,5 ml Sammelgelpuffer dazugegeben.)

2.2.6.2 Native PAGE

In besonderen Fällen wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt. Alle dazu benötigten Lösungen wurden entsprechend den Lösungen für die SDS-PAGE ohne SDS-Zugabe angesetzt. Im Probenpuffer wurde außerdem das Mercaptoethanol durch SDS-freien Sammelgelpuffer ersetzt. Die Trennung der Proteine fand in einer Kühlbox auf Eis statt. Zur Fokussierung der Proben im Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 50 V angelegt. Danach erfolgte die Trennung bei konstant 100 V.

2.2.6.3 GelfärbungenCoomassie-Färbung

Diese Färbung ist für Banden mit einem Proteingehalt ab 100 ng geeignet. Die Gele wurden zwischen einer Stunde und über Nacht im Fixier- und Färbebad inkubiert. Zum Entfärben wurde die Entfärberlösung mehrmals gewechselt.

**Fixier- und Färbelösung**

Coomassie Blue R 250	1,25 g
Essigsäure (100%)	46 ml
Ethanol (99,8%)	227 ml
A. dest.	227 ml

**Entfärberlösung**

Ethanol (99,8%)	300 ml
Essigsäure (100%)	100 ml
A. dest.	600 ml

Diese Lösung kann auch als Lagerlösung verwendet werden. Gebrauchte Entfärberlösung kann durch Aktivkohle wieder regeneriert werden.

**Silberfärbung nach BLUM et al. (1987)**

Die sensitive Methode der Silberfärbung macht Banden mit einem Proteingehalt von mindestens 1-10 ng im Gel sichtbar.

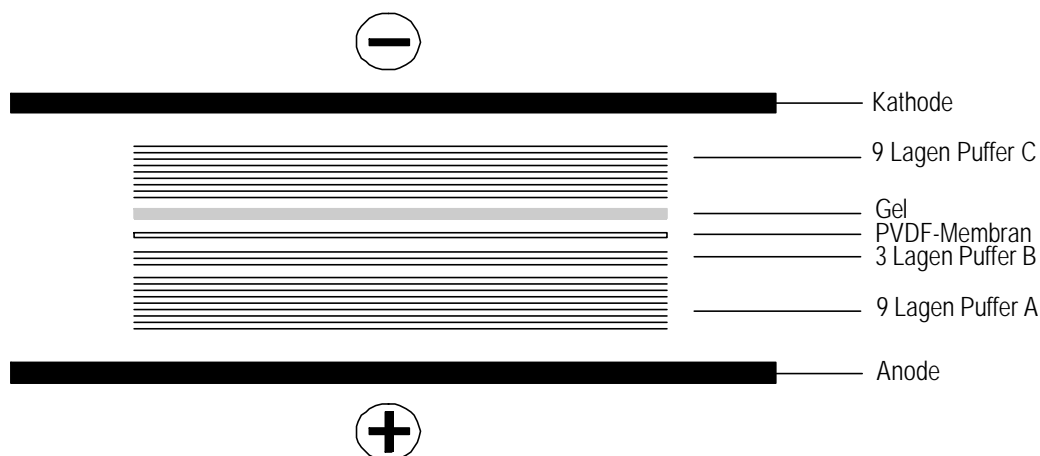
<b>Fixierer</b>	Methanol (99%)	500 ml	mind. 1 h
	Essigsäure (100%)	120 ml	
	Formaldehyd (37%)	0,5 ml	
	A. dest.	ad 1000 ml	
<b>Waschlösung</b>	Ethanol (99,8%)	500 ml	20 min
	A. dest.	ad 1000 ml	
<b>Vorbehandlungslösung</b>	Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	0,2 g	1 min
	A. dest.	ad 1000 ml	
A. dest.			3 x 20 s
<b>Imprägnier- und Färbelösung</b>	Silbernitrat	2 g	20 min
	Formaldehyd (37%)	0,75 ml	
	A. dest.	ad 1000 ml	
A. dest.			2 x 20 s
<b>Entwickler</b>	Natriumcarbonat	60 g	Nach Sicht
	Formaldehyd (37%)	0,5 ml	
	Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	4 µg*	
	A. dest.	ad 1000 ml	

<b>Stopplösung</b>	Methanol (99%)	500 ml	10 min
	Essigsäure (100%)	120 ml	
	A. dest.	ad 1000 ml	
<b>Wasch- und Lagerlösung</b>	Methanol (99%)	500 ml	mind. 20 min
	A. dest.	ad 1000 ml	

\*bzw. 2 ml der Vorbehandlungslösung

#### 2.2.6.4 Semi-Dry Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Die Membranen wurden je nach Firmenangabe (ROTH bzw. SCHLEICHER&SCHUELL) vor dem Blotvorgang mit Methanol aktiviert. Die entsprechend der Gel- und Membrangröße zugeschnittenen Whatman-Filterpapiere wurden in Puffer A, B oder C getaucht und übereinander geschichtet (Abb.1). Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei konstanter Stromstärke  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ .



**Abb.1:** Aufbau der Blotkammer für das Semi-Dry-Blot-Verfahren

Im Anschluß wurde, sofern vorhanden, die Lane der Markerproteine abgeschnitten und die Membran 1 h in 5% Trockenmilch in TBS bzw. 3% BSA in TBS blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei  $10^\circ\text{C}$ . Der Markerstreifen wurde 1-2 min in eine Amidoschwarz-Färbelösung getaucht und danach wieder entfärbt.

Am nächsten Tag wurden die Membranen viermal á 15 min mit 0,1% BSA in TBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit alkalischer

Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, wurde weitere dreimal á 15 min mit 0,1% BSA in TBS gewaschen. In einem letzten Waschschrift wurden die Membranen in dem Puffer vorinkubiert, in dem die Detektionsreaktion stattfinden sollte. Danach wurde über eine Enzym-bedingte Farbreaktion die Bindung des primären Antikörpers visualisiert, d.h. entweder mit BCIP und NBT für alkalische Phosphatase oder mit DAB für Peroxidase inkubiert. Die Reaktionen wurde durch Spülen mit kaltem Leitungswasser gestoppt. In einigen Fällen wurde über Chemilumineszenz das Bindungsmuster auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Hier erfolgte die Behandlung der Membran nach den Angaben des Herstellers (ECL<sup>TM</sup> Detection Kit bzw. ECL<sup>TM</sup>+plus Detection Kit, AMERSHAM PHARMACIA, siehe 2.2.6.5).

Die Lektine waren direkt mit Biotin markiert. Hier erfolgte die Detektion über Streptavidin gekoppelt mit alkalischer Phosphatase. Streptavidin hatte allerdings den Nachteil, neben den gebundenen Lektinen auch eine Reihe anderer Banden bei den Hämocyten und Organpräparationen zu markieren. Eine Negativkontrolle, d.h. die Inkubation einer beladenen Blotmembran nur mit Streptavidin gekoppelt mit alkalischer Phosphatase war daher zwingend notwendig. Im Fall des Lektins aus *Arachis hypogaea* (PNA) wurde deshalb im Verlauf der Arbeit dazu übergegangen, das Lektin direkt mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt zu benutzen.

#### **Puffer A**

Tris	300 mM	36,3 g
A. dest.		ad 1 l

#### **Puffer B**

Tris	25 mM	3 g
A. dest.		ad 1 l

#### **Puffer C**

6-Aminohexansäure	40 mM	0,525 g
Tris	25 mM	0,305 g
A. dest.		ad 200 ml



**Amidoschwarz-Färbelösung**

Amidoschwarz	5%	5 g
Methanol (99%)	50%	50 ml
Essigsäure (100%)	40%	40 ml
A. dest.		ad 100 ml

**Amidoschwarz-Entfärber**

Isopropanol (100%)	25%	250 ml
Essigsäure (100%)	10%	100 ml
A. dest.		ad 1000 ml

**Verwendete sekundäre Antikörper bzw. Streptavidin**

Spezifität (Anti-)	Gekoppeltes Enzym	Verdünnung	Firma
Maus IgG & M	Alkalische Phosphatase	1:15.000	SIGMA
Maus IgG	Alkalische Phosphatase	1:10.000	DIANOVA
Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase	1:10.000	DAKO
Kaninchen IgG	Alkalische Phosphatase	1:5.000	DAKO
Kaninchen IgG	Meerrettich-Peroxidase	1:1.000	IMMUNPRÄP
Streptavidin	Alkalische Phosphatase	1:3.000	DAKO

**Reaktionslösung für alkalische Phosphatase**

BCIP	(0,5 g auf 10 ml DMSO)	33 µl
NBT	(0,5 g auf 10 ml 70% DMSO)	66 µl
100 mM Tris pH 9,5	incl.: 100 mM NaCl	10 ml
	5 mM MgCl <sub>2</sub>	

**Reaktionslösung für Peroxidase**

Diaminobenzidin (DAB)	5 mg
50 mM Tris pH 7,6	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1%)	200 µl

### 2.2.6.5 Chemilumineszenz und Strippen von Western-Blot-Membranen

Die Detektion der Antikörper- bzw. Lektinbindung über Chemilumineszenz ist ca. zehnmals sensitiver als die Detektion über enzymvermittelte Farbreaktionen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß die Signale auf einen Röntgenfilm übertragen werden, d.h. die Blotmembran selbst nicht beeinflußt wird. Deshalb ist es möglich die Membran zu stripfen, d.h. primären und sekundären Antikörper abzulösen und einen weiteren Antikörper auf derselben Membran auszutesten. Gleichzeitig werden aber auch ungefähr 50% der geblotteten Proteine abgelöst.

Die mit dem primären und sekundären Antikörper (gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase) inkubierten Blotmembranen wurden in Prospekthüllen gelegt und eine Minute mit den Reagenzien aus dem ECL<sup>TM</sup> Detection Kit bzw. 5 min mit den Reagenzien aus dem ECL<sup>TM</sup>+plus Detection Kit inkubiert. Nach Entfernen der überflüssigen Lösung wurden die Membranen zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup>, AMERSHAM PHARMACIA) in eine Fotokassette (Filmscribor, PHILIPS) gelegt und entsprechend der zu erwartenden Emission dort inkubiert. Der Röntgenfilm wurde dann 1 bis 4 min entwickelt (Roentogen, TETENAL), 5 min gewässert, 10 min fixiert (Vario Fix, TETENAL) und weitere 5 min gewässert. Entsprechend dem Bild wurde die Inkubationszeit für eine weitere Belichtung abgeschätzt. Dazu wurde der neue Röntgenfilm entweder direkt anschließend in die Fotokassette eingelegt oder die Blotmembran zunächst erneut mit dem Chemilumineszenzreagenz versetzt.

Zum Strippen der Blotmembranen wurde diese für 45 bis 60 min bei 60°C in Stripping Buffer unter leichtem Schwenken inkubiert und danach dreimal á 10 min in 0,1% BSA-TBS gewaschen, erneut für eine Stunde mit 5% Trockenmilch oder 3% BSA in TBS blockiert und mit dem nächsten primären Antikörper oder Lektin versetzt. Weiter wurde wie unter 2.2.6.4 beschrieben verfahren.

#### **Stripping Buffer**

Tris	62,5 mM
Mercaptoethanol	100 mM
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2%

in A. dest. lösen, pH 6,7 mit HCl einstellen

### 2.2.6.6 Berechnung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine

Um das Molekulargewicht der interessanten Proteine über Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse zu ermitteln, wurden die entsprechenden  $R_f$ -Werte wie folgt berechnet:

$$R_f = \frac{\text{Zurückgelegte Entfernung der Bande}}{\text{Zurückgelegte Entfernung der Lösungsmittelfront}}$$

Als Eichproteine dienten die mitgeführten Marker, zumeist der Firma SIGMA.

## **2.2.7 Hybridomazellkultur**

### 2.2.7.1 Routinehaltung der Hybridomakulturen

Zur Produktion einiger monoklonaler Antikörper wurden Hybridomazellen aus der Fusion von WILLOTT und Mitarbeitern (1994) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und ca. 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten und der Überstand regelmäßig geerntet. Als Startkulturen dienten bei -70°C eingefrorene Aliquots oder aus den USA übersandte lebende Zellen. Sämtliche verwendete Plastikgefäße stammten von der Firma NUNC.

Die tiefgefrorenen Zellen wurden zügig aufgetaut und in 10 ml RPMI-Medium mit 10% FBS überführt. In diesem Medium wurden sie dreimal gewaschen, d.h. jeweils 5 min bei 200 x g pelletiert und wieder in 10 ml Medium resuspendiert. Das letzte Pellet wurde entsprechend der Größe in 1 bis 2 ml RPMI-Medium mit 10% FBS und 10% BM-Condimed<sup>®</sup>H1 (BOEHRINGER MANNHEIM) aufgenommen und auf zwei bis vier Löcher einer 24-Loch-Platte ungleich aufgeteilt, in die schon 0,5 ml desselben Mediums vorgelegt waren. Nach ein bis zwei Stunden wurde der Zustand der Zellen kontrolliert und ein Teil des Mediums gewechselt.

Je nach Wachstum der Zellen wurde zuerst der Anteil an BM-Condimed<sup>®</sup>H1 verringert und dann gänzlich weggelassen und FBS soweit wie möglich auf mindestens 2,5% reduziert und die Kultur schrittweise expandiert. Dabei hatten die Zellen immer erst Gelegenheit, sich an das veränderte Medium anzupassen. Erst dann wurden sie in größere Kulturgefäße überführt. Der Mediumwechsel und damit die Ernte des Überstandes erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. Der Überstand wurde regelmäßig auf das Vorhandensein des entsprechenden Antikörpers auf Mehrlochobjektträgern mit Hämozytenmonolayern getestet. Wurde der Überstand nicht steril gewonnen, dann wurde 0,02% Natriumazid in A. bidest. zugesetzt.

War die Zellkultur in einem gleichmäßigen Wachstum und ausreichend Überstand geerntet,

wurden die Zellen einen Tag nach dem letzten Mediumwechsel noch einmal mit frischem Medium überschichtet und dann vom Kulturflaschenboden abgeschlagen. Medium und Zellen wurden in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 200 x g wurden die Zellen 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Pellet in eisgekühltes RPMI-Medium mit 40% FBS und 10% DMSO aufgenommen und auf Kryoröhrchen á 0,5 ml aufgeteilt (5 ml Zellsuspension aus der Zellkulturflasche war ausreichend für eine gute Zelldichte in zwei Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen blieben weitere 30 min auf Eis und wurden dann in speziellen mit Isopropanol gefüllten Gefrierboxen in den -70°C Gefrierschrank gestellt. Nach ein bis zwei Tagen waren die Zellsuspensionen durchgefroren und konnten in die dafür vorgesehenen Kryoboxen einsortiert werden.

### **Zellkulturmedium RPMI 1640**

*\*Als Pulver von GIBCO*

Entsprechend den Firmenangaben wurde Pulver für 2 l Medium in 1800 ml A. bidest. gelöst.

Zu dieser Lösung wurden hinzugegeben:

HEPES	1 M (283,3 g / l)	20 ml
NaHCO <sub>3</sub>	7,5%	20 ml
PEST	1000 µg / ml (GIBCO)	20 ml
Mercaptoethanol	0,1 M (78 mg / 10 ml)	1 ml

Der pH-Wert wurde auf 6,9 - 7,0 eingestellt und das Medium auf 1960 ml aufgefüllt.

Nach dem Sterilfiltrieren wurde das Medium in 490-ml-Aliquots aufgeteilt. Vor der Verwendung wurden pro Aliquot 10 ml Natriumpyruvat (100 mM, entspricht 1,1 g / 100 ml) hinzugegeben.

*\*Als Fertigmedium von SIGMA*

Zu 500 ml Fertigmedium wurden hinzugegeben:

HEPES	1 M (283,3 g / l)	5 ml
PEST	1000 µg / ml (GIBCO)	5 ml
Mercaptoethanol	0,1 M (78 mg / 10 ml)	0,5 ml
Natriumpyruvat	100 mM (1,1 g / 100 ml)	10 ml

### 2.2.7.2 Subklonieren der Hybridomazellkulturen

Zur Pflege der Hybridomakulturen und zur Sicherstellung der Qualität der monoklonalen Antikörper gehörte das Subklonieren der entsprechenden Klone. Hierzu wurden gut wachsende Zellen geerntet und das Pellet in RPMI-Medium mit 10% FBS und 10% BM-Condimed<sup>®</sup>H1 resuspendiert und zwar so, daß sich ein Titer von ca.  $5 \times 10^2$  Zellen/ml ergab. Parallel dazu wurde eine 96-Loch-Platte vorbereitet, in die pro Loch 100 µl desselben Mediums pipettiert wurden. Je 100 µl der Zellsuspension wurden viermal in das jeweils erste Loch einer Zwölfer-Reihe einpipettiert und in Zweier-Schritten über die gesamten 12 Löcher verdünnt. Die 96-Loch-Platte wurde jeden Tag begutachtet. Die Stellen, an denen sich Einzelzellen zu teilen begannen, wurden markiert. Vier der besten Klone wurden ausgewählt und bis zu einer konstant wachsenden Kultur expandiert wie unter 2.2.7.1 beschrieben. Die Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper aus den Subklonen wurden mit der aus dem Mutterklon verglichen. Bei Übereinstimmung erhielten die Subklone eine Nummer und die Aliquots der Hybridomazellen wurden bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.8 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)**

Jeweils 4 µl der zu testenden Proben wurden je dreimal in eine 96-Loch-Platte gegeben und mit 196 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer dreiminütiger Inkubation unter Schütteln im Dunkeln erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im Multiscan-Photometer (BIORAD). Durch das gleichzeitige Messen einer BSA-Eichreihe von 10 bis 1000 µg/ml in TBS konnte der Proteingehalt in den Proben bestimmt werden. Als Nullwert diente TBS. Eichgeraden mit einem Korrelationskoeffizienten unter 0,95 wurden verworfen und die gesamte Messung wiederholt.

#### **Bradford-Reagenz**

Coomassie Brilliant Blue G 250	100 mg
Ethanol (99,8%)	50 ml
Phosphorsäure (85%)	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Die Lösung mußte über Nacht gerührt, danach filtriert und bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln gelagert werden.

### 2.2.9 Proteinfällung mit Ammoniumsulfat

Die Ammoniumsulfatfällung wurde benutzt, um Proteine schonend zu fällen, z.B. Antikörper aus Hybridomakulturüberstand. Mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung sollte eine Trennung von Protein-"Gruppen" nach ihrer Löslichkeit in Anwesenheit dieses Salzes erreicht werden, z.B. für die Fraktionierung von Proteinen aus dem Hämocytenlysat.

Das Proteingemisch wurde in ein Gefäß geeigneter Größe auf Eis gekühlt. Unter ständigem Rühren wurde die entsprechende Menge Ammoniumsulfat sehr langsam dazugegeben. Für eine umfassende Präzipitation wurde die Lösung anschließend noch für eine weitere Stunde unter ständigem Rühren auf Eis belassen. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation bei 30.000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, für die weitere Fällung auf Eis gestellt und wieder die entsprechende Menge kristallines Ammoniumsulfat dazugegeben. Das Pellet wurde z.B. in TBS aufgenommen und über Nacht dialysiert.

#### Mengenangaben für Ammoniumsulfat für eine fraktionierte Fällung

Ammoniumsulfat-fraktion	Molarität des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Zugabe von mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu dem Überstand aus der vorherigen Fraktion
20%	0,82 M	108 mg/ml
40%	1,64 M	217 mg/ml
60%	2,46 M	325 mg/ml
80%	3,28 M	433 mg/ml
100%	4,1 M	542 mg/ml

## 2.3 Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper an Hämocyten und Gewebe von Larven und Puppen

### 2.3.1 Screening der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994)

Insgesamt wurden 214 Hybridomakulturüberstände getestet (siehe Anhang 1). Zum Screenen wurden Hämocytenmonolayer auf Mehrlochobjektträgern hergestellt. Für den direkten Vergleich von larvalen und pupalen Hämocyten war es wichtig, Variationen durch experimentelle Unregelmäßigkeiten auszuschließen. Deshalb wurden diese Hämocyten auf

benachbarte Löcher eines Objektträgers aufgetragen. Das erste Screening erfolgte auf Objektträgern, die vorher bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Nach dem ersten Vorsortieren der Antikörper entsprechend der Fragestellung dieser Arbeit wurden die interessanten Antikörper auf frisch hergestellten Objektträgern auf Hämozyten mit und ohne Tritonbehandlung im Vergleich getestet. Jeder Antikörper wurde mindestens dreimal auf unabhängigen Präparaten getestet, d.h. auf Hämozyten von unterschiedlichen Tieren. Außerdem wurde darauf geachtet, daß jeder Antikörper nicht in Nachbarschaft zu den Antikörpern aus dem vorangegangenen Test aufgetragen wurde.

Um die Beobachtungen der Fluoreszenz im Mikroskop möglichst unvoreingenommen auf Diapositiven abzubilden, wurden die zusammengehörigen Fluoreszenzbilder manuell gleich lang belichtet. Auch beim Einscannen und Bearbeiten der Bilder am Computer wurde darauf geachtet, daß alle zusammengehörigen Bilder in gleicher Weise behandelt wurden.

Nach Abschluß des Screenings wurden alle folgenden Untersuchungen nur noch mit den entsprechenden Subklonen durchgeführt, entweder mit bereits vorhandenen oder mit selbst hergestellten.

### **2.3.2 Western-Blot-Analyse von Hämozytenlysaten und Hämolymp plasma**

Sofern die Hybridomakulturen im Labor vorhanden waren, konnte ausreichend Kulturüberstand gewonnen und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden.

Für einen optimalen Überblick über die möglichen Proteinbanden, die durch die Antikörper markiert werden könnten, wurde je Antikörper ein 5% Trenngel mit einem 3% Sammelgel und ein 12% Trenngel mit einem 5% Sammelgel angefertigt und geblottet. Diese Ansätze wurden jeweils dreimal mit Hämozytenlysaten und Plasmaproben unterschiedlicher Tiere wiederholt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Hämolymppräparationen frisch waren, denn eine längere Lagerung der Proben konnte eine Veränderung des Bandenmusters zur Folge haben.

### **2.3.3 Nachweis der Zusammengehörigkeit von Antikörpern**

Um nachzuweisen, daß Antikörper das gleiche Bandenmuster erkannten, wurden die Proteinspuren auf der Membran nach dem Blotten der Länge nach halbiert und jede Hälfte mit einem anderen Antikörper inkubiert. Dabei wurden sowohl die Hämozytenlysate als auch die Plasmaproben berücksichtigt.

Die Prozentigkeit des SDS-Gels richtete sich nach der optimalen Auftrennung für den jeweils untersuchten Fall. Im Allgemeinen wurde ein 5% Trenngel mit einem 3% Sammelgel verwendet. Beim Auflegen des Gels auf die PVDF-Membran wurden die Taschen auf der Membran markiert, um nach dem Blotten die Spuren eindeutig wiederzufinden.

#### **2.3.4 Test der Antikörperbindung an Geweben**

Alle interessanten monoklonalen Antikörper wurden auf Präparaten von Larven- und Puppenquerschnitten getestet. Da die Bindungsmuster teilweise sehr variabel waren, bzw. bei Querschnitten von ursprünglich Paraformaldehyd fixierten Tieren keine Markierung zu finden war, wurden die meisten Antikörper zusätzlich auf Querschnitten von Bouin fixierten Tieren bzw. auf Kryoschnitten getestet. Bei diesen Experimenten ging es um die Bindungsspezifität der untersuchten Antikörper und nicht um den Vergleich der Bindungsstärke in der Larve zu der in der Puppe.

War ausreichend Hybridomaüberstand vorhanden, wurde die Bindungsspezifität der Antikörper an die verschiedenen Organen zusätzlich in einer Western-Blot-Analyse ausgetestet. Die Auftrennung der Proben erfolgte hier im Allgemeinen in einem 6% Trenngel mit einem 4% Sammelgel. Es wurden Gelkämme für 15 Taschen pro Gel verwendet. Pro Tasche wurden ca. 12 µg Protein aufgetragen. Die Probenauftragsmenge war durch die Größe der Taschen limitiert. Deshalb erfolgte die Detektion des Bindungsmusters der Antikörper über Chemilumineszenz.

### ***2.4 Bindungseigenschaften von Lektinen an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen***

#### **2.4.1 Screening von Lektinen**

Insgesamt wurden 14 Lektine (alle von der Firma SIGMA) getestet. Für das Screening wurden Hämozytenmonolayer auf Mehrlochobjektträgern frisch hergestellt. Für den direkten Vergleich von larvalen und pupalen Hämozyten wurden diese Zellen auf benachbarte Löcher auf einen Objektträger aufgetragen. Jeweils zwei Objektträger wurden im Vergleich getestet, einer wurde vor dem Auftrag der Lektine mit Triton X-100 behandelt. Jedes Lektin wurde



mindestens dreimal auf unabhängigen Präparaten getestet, d.h. auf Hämozyten von unterschiedlichen Tieren. Außerdem wurde darauf geachtet, daß jedes Lektin nicht in Nachbarschaft zum Lektin aus dem vorangegangenen Test aufgetragen wurde.

Alle Lektine waren direkt mit FITC bzw. TRITC markiert. Die Lektinverdünnungen wurden in 0,5% BSA in TBS hergestellt. Die Präparate wurden mit den jeweiligen Lektinen 2 h im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen und Eindeckeln waren die Präparate fertig zur Auswertung.

Folgende Lektine wurden getestet, wobei die angegebenen optimalen Konzentrationen im Verlauf des Screenings ermittelt wurden:

<b>Lektin aus</b>	<b>Konzentration</b>
<i>Abrus precatorius</i>	5 µg/ml
<i>Arachis hypogaea</i>	0,5 µg/ml
<i>Bauhinia purpurea</i>	1 µg/ml
<i>Erythrina corallodendron</i>	5 µg/ml
<i>Glycine max</i>	20 µg/ml
<i>Helix pomatia</i>	0,5 µg/ml
<i>Lens culinaris</i>	5 µg/ml
<i>Maclura pomifera</i>	5 µg/ml
<i>Phaseolus vulgaris</i>	20 µg/ml
<i>Phytolacca americana</i>	5 µg/ml
<i>Succinyl-Concanavalin A</i>	5 µg/ml
<i>Tetragonolobus purpureas</i>	20 µg/ml
<i>Triticum vulgare</i>	5 µg/ml
<i>Vicia villosa</i> Isolectin B <sub>4</sub>	0,5 µg/ml

#### **2.4.2 Western-Blot-Analyse von Hämozytenlysaten und Hämolymp plasma**

Zunächst wurden 8%ige Trenngele mit 4%igen Sammelgelen angefertigt und geblottet. Für die beiden in diesem Rahmen interessanten Lektine aus *Arachis hypogaea* und *Vicia villosa* wurden darüber hinaus für einen besseren Überblick 5% Trenngele mit 3% Sammelgelen und 12% Trenngele mit 5% Sammelgelen gegossen. Diese Ansätze wurden jeweils dreimal mit Hämozytenlysaten und Plasmaproben unterschiedlicher Tiere wiederholt.

Folgende Lektine wurden in der Western-Blot-Analyse getestet:

<b>Lektin aus</b>	<b>Konzentration</b>
<i>Abrus precatorius</i>	1 µg/ml
<i>Arachis hypogaea</i>	0,2 µg/ml
<i>Erythrina corallodendron</i>	2 µg/ml
<i>Glycine max</i>	8 µg/ml
<i>Vicia villosa</i> Isolectin B <sub>4</sub>	0,2 µg/ml

Die Verdünnungen wurden in 0,5% BSA in TBS hergestellt. Alle verwendeten Lektine waren mit Biotin markiert und wurden über Nacht bei 10°C unter Schütteln mit den Blotmembranen inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Bindung der Lektine über Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase visualisiert. Streptavidin selbst band an zwei Banden im Hämocytenlysat. Da dieser Artefakt nicht immer auftrat, mußte bei jedem Versuchsansatz je eine Membran mit identischen Proben als Kontrolle mit Streptavidin allein inkubiert werden. Im Fall des *Arachis hypogaea*-Lektins wurde im Verlauf der Arbeit dazu übergegangen, das Lektin direkt mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt zu benutzen. Hier konnte die Bindung des Lektins zum einen mit Hilfe von DAB und zum anderen über Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

### 2.4.3 Test der Lektinbindung an Geweben

Die beiden interessanten Lektine aus *Arachis hypogaea* und *Vicia villosa* Isolectin B<sub>4</sub> wurden auf Präparaten von Larven- und Puppenquerschnitten getestet.

Zusätzlich wurde die Bindungsspezifität der Lektine an die verschiedenen Organe von Larven und Puppen über eine Western-Blot-Analyse ausgetestet. Für den Einsatz des *Arachis hypogaea*-Lektins erfolgte die Auftrennung der Proben in einem 6% SDS-Trenngel mit einem 4% SDS-Sammelgel, für das *Vicia villosa*-Lektin wurde ein 8% Trenngel mit einem 4% Sammelgel benutzt. Es wurden Gelkämme für 15 Taschen pro Gel verwendet. Pro Tasche wurden ca. 12 µg Protein aufgetragen. Da beide Lektine mit Biotin gekoppelt waren, erfolgte die Detektion über Streptavidin-gekoppelte alkalischer Phosphatase. Da Streptavidin selbst an verschiedene Banden besonders aus Darm- und Fettkörperproben band, war es notwendig, bei jedem Ansatz eine Kontrolle mitzuführen, d.h. eine Membran mit den entsprechenden Proben nur mit Streptavidin zu inkubieren.

## 2.5 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität auf Larven- und Puppenhämozyten

### 2.5.1 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität in der Immunhistochemie

Aus Kooperationen und als Geschenke standen einige Antikörper bekannter Spezifität zur Verfügung, die entsprechend den monoklonalen Antikörpern aus eigener Produktion auf larvalen und pupalen Hämozytenmonolayern getestet wurden. Die Antikörperverdünnungen wurden in 0,5% BSA in TBS hergestellt.

Folgende Antikörper kamen zum Einsatz:

Antikörper gegen	Konzentration	Eigenschaften	Referenz
<i>Manduca sexta</i> Lipophorin	1:1000	polyklonal, aus Kaninchen	ZIEGLER et al. (1995)
<i>Hyalophora cecropia</i> Arylphorin	1:200	polyklonal, aus Kaninchen	TELFER et al. (1983)
<i>Drosophila</i> muskelspezifisches Myosin (I)	1:500	polyklonal aus Kaninchen	KIEHART & FEGHALI (1986)
<i>Drosophila</i> muskelspezifisches Myosin (II)	1:200	polyklonal aus Maus	KIEHART & FEGHALI (1986)
<i>Manduca sexta</i> Ecdysonrezeptor B1-Isoform	Hybridomaüberstand des Klons 6B7	monoklonal aus Maus	FUJIWARA et al. (1995), JINDRA et al. (1996)
<i>Manduca sexta</i> Ecdysonrezeptor (allgemein)	Hybridomaüberstand des Klons 10F1	monoklonal aus Maus	FUJIWARA et al. (1995), JINDRA et al. (1996)

### 2.5.2 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität in der Western-Blot-Analyse

Die Antikörper bekannter Spezifität wurden zusätzlich zur Immunhistochemie mit Blotmembranen mit aufgetrennten Hämozyten- und Plasmaproteinen inkubiert. Hier ging es vor allem um den Nachweis, daß die Reaktion im histologischen Präparat tatsächlich auf der

Bindung der Antikörper an den entsprechenden Liganden beruht. Die Verdünnungen wurden in 0,5% BSA in TBS hergestellt.

Die Antikörper kamen in folgenden Konzentrationen zum Einsatz:

Antikörper gegen	Konzentration	Prozentigkeit von Trenngel / Sammelgel
Lipophorin	1:2000	8% / 4%
Arylphorin	1:10.000	8% / 4%
Myosin (I)	1:1000	8% / 4%
Myosin (II)	1:1000	8% / 4%
Ecdysonrezeptor B1	Hybridomaüberstand	10% / 4%
Ecdysonrezeptor allg.	Hybridomaüberstand	10% / 4%

## **2.6 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin**

### **2.6.1 Charakterisierung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin**

Um einen Vergleich der Bindungsaktivität des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Hämozyten von unbehandelten Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) zu Hämozyten von Larven, die immunologisch stimuliert wurden, durchführen zu können, wurden L5d1-Larven mit *Micrococcus luteus* infiziert. Dieses Bakterium lag gefriergetrocknet vor und wurde zum Applizieren in Vollsaline suspendiert. Die Endkonzentration betrug 200 µg/ml. Pro Tier wurden 30 µl, d.h. 6 µg *M. luteus* injiziert. Parallel wurden Tiere mit 30 µl Vollsaline gespritzt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Hämozyten geerntet und entweder für histologische Präparate oder für die Gelelektrophorese aufgearbeitet. Um einen direkten Vergleich der Bindungsmuster im mikroskopischen Präparat zu haben, wurden Hämozyten von unbehandelten, Bakterien-infizierten und Vollsaline-gespritzten Larven sowie von Puppen nebeneinander auf einen Mehrlochobjektträger aufgetragen und identisch behandelt.

Hämozytenlysate von Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) wurden im Vergleich unter reduzierenden (mit Mercaptoethanol) und nicht reduzierenden (ohne Mercaptoethanol) Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und zerstört damit die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine.

Zusätzlich wurde das Verhalten des Lektinliganden nativ nach einer Gelelektrophorese und anschließendem Blotten untersucht. Die nicht denaturierten Proteine bewegten sich im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe, Struktur und Ladung.

Weiterhin wurde die Glykosylierung des gesuchten Proteins charakterisiert. Dazu wurde zur Spaltung der möglichen N-glykosidischen Bindung N-Glycosidase F und zur Spaltung einer eventuellen O-glykosidischen Bindung Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase eingesetzt.

#### N-Glycosidase F (BOEHRINGER MANNHEIM)

Ein 30  $\mu$ l Hämozytenlysataliquot wurde nach Sonifizieren soweit in der Vakuumzentrifuge eingengt, bis sämtliche Flüssigkeit entfernt war. Das Pellet wurde in 30  $\mu$ l 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, versetzt mit 0,1 M EDTA, 20 mM Natriumazid und 1% SDS, gelöst und 2 min bei 95°C gekocht. Danach wurden 10  $\mu$ l des zehnfachen Natriumphosphatpuffers pH 7,2, 10  $\mu$ l einer 10%igen Triton X-100-Lösung (in Phosphatpuffer) und 30  $\mu$ l A. bidest. dazugegeben und weitere 2 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen des Gemisches auf mindestens 37°C wurden 1  $\mu$ l Proteaseinhibitor-Cocktail und 20  $\mu$ l der N-Glycosidase F-Stammlösung (200 U/ml in A. bidest. gelöst) dazugegeben (letztendlich waren im Reaktionsgemisch 40 U/ml) und über Nacht (ca. 18 h) bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde in der Vakuumzentrifuge eingengt und im Vergleich zu unbehandelten Hämozytenlysaten in einer SDS-PAGE aufgetragen, geblottet und mit dem *Arachis hypogaea*-Lektin ausgewertet.

#### Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase (CALBIOCHEM)

Ein 30  $\mu$ l Hämozytenlysataliquot nach Sonifizieren wurde soweit in der Vakuumzentrifuge eingengt, bis sämtliche Flüssigkeit entfernt war. Das Pellet wurde in 20  $\mu$ l 250 mM Natriumphosphatpuffer pH 5 und 75  $\mu$ l A. bidest. gelöst. Dazu wurden 1  $\mu$ l Proteaseinhibitor-Cocktail und 4  $\mu$ l Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase-Lösung gegeben, so daß letztendlich 4 mU Enzym im Reaktionsgemisch enthalten waren. Die Probe wurde ca. 18 h bei 37°C inkubiert, anschließend in der Vakuumzentrifuge eingengt und in einer SDS-PAGE aufgetragen und geblottet. Die Auswertung des Versuches fand nach Inkubation der Blotmembran mit dem *Arachis hypogaea*-Lektin statt.

## 2.6.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung

Hämozyten von Larven des fünften Larvenstadiums (L5d2) wurden wie unter 2.2.2 beschrieben gewonnen und das letzte Pellet in ca. 0,5 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen. Dazu wurden 5 µl Proteaseinhibitor-Cocktail gegeben. Nach viermal á 10 s Sonifizieren und anschließendem Einfrieren der Zellen und Wiederholen dieses Zyklus für weitere dreimal wurde die Lösung bei 40.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für nachfolgende Untersuchungen aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut mit Solubilisierungspuffer versetzt, der diesmal unterschiedliche Detergenzien in unterschiedlicher Konzentration enthielt. Für einen direkten Vergleich der Wirkung der verschiedenen Detergenzvarianten wurden pro Versuchsansatz mehrere Pellets gepoolt, eine Proteinbestimmung durchgeführt und danach wieder aliquotiert. Die Aliquots wurden so gewählt, daß ein wirkungsvolles Protein-Seife-Gemisch mit den gewählten Detergenzkonzentrationen entstand (Seife-Protein-Verhältnis sollte zwischen 1 und 10 liegen). Folgende Detergenzien wurden getestet: 1% Triton X-114 als nicht ionische Seife, 1% und 0,5% SDS als ionische Seife.

Die Solubilisierungsansätze wurden 1 h bei 10°C für Triton und bei Raumtemperatur für SDS geschüttelt und danach 1 h bei 40.000 x g zentrifugiert (4°C für Triton, 18°C für SDS). Das Pellet wurde noch einmal mit Solubilisierungspuffer versetzt, nochmals 1 h (10°C für Triton, Raumtemperatur für SDS) geschüttelt und 1 h bei 40.000 x g (4°C für Triton, 18°C für SDS) zentrifugiert. Alle Überstände und Pellets wurden für die Kontrollelektrophorese aufbereitet.

Für einen wirklichen Nachweis des Erfolges der Solubilisierung wurde eine Ultrazentrifugation angeschlossen. Die Proben wurden in einer BECKMANN-Zentrifuge (Modell L5-65) mit einem Ausschwenkrotor (SW 28) eine Stunde bei 20°C und 128.000 x g zentrifugiert.

Nach dem Solubilisieren wurde das Proteingemisch mit 5% Mercaptoethanol 5 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Hilfe eines 100-kDa-Zentrifugenfilters (Vivaspin 20 ml Concentrator, SARTORIUS) fraktioniert. Dabei wurde 30 min bei 18°C und 3.000 x g zentrifugiert. Das gesuchte Protein sollte sich in der Fraktion mit Proteinen größer als 100 kDa befinden.

Zur Vorbereitung auf die Affinitätschromatografie, in der sich SDS und Mercaptoethanol störend auswirken könnten, wurde die Proteinlösung über Nacht bei 10°C gegen den Säulenlaufpuffer (20 mM Tris-Puffer pH 7,2 mit 150 mM NaCl) dialysiert. Für einen

effektiven Säulenauftrag wurde die Probe weiterhin in der Vakuumzentrifuge auf ein sinnvolles Volumen eingeengt.

### **Solubilisierungspuffer, pH 6,5 - 6,8**

Pipes	1,7 mM
Glycerin	10%
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3 mM
KCl	40 mM
NaCl	4 mM

### **2.6.3 Herstellung einer Affinitätschromatografiesäule mit dem *Arachis hypogaea*-Lektin**

Zur Herstellung einer Affinitätschromatografiesäule wurden 3 mg *Arachis hypogaea*-Lektin an 1 g CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Dazu wurde die Sepharose in 3,5 ml 1 mM HCl 15 min aufgequollen und danach mit 200 ml 1 mM HCl auf einem Sinterkeramikfilter unter Anlegen von Unterdruck gewaschen. Das Lektin wurde in 5 ml Kopplungspuffer gelöst und darin das Sepharosegel aufgenommen. Dieses Gemisch wurde für die Inkubation über Nacht bei 10°C so auf einem Kippschüttler angebracht, daß eine gute Durchmischung möglich war ("end over end"). Am nächsten Tag wurde das Gel auf dem Sinterfilter mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen, um das überschüssige Lektin zu entfernen. Zur Blockierung der übrigen reaktiven Gruppen der Sepharose wurde das Gel anschließend in 0,1 M Tris-Puffer pH 8 für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Abschließend wurde das Gel in drei Zyklen mit wechselndem pH gewaschen. Für diese Prozedur wurden 0,1 M Acetatpuffer pH 4 und 0,1 M Tris-Puffer pH 8 verwendet, beide Lösungen enthielten 0,5 M NaCl. Bei jedem Waschschrift wurde das Gel für einige Minuten in dem entsprechenden Puffer auf dem Sinterfilter geschwenkt und dann durch Unterdruck die Lösung entfernt. Bis zur Durchführung der Affinitätschromatografie wurde die nun fertige Säulenmatrix im Säulenlaufpuffer (20 mM Tris-Puffer pH 7,2 mit 150 mM NaCl) bei 4°C aufbewahrt.

### **Kopplungspuffer pH 8,3**

NaHCO <sub>3</sub>	0,1 M
NaCl	0,5 M

#### 2.6.4 Affinitätschromatografie mit der Lektin-Säule

Die mit dem *Arachis hypogaea*-Lektin gekoppelte Säulenmatrix wurde in eine Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatography-Säule (BIORAD) gefüllt. Das Säulenvolumen betrug ca. 1,5 ml. Vor jeder Affinitätsstrennung wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Säulenlaufpuffer äquilibriert. Danach erfolgte der Auftrag des vorbereiteten Proteingemisches. Nicht gebundenes Protein wurde mit 5 Säulenvolumen aus der Säule gewaschen. Für das Ablösen des gebundenen Proteins wurde als Konkurrenzligand Galactose benutzt. Die Elution des gesuchten Proteins war mit 5 ml 0,2 M Galactose im Säulenlaufpuffer erfolgreich. Danach wurde die Säule für den nächsten Lauf äquilibriert. Während des gesamten Laufes wurden 2-ml-Fractionen gesammelt und nach dem Einengen in der Vakuumzentrifuge auf den Gehalt des gesuchten Proteins über gelelektrophoretische Auftrennung (5% Trenngel) und Western-Blot-Analyse untersucht. Die Fractionen, die Galactose enthielten, mußten für eine bessere Handhabbarkeit dialysiert werden.

#### Säulenlaufpuffer für die Affinitätschromatografie für *Arachis hypogaea*

Tris, pH 7,2	20 mM
NaCl	150 mM

### 2.7 Charakterisierung und Reinigung des korrespondierenden Antigens zu MS#75

#### 2.7.1 Charakterisierung des Liganden zu MS#75

Um einen Hinweis zu bekommen, ob das von MS#75 erkannte Protein evtl. eine Bedeutung bei Immunreaktionen hat, wurde der Antikörper sowohl im histologischen Präparat als auch auf den Blotmembranen auf seine Bindungsspezifität an Hämocyten von Larven getestet, die mit *Micrococcus luteus* infiziert und als Kontrolle mit Vollsaline injiziert wurden. Vorbereitung und Durchführung dieser Experimente sind unter 2.6.1 beschrieben.

Zur weiteren Charakterisierung des Liganden zu MS#75 wurden im Vergleich Hämocytenlysate unter reduzierenden (mit Mercaptoethanol) und nicht reduzierenden (ohne Mercaptoethanol) Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit diesem Antikörper inkubiert. Zusätzlich wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.6.1).



### 2.7.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung

Hämozyten des fünften Larvenstadiums (L5d2) wurden ähnlich der Vorbereitung für die Gelelektrophorese gewonnen, eingefroren und sonifiziert (siehe 2.2.2). Dabei befanden sich die Zellen ab dem letzten Waschschrift in Solubilisierungspuffer. Nach dieser Aufbereitung wurde das Zellysat 1 h bei 40.000 x g zentrifugiert und der Überstand für anschließende Untersuchungen aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in etwas Solubilisierungspuffer gelöst, dann mehrere Pellets vereint, eine Proteinbestimmung durchgeführt und für Parallelansätze wieder aliquotiert. Zu diesen Aliquots wurden unterschiedliche Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst in Solubilisierungspuffer gegeben (Seife-Protein-Verhältnis sollte zwischen 1 und 10 liegen). Folgende Detergenzien und Konzentrationen wurden ausgetestet:

SDS	0,2%; 0,5%
Triton X-100	0,2%; 0,5%; 1%
Triton X-114	0,5%; 1%
Tween 20	0,1%; 0,2%

Die Solubilisierungsansätze wurden 1 h bei 10°C (für SDS bei Raumtemperatur) geschüttelt und danach 1 h bei 40.000 x g und 4°C zentrifugiert (für SDS bei 18°C). Die Pellets wurden noch einmal mit Solubilisierungspuffer versetzt, nochmals für 1 h bei 10°C (für SDS bei Raumtemperatur) geschüttelt und für 1 h bei 40.000 x g und 4°C (für SDS bei 18°C) zentrifugiert. Alle Überstände und Pellets wurden für die Kontrollelektrophorese aufbereitet.

Proben mit Detergenzien, die sich nicht durch Dialyse entfernen lassen, wie z.B. Triton und Tween, konnten nicht ohne Probleme eingeeengt werden. Deshalb wurden in diesen Fällen die Detergenzien mit Calbiosorb<sup>®</sup> (CALBIOCHEM) entsprechend den Firmenangaben entfernt.

Später wurde Chaps als weiteres Detergenz in die Versuchsreihen mit aufgenommen. Hier wurden folgende Seife-Protein-Verhältnisse ausgetestet: 0,5; 1; 2; 5; 7,5; 10.

Der Erfolg der Solubilisierungsversuche wurde über Ultrazentrifugation mit einer BECKMANN-Zentrifuge (Modell L5-65) mit einem Ausschwenkrotor (SW 28) für eine Stunde bei 20°C und 128.000 x g verifiziert. Später wurde als Alternative der Nachweis über Größenausschlußchromatografie mit einer Sepharose Cl 6B-Säule erbracht (siehe 2.7.5).

**Solubilisierungspuffer, pH 6,5-6,8**

Pipes	17 mM
NaCl	0,1 M
Glycerin	10%

**2.7.3 Reinigung des Antikörpers MS#75**

Ein Liter Hybridomaüberstand, der den monoklonalen Antikörper MS#75 enthielt, wurde mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle (Modell 8400, AMICON) auf ca. 100 ml eingengt. Dabei wurden durch einen Filter (Polyethersulfonfilter PM 30, MILLIPORE, Ausschlußgrenze 30 kDa) alle höhermolekularen Proteine zurückgehalten und somit angereichert. Da es sich bei MS#75 um ein IgG-Molekül handelt, konnte das Protein durch eine 50%ige Ammoniumsulfatfällung weiter angereichert werden. Dabei wurde zum Hybridomaüberstand unter ständigem Rühren und auf Eis die entsprechende Menge gesättigte Ammoniumsulfatlösung tropfenweise hinzugefügt und weitere 60 min gerührt (siehe auch 2.2.9). Danach erfolgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C. Das Pellet wurde in 10 ml 20 mM Phosphatpuffer pH 7 aufgenommen und über Nacht gegen diesen Puffer bei 10°C unter leichtem Rühren dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Ammoniumsulfatfällung wiederholt und erneut dialysiert.

Die so erhaltene Proteinsuspension wurde auf eine Protein G-Säule (Säulenvolumen 1 ml, PHARMACIA) aufgetragen. Für die erfolgreiche Interaktion des Antikörpers mit dem Protein G wurde das Proteingemisch ca. 30 min auf der Säule inkubiert. Nach 10 Säulenvolumen Spülen mit 20 mM Phosphatpuffer pH 7 wurde mit 5 Säulenvolumen 0,1 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,7 eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden sofort mit 1 M Tris-Puffer pH 9 auf einen pH von ca. 7 eingestellt. Nach weiterem Spülen mit Phosphatpuffer für mindestens 10 Säulenvolumen konnte die Säule mit der nächsten Antikörperlösung beladen werden. Der Erfolg der Aufreinigung über die Protein G-Säule wurde nach jedem Durchgang zunächst über eine Proteinbestimmung getestet, wobei statt 4 µl 15 µl Probenvolumen aufgetragen wurden. Die Fraktionen ohne Protein wurden verworfen.

Später erfolgte exemplarisch eine Kontrolle über eine SDS-PAGE (10% Trenngel mit 4% Sammelgel) in einem mit Coomassie gefärbten Gel und einer dazugehörigen Western-Blot-Analyse. Die Membran wurde mit einem Anti-Maus-IgG-Antikörper inkubiert.

Alle Fraktionen aus der Säulenchromatografie, die den gesuchten Antikörper enthielten, wurden mit Hilfe der Vakuumzentrifuge eingengt und gepoolt.

### **Gesättigte Ammoniumsulfatlösung**

Ammoniumsulfat	550 g
A. dest.	ad 600 ml

pH 6,5 mit Ammoniak einstellen

#### **2.7.4 Immunpräzipitation mit MS#75**

Zellysatüberstand nach der Behandlung von Hämozyten aus 20 Larven mit 0,5% Triton X-100 wurde eingeeengt und gegen 20 mM Phosphatpuffer pH 6,5 mit 0,5 M NaCl dialysiert. Das Volumen wurde auf 4,8 ml eingestellt. Damit waren am Ende ungefähr 2% Triton X-100 in der Lösung. Dazu wurden 200 µl Antikörperlösung MS#75 nach Ammoniumsulfatfällung gegeben. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 10°C auf einem Kippschüttler ("end over end") inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl Protein G-Sepharose (ImmunoPure<sup>®</sup> Immobilized Protein G<sup>®</sup>, PIERCE) zu dem Zellysat-Antikörper-Gemisch gegeben und weitere 3 h bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Parallel dazu wurden zwei Kontrollen mitgeführt: je 25 µl Protein G-Sepharose wurden mit 1 µl Maus-IgG (Anti-Phosphotyrosin-Antikörper, NEB) bzw. mit 10 µl MS#75 aus der Ammoniumsulfatfällung gemischt. Die entsprechenden Protein G-Sepharose-Komplexe wurden sechsmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Dafür wurden die Komplexe bei 300 x g für 3 min pelletiert. Anschließend wurde noch einmal mit A. bidest. gewaschen. Die letzten Pellets wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abzentrifugieren der Sepharose wurden die Überstände auf zwei SDS-Gele verteilt, ein Gel für eine Silberfärbung und ein Gel für eine Western-Blot-Analyse. Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper MS#75 inkubiert.

Die mitgeführten Kontrollen waren notwendig, da durch das Kochen der Sepharose auch der gebundene Antikörper abgelöst wurde. Auch Spuren von Protein G waren zu erwarten.

#### **2.7.5 Größenausschlußchromatografie**

Eine Größenausschlußchromatografie mit Sepharose Cl 6B in einer 30 cm langen Säule mit einem ungefähren nutzbaren Volumen von 23 ml diente zum einen zur Kontrolle der Versuche zur Solubilisierung des gesuchten Proteins, wurde zum anderen aber auch als

Vorreinigungsmöglichkeit in Betracht gezogen. Zur Durchführung der Chromatografie wurde das BioLogic-System der Firma BIORAD benutzt.

Vor jedem Lauf wurde die Säule mit 50 ml Säulenlaufpuffer äquilibriert. Danach erfolgte der Probenauftrag (Probenvolumen 1 ml). Die Trennung erfolgte durch den Durchfluß von weiteren 50 ml Puffer. Der gesamte Lauf fand mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,5 ml/min statt. Während der Trennung wurden 2-ml-Fractionen gesammelt.

Zur Eichung der Säule wurde ein Gemisch aus 1 mg Blue Dextran (2.000 kDa) und 0,5 mg Jack-Bean-Urease (Dimer 240 kDa, Tetramer 480 kDa) eingesetzt.

### **Säulenlaufpuffer für die Größenausschlußchromatografie, pH 6,5-6,8**

Pipes 17 mM

NaCl 0,15 M

Während der Optimierungsversuche der Chromatografie wurden unterschiedliche Konzentrationen Chaps (bis 0,25%) zum Puffer dazugegeben.

### **2.7.6 Herstellung einer Affinitätschromatographiesäule mit MS#75**

Ungefähr 6 mg gereinigter Antikörper MS#75 wurden an 1 g CNBr-aktivierte Sephadex gekoppelt. In einem Parallelansatz wurden 6 mg BSA an ein weiteres Gramm Sephadex als Kontrolle gekoppelt. Dabei wurde nach der unter 2.6.3 beschriebenen Prozedur gearbeitet.

Ungefähr 100 µl der fertigen Matrices wurden mit einem Anti-Maus-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase für eine Stunde unter Schütteln inkubiert, der überschüssige Antikörper durch vier Waschschrte á 10 min mit TBS entfernt und durch die Inkubation mit BCIP und NBT das Vorhandensein des Enzyms durch eine Farbreaktion kenntlich gemacht.

Die Säulenmatrix für die Affinitätschromatografie hatte letztendlich ein Volumen von 3 ml.

### **2.7.7 Affinitätschromatografie mit der MS#75-Säule**

Zur Vorbereitung auf die Affinitätschromatografie wurden die Hämozyten mit 0,5% Chaps (Seife-Protein-Verhältnis sollte dabei größer als 5 sein) behandelt und der Überstand in der Vakuumzentrifuge eingengt und gegen Säulenlaufpuffer dialysiert. Die so erhaltene Probe wurde zusammen mit der Säulenmatrix, an die der Antikörper MS#75 gekoppelt war, in insgesamt ca. 8 ml Säulenlaufpuffer 3 h bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln ("end over end") inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden 50 µl Proteaseinhibitor-Cocktail und

20 µl 0,02% Natriumazid in A. bidest. gegeben. Der weitere Verlauf der Chromatografie fand mit Hilfe des BioLogic-Systems (BIORAD) statt. Dazu wurde die Matrix in eine 5-cm-Glassäule umgefüllt. Die überschüssige Lösung wurde für die Kontrollgelelektrophorese aufbewahrt. Das Programm sah bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wie folgt aus:

Schritt	Volumen	Puffer
Spülen der Säule	0-20 ml	Säulenlaufpuffer
Elution des gebundenen Proteins	20-30 ml	Glycin/HCl-Puffer, pH 2,8; +0,25% Chaps
Spülen der Säule	30-50 ml	Säulenlaufpuffer

Die Elution erfolgte durch einen schnellen pH-Wechsel ins saure Milieu. Die einzelnen Fraktionen mit diesem sauren pH wurden sofort mit 1 M Tris-Puffer pH 9 auf einen pH von ca. 7 eingestellt. Während des gesamten Laufes wurden 2-ml-Fraktionen gesammelt. Alle Proben wurden in der Vakuumzentrifuge eingeeengt und über eine SDS-PAGE (6% Trenngel, 4% Sammelgel) mit anschließendem Western Blot und Inkubation der Blotmembran mit dem Antikörper MS#75 ausgewertet.

#### **Säulenlaufpuffer für die Affinitätschromatografie für MS#75**

Phosphatpuffer, pH 6,5	10 mM
NaCl	0,1 M
Chaps	0,25%

## **2.8 Trennung von Hämozyten über Dichtegradientenzentrifugation**

### **2.8.1 Vorbereitung der Percollösung**

Das von PHARMACIA hergestellte Percoll entspricht Kieselerde umhüllt mit PVP in kolloidaler Lösung mit einem Partikeldurchmesser von 21-22 nm. Es wird von der Firma als 23% (w/v) Lösung in A. bidest. geliefert und muß den gewünschten physiologischen Verhältnissen angepaßt werden. Demzufolge wurde 1 Teil 10fach konzentrierte AC-Saline mit 9 Teilen Percoll gemischt. Dieses Gemisch wurde als "100% physiologisches Percoll" bezeichnet und war die Ausgangslösung zur Herstellung aller verwendeten Percollösungen.

**10fach konzentrierte AC-Saline** (Angaben in g für 100 ml)

NaCl	0,23
KCl	2,98
Saccharose	30,0
Polyvinylpyrolidon	1
EDTA	3,01
Zitronensr.-1-Hydrat	2,0
Na-Citrat	8,0
Pipes	0,58

in A. bidest. lösen, einstellen des pH 6,5 mit NaOH-KOH-Mischung (1:1)

**2.8.2 Trennung von Hämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten**2.8.2.1 Herstellung eines kontinuierlichen Percollgradienten

Mit Hilfe eines kontinuierlichen Percollgradienten sollte ein erster Überblick über das Verhalten der Hämozyten entsprechend ihrer Dichte gewonnen werden. Dabei war zu beachten, daß Percoll nur metastabile Gradienten bildet, d.h. sie verändern sich ständig bei anhaltender Zentrifugation mit hoher g-Zahl; je länger zentrifugiert wird, desto steiler ist der Gradient im Mittelbereich. Im Verlauf der Versuche wurde der Gradient standardmäßig aus einer 40%-Percollösung in AC-Saline durch Zentrifugation bei 4°C und 20.000 x g in einem Festwinkelrotor für 20 min aufgebaut. Die Zentrifuge war so eingestellt, daß zum Ende der Zentrifugation die Drehung des Rotors nicht abgebremst wurde. Zu jedem Percollansatz wurden 50 µl eines Gemisches von Markerbeads in A. bidest. pipettiert. Diese Markerbeads gaben nach der Zentrifugation Auskunft über die Qualität des Gradienten. Nur gut eingestellte Gradienten wurden für weitere Versuche verwendet.

Alle Zentrifugationsröhrchen wurden vorher mit Silan<sup>®</sup> behandelt.

**Markerbeads für die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (PHARMACIA)**

Farbe	Nummer	Buoyant-Dichte in [g/ml] für 0,25 M Sucrose-Lösung
Blau	1	1,035-6
Gelb-orange	2	1,049-51
Grün	3	1,050-54
Rot	4	1,069-72
Blau	10	1,082-84
Orange	6	1,098-100
Grün	7	1,111-12
Violett-schwarz	9	1,125-35
Rot	8	1,131-33

2.8.2.2 Vorbereitung der Hämozyten und Auftrag auf den Gradienten

Die Hämozyten wurden entsprechend der unter 2.2.2.1 angegebenen Methode gewonnen, allerdings nur einmal in AC-Saline gewaschen. Das danach erhaltene Pellet wurde in 200 µl AC-Saline aufgenommen und vorsichtig auf den Percollgradienten geschichtet.

Der Gradient mit den Hämozyten wurde nun 15 min bei 4°C und 400 x g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Dabei wurde die Zentrifuge so eingestellt, daß die Zentrifugation langsam begonnen und am Ende nicht abgebremst wurde.

2.8.2.3 Abtragen des Percollgradienten

Zuerst wurde der Gradient mit Markerbeads und Zellen analysiert und vom Meniskus ausgehend ausgemessen. Der Percollgradient wurde dann in Fraktionen á 1 ml von oben her abgetragen und jeder dieser Milliliter in jeweils ein Reagenzgefäß mit vorgelegten 5 ml eiskalter AC-Saline pipettiert. Die Gefäße wurden 10 min bei 4°C und 200 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in einer geringen Menge Grace-Insektenmedium (etwa 40 µl) aufgenommen und auf die für die jeweilige Fraktion vorgesehenen Löcher von drei Mehrlochobjektträgern pipettiert. Nach 10 min, in denen sich die Zellen absetzen konnten, wurden die beiden Präparate für die Immunhistochemie mit 3,5% Paraformaldehyd in Ca/Mg-freier Saline und das Präparat für den Peroxidasenachweis mit 2,5% Glutaraldehyd in Ca/Mg-freier Saline für weitere 10 min fixiert und danach die Fixative zweimal mit TBS entfernt. Es

folgte eine dreißigminütige Inkubation mit 3% BSA in TBS. Nach dem Entfernen aller Flüssigkeit wurden die Objektträger bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.8.2.4 Auswertung der Zelltrennung

Die Zelltrennung wurde unter mehreren Aspekten ausgewertet. Zum einen wurde der Verlauf des kontinuierlichen Gradienten mit Hilfe der Markerbeads nachvollzogen und die ungefähre Lage der beobachteten Zellbanden bestimmt. Zum anderen wurden die drei Objektträger pro Tier ausgewertet. Von den beiden mit Paraformaldehyd fixierten Objektträgern wurde der eine mit dem Marker für granuläre Zellen MS#7 und der andere mit dem Marker für Plasmatozyten MS#13 inkubiert. Auf dem dritten mit Glutaraldehyd fixierten Objektträger wurde ein Peroxidasenachweis durchgeführt. Dieser diente zur Detektion von Oenozytoiden, die als typisches Enzym Phenoloxidase enthalten, welches eine Peroxidaseaktivität besitzt (HOLTHUSEN 1999). Dieser Objektträger wurde auch zur Auswertung der Trennung in Bezug auf sphärule Zellen genutzt, da die Glutaraldehydfixierung wesentlich besser die Zellstrukturen konservierte als die Paraformaldehydfixierung.

Je nach Anzahl der Zellen pro Loch auf den Mehrlochobjektträgern wurden entweder alle oder mindestens 1000 Zellen pro Loch gezählt und entsprechend der Anteil der markierten Zellen bestimmt.

Bei der Auswertung der Objektträger wurde außerdem darauf geachtet, wie hoch die Dichte der Zellen allgemein in den einzelnen Fraktionen war. Durch das genaue Zählen war es möglich, die Zellzahl pro Loch und damit pro Fraktion abzuschätzen. Damit lagen konkrete Zahlenwerte vor und die Auswertung der Zelltrennung konnte objektiv gestaltet werden.

Insgesamt wurden die Hämozyten von 6 Tieren je Entwicklungsstadium (L5d2 und Pd1) über einen 40% kontinuierlichen Percollgradienten getrennt.

#### Nachweis auf Peroxidase

Die Präparate wurden 10 min vor dem Aufbringen der Reaktionslösung mit 50 mM Tris-Puffer pH 7,6 inkubiert. Die Reaktionslösung wurde über Nacht auf den Hämozyten belassen. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zweimal mit TBS gewaschen und dann eingedeckelt.



### Reaktionslösung zum Nachweis der Peroxidaseaktivität

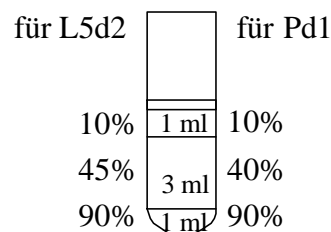
Diaminobenzidin (DAB)	5 mg
50 mM Tris pH 7,6	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1%)	200 µl

## 2.8.3 Trennung von Hämozyten über einen diskontinuierlichen Percollgradienten

### 2.8.3.1 Herstellung eines diskontinuierlichen Percollgradienten

Nach Auswertung der Zelltrennung im kontinuierlichen Percollgradienten wurde im Folgenden über einen diskontinuierlichen Gradienten versucht, das Hämozytengemisch aus der Hämolymphe zu fraktionieren.

Folgende Gradienten kamen zum Einsatz:



Die einzelnen Percollmischungen wurden vorsichtig übereinandergeschichtet und zum Schluß die einmal gewaschenen Hämozyten aufgetragen.

Der Gradient mit den Hämozyten wurde 15 min bei 4°C und 400 x g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert, wobei die Zentrifuge so eingestellt war, daß die Zentrifugation langsam begann und am Ende nicht abgebremst wurde.

### 2.8.3.2 Abtragen des Percollgradienten

Während der ersten Versuche wurde der Erfolg der Trennung kontrolliert, in dem sowohl die Zellringe, die sich an den Phasengrenzen ergaben, ausgewertet wurden, als auch die Percollösungen zwischen den Grenzen. Dabei wurde immer erst die Phasengrenze abgesaugt und dann das darüberliegende Percoll. Später wurden nur die Zellringe und deren nähere Umgebung aus dem Gradienten entnommen und in jeweils 5 ml eiskalte AC-Saline überführt und zentrifugiert. Je nach Verwendungszweck wurden die Hämozyten nach der letzten Zentrifugation entweder auf Objektträger pipettiert, um eine Auswertung über Immunhistochemie und Peroxidasenachweis durchzuführen, oder gesammelt und für die Gelelektro-

phorese aufbereitet.

Besonders bei der Trennung der Puppenhämozyten fiel auf, daß die Zellen teilweise sehr fragil waren und im Verlauf der Präparation verloren gingen. Deshalb wurden die Hämozyten, die für den Auftrag auf die Gelelektrophorese bestimmt waren, direkt aus dem Tier in AC-Saline mit 3,5% Paraformaldehyd entblutet.

## **2.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

### **2.9.1 Probenvorbereitung**

Die Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese, d.h. die Hämozytenlysate bzw. das Lysat der hämatopoietischen Organe wurden über Proteinbestimmung so eingestellt und aliquotiert, daß alle Gele, die am Ende verglichen werden sollten, mit der gleichen Proteinmenge beladen waren. Im Allgemeinen wurde eine Proteinmenge zwischen 50 und 150 µg aufgetragen.

Die einzelnen Proben wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 350 µl Solubilisierungspuffer aufgenommen. Dieses Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert.

#### **Solubilisierungspuffer für die 2D-Gelelektrophorese**

Harnstoff	9 M
DTT	1% (w/v)
Chaps	4% (w/v)
Pharmalyte (3-10NL)	1% (v/v)

### **2.9.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung**

Die Proteinlösung wurde in ein Keramikschißchen (IPGphor Strip Holder, PHARMACIA) gleichmäßig zwischen die beiden Elektroden einpipettiert. Auf die Proteinlösung wurde ein IEF-Streifen (pH 4-7, Immobiline DryStrip, PHARMACIA) mit der Gelseite nach unten

gelegt. Als Schutz vor Austrocknung wurde darüber 1 ml eines speziellen Öls (Immobiline DryStrip Cover Fluid, PHARMACIA) geschichtet.

Die fertigen Keramikscheibchen wurden auf die IPGphor (PHARMACIA) gelegt und das Programm zur Äquilibrierung und Fokussierung gestartet. Das verwendete Programm sah wie folgt aus:

Konstante Spannung	Dauer
30 V	5 h
60 V	5 h
200 V	1 h
500 V	1 h
2000 V	1 h
2000 - 8000 V	0,5 h
8000 V	12,5 h

Die Fokussierung wurde nach Ablauf des Programms beendet. Für die weitere Optimierung und die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Gelen untereinander war es wichtig, die Gesamt-Kilovoltstunden zu protokollieren. Trotz gleicher Fokussierungsdauer veränderte sich dieser Wert in Abhängigkeit von den Proben.

Nach der Fokussierung war die Lagerung der IEF-Streifen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $-80^{\circ}\text{C}$  möglich.

### 2.9.3 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die zweite Dimension wurde horizontal mit Gradientengelen (Gradient 12-14%, ExcelGel SDS, PHARMACIA) durchgeführt. Dazu wurde ein Flachbett-Elektrophoresegerät (Multiphor II, PHARMACIA) angeschlossen an einen Thermostaten benutzt. Zur optimalen Kühlung der Gele auf  $15^{\circ}\text{C}$  wurde auf jede Kühlplatte 1 ml DryStrip Cover Fluid fein verteilt und das Gel so aufgelegt, daß keine Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte blieben. An die äußeren Begrenzungen des Gels wurden ein Anoden- und ein Katodenpufferstreifen (SDS Buffer Strips, PHARMACIA) gelegt. Auch hier sollte keine Luftblase zwischen dem Gel und den Pufferstreifen sein.

Als Vorbereitung für die zweite Dimension wurden die IEF-Streifen mit den fokussierten Proben zunächst 20 min in Äquilibrierungspuffer A und danach 20 min in Äquilibrierungspuffer B geschwenkt (10 ml pro Streifen). Nach kurzem Spülen in A. bidest. wurden die Streifen vorsichtig abgetrocknet und nach 5 min mit der Gelseite nach unten etwa 1-2 mm

ohne Luftblasen vor den Katodenstreifen gelegt. Auf gleiche Höhe wurde ein feuchtes Filterblättchen platziert, auf das 2 µl Markerproteingemisch pipettiert wurden.

Die Elektrodenhalter an den Glasplatten wurden genau über die Pufferstreifen gestellt und die Glasplatten, ohne Druck auszuüben, abgesenkt. Die Elektroden wurden angeschlossen und die Kammer verschlossen.

Der Vorlauf fand bei konstant 20 mA pro Gel für 45 min statt. Danach wurden IEF-Streifen und Filterblättchen entfernt. Der Hauptlauf wurde bei konstant 40 mA pro Gel durchgeführt.

### **Äquilibrationpuffer-Stammlösung, pH 8,8**

Tris	50 mM
Harnstoff	6 M
Glycerin	30% (v/v)
SDS	2% (w/v)

pH mit HCl einstellen

### **Äquilibrationpuffer A**

10 ml Äquilibrationpuffer-Stammlösung versetzen mit:

DTT	100 mg
0,25% (w/v)-Bromphenolblau-	50 µl

Stammlösung

DTT im Ultraschallbad lösen.

### **Äquilibrationpuffer B**

10 ml Äquilibrationpuffer-Stammlösung versetzen mit:

Iodacetamid	400 mg
0,25% (w/v)-Bromphenolblau-	50 µl

Stammlösung

Iodacetamid im Ultraschallbad lösen.

## **2.9.4 Silberfärbung der Fertiggele**

Da sich die Fertiggele bei der Verwendung von hohen Alkoholkonzentrationen leicht von ihrer Plastikunterlage ablösen können, wurde die Silberfärbung nach BLUM und Mitarbeitern (1987) entsprechend angepaßt.

<b>Fixierer</b>	Ethanol (99,8%)	400 ml	mind. 1 h
	Essigsäure (100%)	100 ml	
	Formaldehyd (37%)	0,5 ml	
	A. dest.	ad 1000 ml	
<b>Waschlösung</b>	Ethanol (99,8%)	300 ml	2 x 10 min
	A. dest.	ad 1000 ml	
<b>Vorbehandlungslösung</b>	Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	0,2 g	1 min
	A. dest.	ad 1000 ml	
A. dest.			3 x 30 s
<b>Imprägnier- und Färbelösung</b>	Silbernitrat	2 g	20 min
	Formaldehyd (37%)	0,75 ml	
	A. dest.	ad 1000 ml	
A. dest.			2 x 30 s
<b>Entwickler</b>	Natriumcarbonat	60 g	nach Sicht
	Formaldehyd (37%)	0,5 ml	
	Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	4 µg*	
	A. dest.	ad 1000 ml	
A. dest.			20 s
<b>Stopplösung</b>	EDTA (50 mM)	14,61 g	10 min
	A. dest.	ad 1000 ml	
A. dest.			2 x 10 min

\*bzw. 2 ml der Vorbehandlungslösung

## **2.10 *In vitro*-Kultivierung von Hämozyten in Anwesenheit von *b*-Ecdyson**

### **2.10.1 Gewinnung der Hämozyten**

Für die anschließende Kultivierung der Hämozyten war es notwendig, die Hämolymphe unter sterilen Bedingungen zu entnehmen und nur mit sterilen Lösungen zu arbeiten.

Die ausgesuchten Tiere wurden durch Lagerung im Kühlschrank mindestens 20 min gekühlt und die Oberfläche intensiv mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Reinigung wurde unter der Sterilbank wiederholt. Bei den Larven wurde mit einer abgeflamnten Schere ein Kranzfüßchen angeschnitten, bei den Puppen wurden die Flügeldecken und der dorsale thorakale Bereich angeritzt. Die Hämolymphe eines Tieres wurde direkt in 5 ml eisgekühlte AC-Saline getropft und vorsichtig durchmischt. Die Zellen wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 200 x g bei 4°C pelletiert und anschließend zweimal mit eiskalter AC-Saline durch vorsichtiges Resuspendieren und anschließendem Zentrifugieren gewaschen. Das letzte Resuspendieren fand in einem definierten Volumen AC-Saline statt (je nach Größe des Pellets in 2-5 ml). Aus dieser Lösung wurde die Zahl der Hämozyten mit einer "Neubauer improved"-Zählkammer bestimmt. Das Pellet nach dem letzten Waschschrift wurde in Grace-Insektenmedium aufgenommen. Der Titer dieser Zellsuspension sollte bei Larven  $2 \times 10^6$  und bei Puppen  $1 \times 10^6$  Zellen/ml betragen.

### **2.10.2 Kultivierung der Hämozyten**

Für die Kultivierung der Zellen wurden 96-Loch-Platten und Zellkulturobjektträger (beides NUNC) vorbereitet.

In jeder 96-Loch-Platte wurden folgende Ansätze in vier Parallelen pro Tier vorbereitet:

Behandlung	Verwendete Stammlösungen	Verdünnung im Medium	Menge pro Loch
Kontrolle	-	Pur	-
Isopropanol	10% in A. bidest.	1:10	1% Isopropanol
Cortison in hoher Konzentration	1 mg/ml in A. bidest., 10% Isopropanol	1:10	10 µg Cortison, 1% Isopropanol
Cortison in niedriger Konzentration	Isopropanol	1:100	1 µg Cortison, 0,1% Isopropanol
β-Ecdyson in hoher Konzentration	1 mg/ml in A. bidest., 10% Isopropanol	1:10	10 µg Ecdyson (ung. $10^{-4}$ M), 1% Isopropanol
β-Ecdyson in niedriger Konzentration	Isopropanol	1:100	1 µg Ecdyson (ung. $10^{-5}$ M), 0,1% Isopropanol

Pro Loch wurden 100.000 bzw. 50.000 Hämocyten bei der Larvenpräparation eingesät. Bei der Puppenpräparation genügten 50.000 Hämocyten pro Loch. Letztendlich befanden sich 200 µl Medium in jedem Loch.

In den Zellkulturobjektträgern standen insgesamt nur 8 Felder zur Verfügung. Deshalb wurden jeweils zwei Parallelen folgender Ansätze kultiviert:

Behandlung	Verwendete Stammlösungen	Verdünnung im Medium	Menge pro Loch
Kontrolle	-	pur	-
Isopropanol	10% in A. bidest.	1:5	2% Isopropanol
Cortison in hoher Konzentration	1 mg/ml in A. bidest., 10% Isopropanol	1:5	20 µg Cortison, 2% Isopropanol
β-Ecdyson in hoher Konzentration	1 mg/ml in A. bidest., 10% Isopropanol	1:5	20 µg Ecdyson (ung. $2 \times 10^{-4}$ M), 2% Isopropanol

Pro Feld wurden bei der Larvenpräparation 400.000 bzw. 200.000 Hämocyten und bei der Puppepräparation 200.000 Hämocyten eingesät. Letztendlich befanden sich 400 µl Medium in jedem Feld.

96-Loch-Platten und Zellkulturobjektträger wurden bei 25°C inkubiert. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden sowohl Platten als auch Objektträger alle 24 h unter einem Invers-

mikroskop ausgewertet. Letztendlich wurde eine Inkubationszeit von 72 h festgelegt, um die Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten.

### 2.10.3 Auswertung der Hämocytenkulturen

Die Inkubation der Zellen in der 96-Loch-Platte in den verschiedenen Medien wurde durch die Zugabe von 2,5% Glutaraldehyd in Ca/Mg-freier Saline gestoppt. Nach intensiver lichtmikroskopischer Auswertung wurde der Nachweis für Peroxidaseaktivität durchgeführt.

Die Zellen in den Zellkulturobjektträgern wurden mit 3,5% Paraformaldehyd in Ca/Mg-freier Saline fixiert und dann weiter bearbeitet, wie für die Immunhistochemie (2.2.4) beschrieben.

Die Objektträger wurden bis zur Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde jeweils ein Feld pro Ansatz mit dem Marker für granuläre Zellen MS#7 und das andere mit dem Marker für Plasmatozyten MS#13 inkubiert.

Während der einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper (für diese Anwendung wurde ein Cy3-markierter Antikörper gewählt), wurde zusätzlich 300 mM FITC-markiertes Phalloidin, welches an Actin bindet, zu den Ansätzen gegeben (Objektträger für die Phalloidininkubation mußten vorher mit 0,5% Triton X-100 in 3% BSA-TBS behandelt werden.). Während des vorletzten Waschschrilles, der auf 20 min ausgedehnt wurde, wurde der interkalierende, blau fluoreszierende DNA-Farbstoff DAPI ( $10^{-6}$  M in 0,5% BSA-TBS) zu den Zellen gegeben. Nach Beendigung der verschiedenen Inkubationen wurde die Maske vom Objektträger abgetrennt und der Objektträger mit DABCO-Glycerin eingedeckelt.

#### Nachweis auf Peroxidase

Die Präparate wurden 10 min vor dem Aufbringen der Reaktionslösung mit 50 mM Tris-Puffer pH 7,6 inkubiert. Die Reaktionslösung wurde über Nacht auf den Hämocyten belassen.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zweimal mit TBS gewaschen und dann eingedeckelt.

#### **Reaktionslösung zum Nachweis der Peroxidaseaktivität**

Diaminobenzidin (DAB)	5 mg
50 mM Tris pH 7,6	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1%)	200 µl



## **2.11 Untersuchungen zur Hämatopoiese im fünften Larvenstadium**

### **2.11.1 Präparation der hämatopoietischen Organe**

Die hämatopoietischen Organe der Larven von *M. sexta* befinden sich als schalenförmiger angeordnete Loben um jede der vier Flügelanlagen. Diese befinden sich lateral im meso- und metathorakalen Segment und sind von außen gut zu erkennen. Für die Präparation wurden die vorfixierten Larven (L5d2) vom Abdomen her seitlich entlang des Dorsalgefäßes geöffnet und unter TBS aufgespannt (siehe auch 2.2.3).

Der vordere Teil des Tieres enthält wenig Fettkörper und sehr viele Tracheen. Zur Orientierung eignete sich der Haupttracheenast, der erstes (im vorderen Thorakalsegment) und zweites Stigmmum (im ersten Abdominalsegment) verbindet. Die Flügelanlagen liegen sehr dicht an der Epidermis, d.h. um zu ihnen vorzudringen, mußten zunächst einzelne Gewebeschichten von der Innenseite des Tieres her abgetragen werden. Die erste Schicht ist ein Lobus Fettkörper. Danach folgten einige Muskelstränge. Die Flügelanlage besteht aus einem Knäuel dicht gepackter Tracheen und einem durchscheinenden formstabilen Gewebe, der zukünftigen epithelialen Oberfläche des Flügels. Da herum ist das "wolken"artige hämatopoietische Organ wie ein Baseballhandschuh angeordnet. Zum Herauspräparieren dieser beiden Organe mußte vorsichtig die Verbindung zur Epidermis durchtrennt werden (Abb.2).

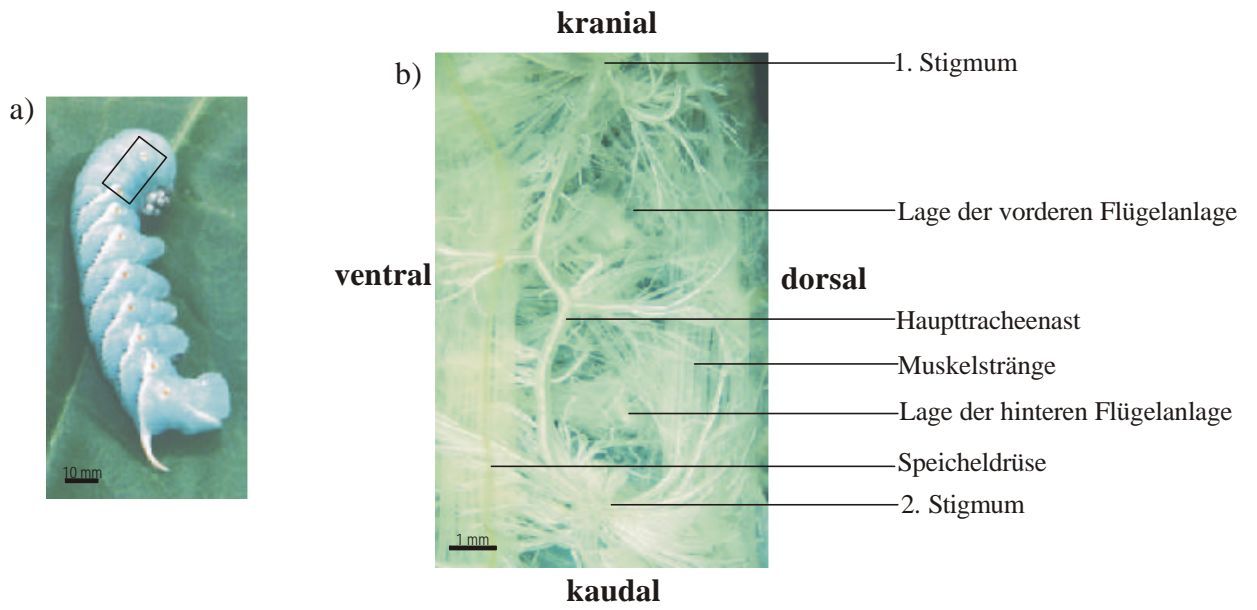
### **2.11.2 Aufbereitung der hämatopoietischen Organe für weitere Untersuchungen**

Zur Herstellung der Kryoschnitte für immunhistologische Untersuchungen wurde aus vorfixierten Tieren je eine Flügelanlage mit dem hämatopoietischen Organ und der Epidermis als äußerer Begrenzung als Quader herauspräpariert. Die Epidermis diente im Schnitt als Orientierung. Das Gewebestück wurde in Tissue Tec<sup>®</sup> (SAKURA) eingebettet und im Kryostaten (SLEE/Mainz) zu 12 µm dicken Schnitten verarbeitet. Die Schnitte wurden auf

---

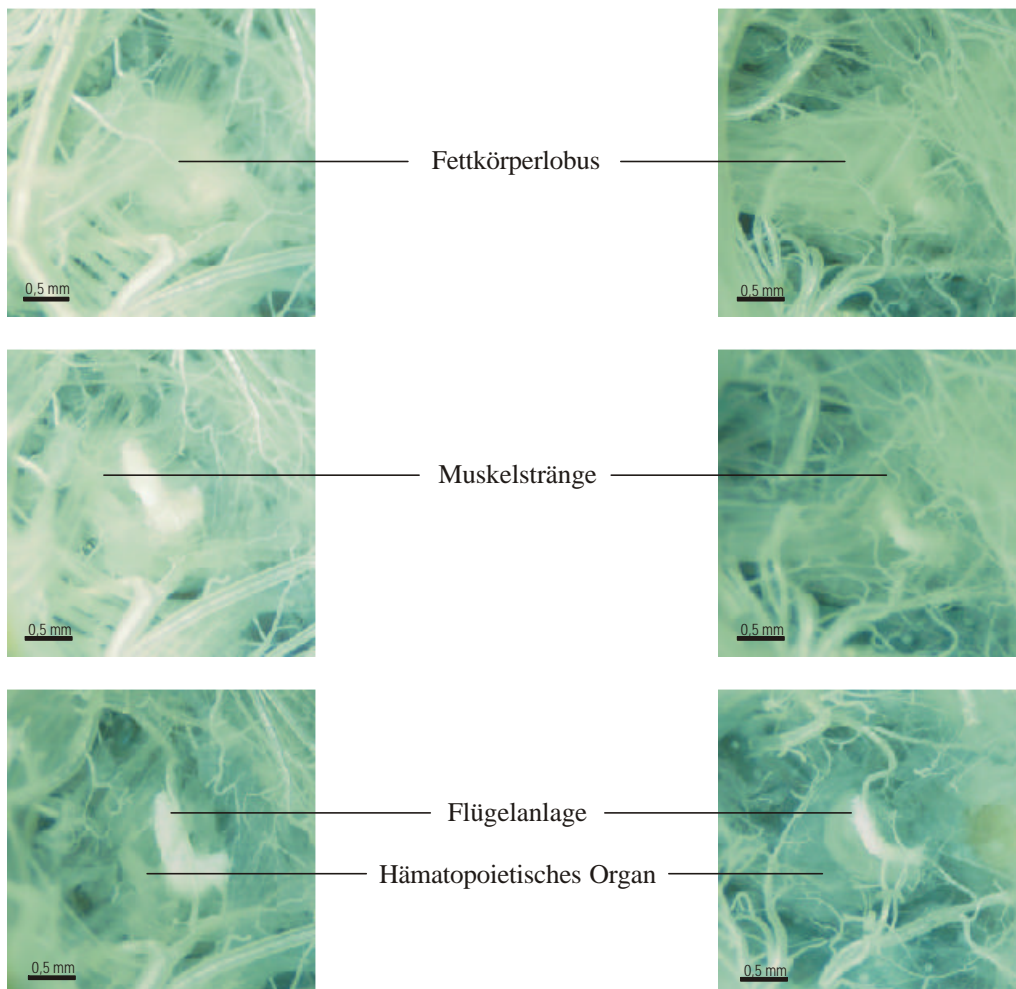
**Abb.2** (S. 63): Lage und Präparation der hämatopoietischen Organe: a) Larve (L5d2), markierter Kasten entspricht in der Außenansicht b); b) aufpräparierte Larve im meso- und metathorakalen Bereich, c) schrittweise Präparation einer vorderen Flügelanlage mit hämatopoietischem Organ; d) schrittweise Präparation einer hinteren Flügelanlage mit hämatopoietischem Organ

Abb.2



c) Vordere Flügelanlage

d) Hintere Flügelanlage



Objektträgern mit geladener Oberfläche (SuperFrost<sup>®</sup> Plus, MENZEL-GLÄSER) aufgefangen und eingefroren. Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde jeder Schnitt 10 min mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert und 30 min mit 3% BSA-TBS blockiert. Für die bessere Durchdringungsmöglichkeit der Antikörper wurden die Schnitte vor dem Blockieren zumeist 5 min mit 0,5% Triton X-100 in 3% BSA in TBS behandelt (siehe 2.2.4).

Zur Identifizierung der Hämozytentypen wurde als Marker für granuläre Zellen MS#7 und für Plasmatozyten MS#75 genutzt (der Ligand von MS#13 wurde nach Tritonbehandlung vom Antikörper nicht mehr erkannt). Um die Mitoseaktivität im hämatopoietischen Organ nachzuweisen, wurde ein kommerzieller Antikörper gegen Phospho-Histon H3 (aus Kaninchen, UPSTATE; GOTO et al. 1999) in einer 1:200 Verdünnung benutzt. Damit dieser Antikörper an seinen Liganden im Zellkern binden kann, mußte das Präparat vorab mit Triton X-100 behandelt werden.

Auch für die Elektronenmikroskopie wurde ein Quader mit Flügelanlage, hämatopoietischem Organ und Epidermis als äußerer Begrenzung herauspräpariert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Aufarbeitung der Hämozyten (siehe 2.2.2.2).

Für die Auftrennung in der Gelelektrophorese wurde das hämatopoietische Organ von der Flügelanlage getrennt und einzeln aufbereitet wie unter 2.2.3.3 beschrieben.

### **2.11.3 Untersuchungen zur Zellteilungsaktivität der Hämozyten**

Den Untersuchungen am hämatopoietischen Organ wurden die gleichen Versuche an frei flottierenden Hämozyten aus Larven (L5d2) gegenübergestellt. Hämozytenpräparate, die wie unter 2.2.2.3 beschrieben hergestellt wurden, wurden mit MS#7 als Marker für granuläre Zellen und MS#75 als Marker für Plasmatozyten in Kombination mit dem Antikörper gegen Phospho-Histon H3 (aus Kaninchen, UPSTATE; GOTO et al. 1999) inkubiert. Die Präparate mußten vor der Inkubation mit den Antikörpern mit 0,5% Triton X-100 in 3% BSA in TBS behandelt werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine Beobachtungen zu Hämocyten von Larven und Puppen

#### 3.1.1 Licht- und elektronenmikroskopischer Vergleich der Hämocyten von Larven und Puppen

Der erste Schritt in der Bearbeitung der für die vorliegende Arbeit gegebenen Fragestellung war der Vergleich der Hämocyten der Larve im letzten Stadium (L5d2) mit den Hämocyten der Puppe (Pd1) im Licht- und im Elektronenmikroskop.

Schon unter dem Lichtmikroskop fiel auf, daß sich das Hämocytenbild von Larven und Puppen wesentlich voneinander unterscheidet (Abb.3a, b). Während in den Larvenpräparaten Plasmatozyten, granuläre Zellen, Oenocytoide und sphärule Zellen deutlich zu identifizieren waren, fanden sich in den Puppenpräparaten nur Plasmatozyten und granuläre Zellen. Die Zellen dieser beiden Typen unterschieden sich allerdings von den entsprechenden Zellen der Larven. Die Plasmatozyten der Puppen waren gespreiteter, die granulären Zellen enthielten auffälligere Granulen und waren insgesamt größer als die granulären Zellen der Larven. Sphärule Zellen und Oenocytoide traten in Puppen nur äußerst selten auf. Weiterhin fiel auf, daß die Zahl der granulären Zellen und die der Plasmatozyten im untersuchten Larvenstadium ungefähr gleich war, während in Puppen die Plasmatozyten dominierten. Insgesamt enthielten die Puppen auf den ersten Blick weniger Hämocyten als die Larven.

Im elektronenmikroskopischen Bild ließen sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologien sehr gut identifizieren (Abb.3c, d). Die Plasmatozyten hatten keine bestimmte Form, meist waren sie spindelförmig. Auffällig waren die vielen angeschnittenen Filopodien und der gelappte Kern. Dieser enthielt einen scharf abgegrenzten, teilweise sehr großen Nucleolus. Im Cytoplasma waren vor allem rauhes endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien zu finden. Die Plasmatozyten der Puppen unterschieden sich nicht wesentlich von den larvalen Plasmatozyten. Beobachtet werden konnte nur, daß die Zellen meist in annähernd runder Form angeschnitten waren und der Kern noch gelappter schien als bei den Zellen der Larven.

Die larvalen granulären Zellen waren meist rundlich mit einem annähernd runden Zellkern. Dieser enthielt einen scharf abgegrenzten Nucleolus. Im Cytoplasma befand sich reichlich rauhes endoplasmatisches Retikulum, das sich oft erweiterte und Zisternen bildete. Daneben

fanden sich einige Mitochondrien und auffällig elektronendichte Granulen, die in ihrer Anzahl und Größe von Zelle zu Zelle variierten. Oft war es möglich, fibrilläre Strukturen in diesen Granulen auszumachen. Die granulären Zellen der Puppen dagegen zeigten eine ganz andere Struktur. Sie hatten kaum rauhes endoplasmatisches Retikulum, dafür waren sie angefüllt mit Granulen, die sich in ihrer Elektronendichte, Struktur und Form voneinander unterschieden. Der Zellkern dieser Zellen war nur selten klar abgegrenzt.

In den Präparaten der larvalen Hämozyten konnten Oenozytoide und sphärule Zellen identifiziert werden. Oenozytoide waren relativ große ovoide Zellen mit einem scharf abgegrenzten Nucleolus im Zellkern. Interessant war die Strukturierung im Cytoplasma: Es enthielt sehr viele Ribosomen, die nur selten am endoplasmatischen Retikulum gebunden waren. Daneben besaßen sie einige elektronendichte Granulen und nur selten Mitochondrien. Sphärule Zellen waren leicht an ihren riesigen Einschlüssen zu erkennen, die dazu führten, daß sich die Zellmembran entsprechend "ausbeulte". Diese Einschlüsse enthielten feines granuläres Material, welches vermutlich durch die Behandlung der Präparate teilweise herausgelöst war. Im cytoplasmatischen Raum zwischen den Sphärulen befanden sich rauhes endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien. Der Zellkern der sphärule Zellen war durch die großen Einschlüsse etwas verformt.

### 3.1.2 Bestimmung von THC und DHC

Ausgehend von den ersten Beobachtungen wurden genauere Untersuchungen bezüglich des THC ("total hemocyte count") und DHC ("differential hemocyte count") angeschlossen (siehe Anhang 1).

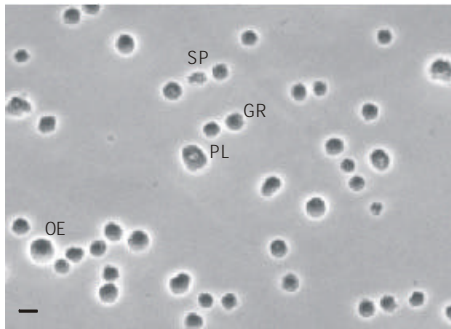
Für die Bestimmung des THC wurden bei Larven, beginnend im vierten, dem vorletzten Larvenstadium, fortlaufend das Alter und das Gewicht erfaßt und täglich bzw. im Abstand von zwei Tagen Proben von mindestens fünf Tiere ausgewertet.

---

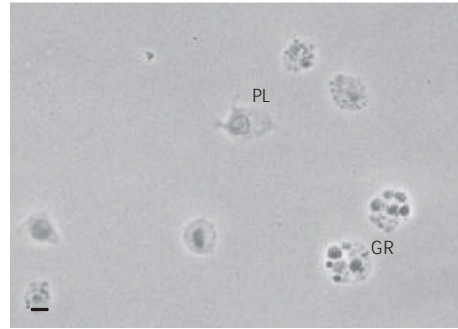
**Abb.3** (S.67): Hämozyten im licht- und elektronenmikroskopischen Bild; a) Hämozyten einer Larve (L5d2) im Lichtmikroskop; b) Hämozyten einer Puppe (Pd1) im Lichtmikroskop; c) Hämozyten einer Larve (L5d2) im Elektronenmikroskop: 1, 2, 3 (Ausschnitt von 2) - granuläre Zellen (Pfeil kennzeichnet eine elektronendichte Granule mit fibrillären Strukturen), 4, 5 (Ausschnitt von 4) - Oenozytoide, 6, 7- Plasmatozyten (Pfeile kennzeichnen Mitochondrien), 8- sphärule Zelle; d) Hämozyten einer Puppe (Pd1) im Elektronenmikroskop: 1 - granuläre Zelle, 2, 3- Plasmatozyten (Pfeil kennzeichnet großes Mitochondrium)  
Balken in den lichtmikroskopischen Bildern entspricht 10 µm  
Balken in den elektronenmikroskopischen Bildern entspricht 1 µm  
GR- granuläre Zelle, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoide, SP- sphärule Zelle

**Abb.3**

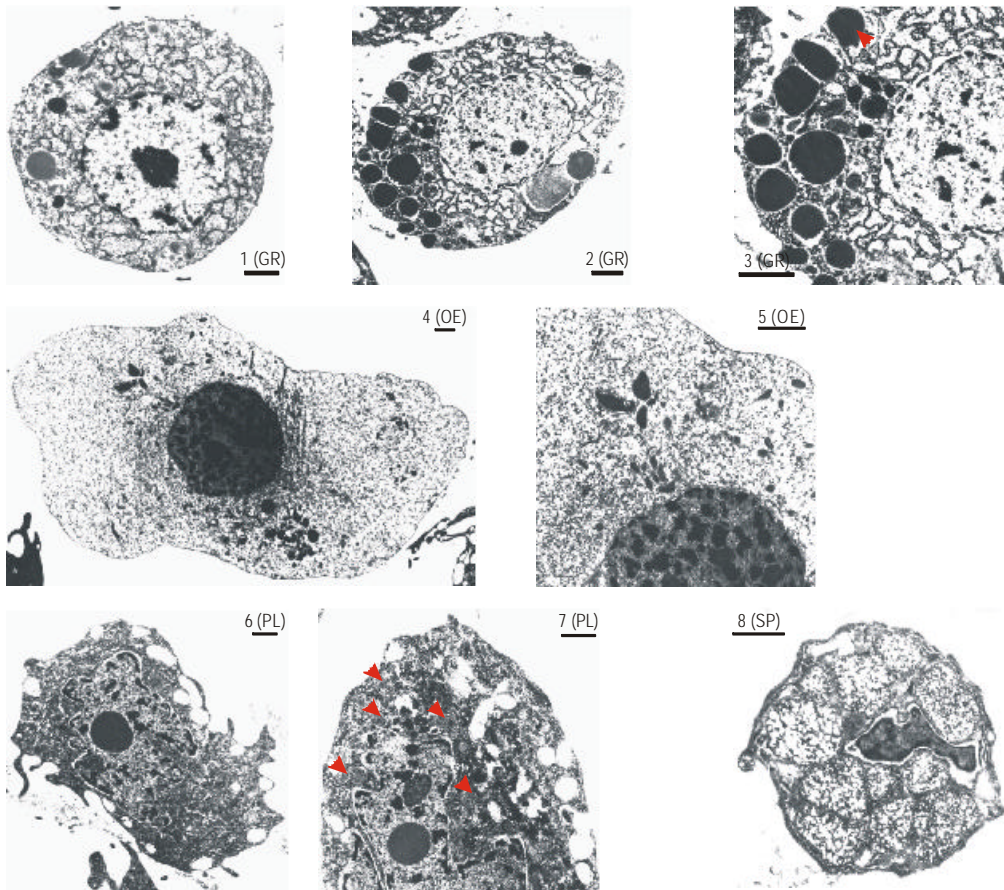
a) Hämozyten einer Larve (L5d2) im Lichtmikroskop



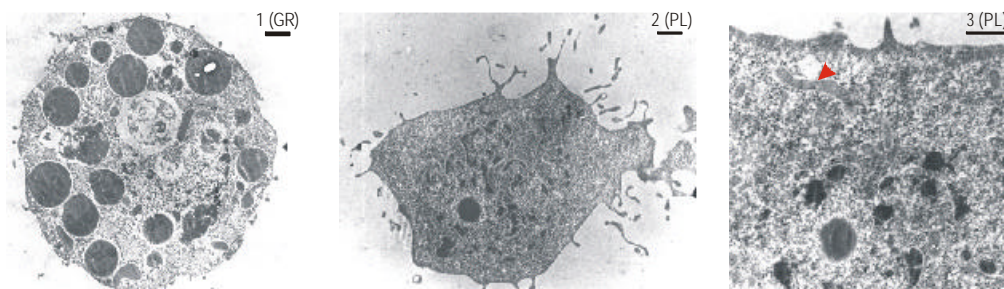
b) Hämozyten einer Puppe (Pd1) im Lichtmikroskop



c) Hämozyten einer Larve (L5d2) im Elektronenmikroskop



d) Hämozyten einer Puppe (Pd1) im Elektronenmikroskop



Anhand des Kurvenverlaufes für das Körpergewicht (Abb.4) läßt sich die Entwicklung während des letzten Larvenstadiums gut nachvollziehen. Dieses wird in drei Teilstadien unterteilt. Zum Ende des ersten Stadiums, dem Freßstadium, erreichte das Körpergewicht ungefähr das sechsfache des Ausgangsgewichts. Es stieg von ca. 1,9 g (L5d0) auf 11,4 g (L5d6). Danach schließt sich das Wanderstadium an. Mit Beginn dieser Phase hörten die Tiere auf zu fressen. Das Gewicht sank auf ca. 5,5 g (L5d10) ab. Zum Ende des letzten Larvenstadiums werden aus den Larven Präpuppen. Einen Tag später hatten sich die Tiere verpuppt und wogen ca. 3,6 g (Pd0).

Der THC (Abb.4) ist ein Maß für den Titer oder auch die "Konzentration" der Zellen in der Hämolymphe. Dieser Wert stieg vor der letzten larvalen Häutung und erreichte sein Maximum von  $1,9 \times 10^7$  Zellen/ml am ersten Tag nach der Häutung (L5d0). Danach sank er bis zum Beginn des Wanderstadiums (L5d6) auf ca.  $3,7 \times 10^6$  Zellen/ml. Kurz vor der Häutung zur Puppe (L5d10) stieg die Konzentration der Zellen noch einmal auf  $9,6 \times 10^6$  Zellen/ml. In den Puppen (Pd0) konnte nur noch ein durchschnittlicher THC von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml ermittelt werden.

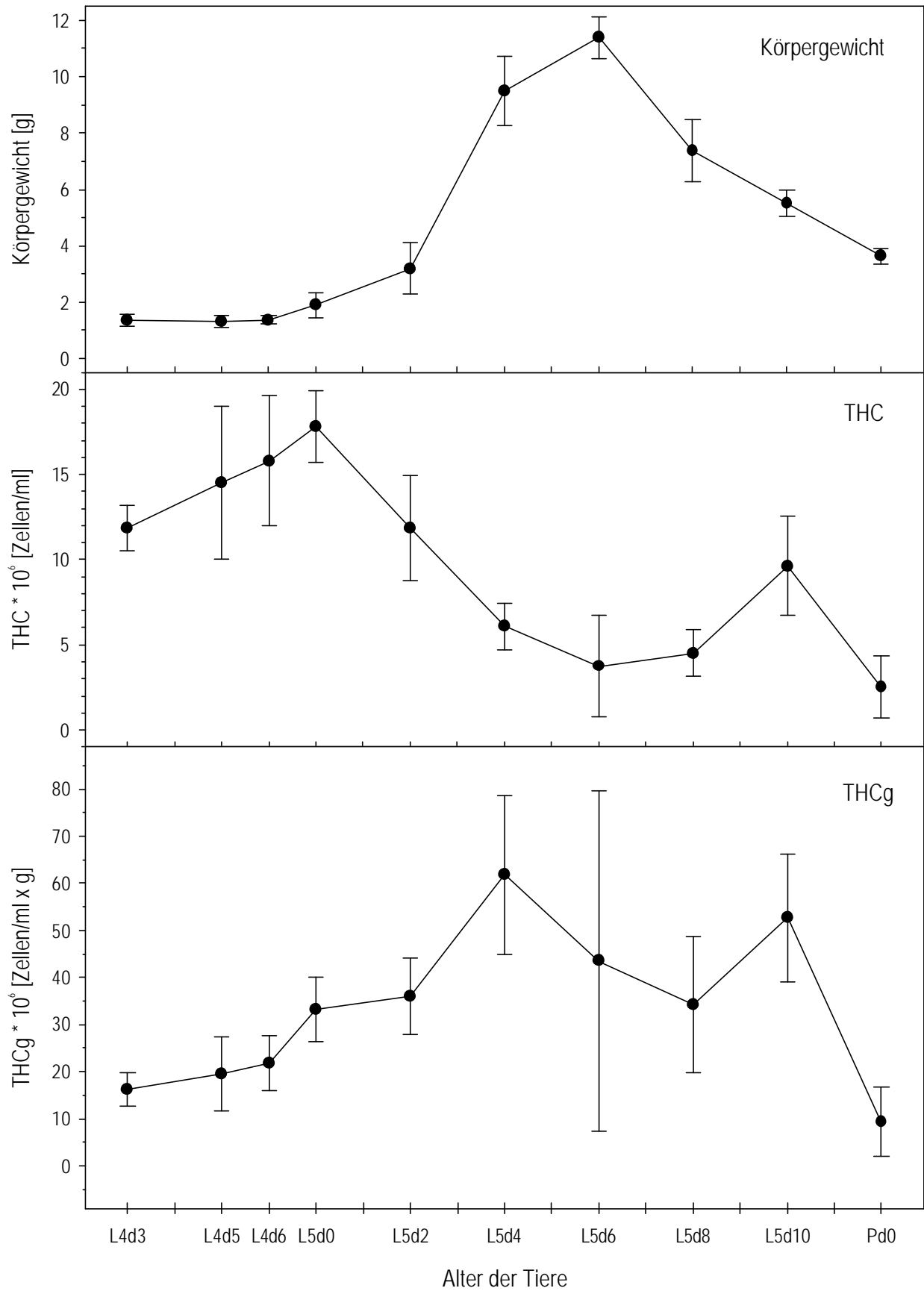
Da sich im Verlauf des letzten Larvenstadiums Körpergewicht und auch Hämolympfmenge drastisch verändern, wurde nach einem Maß gesucht, das ungefähr der Gesamtzellzahl in einem Individuum nahe kommt. Dazu wurde der ermittelte THC-Wert eines Tieres auf das entsprechende Körpergewicht bezogen. Dieser Wert wurde THCg genannt. Die grafische Darstellung dieser Werte (Abb.4) zeigte, daß die Zahl der Hämozyten vom ersten Tag des letzten Larvenstadiums bis kurz vor Beginn des Wanderstadiums kontinuierlich zunahm. Der Maximalwert von  $6,2 \times 10^7$  Zellen/ml pro Gramm Körpergewicht wurde in dem hier untersuchten Zeitfenster am fünften Tag (L5d4) erreicht. Nach einem Abfall der Werte wurde ein weiteres Maximum zum Zeitpunkt L5d10 mit  $5,3 \times 10^7$  Zellen/ml x g Körpergewicht ermittelt. Bei den untersuchten Puppen (Pd0) ergab sich ein durchschnittlicher THCg-Wert von  $9,4 \times 10^6$  Zellen/ml x g Körpergewicht.

Zur Bestimmung des DHC wurden die Hämozyten von Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) fixiert und mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern identifiziert. Dabei wurden die Antikörper MS#7 für die granulären Zellen, MS#13 für die Plasmatozyten und MS#19 für die Oenozytoide verwendet. Da für die sphäkulen Zellen kein spezifischer Antikörper zur

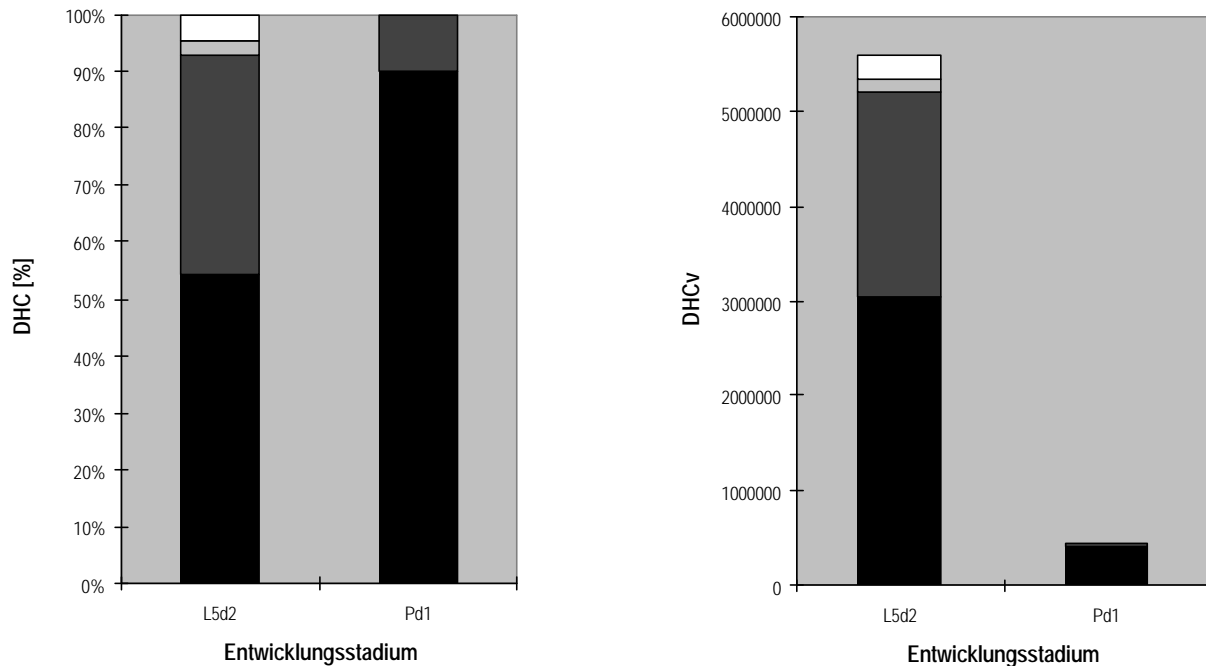
---

**Abb.4** (S.69): Körpergewicht, THC und THCg (entspricht dem THC bezogen auf das Körpergewicht) dargestellt in Abhängigkeit vom Alter der Tiere, • Mittelwerte, —| Standardabweichung

Abb.4







**Abb.5:** Vergleich der differentiellen Hämozytenzahl DHC und DHCv (DHC bezogen auf die Gesamtzellzahl) von Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) ermittelt in immunhistologischen Präparaten mit den Markerantikörpern MS#7 (GR), MS#13 (PL) und MS#19 (OE): schwarz- Plasmatozyten, dunkelgrau- granuläre Zellen, hellgrau- Oenozytoide, weiß- nicht markierte Zellen

Verfügung stand, fiel dieser Zelltyp unter die Kategorie "nicht markierte Zellen". Insgesamt wurden Präparate von fünf verschiedenen Tieren ausgezählt (Abb.5).

Aus der differentiellen Zählung ergab sich, daß in den untersuchten Larven Plasmatozyten etwas häufiger vorhanden waren als granuläre Zellen: granuläre Zellen zu 39% und Plasmatozyten zu 54%. Oenozytoide traten mit einer Häufigkeit von 2,4% auf. Dieser Zelltyp wurde in den Puppen nicht mehr nachgewiesen. Hier waren die Plasmatozyten mit einem Anteil von 90% der dominierende Zelltyp. Granuläre Zellen waren nur noch mit 10% vertreten. Auch sphärule Zellen, die eine sehr auffällige Gestalt haben, konnten in den Präparaten der Puppen nicht mehr beobachtet werden.

Diese ersten Daten bildeten die Grundlage für die Diplomarbeit von T. K. Holthusen (1999): "Veränderung des Hämozytenbildes von *Manduca sexta* im Verlauf der Metamorphose". Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Veränderungen des THC und DHC im Verlauf des vierten und fünften Larvenstadiums und beginnenden Puppenstadiums täglich bestimmt. Darüberhinaus wurden Körpergewicht, Hämolympfmenge, Proteingehalt, Lysozymaktivität und Ecdysonkonzentration in der Hämolymphe bestimmt. Auf einige Ergebnisse dieser Diplomarbeit, die in Kooperation mit der vorliegenden Arbeit angefertigt wurde, wird in der Diskussion eingegangen.

## **3.2 Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen**

### **3.2.1 Screening der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994)**

Insgesamt wurden 214 Überstände von Hybridomakulturen und deren Subklone auf die Bindungseigenschaften der enthaltenen monoklonalen Antikörper an *Manduca*-Hämozyten von Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) getestet (siehe Anhang 2). Dieses Screenen diente gleichzeitig als Kontrolle des ersten Screenings direkt nach der Fusion (WILLOTT et al. 1994).

Vierundsechzig Überstände zeigten keine oder nur eine sehr schwache Bindung an Hämozyten, wobei bei fünf Antikörpern aufgrund der Beobachtungen im Präparat auf eine Reaktion mit einem Plasmaprotein geschlossen werden konnte (X15E05, X17F11, Z11F07, Z16B06, Z19E07 [MS#115]).<sup>1</sup>

Achtundfünfzig Überstände banden an cytoplasmatische Strukturen, teilweise erst deutlich nach Behandlung der Hämozyten mit dem Detergenz Triton X-100. Mit einigen dieser Antikörper wurden bei den Plasmatozyten fibrilläre Strukturen erkennbar (X17G06, Z05E10, Z16E03). Andere reagierten, nach dem Präparat zu urteilen, zusätzlich mit Molekülen aus dem Hämolymp plasma (X14C06 [MS#1], X14E07 und Subklon MS#24, Z01E10 und Subklon MS#8, Z12D03, Z17A11, Z20F03 [MS#5]).

Fünf der getesteten Antikörper markierten Strukturen im Zellkern (X12F01 und Subklon MS#32, X15E11 und Subklon MS#11, X34B05).

Eine ganze Reihe von monoklonalen Antikörpern band an Antigene, die nach Behandlung der Hämozyten mit Triton X-100 nicht oder kaum noch vorhanden waren: MS#112 [X02C11], X03G04 [MS#113], MS#29 [X11E04, MS#125], MS#105 [X13B08], X25E11 und Subklon MS#42, MS#13 [X27F12], X30B12 [MS#41], MS#28 [X31A05], X32F07, Z07E08, Z22E01 [MS#34, MS#51].

Wertvoll für die Aufgabenstellung dieser Arbeit waren die Antikörper, die deutliche Bindungsmuster an den Hämozyten zeigten. Dabei gab es auch eine ganze Reihe von monoklonalen Antikörpern, die nur bestimmte Zelltypen erkannten, wobei sich verschiedene Kombinationen ergaben. Tabelle 1 gibt einen Überblick über diese interessanten Antikörper und fäßt sie in Gruppen mit ähnlichen Bindungseigenschaften auf Hämozyten von Larven (L5d2) zusammen.

---

<sup>1</sup> Erklärung zur Schreibweise der Antikörpernumerierung siehe Abkürzungsverzeichnis

**Tab.1:** Zusammenfassung aller getesteten monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994), die an Hämozyten banden, geordnet nach ihrer Bindungsspezifität<sup>1</sup>

Zelltyp, der erkannt wurde	Anzahl der Antikörper	Nummer der Antikörper
alle Hämozyten	20	X01B12 X03G04 [MS#113] X05B06 X07B08 und MS#70 X07C02 und MS#73 X07C04 X12E03 X17B10 [MS#36] X17D04 und MS#30 X20B12 [MS#15] X27B04 X27D12 X27F10 X28G04 und MS#72 MS#28 [X31A05] MS#74 [X33E10] Z01A10 [MS#6] Z14F10 Z18E07 und MS#77 Z19E06
PL, GR, OE	9	X02F02 [MS#43] X11G09 X16A02 und MS#16 [MS#119] X22A10 X22B11 X22C10 und MS#50 [MS#33] X24G02 [MS#40] X31F07
PL, SP, OE	1	X31A04 und MS#75
PL, SP	1	X16C02

<sup>1</sup> Erklärung zur Schreibweise der Antikörpernumerierung siehe Abkürzungsverzeichnis

Zelltyp, der erkannt wurde	Anzahl der Antikörper	Nummer der Antikörper
GR, OE	17	X05A02 und Subklon MS#26 [MS#131] X06C03 [MS#106] X08H07 und Subklon MS#7 X11E04 und Subklon MS#29 [MS#125] X13B08 und Subklon MS#105 X15F06 [MS#35] X19C08 [MS#120] X19E09 [MS#102] X24C11 und Subklon MS#107 MS#42 [X25E11] X27C05 und Subklon MS#39 X30B12 [MS#41] X32F07 X32H02 [MS#37] MS#2 [X34H03] Z22C04 [MS#10] Z23H01 und Subklon MS#17
PL	5	MS#112 [X02C11] X27F12 und Subklon MS#13 Z07E08 Z13H05 [MS#3, MS#9] Z22E01 [MS#34, MS#51]
GR	10	X06F10 X10D03 X15G06 X21B02 und Subklon MS#109 X24D09 [MS#12, MS#108] X27E09 und Subklon MS#103 X29F02 X30C06 Z22D06 und Subklon MS#21 Z26A09
OE	3	X11G01 Z20F04 MS#19 [Z23D08]

Die vergleichenden Analysen der Bindung der monoklonalen Antikörper auf Hämozyten aus Larven und Puppen lassen sich, bezogen auf Tabelle 1, wie folgt zusammenfassen:

- Antikörper, die an Epitope auf allen larvalen Hämozyten banden, markierten auch alle Hämozyten der Puppe, mit einer Ausnahme: X07C02 und Subklon MS#73 markierten die Plasmatozyten der Puppe nicht mehr. Beim Vergleich zwischen Larven- und Puppenhämozyten wurde bei dieser Gruppe von Antikörpern viel Wert auf die Veränderungen der Bindungsmuster gelegt. In der Tat konnte dies bei 8 Antikörpern beobachtet werden: X05B06, X07B08 und Subklon MS#70, X07C04, X27F10, X28G04 und Subklon MS#72, MS#74 [X33E10], Z18E07 und Subklon MS#77 und Z19E06.
- Antikörper, die Plasmatozyten, granuläre Zellen und Oenozytoide der Larven markierten, banden alle pupalen Hämozyten, d.h. Plasmatozyten und granuläre Zellen. Oenozytoide finden sich unter den frei flottierenden Zellen in der Puppenhämolymphe nicht mehr. Eine Ausnahme bildet X24G02 [MS#40]. Dieser Antikörper markierte in Puppenpräparaten nur granuläre Zellen. Daneben konnten bei drei Antikörpern Veränderungen der Bindungsmuster auf Hämozyten der Puppen im Vergleich zu Hämozyten der Larven beobachtet werden: X11G09, X16A02 und Subklon MS#16 [MS#119] und X31F07.
- X31A04 und Subklon MS#75 markierten Plasmatozyten, sphärule Zellen und Oenozytoide im Larvenpräparat. Im Puppenpräparat reagierten diese Antikörper mit Plasmatozyten und granulären Zellen.
- Der Antikörper X16C02, der Plasmatozyten und sphärule Zellen der Larven markierte, band im Puppenpräparat nur an Plasmatozyten. Sphärule Zellen finden sich unter den frei flottierenden Zellen in der Puppenhämolymphe nicht mehr.
- Die meisten Antikörper, die sowohl larvale granuläre Zellen als auch Oenozytoide erkannten, banden im Puppenpräparat nur an granuläre Zellen. Eine Ausnahme bilden hier die Antikörper: X11E04 und Subklon MS#29 [MS#125], X13B08 und Subklon MS#105, X30B12 [MS#41], X32F07 und MS#2 [X34H03]. Diese Gruppe von Antikörpern markierte Moleküle, die sich ab und zu auch auf den Plasmatozyten der Larven fanden. Dieses Phänomen trat auch bei den pupalen Plasmatozyten auf. Die entsprechenden Antigene ließen sich mit Triton X-100 fast vollständig von den Zellen entfernen, allerdings unterschiedlich stark von der larvalen und pupalen Zellen. Daneben waren vier weitere Klone interessant: X05A02 und Subklon MS#26 [MS#131] und MS#42 [X25E11] markierten neben den pupalen granulären Zellen zusätzlich die Plasmatozyten. X06C03 [MS#106] und X19C08 markierten die Granulen der granulären Zellen der Puppen wesentlich kräftiger als die der larvalen granulären Zellen.

- Antikörper, die unter den Hämocyten der Larven speziell nur Plasmatozyten erkannten, waren auch spezifisch für pupale Plasmatozyten.
- Antikörper, die granuläre Zellen der Larven markierten, taten dies auch bei den pupalen granulären Zellen. Ausnahmen bildeten X29F02 und Z22D06 und dessen Subklon MS#21. Auf den Puppenhämocyten war bei diesen Antikörpern kaum noch eine Markierung auszumachen. Der Antikörper X10D03 zeigte genau die umgekehrte Reaktion. Die granulären Zellen der Larven wurden nur sehr schwach erkannt, während die Markierung der granulären Zellen der Puppen sehr intensiv war.
- Die beiden Oenozytenoidenmarker X11G01 und Z20F04 markierten überraschenderweise die granulären Zellen der Puppen. Das Antigen zum Antikörper MS#19 [Z23D08], der als einziger der Oenozytenoidenmarker als Hybridomakultur im Labor vorhanden war, erwies sich leider als unbeständig, d.h. bei Verwendung des selben Hybridomaüberstandes wurden Oenozytoide in älteren Präparaten (1998) erkannt, wohingegen das entsprechende Antigen in Präparaten jüngeren Datums offensichtlich nicht mehr vorhanden war. Eine genauere Untersuchung des Bindungsmusters dieses Antikörpers war deshalb nicht möglich.

Ein Fazit dieser Beobachtungen ist, daß die Zuordnung "Plasmatozyt" und "granuläre Zelle" trotz der morphologischen Unterschiede dieser Zelltypen in Larven und Puppen durch die Markierung mit monoklonalen Antikörper bestätigt wurde. Die spezifischen Marker MS#7 (GR und teilweise OE), MS#13 (PL) und MS#75 (PL, SP, OE) wurden in vielen anschließenden Versuchen zur Identifizierung der entsprechenden Hämocyten genutzt.

Durch das zielgerichtete Screenen nach Unterschieden zwischen Larven- und Puppenhämocyten wurden viele unterschiedliche Charakteristika entdeckt (Tab.2). Alle interessanten Antikörper werden in den folgenden Abschnitten (3.2.2, 3.2.4) genauer vorgestellt, ihre Bindungseigenschaften sowohl an die Hämocyten als auch Gewebe von Larven und Puppen beschrieben und im Bild dargestellt. Sofern die entsprechenden Hybridomazellen im Labor in Kultur vorhanden waren und damit ausreichend Überstand gewonnen werden konnte, wurde zusätzlich eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

Alle weiteren Untersuchungen wurden, sofern in Hybridomakultur vorhanden, nur noch mit den entsprechenden Subklonen durchgeführt. In einigen Fällen wurden diese Subklone im Verlauf der Arbeit selbst hergestellt.

**Tab.2:** Übersicht aller monoklonalen Antikörper mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften an Larven- und Puppenhämozyten im Vergleich, geordnet nach dem Bindungsmuster

<b>Gruppe</b>	<b>Unterschiede zwischen larvalen und pupalen Hämozyten</b>	<b>Zusätzliche Reaktionen der Antikörper</b>	<b>Nummer der Antikörper</b>
<b>A</b>	PL sind nahezu nicht gefärbt in L5d2, PL in P haben Punkte.	GR, OE in L5d2 bzw. GR in P	X05A02 und MS#26 [MS#131] MS#42 [X25E11]
<b>B</b>	Die Granulen der GR sind in P kräftiger gefärbt als in L5d2.	OE in L5d2	X06C03 [MS#106] X19C08 [MS#120]
<b>C</b>	Die Granulen der GR sind in P kräftiger gefärbt als in L5d2. PL sind in L5d2 schwach gefärbt, in P nicht.	OE und SP in L5d2	X07C02 und MS#73
<b>D</b>	Die Granulen der GR sind in P kräftiger gefärbt als in L5d2. PL sind in L5d2 gefärbt, in P nicht.	OE in L5d2	X24G02 [MS#40]
<b>E</b>	Die Granulen der GR sind in P kräftiger gefärbt als in L5d2. PL sind in Färbung sehr variabel, meist sind sie in L5d2 kräftiger gefärbt und in P mehr diffus.	OE in L5d2 SP variabel	X05B06 X07B08 und MS#70 X07C04 X11G09 X16A02 und MS#16 [MS#119] X27F10 X28G04 und MS#72 X31F07 MS#74 [X33E10] Z18E07 und MS#77 Z19E06
<b>F</b>	In L5d2 nahezu keine Färbung, in P kräftige Färbung der Granulen der GR.		X10D03
<b>G</b>	GR in L5d2 sind nicht gefärbt, in P kräftige Färbung der Granulen der GR.	OE in L5d2	X11G01 Z20F04
<b>H</b>	GR in L5d2 sind kaum gefärbt, in P kräftige Färbung der Granulen der GR.	PL, OE, SP in L5d2 PL in P	X31A04 und MS#75
<b>I</b>	GR in L5d2 gefärbt, in P nur schwache Färbung.		X29F02 Z22D06 und MS#21
<b>J</b>	Antigen läßt sich mit Triton von der Zellmembran der GR in L5d2 entfernen, von der Membran der GR in P hingegen nicht	OE in L5d2	X11E04 und MS#29 X13B08 und MS#105 X30B12 X32F07 MS#2 [X34H03]

### 3.2.2 Monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppenhämozyten: Immunhistologische Bilder und Western-Blot-Analysen

Im folgenden werden alle monoklonalen Antikörper mit unterschiedlichem Bindungsmuster auf Larven- und Puppenhämozyten im Vergleich entsprechend ihrer Zuordnung vorgestellt (Tab.2). Dabei kamen Präparate mit und ohne Tritonbehandlung zum Einsatz. Die hier dargestellte Auswertung erfolgte anhand von Präparaten nach Tritonbehandlung, da hier die Bindungseigenschaften der Antikörpern wesentlich eindeutiger waren.

#### Gruppe A:

##### MS#26

Der Antikörper MS#26 markierte unter den Hämozyten der Larven granulären Zellen und Oenozytoide, aber nicht Plasmatozyten und sphärule Zellen. Bei den Puppenhämozyten dagegen wurde durch den Antikörper neben den Granulen der granulären Zellen eine punktförmige Struktur in den Plasmatozyten markiert (Abb.6a).

In der Western-Blot-Analyse zeigten sich durch die Markierung mit MS#26 in allen Zellysaten und Plasmaproben sehr hochmolekulare Proteine. Neben einer ganzen Reihe von Banden in allen Spuren war vor allem ein Protein mit ca. 180 kDa im Lysat der Larvenhämozyten auffällig (Abb.6b).

##### MS#42

Durch den Antikörper MS#42 wurden in Larvenpräparaten die Granulen der granulären Zellen, der Oenozytoide und in Puppenpräparaten die Granulen der granulären Zellen markiert. Außerdem zeigte sich eine punktförmige Markierung in oder an den pupalen Plasmatozyten, die allerdings schon bei einigen larvalen Plasmatozyten beobachtet werden konnte (Abb.7).

---

**Abb.6** (S.78): a) Markierung von MS#26 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#26 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.7** (S.78): Markierung von MS#42 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm



Abb.6a: MS#26

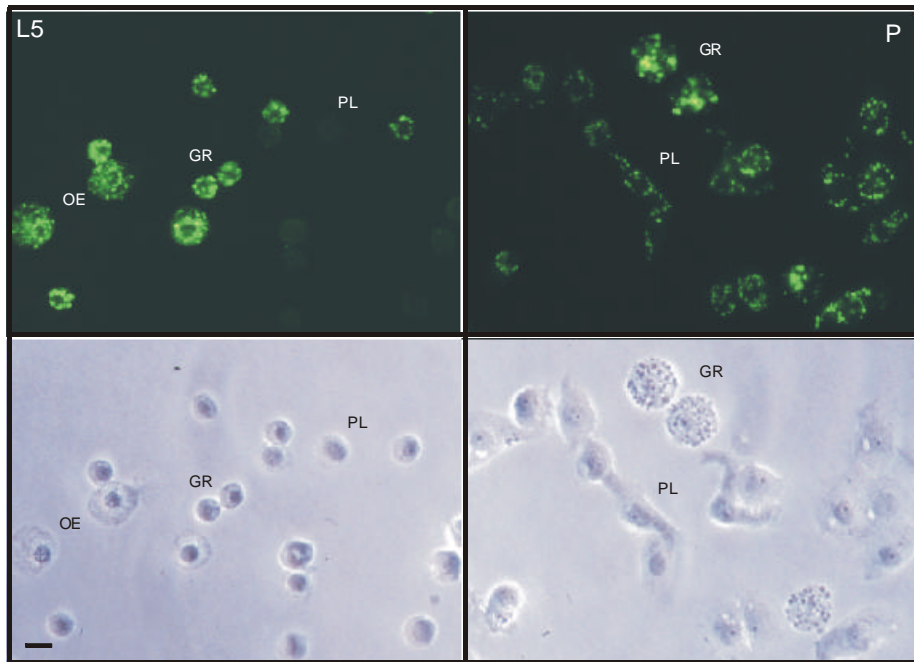


Abb.6b: MS#26

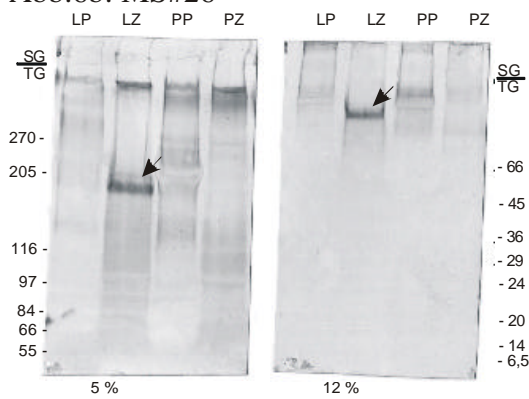
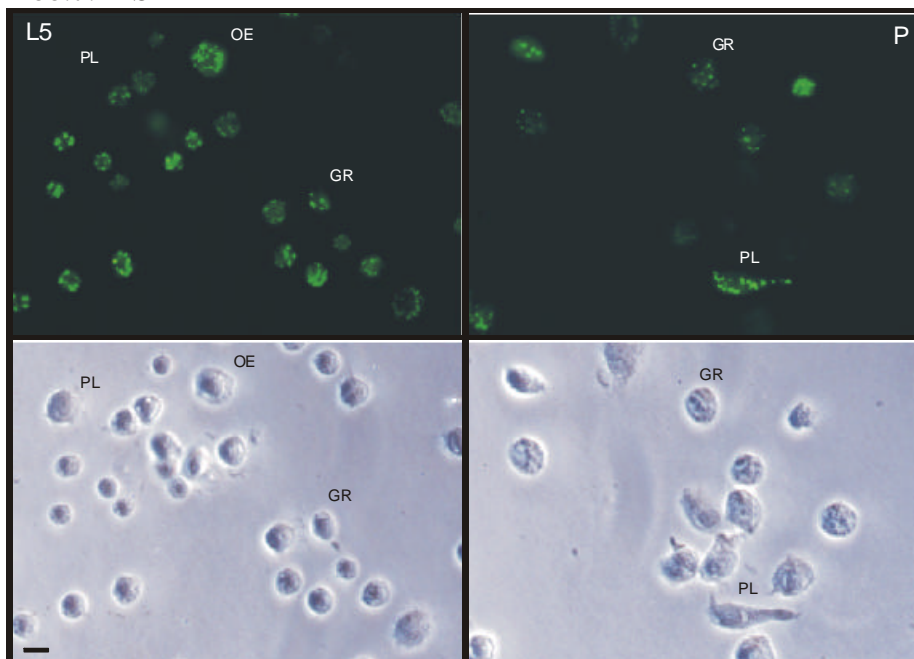


Abb.7: MS#42



Von diesem Antikörper gab es im Labor keine Hybridomkultur und es war daher keine Western-Blot-Analyse möglich.

### **Gruppe B:**

#### X06C03

Der Antikörper X06C03 markierte im Larvenpräparat Oenozytoide und granuläre Zellen, wobei die Oenozytoide kräftiger markiert waren. Im Puppenpräparat band dieser Antikörper nur an granuläre Zellen, allerdings wesentlich stärker als an larvale granuläre Zellen (Abb.8). Mit diesem Antikörper konnte keine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden.

#### X19C08

Von den Hämozyten der Larven wurden durch X19C08 Oenozytoide kräftig und granuläre Zellen weniger intensiv markiert. In Puppenpräparaten war die Markierung der granulären Zellen dagegen sehr deutlich (Abb.9).

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper war nicht möglich.

### **Gruppe C:**

#### MS#73

Der deutlichste Unterschied der Markierung von MS#73 im Vergleich zwischen larvalen und pupalen Hämozyten war, daß in Larvenpräparaten die Plasmatozyten markiert waren, wenn auch nur schwach, während in Puppenpräparaten keine Markierung an den Plasmatozyten zu erkennen war. Außerdem waren die Granulen der pupalen granulären Zellen kräftiger markiert als die der larvalen Zellen. In der Larve wurden zusätzlich Oenozytoide und sphärule Zellen von diesem Antikörper erkannt (Abb.10a).

In der Western-Blot-Analyse mit MS#73 fiel besonders eine Proteinbande von ca. 180 kDa im Larvenzellsat auf, die es bei den Puppenhämozyten nicht gab. Dafür fand sich im

---

**Abb.8** (S.80): Markierung von X06C03 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

**Abb.9** (S.80): Markierung von X19C08 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.8: X06C03

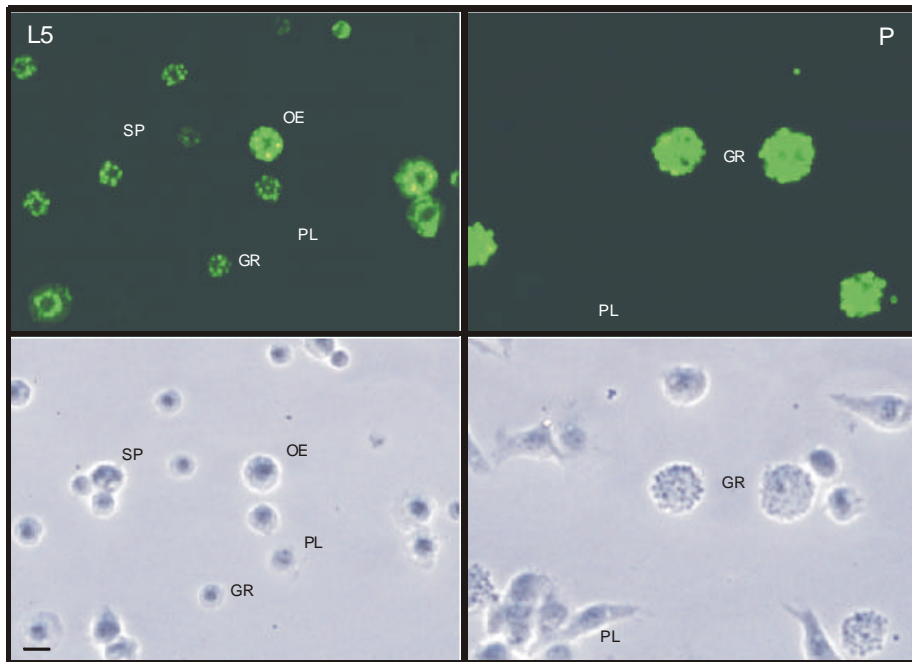
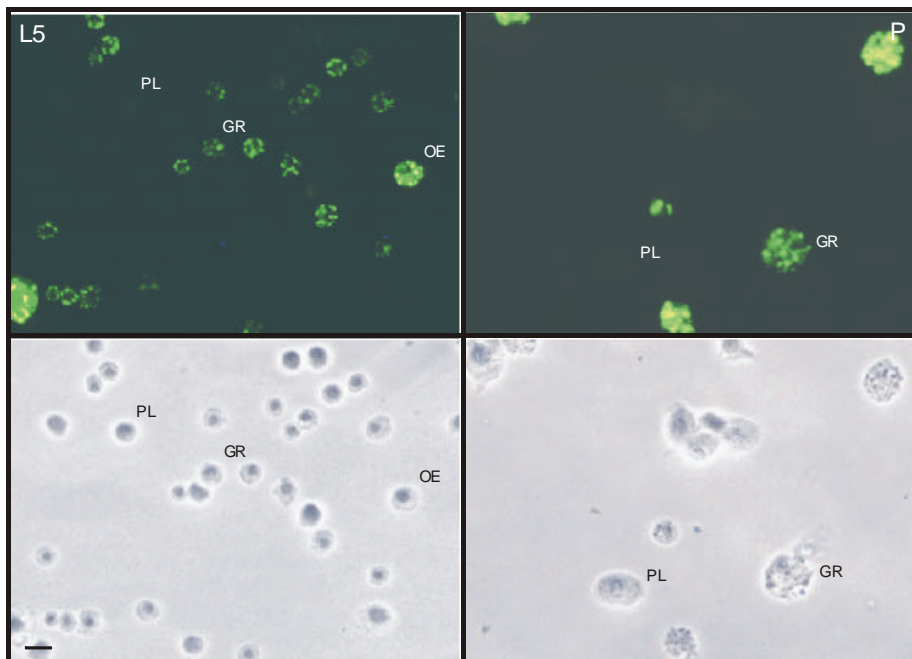


Abb.9: X19C08



Puppenplasma und im Lysat der Puppenzellen annähernd die gleiche hochmolekulare Bande von ca. 280 kDa. Die entsprechende Bande gab es im Plasma der Larven nicht (Abb.10b).

### **Gruppe D:**

#### X24G02

Der Antikörper X24G02 markierte larvale granuläre Zellen, Plasmatozyten und Oenozytoide. Die granulären Zellen der Puppen waren stärker markiert als die der Larven. Die Plasmatozyten der Puppen wurden vom Antikörper nicht erkannt (Abb.11).

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper war nicht möglich.

### **Gruppe E:**

#### X05B06

Durch X05B06 wurden alle larvalen und pupalen Hämozyten erkannt. Im Vergleich der Markierungsintensität bei Zellen aus Pd1 und L5d2 schienen pupale granuläre Zellen und Plasmatozyten kräftiger markiert zu sein (Abb.12a).

Auf der Blotmembran markierte der Antikörper nur schwach eine Bande im Lysat der Larven- und der Puppenzellen bei ca. 170 kDa. Alle anderen markierten Banden waren sehr hochmolekular und traten besonders intensiv in den Proben der Puppen auf (Abb.12b).

#### MS#70

Der Antikörper MS#70 erkannte alle Hämozyten sowohl der Larven als auch der Puppen. Allerdings zeigte sich eine Veränderung in der Markierungsintensität. Während die Granulen der pupalen granulären Zellen intensiver "gefärbt" waren im Vergleich zu den larvalen granulären Zellen, war die Markierung an den Plasmatozyten der Puppen schwächer und diffuser (Abb.13a).

---

**Abb.10** (S.82): a) Markierung von MS#73 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#73 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.11** (S.82): Markierung von X24G02 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.10:a) MS#73

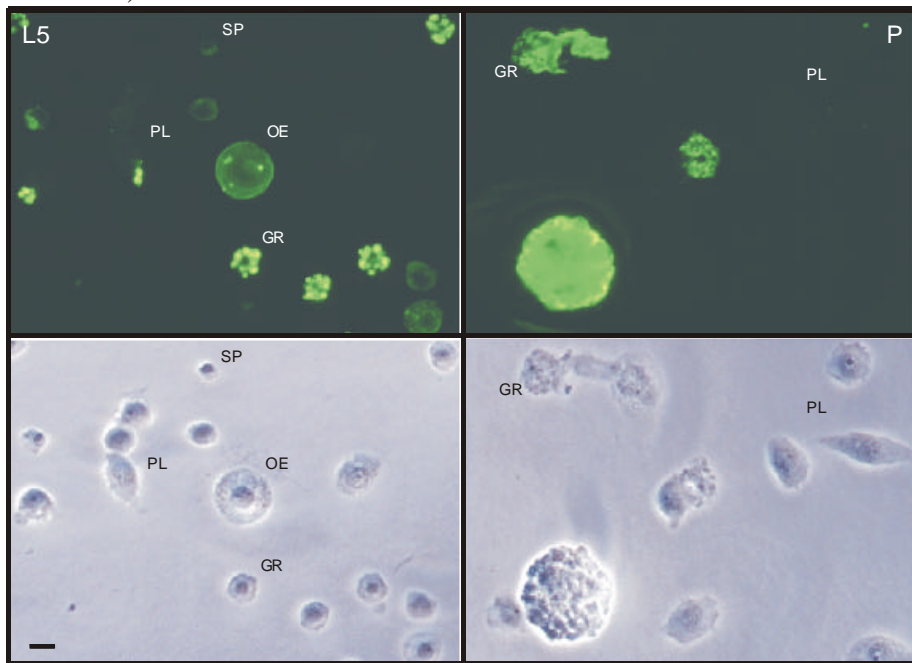


Abb.10:b) MS#73

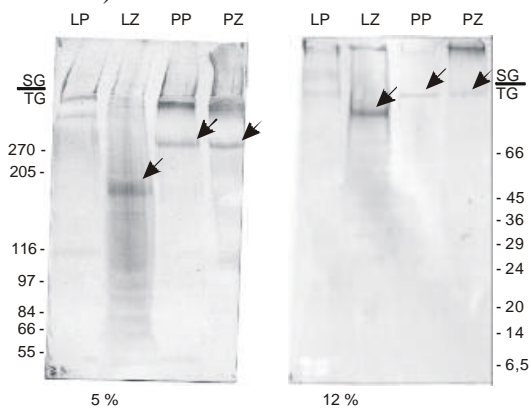
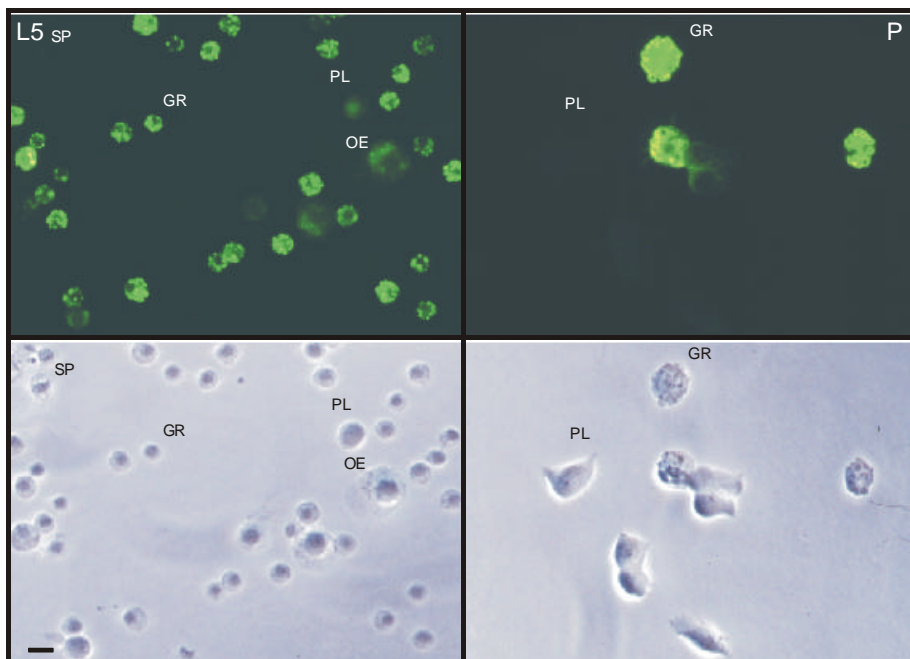


Abb.11: X24G02



In der Western-Blot-Analyse wurden viele Banden durch den Antikörper markiert. Auffällig war besonders eine Bande mit ca. 200 kDa und eine schwächere mit ca. 180 kDa im Lysat der Larvenzellen. Die 200-kDa-Bande fand sich etwas schwächer in der pupalen Plasmaspur wieder. In der Spur des Larvenplasmas ließ sich diese Bande nur sehr schwer ausmachen. Im Puppenhämozytenlysate erkannte der Antikörper viele Moleküle im Bereich zwischen 110 und 180 kDa und größer 400 kDa, außerdem eine Bande mit ca. 270 kDa, die auch in der Spur des Puppenplasmas zu sehen war. Auf der Blotmembran der Auftrennung im 12%-SDS-Gel fand sich sowohl im Plasma der Larve als auch im Plasma der Puppe eine Bande von ca. 50 kDa (Abb.13b).

#### X07C04

Neben der Markierung der Granulen von Oenozytoiden und granulären Zellen und auch der sphäkulen Zellen, erkannte der Antikörper X07C04 vor allem Plasmatozyten. Dieses intensive Bindungsmuster trat bei den Plasmatozyten der Puppen nicht auf. Dagegen waren die Granulen der pupalen granulären Zellen deutlich zu erkennen (Abb.14a).

Auf der Blotmembran zeigte der Antikörper nur eine sehr schwache Bindungsreaktion. Besonders hochmolekulare Proteine wurden markiert. Die Bande bei ca. 200 kDa im Lysat der Larvenhämozyten war besonders interessant. Sie fand sich, wenn auch sehr schwach, im Plasma der Puppen und der Larven wieder. Im Lysat der Puppenhämozyten und im Puppenplasma fiel besonders ein Protein von ca. 270 kDa auf. Daneben fanden sich eine ganze Reihe von Banden, die der Antikörper im Puppenzellysate erkannte. Eine niedermolekulare Bande trat in den Spuren des Larven- und Puppenplasmas auf. Sie lag bei ca. 50 kDa (Abb.14b).

---

**Abb.12** (S.84): a) Markierung von X05B06 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphäkulare Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von X05B06 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.13** (S.85): a) Markierung von MS#70 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphäkulare Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#70 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.14** (S.86): a) Markierung von X07C04 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphäkulare Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von X07C04 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

Abb.12:a) X05B06

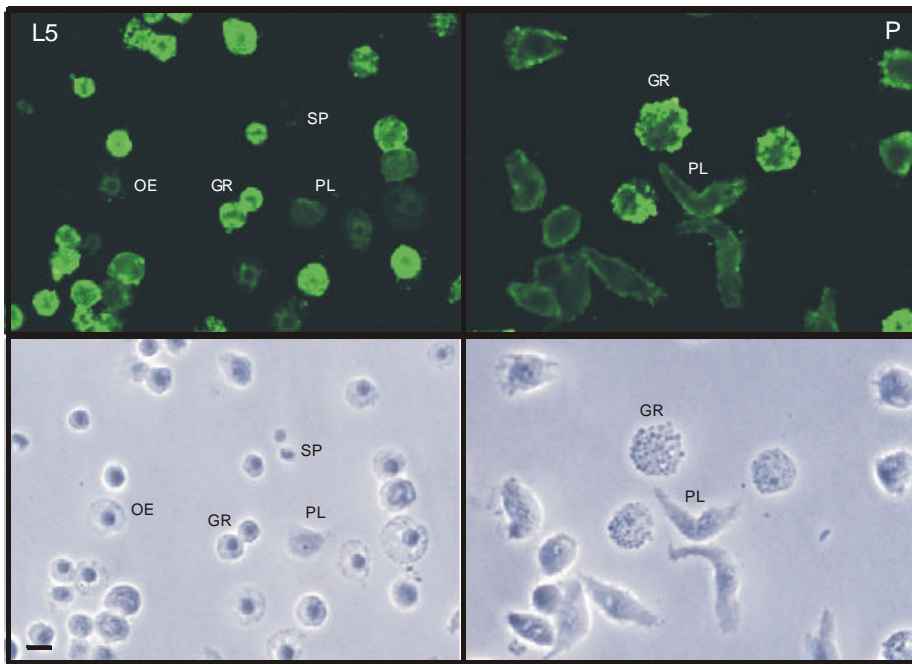


Abb.12:b) X05B06

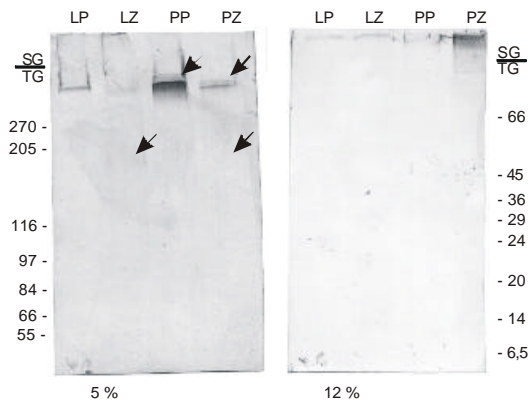


Abb.13:a) MS#70

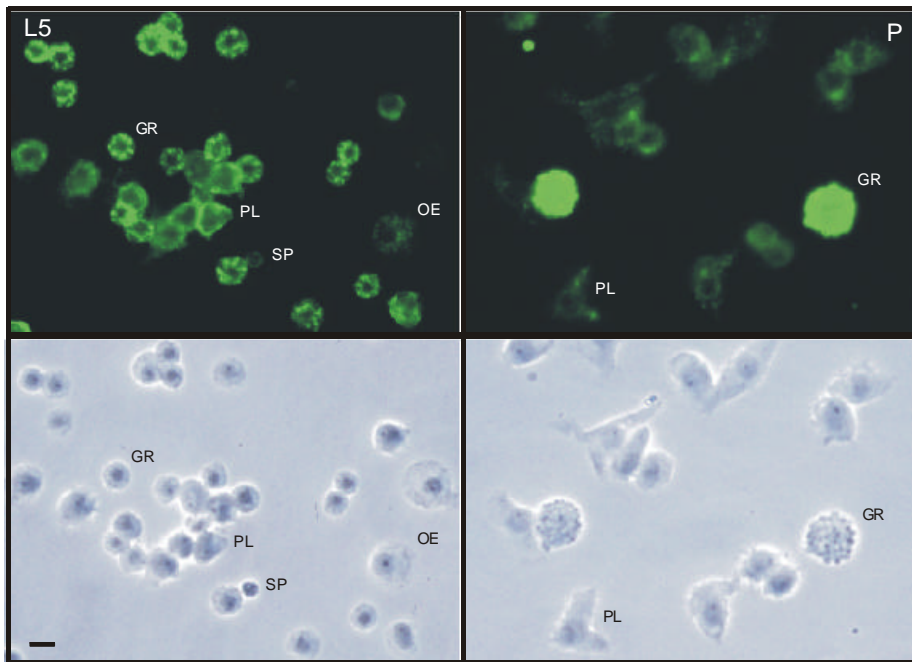


Abb.13:b) MS#70

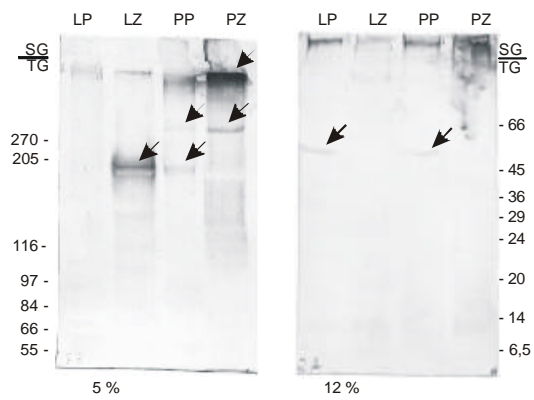




Abb.14: a) X07C04

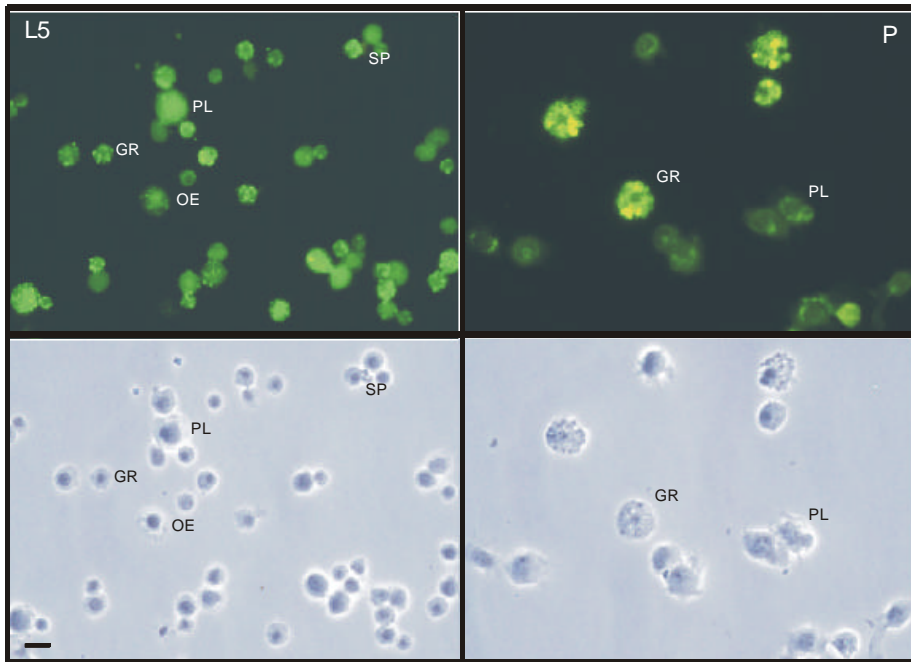
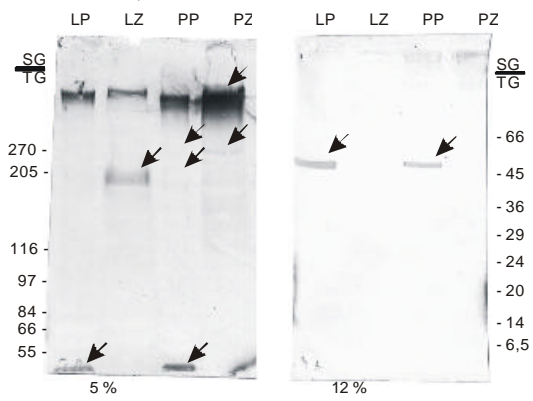


Abb.14: b) X07C04



### X11G09

Der Antikörper X11G09 markierte unter den Larvenhämozyten hauptsächlich Plasmatozyten, die in ähnlicher Intensität auch in der Puppe erkannt wurden. Daneben waren granuläre Zellen und Oenozytoide "gefärbt", wobei die Markierung an den granulären Zellen intensiver als an den Oenozytoiden war. Im Puppenpräparat traten die Granulen allerdings noch intensiver hervor. Sphärule Zellen waren zumeist nicht markiert (Abb.15a).

In der Western-Blot-Analyse markierte der Antikörper eine Vielzahl von Proteinbanden in allen Spuren. Auffällig waren die stark markierten Bereiche zwischen 150 und 250 kDa im Larvenhämozytenlysat und zwischen ca. 100 und 200 kDa im Puppenhämozytenlysat. Im niedermolekularen Bereich traten Banden von ca. 50 kDa in beiden Plasmaproben und zwischen 45 und 50 kDa in beiden Hämozytenlysaten auf (Abb.15b).

### MS#16

Oenozytoide und granuläre Zellen der Larven waren mit MS#16 an den Granulen markiert, Sphärule Zellen zeigten keine Markierung. Plasmatozyten schienen sehr intensiv "gefärbt". Im Puppenpräparat waren sowohl granuläre Zellen als auch Plasmatozyten deutlich markiert, wobei die Granulen der granulären Zellen besonders stark auffielen (Abb.16a).

Neben auffälligen, hochmolekularen Banden der Zellysate - 180 und 200 kDa bei den larvalen und zwischen 110 und 180 kDa bei den pupalen Hämozyten - wurde auf der Blotmembran durch diesen Antikörper auch ein niedermolekulares Protein in den beiden Plasmaproben von ca. 50 kDa erkannt. Während im Larvenplasma nur schwache Markierungen auftraten, waren im Puppenplasma vor allem hochmolekulare Proteinbanden auffällig. Eine Proteinbande von ca. 270 kDa trat sowohl im Plasma als auch im Hämozytenlysat der Puppen auf (Abb.16b).

---

**Abb.15** (S.88): a) Markierung von X11G09 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von X11G09 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.16** (S.89): a) Markierung von MS#16 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#16 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.17** (S.89): a) Markierung von X27F10 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.15:a) X11G09

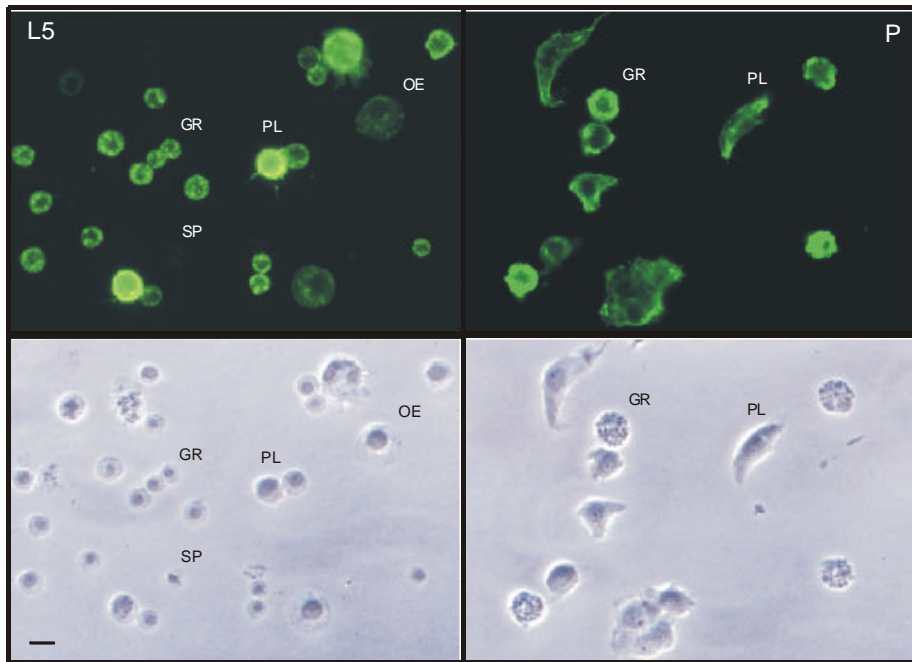


Abb.15:b) X11G09

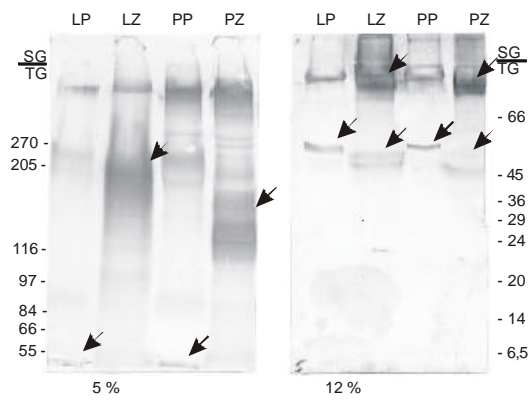


Abb.16:a) MS#16

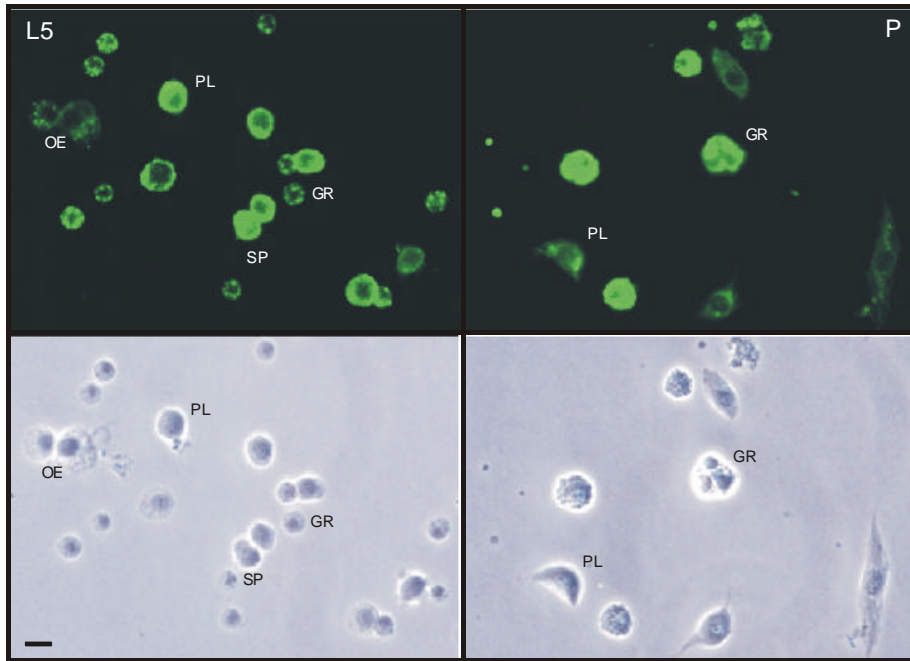


Abb.16:b) MS#16

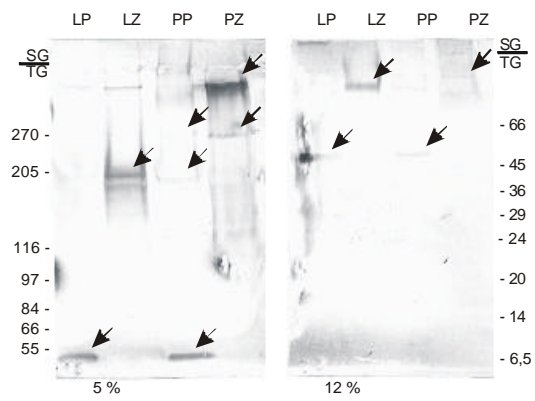
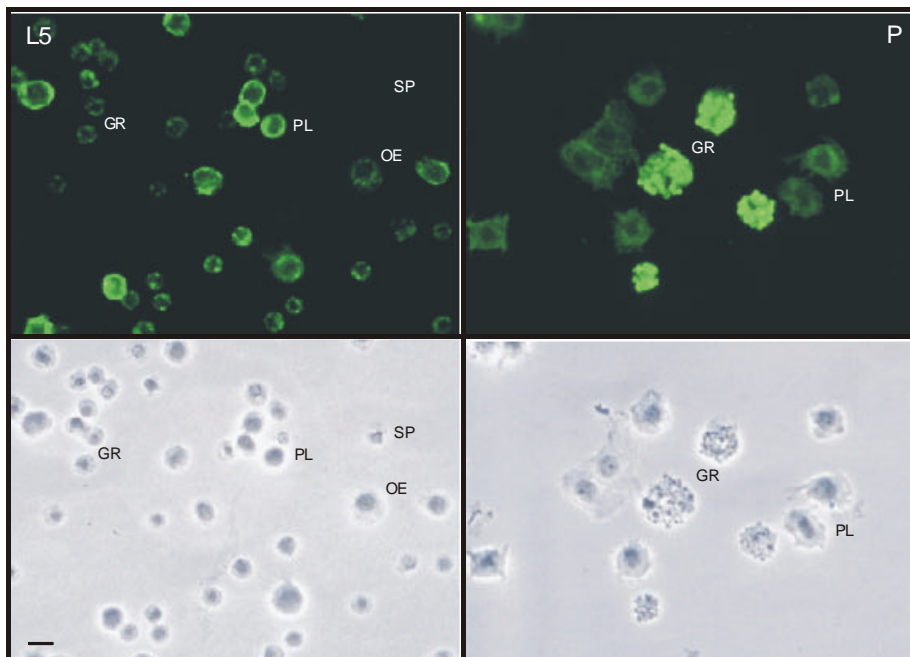


Abb.17: X27F10



### X27F10

X27F10 erkannte alle Hämocyten der Larven, wobei besonders die Plasmatozyten kräftig markiert waren. In Puppenpräparaten fielen besonders die Granulen der granulären Zellen auf. Pupale Plasmatozyten waren im Vergleich zu larvalen diffus und weniger intensiv markiert (Abb.17).

Eine Western-Blot-Analyse war nicht möglich, da nicht genug Hybridomazellkultur-Überstand zur Verfügung stand.

### MS#72

Der Antikörper MS#72 markierte unter den Hämocyten der Larven granuläre Zellen, Oenozytoide und Plasmatozyten intensiv, sphärule Zellen nur schwach. In Puppenpräparaten war die Markierung der Plasmatozyten diffuser und schwächer als in Larven; die Granulen der granulären Zellen dagegen waren intensiver "gefärbt" (Abb.18a).

Auf der Blotmembran markierte der Antikörper im Hämocytenlysate der Larven den Bereich von 120 bis 200 kDa, besonders zwei Banden, um 200 und 180 kDa. Dieses Muster war im Puppenzellsat nicht vorhanden. Hier wurden neben einer Proteinbande von ca. 270 kDa, die sich auch im Puppenplasma wiederfand, diverse Moleküle im Bereich zwischen 100 und 180 kDa markiert. Auffällig war im niedermolekularen Bereich eine Plasmabande von ca. 50 kDa, sowohl bei den Larven als auch bei den Puppen (Abb.18b).

### MS#74

Nach der Inkubation der Hämocytenpräparate der Larven mit dem Antikörper MS#74 fielen besonders die deutlich markierten Plasmatozyten auf. Daneben waren die granulären Zellen und Oenozytoide an den Granulen und die sphärulen Zellen nur schwach "gefärbt". Bei den Hämocyten der Puppen fielen die Granulen der granulären Zellen auf. Die pupalen Plasmatozyten waren im Vergleich zu den larvalen Zellen schwächer und diffus markiert (Abb.19a).

---

**Abb.18** (S.91): a) Markierung von MS#72 auf Hämocyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#72 auf Hämocytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämocyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämocyten

Abb.18:a) MS#72

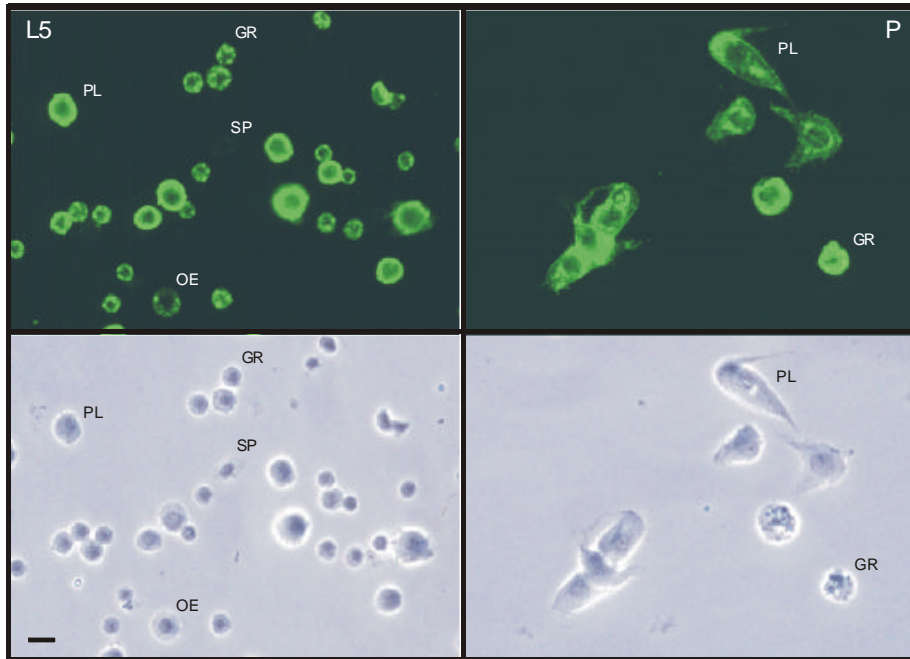
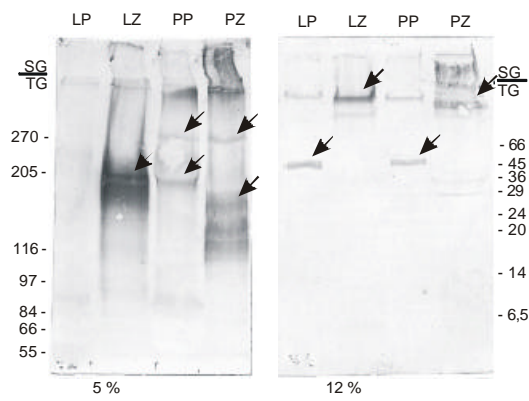


Abb.18:b) MS#72



In der Western-Blot-Analyse erkannte der Antikörper MS#74 im Lysat der Larvenhämozyten besonders zwei Banden, eine von ca. 200 und eine von ca. 180 kDa. Im Puppenzellysat dagegen wurden hauptsächlich sehr hochmolekulare Proteine und Moleküle im Bereich zwischen 100 und 180 kDa markiert. Eine Bande war allerdings auffällig. Sie lag bei ca. 270 kDa und war ebenfalls in der Spur des Puppenplasmas zu finden. Außerdem lag eine Proteinbande in der Puppenplasmaspur etwa auf gleicher Höhe wie die 200-kDa-Bande des Larvenzellysats. Im Plasma der Larven war außer den sehr hochmolekularen Proteinen nur eine weitere Bande von ca. 50 kDa zu sehen. Diese fand sich auch im Plasma der Puppen (Abb.19b).

### X31F07

Durch den Antikörper X31F07 wurden außer den sphäkulen Zellen alle Hämozyten der Larven und Puppen markiert. Die Granulen der pupalen granulären Zelle schienen intensiver "gefärbt" zu sein als die der larvalen granulären Zellen. Die Plasmatozyten der Puppen waren im Vergleich zu den larvalen Plasmatozyten schwächer und diffuser markiert (Abb.20).

In der Western-Blot-Analyse zeigte sich ein Bindungsmuster ähnlich dem mit dem Antikörper X05B06. Da nur sehr wenig Hybridomaüberstand zur Verfügung stand, konnte dieses Experiment nicht verifiziert und direkt mit dem Bindungsmuster von X05B06 verglichen werden.

### MS#77

Im Präparat der Larvenhämozyten wurden granuläre Zellen, Oenozytoide und sphäkulare Zellen durch den Antikörper MS#77 relativ schwach markiert, Plasmatozyten dagegen sehr intensiv. Bei den Puppenzellen traten eher die Granulen der granulären Zellen hervor, wogegen die Plasmatozyten schwächer markiert waren (Abb.21a).

Auf der Blotmembran markierte der Antikörper kräftige Banden in den Lysaten der

---

**Abb.19** (S.93): a) Markierung von MS#74 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphäkulare Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#74 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.20** (S.93): Markierung von X31F07 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphäkulare Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.19:a) MS#74

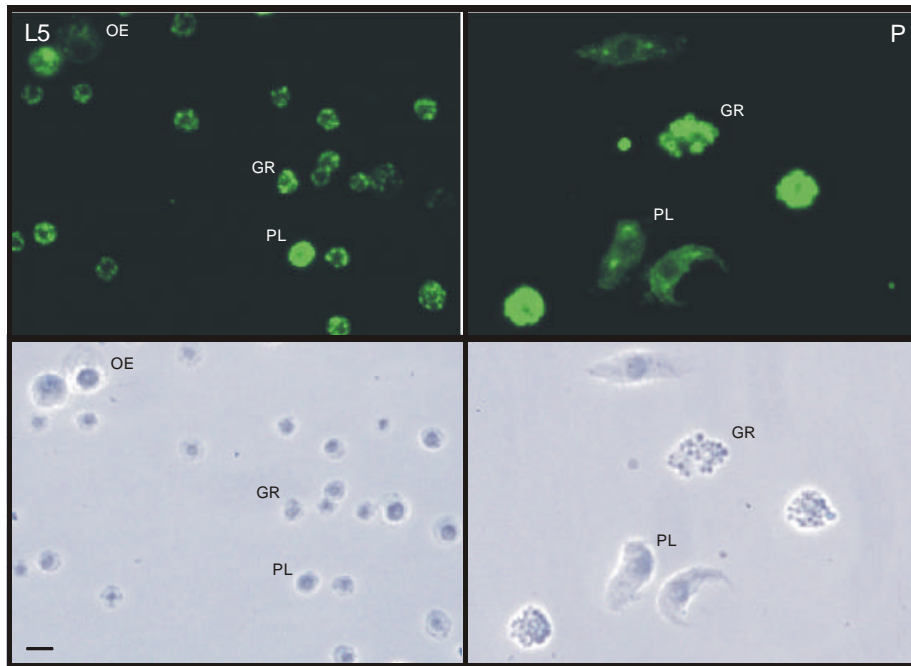


Abb.19:b) MS#74

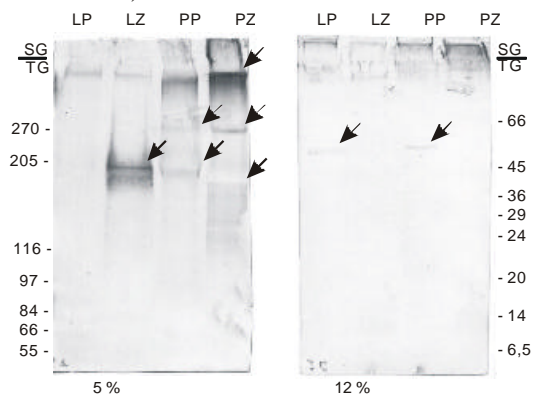
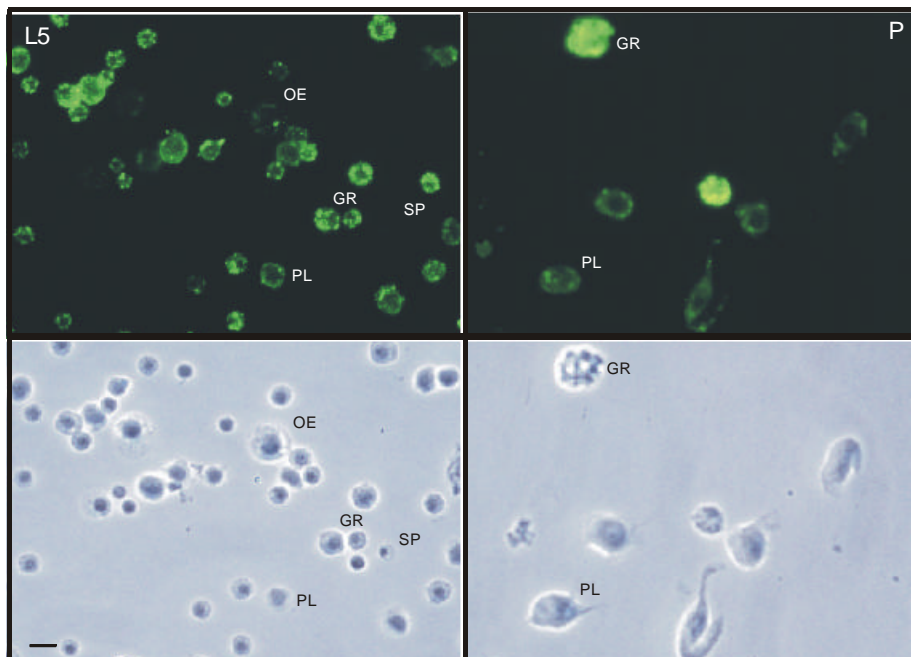


Abb.20: X31F07





Hämozyten, wobei im Lysat der Larvenzellen Banden von ca. 150, 180 und 200 kDa auftraten, wogegen im Lysat der Puppenzellen drei Banden bei ca. 100, 110 und 140 kDa zu finden waren. Im Plasma sowohl der Larven als auch der Zellen fielen sehr schwach markierte Banden bei ca. 220 kDa und 50 kDa auf (Abb.21b).

#### Z19E06

Die Plasmatozyten der Larven wurden durch den Antikörper Z19E06 besonders intensiv markiert, granuläre Zellen und Oenozytoide weniger und sphärule Zellen sehr schwach. Die Markierung der Plasmatozyten der Puppen dagegen war eher schwach und diffus, wobei punktförmige Strukturen in den Zellen auffielen. Die Granulen der granulären Zellen der Puppen waren sehr intensiv "gefärbt"(Abb.22a).

Der Antikörper erkannte auf der Blotmembran in allen Spuren eine Reihe von Proteinbanden bzw. den gesamten hochmolekularen Bereich. Teilweise waren keine einzelnen Banden auszumachen. Auffällig war, daß keine Proteine kleiner als 40 kDa markiert wurden (Abb.22b).

#### **Gruppe F:**

#### X10D03

Während auf den Hämozyten der Larven nahezu keine Bindung des Antikörpers X10D03 nachgewiesen werden konnte, waren die Granulen der granulären Zellen der Puppen markiert (Abb.23).

Mit diesem Antikörper konnte keine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden.

---

**Abb.21** (S.95): a) Markierung von MS#77 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#77 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.22** (S.96): a) Markierung von Z19E06 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von Z19E06 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.23** (S.96): Markierung von X10D03 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.21:a) MS#77

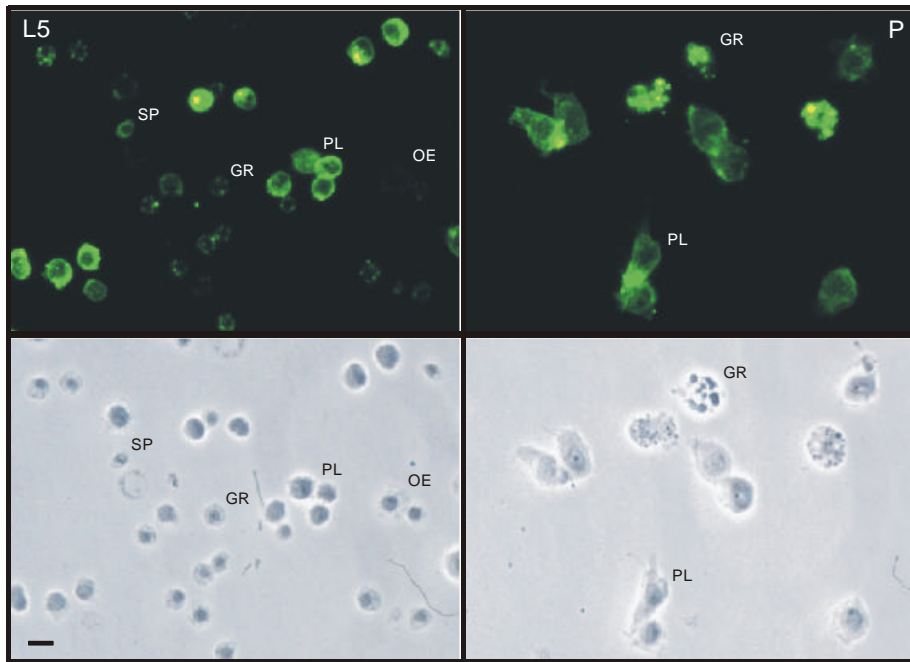


Abb.21:b) MS#77

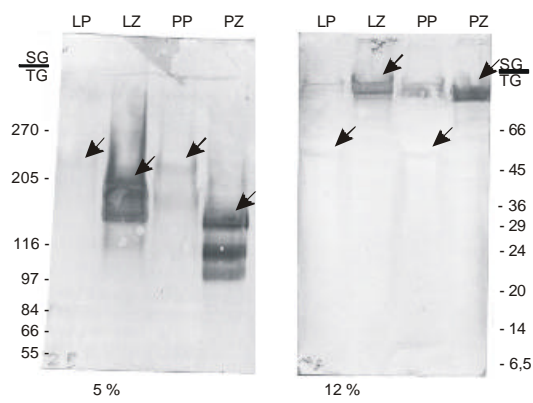


Abb.22:a) Z19E06

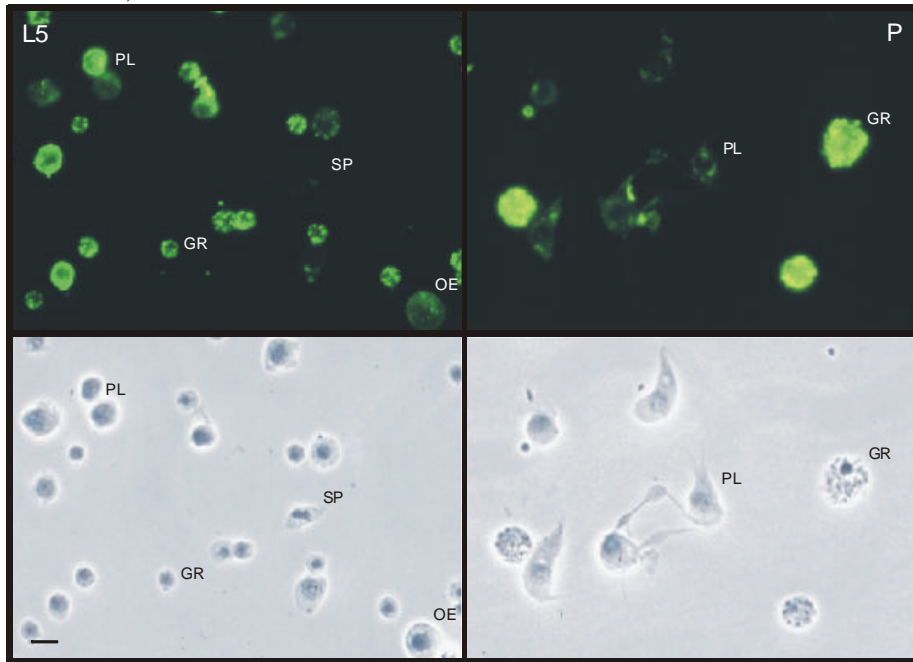


Abb.22:b) Z19E06

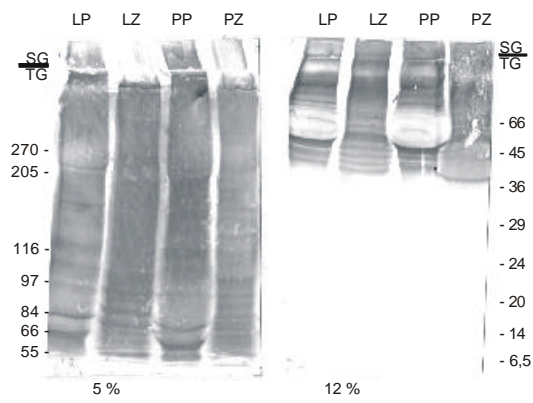
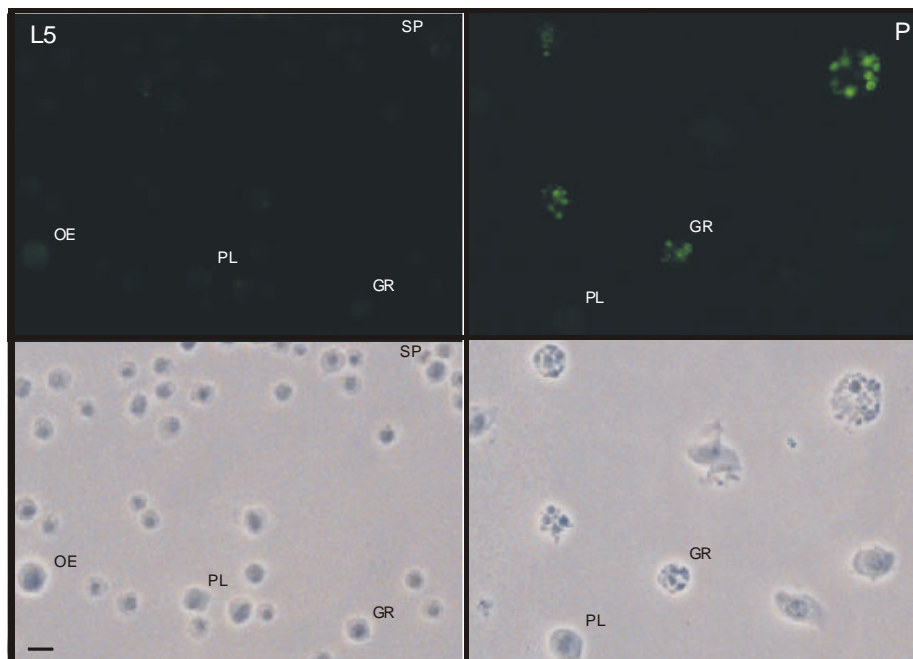


Abb.23: X10D03



## Gruppe G:

### X11G01

Der Antikörper X11G01 markierte unter den Hämocyten der Larven vor allem die Oenozytoide. Daneben zeigt sich eine schwache Bindung des Antikörpers an die granulären Zellen. In Puppenpräparaten hingegen waren die granulären Zellen intensiv markiert (Abb.24).

Eine Western-Blot-Analyse war mit diesem Antikörper nicht möglich.

### Z20F04

Im Präparat der Larvenhämocyten wurden durch Z20F04 die Oenozytoide intensiv, die granulären Zellen wenig markiert. Im Puppenpräparat waren die Granulen der granulären Zellen dagegen deutlich hervorgehoben (Abb.25).

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper konnte nicht durchgeführt werden.

## Gruppe H:

### MS#75

Der Antikörper MS#75 markierte sehr intensiv die larvalen Plasmatozyten. Daneben trat eine schwächere Markierung der Oenozytoide und sphärulen Zellen auf. Die larvalen granulären Zellen wurden durch den Antikörper eindeutig nicht erkannt. In Puppenpräparaten dagegen waren sowohl Plasmatozyten als auch granuläre Zellen markiert. In den pupalen granulären Zellen befand sich das korrespondierende Epitop vermutlich im Cytoplasma zwischen den Granulen (Abb.26a).

Auf der Blotmembran markierte der Antikörper sowohl im Larven- als auch im Puppenhämocytenlysat eine Proteinbande von ca. 110 kDa, desweiteren im Larvenhämocytenlysat Proteinbanden von ca. 140, 180 und 200 kDa und im Puppenhämocytenlysat eine Proteinbande von ca. 150 kDa. Sowohl im Plasma der Larven als auch im Plasma der Puppen wurden keine Proteinbanden durch diesen Antikörper markiert (Abb.26b).

---

**Abb.24** (S.98): Markierung von X11G01 auf Hämocyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

**Abb.25** (S.98): Markierung von Z20F04 auf Hämocyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.24: X11G01

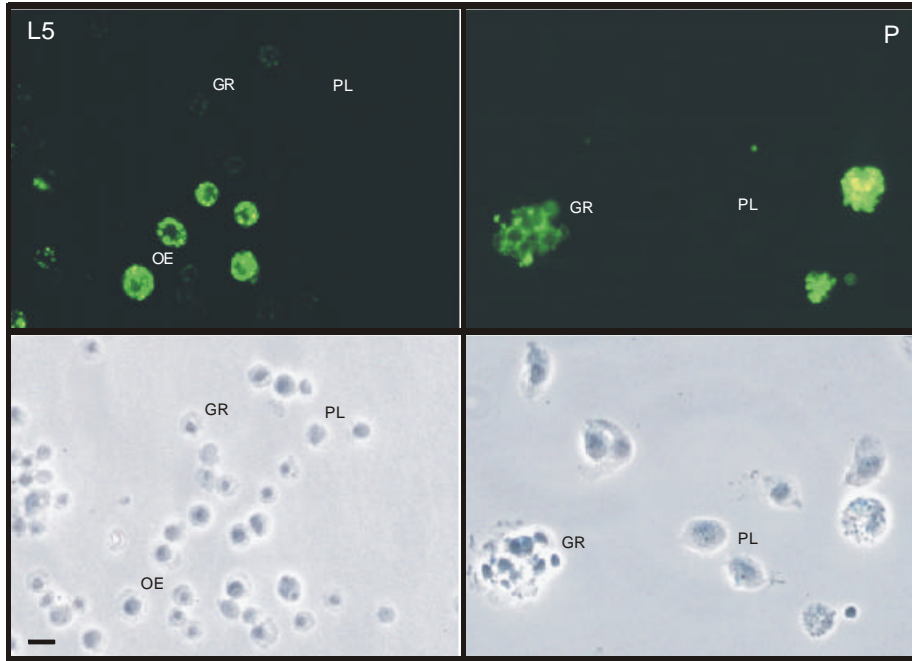
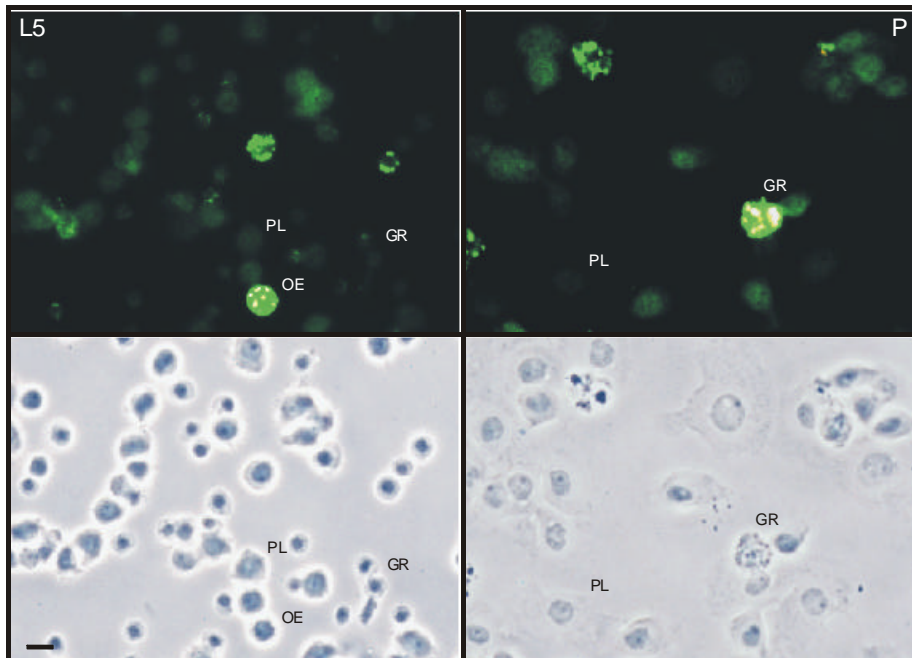


Abb.25: Z20F04



**Gruppe I:**X29F02

Während die Granulen der granulären Zellen im Präparat der Larvenhämozyten durch den Antikörper X29F02 deutlich markiert wurden, war im Präparat der Puppenhämozyten keine Markierung erkennbar (Abb.27).

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper war nicht möglich.

MS#21

Der Antikörper MS#21 band nur larvale granuläre Zellen. Im Präparat der Puppenhämozyten war keine Markierung erkennbar (Abb.28).

Mit diesem Antikörper konnte keine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden.

**Gruppe J:**MS#29

MS#29 erkannte im Larvenhämozytenpräparat granuläre Zellen und Oenozytoide, allerdings war nach Behandlung der Hämozyten mit Triton X-100 diese Markierung kaum noch nachweisbar. Bei den granulären Zellen der Puppen war die Markierung durch die Tritonbehandlung nur wenig beeinflusst (Abb.29a).

Auf der Blotmembran wurde mit der herkömmlichen Methode sowohl im Plasma der Larven als auch im Plasma der Puppen nur eine Proteinbande von ca. 50 kDa markiert (Abb.29b).

---

**Abb.26** (S.100): a) Markierung von MS#75 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#75 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.27** (S.101): Markierung von X29F02 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

**Abb.28** (S.101): Markierung von MS#21 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.26:a) MS#75

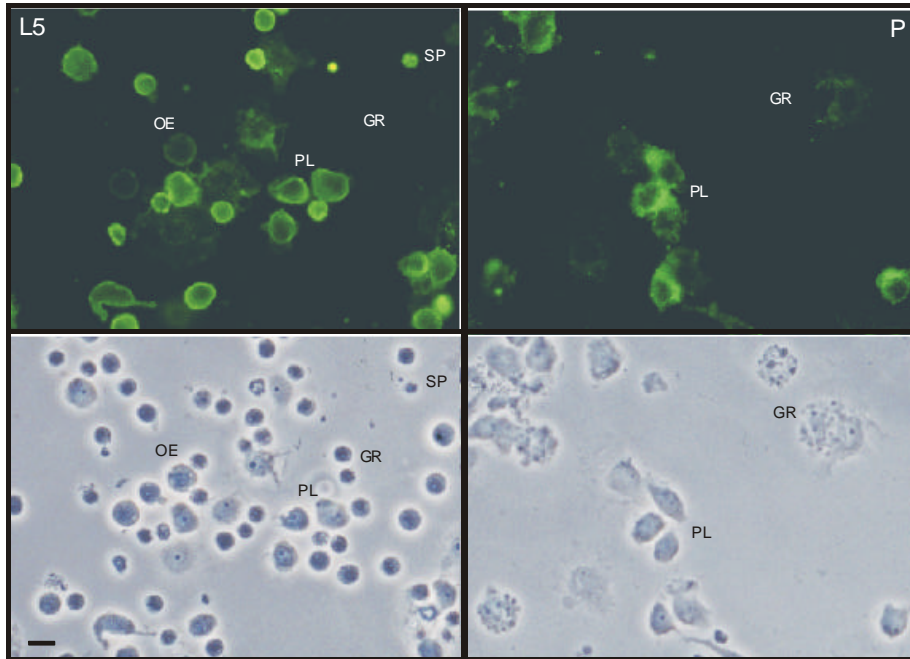


Abb.26:b) MS#75

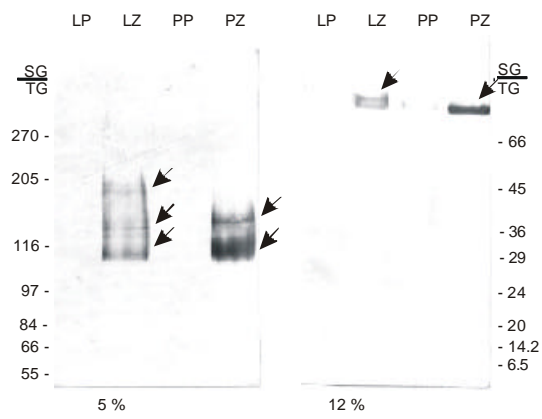


Abb.27: X29F02

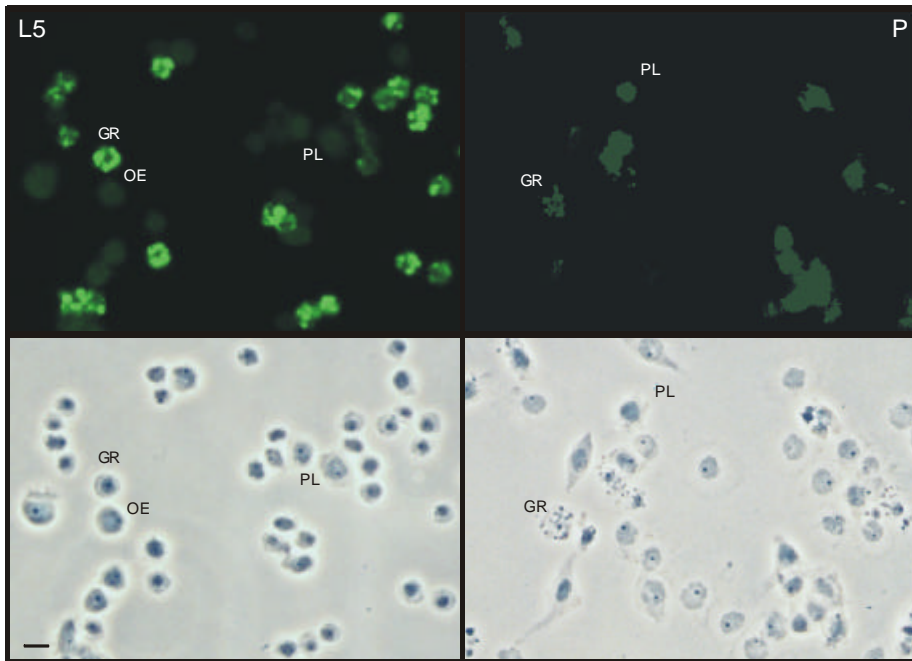
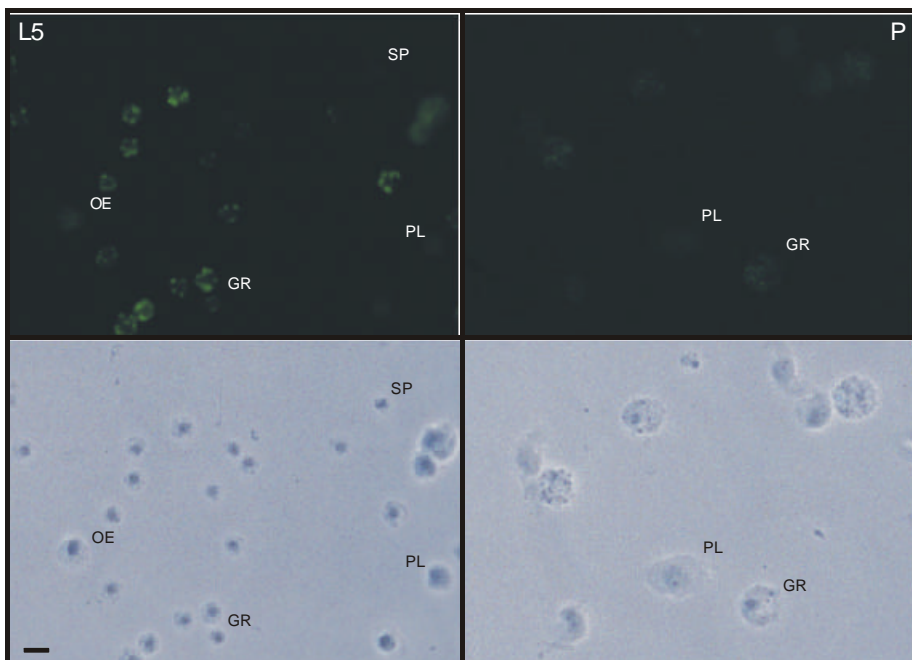


Abb.28: MS#21





### X13B08 und MS#105

X13B08 und der entsprechende Subklon MS#105 markierten unter den larvalen Hämozyten Oenozytoide und granuläre Zellen. Nach Behandlung der Zellen mit Triton X-100 erkannte der Antikörper nur noch vereinzelte Strukturen (Punkte) vor allem an den Oenozytoiden. Bei den pupalen granulären Zellen allerdings blieb das entsprechende Epitop nach Tritonbehandlung weitestgehend erhalten.

Die Hybridomaüberstände beider Klone, die für diese Arbeit zur Verfügung standen, verloren im Verlauf der Zeit ihre Bindungsaktivität. Die Antikörper-produzierenden Zellen standen nicht zur Verfügung. Deshalb war keine Fotodokumentation und keine Western-Blot-Analyse möglich.

### X30B12

X30B12 erkannte sowohl im Larven- als auch im Puppenpräparat granuläre Zellen. Im Larvenpräparat wurden zusätzlich Oenozytoide markiert. Das entsprechende Antigen ließ sich allerdings mit Triton X-100 von den larvalen granulären Zellen und Oenozytoiden fast vollständig entfernen. Bei den granulären Zellen der Puppe war dies nicht möglich (Abb.30).

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper konnte nicht durchgeführt werden.

### X32F07

Nach der Behandlung der Hämozyten von Larven und Puppen mit Triton X-100 erkannte der Antikörper X32F07 die granulären Zellen und Oenozytoide auf dem Präparat der Larvenhämozyten kaum noch. Die granulären Zellen der Puppen blieben, was die Markierung mit X32F07 betraf, nahezu unverändert (Abb.31).

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper war nicht möglich.

---

**Abb.29** (S.103): a) Markierung von MS#29 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung von MS#29 auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.30** (S.103): Markierung von X30B12 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.29:a) MS#29

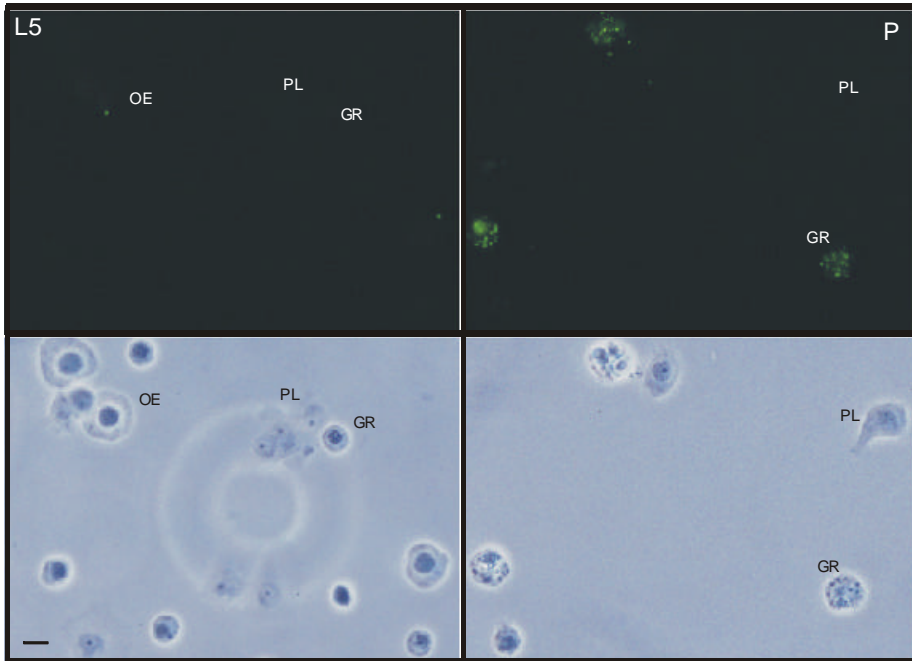


Abb.29:b) MS#29

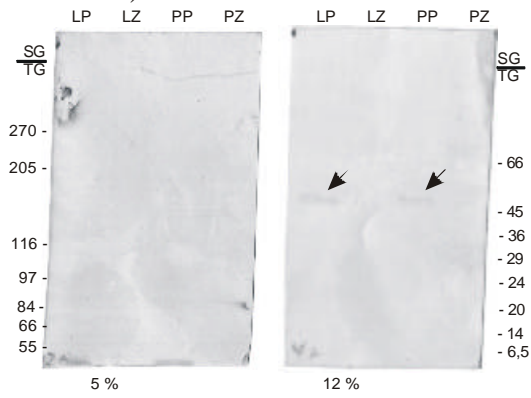
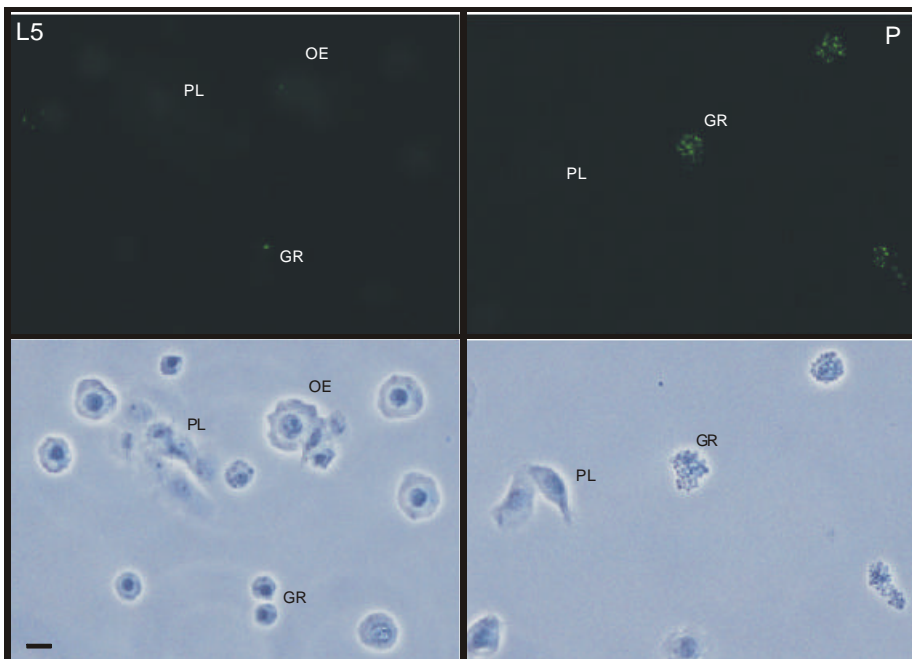


Abb.30: X30B12



### MS#2

Die Unterschiede in der Antikörperbindung auf larvalen und pupalen Hämozyten im Vergleich waren erst nach der Behandlung der Hämozyten mit Triton X-100 deutlich. Das entsprechende Antigen ließ sich von den granulären Zellen und Oenozytoiden der Larve nahezu vollständig entfernen. Bei den Zellen der Puppen blieb die Markierung der granulären Zellen auch nach Einsatz von Triton erhalten (Abb.32).

Es wurden Western-Blot-Analysen unter den üblichen Bedingungen durchgeführt. Auf der Blotmembran waren keine Proteinbanden markiert.

### **3.2.3 Nachweis der Zusammengehörigkeit von Antikörpern**

Einige Antikörper zeigten im Hämozytenpräparat und in der Western-Blot-Analyse dasselbe oder ein ähnliches Bindungsmuster. Deshalb wurden einige von ihnen auf ihre Zusammengehörigkeit über eine Western-Blot-Analyse getestet (Abb.33).

Aufgrund des Nachweises der selben Bindungsspezifitäten ergab sich, daß die Antikörper MS#16, MS#70, MS#72, MS#74 und MS#77 zu einer Gruppe zusammengefaßt werden konnten.

X11G09 zeigte im Großen und Ganzen ein dieser Gruppe entsprechendes Bindungsmuster, allerdings waren die entsprechenden Proteine viel kräftiger markiert und einige zusätzliche Banden traten auf. Eine Übereinstimmung konnte nicht hundertprozentig angenommen werden.

Der Antikörper X07C04 zeigte eine relativ schwache Bindungsaktivität. Die Proteinbanden, die eindeutig markiert waren, stimmten mit der oben zusammengefaßten Gruppe überein.

Auch der Antikörper X05B06 hatte in der Western-Blot-Analyse eine relativ schwache Bindungsreaktion. Er teilte seine Spezifität in den hochmolekularen Bereichen mit der oben angegebenen Gruppe von Antikörpern.

Die Antikörper MS#26 und MS#73 markierten das gleiche Protein (ca. 180 kDa) im

---

**Abb.31** (S.105): Markierung von X32F07 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

**Abb.32** (S.105): Markierung von MS#2 auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

Abb.31: X32F07

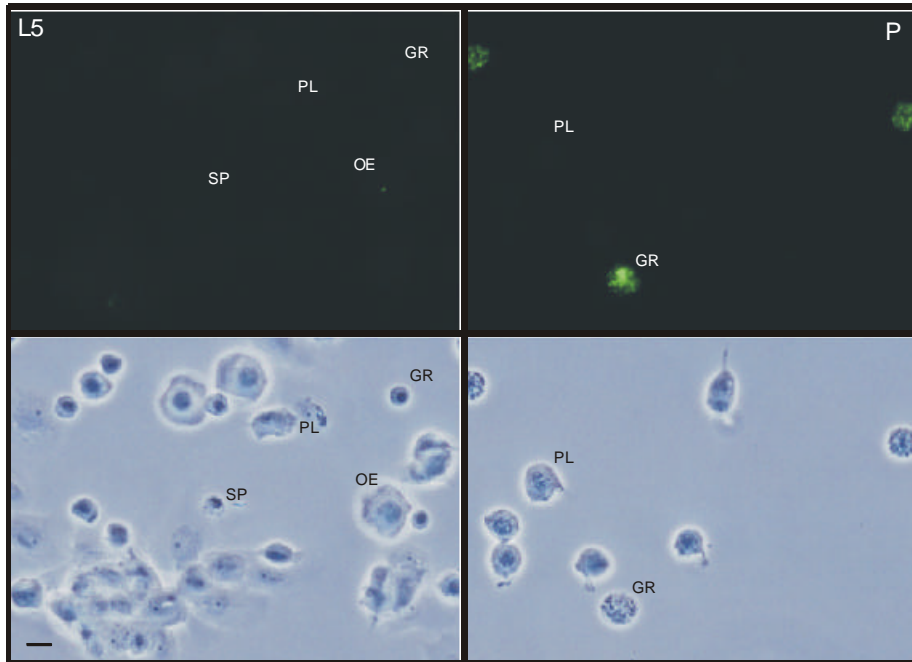
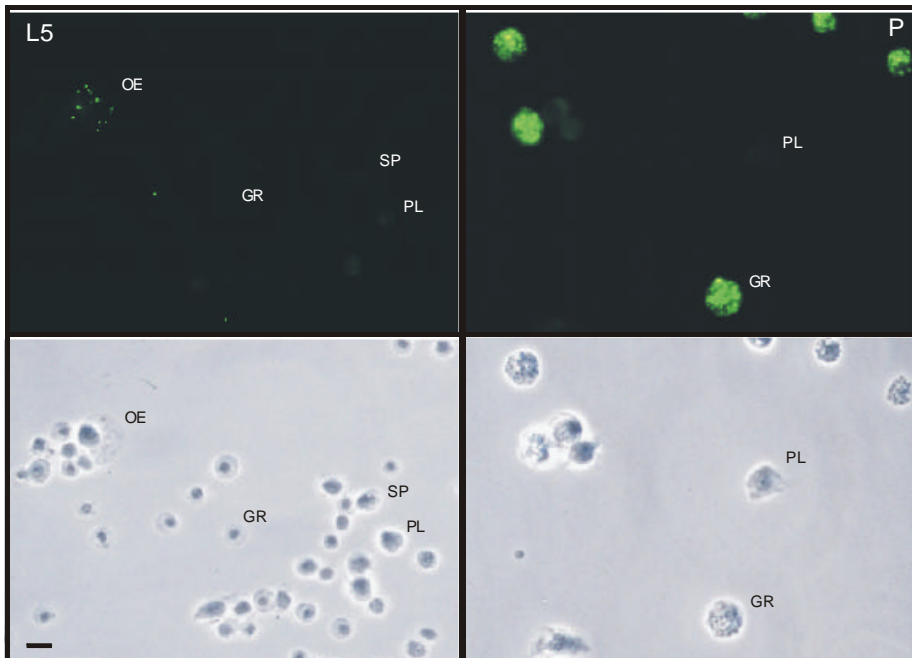
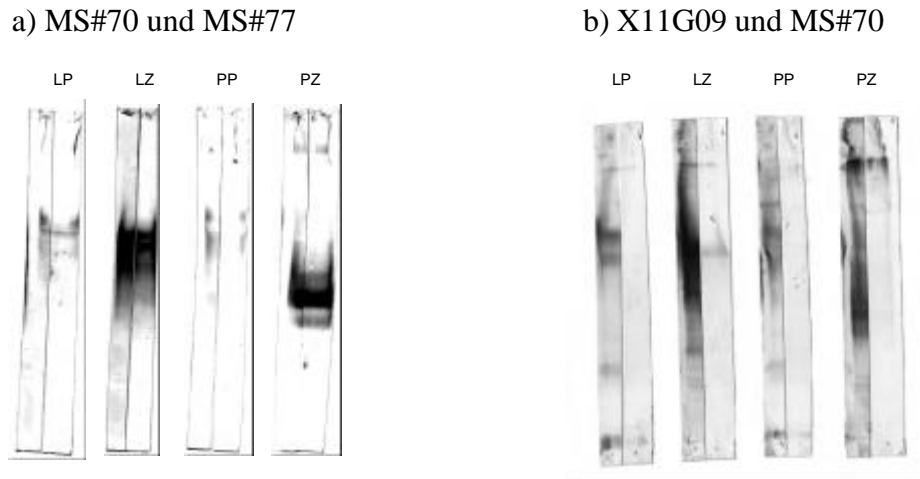


Abb.32: MS#2





**Abb.33:** Nachweis der Zusammengehörigkeit von Antikörpern über Western-Blot-Analyse, a) Vergleich von MS#70 (jeweils linker Streifen) und MS#77 (jeweils rechter Streifen); b) Vergleich von X11G09 (jeweils linker Streifen) und MS#70 (jeweils rechter Streifen); LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

Larvenhämozytenlysat, in allen anderen Banden entsprachen sie nicht einander. Dieses Protein wurde auch von der oben zusammengefaßten Antikörpergruppe erkannt.

Die 50-kDa-Plasmabande, die als einzige Bande von MS#29 markiert wurde, gehörte auch zu den Banden, die die oben angegebene Gruppe von Antikörpern erkannte.

MS#75 markierte nur Proteine in den Zellysaten. Die Banden bei ca. 140, 180 und 200 kDa fanden sich auch auf den Blotmembranen nach Inkubation mit einem der oben zusammengefaßten Antikörper. Die 110-kDa-Bande der Zellysate schien allerdings spezifisch für MS#75 zu sein.

Z19E06 zeigte ein einmaliges Bindungsmuster auf der Blotmembran. Dieser Antikörper markierte nahezu alle Proteine größer 40 kDa.

### 3.2.4 Test der Antikörperbindung an Geweben

Für eine bessere Interpretation der Bindungsmuster bei Hämozyten wurden alle interessanten Antikörper auf Querschnitten von Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) getestet. Dabei kamen, wenn nicht anders angegeben, Paraffin- und Kryoschnitte zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte bevorzugt anhand von Paraffinschnitten aufgrund der besseren Strukturhaltung. Parallel dazu wurden verschiedene Organe aus Tieren entsprechenden Alters präpariert und die Organlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um die Antikörper in der Western-Blot-Analyse zu testen.

**Gruppe A:**MS#26

MS#26 markierte im Querschnitt der Larven neben den Hämocyten muskuläre Strukturen und sehr auffällig die Speicheldrüse. Im Querschnitt der Puppen waren mehr oder weniger alle Strukturen markiert, besonders die Basallamina (Abb.34a).

In der Western-Blot-Analyse der Organe aus Larven und Puppen markierte der Antikörper eine Proteinbande von ca. 105 kDa in mehreren Proben: larvale Tracheen, Epidermis, Nerven und Speicheldrüse, pupale Epidermis. Im Lysat der Speicheldrüse der Larve markierte der Antikörper daneben zwei höhermolekulare Banden (ca. 120 und 200 kDa). Die 120-kDa-Bande trat auch im Lysat der Hämocyten und der Malpighischen Gefäße auf. Sehr auffällig war die Reaktion des Antikörpers mit den Proteinen der Flügelanlage (Abb.34b).

MS#42

MS#42 zeigte auf allen Larven- und Puppenpräparaten verschiedener Fixierungsart keine Bindungsreaktion.

Eine Western-Blot-Analyse konnte nicht durchgeführt werden.

**Gruppe B:**X06C03

Der Antikörper X06C03 schien im Larvenquerschnitt relativ spezifisch Hämocyten zu markieren. Daneben trat eine schwache, hüllenartige "Färbung" besonders um muskuläre Strukturen auf. Im Querschnitt der Puppe war um alle Strukturen eine hüllenartige Markierung zu erkennen, besonders Muskelstränge und bestimmte Teile des Fettkörpers waren hervorgehoben (Abb.35).

Ein Nachweis des Antigens über Western-Blot-Analyse war nicht möglich

---

**Abb.34** (S.108): a) Markierung von MS#26 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von MS#26 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

Abb.34:a) MS#26

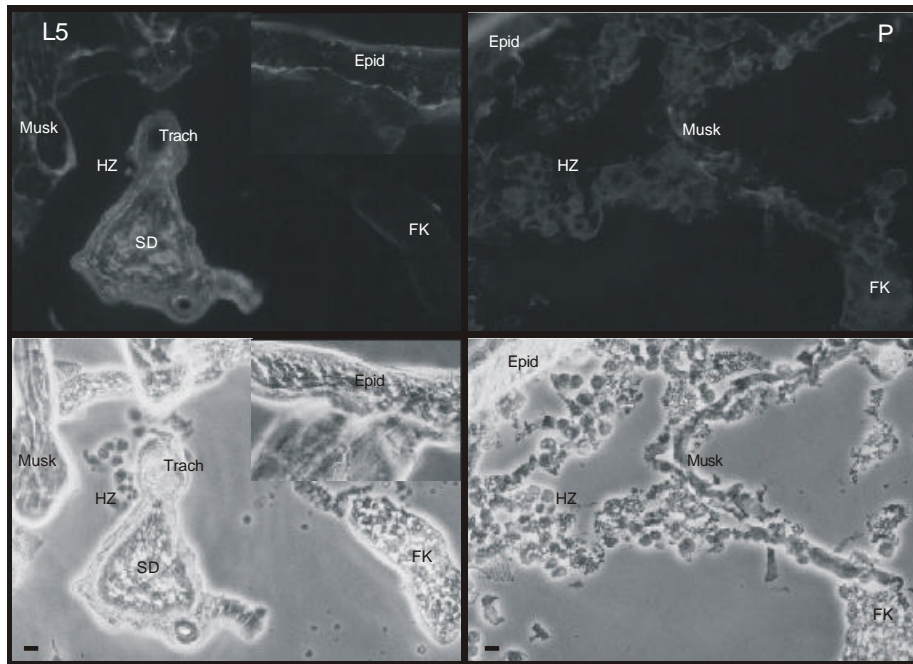
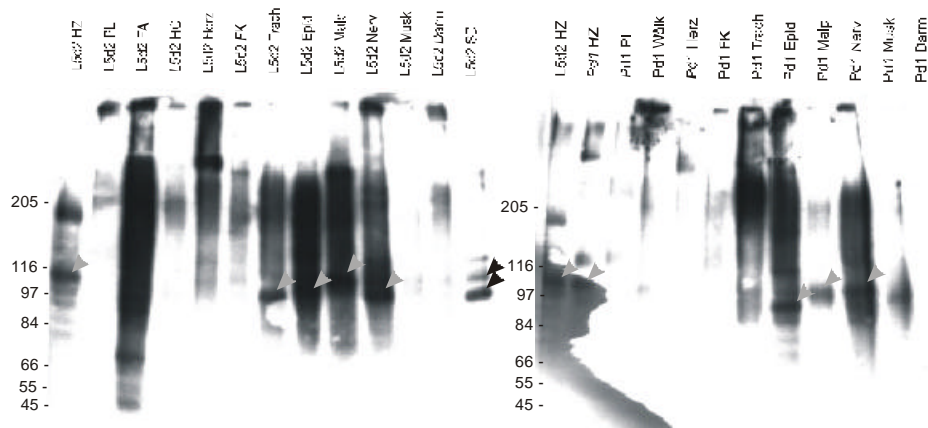


Abb.34:b) MS#26



X19C08

Der Antikörper zeigte nur auf den mit Bouin fixierten Präparaten eine Reaktion. Dort markierte er in den Larvenquerschnitten die Basallamina um alle Organe und die Hämocyten schwach. Zur Optimierung der Färbung, für den Vergleich mit Puppenquerschnitten und für eine Western-Blot-Analyse stand nicht genügend Hybridomaüberstand zur Verfügung.

**Gruppe C:**MS#73

MS#73 markierte sowohl im Larven- als auch im Puppenquerschnitt die Basallamina um sämtliche Organe und die Hämocyten (Abb.36a).

Neben einer Proteinbande im Hämocytenlysat war vor allem eine sehr hochmolekulare Bande im LySAT des Larven- und des Puppenherzens markiert. Diese Bande trat nur schwach im LySAT der larvalen Epidermis und des Darmes auf (Abb.36b).

**Gruppe D:**X24G02

X24G02 erkannte im Larvenquerschnitt nur schwach die Basallamina aller Organe. Die Hämocyten waren kaum markiert. Im Puppenquerschnitt dagegen waren die granulären Zellen deutlich zu erkennen (Abb.37).

Eine Darstellung des entsprechenden Antigens auf der Blotmembran war nicht möglich.

---

**Abb.35** (S.110): a) Markierung von X06C03 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämocyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Musk- Muskeln

**Abb.36** (S.111): a) Markierung von MS#73 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von MS#73 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

**Abb.37** (S.110): a) Markierung von X24G02 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämocyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Musk- Muskeln



Abb.35: X06C03

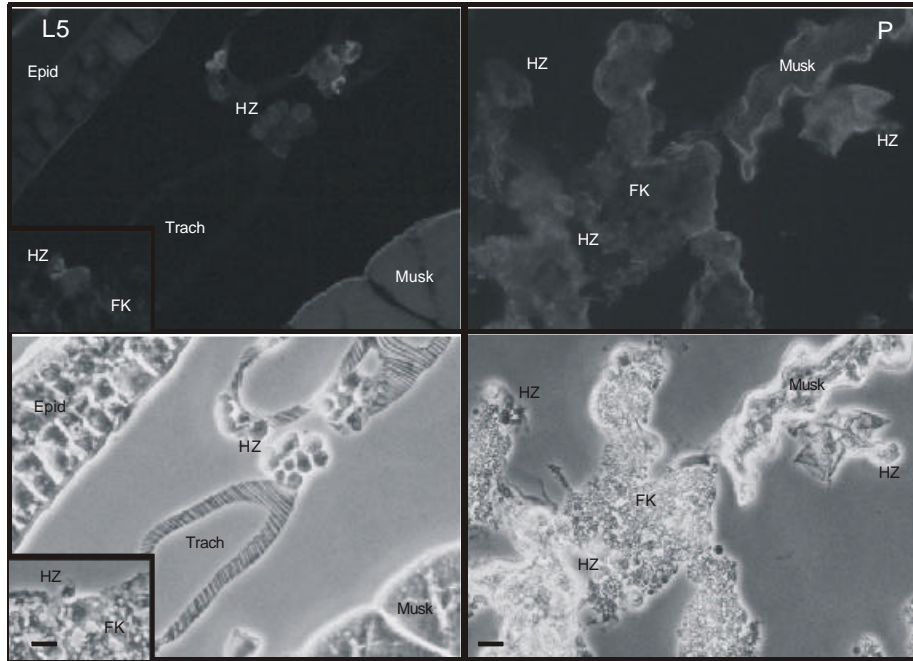


Abb.37: X24G02

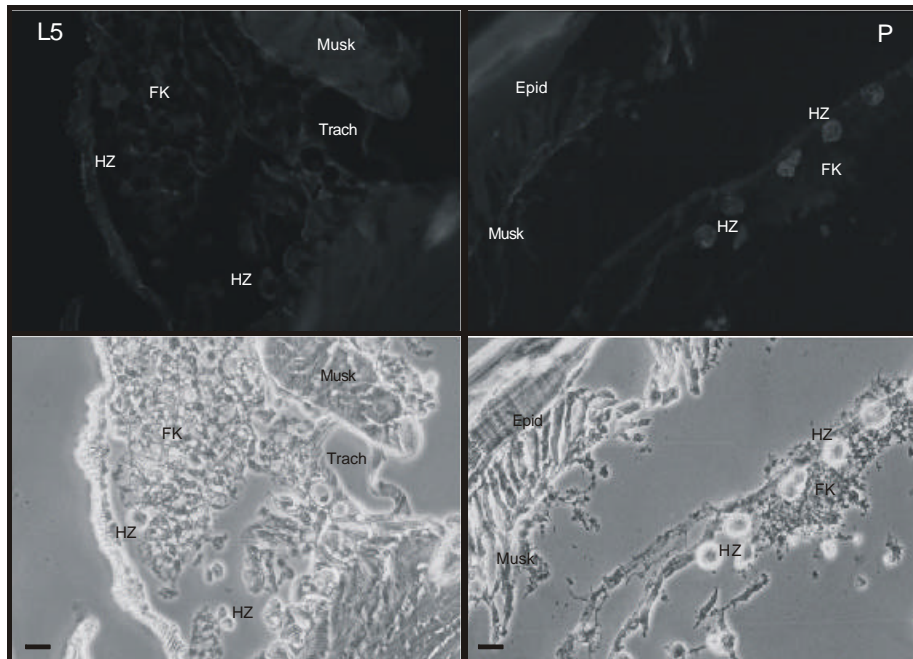


Abb.36:a) MS#73

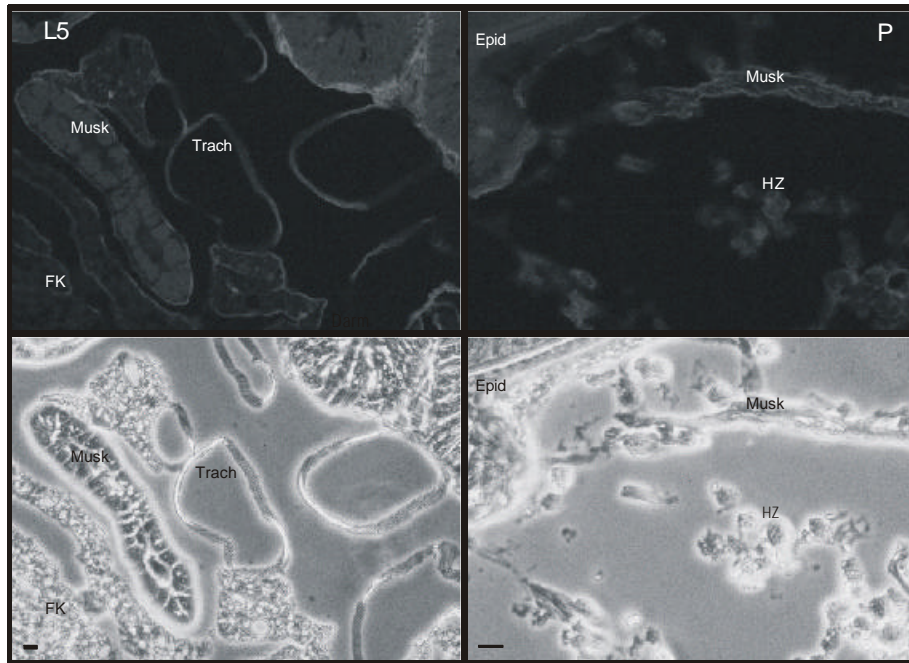
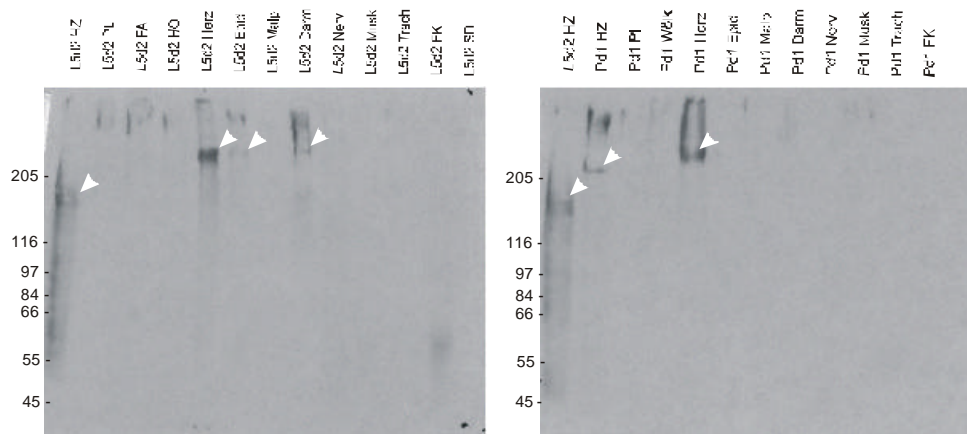


Abb.36:b) MS#73



**Gruppe E:**X05B06

Sowohl im Larven- als auch im Puppenquerschnitt erkannte X05B06 neben den Hämocyten die Basallamina sämtlicher Organe, wobei diese Markierung im Larvenquerschnitt wesentlich intensiver war als im Puppenquerschnitt (Abb.38a).

In der Western-Blot-Analyse der verschiedenen Organe von Larven und Puppen war außer in der Spur der Hämocytenlysate nur noch eine sehr schwache Reaktion in der Spur der larvalen Malpighischen Gefäße auszumachen (Abb.38b).

MS#70

Durch den Antikörper MS#70 wurde die Basallamina aller Organe erkannt, daneben zeigten die Hämocyten eine deutliche Markierung. Im Puppenquerschnitt fielen besonders die Granulen der granulären Zellen auf (Abb.39a).

In der Western-Blot-Analyse der Lysate der verschiedenen Organe markierte der Antikörper Proteinbanden in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen. Regelmäßigkeiten waren dabei nicht ersichtlich. Lediglich eine Bande mit sehr hohem Molekulargewicht war in nahezu allen Spuren der larvalen Proben zu erkennen (Abb.39b).

X07C04

Die Markierung des Antikörpers X07C04 entspricht der von MS#70, wenn auch weniger intensiv. Auf eine Darstellung wird aus diesem Grund verzichtet.

In der Western-Blot-Analyse markierte der Antikörper nur schwach Proteinbanden in den Hämocytenlysaten.

---

**Abb.38** (S.113): a) Markierung von X05B06 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von X05B06 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach-Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

**Abb.39** (S.114): a) Markierung von MS#70 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von MS#70 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach-Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

Abb.38:a) X05B06

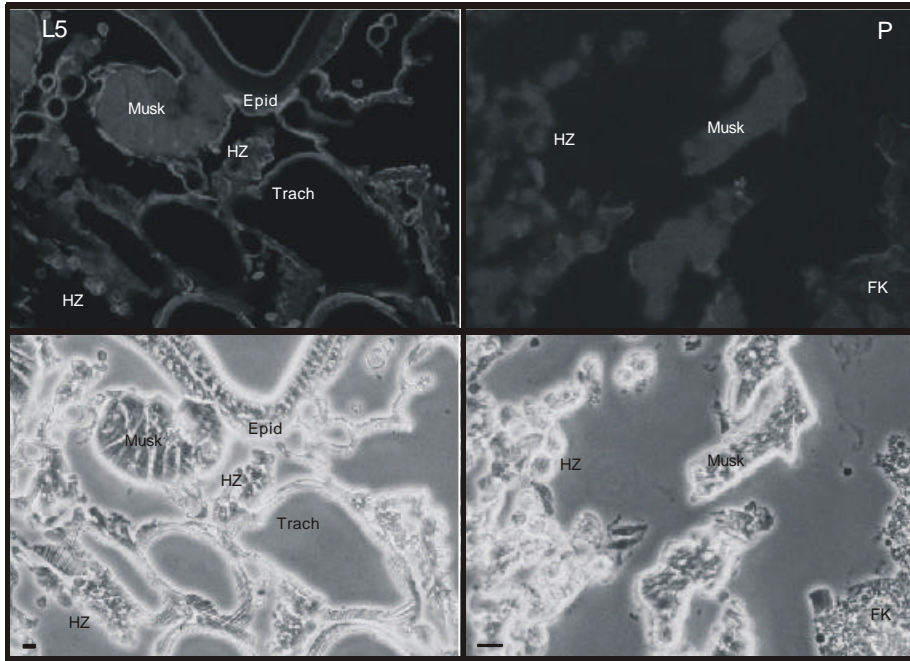


Abb.38:b) X05B06

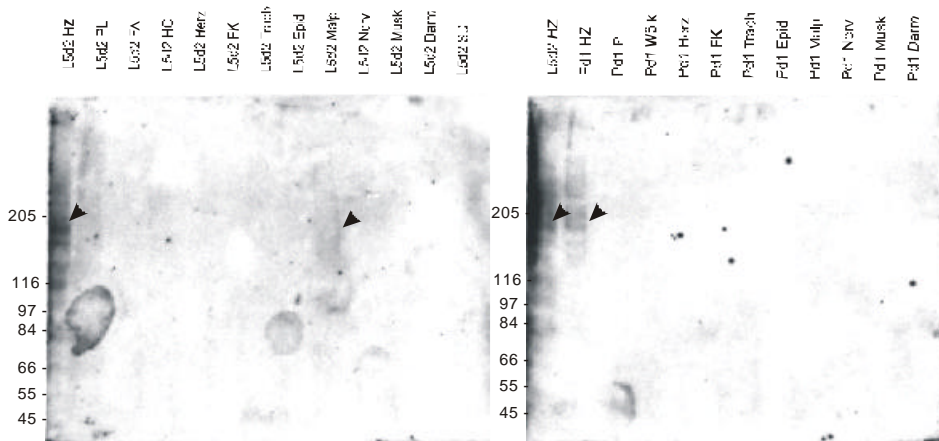


Abb.39:a) MS#70

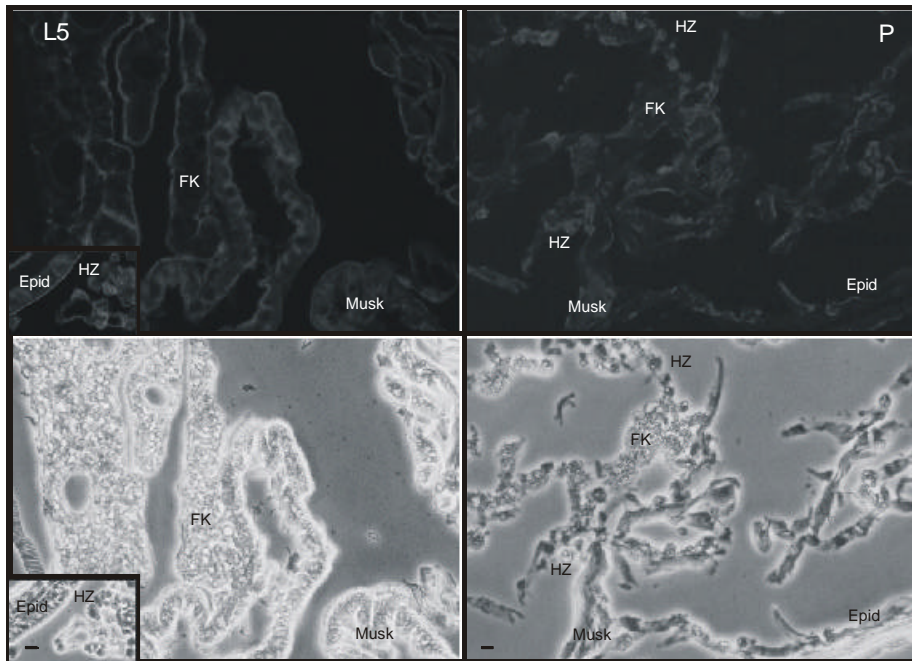
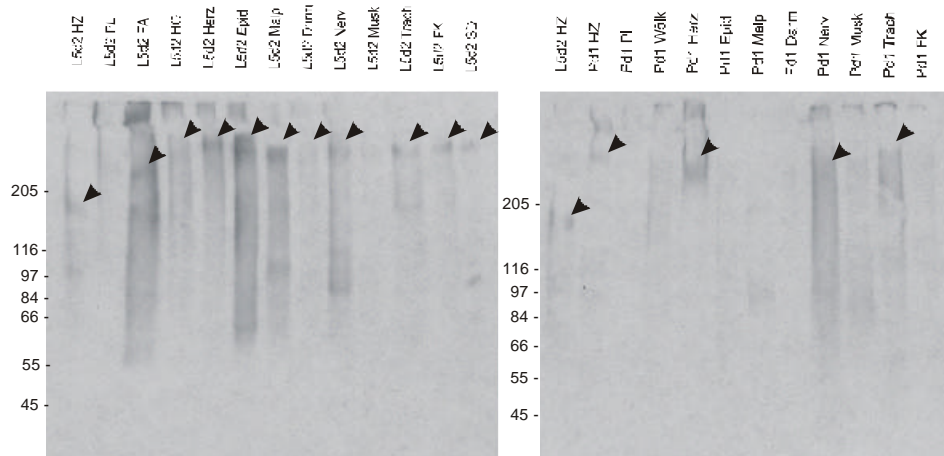


Abb.39:b) MS#70



### X11G09

Durch den Antikörper X11G09 schienen in den Querschnitten die Zellen aller Organe markiert. Die Hämocyten traten sowohl im Larven- als auch im Puppenquerschnitt deutlich hervor, wobei besonders die Granulen der pupalen granulären Zellen auffielen (Abb.40a).

In der Western-Blot-Analyse zeigte sich hauptsächlich eine Markierung in den Spuren der Hämocyten, der Herzen, des hämatopoietischen Organs und der Flügelanlage. Es waren kaum einzelne Banden auszumachen. Mit Vorsicht kann eine Übereinstimmung der markierten Proteinbanden des Larvenhämocytenlysats mit den Banden des Lysat des hämatopoietischen Organs angenommen werden (Abb.40b).

### MS#16

Die Markierung des Antikörpers MS#16 auf den Querschnitten von Larven und Puppen entsprach dem Muster des Antikörpers MS#70.

Auf der Blotmembran wurden lediglich Proteine der Hämocyten schwach markiert. Nur undeutlich war ein Signal in der Spur der Puppenepidermis zu erkennen.

### X27F10

X27F10 markierte in den Querschnitten vor allem die Hämocyten und daneben die Basallamina sämtlicher Organe (Abb.41). Dieses Markierungsmuster entsprach dem des Antikörpers MS#70.

Eine Western-Blot-Analyse mit diesem Antikörper war nicht möglich.

### MS#72

Das Bindungsmuster des Antikörpers MS#72 entsprach in den Querschnitten wie erwartet dem des Antikörpers MS#70. Auf eine Darstellung wird aus diesem Grund verzichtet.

In der Western-Blot-Analyse der verschiedenen Organlysate markierte der Antikörper nur schwach neben Banden in den Spuren der Hämocytenlysate Proteine der Epidermis und evtl. der Malpighischen Gefäße.

---

**Abb.40** (S.116): a) Markierung von X11G09 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von X11G09 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach-Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

Abb.40:a) X11G09

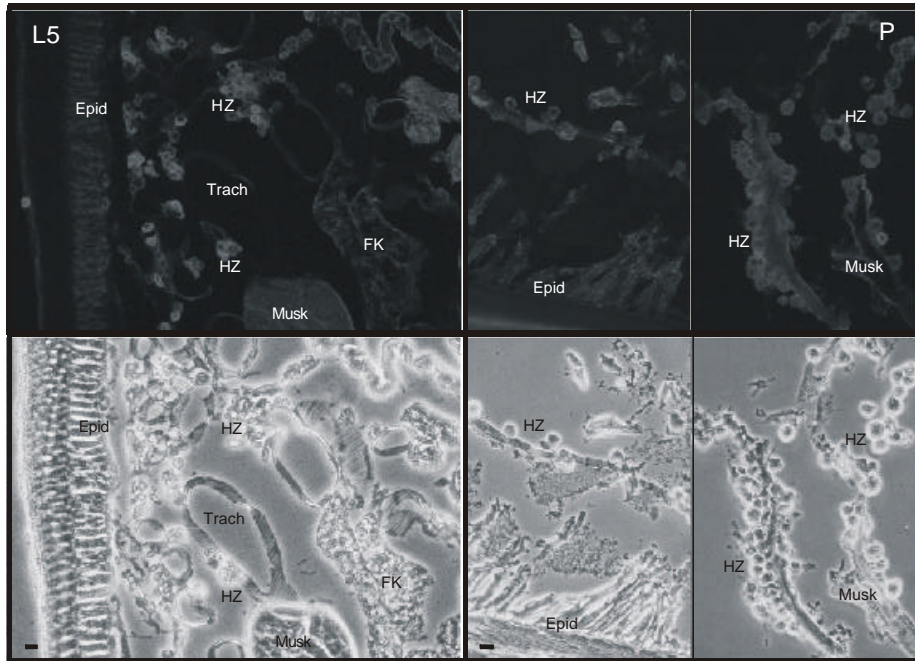
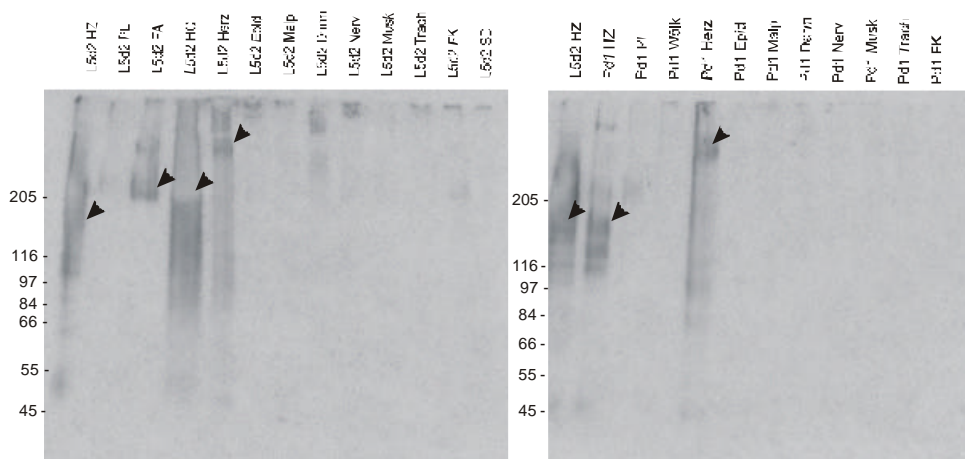


Abb.40:b) X11G09



X31F07

Vermutlich verlor der Antikörper X31F07 im Verlauf der Zeit seine Bindungseigenschaften. Während er bei einem ersten Screenen die Basallamina sämtlicher Organe zusätzlich zu den Hämozyten markierte, band er in späteren Präparaten nur an die Hämozyten. Eine hüllenartige Markierung war nur sehr schwach zu erkennen (Abb.42).

Eine Western-Blot-Analyse konnte mit diesem Antikörper nicht durchgeführt werden.

MS#74

Die Bindungseigenschaften des Antikörpers MS#74 auf den Querschnitten von Larven und Puppen entsprachen denen des Antikörpers MS#70.

Die Reaktionen des Antikörpers auf der Blotmembran der verschiedenen Organlysate waren sehr schwach. Neben Proteinbanden in den Spuren der Hämozyten konnte nur eine Markierung in den Lysaten der Epidermis und der Nerven ausgemacht werden.

MS#77

Obwohl der Antikörper MS#77 aufgrund der Markierungen im Hämozytenpräparat und in der Western-Blot-Analyse der Gruppe E (MS#16, MS#70, MS#72, MS#74) zugeordnet werden konnte, zeigte sich in den Querschnitten von Larven und Puppen überraschenderweise ein anderes Bindungsmuster. MS#77 hatte eine hohe Hämozytenspezifität. Nur schwach war eine hüllenartige Markierung um die Organe im Larvenpräparat zu erkennen. Im Puppenquerschnitt waren sowohl granuläre Zellen als auch Plasmatozyten deutlich auszumachen (Abb.43a).

Die Hämozytenspezifität der Antikörpers MS#77 spiegelte sich auch in der Western-Blot-Analyse der Organlysate wider. Hier waren Proteinbanden in den Spuren der Hämozyten und des hämatopoietischen Organs markiert, wobei in beiden Proben vermutlich gleiche Proteine identifiziert wurden (ca. 150 und 200 kDa). Daneben zeigten sich Banden im Plasma der Larven und schwach im Plasma der Puppen, die in der vorangegangenen Analyse (Abb.21b) in der Form nicht auftraten (Abb.43b).

---

**Abb.41** (S.118): Markierung von X27F10 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämozyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Musk- Muskeln

**Abb.42** (S.118): Markierung von X31F07 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämozyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Musk- Muskeln



Abb.41: X27F10

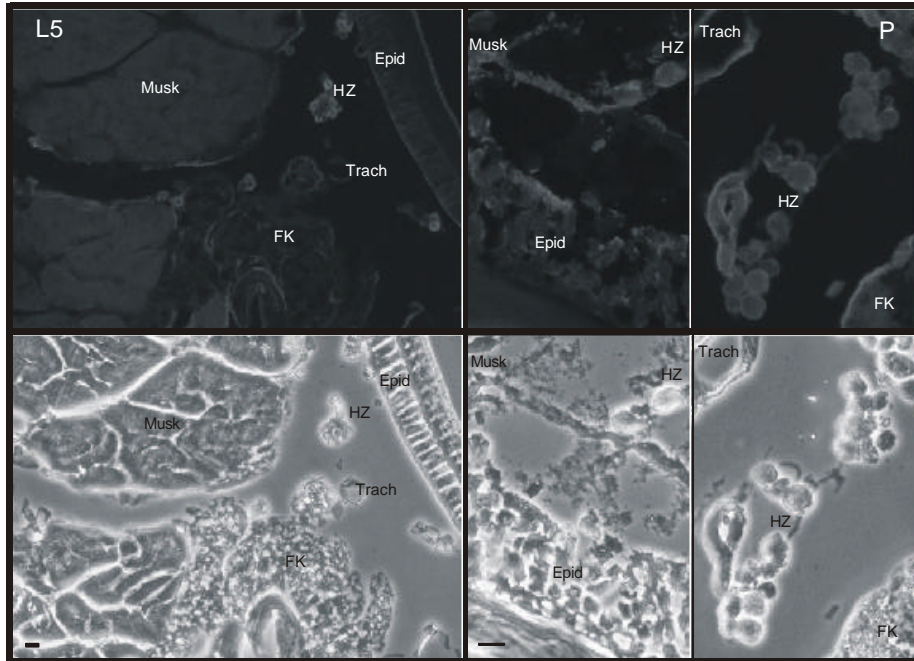
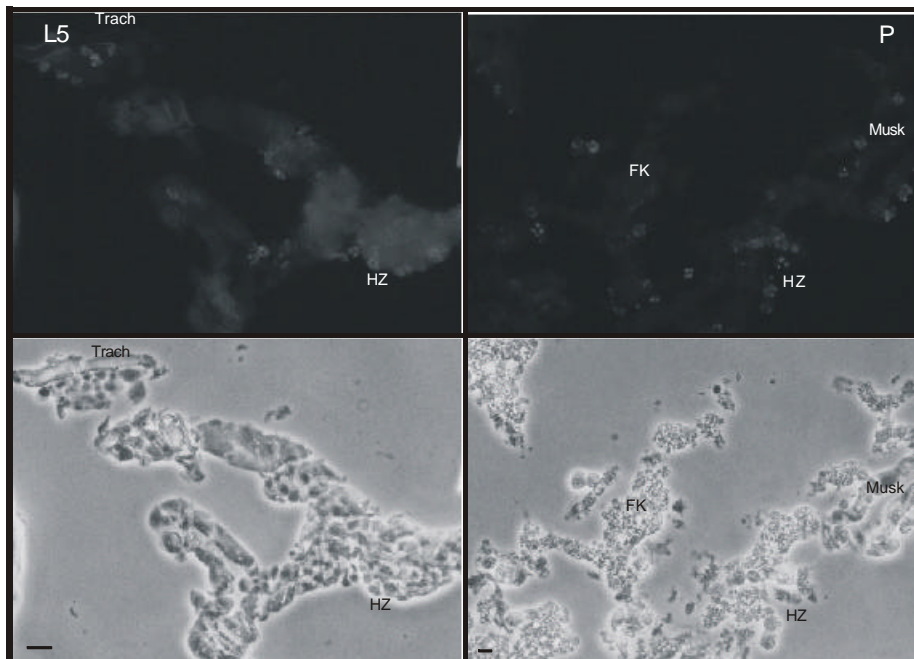


Abb.42: X31F07



### Z19E06

Obwohl die Markierung durch den Antikörper Z19E06 im Hämocytenpräparat sehr deutlich war, konnte keine eindeutige Markierung in den Querschnitten festgestellt werden. Unter den unterschiedlich durchgeführten Präparationen zeigte sich einmal in einem mit Paraformaldehyd fixierten Präparat eine schwache Markierung der Basallamina. In einem Kryoschnitt dagegen fanden sich feine Punkte an Tracheen und im Fettkörper, vermutlich an den dort versorgenden Tracheen. In Puppenschnitten konnte keine Markierung nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

In der Western-Blot-Analyse der Organlysate trat dagegen eine sehr interessante Markierung auf. Neben intensiv markierten Proteinbanden in den Spuren der Hämocyten und des Plasmas, waren besonders Proteine in den Spuren der larvalen Flügelanlage, Epidermis und der Malpighischen Gefäße markiert. Daneben fand sich eine hochmolekulare Bande in den Lysaten der larvalen und pupalen Nerven, der Dorsalgefäße und ganz schwach auch der Tracheen. Interessanterweise stimmten die besonders intensiv markierten Banden in den Hämocytenlysaten im Molekulargewicht mit den Hauptbanden der larvalen Malpighischen Gefäße überein (Abb.44).

## **Gruppe F**

### X10D03

X10D03 zeigte auf keinem der ausgetesteten Querschnitte eine Markierung.

Für eine Western-Blot-Analyse stand nicht genügend Zellkulturüberstand zur Verfügung.

---

**Abb.43** (S.120): a) Markierung von MS#77 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von MS#77 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

**Abb.44** (S.121): Markierung von Z19E06 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

**Abb.45** (S.121): Markierung von X11G01 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämocyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Musk- Muskeln

Abb.43:a) MS#77

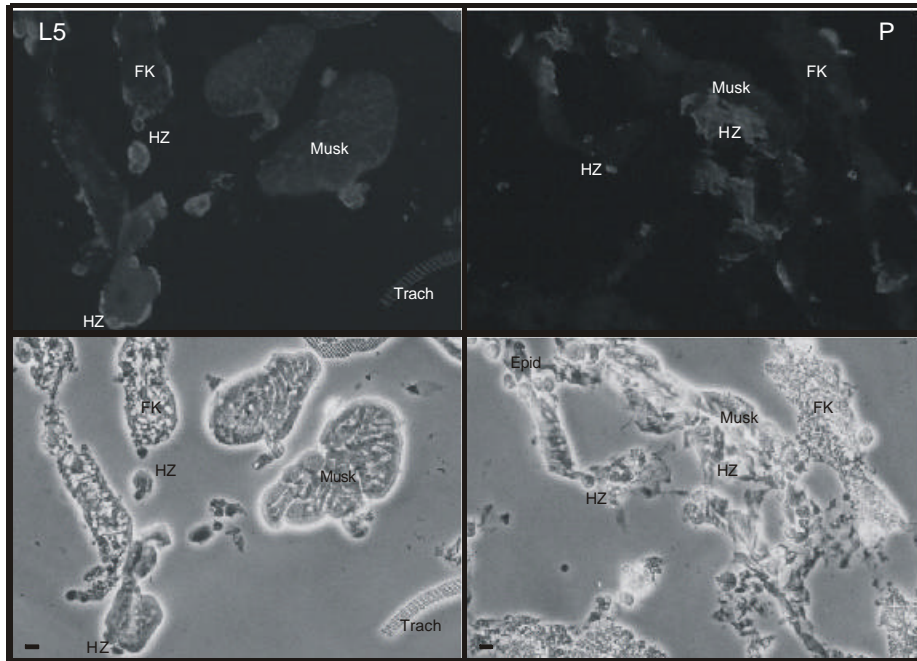


Abb.43:b) MS#77

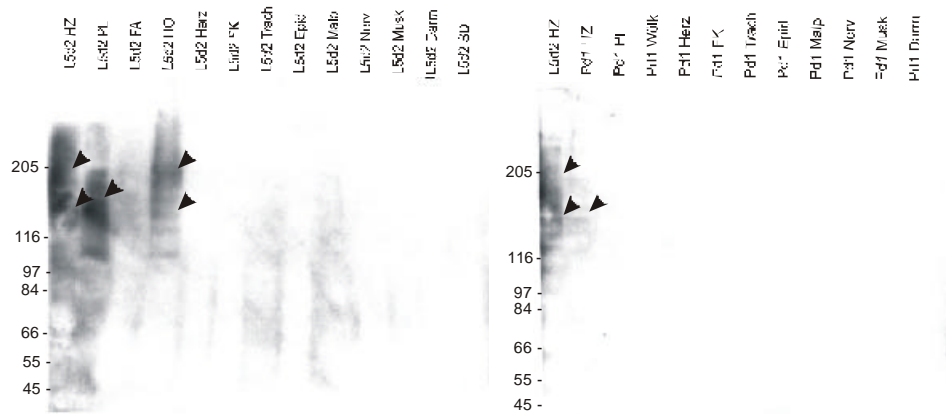


Abb.44: Z19E06

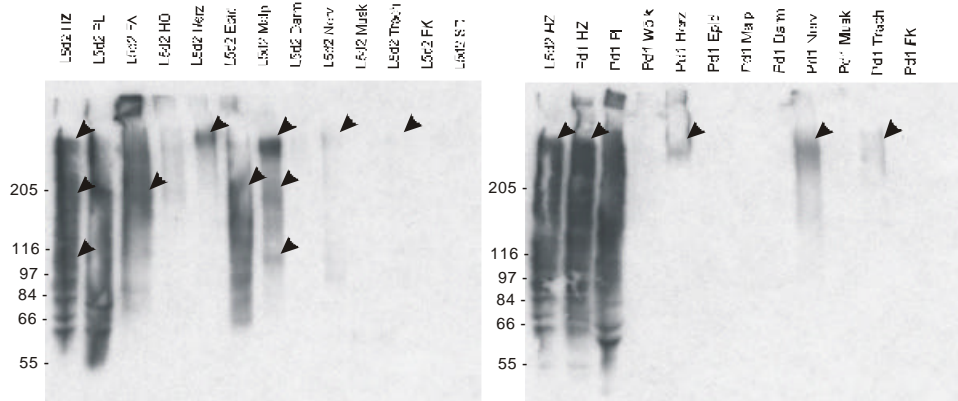
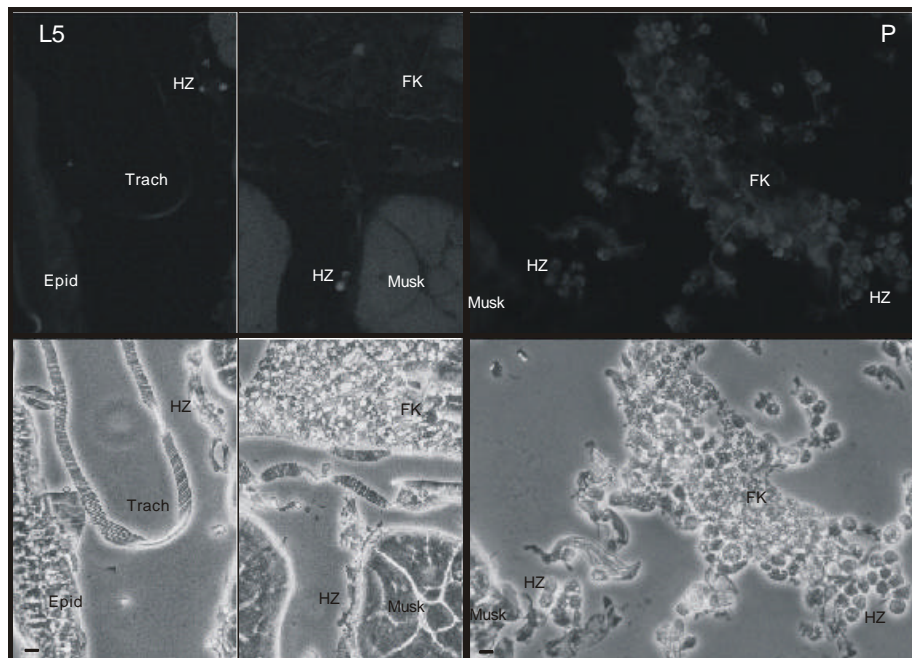


Abb.45: X11G01



## Gruppe G

### X11G01

X11G01 zeigte in den Querschnitten von Larven und Puppen Hämozytenspezifität. Während sich im Larvenquerschnitt nur vereinzelte markierte Hämozyten fanden, vermutlich Oenozytoide, waren im Puppenquerschnitt sämtliche granuläre Zellen kräftig markiert (Abb.45).

Ein Nachweis des Antigens über Western-Blot-Analyse war nicht möglich

### Z20F04

Die Hämozytenspezifität von Z20F04 konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Nur in einem Larvenquerschnittspräparat (Kryoschnitt) gelang es, ganz schwach eine Markierung der Hämozyten zu detektieren, vermutlich der Oenozytoide. In Puppenquerschnitten trat keine Markierung auf.

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften des Antikörpers auf einer Blotmembran war nicht möglich.

## Gruppe H

### MS#75

Der Antikörper MS#75 war eindeutig hämozytenspezifisch. Das konnte sowohl im Larven- als auch im Puppenquerschnitt nachgewiesen werden (Abb.46a).

In der Western-Blot-Analyse der Organlysate fand sich neben den Proteinbanden in den Hämozytenproben, die in etwa denen in Abbildung 26b dargestellten entsprachen, nur eine weitere Bande in der Probe der hämatopoietischen Organe. Diese Bande (ca. 200 kDa) entsprach der oberen Bande des larvalen Hämozytenlysats (Abb.46b).

---

**Abb.46** (S.123): a) Markierung von MS#75 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung von MS#75 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämozyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach-Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

Abb.46:a) MS#75

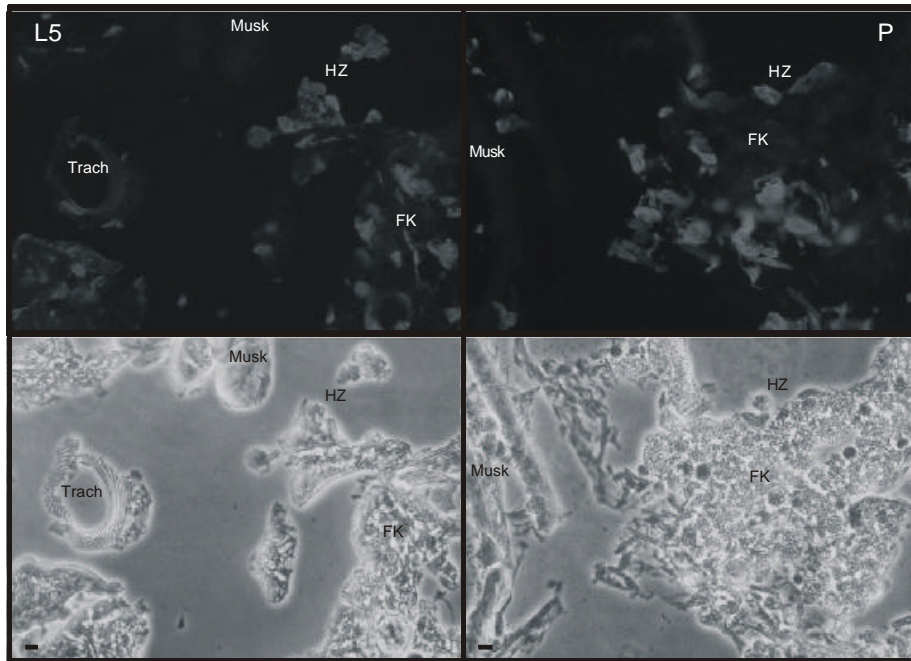
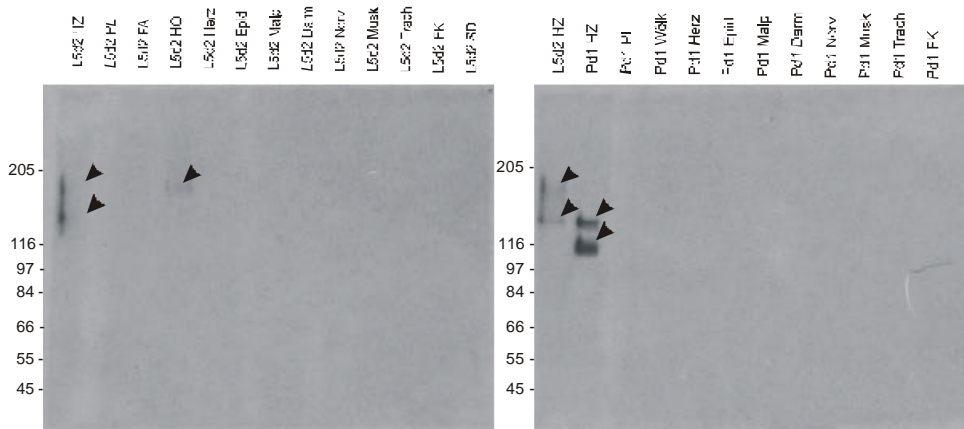


Abb.46:b) MS#75



## Gruppe I

### X29F02

Der Antikörper X29F02 erkannte sowohl in den Larven- als auch in den Puppenquerschnitten nur die granulären Zellen, die in der Larve kräftiger markiert waren als in der Puppe (Abb.48).

Eine Western-Blot-Analyse war mit diesem Antikörper nicht möglich.

### MS#21

MS#21 zeigte das gleiche Markierungsmuster wie der Antikörper X29F02. Auf eine Darstellung wurde deshalb verzichtet.

Eine Western-Blot-Analyse konnte nicht durchgeführt werden.

## Gruppe J

### MS#29

Im Larvenquerschnitt detektierte MS#29 neben den Hämocyten das Muskelgewebe und Strukturen in oder an den Zellen des Fettkörpers. Diese Markierung ergab ein "fleckentartiges" Bild. Im Puppenquerschnitt waren neben den Hämocyten besonders Teile des Fettkörpers kräftig markiert (Abb.47a).

Aus den Erfahrungen aus vorangegangenen Western-Blot-Analysen (Abb.29b) wurde für die Untersuchung der Organlysate ein 8% Trenngel mit einem 4% Sammelgel gewählt. Nach der Darstellung der Antikörperbindung über eine Chemilumineszenzreaktion zeigte sich interessanterweise eine 50-kDa-Bande besonders stark in der Probe der Puppenhämocyten aber auch im Larvenhämocytenlysat. In der vorangegangenen Darstellung trat eine Proteinbande in diesem Bereich im Plasma auf (siehe auch Abb.29b). Diese Bande fand sich desweiteren im Lysat der larvalen Nerven wieder. Alle anderen Spuren blieben ohne Markierung (Abb.47b).

---

**Abb.47** (S.125): a) Markierung von MS#29 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10  $\mu$ m, b) Markierung von MS#29 auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämocyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach-Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

Abb.47:a) MS#29

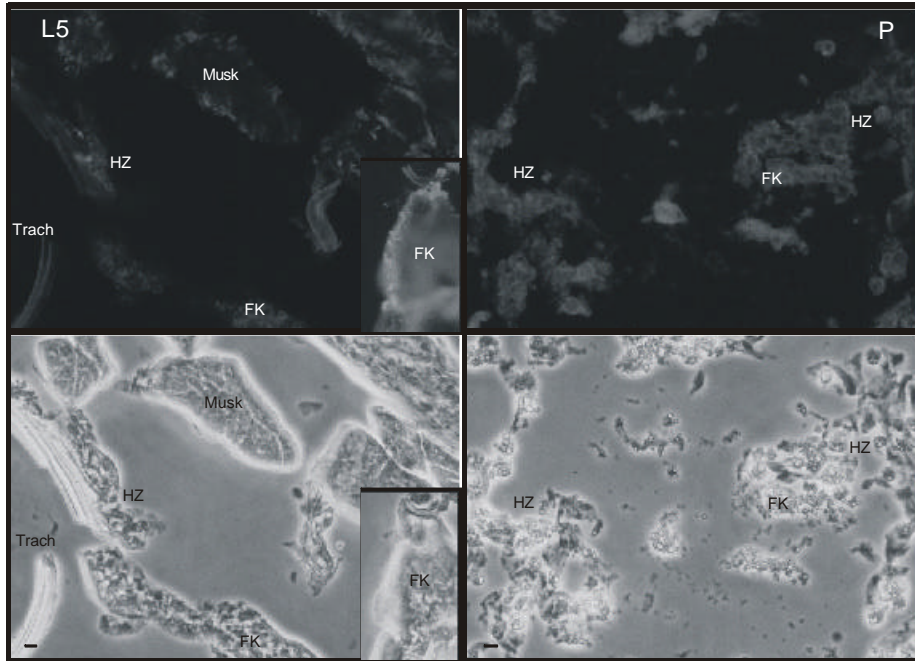
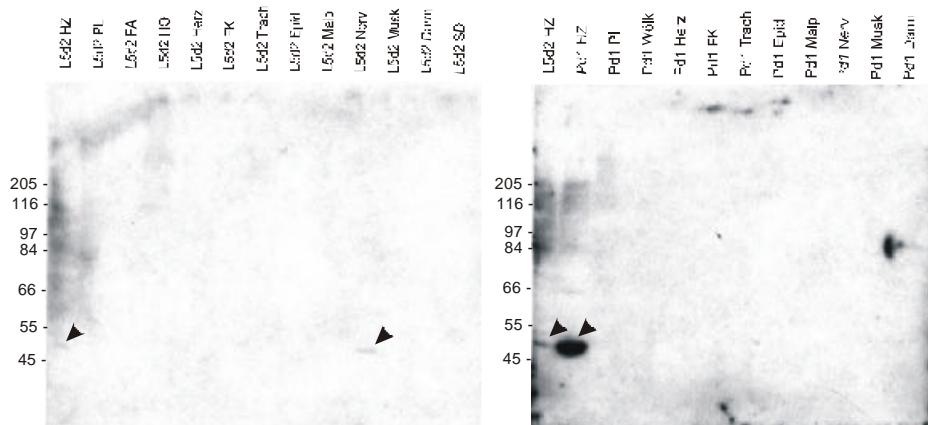


Abb.47:b) MS#29





X30B12

X30B12 markierte im Larvenquerschnitt neben den Hämocyten besonders Strukturen um und innerhalb des Muskelgewebes. Daneben fiel eine fleckenartige "Färbung" im oder am Fettkörper auf. Im Puppenquerschnitt waren mehr oder weniger alle Strukturen markiert. Die Hämocyten traten allerdings besonder hervor (Abb.49).

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften des Antikörpers auf einer Blotmembran war nicht möglich.

X32F07

Der Antikörper X32F07 zeigte das gleiche Bindungsmuster wie X30B12. Auch hier fiel im Larvenquerschnitt die hüllenartige Markierung um das Muskelgewebe und die fleckenartige Markierung am Fettgewebe auf. Im Puppenquerschnitt waren im Prinzip alle Strukturen markiert, besonders kräftig allerdings die Hämocyten. Auf eine Darstellung wurde verzichtet.

Ein Nachweis des Antigens über Western-Blot-Analyse war nicht möglich.

MS#2

Der Antikörper MS#2 zeigte auf den Querschnitten die gleichen Bindungseigenschaften wie MS#29. Deshalb wurde auf eine Darstellung verzichtet.

Es stand ausreichend Antikörperlösung für eine Western-Blot-Analyse zur Verfügung. Ein Nachweis des entsprechenden Antigens zu MS#2 gelang aber mit den verwendeten Standardbedingungen nicht.

---

**Abb.48** (S.127): Markierung von X29F02 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämocyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Musk- Muskeln

**Abb.49** (S.127): Markierung von X30B12 auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, HZ- Hämocyten, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Musk- Muskeln

Abb.48: X29F02

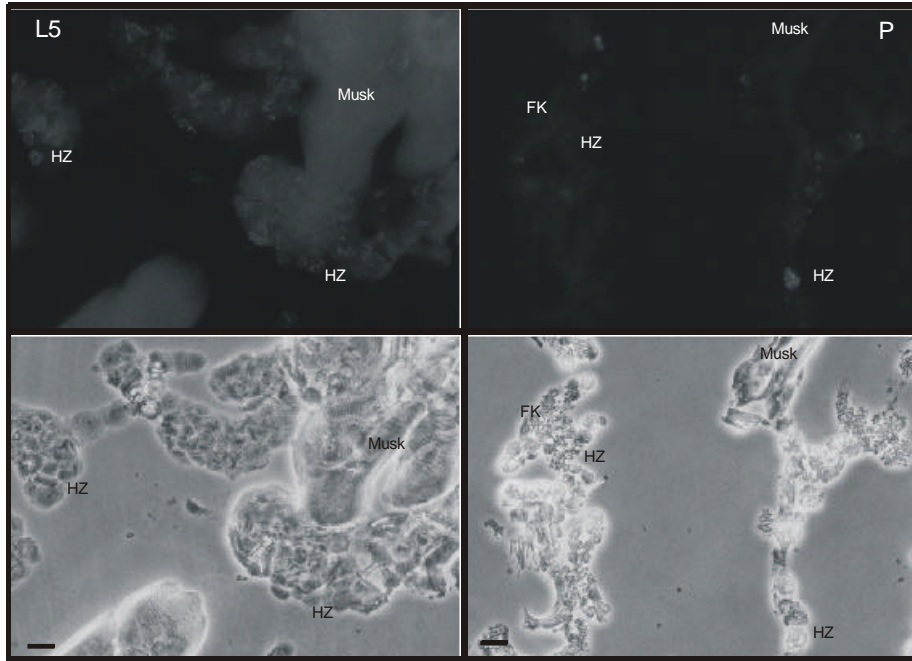
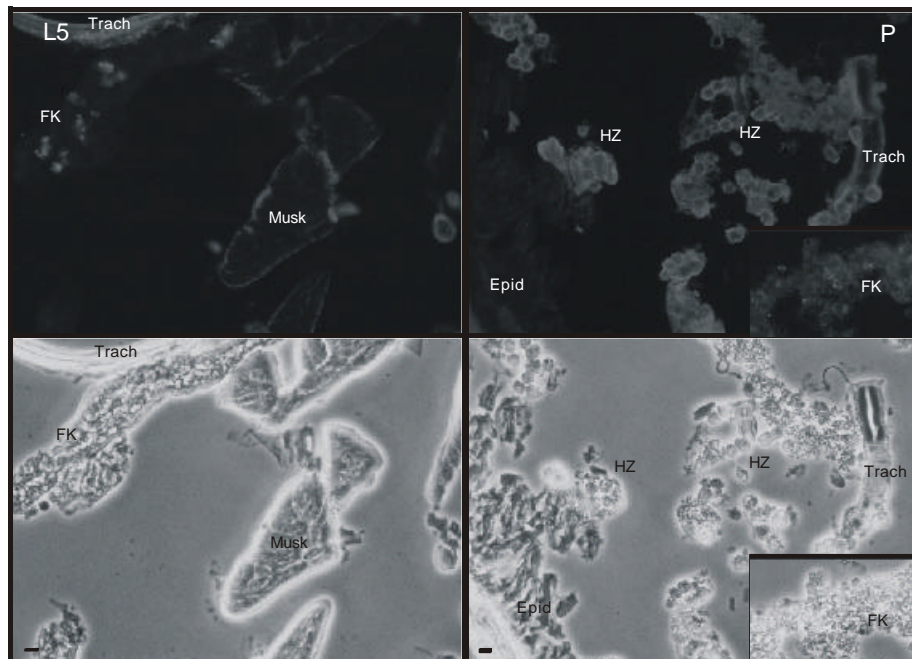


Abb.49: X30B12



### 3.3 Bindungseigenschaften von Lektinen an Hämocyten und Gewebe von Larven und Puppen

#### 3.3.1 Screening der Lektine

Insgesamt wurden die Bindungseigenschaften von 14 Lektinen auf Hämocyten aus Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) getestet (siehe Anhang 3). Allgemein fiel auf, daß die Lektine auf den Präparaten zumeist einen starken Hintergrund verursachten, teilweise als Schimmer, manchmal als starker sandiger Hintergrund. Nach der Behandlung der Objektträger mit Triton X-100 war die Markierung wesentlich besser auswertbar. Trotzdem war die Bindung der Lektine von Versuchsansatz zu Versuchsansatz variabel und eine eindeutige Aussage ließ sich nicht in jedem Fall treffen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die getesteten Lektine.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Lektine mit einer Spezifität für Einfachzucker, wie z.B. galNAc, tendenziell an alle Hämocyten banden, wohingegen Lektine mit einer eingeschränkteren Spezifität gegen Zweifachzucker, wie z.B.  $\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc, nur bestimmte Hämocytentypen markierten (Tab.3).

**Tab.3:** Zusammenfassung aller auf Hämocyten getesteten Lektine mit Angabe ihrer Zuckerspezifitäten geordnet nach ihren Bindungseigenschaften

Zelltyp, der hauptsächlich markiert wurde	Lektin aus	Zuckerspezifität
alle Zellen	<i>Abrus precatorius</i> <i>Glycine max</i> <i>Helix pomatia</i> <i>Succinyl-Concanavalin A</i> <i>Vicia villosa</i> Isolectin B4	gal galNAc galNAc $\alpha$ -man, $\alpha$ -glc galNAc
alle Zellen - cytoplasmatische Strukturen	<i>Erythrina corallodendron</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phytolacca americana</i> <i>Tetragonolobus purpureas</i>	$\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 4)glcNAc oligosacch. (glcNAc) <sub>3</sub> $\alpha$ -L-fuc
GR, OE schwach	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Maclura pomifera</i> <i>Bauhinia purpurea</i> <i>Lens culinaris</i>	$\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc $\alpha$ -gal, $\alpha$ -galNAc $\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc $\alpha$ -man
PL	<i>Triticum vulgare</i>	(glcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc

Interessant für die Aufgabenstellung dieser Arbeit waren die Lektine, die Unterschiede in ihren Bindungseigenschaften auf Larvenhämozyten im Vergleich zu Puppenhämozyten zeigten. Das waren letztendlich nur zwei Lektine, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

### **3.3.2 Lektine mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppenhämozyten: Immunhistologische Bilder und Western Blots**

#### **Arachis hypogaea-Lektin**

Das *Arachis hypogaea*-Lektin markierte sowohl auf den Hämozytenpräparaten der Larven als auch der Puppen hauptsächlich die granulären Zellen. Die Granulen dieser Zellen waren bei Puppen wesentlich deutlicher markiert als bei Larven (Abb.50a).

Auf der Blotmembran erkannte das Lektin nur eine Proteinbande von ca. 140 kDa und nur in den Hämozytenlysaten (die anderen Banden beruhten auf der unspezifischen Bindung des Streptavidins; Abb.50b).

#### **Vicia villosa-Lektin (Isolectin B4)**

Das *Vicia villosa*-Lektin schien im Larvenhämozytenpräparat nur an die Zellmembran bestimmter Plasmatozyten gebunden zu haben. Alle anderen Zellen zeigten eine eher schwache Markierung. Unter den Puppenhämozyten fielen besonders die granulären Zellen mit ihren intensiv markierten Granulen auf (Abb.51a).

In der Western-Blot-Analyse wurden in den Spuren sowohl der Hämozyten- als auch der Plasmaproben sehr viele Proteine markiert. Einige Unterschiede beim Vergleich der Präparate aus Larven und aus Puppen fielen allerdings auf. Im Plasma der Larven fand sich eine kräftig markierte Proteinbande von ca. 100 kDa, die sich im Plasma der Puppen nicht wiederfand.

---

**Abb.50** (S.130): a) Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

**Abb.51** (S.131): a) Markierung des *Vicia villosa*-Lektins (Isolectin B4) auf Hämozyten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; b) Markierung des *Vicia villosa*-Lektins (Isolectin B4) auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1, SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

Abb.50:a) *Arachis hypogaea*-Lektin

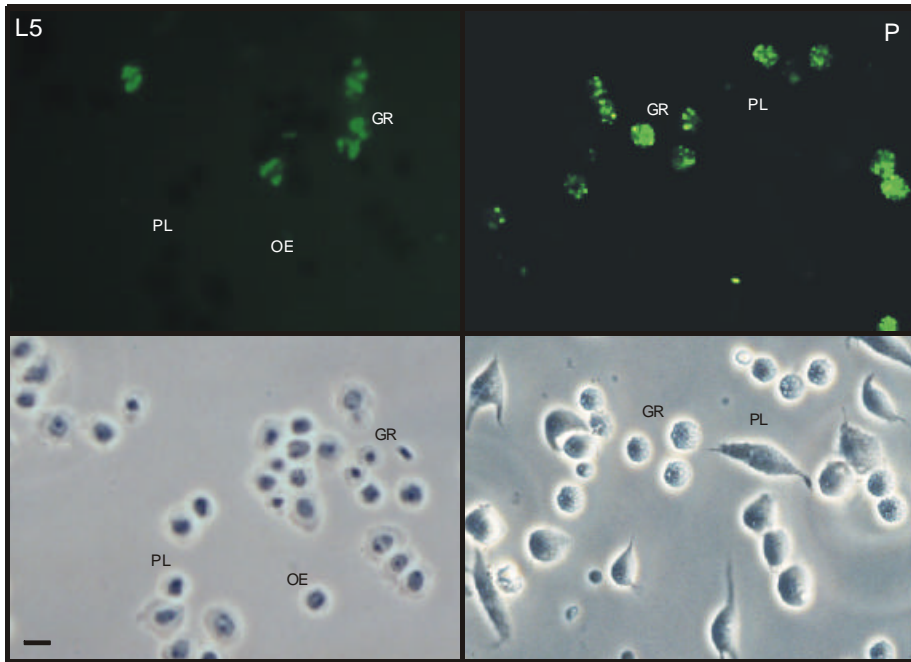


Abb.50:b) *Arachis hypogaea*-Lektin

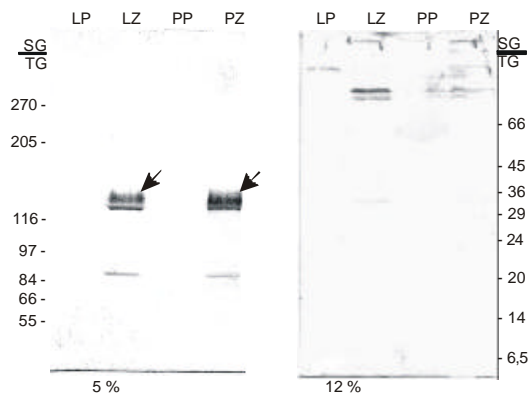


Abb.51:a) *Vicia villosa*-Lektin (Isolectin B4)

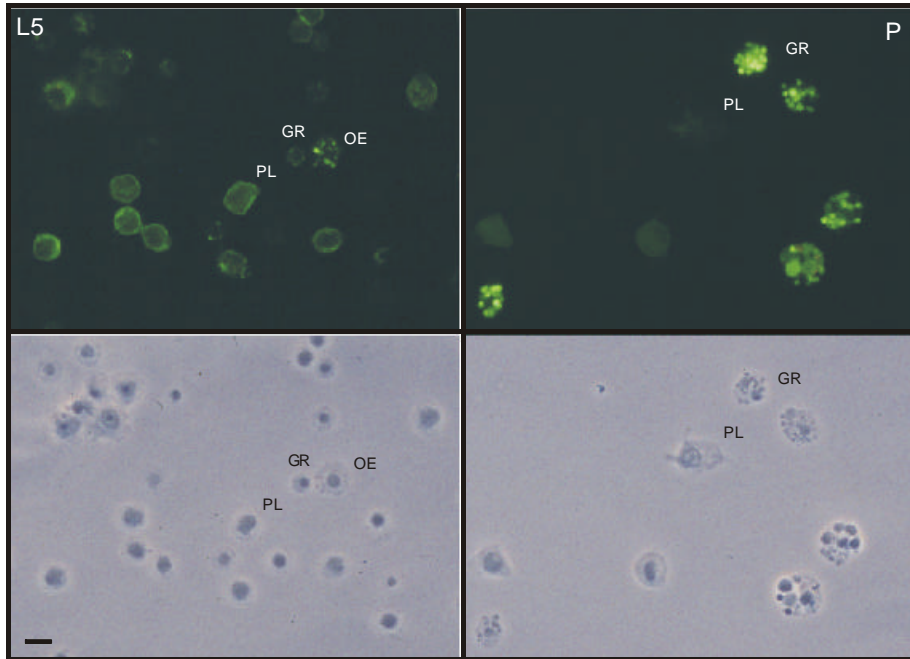
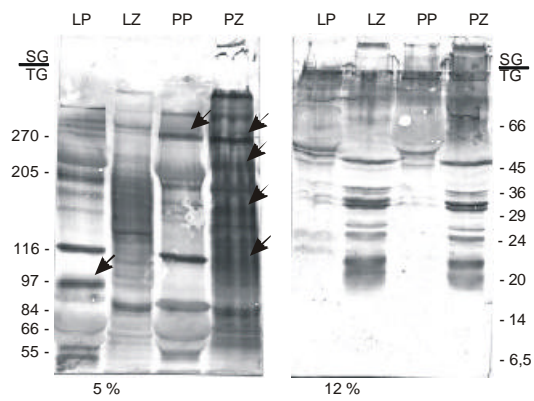


Abb.51:b) *Vicia villosa*-Lektin (Isolectin B4)



Demgegenüber gab es ein hochmolekulares Protein von ca. 320 kDa nur im Plasma der Puppen. Während das Lektin im Lysat der Larvenhämozyten viele Banden relativ schwach markierte, fielen im Lysat der Puppenhämozyten einige besonders kräftig markierte Banden auf (Abb.51b).

### 3.3.3 Test der Lektinbindung an Geweben

#### *Arachis hypogaea*-Lektin

Auf den Querschnitten von Larven und Puppen zeigte sich die Hämozytenspezifität des *Arachis hypogaea*-Lektins. Im Larvenpräparat war daneben eine schwache Markierung um alle Organe auszumachen (Abb.52b).

Die Bindung des Lektins wurde auf der abgebildeten Blotmembran (Abb.52b) über eine Farbreaktion der alkalischen Phosphatase dargestellt. Dabei war dieses Enzym an Streptavidin gekoppelt, das wiederum das Biotin (gekoppelt an das Lektin) erkannte. Da Streptavidin selbst an viele Proteine der Organlysate band, ergaben sich sehr viele falsch positive Ergebnisse auf (siehe Anhang 4). Trotz allem ließ sich eindeutig nachweisen, daß das *Arachis hypogaea*-Lektin hauptsächlich eine Bande von ca. 120 kDa markierte, die neben den Hämozytenlysaten auch in den Spuren der Flügelanlage und des hämatopoietischen Organs auftauchte. Ganz schwach war auch eine Markierung in den Spuren des larvalen Hämolympplasmas, des larvalen Herzens und des Fettkörpers zu erkennen. Daneben band das Lektin an höhermolekulare Proteine in den Plasmaspuren der Larven und Puppen, die aus den vorhergehenden Experimenten (Abb.50b) noch nicht bekannt waren (Abb.52b).

#### *Vicia villosa*-Lektin (Isolectin B4)

Auffällig beim Einsatz des *Vicia villosa*-Lektins bei Larven- und Puppenquerschnitten war die Markierung aller Chitin-haltigen Strukturen: peritrophische Membran im Darm, Kutikula und Tracheen. Neben den Hämozyten zeigten alle Organe eine hüllenartige Markierung, teilweise auch einen durchgehenden Schimmer (Abb.53a).

---

**Abb.52** (S.133): a) Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämozyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

Abb.52:a) *Arctus hypogaea*

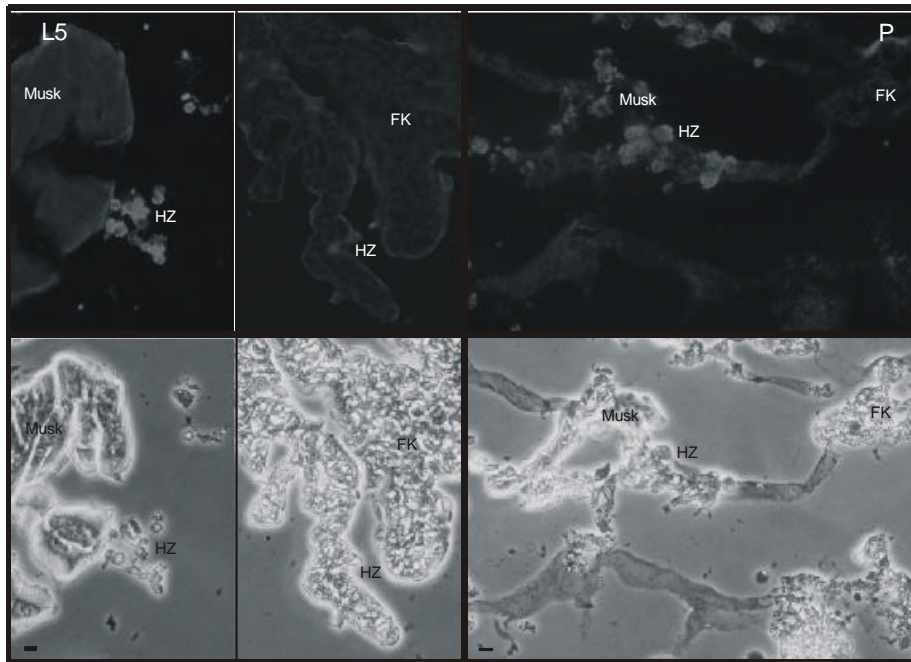
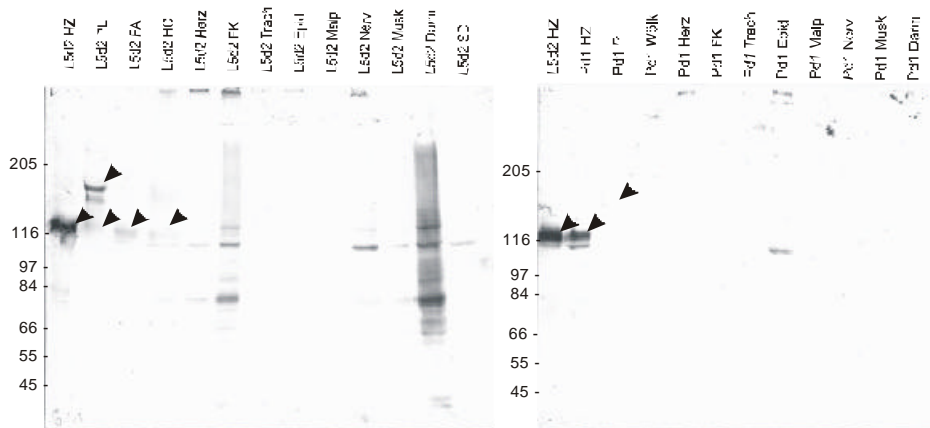


Abb.52:b) *Arctus hypogaea*





Die Auswertung der Liganden-Blot-Analyse war durch die Bindungseigenschaften des Streptavidins erschwert, welches zur Detektion des Biotin gekoppelten Lektins eingesetzt werden mußte. Sowohl das Lektin als auch Streptavidin markierten eine ganze Reihe von Banden (siehe Anhang 4). Trotz allem konnten einige intensiv markierte Banden in den Lysaten der Epidermis, Tracheen und Nerven der Larven und Puppen, als auch besonders kräftig im Darmlysat der Puppen dem *Vicia villosa*-Lektin zugeordnet werden. Für eine klare Aussage der Bindungseigenschaften dieses Lektins in der Western-Blot-Analyse ist es unbedingt erforderlich, ein direkt markiertes Lektin zu verwenden (Abb.53b).

### **3.4 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität auf Larven- und Puppenhämozyten**

#### **3.4.1 Einsatz der Antikörper gegen *Manduca sexta*-Lipophorin und *Hyalophora cecropia*-Arylphorin**

Die Antikörper gegen *M. sexta*-Lipophorin und *H. cecropia*-Arylphorin markierten im immunhistologischen Bild alle Hämozyten. Besonders auffällig traten dabei die Granulen der granulären Zellen und teilweise der Oenozytoide hervor. Diese Markierung war an den Granulen der pupalen granulären Zellen wesentlich kräftiger als im Larvenpräparat (Abb.54a, b).

Durch den Anti-Lipophorin-Antikörper wurden in der Western-Blot-Analyse vor allem die beiden Apoproteine des Lipophorins ApoLp I (um 250 kDa) und ApoLp II (um 70 kDa) im

---

**Abb.53** (S.135): a) Markierung des *Vicia villosa*-Lektins (Isolectin B4) auf Querschnitten von L5d2 und Pd1: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, Balken entspricht 10 µm, b) Markierung des *Vicia villosa*-Lektins (Isolectin B4) auf Organlysaten von L5d2 und Pd1, HZ- Hämozyten, PL- Plasma, FA- Flügelanlage, HO- hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Trach- Tracheen, Epid- Epidermis, Malp- Malpighische Gefäße, Nerv- Nerven, Musk- Muskeln, SD- Speicheldrüse, Wölk- "Wölkchen"- speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe

**Abb.54** (S.136): a) Markierung des Anti-Lipophorin-Antikörpers auf Hämozyten von L5d2 und Pd1; b) Markierung des Anti-Arylphorin-Antikörpers auf Hämozyten von L5d2 und Pd1, a) und b) Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm; c) Markierung des Anti-Lipophorin-Antikörpers auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1; d) Markierung des Anti-Arylphorin-Antikörpers auf Hämozytenlysaten und Hämolympfplasmaproben von L5d2 und Pd1; c) und d) SG- Sammelgel, TG- Trenngel, LP- Larvenplasma, LZ- Larvenhämozyten, PP- Puppenplasma, PZ- Puppenhämozyten

Abb.53:a) *Vicia villosa*-Lektin (Isolectin B4)

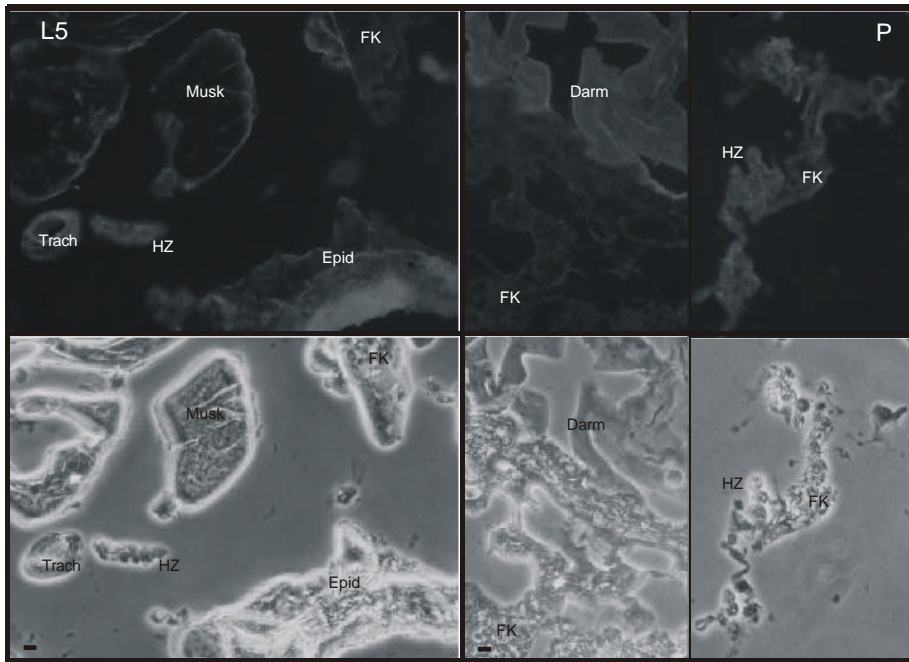


Abb.53:b) *Vicia villosa*-Lektin (Isolectin B4)

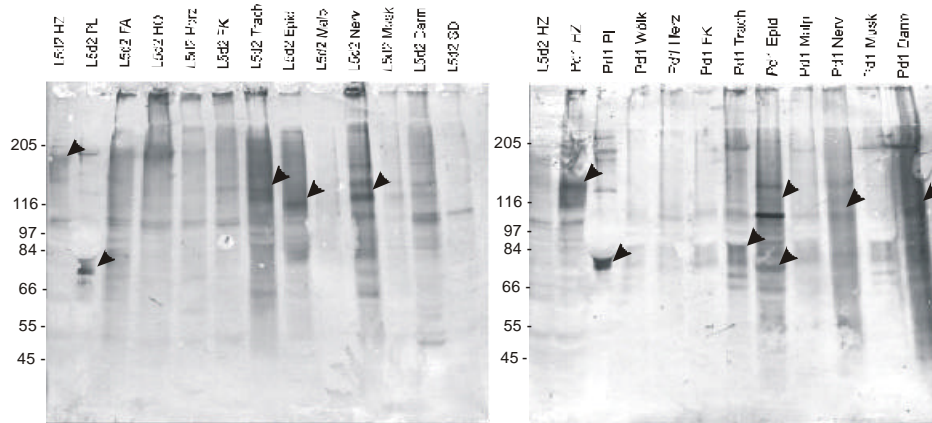


Abb.54:a) Anti-Lipophorin-Antikörper

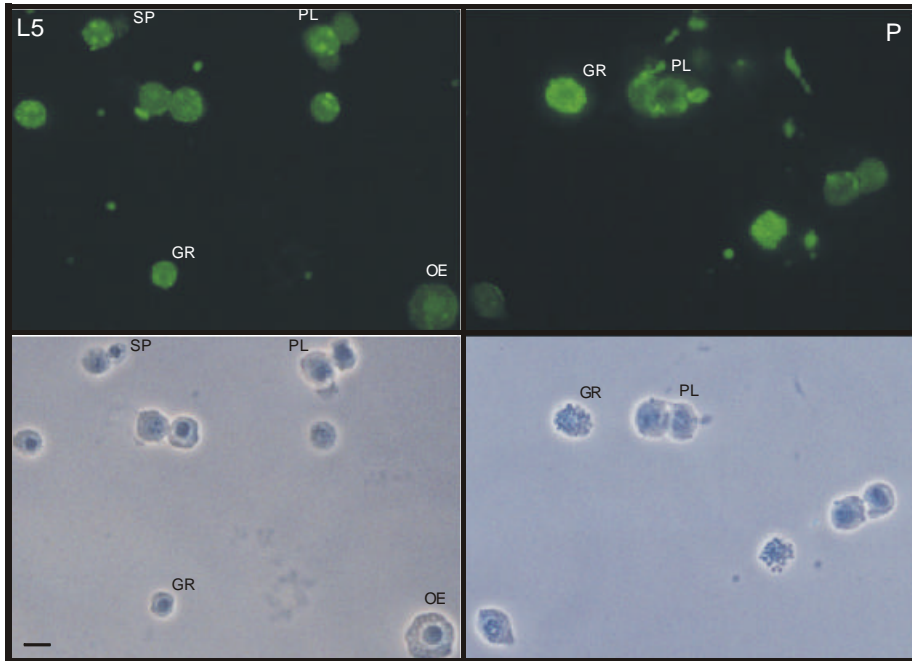


Abb.54:b) Anti-Arylphorin-Antikörper

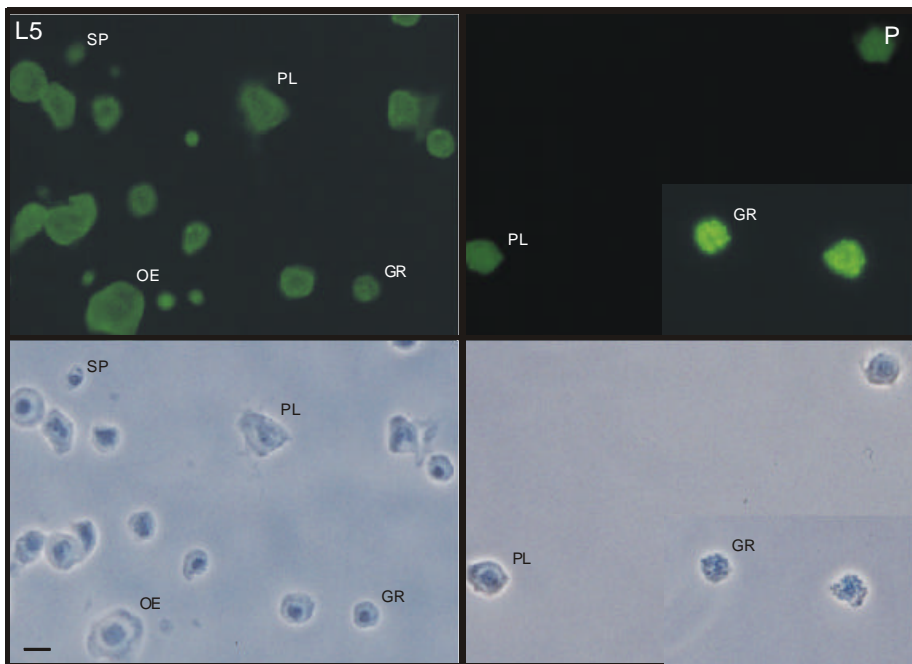


Abb.54:c) Anti-Lipophorin-Antikörper

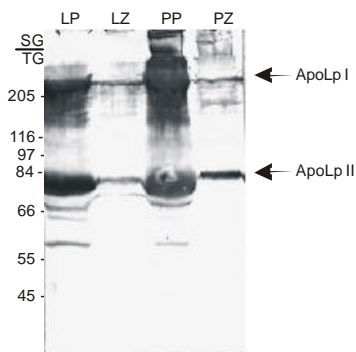
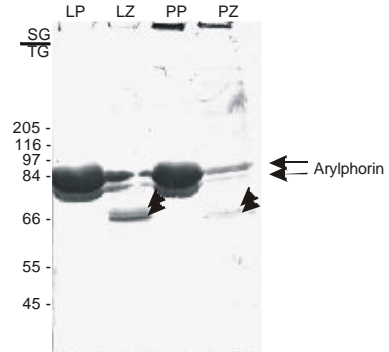


Abb.54:d) Anti-Arylphorin-Antikörper



Hämolympfplasma markiert. Beide Banden traten auch in den Lysaten der Larven- und Puppenhämozyten auf (Abb.54c).

Die zwei Arylphorinbanden, die erwartungsgemäß im Plasma detektiert wurden (um 72 und 77 kDa; RYAN et al. 1985), fanden sich auch in den Lysaten der Hämozyten. In den Spuren der Hämozytenlysate sowohl der Larven als auch der Puppen markierte der eingesetzte Antikörper noch zwei weitere Banden von ca. 66 und 67 kDa (Abb.54d).

### **3.4.2 Einsatz der Antikörper gegen muskelspezifisches Myosin aus *Drosophila melanogaster***

Beide verwendeten Anti-Myosin-Antikörper gegen muskelspezifisches Myosin aus *D. melanogaster* markierten im Larvenpräparat nur einige wenige Plasmatozyten. Diese Färbung betraf nur distinkte Bereiche in den Zellen. Allein aus der Morphologie der Plasmatozyten konnte nicht auf eine bestimmte Subpopulation oder einen bestimmten Aktivierungszustand geschlossen werden. Im Puppenpräparat war die Markierung der beiden Antikörper etwas unterschiedlich in der Stärke. Der erste Antikörper (Myo I) zeigte eine intensivere Markierung. Im Prinzip waren alle pupalen Hämozyten markiert: die granulären Zellen schwächer als die Plasmatozyten (Abb.55a).

Im Larvenquerschnitt war lediglich die viscerale Muskulatur eindeutig durch die beiden eingesetzten Antikörper markiert (Abb.55b). In einem Puppenquerschnitt konnte die Färbung eines Muskelstranges ausgemacht werden. Daneben wurde keine weitere Färbung detektiert.

In einem Larvenquerschnitt wurden Kapseln aus einer Immunreaktion entdeckt. Diese Kapseln wurden vom Antikörper Myo I markiert (Abb.55c).

In der Western-Blot-Analyse zeigten beide Antikörper ein sehr variables und in seiner Intensität besonders schwaches Bindungsmuster (nicht dargestellt). In den Darm- oder Muskellysaten wurden wenn dann nur schwach Banden im niedermolekularen Bereich (ca. 50 kDa) markiert. In den Proben der Hämozytenlysate wurde eine Proteinbande im erwarteten Bereich (ca. 205 kDa) detektiert, daneben aber auch weitere 8 bis 10 Banden.

### **3.4.3 Einsatz der Antikörper gegen *Manduca sexta*-Ecdysonrezeptoren**

Es standen zwei verschiedene monoklonale Antikörper gegen Ecdysonrezeptoren aus *M. sexta* zur Verfügung. Der Antikörper 10F1 erkennt alle Ecdysonrezeptorisoformen, der Antikörper 6B7 ist nur gegen die Isoform B1 gerichtet. Beide Antikörper erkannten in den

Hämozytenpräparaten nur die Oenozytoide, wobei die Markierung mit 10F1 intensiver ausfiel als die mit 6B7. Die betroffenen Oenozytoide waren im Zellkern und auch im Cytoplasma markiert, wobei die Intensität der Markierung variierte (Abb.56a).

Beide Antikörper wurden außerdem auf Präparaten des hämatopoietischen Organs getestet. Hier markierte keiner der Antikörper Zellen im hämatopoietischen Organ. Dagegen konnte eine leichte Markierung in den Zellen der Flügelanlage detektiert werden (nicht dargestellt).

In der Western-Blot-Analyse bestätigte sich die Beobachtung aus den mikroskopischen Präparaten. Die erwartete Bande zwischen 75 und 80 kDa (JINDRA et al. 1996) fand sich im Lysat der Larven- aber nicht der Puppenhämozyten (Abb.56b). Im Lysat der Puppenhämozyten wurde durch beide Antikörper sehr schwach eine Bande von ca. 150 kDa markiert, was ungefähr der doppelten Größe eines Rezeptormoleküls entspricht.

---

**Abb.55** (S.139): a) Markierung des Anti-Myosin-Antikörpers (Myo I) auf Hämozyten von L5d2 und Pd1, Differentialinterferenzkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ; b) Markierung der Darmmuskulatur durch den Anti-Myosin-Antikörper (Myo I) auf einem Querschnitt von L5d2, Differentialinterferenzkontrastbild, Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ; c) Markierung in einer Kapsel durch den Anti-Myosin-Antikörper (Myo I) auf einem Querschnitt von L5d2, Differentialinterferenzkontrastbild, Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$

**Abb.56** (S.139): a) Markierung des Anti-Ecdysonrezeptor-Antikörpers 10F1 auf Hämozyten von L5d2, Differentialinterferenzkontrastbild, Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ; b) Markierung des Anti-Ecdysonrezeptor-Antikörpers 6B7 in der Western-Blot-Analyse: LZ - Larvenhämozytenlysat (L5d2), HO - larvales hämatopoietisches Organ (L5d2), PZ - Puppenhämozytenlysat (Pd1)

Abb.55: Anti-Myosin-Antikörper

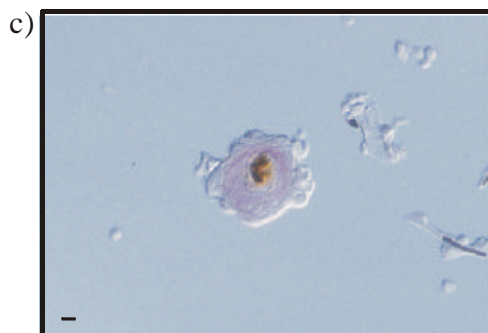
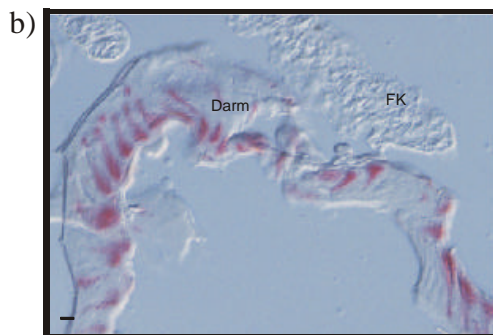
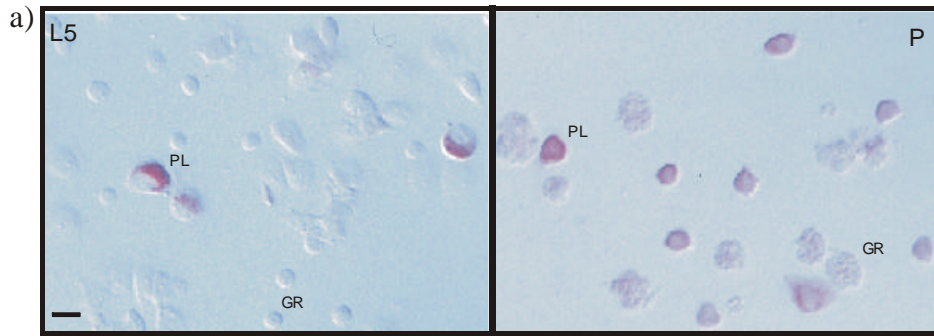
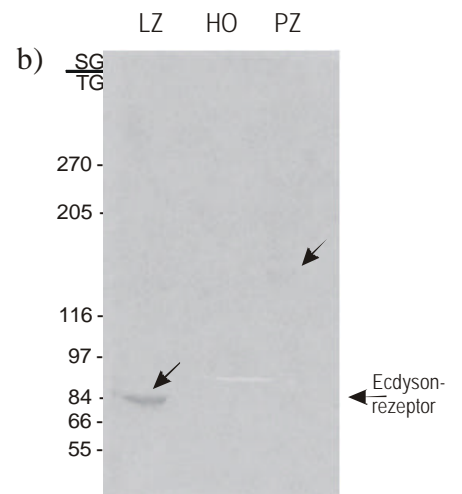
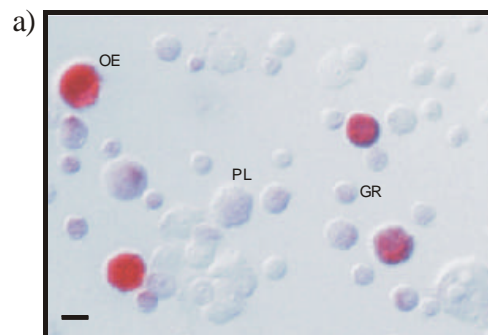


Abb.56: Anti-Ecdysonrezeptor-Antikörper



### 3.5 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin

#### 3.5.1 Charakterisierung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin

Da in der Literatur zunehmend die Bedeutung von Glycoproteinen im Immungeschehen diskutiert wird (siehe 4.3.1), wurde das *Arachis hypogaea*-Lektin auf Hämozytenpräparaten von *Micrococcus luteus*-infizierten und als Kontrolle von Vollsaline-gespritzten Tieren getestet. Interessanterweise zeigten sich hier Unterschiede im Bindungsmuster. Während die Granulen der granulären Zellen der Vollsaline-gespritzten Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren schon eine deutlichere Markierung aufwiesen, waren sie bei *M. luteus*-infizierten Tieren noch intensiver markiert. In Präparaten Bakterien-behandelter Tiere trat außerdem eine Lektinbindung an sphärule Zellen auf, die in unbehandelten Tieren gar nicht, in Vollsaline-gespritzten Tieren leicht markiert waren (Abb.57).

Durch die zusätzliche Markierung der sphärulen Zellen war es interessant, die Lektinbindung an die Proteine der entsprechenden Hämozytenlysate und Plasmenproben in einer Western-Blot-Analyse zu testen. Hier fand sich allerdings in allen Hämozytenlysaten die gleiche 120-kDa-Bande (nicht dargestellt).

Larven- und Puppenhämozytenlysate wurden unter reduzierenden (mit Mercaptoethanol) und nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Mercaptoethanol) in einer SDS-PAGE verglichen. In beiden Fällen markierte das Lektin die gleiche Bande von ca. 120 kDa.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Hämozytenlysate von Larven und Puppen in einer nativen Elektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteine nicht denaturiert. Auf der entsprechenden Blotmembran erstreckte sich die Markierung durch das Lektin über einen großen Bereich, wie es von membranständigen Proteinen zu erwarten ist.

---

**Abb.57** (S.141): Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Hämozyten von L5d2 Vollsaline-gespritzt und L5d2 *Micrococcus luteus*-infiziert: Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyt, OE- Oenozytoid, SP- sphärule Zelle, Balken entspricht 10 µm

**Abb.58** (S.141): Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Hämozytenlysaten von L5d2 und Pd1 nach verschiedenen gelelektrophoretischen Auftrennungen in der Western-Blot-Analyse, a) mit SDS und Mercaptoethanol (Me), b) mit SDS, ohne Mercaptoethanol (Me), c) nativ

Abb.57

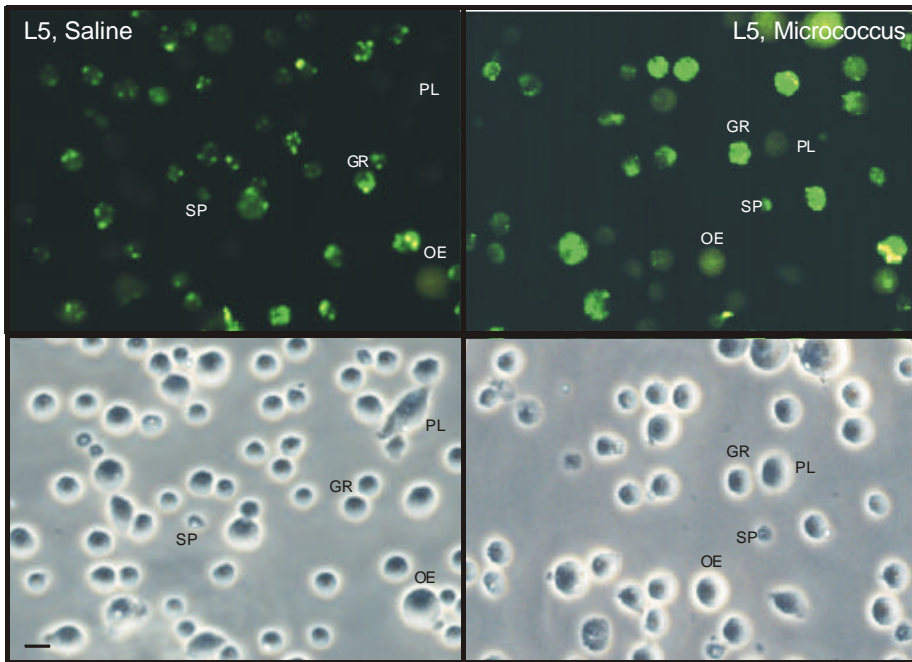
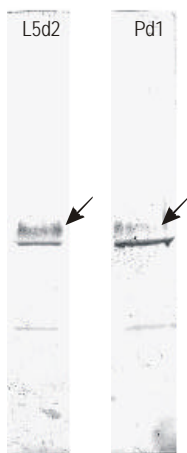
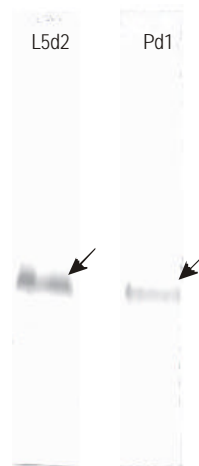


Abb.58

a) +SDS,+Me



b) +SDS,-Me



c) nativ





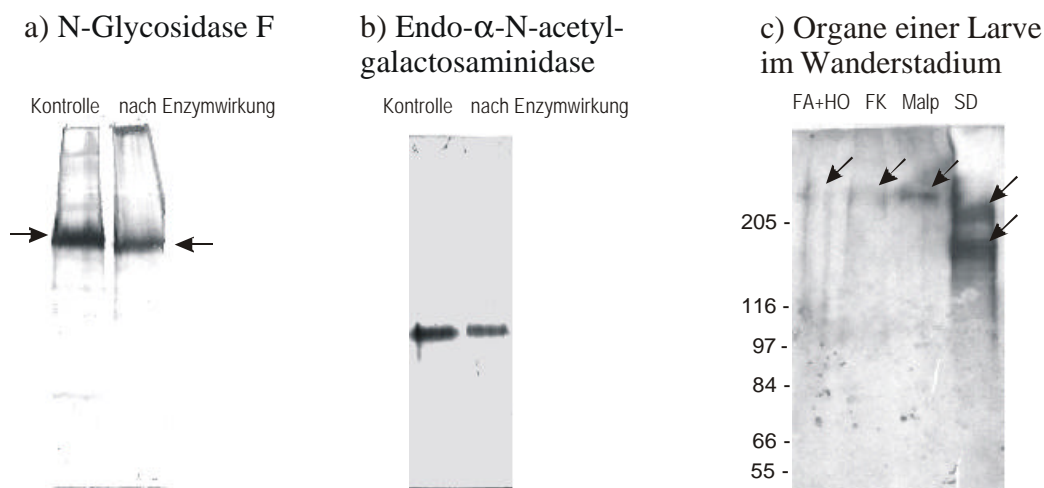
### Charakterisierung der Glykosylierung

Prinzipiell sind zwei Glykosylierungsformen an Proteinen möglich: die N-Glykosylierung an Asparagin oder Lysin und die O-Glykosylierung an Threonin, Serin, 5-Hydroxylysin, Hydroxyprolin oder Tyrosin.

Der Nachweis einer N-glykosidischen Bindung kann im Allgemeinen über die Abspaltung der Zuckerkette mit N-Glycosidase F erbracht werden. Auch nach der Reaktion mit diesem Enzym erkannte das *Arachis hypogaea*-Lektin seinen Liganden auf der Blotmembran. Es konnte eine minimale Verschiebung der Proteinbande in den niedermolekularen Bereich im Vergleich mit unbehandeltem Hämozytenlysate festgestellt werden (Abb.59a).

Zum Nachweis einer O-glykosidischen Bindung des Zuckers an das Protein wurde Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase als O-Glycosidase eingesetzt. Trotz langer Inkubationszeiten des Enzyms mit dem Hämozytenlysate wurde das untersuchte Protein vom Lektin auf der Blotmembran erkannt. Eine Abspaltung des Zuckers mit Hilfe des eingesetzten Enzyms fand vermutlich nicht statt (Abb.59b).

In *D. melanogaster* wurde mit Hilfe des *Arachis hypogaea*-Lektins ein Protein identifiziert, welches auch in der Speicheldrüse der Larven zu finden ist (U. Theopold, mündliche Mitteilung). In der Western-Blot-Analyse der verschiedenen Organlysate von *M. sexta* wurde diese Markierung nicht gefunden (Abb.52b). Die Speicheldrüsen der Larven von *M. sexta* sind aufgrund der Biologie der Tiere zum Zeitpunkt des Eintritts ins Wanderstadium (L5d6)



**Abb.59:** Markierung von Hämozytenproteinen in der Western-Blot-Analyse durch das *Arachis hypogaea*-Lektin auf a) Hämozytenlysaten von L5d2 vor und nach der Einwirkung von N-Glycosidase F, b) Hämozytenlysaten von L5d2 vor und nach Einwirkung von Endo- $\alpha$ -N-acetyl-galactosaminidase, c) auf Organlysaten einer Larve im Wanderstadium (L5d6), FA+HO- Flügelanlage und hämatopoietisches Organ, FK- Fettkörper, Malp- Malpighische Gefäße, SD- Speicheldrüse

besonders kräftig ausgebildet. Deshalb wurde exemplarisch das Lysat einer entsprechenden Speicheldrüse mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Daneben interessierten auch die Bindungseigenschaften des *Arachis hypogaea*-Lektins an andere Organe eines Tieres im Wanderstadium. Während alle aufgetrennten Organlysate keine ohne nur eine schwache Markierung von Proteinen im höhermolekularen Bereich zeigten, waren im Lysat der Speicheldrüse mindestens zwei Banden sehr kräftig markiert. Beide Proteine besaßen allerdings ein höheres Molekulargewicht als das gesuchte Protein aus den Hämozyten (Abb.59c).

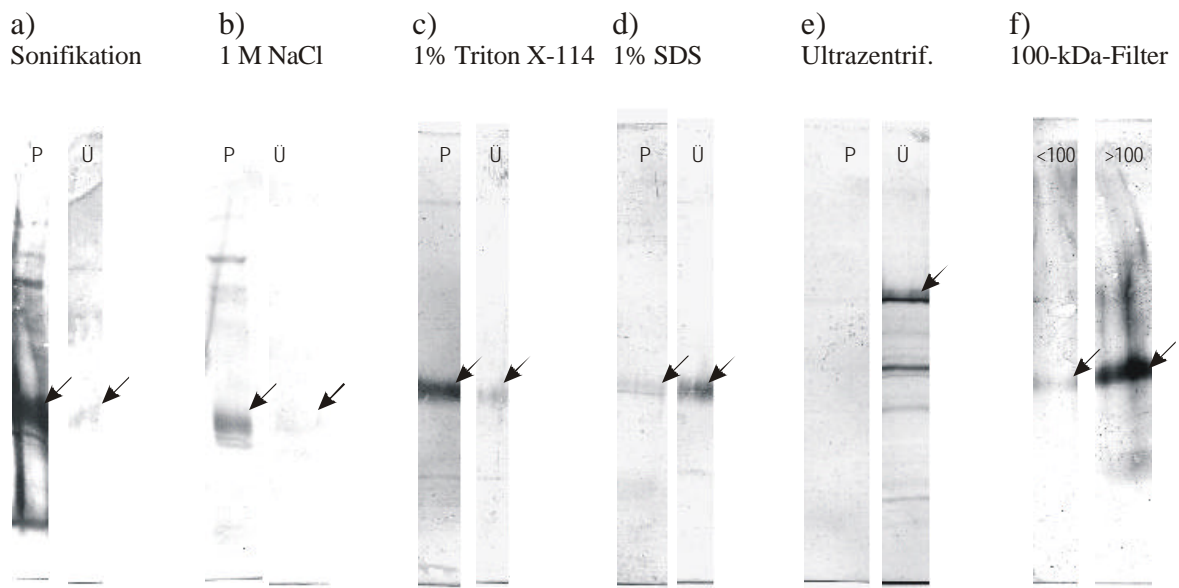
### 3.5.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung

Bevor an die Anreinigung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin herangegangen werden konnte, mußte die Frage geklärt werden, ob es sich bei dem gesuchten Protein um ein membranständiges oder um ein Cytoplasmprotein handelte. Dazu wurden Hämozyten durch Ultraschall und Einfrieren aufgebrochen und dann mit 40.000 x g zentrifugiert. Das gesuchte Protein befand sich nach dieser Prozedur im Pellet, d.h es handelte sich um ein Membranprotein (Abb.60a).

Um zu testen, ob es ein peripheres oder integrales Membranprotein war, wurden durch Ultraschall und Einfrieren aufgebrochene Hämozyten mit 1 M NaCl in Solubilisierungspuffer gewaschen und dann mit 40.000 x g zentrifugiert. Auch hier befand sich das Protein im Pellet, d.h. es war kein peripheres Membranprotein (Abb.60b).

Zur Solubilisierung des offensichtlich integralen Proteins wurden eine nicht ionische (Triton X-114) und eine ionische Seife (SDS) getestet, beide zunächst in einer Konzentration von 1%. Während sich das Protein nach der Behandlung mit Triton X-114 wieder im Pellet befand, zeigte es sich nach der SDS-Behandlung im Überstand (Abb.60c, d).

Da sich eine hohe SDS-Konzentration schwer handhaben ließ - das SDS fiel beim Einengen der Proben und bei der Lagerung im Kühlschrank aus - wurde eine niedrigere Konzentrationen (0,5%) ausgetestet. Dieser Ansatz war erfolgreich. Fortlaufend wurde mit 0,5% SDS gearbeitet. Im Zuge der Reinigung des Liganden zum Antikörper MS#75 (siehe 3.6.2) wurde die Solubilisierungswirkung von Chaps auf den Liganden des *Arachis hypogaea*-Lektins ausgetestet. Dabei war eine Chapskonzentration von 0,5% bei einem Seife-Protein-Verhältnis von 5 erfolgreich (nicht dargestellt).



**Abb.60:** Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins auf Hämocytenproben aus L5d2 nach unterschiedlicher Behandlung in der Western-Blot-Analyse: a) Aufbrechen der Zellen durch Sonifizieren und Einfrieren, b) Inkubation der aufgebrochenen Zellen mit 1 M NaCl, c) Behandlung der Zellen mit 1% Triton X-114, d) Behandlung der Zellen mit 1% SDS, e) Ultrazentrifugation des Überstandes nach Behandlung mit 1% SDS, P-Pellet und Ü-Überstand nach der entsprechenden Zentrifugation; f) Fraktionierung des Überstandes nach Behandlung mit 1% SDS durch einen Zentrifugationsfilter mit einer Ausschlußgrenze von 100 kDa

Da sich mit einer Zentrifugation von 40.000 x g noch keine eindeutige Solubilisierung eines Proteins feststellen läßt (REHM 2000), wurde nach dem Einsatz von 0,5% SDS eine Ultrazentrifugation bei mindestens 100.000 x g angeschlossen. Auch nach dieser befand sich das Protein im Überstand und konnte somit als solubilisiert angesehen werden (Abb.60e).

Zur Vereinfachung der Prozedur wurde ausgetestet, ob die SDS-Behandlung der Hämocyten allein ausreichend war, um das gesuchte Protein aus der Membran zu lösen, oder ob die vorherige Behandlung der Zellen durch Ultraschall und Einfrieren einen positiven Einfluß auf die Solubilisierungswirkung von SDS hatte. Im Vergleich zeigte sich, daß die Einwirkung von SDS das Protein ausreichend gut aus der Membran herauslöste.

Da sich in einem Pilotexperiment mit der *Arachis hypogaea*-Affinitätschromatografiesäule (siehe 3.5.3) herausstellte, daß sich die endgültige Reinigung des Proteins über diesen Schritt sehr zeitaufwendig gestalten würde, wurde daran gearbeitet, den Probenauftrag für diese Säule so effektiv wie möglich zu gestalten. Dazu wurde ein Anreicherungs- und Vorreinigungsschritt entwickelt. Da in der Auftrennung mittels SDS-PAGE ersichtlich war, daß die meisten anderen Proteine im Hämocytenlysat nach der entsprechenden Probenaufbereitung kleiner als das gesuchte Protein waren, wurden die Proben nun ähnlich wie für die Gelelektrophorese behandelt, d.h. sie wurden zusätzlich zu dem SDS mit 5% Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Danach wurde über einen Zentrifugenfilter mit einer Ausschluß-

grenze von 100 kDa eine Fraktionierung versucht (Abb.60f). Dieser Ansatz schien neben der möglichen Fraktionierung des Proteingemischs auch wegen der möglichen Anreicherung d.h. Volumenverkleinerung der Probe für den Auftrag auf die Affinitätschromatographiesäule ohne Aufkonzentrierung des SDS sehr attraktiv. Die anfänglichen Versuche mit dieser Methode waren sehr erfolgreich, allerdings zeigte sich nach Wiederholung ein sehr schneller Verschleiß der Zentrifugfilter, d.h. sie waren sehr schnell verstopft. Eine Proteinbestimmung vor und nach der Zentrifugation mit diesen Filtern ergab, daß ungefähr zwei Drittel des Gesamtproteins vermutlich im Filter hängen blieben. Daß auch das gesuchte Protein auf diese Weise dezimiert wurde, war anzunehmen. Deshalb und wegen des hohen Verschleißes an Filtern wurde von dieser Methode wieder Abstand genommen.

Alternativ zur Fraktionierung über einen Filter wurde eine mögliche Anreicherung des gesuchten Proteins über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung ausgetestet (20%, 40%, 60%, 80%, 100%). Das Protein befand sich in allen Fraktionen. Damit war eine Vorreinigung über diesen Weg nicht möglich (nicht dargestellt).

Zur Vorbereitung auf die Affinitätschromatografie war es notwendig, das SDS über Dialyse aus der Lösung zu entfernen bzw. die Konzentration des SDS zu vermindern, um die Ligandenbindung in der Affinitätschromatografie nicht zu gefährden. In Vortests konnte gezeigt werden, daß sich das gesuchte Protein auch nach der Reduktion des SDS über Dialyse nach Zentrifugation bei 128.000 x g noch im Überstand befand.

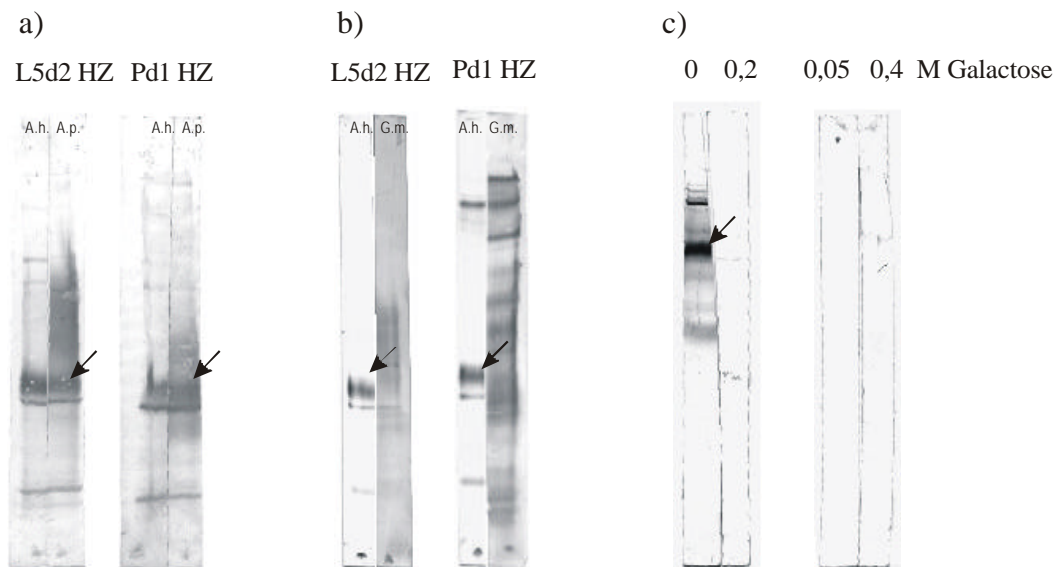
### 3.5.3 Affinitätschromatografie mit der Lektin-Säule

Vor der Durchführung der Lektin-Affinitätschromatografie mußte die Frage geklärt werden, wie der Ligand wieder desorbiert werden konnte. Dazu wurden andere Lektine und deren Bindung an das gesuchte Protein bzw. die Inhibition dieser Bindung durch entsprechende Zucker analysiert. Tabelle 4 faßt den theoretischen Ansatz dieser Analyse zusammen, während in Abbildung 61 die entsprechenden Ergebnisse dargestellt sind.

Auf der Blotmembran markierte das *Abrus precatorius*-Lektin das gesuchte Protein (Abb.61a), das *Glycine max*-Lektin dagegen nicht (Abb.61b). Sowohl die Bindung durch das *Arachis hypogaea*-Lektin als auch durch das *Abrus precatorius*-Lektin kann laut Theorie (Tab.4) durch Galactose inhibiert werden. Ausgehend davon wurde eine Beeinflussung der Bindungsreaktion zwischen dem *Arachis hypogaea*-Lektin und dem gesuchten Protein durch

**Tab.4:** Zusammenstellung von Lektinen mit ihren Eigenschaften, die relevant für die Vorbereitung der Affinitätschromatografie mit dem *Arachis hypogaea*-Lektin sind

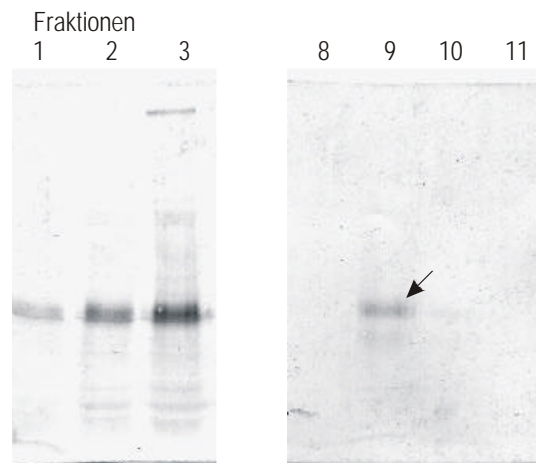
Lektin	Spezifität	Inhibition
<i>Arachis hypogaea</i>	$\beta$ -Gal (1 $\rightarrow$ 3) galNAc	D-Gal, $\alpha$ -Lactose
<i>Abrus precatorius</i>	Gal	D-Gal, N-acetyl-D-glucosamin
<i>Glycine max</i>	GalNAc	D-Gal, N-acetyl-D-galactosamin



**Abb.61:** a), b) Vergleich der Markierung des *Arachis hypogaea*-Lektins (A.h.) auf Hämocytenlysaten von L5d2 und Pd1 mit a) dem *Abrus precatorius*-Lektin (A.p.), b) dem *Glycine max*-Lektin (G.m.); c) Inhibition der Bindung des *Arachis hypogaea*-Lektins an Hämocytenlysate von L5d2 durch 0,05 M, 0,2 M und 0,4 M Galactose; Western-Blot-Analysen

Galactose zunächst auf der Blotmembran getestet. Dazu fand die Inkubation der Membran mit dem Lektin in Anwesenheit von 0,05 M, 0,2 M und 0,4 M Galactose statt. Alle eingesetzten Konzentrationen verhinderten eine Bindung des Lektins an das gesuchte Protein (Abb.61c). Für die Affinitätschromatografie wurden 0,2 M Galactose gewählt. Mit diesem Ansatz gelang die Elution des Proteins (Abb.62).

Die gesammelten Fraktionen, die das gesuchte Protein enthielten, mußten aufgrund des geringen Proteingehalts vor dem Auftrag in der SDS-PAGE stark eingengt werden. Dabei erwies sich die Galactose als störend. Durch Dialyse gegen Säulenlaufpuffer wurde sie entfernt.



**Abb.62:** Detektion des Liganden des *Arachis hypogaea*-Lektins in Fraktionen aus der Affinitätschromatografie mit einer mit dem Lektin gekoppelten Säulenmatrix in der Western-Blot-Analyse, Fraktionen 1, 2, 3- Probenauflage, Fraktion 8- Spülen, Fraktion 9, 10, 11- Elution mit 0,2 M Galactose im Laufpuffer

Um eine ausreichende Menge angereinigten Proteins für die Ansequenzierung zu erhalten, mußten mehrere Affinitätschromatografieläufe durchgeführt werden. Ein großes Flüssigkeitsvolumen mit dem eluierten Protein war zu erwarten. Deshalb wurde im Vorfeld getestet, ob mit einer 100%igen Ammoniumsulfatfällung das gesuchte Protein gefällt und anschließend wieder gelöst werden kann. Dieses Experiment war erfolgreich. Die anschließende Dialyse sollte dann gleichzeitig das verbliebene Ammoniumsulfat und die Galactose entfernen.

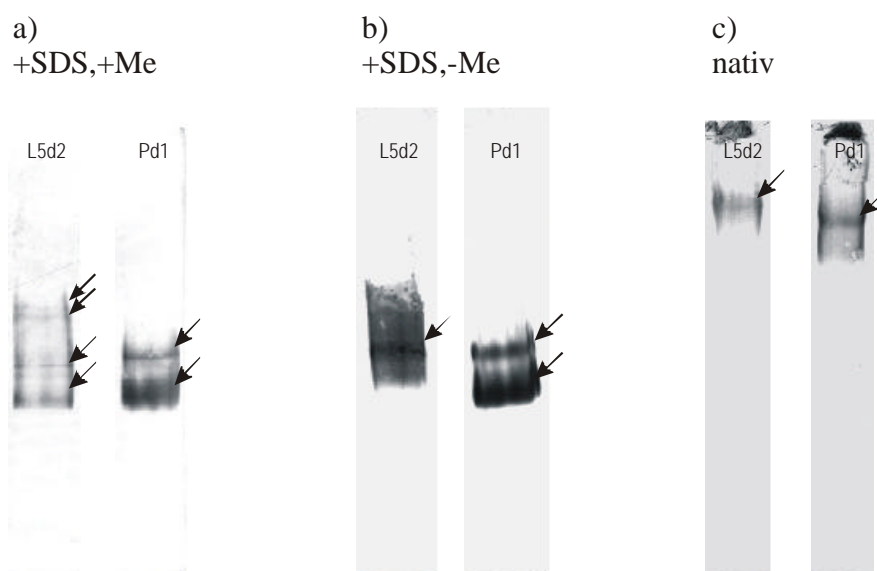
Nach mehrmaligem Abtesten des Reinigungsschemas in analytischen SDS-PAGE wurden letztendlich Hämocyten von 100 Larven aufbereitet und ungefähr 75 Säulenläufe mit der Affinitätschromatographiesäule durchgeführt. Nach anschließender Ammoniumsulfatfällung und Dialyse wurde die Probe auf einen Slot im SDS-Gel aufgetragen und eine Silberfärbung durchgeführt. Auf dem Gel fand sich keine Proteinbande.

### 3.6 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zu MS#75

#### 3.6.1 Charakterisierung des Liganden zu MS#75

Der Antikörper MS#75 wurde auf seine Bindungsaktivität im Vergleich auf Hämozyten von unbehandelten, *Micrococcus luteus*-infizierten und Vollsaline-gespritzten Larven (L5d2) und auf Hämozyten von Puppen (Pd1) sowohl im immunhistologischen Präparat als auch in der Western-Blot-Analyse getestet. Es fanden sich in beiden gewählten Darstellungen keine Unterschiede zwischen den Hämozyten der unterschiedlich behandelten Larven (nicht dargestellt). Der Unterschied zwischen den larvalen und pupalen Hämozyten ist unter 3.2.2 beschrieben.

Zur weiteren Charakterisierung des korrespondierenden Antigens zum Antikörper MS#75 wurden Larven- und Puppenhämozytenlysate unter reduzierenden (mit Mercaptoethanol) und nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Mercaptoethanol) mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse aufgetrennt (Abb.63a, b). In den beiden unterschiedlich behandelten Puppenhämozytenlysaten markierte der Antikörper jeweils zwei Proteinbanden von ca. 110 kDa und 150 kDa. Im Vergleich der unterschiedlich behandelten Larvenhämozytenproben allerdings zeigte sich unter nicht reduzierenden Bedingungen eine markante Bande von ca. 150 kDa,



**Abb.63:** Markierung von MS#75 auf Hämozytenlysaten von L5d2 und Pd1 nach unterschiedlicher Probenaufbereitung bzw. Trennmethode in der Western-Blot-Analyse, a) mit SDS und Mercaptoethanol (Me), b) mit SDS, ohne Mercaptoethanol (Me), c) nativ

entsprechend der oberen Bande in der Spur der Puppenhämozyten. Nach Behandlung mit Mercaptoethanol waren mindestens vier Proteinbanden von ca. 110, 140, 180 und 200 kDa durch den Antikörper markiert.

Zusätzlich wurden Hämozytenlysate von Larven und Puppen in einer nativen Elektrophorese aufgetrennt. Hier markierte der Antikörper auf der dazugehörigen Blotmembran in beiden Lysaten eine Proteinbande, wobei die Bande bei den Larvenhämozyten etwas höher lag als die Bande der entsprechenden Puppenpräparation (Abb.63c).

An dieser Stelle soll noch einmal auf die interessanten Bindungseigenschaften des Antikörpers MS#75 auf der Blotmembran der Lysate der verschiedenen Organe hingewiesen werden. Hier markierte der Antikörper außer den Banden in den Hämozytenlysaten nur eine Bande im Lysat des hämatopoietischen Organs (Abb.46b).

### **3.6.2 Solubilisierung des Liganden und weitere Probenaufbereitung**

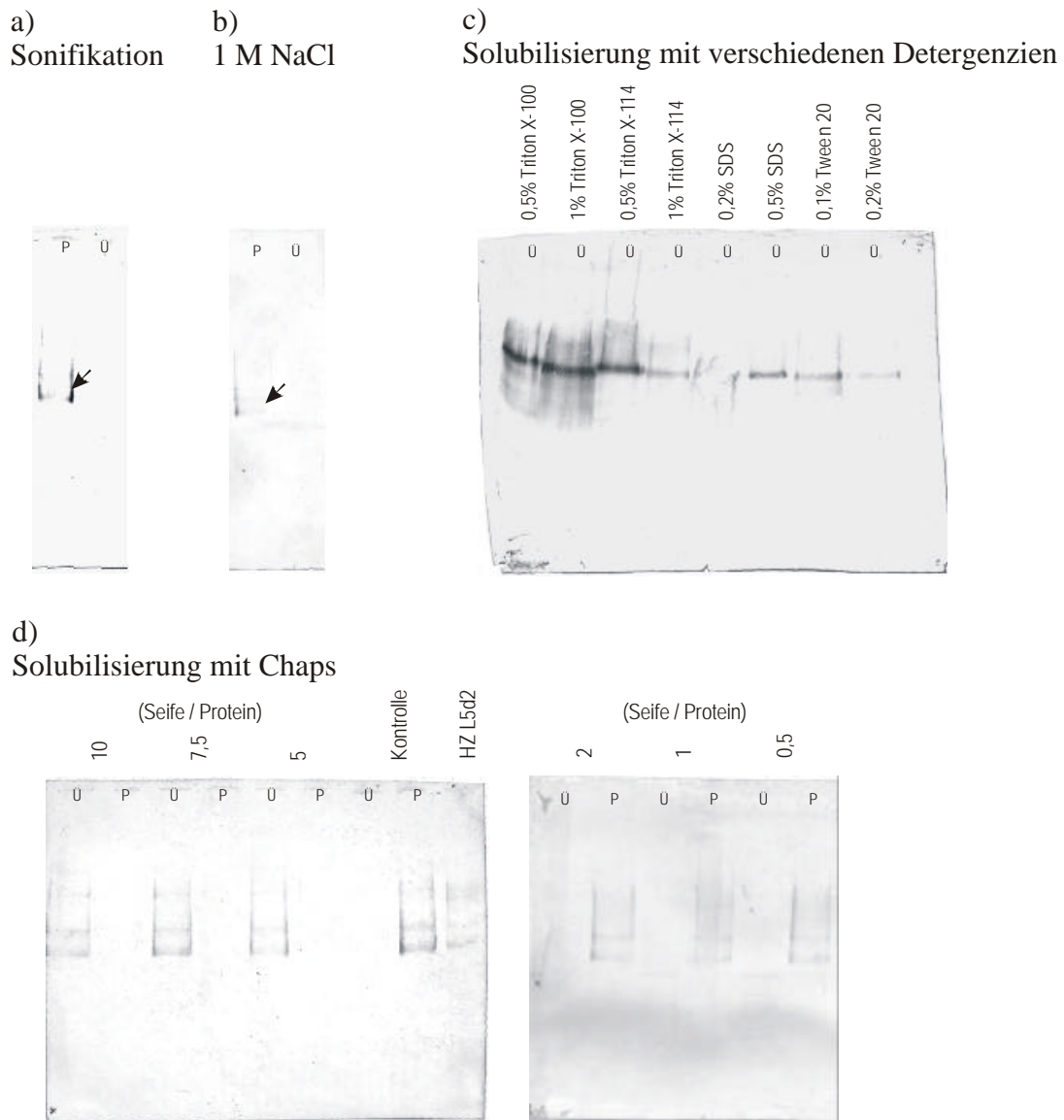
Bevor eine Anreinigung des Liganden zum Antikörper MS#75 begonnen werden konnte, mußte die Membranständigkeit des gesuchten Proteins nachgewiesen werden. Dazu wurden in Parallelansätzen Hämozytenlysataliquots nach der Behandlung mit Ultraschall und Einfrieren nur mit Solubilisierungspuffer bzw. mit 1 M NaCl in Solubilisierungspuffer inkubiert. Bei beiden Ansätzen fand sich das Protein nach der Zentrifugation im Pellet, d.h. es handelte sich weder um ein Cytoplasmprotein noch um ein peripheres Membranprotein (Abb.64a, b).

Um das Protein aus der Membran zu lösen, wurden verschiedene Detergenzien in jeweils zwei Konzentrationen ausgetestet. Am wirksamsten erwies sich Triton X-100. In einem nachfolgenden Versuch wurden die Ansätze nach Behandlung mit drei Triton-Konzentrationen 1%, 0,5% und 0,2% verglichen und außerdem abgetestet, ob vorheriges Sonifizieren der Zellen die Wirksamkeit des Detergenzes beeinflusst. Triton X-100 war in den Konzentrationen 1% und 0,5% gleich wirksam, 0,2% Triton X-100 löste das gesuchte Protein weniger effektiv aus der Membran. Ob die Zellen vorher durch Sonifizieren aufgebrochen waren, spielte dabei keine Rolle (Abb.64c).

Für den weiteren Verlauf wurde mit 0,5% Triton X-100 gearbeitet. Der Solubilisierungstest über Ultrazentrifugation ergab kein eindeutiges Ergebnis. Durch die Chromatografie mit Sepharose Cl 6B konnte aber nachgewiesen werden, daß das gesuchte Protein unter diesen Bedingungen nicht solubilisiert war. Deshalb wurde Chaps als weiteres Detergenz ausgetestet.

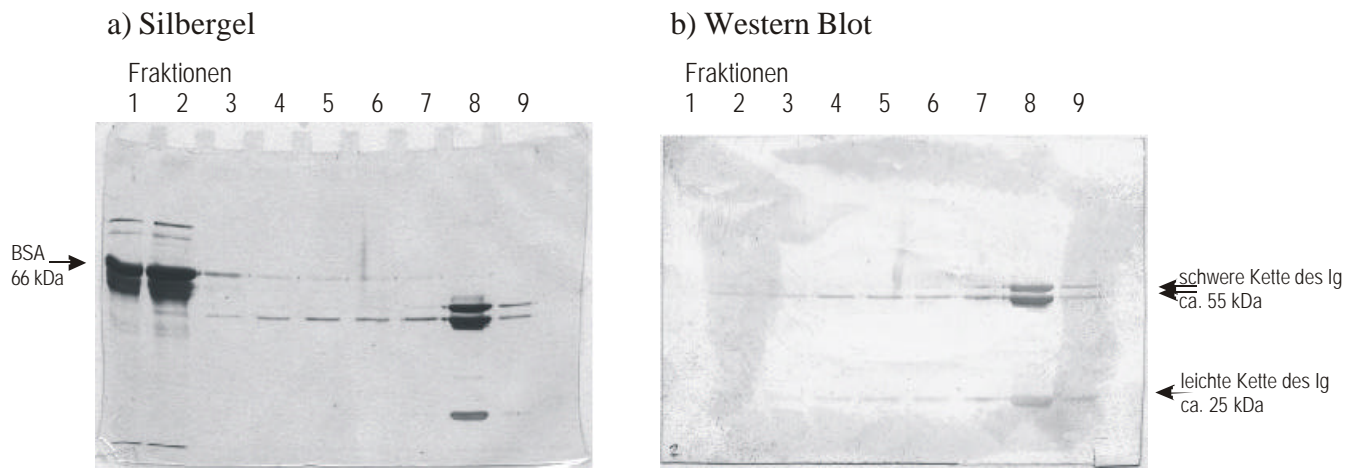
Für Chaps wurde zunächst das geeignete Seife-Protein-Verhältnis ermittelt (Abb.64d). Es war größer 5. Dieses Ergebnis ergab sich anhand einer analytische SDS-PAGE mit anschließender





**Abb.64:** Markierung von MS#75 auf Hämozytenproben aus L5d2 nach unterschiedlicher Behandlung in der Western-Blot-Analyse: a) Aufbrechen der Zellen durch Sonifizieren und Einfrieren, b) Inkubation der aufgebrochenen Zellen mit 1 M NaCl, c) Behandlung der Zellen mit verschiedenen Detergenzien, d) Behandlung der Zellen mit verschiedenen Chaps-Konzentrationen abgestimmt auf die Proteinkonzentration der Probe (Zahlen geben das Seife-Protein-Verhältnis an); P- Pellet, Ü- Überstand nach der Zentrifugation

Western-Blot-Analyse nach Zentrifugation bei 40.000 x g. In der Chromatografie mit Sepharose Cl 6B zeigte sich allerdings, daß das Protein nicht solubilisiert war. Fortlaufend wurden die Bedingungen für die Größenausschlußchromatografie und damit für die Proteinumgebung variiert (Zugabe von Chaps in verschiedenen Konzentrationen), doch keine führte zum Erfolg (siehe Dokumentation unter 3.6.5).



**Abb.65:** Reinigung des Antikörpers MS#75 über eine Protein G-Säule, Fraktionen 1, 2: Durchlauf beim Probenauftrag, Fraktionen 3-7: Spülen, Fraktionen 8, 9: Elution mit Glycin/HCl-Puffer pH 2,7, a) Silbergel der Fraktionen, b) Western-Blot-Analyse der Fraktionen (Nachweis mit einem Anti-Maus-Antikörper - der gereinigte Antikörper befindet sich in Fraktion 8)

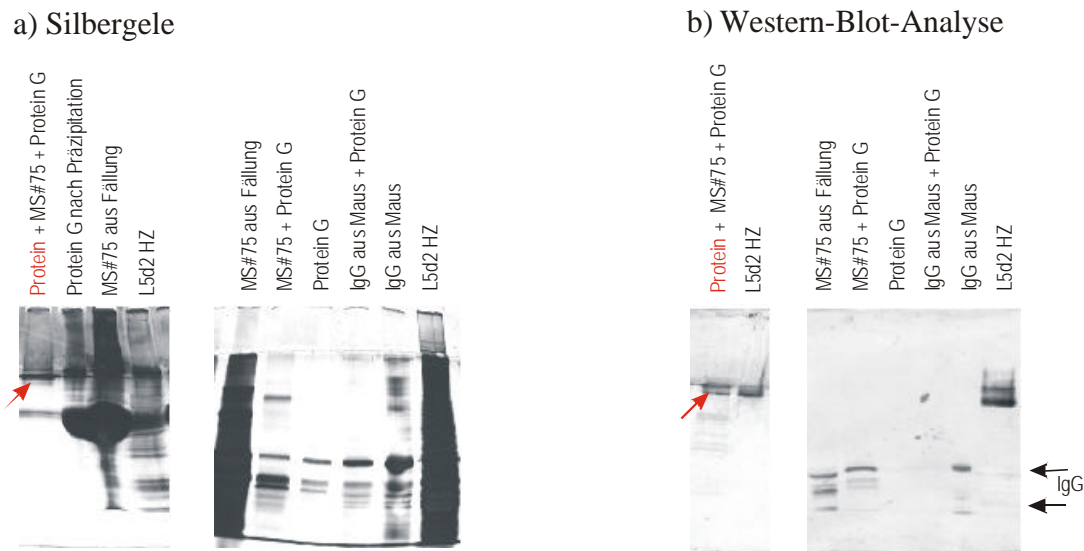
### 3.6.3 Reinigung des Antikörpers MS#75

Die Reinigung des Antikörpers MS#75 war mit den angewendeten Methoden erfolgreich. Durch zweimalige Ammoniumsulfatfällung gelang eine Anreicherung der Antikörpermoleküle und eine Reduzierung des BSA-Gehaltes in der Probe. BSA ist der wesentliche Bestandteil des FBS, welches der Hybridomazellkultur zugesetzt wird und damit in großen Mengen im Hybridomaüberstand enthalten ist.

Bei der Reinigung des Antikörpers über eine Protein G-Säule war vor allem darauf zu achten, daß Antikörper und Protein G genügend Zeit hatten, miteinander zu interagieren. Die gewählte Inkubationszeit von 30 min war dafür ausreichend. Danach war das vor allem im Gemisch enthaltene BSA im Durchlauf, während der Antikörper mit einem pH-Shift ins saure Milieu eluiert wurde (Abb.65).

### 3.6.4 Immunpräzipitation mit MS#75

Die Immunpräzipitation war als erster Versuch zur Anreicherung des korrespondierenden Antigens zu MS#75 gedacht, um ungefähr abschätzen zu können, wieviel Ausgangsprotein, d.h. Hämozytenlysat eingesetzt werden mußte, damit am Ende eine ausreichende Menge



**Abb.66:** Immunpräzipitation von Hämocytenlysat mit angereinigtem Antikörper MS#75, der rote Pfeil markiert das gesuchte Protein aus dem Präzipitationsversuch, a) Silbergele, b) Western-Blot-Analyse (Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit MS#75 als primärem und einem Anti-Maus-Antikörper als sekundärem Antikörper)

gereinigtes Protein zum Ansequenzieren gewonnen werden konnte. Dieser Versuch wurde mit Hämocytenlysat nach Behandlung mit 0,5% Triton X-100 durchgeführt.

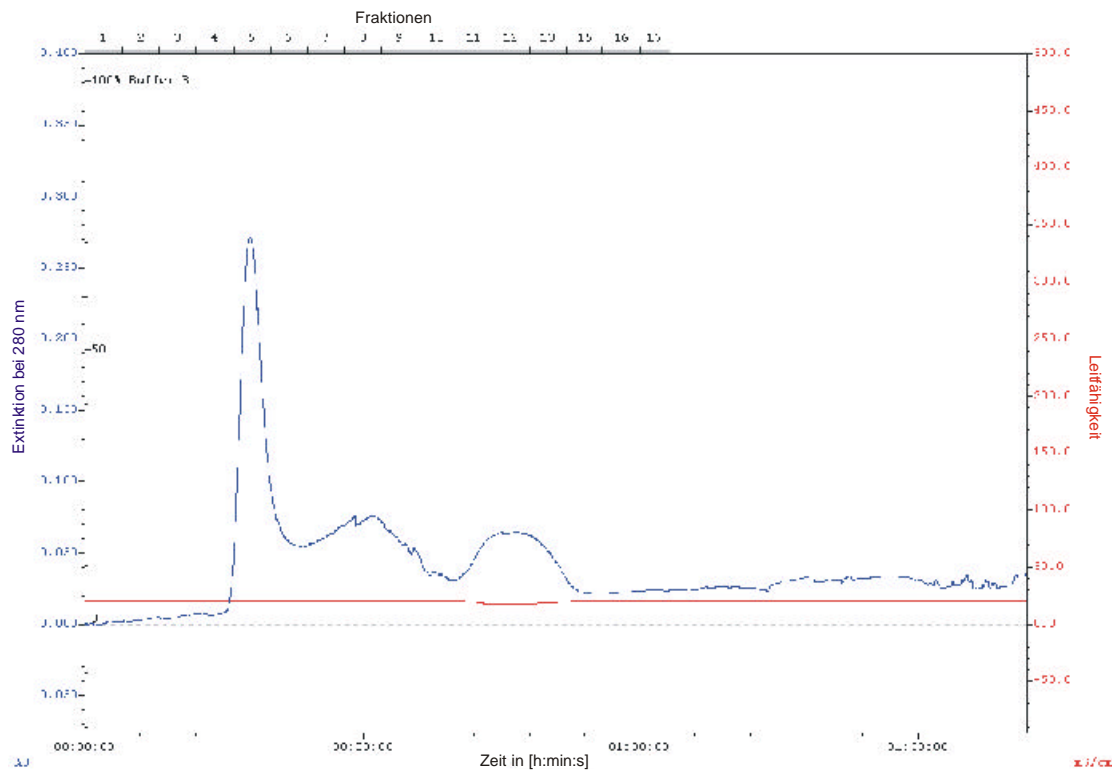
Die Immunpräzipitation war erfolgreich. Auf der Blotmembran, die mit dem Antikörper MS#75 inkubiert wurde, fand sich sehr deutlich eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich. Durch den Vergleich mit den Kontrollen, in denen zum einen der Antikörper MS#75 und zum anderen ein beliebiger Maus-Antikörper mitaufgetragen wurden, ließ sich eindeutig erkennen, daß es sich bei der deutlichen Bande um das Antigen handeln mußte. Im Gel, daß mit Silber gefärbt wurde, war diese Bande nicht deutlich auszumachen, d.h daß das Antigen nur in einer sehr geringen Menge vorlag (weniger als 1 ng). Demzufolge mußte für eine Reinigung des gesuchten Proteins Hämocytenlysat von mindestens 200 Larven aufbereitet werden.

### 3.6.5 Größenausschlußchromatografie

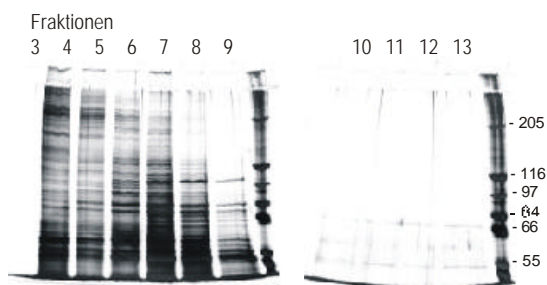
Die Größenausschlußchromatografie wurde durchgeführt, um den Erfolg der Solubilisierungsversuche des Liganden zum Antikörper MS#75 zu testen.

Unter gleichen Bedingungen wie die untersuchten Hämocytenlysate wurde ein Gemisch aus Blue Dextran (2.000 kDa) und Jack Bean Urease Tetramer (480 kDa) und Dimer (240 kDa) über die Größenausschlußsäule getrennt. In den ersten Fraktionen fand sich das 2.000 kDa große Blue Dextran. Die beiden Urease-Proteine wurden in den Fraktionen 8-9 bzw. 11-12

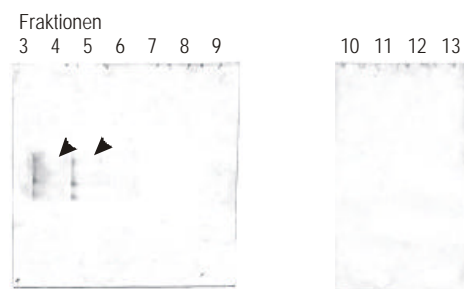
## a) Chromatogramm



## b) Silbergele der Fraktionen



## c) Western-Blot-Analyse der Fraktionen

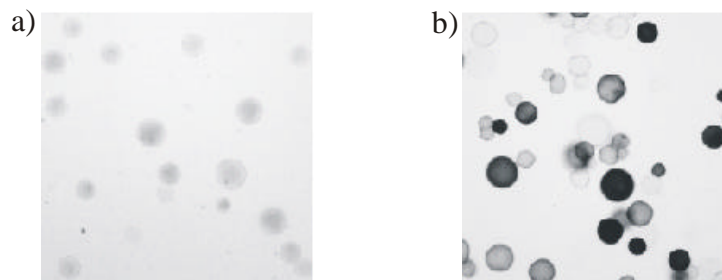


**Abb.67:** Größenausschlußchromatografie des Hämozytenlysatsüberstandes nach Inkubation mit 0,5% Chaps, im Laufpuffer waren 0,25% Chaps enthalten, a) Chromatogramm, b) Fraktionen auf einem Silbergel, b) Fraktionen in der Western-Blot-Analyse inkubiert mit dem Antikörper MS#75 als primärem Antikörper

detektiert. Demnach wurde das gesuchte Protein, welches ein relatives Molekulargewicht von ca. 140 hat, in einer späteren Fraktion erwartet. Bei allen eingesetzten Detergenzien in verschiedenen Konzentrationen fand sich das gesuchte Protein immer in den ersten Fraktionen. Daraus ließ sich schließen, daß keiner der Solubilisierungsversuche zum Erfolg führte (Abb.67).

### 3.6.6 Herstellung einer Affinitätschromatographiesäule mit MS#75

Um eine Kontrolle über den Erfolg der Kopplung des Antikörpers MS#75 an CNBr-aktivierte Sepharose zu haben, wurde in einem Parallelansatz BSA an diese Sepharose gekoppelt. Damit war im Nachhinein ein Nachweis des Antikörpers an den Sepharosekügelchen möglich. Über eine Farbreaktion, ausgelöst durch die alkalische Phosphatase gekoppelt am Anti-Maus-Antikörper, färbten sich die Kügelchen, die mit Antikörper beladen waren, violett.

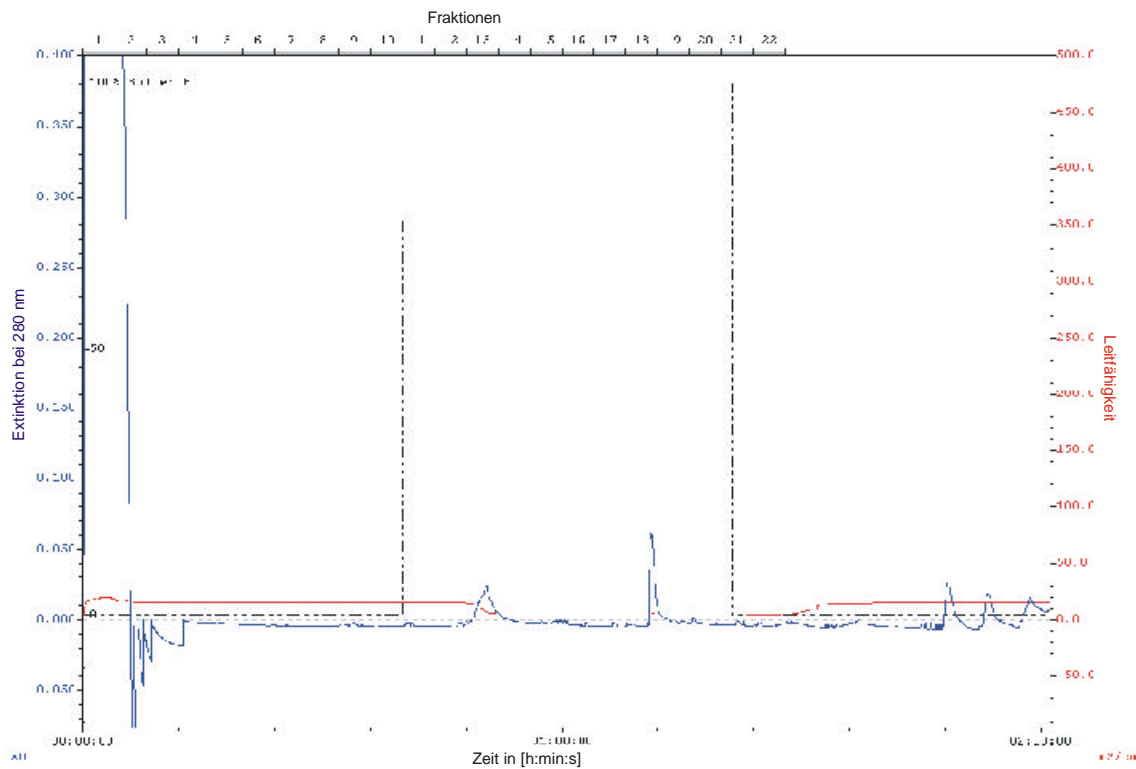


**Abb.68:** Sepharosekügelchen, an die a) BSA und b) der gereinigte Antikörper MS#75 gekoppelt wurde, Nachweis erfolgte über einen Anti-Maus-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase

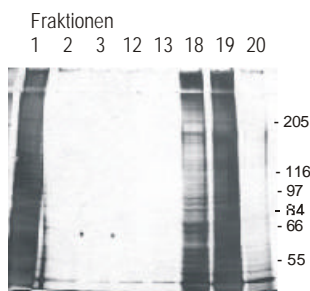
### 3.6.7 Affinitätschromatografie mit der MS#75-Säule

Trotz aller Solubilisierungsschwierigkeiten wurde eine Affinitätschromatografie mit der hergestellten Antikörper-gekoppelten Säulenmatrix durchgeführt. Der verwendete pH-Wechsel ins saure Milieu zum Eluieren des gebundenen Proteins war erfolgreich. Allerdings zeigten sich im Kontrollsilbergel neben dem gesuchten Protein sehr viele Banden. Die eigentlich interessanten Banden konnten nur in der Western-Blot-Analyse eindeutig gezeigt werden (Abb.69).

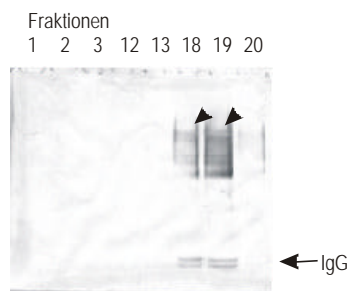
## a) Chromatogramm



## b) Silbergel der Fraktionen



## c) Western-Blot-Analyse der Fraktionen



**Abb.69:** Affinitätschromatografie des Hämozytenlysatüberstandes nach Inkubation mit 0,5% Chaps mit einer mit dem Antikörper MS#75 gekoppelten Sepharosematrix, Elution erfolgte über pH-Shift mit Glycin/HCl-Puffer pH 2,7, ein saurer pH wurde erst ab Fraktion 18 gemessen, a) Chromatogramm, b) Silbergel mit ausgewählten Fraktionen, c) Western-Blot-Analyse mit ausgewählten Fraktionen, inkubiert mit MS#75 als primärem Antikörper

### **3.7 Trennung von Hämozyten über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation**

#### **3.7.1 Trennung von Hämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten**

##### 3.7.1.1 Allgemeine Bemerkungen

In Vorversuchen wurden in Anlehnung an Literaturangaben (MEAD et al. 1986) verschiedene Ausgangsprozentsigkeiten der Percollösung für einen kontinuierlichen Gradienten ausgetestet. Dabei ging es zum einen darum, einen Gradienten zu finden, mit dessen Hilfe sich die Hämozyten eines Tieres in die verschiedenen Hämozytentypen fraktionieren lassen. Auf der anderen Seite sollte das Verhalten der Hämozyten aus den unterschiedlichen Entwicklungsstadien (L5d2 und Pd1) im Dichtegradienten verglichen werden. Letztendlich wurde ein 40%iger kontinuierlicher Percollgradient gewählt.

Die Hämozyten einer Fraktion wurden nach dem Waschen aliquotiert und auf drei Mehrlochobjektträger aufgetragen. Der Vergleich dieser Parallelansätze ergab, daß die Anzahl der Zellen stark variieren konnte. Deshalb war es für das Abschätzen der gesamten Zellverteilung im Gradienten notwendig, die Gesamtzellzahl einer Fraktion aus der Summe aller drei Objektträger zu ermitteln.

Die aus dem Percollgradienten entnommenen Fraktionen á 1 ml enthielten unterschiedliche Mengen an Hämozyten. Eine gewisse Anreicherung war zumindest für die Larvenpräparationen bereits im Zentrifugenröhrchen erkennbar. Diese Fraktionen mit einer hohen Hämozytendichte ergaben in der Auswertung des DHC ein relativ realistisches Bild, d.h. die Summe aller ermittelten DHC-Werte über die drei ausgezählten Objektträger ergab ungefähr 100%. In Fraktionen mit einer geringen Hämozytendichte konnten naturgemäß nur unsichere Daten ermittelt werden. Hierfür die exemplarische Auswertung zweier Fraktionen: Die Fraktion 9 der Puppenpräparation 1 vom 07.04.00 (siehe Anhang 5) enthielt laut Zählung 75% Plasmatozyten auf dem einen Objektträger und 87% granuläre Zellen auf dem anderen Objektträger. Insgesamt standen in dieser Fraktion aber nur 30 Zellen zur Verfügung. In Fraktion 8 der Larvenpräparation 4 vom 21.09.00 (siehe Anhang 5) wurden insgesamt ca. 34.500 Zellen gefunden. Der für diese Fraktion ermittelte DHC aus den unterschiedlichen Objektträgern setzte sich aus 54,5% Plasmatozyten, 35,4% granulären Zellen, 5,4% Oenozytoiden und 3,9% spherulen Zellen zusammen, was als realistisches Bild angenommen werden kann.

Nach Berechnung der Summe aller Zellen, die sich nach der Prozedur auf den Objektträgern befanden, ergab sich für die Larvenpräparationen eine Gesamtzellzahl zwischen  $3,7 \times 10^4$  und  $2,0 \times 10^5$  und für die Puppenpräparationen zwischen  $1,9 \times 10^3$  und  $1,3 \times 10^4$ . Im Vergleich mit der gewonnenen Ausgangsmenge an Hämozyten von ca.  $6,1 \times 10^6$  für L5d2 und  $4,1 \times 10^5$  für P (ermittelt aus dem THC und der gewonnenen Hämolyphmenge; siehe Anhang 1) ist festzustellen, daß mehr als 96% der Zellen durch die verschiedenen Arbeitsschritte verloren gegangen sind. Da dieser enorme Verlust an Zellen schon in den Vorversuchen aufgefallen war, wurden die Waschschrte für die Zellen vor dem Auftragen auf den Percollgradienten und nach dem Abtragen der Fraktionen auf jeweils einen reduziert.

Die Kontrolle über den Verlauf des Gradienten erfolgte in jedem Röhrchen über Markerbeads. Damit konnte festgestellt werden, daß sich der kontinuierliche Dichtegradient ausgehend von einer 40%igen Percolllösung bei den unter 2.8.2 angegebenen Bedingungen für alle Präparationen gleichbleibend und damit reproduzierbar aufbaute.

### 3.7.1.2 Trennung von Larvenhämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten

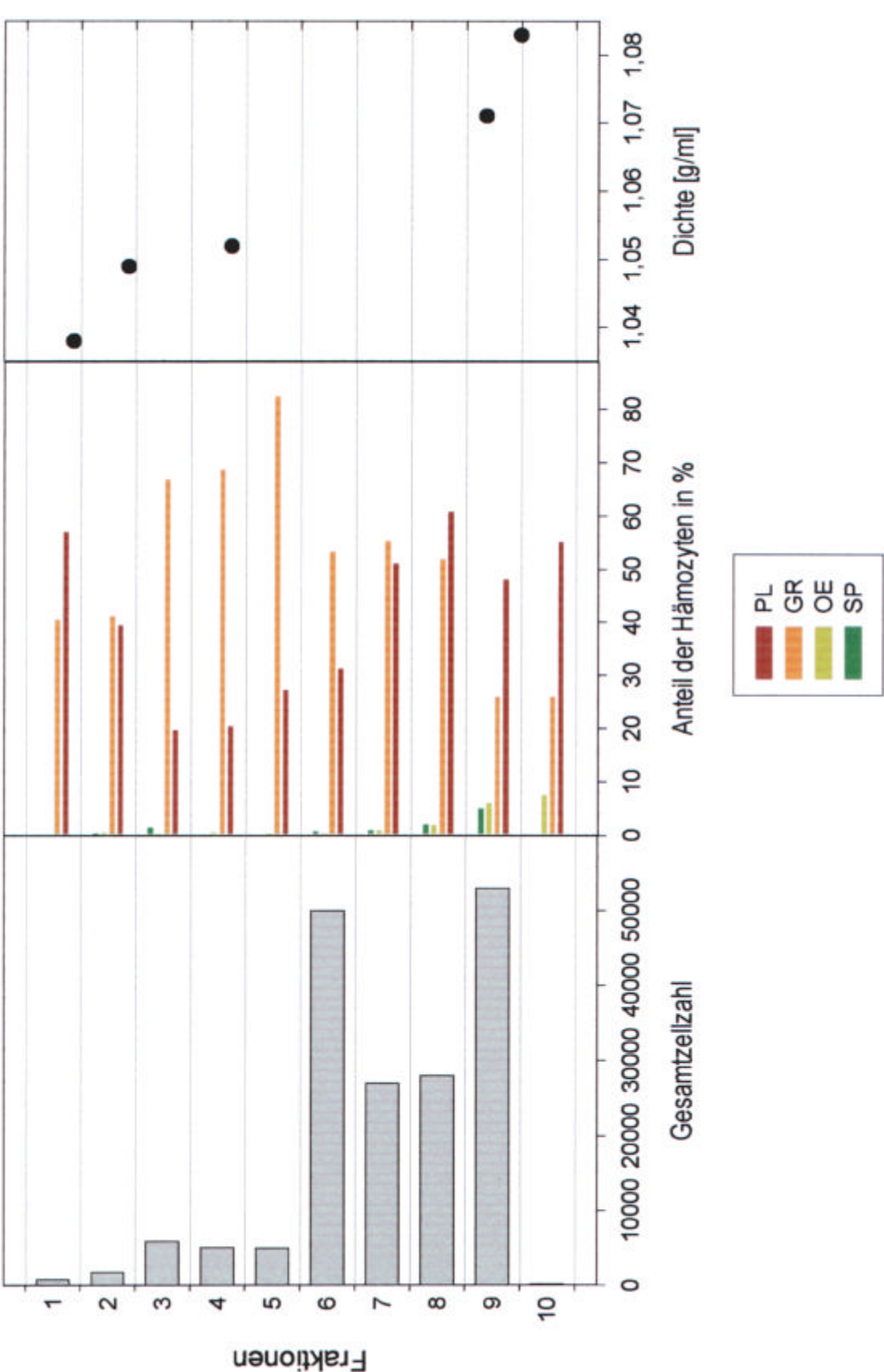
Eine klare Trennung der vier untersuchten Hämozytentypen voneinander gelang über den eingesetzten 40%igen kontinuierlichen Percollgradienten nicht. Allerdings zeigten sich Tendenzen, in welchen Dichtebereichen bestimmte Typen besonders häufig auftraten (Abb.70). Besonders eindeutig war das Verhalten der Oenozytoide und sphärulen Zellen. Beide Zelltypen haben eine vergleichsweise hohe Dichte und fanden sich in den unteren Fraktionen (8 bis 10), wobei die Hauptmenge der sphärulen Zellen oberhalb der der Oenozytoide lag. Plasmatozyten und granuläre Zellen konnten in allen Fraktionen nachgewiesen werden. Granuläre Zellen traten relativ gesehen etwas häufiger im Bereich der Fraktionen 4 und 5 auf. In Fraktion 5 der Präparation 5 vom 05.04.00 wurde sogar eine Reinheit von 97,7% erreicht (siehe Anhang 5). Die Plasmatozyten waren in den Fraktionen 8 und 9 dominant. Die relative Anreicherung dieser Zellen schwankte zwischen 42,9% und 71%. Bezogen auf die Gesamthämozytenzahl in den einzelnen Fraktionen zeigte sich aber, daß sich in den Fraktionen 8 und 9 letztendlich mehr granuläre Zellen befanden als in den Fraktionen 4 und 5.

---

**Abb.70** (S.158): Darstellung der Zelltrennung über einen 40% kontinuierlichen Percolllichtegradienten aus der Larvenpräparation 1 vom 21.09.00 (siehe Anhang 5); a) Gesamtzellzahl in den einzelnen Fraktionen, b) relativer Anteil der einzelnen Hämozytentypen (DHC) in %, rot - Plasmatozyten (PL), orange - granuläre Zellen (GR), gelb - Oenozytoide (OE), grün - sphärule Zellen (SP), c) Verlauf des Dichtegradienten anhand der eingesetzten Markerbeads (Punkte)



Abb.70



Die Fraktionen 8 und 9 enthielten bei allen untersuchten Larven das Gros an Hämozyten. Interessanterweise ergab sich bei drei der sechs Präparationen ein zweiter Peak in der Gesamthämozytenzahl in Fraktion 6, der durch Fraktion 7 mit deutlich weniger Hämozyten gegenüber dem großen Peak abgegrenzt wurde. Diese Fraktion enthielt mehr granuläre Zellen als Plasmatozyten, wie auch die Fraktionen 4 und 5.

In den oberen Fraktionen (1 und 2) blieb die Summe der ermittelten DHC-Werte zumeist deutlich unter 100%. In diesen Fraktionen wurden vereinzelt kleine runde Zellen beobachtet, bei denen es sich um Prohämozyten handeln könnte. Bei diesen Zellen ist anzunehmen, daß sie von keinem der eingesetzten monoklonalen Antikörper markiert werden. Da pro Objektträger nur jeweils ein Antikörper aufgetragen werden konnte, war es nicht möglich, dieser Hypothese nachzugehen.

Eine zusammenfassende Darstellung aller sechs durchgeführten Trennungen ist aufgrund der starken Schwankungen der ermittelten DHC-Werte zwischen den Einzelpräparationen nicht möglich. Exemplarisch ist deshalb die Trennung der Larvenpräparation 1 vom 21.09.00 dargestellt (Abb.70).

### 3.7.1.3 Trennung von Puppenhämozyten über einen kontinuierlichen Percollgradienten

Die Hämozyten der Puppen setzen sich aus zwei Typen zusammen, aus Plasmatozyten und aus granulären Zellen. Diese beiden Zelltypen konnten über einen 40%igen kontinuierlichen Percolldichtegradienten separiert werden. Plasmatozyten traten hauptsächlich in den Fraktionen 2 bis 4 auf, granuläre Zellen waren eher in den Fraktionen 8 bis 10 zu finden. Beide Zellpopulationen waren durch Bereiche mit sehr wenigen Hämozyten voneinander abgrenzbar (hauptsächlich Fraktion 6).

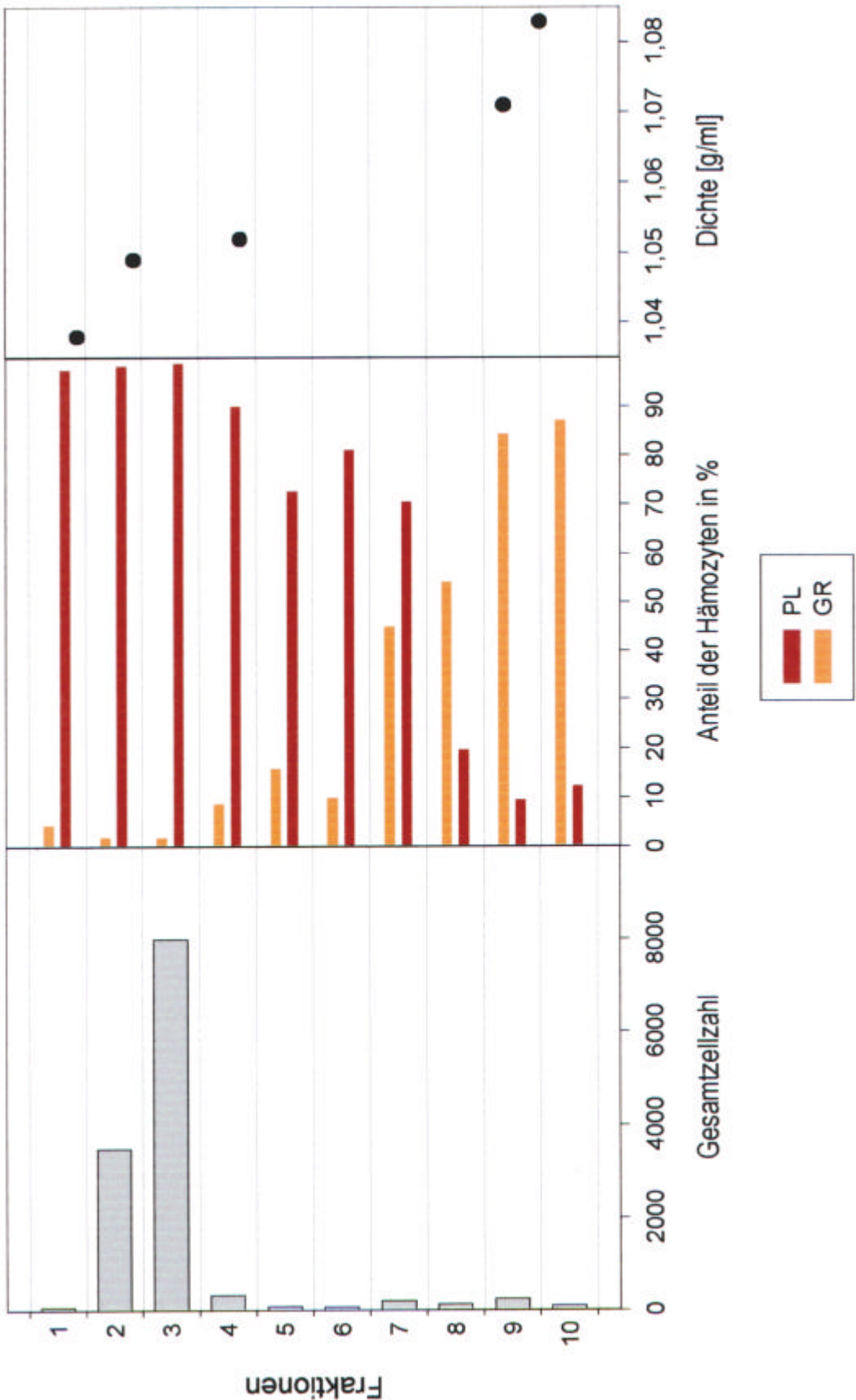
Die meisten Hämozyten waren in Fraktion 3 zu finden und waren hauptsächlich Plasmatozyten. Die Reinheit dieser Zellen lag zwischen 88% und 99%. Die zweite Hämozytenansammlung in Fraktion 9 enthielt dagegen nur wenige Hämozyten, die als granuläre Zellen identifiziert wurden. Die relative Anreicherung schwankte hier zwischen 82% und 100%.

Auch in diesen Experimenten zeigte sich, daß die granulären Zellen der Puppe offensichtlich

---

**Abb.71** (S. 160): Darstellung der Zelltrennung über einen 40% kontinuierlichen Percolldichtegradienten aus der Puppenpräparation 2 vom 07.04.00 (siehe Anhang 5); a) Gesamtzellzahl in den einzelnen Fraktionen, b) relativer Anteil der einzelnen Hämozytentypen (DHC) in %, rot - Plasmatozyten (PL), orange - granuläre Zellen (GR), c) Verlauf des Dichtegradienten anhand der eingesetzten Markerbeads (Punkte)

Abb.71



sehr fragil sind. Oft konnten keine ganzen Zellen mehr ausgemacht werden. So fanden sich in Präparation 1 vom 07.04.00 kaum zählbare granuläre Zellen.

Auf den Objektträgern, auf denen der Peroxidasenachweis zur Identifizierung der Oenozytoide durchgeführt wurde, waren nur vereinzelt Zellen gefärbt und wenn, dann immer in den unteren Fraktionen. Die entsprechend gefärbten Zellen erschienen kleiner als die Oenozytoide der Larven.

In der ersten Fraktion fand sich im Allgemeinen sehr viel "Debris". Vermutlich handelte es sich dabei um Gewebeteile oder koagulierte Hämolympfketzen, die aufgrund ihrer Größe nicht in den Gradienten eindringen konnten.

Eine zusammenfassende Darstellung aller sechs durchgeführten Trennungen ist aufgrund der starken Schwankungen der ermittelten DHC-Werte zwischen den Einzelpräparationen nicht möglich. Exemplarisch ist deshalb die Puppenpräparation 2 vom 07.04.00 dargestellt (Abb.71).

#### 3.7.1.4 Vergleich der Trennungen larvaler und pupaler Hämozyten

Die Hämozyten aus Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) zeigten eine unterschiedliche Verteilung im kontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten. Während die granulären Zellen der Larven über den gesamten Dichtebereich verteilt lagen, konzentrierten sich die granulären Zellen der Puppen in den dichten Bereichen der Fraktionen 8 bis 10. Die Plasmatozyten der Larven befanden sich hauptsächlich in Bereichen hoher Dichte (Fraktionen 8 und 9). Die pupalen Plasmatozyten hatten dagegen eine geringere Dichte und waren in den Fraktionen 2 bis 4 zu finden. Somit lassen sich die Unterschiede zwischen granulären Zellen und Plasmatozyten aus Larven und Puppen, die bereits rein morphologisch sichtbar sind, auch über Dichtegradientenzentrifugation belegen.

### **3.7.2 Trennung von Hämozyten über einen diskontinuierlichen Gradienten**

Aufgrund der Erfahrungen aus der Zelltrennung über einen 40%igen kontinuierlichen Percollgradienten wurde eine Fraktionierung der Larvenhämozyten über einen Gradienten bestehend aus 90%, 45% und 10% Percoll vorgenommen. Damit sollte eine Trennung der oberen kleineren Zellanhäufung mit einem höheren Anteil an granulären Zellen von der unteren größeren Zellansammlung mit einer Anreicherung an Oenozytoiden, sphäkulen Zellen und Plasmatozyten erreicht werden. Nach der Kontrolle über immunhistochemische Analysen

und den Peroxidasenachweis wurde dieser Gradient zur Fraktionierung der Hämozyten für einen nachfolgenden Auftrag in der zweidimensionalen Gelelektrophorese genutzt. Da sich, wie aus den vorhergehenden Versuchen bekannt, die Hämozyten der einzelnen Larven sehr unterschiedlich im Gradienten verteilen können, wurden die Fraktionen jeder Trennung unter dem Mikroskop kontrolliert und die Ansätze mit geringerem Trennerfolg verworfen.

Zur Trennung der Plasmatozyten von den granulären Zellen der Puppen wurde ein diskontinuierlicher Gradient aus 90%, 40% und 10% Percoll eingesetzt, wobei die granulären Zellen an der Phasengrenze zu 90% Percoll und die Plasmatozyten an der Grenze zu 40% Percoll angereichert wurden. Auch hier wurde jede Trennung unter dem Mikroskop kontrolliert, bevor die Zellen für die gelelektrophoretische Auftrennung aufbereitet wurden.

Da besonders die Hämozyten der Puppen sehr fragil waren, wurde die Hämolymphe in späteren Ansätzen direkt aus dem Tier in AC-Saline mit 3,5% Paraformaldehyd getropft.

### **3.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

#### **3.8.1 Allgemeine Bemerkungen**

Das Nadelöhr der zweidimensionalen Gelelektrophorese war die Isoelektrische Fokussierung und die entsprechende Probenaufbereitung für diesen Schritt. Als besonders fatal erwies sich der in der AC-Saline vorhandene Zucker, der keine Fokussierung der Proben zuließ. Auf diese Weise gingen die Proben aus der diskontinuierlichen Percolldichtegradientenzentrifugation der Puppenhämozyten verloren. Im folgenden wurden die zu untersuchenden Zellysate vorher gegen 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 dialysiert.

Die Fokussierung von Proteinen mit einem basischen isoelektrischen Punkt ist im Allgemeinen ohne etliche Vorversuche zur Optimierung nicht möglich. Es wurde versucht Hämozytenlysat in einem Puffergradienten von pH 3-10 unter den angegebenen Standardbedingungen zu fokussieren (siehe 2.9.2). In diesem pH-Gradienten fand keine auswertbare Auftrennung der Proteine statt, selbst im pH-Bereich zwischen 4 und 7 nicht, der in den weiteren Versuchen erfolgreich eingesetzt wurde.

Die Fokussierung hochmolekularer Proteine ist problematisch. Deshalb wurde für die zweite Dimension ein Gradientengel von 12-14% benutzt, weil in diesem Bereich die beste Auflösung zu erwarten war.

#### **3.8.2 Vergleich der Lysate von Larven- und Puppenhämozyten**

Die Proteinspots aus den gelelektrophoretischen Trennungen der Hämozytenlysate von Larven (L5d2) und Puppen (Pd1) glichen sich sehr (Abb.72a, b). Einige Spots wurden dennoch als unterschiedlich identifiziert. Dabei fiel auf, daß im Puppenzellysat im Vergleich zum Larvenzellysat mehr Spots "neu", d.h. typisch für Puppenhämozyten waren, als umgekehrt. Viele Spots besaßen eine unterschiedliche Intensität. Eine Interpretation hierbei ist allerdings problematisch, da sich das Verhältnis von Plasmatozyten zu granulären Zellen von Larve zu Puppe verändert. Sie wurden in den dargestellten Gelen nicht gekennzeichnet. Auffällig war, daß besonders um pH 5 im Puppenhämozytenlysat viele Spots "neu" auftraten. Einige Spots zeigten das typische Bild von Proteinen, die aus mehreren Monomeren bzw. Untereinheiten bestehen. Aufgrund der Intensität der Spots ist anzunehmen, daß es sich dabei um Speicherproteine handelt.

### 3.8.3 Vergleich der Lysate der Larvenhämozyten und der hämatopoietischen Organe

Einige typische Spots aus dem Vergleich von Larven- und Puppenhämozyten fanden sich auch in der Auftrennung der hämatopoietischen Organe aus L5d2 (Abb.72c). Im Larvenhämozytenlysat fanden sich allerdings insgesamt wesentlich mehr Spots (Abb.72a). Nur wenige Spots konnten als typisch für das hämatopoietische Organ angesehen werden. Es konnte keine Häufung der unterschiedlichen Spots in einem bestimmten pH- oder Molekulargewichtsbereich festgestellt werden.

### 3.8.4 Vergleich der Lysate der Hämozytenfraktionen aus dem diskontinuierlichen Percollgradienten

Im diskontinuierlichen Percollgradienten gelang eine Fraktionierung der Hämozyten der Larve (L5d2) in eine Fraktion mit granulären Zellen und Plasmatozyten und eine Fraktion mit granulären Zellen, Plasmatozyten, Oenozytoiden und sphärulen Zellen (siehe 3.7.2). Trotz vorheriger Dialyse war eine Fokussierung der Proben in der ersten Dimension schwierig. Um pH 6 fand die beste Fokussierung statt. In diesem pH-Bereich traten einige Spots hervor, die eindeutige Unterschiede zwischen den beiden Fraktionen darstellten (Abb.73b, c).

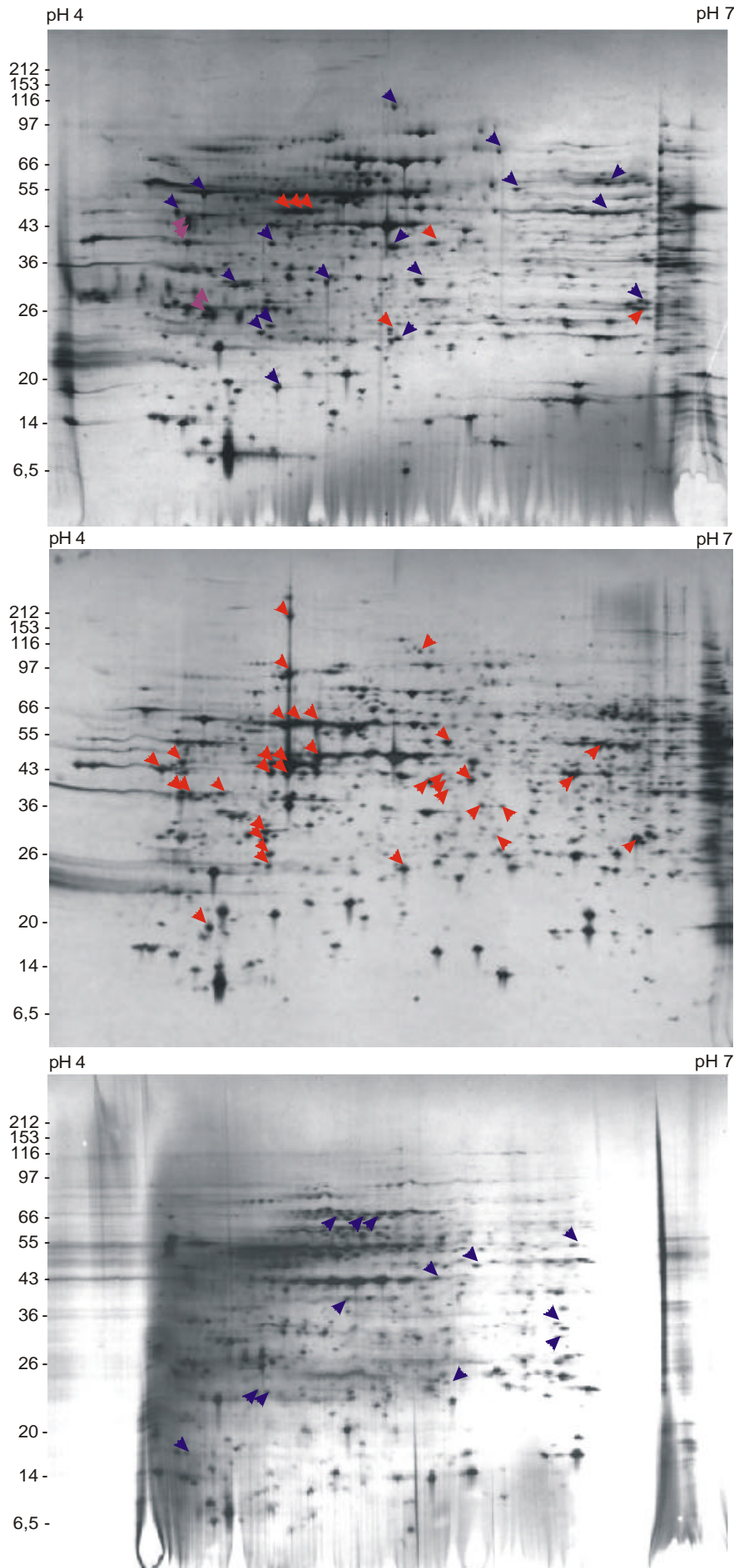
Über einen diskontinuierlichen Percollgradienten gelang die Trennung der granulären Zellen von den Plasmatozyten der Puppe. Leider gelang mit diesen Proben keine Fokussierung in der ersten Dimension. Eine Optimierung dieses Versuchsansatzes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

---

**Abb.72** (S.165): Zweidimensionale Gelelektrophorese verschiedener Proben im Vergleich, pH-Gradient von pH 4-7, Polyacrylamid-Gradient von 12-14%, a) Larvenhämozyten (L5d2), b) Puppenhämozyten (Pd1), c) hämatopoietisches Organ aus L5d2

**Abb.73** (S.166): Zweidimensionale Gelelektrophorese verschiedener Proben im Vergleich, pH-Gradient von pH 4-7, Polyacrylamid-Gradient von 12-14%, a) Larvenhämozyten (L5d2) gesamt, b) Fraktion 1 (GR- granuläre Zellen, PL- Plasmatozyten), c) Fraktion 2 (GR - granuläre Zellen, PL- Plasmatozyten, SP- sphärule Zellen, OE- Oenozytoide,) aus der Trennung von larvalen Hämozyten über einen diskontinuierlichen Percollgradienten (siehe 3.7.2)

Abb.72



a) Larvenhämozyten (L5d2)

b) Puppenhämozyten (Pd1)

c) hämatopoietisches Organ (L5d2)

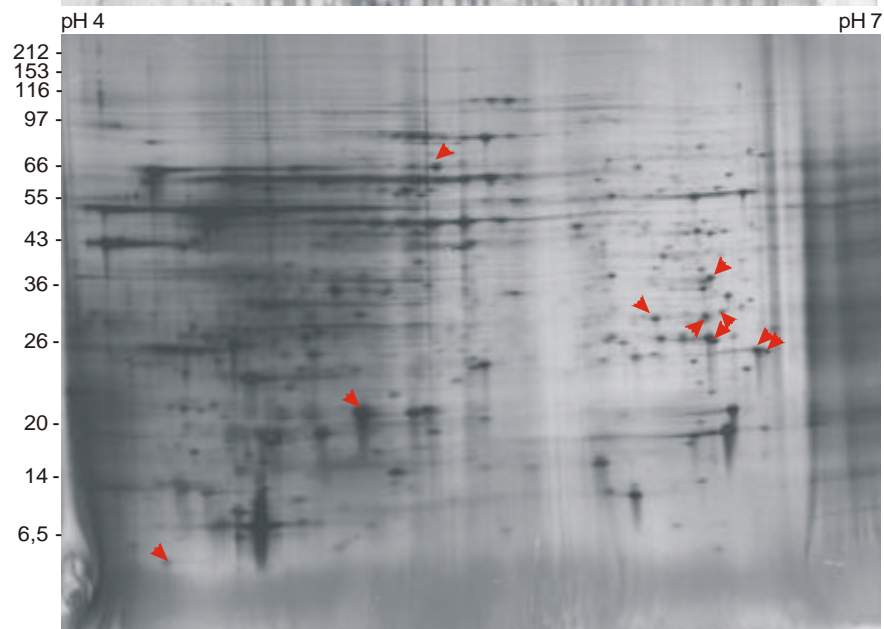
- ▲ markiert Unterschiede zwischen den Larven- und Puppenhämozyten
- ▲ markiert Unterschiede zwischen den Larvenhämozyten und dem larvalen hämatopoietischen Organ
- ▲ markiert Spots, die für Larvenhämozyten typisch sind (im Vergleich zu Puppenhämozyten UND hämatopoietischem Organ)



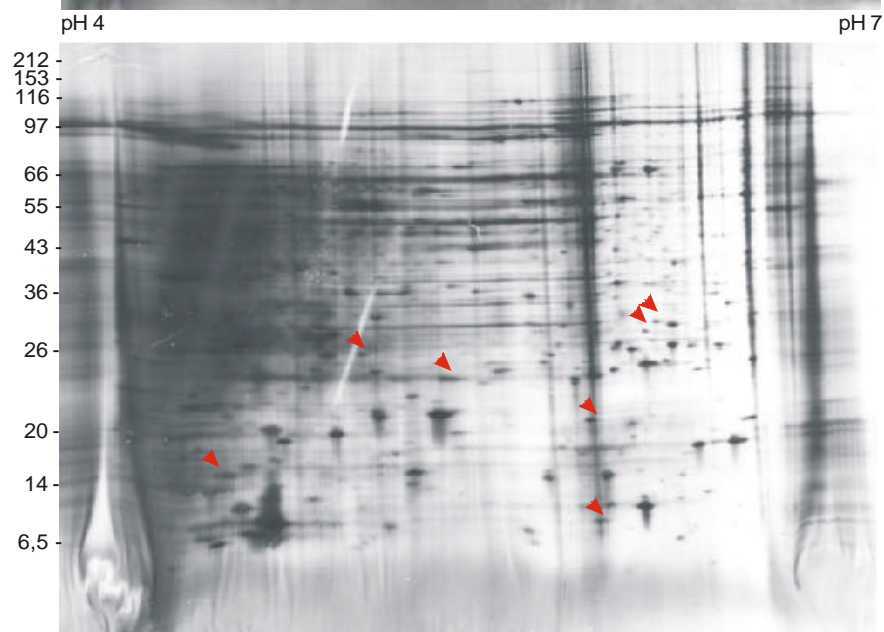
Abb.73



a) Larvenhämozyten (L5d2)



b) Fraktion 1 (GR, PL)



c) Fraktion 2 (GR, PL, SP, OE)

markiert Unterschiede zwischen den Zellfraktionen nach der Trennung über einen diskontinuierlichen Percollgradienten

### **3.9 *In vitro*-Kultivierung von Hämocyten in Anwesenheit von $\beta$ -Ecdyson**

#### **3.9.1 Vorversuche zur *in vitro*-Kultivierung**

Bevor ein Effekt von  $\beta$ -Ecdyson auf die Hämocyten in der *in vitro*-Kultur nachweisbar war, mußte in Vorversuchen der Versuchsansatz optimiert werden. Entscheidend war dabei die Konzentration des  $\beta$ -Ecdysons und die Dichte der Hämocyten in der Kultur.

Ausgehend von Literaturangaben (RIDDIFORD et al. 1979) wurden die Versuche mit einer Ecdysonkonzentration von  $10^{-7}$  M in der Kultur begonnen und entsprechend bis auf  $10^{-5}$  M erhöht. Erst ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  M zeigte sich ein Effekt des  $\beta$ -Ecdysons auf die Hämocyten, der beim Einsatz von  $10^{-5}$  M noch deutlicher zu erkennen war.

Die zweite Komponente, die Dichte der Hämocyten, spielte eine große Rolle, weil sich der  $\beta$ -Ecdysoneffekt vermutlich im inhibierten Migrationsverhalten der Plasmatozyten widerspiegelte. Die Plasmatozyten zeigten nur dann ein deutliche Aggregation, wenn sie in entsprechender Nähe zueinander ausgesät waren. War die Zelldichte zu gering, zeigten diese Zellen keine Bestrebungen, aufeinander zuzuwandern. War die Zelldichte zu hoch, aggregierten die Plasmatozyten unabhängig von der  $\beta$ -Ecdysonkonzentration im Medium. Somit war nicht die Menge des Mediums entscheidend sondern die Fläche, auf die sich die Zellen in der Kultur absetzten.

Interessanterweise ergaben sich für die Kultivierung der Larven- und der Puppenhämocyten unterschiedliche optimale Zellkonzentrationen. Die Puppenplasmatozyten schienen prinzipiell ein größeres Aggregationsbestreben zu besitzen als die Larvenplasmatozyten und spreiteten viel ausgedehnter und flächengreifender. Die Larvenhämocyten wurden entsprechend diesen Beobachtungen in der doppelten Konzentration ausgesät.

Einfluß auf das Aggregationsverhalten der Plasmatozyten hatte auch die Oberfläche des Kulturgefäßes. Auf der Glasoberfläche der Zellkulturobjektträger spreiteten und aggregierten die Plasmatozyten besser als in den 96-Loch-Platten, die aus Plastik bestanden.

Letztendlich gelang die Darstellung des Einflusses von  $\beta$ -Ecdyson auf Hämocyten *in vitro* mit den unter 2.10.2 angegebenen Konzentrationen.

### 3.9.2 Auswertung der *in vitro*-Kultur in den 96-Loch-Platten

In den Kontrollen, die entweder aus Hämocyten in normalem Grace-Insektenmedium oder aus Hämocyten in Medium mit Isopropanol oder Cortison bestanden, zeigten die Plasmatozyten ein starkes Aggregationsbestreben und lagerten sich zu "Zellhaufen" zusammen. In ihrer Form erschienen sie spindelförmig und besonders im Puppenpräparat stark ausgezogen. Durch  $\beta$ -Ecdyson wurde dieses Verhalten offensichtlich inhibiert, denn die Hämocyten erschienen eher flächig, und an der Zusammenlagerung waren eindeutig weniger Zellen beteiligt als in den Vergleichsansätzen. Damit schienen die Zellen im mikroskopischen Bild eher homogener verteilt.

In der 96-Loch-Platte wurde außerdem ein Peroxidasenachweis durchgeführt, um Oenocytoide darzustellen. Bei diesen Zellen konnte kein Einfluß der verschiedenen Kulturbedingungen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich, daß Oenocytoide prinzipiell schwer in der *in vitro*-Kultur zu erhalten waren. Im Allgemeinen waren sie eingefallen, kaputt, oder es ließ sich nur noch die Stelle nachweisen, wo sich die Zelle vor dem Nachweis befand.

### 3.9.3 Auswertung der *in vitro*-Kultur auf den Zellkulturobjektträgern

Die Zellkulturobjektträger wurden für die Auswertung des Einflusses der verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf die Hämocyten mittels verschiedener Fluoreszenzmarkierungen genutzt.

Sowohl bei den Versuchsansätzen mit Larven- als auch denen mit Puppenhämocyten ließ sich mit FITC-markiertem Phalloidin die fibrilläre Ausrichtung des Aktincytoskeletts in den Plasmatozyten darstellen. Dabei war auch zu erkennen, daß die Plasmatozyten an Stellen, an denen sie zusammenstießen, Verbindungen zueinander herstellten, also offensichtlich in Kontakt zueinander standen (Abb.74b). Mit Hilfe des Phalloidins war auch der Effekt des  $\beta$ -Ecdysons im Medium auf das Cytoskelett sichtbar. Während bei Larvenhämocyten in den Kontrollansätzen das Cytoskelett der Plasmatozyten streng ausgerichtet war, konnte in einigen Zellen mit  $\beta$ -Ecdyson im Medium nur eine diffuse Fluoreszenz beobachtet werden, was auf unpolymerisiertes Actin oder ein uneinheitlich ausgerichtetes Cytoskelett hindeutete (Abb.74a). In den Puppenplasmatozyten dagegen war dieser Effekt nicht so ausgeprägt festzustellen. Hier besaßen die Plasmatozyten auch im Ansatz mit  $\beta$ -Ecdyson im Allgemeinen

ein gerichtetem Cytoskelett, wenn auch nicht so breitflächig wie in Kulturen ohne  $\beta$ -Ecdyson. (Abb.75).

Während bei den Larvenpräparaten granuläre Zellen sowohl innerhalb der Zellzusammenlagerungen als auch außerhalb nachgewiesen werden konnten, fiel bei den Puppenpräparaten auf, daß alle granulären Zellen stets innerhalb eines "Zellhaufens" lagen. Jedoch enthielt nicht jedes Aggregat eine granuläre Zelle (Abb.75c).

Mit Hilfe des Zellkernfärbers DAPI war im Übersichtsbild ganz offensichtlich, daß es in den Kontrollansätzen eine Konzentration von Zellen an bestimmten Stellen gab, während in den mit  $\beta$ -Ecdyson behandelten Ansätzen die Verteilung der Zellen eher homogen schien. Interessant war besonders die Beobachtung, daß innerhalb einiger Zellaggregate fragmentierte Zellkerne auftraten, d.h. einige kleine mit DAPI markierte "Punkte" anstelle von großen ovalen Zellkernen (Abb.74c, 75b). Diese Beobachtung wurde besonders bei den mit  $\beta$ -Ecdyson behandelten Larvenhämozyten gemacht. Beim Vergleich der unterschiedlichen Kulturbedingungen für Puppenhämozyten fiel keine Häufung dieses Phänomens auf. Allerdings wurden fragmentierte Zellkerne in allen Puppenpräparationen häufiger beobachtet als in den Larvenhämozytenkontrollansätzen.

---

**Abb.74** (S.170): a) Kultivierung von Larvenhämozyten (L5d2) in Grace-Insektenmedium (Kontrolle) und in Medium mit  $\beta$ -Ecdyson im Vergleich, Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder, grüne Fluoreszenz-Actinfilamente markiert durch Phalloidin-FITC, blaue Fluoreszenz- Zellkerne markiert durch DAPI; b) Larvenhämozyten aus dem Kontrollansatz, Pfeile markieren Kontaktstellen zwischen Plasmatozyten; c) Larvenhämozyten aus dem  $\beta$ -Ecdyson-Ansatz, Pfeil markiert einen fragmentierten Zellkern; Balken entsprechen 10  $\mu$ m

**Abb.75** (S.171): Kultivierung von Puppenhämozyten (Pd1) in Grace-Insektenmedium (Kontrolle) und in Medium mit  $\beta$ -Ecdyson im Vergleich, a) grüne Fluoreszenz- Actinfilamente markiert durch Phalloidin - FITC; b) blaue Fluoreszenz- Zellkerne markiert durch DAPI, Pfeile markieren fragmentierte Zellkerne; c) rote Fluoreszenz- Markierung durch den Marker für granuläre Zellen MS#7 (sekundärer Antikörper mit Cy3 gekoppelt); d) Phasenkontrastbilder; GR - granuläre Zellen, PL - Plasmatozyten

Abb.74

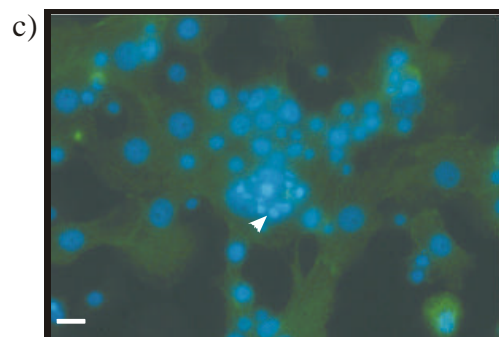
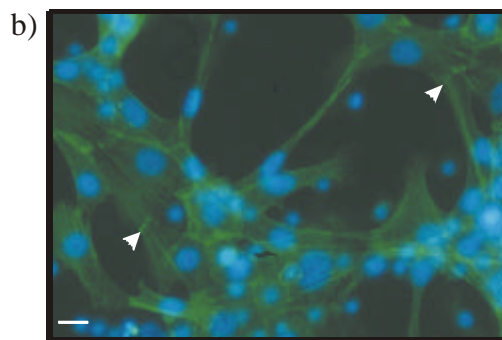
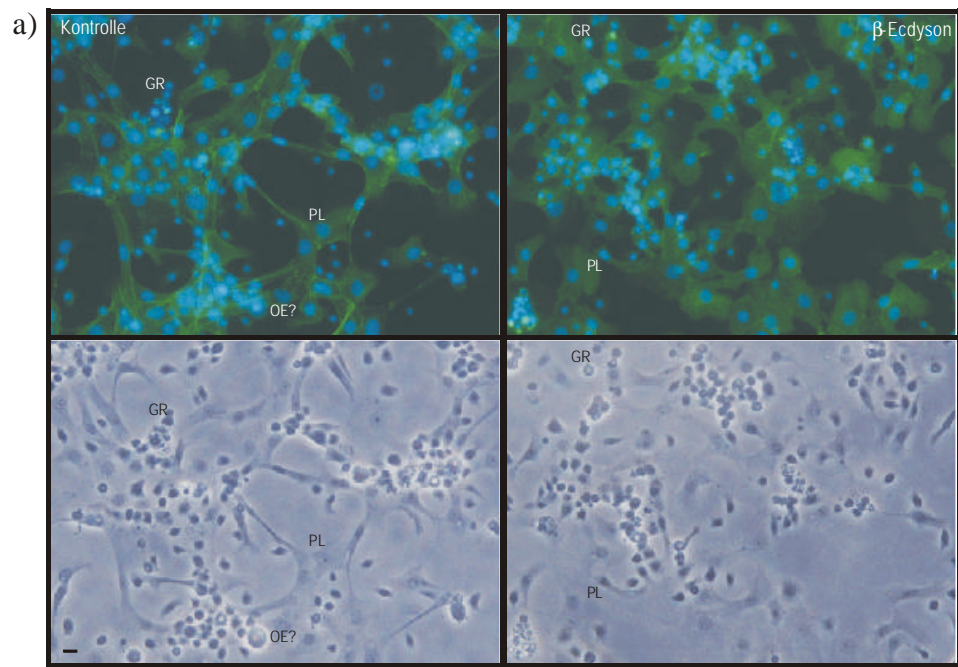
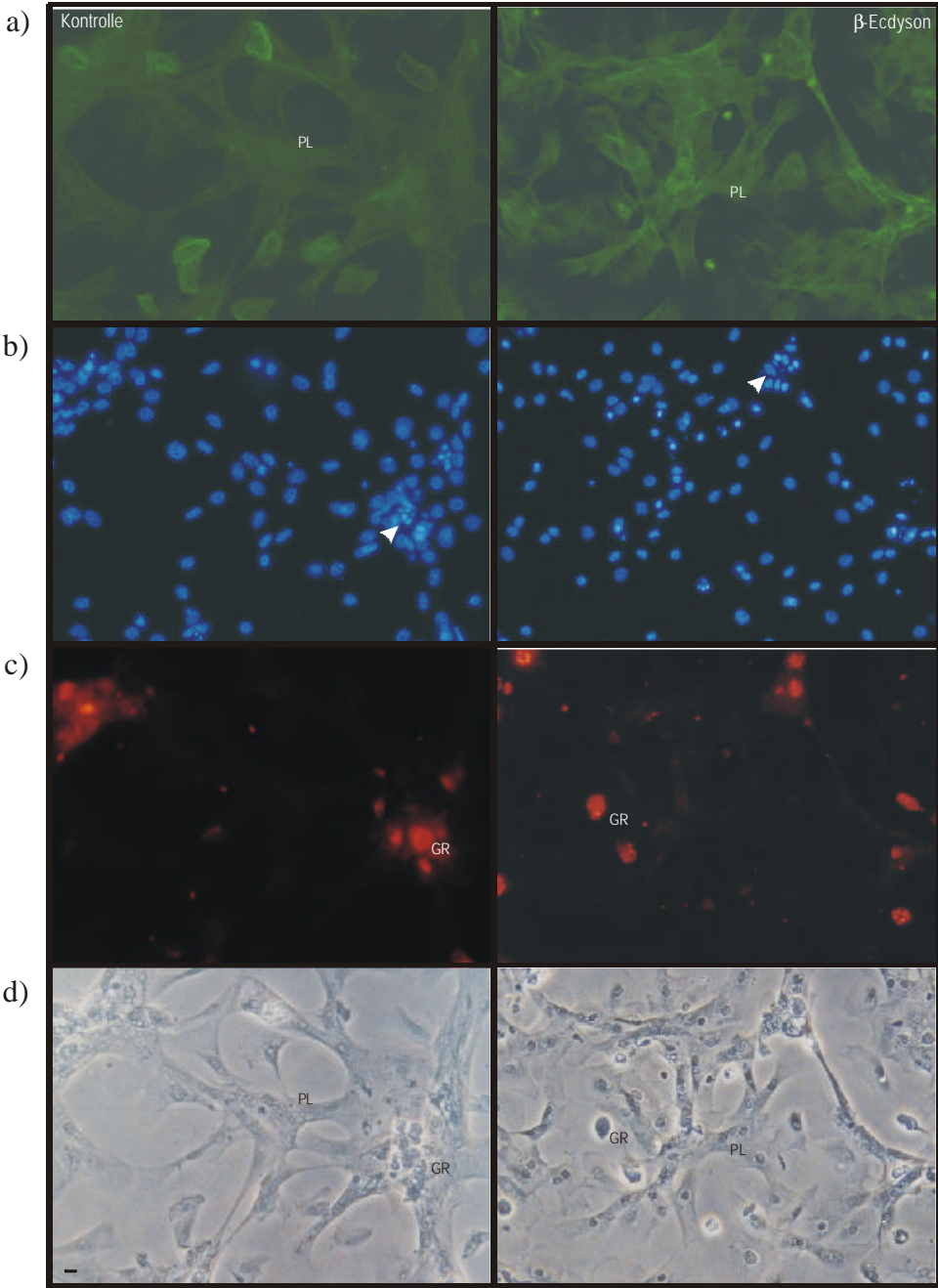


Abb.75



### **3.10 Untersuchungen zur Hämatopoiese im fünften Larvenstadium**

#### **3.10.1 Allgemeine Beobachtungen in Bezug auf das hämatopoietische Organ**

Jede Larve von *M. sexta* besitzt vier hämatopoietische Organe, die sich wie ein Handschuh um die jeweilige Flügelanlage legen. Bei den ersten Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop konnte kein Unterschied in Aufbau und Struktur der vier Organe festgestellt werden. Jedes Organ besteht aus mehreren Loben, die jeweils um einen Tracheenast angeordnet sind. Dieser Ast verzweigt sich innerhalb des jeweiligen Lobus (Abb.76a). Die Zellen innerhalb der Loben schienen sich morphologisch nicht zu unterscheiden. Sie bilden keinen Gewebeverband sondern lagern locker assoziiert zusammen und werden von einer äußeren Hülle, vermutlich nur aus Basallamina bestehend, zusammengehalten (Abb.76b, c). Durch Quetschen konnte diese Hülle zerstört werden. Die Hämozyten flossen dann aus den Loben heraus. Bei genauer Beobachtung konnten dann verschiedene Hämozytenformen unterschieden werden, zum einen spindelförmige Zellen, vermutlich Plasmatozyten, und zum anderen mehr ovoide Zellen, bei denen es sich um Prohämozyten handeln könnte.

Im elektronenmikroskopischen Bild bestätigte sich die Beobachtung, daß sich mindestens zwei verschiedene Zelltypen im hämatopoietischen Organ befinden. Sie stellten sich hier als stark und schwach kontrastierte Zellen dar (Abb.76b). Die stark kontrastierten Zellen ähnelten in ihrer Struktur sehr den larvalen frei flottierenden Plasmatozyten. Ab und zu konnten Einschlüsse bei diesen Zellen beobachtet werden.

Mit Hilfe von Serienschnitten eines vorderen hämatopoietischen Organs sollte die Struktur des Organs näher untersucht werden. Auf diesem Wege war die Untergliederung der einzelnen Loben in weitere kleinere Loben bzw. in zu "Inseln" zusammengelagerten Hämozyten sichtbar, ein Unterschied im Aufbau der Loben fand sich allerdings nicht.

Auf den Kryoschnitten und darüberhinaus auf *whole mount*-Präparaten wurde mit verschiedenen zur Verfügung stehenden Markerantikörpern (für granuläre Zellen MS#7, für Plasmatozyten MS#13 und MS#75) die Zugehörigkeit der Zellen innerhalb des hämatopoietischen Organs untersucht. Interessant war dabei, daß beide eingesetzten Plasmatozytenmarker im Prinzip alle Zellen innerhalb der Loben markierten (Abb.76d). Granuläre Zellen konnten dagegen nur an der äußeren und inneren Peripherie des Organs und zusätzlich innerhalb der Flügelanlage nachgewiesen werden.

Zur Darstellung von Oenozytoiden wurde der Nachweis der Peroxidaseaktivität durchgeführt. Innerhalb der Loben konnte keine Zelle dieses Zelltyps nachgewiesen werden. Zellen, die

evtl. Oenozytoide waren, fanden sich als braun gefärbte Zellen an den großen Tracheenästen, die zum hämatopoietischen Organ bzw. zur Flügelanlage führten (nicht dargestellt).

### 3.10.2 Nachweis der Zellteilungsaktivität in den hämatopoietischen Organen und frei flottierenden Hämozyten

Mit dem Antikörper gegen Phospho-Histon H3 stand ein Marker für die mitotische Aktivität von Zellen zur Verfügung. Er wurde in Kombination mit Hämozytenmarkern auf Präparaten frei flottierender Hämozyten und des hämatopoietischen Organs angewendet.

Beim Einsatz des Anti-Phospho-Histon H3-Antikörpers auf Kryoschnitten des hämatopoietischen Organs waren die Zellkerne verhältnismäßig vieler Zellen markiert. Dabei war die Verteilung der markierten Zellkerne homogen, es gab keine Häufung mitotisch aktiver Zellen im Inneren oder der Peripherie des Organs. In Kombination mit dem Plasmatozytenmarker MS#75 und dem Marker für granuläre Zellen MS#7 wurde eine Markierung der mitotisch aktiven Zellen mit MS#75 beobachtet, was auf eine Zuordnung dieser Zellen zu den Plasmatozyten hindeutet (Abb.76d).

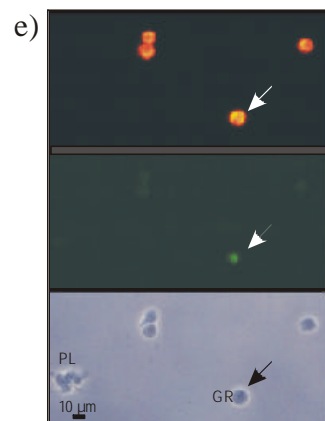
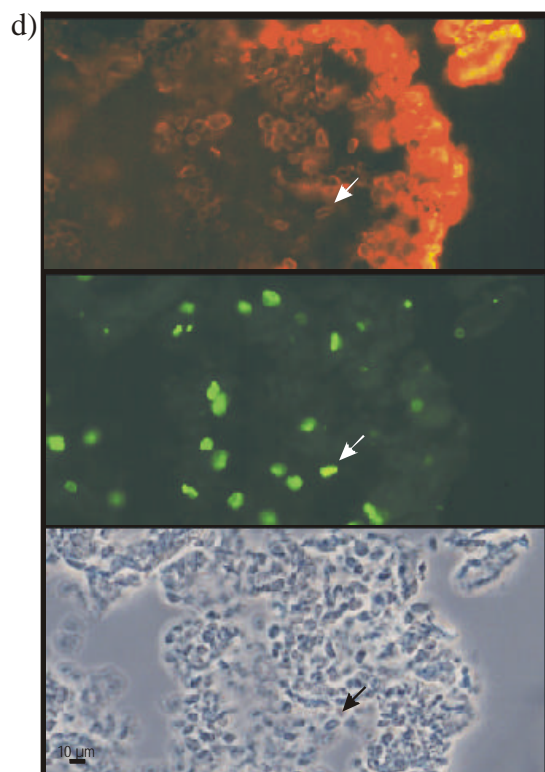
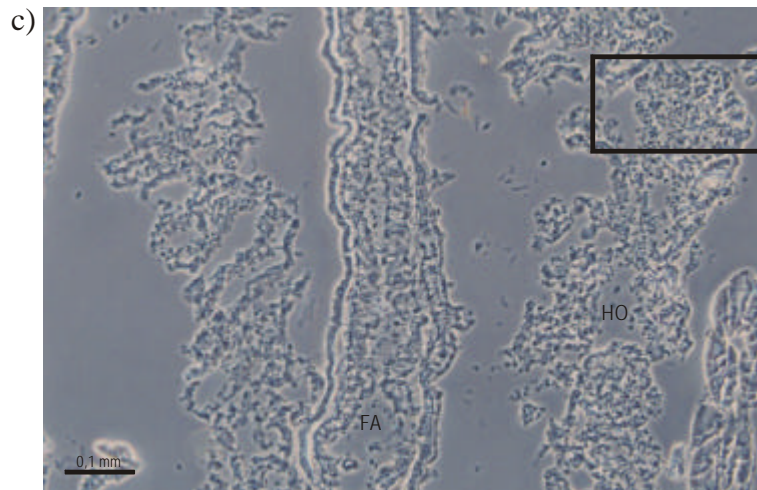
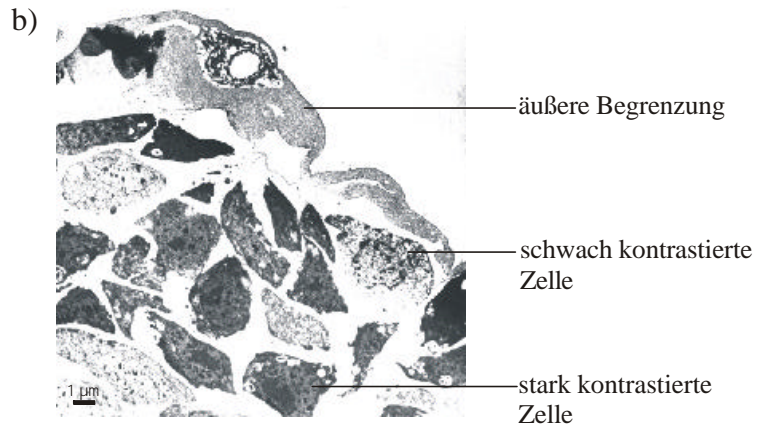
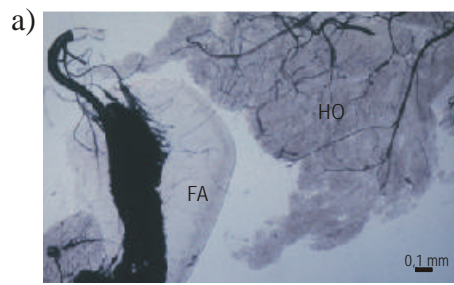
Auf den Hämozytenpräparaten gestaltete sich ein Nachweis der mitotisch aktiven Zellen mit dem Anti-Phospho-Histon H3-Antikörper schwierig. Der Antikörper markierte im Prinzip alle Zellkerne allerdings in unterschiedlicher Intensität. Nach intensivem Beobachten wurden die Zellen, deren Zellkern außer der Fluoreszenzmarkierung auch eine Strukturierung (Chromatinkondensation) zeigten, als mitotisch aktiv angesehen. Demnach waren unter den frei flottierenden Zellen vor allem die granulären Zellen in Teilung begriffen (Abb.76e). Plasmatozyten wurden nur selten, Oenozytoide oder sphärule Zellen nie mit einem markierten Zellkern detektiert. Die Auswertung erfolgte lediglich qualitativ und nicht quantitativ.

---

**Abb.76** (S.174): a-d) Hämatopoietisches Organ aus L5d2, a) *whole mount*-Präparat, Flügelanlage (FA) und hämatopoietisches Organ (HO) wurden auseinander gezogen, b) Außenkante des hämatopoietischen Organs, elektronenmikroskopisches Bild, c) Querschnitt des hämatopoietischen Organs (HO) um die Flügelanlage (FA), markierter Kasten kennzeichnet den Ausschnitt d, d) immunhistochemische Untersuchungen am hämatopoietischen Organ: rote Fluoreszenz- Markierung mit dem Antikörper MS#75 (Plasmatozyten), grüne Fluoreszenz- Markierung mit dem Anti-Phospho-Histon H3-Antikörper (mitotisch aktive Zellen), Pfeil kennzeichnet eine Zelle mit beiden Markierungen e) immunhistochemische Untersuchungen an frei flottierenden Hämozyten: rote Fluoreszenz- Markierung mit dem Antikörper MS#7 (GR - granuläre Zellen, PL - Plasmatozyt), grüne Fluoreszenz- Markierung mit dem Anti-Phospho-Histon H3-Antikörper (mitotisch aktive Zellen), Pfeil kennzeichnet eine Zelle mit beiden Markierungen



Abb.76



## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeine Beobachtungen zu Hämozyten von Larven und Puppen

#### 4.1.1 Licht- und elektronenmikroskopischer Vergleich der Hämozyten von Larven und Puppen

Schon in den ersten Forschungsarbeiten über Insektenhämozyten wurde eine Klassifizierung der Zellen auf der Basis von lichtmikroskopischen Beobachtungen versucht (Zusammenfassung siehe JONES 1962). Auf diesem Wege wurde allerdings keine einheitliche Nomenklatur erreicht, da sich die Zellen in ihrer äußeren Gestalt nicht nur von Spezies zu Spezies unterscheiden, sondern teilweise von Tier zu Tier einer Spezies, je nachdem, Tiere welchen Alters für die Untersuchungen eingesetzt wurden oder unter welchen Bedingungen die Zellen gewonnen wurden. Durch den Einsatz der Transmissionselektronenmikroskopie stellte sich heraus, daß sich zumindest für die Lepidoptera fünf grundsätzliche Hämozytentypen unterscheiden lassen, die im Wesentlichen der von GUPTA (1979) und ROWLEY und RATCLIFFE (1981) vorgeschlagenen Nomenklatur entsprechen: Prohämozyten, Plasmatozyten, granuläre Zellen, Oenozytoide und sphärule Zellen.

Beim Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der larvalen Hämozyten der verschiedenen untersuchten Lepidopteraspezies lassen sich immer wiederkehrende markante Eigenschaften der verschiedenen Zelltypen erkennen, die bei den eigenen Untersuchungen eine schnelle und eindeutige Identifizierung von Plasmatozyten, granulären Zellen, Oenozytoiden und sphärule Zellen im Elektronenmikroskop ermöglichten (*Hyalophora cecropia* - LEA & GILBERT 1966, *Bombyx mori* - AKAI & SATO 1973, *Calpodex ethlius* - LAI-FOOK 1973, *Galleria mellonella* - NEUWIRTH 1973, *Antheraea pernyi* - BEAULATON & MONPEYSSIN 1976, 1977, *Manduca sexta* - HOROHOV & DUNN 1982, *Pseudoplusia includens* - STRAND & JOHNSON 1996). Problematisch war lediglich die Identifizierung der Prohämozyten (siehe auch STRAND & JOHNSON 1996). Diese Zellen werden als Vorläufer- oder Stammzellen einiger oder aller anderen Hämozytentypen diskutiert. Daher ist es anzunehmen, daß sich Zellen dieses Types hauptsächlich in den Loben des hämatopoietischen Organs befinden und nur selten frei flottierend in der Hämolymphe anzutreffen sind (siehe auch JONES 1967, AKAI & SATO 1971, NEUWIRTH 1973, BREHELIN et al. 1978, GARDINER & STRAND 2000, siehe 4.10).

Zur Ultrastruktur der Puppenhämozyten der Lepidoptera lagen lediglich zwei Arbeiten vor (ABU-HAKIMA & FAYE 1981, NARDI et al. 2001). In beiden Arbeiten konzentrierten sich die Autoren auf die granulären Zellen, die besonders viele Vesikel enthielten, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Vergleichende Arbeiten zur Morphologie der Larven- und Puppenhämozyten gibt es kaum (siehe unten).

Der rein morphologische Vergleich der larvalen und pupalen Hämozyten von *M. sexta* im Licht- und Elektronenmikroskop in der vorliegenden Arbeit führte zu drei wesentlichen Aussagen:

1) Ein Unterschied zwischen den larvalen und pupalen Plasmatozyten ließ sich vor allem im Verhalten der Zellen feststellen. Für die lichtmikroskopische Beobachtung wurden die gewaschenen Zellen in Grace-Insektenmedium auf einen Glasobjektträger gebracht. Die Plasmatozyten hefteten sich in dieser Umgebung aktiv an das Glas und nahmen somit die typische gespreitete Form an, wobei sich die Zellen der Puppen wesentlich intensiver spreiteten und damit größer als die Zellen der Larven erschienen. GARDINER und STRAND (1999) dokumentierten ebenfalls eine Zunahme der Spreitungsaktivität der Plasmatozyten im Verlauf des letzten Larvenstadiums von *Pseudoplusia includens*. Ähnliche Beobachtungen konnten von LANOT und Mitarbeitern (2001) an *Drosophila*-Plasmatozyten gemacht werden. Durch Zugabe von  $\beta$ -Ecdyson zu larvalen Hämozyten konnten sie diesen Effekt sogar auslösen.

Für die elektronenmikroskopischen Präparate wurden die Hämozyten direkt aus dem Tier in eine Lösung mit Fixativ aufgenommen. Die Plasmatozyten behielten ihre spindelförmige Gestalt, in der diese Zellen auch in Larven- und Puppenquerschnitten zu finden waren. Unter diesen Bedingungen konnten im Elektronenmikroskop keine wesentlichen Unterschiede zwischen larvalen und pupalen Plasmatozyten festgestellt werden. ASHHURST und RICHARDS (1964) kamen aufgrund ihrer cytochemischen Untersuchungen an Hämozyten von *Galleria mellonella* zu derselben Aussage.

2) Die granulären Zellen der Larven unterschieden sich rein morphologisch erheblich von den granulären Zellen der Puppen. Zu Beginn des letzten Larvenstadiums wiesen diese Zellen neben einem scharf abgegrenzten Nucleolus im Zellkern sehr viel endoplasmatisches Retikulum auf, das sich teilweise zu Zisternen erweiterte. Dies alles deutet auf eine sehr hohe proteinsynthetische Aktivität hin. Ob sich die Produkte dieser Proteinsynthese letztendlich in einigen oder allen Granulen wiederfinden und damit evtl. den beobachteten fibrillären

Strukturen entsprechen, wurde nicht untersucht. Es ist anzunehmen, daß sich die granulären Zellen im Verlauf des letzten Larvenstadiums zu den entsprechenden pupalen granulären Zellen entwickeln, da sich schon im Larvenpräparat granuläre Zellen mit unterschiedlich vielen und verschieden elektronendichten Granulen befanden (siehe auch AKAI & SATO 1973). Die pupalen granulären Zellen zeigten kaum Zeichen von Syntheseaktivität. Sie waren reichlich mit Granulen angefüllt. Veränderungen an den granulären Zellen in *Galleria mellonella* konnten mit Hilfe von cytochemischen Untersuchungen manifestiert werden (ASHHURST & RICHARDS 1964, CHAIN & ANDERSON 1983). Dabei wurde festgestellt, daß die Größe der granulären Zellen, die Anzahl der Lysosomen, die Aktivität der lysosomalen Enzyme und die Größe der Lipidtropfen in den Granulen im Verlauf des letzten Larvenstadiums zunimmt. Ähnliche Aussagen finden sich bei LAI-FOOK (1973) für die Zellen von *Calpodes ethlius*.

3) Oenozytoide und sphärule Zellen waren unter den Hämocyten der Puppen von *M. sexta* sehr selten oder gar nicht zu finden. Diese Tatsache wurde bereits in einigen Arbeiten erwähnt, aber nie genauer untersucht. HOLTHUSEN (1999) konnte den Zeitpunkt des Verschwindens dieser beiden Zelltypen zeitlich determinieren. Er fällt mit dem "epidermal commitment peak" des  $\beta$ -Ecdysons zusammen, der als Startpunkt der Metamorphose angesehen wird (siehe auch BOLLENBACHER et al. 1981, WOLFGANG & RIDDIFORD 1986).

Der feine granuläre Inhalt der auffällig großen Sphärulen der sphärulen Zellen scheint löslich zu sein, denn diese Sphärulen waren im Elektronenmikroskop meist leer oder sehr "flockig" (siehe auch HOROHOV & DUNN 1982). Eine solche Struktur konnte in den Granulen der granulären Zellen nie beobachtet werden. Damit ist ein funktioneller Unterschied dieser beiden Zelltypen schon aus rein morphologischer Sicht anzunehmen.

Die Oenozytoide haben im Vergleich zu den anderen Hämocytentypen auffällig wenige Mitochondrien und Granulen. Ribosomen liegen hauptsächlich frei und nur selten assoziiert an das endoplasmatische Retikulum vor. Die starke Chromatinkondensation und der scharf abgegrenzte Nucleolus weisen auf eine hohe proteinsynthetische Aktivität hin. Diese Zellen sind der Synthesort der Prophenoloxidase, des Schlüsselenzyms für die Melanisierungsreaktion (IWAMA & ASHIDA 1986, ASHIDA & BREY 1995). Die Prophenoloxidase wird ohne Signalpeptid translatiert und gelangt demnach nicht über den für sekretorische Proteine üblichen Weg über das rauhe endoplasmatische Retikulum, Vesikeltransport und Exocytose in die Hämolymphe (JIANG et al. 1997b). Das elektronenmikroskopische Bild unterstützt diese Beobachtungen. Die entsprechenden Strukturen konnten nicht bzw. selten beobachtet werden.

AKAI und SATO (1973) beschrieben für die Oenozytoide von *Bombyx mori* konzentrische Ringe aus feinen fibrillären Strukturen um den Zellkern. Diese Strukturen fanden sich in den hier untersuchten Oenozytoiden nicht. Sie ähnelten mehr den Beschreibungen anderer Autoren (z.B. HOROHOV & DUNN 1982).

Leider fanden nach der Arbeit von BREHELIN und Mitarbeitern (1978) keine vergleichenden Untersuchungen in Bezug auf die Hämozyten über die Familiengrenzen hinweg statt. Die dort vorgeschlagene übergreifende Nomenklatur kann nach dem heutigen Wissensstand nicht übernommen werden. Dennoch sei bemerkt, daß eine Reihe von Untersuchungen bei anderen Insektenarten die Veränderungen der Hämozytenmorphologie in der Entwicklung dokumentieren (z.B. *Calliphora erythrocephala* - CROSSLEY 1964, ZACHARY & HOFFMANN 1973, *Sarcophaga bullata*- WHITTEN 1964, *D. melanogaster* - SHRESTHA & GATEFF 1982a).

#### 4.1.2 Bestimmung von THC und DHC

Aus ersten Beobachtungen ging hervor, daß sich im Verlauf des letzten Larvenstadiums von *M. sexta* zum einen die Anzahl der Hämozyten und zum anderen die Zusammensetzung der Hämozytenpopulation in der Hämolymphe ändert. Um diese Veränderungen quantitativ zu erfassen, wurden der THC ("total hemocyte count", entspr. Zelltiter) und der DHC ("differential hemocyte count", entspr. differentiellen Titer) bestimmt. Diese ersten Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Diplomarbeit von T. K. Holthusen (1999): "Veränderung des Hämozytenbildes von *Manduca sexta* im Verlauf der Metamorphose".

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Untersuchungen aus der Diplomarbeit können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Während sich die Anzahl der granulären Zellen und der Plasmatozyten zu Beginn des fünften Larvenstadiums vom Verhältnis noch ungefähr die Waage hielten, befanden sich frei flottierend in der Puppenhämolymphe hauptsächlich Plasmatozyten.
- Oenozytoide und sphärule Zellen waren in der Hämolymphe der Puppen kaum oder gar nicht vorhanden. Dieses Phänomen konnte bereits mit Beginn des Wanderstadiums beobachtet werden.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß sich die Hämozytenzahlen entsprechend den Häutungszyklen der Lepidopteralarven verändern (*Bombyx mori* - NITTONO 1960, *Galleria mellonella* - SHAPIRO 1979, *Hyalophora cecropia* - TRENCZEK, unveröffentlichte Daten, *Pseudoplusia includens* - GARDINER & STRAND 2000). So wird allgemein beschrieben, daß sich der THC vor der Ecdysis erhöht und kurz danach abfällt, um dann bis zum nächsten

Häutungszyklus wieder anzusteigen (Zusammenfassung siehe JONES 1962). Dies konnte auch in den hier vorgestellten Untersuchungen bei *M. sexta* gezeigt werden. Der Abfall des Zelltiters bis zum Beginn des Wanderstadiums (und vermutlich auch die stark sinkenden Titer nach den Häutungen allgemein) beruht nicht auf einem Rückgang der absoluten Zellzahlen, wie durch die Kalkulation der THCg-Werte sichtbar wird, sondern auf der Zunahme des Hämolympfvolumens (siehe Anhang 1). Mit Beginn des Wanderstadiums scheiden die Tiere über Speicheldrüsen und Darm viel Flüssigkeit aus, die über den gesamten Körper verteilt wird. Diese Substanz soll den Larven helfen, sich in die Erde zu bohren, um sich dort zu verpuppen (REINECKE et al. 1980, JOESTEN et al. 1982). Es ist vorstellbar, daß die Hämolymphe als Wasserreservoir dient (CHAPMAN 1998), denn mit Beginn des Wanderstadiums nahm das Volumen der Hämolymphe ab (siehe Anhang 1). Obwohl die Konzentration der Hämocyten (THC) bis zur Präpuppenphase wieder geringfügig anstieg, weisen die berechneten THCg-Werte auf einen stetigen Rückgang der Gesamthämocytenzahl hin. In den frühen Puppen waren nur noch sehr wenige Zellen (relativ und absolut) frei flottierend zu finden.

Zur Bestimmung des DHC in Lepidopteren liegen nur wenige Arbeiten vor (*Bombyx mori* - NITTONO 1960, *Euxoa declarata* - ARNOLD & HINKS 1976, 1983, *Pseudoplusia includens* - GARDINER & STRAND 2000). Das Verschwinden der Oenocytoide und sphäkulen Zellen während des letzten Larvenstadiums werden durch diese Arbeiten bestätigt. Allerdings scheint die Veränderung des Verhältnisses zwischen Plasmatozyten und granulären Zellen in *M. sexta* einmalig zu sein. Während bei *M. sexta* der Anteil der granulären Zellen am Anfang und der Anteil der Plasmatozyten am Ende des letzten Larvenstadiums am höchsten waren, nimmt bei den anderen Lepidopteraspezies der Anteil der granulären Zellen bis zur Larval-Pupal-Häutung zu. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß lediglich die frei flottierenden Hämocyten gezählt wurden. Wie vor allem in den Puppenquerschnitten zu sehen war, waren die granulären Zellen an Muskeln und Fettkörper angelagert. Es ist anzunehmen, daß sie dort an der Umgestaltung des Gewebes mitwirken (siehe 4.2.2).

Für die eigenen Untersuchungen wurden nur Tiere bis zum Stadium Pd1 eingesetzt. Aus der Arbeit von NARDI und Mitarbeitern (2001) geht hervor, daß die Population der frei flottierenden granulären Zellen in *M. sexta* nach dem zweiten Tag der Puppenphase wieder zunimmt. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Adultentwicklung.

HOLTHUSEN (1999) nutzte die Hämolymphe eines Tieres für mehrere Untersuchungen, u.a. auch für die Bestimmung des Gehaltes an Ecdysonäquivalenten. Die direkte Korrelation von Hämocyten- mit Ecdysonwerten zeigte, daß vor allem der "epidermal commitment peak" des

$\beta$ -Ecdysons im Zusammenhang mit wesentlichen Veränderungen an und in den Hämocyten gesehen werden kann. Ob  $\beta$ -Ecdyson einen direkten Einfluß auf die Blutzellen hat oder ob die Veränderungen der Hämocyten eine Reaktion auf die Veränderungen im Gesamtorganismus sind, konnte von ihr nicht geklärt werden. Die Injektion von  $\beta$ -Ecdyson in Larven des Alters L5d2, um diesen Peak vorfristig zu simulieren, ergab keine Veränderungen im Hämocytenbild. Aufgrund des schwierigen experimentellen Designs für einen *in vivo*-Versuch entstand die Idee, die Hämocyten *in vitro* mit  $\beta$ -Ecdyson zu versetzen (siehe 4.9).

## **4.2 Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper an Hämocyten von Larven und Puppen**

### **4.2.1 Screening der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT et al. (1994)**

Für die vorliegende Arbeit standen Antikörper gegen Hämocyten von *M. sexta* fast aller Klone aus der Fusion von WILLOTT und Mitarbeitern (1994) zur Verfügung (siehe auch TRENCZEK et al. 1998).

Ein ähnlich umfangreiches und in seiner Heterogenität vergleichbares Set an monoklonalen Antikörpern zur Charakterisierung larvaler Lepidoptera-Hämocyten existiert lediglich in der Arbeitsgruppe um M.R. Strand, generiert gegen Hämocyten von *Pseudoplusia includens* (STRAND & JOHNSON 1996). Letztendlich ist ein Vergleich der eigenen Ergebnisse nur mit Arbeiten dieser und der eigenen Gruppe bzw. Arbeiten von Kooperationspartnern möglich.

Ein Vergleich der Bindungseigenschaften der Antikörper ist in Tabelle 5 zusammengefaßt. Folgendes fiel bei diesem Vergleich besonders auf:

- Antikörper, die nur einen Zelltyp erkannten, waren in der AG Strand vor allem gegen Plasmatozyten gerichtet, in unserer AG hauptsächlich gegen granuläre Zellen.
- Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden auffällig viele Antikörper, die granuläre Zellen und Oenozytoide markierten, gefunden. Daneben ergab sich auch die Kombination Plasmatozyten / sphärule Zellen. Antikörper, die diese Zellkombinationen erkannten, gingen aus der Fusion von STRAND und JOHNSON (1996) nicht hervor. Dagegen wurden hier die Kombinationen Plasmatozyten / granuläre Zellen und Plasmatozyten / Oenozytoide markiert, die im Screening mit den eigenen Antikörpern nicht gefunden wurden (beim ersten Screening durch WILLOTT und Mitarbeiter, 1994, allerdings schon).

**Tab.5:** Vergleich der Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper der AG Strand (STRAND & JOHNSON 1996) und der AG Trenczek (WILLOTT et al. 1994 und eigene Untersuchungen) - Anzahl der Antikörper nach Bindungsmustern zusammengefaßt

Zelltyp	STRAND & JOHNSON 1996	WILLOTT et al. 1994	eigene Untersuchungen
alle	18	34	20
PL, GR, OE	o.A.	30	9
PL, SP, OE	o.A.	-	1
GR, SP, OE	o.A.	6	-
PL, SP	-	8	1
GR, OE	-	14	17
PL, GR	9	10	-
PL, OE	2	1	-
PL	17	15	5
GR	14	16	10
OE	7	6	3
SP	3	-	-
Antikörper insg.	70	140	66

Interessanterweise fand sich weder in der Arbeit von WILLOTT und Mitarbeitern (1994) noch von STRAND und JOHNSON (1996) ein spezifischer Antikörper gegen Prohämocyten.

In einem späteren Screening in der AG Strand ergaben sich teilweise andere Ergebnisse für die einzelnen Antikörper im Vergleich zu vorangegangenen Angaben (GARDINER & STRAND 1999), z.B. markierte eine Gruppe von Antikörpern granuläre Zellen und sphärule Zellen, eine Kombination die vordem noch nicht beobachtet wurde (STRAND & JOHNSON 1996). Diese Beobachtungen wurden auf Bindungsunterschiede der Antikörper zurückgeführt, je nachdem, ob sie auf Gesamthämocyten oder auf vorher nach Zelltypen getrennten Populationen angewendet wurden. Die Sekretion von Faktoren durch einen Zelltyp und deren Anlagerung an die Oberfläche eines anderen Zelltyps wurde diskutiert (siehe auch LORET & STRAND 1998).

Unterschiede in den Bindungsreaktionen konnten auch im Vergleich des ersten Screenings der eigenen Antikörper (WILLOTT et al. 1994) mit den vorliegenden Ergebnissen gefunden werden. Diese Unterschiede sind zum einen auf unterschiedliche subjektive Einschätzungen zurückzuführen, zum anderen sind Veränderungen der Tiere in den verschiedenen *Manduca*-Zuchten nicht auszuschließen. Ein Hinweis ergibt sich z.B. aus der Tatsache, daß die für sphärule Zellen spezifischen Antikörper der AG Strand im dortigen Labor auch die sphärulen Zellen von *M. sexta* erkennen. In eigenen Versuchen mit diesen Antikörpern, die freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, gelang eine spezifische Markierung der sphärulen



Zellen nicht. Ein weiterer Hinweis ist der Verlust der Bindungseigenschaften von MS#19 an Oenozytoide. Während dieser Antikörper auf "alten" Präparaten diesen Zelltyp erkannte, zeigte derselbe Hybridomaüberstand auf Präparaten von Tieren aus der aktuellen Zucht keine Markierung. Deshalb mußte im Verlauf der Arbeit auf diesen Antikörper als Marker verzichtet und auf den spezifischen Peroxidasenachweis zurückgegriffen werden.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle bei der Interpretation von Bindungseigenschaften der Antikörper resultiert aus der Konzentration der verwendeten Antikörperlösungen. Da in allen hier dokumentierten Experimenten mit Hybridomaüberständen gearbeitet wurde, war die Konzentration nicht bekannt bzw. konnte von Charge zu Charge stark variieren. Dementsprechend konnte das Bindungsmuster im Präparat variieren. Auch deshalb waren mehrere Kontrollansätze mit unterschiedlichen Chargen pro Antikörper notwendig (siehe auch LORET & STRAND 1998, TRENCZEK et al. 1998). Bei MS#77 und MS#105 zeigte sich zudem, daß auch das Alter des Hybridomaüberstandes einen Einfluß auf das Bindungsmuster haben kann. Empfindliche Antikörper können leicht zerfallen.

Aufgrund der Bindungseigenschaften von Antikörpergruppen schlußfolgerten GARDINER und STRAND (1999), daß granuläre und sphärule Zellen sowie Plasmatozyten und Oenozytoide die gleichen Epitope besitzen, und vermuteten eine dementsprechende verwandtschaftliche Zuordnung. SASS und Mitarbeiter (1994) konnten ebenfalls eine antigene Ähnlichkeit zwischen granulären und sphäkulen Zellen zeigen. Dies steht in völligem Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen. Die häufigste Kombination, die während der eigenen Arbeit beobachtet werden konnte, betraf granuläre Zellen und Oenozytoide. Schlußfolgerungen über Verwandtschaftsbeziehungen aufgrund von Antikörpermarkierungen können nach meiner Meinung ohne Kenntnis der entsprechenden Antigene nur mit Vorsicht gezogen werden.

Die besonders hohe "Antigenität" der granulären Zellen wird durch die Beobachtungen von TRENCZEK und BENNICH (1992) bestätigt. Die meisten der von ihnen gegen pupale Hämocyten von *Hyalophora cecropia* generierten monoklonalen Antikörper reagierten entweder gegen alle Hämocyten oder gegen granuläre Zellen (TRENCZEK et al. 1998). MULLETT und Mitarbeiter (1993) erhielten bei ihrem Ansatz gegen larvale Hämocyten von *Galleria mellonella* fast ausschließlich Antikörper gegen granuläre Zellen. Dieses Phänomen läßt sich evtl. mit einem hohen Anteil an Kohlenhydraten in und an diesen Zellen erklären, die eine Antikörperbildung auslösten. Da es wesentlich weniger Kohlenhydratbausteine als mögliche Varianten von Proteinepitopen gibt, ist es nicht unwahrscheinlich, daß in den immunisierten Mäusen besonders Antikörper gegen für Vertebraten unbekannte Zuckerstrukturen gebildet wurden. Es ist zu beachten, daß bei Antikörpern gegen Kohlenhydratkomponenten nicht von

einer Spezifität gegen ein Protein ausgegangen werden kann, d.h. mehrere Proteine können durch den gleichen Antikörper erkannt werden, auch wenn dieser monoklonal ist (FRIEMEL 1991). Außerdem taucht bei glykosylierten Proteinen ein und derselbe Baustein mehrmals auf, so daß der Antikörper an mehreren Stellen des Proteins binden kann und im Fluoreszenzmikroskop eine besonders kräftige "Färbung" zu beobachten ist. In der Tat sind es besonders die für granuläre Zellen bzw. für granuläre Zellen und Oenozytoide spezifischen Marker, die eine intensive Markierung zeigten.

Von der Vielzahl, der für interessant befundenen Antikörper, besonders der **Gruppe E**, muß angenommen werden, daß sie gegen Kohlenhydratstrukturen gerichtet sind. In der abschließenden Betrachtung aller Ergebnisse dieser Arbeit fand ein Vergleich der Bindungsmuster dieser Antikörper mit denen von fünf Lektinen in der Western-Blot-Analyse statt (siehe 3.3 und nicht dargestellt). Keines der Muster stimmte mit einem der näher untersuchten monoklonalen Antikörper überein. Auf diesem Wege konnte daher eine Bindung der Antikörper an Kohlenhydratkomponenten nicht bewiesen werden.

Einige, der hier dargestellten Markierungsunterschiede an den Hämocyten der beiden untersuchten Stadien, sind vermutlich eher auf allgemeine morphologische Unterschiede zurückzuführen. So könnte zum Beispiel eine schwächere Markierung der pupalen im Vergleich zu den larvalen Plasmatozyten auf einem stärkeren Spreitungsverhalten der Puppzellen beruhen, was optisch zu einer größeren Oberfläche der Zellen und damit zu einer weiteren Verteilung der Epitope führt. Die Granulen der granulären Zellen sind wesentlich größer und auffälliger als die Granulen der vergleichbaren Larvenzellen. Selbst bei gleichbleibender Menge des erkannten Epitops kann der Eindruck entstehen, die Markierung der größeren Granulen sei intensiver.

Einen vergleichbaren Ansatz, monoklonale Antikörper einzusetzen, um Unterschiede zwischen Hämocyten zweier Stadien der Individualentwicklung eines Insekts sichtbar zu machen, gibt es in der Literatur kaum. HORI und Mitarbeitern (1997) gelang über Antikörper-screening die Identifizierung eines 120 kDa membranständigen Proteins, welches nur für präpupale und pupale Hämocyten von *Sarcophaga peregrina* typisch ist. TRENCZEK und BENNICH (1992) erhielten zwei monoklonale Antikörper, die nur an pupale Hämocyten von *Hyalophora cecropia* banden (siehe auch 4.2.2).

#### 4.2.2 Monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppenhämozyten

Von allen getesteten monoklonalen Antikörpern zeigten 28 Unterschiede im Markierungsmuster zwischen Larven- und Puppenhämozyten und wurden dementsprechend in 10 Gruppen (A bis J) unterteilt. Siebenundzwanzig behielten ihre Bindungsaktivität über den Zeitraum der Untersuchungen und konnten immunhistochemisch sowohl auf Präparaten von Larven- und Puppenhämozyten als auch auf Querschnitten der entsprechenden Tiere getestet werden. Vier dieser Antikörper lieferten auf den Querschnitten keine auswertbaren Ergebnisse. Von 14 Antikörpern konnten über Western-Blot-Analyse die Bindungseigenschaften an Proteine des Hämolympplasmas und der Hämozyten und der verschiedenen larvalen und pupalen Organe getestet werden. Insgesamt zeigte sich ein sehr heterogenes Bild und eine Interpretation der Ergebnisse fällt schwer.

Beim Sreenen in Hinblick auf Unterschiede im Markierungsmuster der Antikörper bei Larven- und Puppenhämozyten wurde vor allem auf folgende Punkte geachtet:

- 1) eine quantitative Veränderung der Reaktion des Antikörpers, in dem Sinne, daß derselbe Hämozytentyp in derselben Struktur in veränderter Intensität markiert wird,
- 2) eine qualitative Veränderung der Reaktion des Antikörpers, in dem Sinne, daß eine Markierung von den Larven- zu den Puppenhämozyten nicht mehr vorhanden ist bzw. neu aufgetritt bzw. eine andere Struktur im gleichen Hämozytentyp markiert wird.

Während unter 1) einzuordnende Muster relativ häufig zu beobachten waren, traten die wesentlich aussagekräftigeren Unterschiede zu 2) sehr selten auf und konnten aus technischen Gründen zumeist nicht weiter verfolgt werden. Diese Unterschiede traten besonders bei den Antikörpern der **Gruppen F, G und I** auf. Diese Antikörper waren den Ergebnissen aus den Querschnittspräparaten zufolge nur für Hämozyten spezifisch und daher auch aus dieser Sicht besonders interessant.

Das Charakteristikum der Antikörper **Gruppen F und G** ist die intensive Markierung der Granulen pupaler granulärer Zellen im Gegensatz zu einer sehr geringen oder gar keiner Markierung der Granulen larvaler Zellen. Dieser Unterschied ist qualitativ bedeutender als der mit Antikörpern der **Gruppe B** aber auch der **Gruppen C bis E** dokumentierte. Die deutliche Zunahme der Markierungen in den Granulen der granulären Zellen lassen auf die *de novo* Synthese eines Moleküls in den pupalen granulären Zellen schließen bzw. auf die Aufnahme eines Moleküls im Zeitraum L5d2 bis Pd1. Ein Hinweis besonders für letztere Annahme

könnte eine Bindungsaktivität der Antikörper an Plasmaproteine sein. Leider war eine Western-Blot-Analyse nicht möglich (siehe 4.2.2.1, 4.2.2.4).

Für die **Gruppe G** ist außerdem interessant, daß das markierte Molekül in der Larve für Oenozytoide spezifisch war. Ähnliche Beobachtungen wurden mit dem Antikörper 12F6 gegen pupale granuläre Zellen von *Hyalophora cecropia* gemacht (TRENCZEK & BENNICHT 1992). Dieser Antikörper band außerdem an die Kristallzellen von *D. melanogaster* und markierte in der Western-Blot-Analyse ein Protein mit einer ungefähren molekularen Masse von 80 kDa (TRENCZEK et al. 1999). Aus diesen und weiteren Beobachtungen leitet sich die Vermutung ab, daß es sich bei diesem Protein um eine Prophenoloxidase handelt, auch wenn ein enzymatischer Nachweis nicht gelang. Die pupalen granulären Zellen sowohl von *H. cecropia* als auch von *M. sexta* zeigen keine Phenoloxidase- oder Peroxidaseaktivität (Trenczek mündliche Mitteilung, eigene Beobachtungen). In *D. melanogaster* kodieren drei Gene für eine Prophenoloxidase, eins davon wird in SL2-Zellen exprimiert, in denen sich auf klassische Weise auch keine Enzymaktivität nachweisen läßt (THEOPOLD et al. 2002). Die Expressionsmuster dieser Gene in *D. melanogaster* und eine mögliche Relevanz für *M. sexta* sind noch zu klären.

Die **Gruppe I** ist gekennzeichnet durch den Verlust der Markierung in den Granulen der granulären Zellen bei Puppen im Vergleich zu Larven. Diese Änderung des Bindungsmusters war unter den getesteten Antikörpern einmalig. Die Abgabe des Moleküls (z.B. eines Enzyms) im Verlauf der Entwicklung ist eher unwahrscheinlich, denn es fand sich zumindest in den Querschnitten keine Bindungsaktivität der Antikörper an andere Organe oder an die Basallamina. Daher könnte es sich um ein Molekül (z.B. einen Rezeptor) handeln, das für die Funktionalität der larvalen granulären Zellen notwendig ist, nicht aber für die pupalen Zellen.

Die Besonderheit der Antikörper der **Gruppe A** liegt in der Markierung der Plasmatozyten der Puppe, die in dieser Intensität bei den larvalen Plasmatozyten nicht auftrat. Demgegenüber stehen die **Gruppen C** und **D**: Hier wurde eine Markierung an den larvalen Plasmatozyten beobachtet, die sich an den pupalen Plasmatozyten nicht wiederfand.

Nur ein Vertreter der **Gruppe A** MS#26 wurde näher untersucht. Die Ergebnisse aus den Western-Blot-Analysen und den immunhistochemischen Untersuchungen waren teilweise widersprüchlich. Während sich auf den Larvenquerschnitten besonders die Muskeln und Speicheldrüsen hervorhoben, zeigten sich auf der Blotmembran Proteinbanden vor allem bei Chitin-haltigen Strukturen, wie z.B. Tracheen, Epidermis und der Flügelanlage. Daneben ist besonders die Markierung der Malpighischen Gefäße hervorzuheben (siehe 4.2.2.3, 4.2.2.7).

MS#73, der die **Gruppe C** repräsentiert, markierte neben allen Hämocyten der Larven und granulären Zellen der Puppen auf der Western-Blot-Membran vor allem hochmolekulare Proteinbanden im Lysat der Larven- und Puppenherzen. Diese Markierung läßt sich nicht auf die im Herzen vorhandenen Hämocyten oder Hämolympheproteine zurückführen, denn in dieser Form ist sie einmalig (siehe 4.2.2.5).

**Gruppe D** zeichnet sich außer durch den Verlust der Antikörperbindung an den Plasmatozyten durch eine deutliche Zunahme der Markierungsintensität in den Granulen der granulären Zellen aus. Interessanterweise nahm demgegenüber die Markierung an der Basallamina im Puppenquerschnittspräparat im Vergleich zum Larvenpräparat ab, was auf eine Aufnahme von Molekülen der Basallamina durch die granulären Zellen hinweisen könnte (siehe 4.2.2.1).

Im Vergleich dazu fällt die Markierung auf den Querschnitten mit dem Antikörper X06C03 der **Gruppe B** anders aus, obwohl auch hier die verstärkte Granulenmarkierung kennzeichnend ist. Während auf den Querschnitten der Larven kaum eine Markierung der Basallamina wahrgenommen werden konnte, war sie auf den Puppenquerschnitten deutlich zu erkennen. Interessanterweise betraf sie hauptsächlich muskuläre Strukturen und Teile des Fettkörpers. Für beide Gewebe gibt es Hinweise, daß die Hämocyten während der Metamorphose an ihrem Ab- und Umbau beteiligt sind (siehe 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.9).

Besonders heterogen und schwierig auszuwerten sind die Ergebnisse der Antikörperbindungen der **Gruppe E**. Für die Antikörper MS#70, MS#16, MS#72, MS#74 und MS#77 konnte gezeigt werden, daß sie in der Western-Blot-Analyse dieselben Proteinbanden markierten. Für X05B06 und X07C04 wird vermutet, daß diese Antikörper eine geringere Affinität zu ihrem Epitop hatten als MS#70, MS#16, MS#72, MS#74 und MS#77, letztendlich aber das gleiche Antigen erkannten. Auch für X27F10 und X31F07 ist eine Zuordnung zu dieser Spezifität aufgrund gleicher Markierungsmuster in immunhistochemischen Präparaten anzunehmen. X11G09 hatte ein etwas anderes Bindungsmuster auf der Blotmembran, ist den anderen Antikörpern aber ähnlich. Lediglich Z19E06 fiel deutlich aus dieser Gruppe heraus. Da dieser Antikörper in der Western-Blot-Analyse nahezu alle Proteinbanden markierte, ist seine Bindung an eine Zuckerkomponente mit Sicherheit anzunehmen.

Bei der Auswertung der Antikörpermarkierungen auf den Querschnitten und in der Western-Blot-Analyse der verschiedenen Organlysate konnte diese Einheitlichkeit allerdings nicht mehr bestätigt werden. Der Antikörper MS#77 zeigte bei beiden Analysen andere Bindungseigenschaften als die vier anderen Antikörper, mit denen er zuvor als identisch angesehen wurde. MS#77 markierte Proteinbanden der Proben der Hämocyten, der larvalen hämatopoetischen Organe und der als "Wölkchen" bezeichneten Strukturen nahe der sich entwickelnden

Flügel. Die anderen vier Antikörper sowie X05B06, X07C04, X27F10 und X31F07 banden in den Querschnitten an die Basallamina sämtlicher Organe, X11G09 markierte alle Zellen. Auf den Blots wurden neben Proteinen der Hämocyten oft Proteine der Epidermis beider Entwicklungsstadien oder der Malpighischen Gefäße markiert. Diese z.T. gleichen und z.T. variierenden Markierungsmuster lassen vermuten, daß diese Antikörper gegen Polyzuckerkomponenten gerichtet sind, die Übereinstimmungen in Einzelzuckerkomponenten besitzen. Für eine eindeutige Klärung der Spezifitäten bzw. der Zusammengehörigkeiten der Antikörper dieser Gruppe wäre zum einen eine vergleichende Immunpräzipitation sinnvoll. Zum anderen könnte versucht werden, durch die Zugabe von Zuckern die Bindung des/der Antikörper zu blockieren (siehe 4.2.2.1 bis 4.2.2.10).

Das veränderte Bindungsmuster der Antikörper der **Gruppe J** auf Larven- und Puppenhämocyten im Vergleich konnte erst beobachtet werden, nachdem die Zellen mit dem Detergenz Triton X-100 behandelt wurden. Während das markierte Molekül bei den larvalen granulären Zellen und Oenocytytoiden nach dieser Prozedur nicht mehr oder kaum zu finden war, trat es an den pupalen granulären Zellen in eindeutig detektierbarer Menge auf. Das Detergenz bewirkt u.a. auch das Ablösen peripherer Membranproteine oder von Komponenten, die an die Membran angelagert sind und evtl. aus der Hämolymphe stammen. Für letzteres spricht die Tatsache, daß sich in der Western-Blot-Analyse zumindest eines Antikörpers dieser Gruppe (MS#29) die gleiche Proteinbande von ca. 50 kDa sowohl in den Hämocytenlysaten als auch in den Plasmaproben fand. Interessanterweise trat diese Bande auch in der Spur der larvalen Nerven auf. Leider gelang mit keinem anderen Antikörper dieser Gruppe eine Markierung auf einer Western-Blot-Membran. Auf diesem Wege wäre evtl. eine Aussage möglich gewesen, ob es sich trotz der leichten Markierungsunterschiede der Antikörper dieser Gruppe auf den Querschnitten um das gleiche markierte Protein handelt (siehe 4.2.2.4, 4.2.2.6).

Auf den Antikörper MS#75, der die **Gruppe H** repräsentiert, wird unter 4.6.1 eingegangen.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung aller interessanten Antikörper fiel auf, daß sich einzelne Proteinbanden wiederholten: in der Spur der Larvenhämocytenlysate - eine Bande von ca. 180 kDa, in der Spur der Puppenhämocytenlysate - eine Bande von ca. 270 kDa, in den Plasmaspuren - eine Bande von ca. 50 kDa. Vermutlich handelt es sich dabei um besonders antigene und reichlich vorhandene Proteine. Ein Artefakt ist aufgrund eindeutiger Negativkontrollen ausgeschlossen.

Über die Identität der durch die Antikörper markierten Moleküle läßt sich aufgrund der Molekulargewichte nur spekulieren. Proteine können von Art zu Art aber auch von Kompartiment zu Kompartiment innerhalb eines Tieres unterschiedliche Molekulargewichte haben. Unterschiedliche Glykosylierungsformen erschweren zudem einen Vergleich. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern fanden SASS und Mitarbeiter (1994) in *Calpodes ethlius* u.a. Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 180 und 55 kDa, die aus den Hämocyten in die Hämolymphe sezerniert wurden. TSAKAS und MARMARAS (1990) markierten in *Ceratitis capitata* mit polyklonalen Antikörpern Proteine, die offensichtlich von Hämocyten exprimiert und ins Integument aufgenommen wurden (z.B. 54 und 58 kDa). Folgearbeiten mit einer eventuellen Identifizierung dieser Proteine liegen nicht vor. Auch die Arbeiten mit den Antikörpern von MULLETT und Mitarbeitern (1993) gegen Hämocyten von *Galleria mellonella* und von CHAIN und Mitarbeitern (1992) gegen Hämocyten von *Periplaneta americana* wurden nicht fortgeführt.

Eine eindeutige Interpretation der Markierungsmuster der untersuchten monoklonalen Antikörper kann erst erfolgen, wenn sowohl die Identität der markierten Moleküle als auch deren Syntheseorte eindeutig bestimmt sind. Trotzdem liefern sie einige Hinweise für die möglichen Funktionen der Hämocyten im Metamorphosegeschehen.

#### 4.2.2.1 Hämocyten und Basallamina

Zwölf der 27 auf Querschnitten getesteten Antikörper markierten neben den Hämocyten vor allem die Basallamina sämtlicher Organe. Schon WIGGLESWORTH (1979b) stellte fest, daß einige Hämocyten dieselben histochemischen Färbereaktionen für Mucopolysaccharide aufwiesen wie die Basallamina. Daher vermutete er, wie auch schon in früheren Arbeiten, daß Hämocyten am Aufbau der Basallamina beteiligt sind (WIGGLESWORTH 1956, 1973, 1979a). Das wurde von anderen Wissenschaftlern kritisch betrachtet (ASHHURST 1979). WHITTEN (1964, 1969) beobachtete den Abbau der Basallamina durch Hämocyten während der Metamorphose und vermutete wie CROSSLEY (1968), daß Bestandteile der larvalen Gewebe durch die Hämocyten aufgenommen, gespeichert und zum Aufbau adulten Gewebes verwendet werden. Inzwischen gibt es eine Reihe von Arbeiten, die beide Prozesse belegen. Zum einen konnte z.B. durch *in situ* Hybridisierung in *D. melanogaster* gezeigt werden, daß Hämocyten Bestandteile der extrazellulären Matrix synthetisieren (*D. melanogaster* - KNIBIEHLER et al. 1987, LUNSTRUM et al. 1988, MIRRE et al. 1988, FESSLER & FESSLER 1989, KUSCHE-GULLBERG et al. 1992, FOGERTY et al. 1994, MURRAY et al. 1995, *M. sexta* - NARDI &

MIKLASZ 1989, NARDI et al. 2001, *Locusta migratoria* - BALL et al. 1987). Zum anderen gibt es Arbeiten, die die Aufnahme von Bestandteilen der extrazellulären Matrix durch Hämozyten besonders während der Metamorphose nachweisen konnten (*D. melanogaster* - MURRAY et al. 1995, KIGER et al. 2001, *Sarcophaga peregrina* - KURATA et al. 1992b, *M. sexta* - NARDI & MIKLASZ 1989, RHEUBEN 1992, NARDI et al. 2001, evtl. Antikörper der Gruppe D aus der eigenen Arbeit). In weiteren Arbeiten wurden die gleichen Moleküle in der Basallamina und den Hämozyten gefunden, ob die Ursache dafür Sekretions- oder Abbauprozesse sind, konnte nicht geklärt werden (*Periplaneta americana* - Chain et al. 1992, *Pseudoplusia includens* - Gardiner & Strand 1999, *M. sexta* - Antikörper der Gruppe E aus der eigenen Arbeit).

Besonders der Beitrag der Hämozyten zum Umbau der Basallamina in der Flügelentwicklung wurde in einigen Arbeiten näher untersucht. Hier phagozytieren die Hämozyten offensichtlich erst die Basallamina bzw. apoptotische epidermale Zellen und produzieren danach Bestandteile der neuen adulten Basallamina (*D. melanogaster* - KIGER et al. 2001, *M. sexta* - NARDI & MIKLASZ 1989, NARDI et al. 2001,).

In den wenigen Arbeiten, die auf einen Zusammenhang zwischen der extrazellulären Matrix und den Blutzellen in Lepidopteren hinweisen, finden sich die entsprechenden Proteine in den Granulen der granulären Zellen (GARDINER & STRAND 1999, PENDLAND & BOUCIAS 1998, 2000, NARDI et al. 2001). Die gleichen Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Arbeit gemacht werden.

Der Aufbau und die Integrität der Basallamina sind offensichtlich entscheidend für das Verhalten der Hämozyten, ähnlich dem Endothel im Vertebratensystem. Deshalb ist es wichtig, daß die Hämozyten diese "Oberfläche" modulieren können. So besteht beispielsweise bei Einkapselungsreaktionen die äußere Schicht der Kapsel aus Bestandteilen der extrazellulären Matrix, die in granulären Zellen synthetisiert werden (PECH & STRAND 1996, 2000, GARDINER & STRAND 1999). Vermutlich entspricht damit die Oberfläche der Kapsel allen anderen Oberflächen im Hämozoel und die Immunreaktion ist abgeschlossen. Rizki und Mitarbeiter beobachteten in *D. melanogaster*, daß Hämozyten Fettkörperloben mit unvollständiger Basalmembran eingekapselten (RIZKI & RIZKI 1980, RIZKI et al. 1983). Eventuell läßt sich so auch die Beteiligung der Hämozyten am Ab- und Umbau der Basallamina erklären. Der Abbau der Basallamina bedeutet, daß das betreffende Gewebe zugänglich wird für weitere desintegrierende Prozesse, z.B. enzymatische Abbauprozesse und Phagozytose. Die Synthese und Auflagerung von Bestandteilen der Basallamina schützt das entsprechende Gewebe vor weiteren "Attacken" der Hämozyten. Nachweislich "passen" sich entomo-



pathogene Pilze der Basallamina durch molekulare Mimikry an und entgehen so den Immunreaktionen des Wirtes (PENDLAND & BOUCIAS 1998, 2000).

Lektinbindungstests zeigten, daß sowohl die Basallamina als auch die Oberfläche der Hämozyten eine stark ausgeprägte Glykocalyx aufweisen (siehe 3.3). Diese Zuckerstrukturen verhindern u.a. ungewollte Zell-Zell-Interaktionen und somit, daß die Blutzellen aneinander oder an der Basallamina hängen bleiben (ALBERTS et al. 2001). Davon ausgehend ist zu vermuten, daß Basallamina und Hämozyten ähnliche Zuckerketten ausbilden. Markieren zumindest die Antikörper der **Gruppe E** tatsächlich Kohlenhydratstrukturen, läßt sich so die Bindungsaktivität dieser Antikörper an Hämozyten und an die Basallamina erklären.

Bei den Proteinen der extrazellulären Matrix von Insekten handelt es sich zumeist um große Multidomänenproteine (Lacunin 360 kDa - NARDI et al. 1999; Laminin-Ketten 400, 215, 185 kDa - FESSLER et al. 1987, KUSCHE-GULLBERG et al. 1992; Tigrin 255 kDa - FOGERTY et al. 1994; Dumpy 2,5 Mda - WILKIN et al. 2000). Da durch die eingesetzten Antikörper auf den Western-Blot-Membranen sehr häufig hochmolekulare Banden markiert waren, kann das als weiterer Hinweis angesehen werden, daß es sich bei den markierten Proteinen tatsächlich um Bestandteile der extrazellulären Matrix handelt.

In der vorliegenden und in anderen Arbeiten wurde die Reaktivität der Antikörper sowohl auf Hämozyten als auch auf die Basallamina lediglich immunhistochemisch beschrieben (CHAIN et al. 1992, GARDINER & STRAND 1999). Zumindest für die eigene Arbeit muß die Markierung der Basallamina in den Präparaten der Larven- und Puppenquerschnitte kritisch betrachtet werden. Wie schon unter 4.2.1 bemerkt, spielt die Konzentration und die Affinität des Antikörpers für die Intensität der Markierung auf den immunhistochemischen Präparaten eine Rolle. So ist es möglich, daß gerade auf Querschnittpräparaten Antikörper unspezifisch an Gewebekanten "hängen bleiben". Abgesehen von technischen Problemen kann eine Markierung der Basallamina sämtlicher Organe auch auf ein Protein aus der Hämolymphe deuten. Zudem synthetisieren z.B. Hämozyten Proteine, die in der Epidermis oder Kutikula gebraucht werden (SASS et al. 1994, ASANO & ASHIDA 2001). Der Transport solcher Proteine muß durch die Basallamina erfolgen. In der Immunhistochemie wäre die Basallamina markiert, ohne daß das entsprechende Molekül Bestandteil der Basallamina ist (siehe auch ASHIDA & BREY 1995). Deshalb ist die Interpretation des Bindungsmusters eines Antikörpers im immunhistochemischen Präparat nur mit ergänzender Western-Blot-Analyse möglich.

#### 4.2.2.2 Hämozyten und Fettkörper

Die dokumentierten Reaktionen der Antikörper der **Gruppen B** und **J** an Hämozyten und Fettkörper kann auf der Anwesenheit von Proteinen beruhen, die sowohl typisch für Hämozyten als auch für Fettkörperzellen sind. Inzwischen ist für eine Reihe von Proteinen nachgewiesen, daß sie sowohl im Fettkörper als auch in Hämozyten (teilweise auch in Darm und Epidermis) synthetisiert und ins Plasma sezerniert werden (siehe 4.2.2.3, 4.2.2.4). Diese Nachweise erfolgten hauptsächlich für die sogenannten Immunproteine (z.B. Cecropin A, B, D - YAMANO et al. 1994, YANG et al. 1999, Hemolin - TRENCZEK & FAYE 1988, FAYE & KANOST 1998, Lebocin - FURUKAWA et al. 1997, LIU et al. 2000, Lysozym - MOHRIG & MESSNER 1967, GEIBLER 2001). Für einige dieser Proteine wurde gezeigt, daß sich Syntheserate und damit Titer in der Entwicklung verändern (Lysozym - CHUNG & OURTH 2000, Hemolin - TRENCZEK 1998, Cecropin - SAMAKOVLIS et al. 1990, Sarcotoxin Ia - NANBU et al. 1988). Die Anwesenheit dieser Proteine in der Hämolymphe kann auch zu einer "Basallaminafärbung" führen (siehe 4.2.2.1). Hingewiesen werden soll in diesem Zusammenhang auf die Ergebnisse unter 3.4.1: In den Granulen der granulären Zellen befinden sich Lipophorin und Arylphorin. Diese Proteine werden im Fettkörper synthetisiert und offensichtlich von Hämozyten im Verlauf der Entwicklung aufgenommen (siehe 4.4.1).

Die Markierung der Antikörper der **Gruppe B** könnte im Zusammenhang stehen mit der Beteiligung der Hämozyten an der Dissoziation des Fettkörpers. Die besonders prominente Markierung der Granulen der granulären Zellen kann auf die Synthese eines entsprechenden Enzyms hinweisen. Der Arbeitsgruppe um Natori gelang aus *Sarcophaga peregrina* die Isolation und Charakterisierung zweier Membranproteine (120 und 200 kDa) und einer Protease (26 / 29 kDa) der Hämozyten, die in direktem Zusammenhang mit der Dissoziation des Fettkörpers in der Puppe stehen (KURATA et al. 1989, 1991, 1992a,b, TAKAHASHI et al. 1993, KOBAYASHI et al. 1991, HORI et al. 1997, NATORI et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigen, daß es sich bei dem 120-kDa-Protein um einen Scavenger-Rezeptor handelt (HORI et al. 2000, NISHIKAWA & NATORI 2001). Eine Beteiligung des Rezeptors und damit der Hämozyten über diesen Rezeptor an der Dissoziation anderer larvaler Gewebe ist anzunehmen, evtl. in ähnlicher Funktion wie die bereits bekannten Scavenger-Rezeptoren Croquemort (FRANC et al. 1996, 1999) und dSR-C1 (PEARSON et al. 1995) im *Drosophila*-Embryo.

#### 4.2.2.3 Hämozyten, Integument und kutikuläre Strukturen

Markierungen sowohl der Hämozyten als auch aller Chitin-haltigen Strukturen, wie z.B. Tracheen, Epidermis und Flügelanlage, traten sowohl beim Einsatz der Antikörper der **Gruppe A** als auch der **Gruppe E** auf. Besonders für **Gruppe E** wird vermutet, daß es sich bei den markierten Molekülen um Zuckerkomponenten handelt. Da das mehrfache Auftreten eines Zuckers assoziiert zu unterschiedlichen Proteinen wahrscheinlich ist (siehe 4.2.2), ist die Markierung der Antikörper an diesen Geweben und an den Hämozyten nicht zwingend auf gleiche Proteine zurückzuführen.

Sowohl SASS und Mitarbeiter (1994) in *Calpodes ethlius* als auch CSIKOS und Mitarbeiter (1999) in *M. sexta* konnten mit Hilfe polyklonaler Antikörper epidermale Proteine in der Hämolymphe und teilweise auch in den Hämozyten wiederfinden. Sie vermuten, daß die Hämozyten Syntheseort einiger epidermaler Proteine sind. TSAKAS und MARMARAS (1990) fanden bei ihrem Antikörperscreening zwei Proteine im Integument von *Ceratitis capitata* (54 und 58 kDa), die offensichtlich aus Hämozyten stammten und Tyrosin banden. Eine Beteiligung dieser Proteine an Sklerotisierungsprozessen ist anzunehmen. MARMARAS und Mitarbeiter (1993) zeigten im gleichen Organismus, daß einige epidermale Proteine Tyrosin und *E. coli* binden konnten. Diese Eigenschaft wurde auch für Plasmaproteine nachgewiesen (MARMARAS & CHARALAMBIDIS 1992). Eine Protein mit einer molekularen Masse von 47 kDa, fand sich auch in Hämozyten (MARMARAS et al. 1994). Ob es sich bei den Tyrosin-bindenden Proteinen aus Integument, Hämozyten und Hämolymphe letztendlich um die gleichen Proteine handelt, ist nicht geklärt, doch eine Überschneidung von Melanisierungs- und Sklerotisierungsprozessen scheint offensichtlich (MARMARAS et al. 1996). Zumindes für das Enzym Prophenoloxidase, daß für beide Prozesse notwendig ist, ist der Transport aus den Oenozytoiden ins Integument bewiesen (ASHIDA & BREY 1995, ASANO & ASHIDA 2001).

Für einige identifizierte Proteine sind Hämozyten und Epidermis als Syntheseort nachgewiesen, z.B. das Prophenoloxidase-aktivierende Enzym (SATO et al. 1999), Serpine (MOLNAR et al. 2001) und antimikrobielle Proteine (FERRANDON et al. 1998, BOULANGER et al. 2001).

#### 4.2.2.4 Hämozyten und Hämolympheplasma

Dreizehn der 14 in der Western-Blot-Analyse getesteten monoklonalen Antikörper markierten sowohl Bestandteile der Hämozyten als auch Plasmaproteine. Hämozyten sind Syntheseort

vieler Plasmaproteine. Entsprechende Nachweise liegen hauptsächlich für relevante Moleküle für das Immungeschehen vor (z.B. OCHIAI et al. 1992, JIANG et al. 1999, siehe auch 4.2.2.2). Einige der von Hämocyten synthetisierten Proteine werden zu anderen Geweben z.B. der Epidermis transportiert (siehe 4.2.2.3). Weiterhin ist anzunehmen, daß Hämocyten Plasmaproteine anderer Herkunft aufnehmen, transportieren oder speichern (Zusammenfassung siehe CROSSLEY 1979, siehe auch 4.4.1).

Informationen über die Interaktionen von Hämocyten mit Plasmaproteinen, wie sie sich offensichtlich in der Markierung der Antikörper der **Gruppe J** darstellen, gibt es in der Literatur vor allem im Zusammenhang mit Immunreaktionen. Neben den löslichen "Erkennungsproteinen" (Zusammenfassung siehe TRENCZEK 1998) sind für die Thematik der vorliegenden Arbeit folgende Proteine im Zusammenhang mit Hämolympokoagulation und Hämocytenaggregation interessant:

- Hemocytin aus *Bombyx mori*-Hämocyten mit Domänen ähnlich dem von-Willebrand-Faktor der Mammalia (KOTANI et al. 1995)
- PSP1 ("plasmacyte spreading peptide") aus dem Fettkörper, Nervengewebe und Hämocyten von *Pseudoplusia includens* (CLARK et al. 1997, 1998, STRAND & CLARK 1999) und PP1 aus dem Fettkörper von *M. sexta* (WANG et al. 1999), gehören zur Gruppe der ENF-Peptide, die eine EGF("epidermal growth factor")-ähnliche Domäne haben (YU et al. 1999, VOLKMANN et al. 1999, STRAND et al. 2000)
- HAIP ("hemocyte aggregation inhibition peptide") aus dem Fettkörper von *M. sexta* (KANOST et al. 1994)
- Peroxinectin aus den Blutzellen von *Pacifastacus leniusculus* (JOHANSSON et al. 1995), über Antikörperbindung auch in *Blaberus craniifer* nachgewiesen (RANTAMAKI et al. 1991), mit Integrinbindungs- und Peroxidasedomäne.

Diese oder ähnliche Proteine könnten aufgrund ihrer modulierenden Wirkung auf Hämocyten auch im Entwicklungsgeschehen von Bedeutung sein. Für GBP ("growth blocking peptide"), ein Vertreter der ENF-Peptide, wurde gezeigt, daß sich der Titer in der Hämolymphe entsprechend den Häutungszyklen ändert (OHNISHI et al. 1995). Die Expression von Hemocytin steigt im Zeitraum vor der Verpuppung an (YAMAKAWA & TANAKA 1999). Daher wären weitere vergleichende Untersuchungen der Interaktionen zwischen diesen und den von Antikörpern der **Gruppe J** markierten Proteinen, den Hämocyten und anderen Geweben zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung interessant.

#### 4.2.2.5 Hämozyten und Dorsalgefäß

Die Markierung von Proteinbanden der Dorsalgefäß- und Hämozytenproben durch den Antikörper MS#73 der **Gruppe C** ist in der vorliegenden Untersuchung einmalig. Für eine Interpretation dieses Ergebnisses ist zu beachten, daß es bei der Präparation der Dorsalgefäße für die hier dargestellten Experimente technisch nicht möglich war, die Perikardialzellen abzutrennen. Dabei fiel auf, daß die Perikardialzellen um die Puppenherzen stark türkis gefärbt waren (vermutlich durch die Aufnahme von Insekticyanin).

Ultrastrukturanalysen der Perikardialzellen zeigten neben einem ausgeprägten endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat auch phagozytotische und pinozytotische Aktivität (CHAPMAN 1998). Im Allgemeinen dienen die Perikardialzellen zur Detoxifizierung und zur Beseitigung hochmolekularer Substanzen aus dem Organismus. Jüngere Forschungsarbeiten belegen auch die selektive Aufnahme von Hämolympfbestandteilen (z.B. Juvenilhormonesterase - SHANMUGAVELU et al. 2000) und damit eine regulatorische Funktion. Inwieweit sich diese Eigenschaften mit denen der Hämozyten decken, ist nicht bekannt.

ABU-HAKIMA und FAYE (1981) diskutieren die Bedeutung der Perikardialzellen im Immungeschehen. Nach einer bakteriellen Infektion konnten sie gerade zwischen diesen Zellen desintegrierte Hämozyten finden. Eventuell werden über diesen Weg Hämozyten nach dem normalen Turn-over oder selektiv entsprechend den Veränderungen in der Metamorphose aus dem Kreislauf entfernt, ähnlich der Leber im Vertebratensystem.

Auffällig sind die Ähnlichkeiten im Markierungsmuster von MS#73 und der Verteilung von Sp22D in *Anopheles gambiae* (DANIELLI et al. 2000). Sp22D ist ein Multidomänenprotein mit einer molekularen Masse von ca. 160 kDa. MS#73 markierte zumindest im Larvenhämolyt eine Proteinbande von ca. 180 kDa. Sp22D wird in Hämozyten exprimiert und ins Plasma sezerniert. Dabei ist die Expression nach bakterieller Infektion, Verwundung und während der Metamorphose erhöht. Neben den Hämozyten ist dieses Protein nur noch in den Perikardialzellen nachweisbar. Ob es in diesen Zellen auch exprimiert wird, wurde bisher nicht gezeigt. Vermutlich interagiert es mit exponiertem Chitin, wie es während der Metamorphose oder bei einer Verwundung auftritt.

Auch bei den Herzmuskelzellen konnte sekretorische Aktivität nachgewiesen werden (LOCKE 1989). Eine Aufnahme oder Anlagerung entsprechender Proteine an die Hämozyten ist vorstellbar.

#### 4.2.2.6 Hämozyten und Nervengewebe

Die Antikörper der **Gruppe J**, repräsentiert u.a. durch MS#29, markierten neben Bestandteilen der Hämozyten und der Hämolymphe in der Western-Blot-Analyse auch eine Proteinbande im Nervengewebe. Eine Markierung von Bestandteilen der Hämozyten und des Nervengewebes gab es auch bei Antikörpern der **Gruppe E**.

Für einige Enzyme wie DOPA-Decarboxylasen und Strictosidinsynthasen wird der multiple Einsatz im Nervengewebe, bei der Immunabwehr, d.h. im Zusammenhang mit Hämolymphe und Hämozyten, und bei der Sklerotisierung diskutiert (THEOPOLD et al. 2002). Die tatsächliche Expression bzw. das Vorhandensein dieser Enzyme in den entsprechenden Geweben bleibt noch zu klären.

Es ist bekannt, daß mit den ventralen Ganglien neurosekretorische Zellen assoziiert sind, die teilweise einen ganzen Cocktail von Neuropeptiden sezernieren. Wasserunlösliche Peptide werden gebunden an bestimmte Carrier durch die Hämolymphe zu ihren Zielorganen transportiert (CHAPMAN 1998). Ob sich solche Carrier an oder in den Hämozyten befinden, ist nicht bekannt.

Jüngere Forschungsergebnisse zeigen, daß Neuropeptide und auch Neurotransmitter einen modulierenden Einfluß auf Immunreaktionen ausüben, auch in Invertebraten (SALZET et al. 2000). Zudem beeinflussen Produkte von Immunreaktionen, z.B. Cytokine das neuroendokrine System (OTTAVIANI & FRANCESCHI 1997) und neuronale Funktionen (CLATWORTHY 1998). Detaillierte Untersuchungen für Insekten liegen meines Wissens nicht vor. Ebenso wenig gibt es Informationen über einen "crosstalk" zwischen diesen Organen während der Metamorphose (außer über die klassischen Insektenhormone). Erste Kandidaten könnten die ENF-Peptide sein, die Cytokin-ähnliche Domänen haben und sowohl in Hämozyten, Fettkörper als auch Nervengewebe exprimiert werden (STRAND et al. 2000, siehe 4.2.2.4).

#### 4.2.2.7 Hämozyten und Malpighische Gefäße

Beim Test der Antikörperbindung an Lysate verschiedener Organe in der Western-Blot-Analyse fiel neben der Bindung an Proteine aus der Epidermis und / oder an kutikuläre Strukturen besonders die Markierung von Proteinen der Malpighischen Gefäße auf (**Gruppe A und E**). Leider wurden die Querschnitte aus den thorakalen Bereichen der Tiere angefertigt, da eher eine Bindung der Antikörper an Moleküle der Speicheldrüsen und der hämatopoetischen Organe bzw. die Beteiligung der Hämozyten an der Flügeldifferenzierung erwartet

wurde, so daß keine immunhistochemischen Tests für die Bindungseigenschaften der Antikörper an die Malpighischen Gefäßen vorliegen.

ANDERL (2001) vermutete aufgrund von Beobachtungen an infizierten Larven eine Beteiligung der Malpighischen Gefäße am Immungeschehen in dem Sinne, daß in der Hämolymphe befindliche Fremdkörper über die Malpighischen Gefäße und den Darm aus dem Organismus ausgeschieden werden. Durch die interzellulären Spalten können alle löslichen Moleküle bis zu einer bestimmten Größe in das Innere der Gefäße gelangen. Dieser Mechanismus garantiert das Entfernen von potentiell toxischen Substanzen (CHAPMAN 1998). Die Bindung von Antikörpern an Moleküle der Malpighischen Gefäße dokumentiert die Anwesenheit von Proteinen aus der Hämolymphe in diesen Gefäßen aber nicht unbedingt ein selektives Ausscheiden. Interessant ist allerdings die Beobachtung von ANDERL (2001), daß sich bei Tieren nach der Häutung vom vierten zum fünften Larvenstadium auffällig viele adhärente Hämozyten teilweise als Noduli an den Malpighischen Gefäßen befanden.

Es gibt keinerlei Hinweise in der Literatur über ein Zusammenspiel von Hämozyten und Malpighischen Gefäßen. Es ist jedoch anzunehmen, daß Hämozyten bzw. Bestandteile von Hämozyten über die Malpighischen Gefäße ähnlich wie über die Perikardialzellen ausgeschieden werden.

#### 4.2.2.8 Hämozyten und Speicheldrüsen

Bereits NITTONO (1960) vermutete, daß es einen Zusammenhang zwischen den Speicheldrüsen und den Hämozyten gibt. Mit Hilfe des Lektins aus *Arachis hypogaea* konnte dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden (siehe 4.5.1). Auch die Antikörper der **Gruppe A** markierten Moleküle der Hämozyten und der Speicheldrüsen. Die Speicheldrüsen enthalten Wasser, Ionen, Enzyme zur Vorverdauung (CHAPMAN 1998) und bei *M. sexta* außerdem stark glycosylierte Fibroin-artige Proteine (HAKIM & KAFATOS 1974, JOCHOVA et al. 1997). Ähnlich strukturierte Proteine z.B. Mucine werden für das "Clotting" der Hämolymphe benötigt und in den Hämozyten exprimiert. Tatsächlich konnte für Hemo-mycin eine Expression in Hämozyten und Speicheldrüsen bei *D. melanogaster* nachgewiesen werden (THEOPOLD et al. 1996, THEOPOLD & SCHMIDT 1997, siehe auch 4.5.1).

Auch andere Proteine werden in Hämozyten und Speicheldrüsen exprimiert, z.B. das Prophe-noloxidase-aktivierende Enzym in *Bombyx mori* (SATO et al. 1999), bzw. wurden in Hämozyten und Speicheldrüsen nachgewiesen, z.B. ein Lektin aus *Bombyx mori* (AMANAI et al. 1991).

#### 4.2.2.9 Hämozyten und Muskeln

Die Markierung der Hämozyten und muskulären Strukturen durch die Antikörper der **Gruppen A, B und J** könnte auf Moleküle hinweisen, die sowohl in Muskelzellen als auch in Hämozyten vorkommen. Über einen solchen Zusammenhang gibt es meines Wissens in der Literatur keine Angaben. Anhaltspunkte bilden lediglich einerseits die Fähigkeit der Hämozyten, Bestandteile der extrazellulären Matrix zu exprimieren (siehe 4.2.2.1), und andererseits die Bedeutung von Komponenten der extrazellulären Matrix für die Funktionalität der Muskelfibrillen (ALBERTS et al. 2001).

Das Markierungsmuster der Antikörper der **Gruppe B** weist auf die Rolle der Hämozyten beim Umbau der Muskulatur hin. Verschiedentlich wurde beschrieben, wie Hämozyten larvale Muskelfibrillen phagozytierten bzw. die Basallamina von Muskelfibrillen abbauten (*Calliphora erythrocephala* - CROSSLEY 1968, *M. sexta* - RHEUBEN 1992, *D. melanogaster* - LANOT et al. 2001). In den Präparaten der Puppenquerschnitte waren besonders häufig an Muskelfibrillen angelagerte granuläre Zellen zu beobachten. Somit läßt sich die starke Markierung der Granulen der pupalen granulären Zellen evtl. auf die Expression von Enzymen, z.B. Proteasen zurückführen, die für die Dissoziation des Muskelgewebes notwendig sind. Die Expression diverser Proteasen in Hämozyten wurde in Bezug auf das Immungeschehen bereits nachgewiesen (JIANG et al. 1999, GORMAN & PASKEWITZ 2001, KANOST et al. 2001). Ein Zusammenhang mit dissoziierendem Gewebe während der Metamorphose wurde lediglich durch KURATA und Mitarbeiter (1992a, b) hergestellt (siehe 4.2.2.1, 4.2.2.2).

#### 4.2.2.10 Hämozyten und hämatopoietisches Organ

Das hämatopoietische Organ wird als Bildungsort aller oder einiger Hämozytentypen diskutiert (siehe 4.10). Eine Markierung der Zellen innerhalb des hämatopoietischen Organs durch einige der eingesetzten Antikörper wurde erwartet. Besonders beeindruckend zeigte sich dies im Bindungsmuster der Antikörper MS#75 der **Gruppe H** (siehe auch 4.6.1) und MS#77 der **Gruppe E**. Eine ausführliche Diskussion erfolgt unter 4.10.



### **4.3 Bindungseigenschaften von Lektinen an Hämozyten und Gewebe von Larven und Puppen**

#### **4.3.1 Screening der Lektine**

In den letzten Jahren mehrten sich die Veröffentlichungen über die Bedeutung der Glycosylierung für die Funktion eines Proteins insbesondere auch im Hinblick auf Immunreaktionen (z.B. BULET et al. 1993, BETTENCOURT et al. 1999, RUDD et al. 2001). Seit langem ist bekannt, daß mit der Differenzierung der Zellen eine Veränderung in der Glykosylierung einhergeht (z.B. CALLAERTS et al. 1995, D'AMICO & JACOBS 1995). Ein Zusammenhang zwischen diesem Aspekt und dem Einfluß von  $\beta$ -Ecdyson konnte an Zelllinien gezeigt werden (KRAME-ROV et al. 1983, THEOPOLD et al. 2001).

Aufgrund des Fehlens spezifisch bindender Antikörper im Rahmen der Immunabwehr wurde für die Invertebraten postuliert, daß eine Fremderkennung über sogenannte "pattern recognition proteins" erreicht wird (HOFFMANN et al. 1999), die sich insbesondere gegen Pathogen-spezifische Zuckerkomponenten richtet. Dieser Bestandteil der angeborenen ("innate") Immunität ist auch für die Vertebraten u.a. am Beispiel des Mannose-bindenden Lektins intensiv dokumentiert (z.B. TURNER 1996). Für Insekten sind bereits zahlreiche spezifische Erkennungsproteine bekannt (z.B.: für LPS - KOIZUMI et al. 1999, für Peptidoglycan - OCHIAI & ASHIDA 1999, WERNER et al. 2000, für  $\beta$ -1,3-Glucan - CHEN et al. 1999). Daneben wurden inzwischen auch eine Reihe von Lektinen identifiziert, die andere Zuckerspezifitäten aufweisen, z.B. BDL1-3 spezifisch für N-acetyl-D-galactosamin (WILSON et al. 1999) und ein Lektin spezifisch für Galactose (HAQ et al. 1996). Für *D. melanogaster* (THEOPOLD et al. 1999) und *Periplaneta americana* (KAWASAKI et al. 1996) wurden "lectin multigene families" beschrieben, was auf eine multifunktionelle Bedeutung von Lektinen in Immun- und Entwicklungsprozessen hinweist (siehe auch KAWAGUCHI et al. 1991, THEOPOLD et al. 1999). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß auch exogene Lektine einen modulierenden Einfluß auf Immunreaktionen haben können (PENDLAND & BOUCIAS 1996, THEOPOLD et al. 1996, WILSON et al. 1999).

Hingewiesen werden soll auch auf die besonders intensive Glycosylierung der extrazellulären Matrix (siehe 4.2.2.1). Besonders interessant erscheint dabei das bei den Mammalia dokumentierte Wechselspiel zwischen Mucinen (z.B. CD43) - hoch glykosylierten Proteinen - und Selektinen - spezialisierten Lektinen - das für die Zell-Zell-Interaktion notwendig ist, z.B. für die gerichtete Bewegung der Blutzellen (ALBERTS et al. 2001). Ähnliche Beobachtungen

wurden für die Hämocyten der Insekten noch nicht gemacht. Für *D. melanogaster* wurden aber bereits Mucine (z.B. THEOPOLD et al. 1996, KRAMEROV et al. 1997) und ein Selektin (LESHKO-LINDSAY & CORCES 1997) beschrieben, letzteres allerdings nicht im Zusammenhang mit Blutzellen.

Aus diesen verschiedenen Aspekten heraus ist es interessant, die Zusammensetzung der Zuckerkomponenten auf und in den Hämocyten zu untersuchen. Eine vergleichende Analyse der Hämocyten während der Entwicklung mit Hilfe kommerziell erhältlicher Lektine gibt es in dem Umfang, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, noch nicht. Lektine wurden bisher benutzt, um unterschiedliche Glykosylierungen der Hämocyten mit Abwehrreaktionen z.B. gegen Parasiten und Parasitoide zu korrelieren (RIZKI & RIZKI 1983, NAPPI & SILVERS 1984, LI & CHRISTENSEN 1990, MCKENZIE & PRESTON 1992). Es muß aber beachtet werden, daß die Spezifität von Lektinen begrenzt ist, denn die Mono- und Disaccharide, an die Lektine üblicherweise binden, können Bestandteil vieler Kohlenhydratstrukturen sein.

Von den 14 getesteten Lektinen zeigten die meisten eine Bindung an alle Hämocyten. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Lektine, die nur für einen Zucker spezifisch waren. Nur fünf Lektine markierten einzelne Hämocytentypen, wobei nur das Lektin aus *Triticum vulgare* an Plasmatozyten band. Die anderen vier Lektine markierten granuläre Zellen und Oenocytoide. Interessanterweise trat diese Kombination auch beim Screening der monoklonalen Antikörper häufig auf (siehe 4.2.1).

Das Lektin aus *Triticum vulgare*, auch als "wheat germ agglutinin (WGA)" bezeichnet, ist ein gegen Hämocyten häufig eingesetztes Lektin. So konnten RIZKI und RIZKI (1983) und NAPPI und SILVERS (1984) eine besonders kräftige Markierung mit WGA auf *Drosophila*-Hämocyten beobachten, wenn Einkapselungsreaktionen stattfanden. In *Antherea pernyi* markierte WGA sowohl Plasmatozyten als auch granuläre Zellen (BEAULATON 1985), in *Blaberus discoidalis* wurden nur Plasmatozyten durch dieses Lektin erkannt (WILSON et al. 1999). Es ist zu vermuten, daß das Auftreten der durch WGA markierten Zucker [(glcNAc)<sub>2</sub>, NeuNAc] mit der Immunkompetenz der Hämocyten zusammenhängt. Weitere Untersuchungen sind interessant, z.B. ob dieses Lektin nur spezifisch an Hämocyten bindet oder auch an andere Gewebe.

Soweit bekannt, gelang es erst einmal, ein Protein aufgrund von Lektinbindung aus Hämocyten zu isolieren. Dabei handelt es sich um das durch das *Helix pomatia*-Lektin markierbare Hemomucin, das sich in Granulen und an Membranen von *Drosophila*-Hämocyten befindet (THEOPOLD et al. 1996). Dieses Mucin ist an der Koagulation der Hämolymphe beteiligt und wird vermutlich über sogenannte Mikropartikel aus den Zellen abgegeben (THEOPOLD &

SCHMIDT 1997). Bei Untersuchungen an Hämocyten von *Galleria mellonella* konnte eine Markierung der Granulen granulärer Zellen durch das *Helix pomatia*-Lektin beobachtet werden (THEOPOLD & SCHMIDT 1997). Dies gilt nicht für Hämocyten von *M. sexta*. Wie in den vorliegenden Untersuchungen dokumentiert, markierte dieses Lektin alle Hämocyten. Vermutlich ändert sich die Glycosylierung des Hemomucins im Verlauf der Entwicklung. Zumindest in der *Drosophila*-Zelllinie SL2 wurde nach Zugabe von  $\beta$ -Ecdyson eine stärker glycosylierte Form des Hemomucins detektiert, die durch das *Arachis hypogaea*-Lektin (PNA) erkannt wurde (THEOPOLD et al. 2001, siehe 4.5.1).

#### **4.3.2 Lektine mit unterschiedlichen Bindungsmustern auf Larven- und Puppenhämocyten**

Zwei der 14 untersuchten Lektine zeigten Unterschiede im Markierungsmuster im Vergleich der Hämocyten aus Larven und Puppen: das Lektin aus *Arachis hypogaea* ("peanut agglutinin", PNA) und das Isolektin B4 aus *Vicia villosa* (VVB4). Trotz gleicher Spezifität für N-acetylgalactosamin des VVB4 und der Lektine aus *Glycine max* ("soybean agglutinin", SBA) und *Helix pomatia* zeigten sich in den immunhistochemischen Präparaten unterschiedliche Markierungsmuster, die aber nicht näher untersucht wurden.

Demgegenüber waren die Markierungen durch die beiden Lektine aus *Arachis hypogaea* und *Bauhinia purpurea* gleicher Spezifität für das Disaccharid  $\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc auf den Hämocytenpräparaten identisch.

VVB4 markierte im Präparat der Larvenhämocyten besonders die Plasmatozyten, während es im Puppenpräparat besonders an die Granulen der granulären Zellen band. Die Bindung des Lektins an alle Chitin-haltigen Strukturen scheint im Widerspruch zu seiner Zuckerspezifität zu stehen. Die Hauptbestandteile von Chitin sind N-acetylglucosamin und N-acetylmuraminsäure, VVB4 markiert N-acetylgalactosamin. Daher ist anzunehmen, daß durch das Lektin Proteine in der Kutikula markiert werden.

Die intensive Markierung der pupalen Hämocyten durch VVB4 im immunhistologischen Präparat spiegelte sich auch in der Western-Blot-Analyse der Hämocytenlysate wider. In der Spur der Puppenhämocyten wurden einige Proteine besonders kräftig markiert, die im Lysat der Larvenhämocyten nicht vorhanden waren. Ob dies auf eine veränderte Glycosylierung an den Hämocyten selber zurückzuführen ist oder im Zusammenhang mit Auf- und Abbau der Basallamina und / oder des Integuments gesehen werden muß, kann nicht gesagt werden (siehe 4.2.2.1, 4.2.2.3).

Auf das Markierungsmuster des Lektins aus *Arachis hypogaea* (PNA) soll unter 4.5.1 eingegangen werden.

#### **4.4 Einsatz von Antikörpern bekannter Spezifität auf Larven- und Puppenhämozyten**

##### **4.4.1 Einsatz der Antikörper gegen *Manduca sexta*-Lipophorin und *Hyalophora cecropia*-Arylphorin**

Eine sehr prominente Klasse von Plasmaproteinen sind die Lipidtransportproteine, zusammengefaßt unter dem Namen Lipophorin. Lipophorin besteht als HDLp ("high density lipoprotein") aus den Untereinheiten ApoLp I und ApoLp II (ApoLp steht für Apolipoprotein). Durch das Beladen des HDLp hauptsächlich mit Diacylglycerinen entsteht das LDLp ("low density lipoprotein"), das, soweit aus Imagines bekannt, mit ApoLp III assoziiert (CHAPMAN 1998). Die Assoziation von ApoLp III steht aber offensichtlich auch im Zusammenhang mit dem Metamorphosegeschehen (ZIEGLER et al. 1995) und der larvalen systemischen Immunantwort (DETTLOFF et al. 2001). Apolipoprotein-mRNA läßt sich im Fettkörper während der gesamten Freßphase im letzten Larvenstadium nachweisen und die Lipophorinkonzentration im Plasma steigt entsprechend. Mit Beginn des Wanderstadiums wird die Expression eingestellt und die Lipophorinkonzentration bleibt konstant (PRASAD et al. 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörperserums die Anwesenheit zumindest von ApoLp I und ApoLp II in den Granulen der granulären Zellen nachgewiesen, wobei der Gehalt in den pupalen Hämozyten höher als in den larvalen Zellen war. Es ist anzunehmen, daß diese intensive Markierung auf eine Internalisierung des Lipophorins zurückzuführen ist. Für die Fettkörperzellen, die als Lipidspeicher für das pupale und adulte Stadium fungieren, wurde gezeigt, daß sie Lipophorin über einen spezifischen Rezeptor aufnehmen (TSUCHIDA & WELLS 1990). Ob auch die Hämozyten einen solchen Rezeptor exprimieren, ist nicht bekannt. Eventuell haben die Hämozyten ähnlich den Fettkörperzellen eine Lipidspeicherfunktion.

Interessant ist, daß Lipophorin, besonders ApoLp III, in jüngeren Arbeiten im Zusammenhang mit Immunreaktionen diskutiert wird. Bei *Galleria mellonella* ist es involviert in Koagulationsreaktionen (THEOPOLD et al. 2002), induziert die Expression antibakterieller Proteine und

erhöht die phagozytotische Aktivität der Hämocyten (WIESNER et al. 1997), wirkt synergistisch auf die Lysozymaktivität (HALWANI & DUNPHY 1999) und bindet selbst an LPS und  $\beta$ -1,3-Glucan (DUNPHY & HALWANI 1997, IIMURA et al. 1998, *Locusta migratoria* - DUVIC & BREHELIN 1998). DETTLOFF und Mitarbeiter (2001) beobachteten die spezifische Aufnahme von LDLp durch granuläre Zellen nach Immunstimulation. SUN und Mitarbeiter (1995) konnten eine steigende Expression von ApoLp III in Intersegmentalmuskelzellen mit Beginn des programmierten Zelltods nachweisen. Vor diesem Hintergrund sei auf die Expression von Scavenger-Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie auf embryonalen Hämocyten von *D. melanogaster* (PEARSON et al. 1995) und prepupalen und pupalen Hämocyten von *Sarcophaga peregrina* (HORI et al. 2000) hingewiesen, die offensichtlich unter  $\beta$ -Ecdysonkontrolle steht (DIMARCQ et al. 1997). Diese Ergebnisse und das in der vorliegenden Arbeit beobachtete starke Auftreten von Lipophorin besonders in den pupalen granulären Zellen könnte auf einen Zusammenhang zwischen Lipophorin und der Scavengerfunktion der Hämocyten hindeuten (siehe zur Scavengerfunktion der Hämocyten auch BRAUN et al. 1998). Damit würde Lipophorin als ein weiteres Bindeglied zwischen immunologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen eine besondere Bedeutung zukommen.

Das Speicherprotein Arylphorin gehört zu den häufigsten Plasmaproteinen der Insekten (bis zu 60% - CHAPMAN 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Protein besonders in den Granulen granulärer Zellen detektiert werden, wobei die Markierung durch das eingesetzte polyklonale Serum bei den Puppenhämocyten wesentlich intensiver war als bei den Larvenhämocyten.

Die Produktion und Abgabe von Arylphorin vor allem durch den Fettkörper ist zyklisch und korreliert mit der Entwicklung, d.h. während der larvalen Stadien steigt die Arylphorinkonzentration in der Hämolymphe, während der Häutungen fällt sie (RIDDIFORD & HICE 1985, WEBB & RIDDIFORD 1988a). Dieses Phänomen wird durch  $\beta$ -Ecdyson und Juvenilhormon reguliert (WEBB & RIDDIFORD 1988b). Arylphorin wird während der Häutung u.a. in die neue Epidermis eingelagert und "verbraucht" (RIDDIFORD & HICE 1985). Mit Eintritt ins Wanderstadium verlieren Teile des Fettkörpers ihre synthetische Aktivität und werden zu reinen Speicherorganen für das pupale und adulte Stadium (HAUNERLAND & SHIRK 1995). In *Calliphora vicina* wird die endocytotische Aufnahme von Arylphorin aus der Hämolymphe in die Fettkörperzellen über einen spezifischen Rezeptor vermittelt, der unter Ecdysonkontrolle steht (BURMESTER & SCHELLER 1995, 1997). Ob Hämocyten einen ähnlichen Rezeptor besitzen und ob dieser während der Entwicklung unterschiedlich exprimiert wird, ist nicht bekannt. Lediglich der Nachweis eines Rezeptor assoziierten Proteins, des "anterior fat body

protein (AFP)" gelang ebenso für die Hämocyten von *Calliphora vicina* (HANSEN et al. 2002). Die Anwesenheit eines Arylphorin-Rezeptors in der Hämocytenmembran liegt damit nahe und eine spezifische, Hormon-regulierte Aufnahme von Arylphorin durch die Hämocyten wäre denkbar. Ähnlich den Fettkörperzellen könnten die Hämocyten als Speicher für Arylphorin fungieren. Über eine Transportfunktion der Blutzellen wäre nachzudenken.

Interessant ist die Beobachtung von zwei weiteren Proteinen in den Hämocytenlysaten von Larven und Puppen von ca. 66 und 68 kDa. Proteinbanden mit geringerem Molekulargewicht als erwartet, fanden RIDDIFORD und HICE (1985) im Fettkörper kurz vor und nach den Häutungen und in der Epidermis. Sie vermuteten, daß es sich dabei um Abbauprodukte handelte, wie sie auftreten könnten, wenn die im Arylphorin gespeicherten Aminosäuren für andere biochemische Prozesse gebraucht werden. Andere Autoren diskutierten die Bedeutung von "Bruchstücken" des Arylphorins während der Sklerotisierung (z.B. LEVENBOOK 1985). Desweiteren ist das Auftreten von weniger glycosylierten Formen der Arylphorinuntereinheiten in den Hämocyten vorstellbar (siehe auch RYAN et al. 1985). Da der Nachweis des Arylphorins in der vorliegenden Arbeit mit einem polyklonalen Serum durchgeführt wurde, ist eine Kreuzreaktion mit einem Arylphorin ähnlichen Protein nicht ausgeschlossen. Weitergehende Untersuchungen z.B. von Hämocyten um den Zeitpunkt larvaler Häutungen wären interessant.

#### **4.4.2 Einsatz der Antikörper gegen muskelspezifisches Myosin aus *Drosophila melanogaster***

In einigen Veröffentlichungen wurde beschrieben und auch mit elektronenmikroskopischen Bildern belegt, wie Hämocyten larvale Muskelfibrillen phagozytierten bzw. die Basallamina von Muskelfibrillen abbauten (*Calliphora erythrocephala* - CROSSLEY 1968, *M. sexta* - RHEUBEN 1992, *D. melanogaster* - LANOT et al. 2001). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde in Puppenquerschnittspräparaten beobachtet, wie granuläre Zellen an Muskelfibrillen angelagert waren. Daraus entstand die Idee, internalisiertes Myosin in den pupalen granulären Zellen nachzuweisen.

Von der AG Renkawitz-Pohl wurden freundlicherweise zwei polyklonale Seren gegen muskelspezifisches Myosin aus adulten Tieren von *D. melanogaster* zur Verfügung gestellt (KIEHART & FEGHALI 1986). Zum Zeitpunkt der Herstellung dieser Antikörper war über die Myosinklassen in *D. melanogaster* noch wenig bekannt. Im Nachhinein ist anzunehmen, daß

diese Antikörper gegen muskelspezifisches Myosin (schwere Kette) der Klasse II (*Mhc*) gerichtet sind.

Der Einsatz dieser Antikörper erbrachte weder in der Immunhistochemie noch in der Western-Blot-Analyse das erwartete Ergebnis, d.h. die Granulen der pupalen granulären Zellen waren nicht markiert. Statt dessen fielen einige markierte Plasmatozyten in den Präparaten der Larvenhämozyten auf. Interessant war auch die Beobachtung einer intensiv markierten Kapsel aus einer Immunreaktion. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich in den Lysaten der larvalen und pupalen Hämozyten neben vielen anderen Proteinbanden auch die erwartete Bande von ca. 205 kDa.

Es kann nicht gesagt werden, ob die eingesetzten Antikörper tatsächlich ein Myosin der Klasse II in *M. sexta* markierten. Wenn ja, so ist es offensichtlich nicht mit dem muskelspezifischen Myosin aus *D. melanogaster* vergleichbar. In *D. melanogaster* ist ein weiteres, nicht muskelspezifisches Myosin der Klasse II (*zipper*) identifiziert worden, das essentiell für die Verlängerung der Epidermiszellen in der Embryogenese und die Flügelentwicklung ist (MANSFIELD et al. 1996). Daneben sind weitere Myosine der Klassen I, III, V, VI, VII, XV und XVIII für *D. melanogaster* beschrieben bzw. werden aufgrund von genomischen Datenanalysen vermutet (YAMASHITA et al. 2000). Aussagen über eine spezifische Form von Myosin in Hämozyten liegen nicht vor. Nach den hier dargestellten Ergebnissen könnte das identifizierte Myosin eine Bedeutung für die Kompetenz der Hämozyten für Immunreaktionen haben.

#### **4.4.3 Einsatz der Antikörper gegen *Manduca sexta*-Ecdysonrezeptoren**

Bisher konnten drei Isoformen des Ecdysonrezeptors aus *D. melanogaster* (TALBOT et al. 1993) und zwei aus *M. sexta* (FUJIWARA et al. 1995, JINDRA et al. 1996) identifiziert werden. In Expressionsstudien an verschiedenen Geweben in *D. melanogaster* wurde festgestellt, daß das Auftreten der verschiedenen Isoformen unter strenger zeitlicher und räumlicher Kontrolle steht (TALBOT et al. 1993, TRUMAN et al. 1994, BENDER et al. 1997, SCHUBINGER et al. 1998). Dabei ergibt sich zusammenfassend das Bild, daß die Isoform A in Geweben dominant ist, die sich im Verlauf der Metamorphose differenzieren, wie z.B. die Imaginalscheiben. Die Isoform B1 wird hauptsächlich in larvalen Geweben exprimiert, die entweder nicht mehr benötigt werden und sterben oder die zu den entsprechenden adulten Strukturen proliferieren. Für die Lepidoptera, wie z.B. *M. sexta*, in denen im Vergleich zu den höheren Diptera, wie z.B. *D. melanogaster* mehr larvale Zellen erhalten bleiben, die im Verlauf der Metamorphose ihr

Differenzierungsprogramm ändern, kann diese strenge Zuordnung der Isoformen nicht übernommen werden. Nach Expressionstudien an Epidermiszellen von *M. sexta*, die sowohl larvale, pupale und adulte Kutikula synthetisieren, wurde folgende Hypothese erstellt (JINDRA et al. 1996): Die Isoform A tritt hauptsächlich während den Häutungsphasen auf, besonders wenn eine neue Kutikulaform synthetisiert wird, während die Isoform B1 typisch für die Phasen vor der neuen Differenzierung der Epidermiszellen ist. Untersuchungen zur Expression der Ecdysonrezeptoren in Blutzellen liegen nicht vor.

Für die vorliegende Arbeit standen zwei monoklonale Antikörper gegen Ecdysonrezeptoren zur Verfügung: einer gegen alle Ecdysonrezeptorisoformen und einer gegen die Isoform B1. Beide Antikörper banden in den Hämocytenpräparaten nur an Strukturen der Oenozytoide. Somit kann mit relativer Sicherheit auf das Vorhandensein der Isoform B1 in diesen Zellen geschlossen werden. Weitere Rezeptorisoformen sind jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Die Oenozytoide waren nicht nur wie erwartet im Zellkern, sondern auch im Cytoplasma markiert. Dieses Phänomen kann durch die Art der Präparation und Fixierung bedingt sein (M. Spindler-Barth, persönliche Mitteilung).

Entsprechend den oben genannten Vorstellungen kann die Expression der B1-Isoform in den Oenozytoiden auf eine apoptotische Reaktion dieser Zellen auf entsprechende Ecdysonsignale hindeuten. Trifft dies zu, kann auch das Verschwinden der Oenozytoide aus der frei flotierenden Hämocytenpopulation mit Beginn des Wanderstadiums erklärt werden (siehe 4.1). Überraschend war aber, daß außer den Oenozytoiden kein anderer Zelltyp in Larven und Puppen der untersuchten Entwicklungsstadien durch die beiden Antikörper markiert wurde. In *D. melanogaster* wurde eine Reaktion der Plasmatozyten auf  $\beta$ -Ecdyson beschrieben (MEISTER & RICHARDS 1996, LANOT et al. 2001). Ein Nachweis von Ecdysonrezeptoren liegt allerdings nicht vor. Da bekannt ist, daß sowohl Expression als auch Abbau der Ecdysonrezeptoren sehr streng reguliert werden (KARIM & THUMMEL 1992, THUMMEL 2002), sind weitere Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf mRNA- und Proteinebene in Kombination mit *in vitro*-Versuchen notwendig (siehe 4.9).



## **4.5 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin**

### **4.5.1 Charakterisierung des Liganden zum *Arachis hypogaea*-Lektin**

Das Lektin von *Arachis hypogaea* (spezifisch für  $\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc) war für weitere Untersuchungen besonders interessant, da es in Querschnittspräparaten von Larven und Puppen ausschließlich Hämozyten markierte. Dabei band das Lektin an die Granulen granulärer Zellen, die im Puppenpräparat wesentlich intensiver markiert waren als im Larvenpräparat. Außerdem markierte das Lektin auf Hämozytenpräparaten aus Larven, die vorher mit *Mirococcus luteus* infiziert wurden, zusätzlich zu granulären auch sphärule Zellen. Dieses Bindungsmuster fand sich bei den Hämozyten von *Galleria mellonella* in gesunden Tieren (U. Theopold, persönliche Mitteilung). Da in der Western-Blot-Analyse sowohl bei gesunden und infizierten Larven von *M. sexta* als auch in Puppen nur jeweils eine Bande von ca. 120 kDa zu finden war, kann davon ausgegangen werden, daß es sich in allen Fällen um das gleiche Protein handelte. In der Western-Blot-Analyse der verschiedenen Organlysate wurden entsprechende Proteinbanden in den Spuren der Flügelanlagen, hämatopoietischen Organe, larvalen Herzen und Fettkörper sowie im Larven- und Puppenplasma detektiert. Dies ist vermutlich auf die dort anwesenden Hämozyten bzw. die Abgabe des markierten Proteins zurückzuführen.

U. Theopold entdeckte in *D. melanogaster* und *G. mellonella* mit Hilfe des *Arachis hypogaea*-Lektins ein bisher noch unbekanntes Mucin von ca. 150 kDa. Dieses Mucin wird auch in Speicheldrüsen exprimiert, besitzt eine Fibroin-ähnliche Struktur und gehört zu den durch  $\beta$ -Ecdyson regulierten Genen (U. Theopold, unveröffentlichte Daten, THEOPOLD et al. 2002). Aufgrund dieses Hinweises wurde besonders auf eine Markierung von Proteinen der Speicheldrüsen geachtet. In den Spuren der Speicheldrüsenlysate der verwendeten Larven des Alters L5d2 markierte das *Arachis hypogaea*-Lektin keine Proteinbande.

Die Speicheldrüsen von *M. sexta* ändern im Verlauf des letzten Larvenstadiums ihr Aussehen. Mit Beginn des Wanderstadiums haben sie einen vergrößerten Querschnitt, was mit der erhöhten Speichelproduktion zusammenhängt. Die Larven speicheln sich für eine bessere Fortbewegung und zum Einbohren in die Erde komplett ein (REINECKE et al. 1980). Die Untersuchungen von JOCHOVA und Mitarbeitern (1997) zeigten, daß vor dem programmierten Zelltod der Speicheldrüsenzellen die Produktion sämtlicher Proteine reduziert wird, wohingegen ein Fibroin-ähnliches Protein sehr stark exprimiert wird. Dementsprechend

wurde ergänzend das Lysat der Speicheldrüsen von Larven im Wanderstadium untersucht. In der Western-Blot-Analyse fanden sich tatsächlich Banden, die vom *Arachis hypogaea*-Lektin markiert wurden, allerdings in anderen Molekulargewichtsbereichen. Allein aus der Bindung des Lektins kann nicht auf die gleiche Identität der Proteine aus Hämocyten und Speicheldrüsen geschlossen werden, das gleiche Molekulargewicht hätte dies aber wahrscheinlicher gemacht.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie stark der Ligand des *Arachis hypogaea*-Lektins glycosyliert ist und in welcher Form die Zucker an das Protein gekoppelt sind. So ist z.B. das 150-kDa-Protein aus *D. melanogaster* laut der genomischen Sequenz lediglich 43 kDa groß, es existieren aber 68 potentielle Möglichkeiten für eine O-Glycosylierung und 10 potentielle Stellen für eine N-Glycosylierung (U. Theopold, unveröffentlichte Daten). Ein weiteres aus *Drosophila*-Zelllinien isoliertes Mucin besteht bei einer ungefähren molekularen Masse von 80 kDa zu 40% aus Zuckern. Auch hier gibt es potentielle O- und N-Glycosylierungsstellen (KRAMEROV et al. 1996, 1997). Für das hier untersuchte Protein wurden beide möglichen Glycosylierungsformen mit Hilfe von zuckerspaltenden Enzymen ausgetestet. Nach der Reaktion mit N-Glycosidase F ergab sich eine leichte Verschiebung der Proteinbande in den niedermolekularen Bereich, d.h. daß mit Hilfe dieses Enzyms einige Zuckerketten abgespalten wurden. Die Reaktion mit Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase als O-Glycosidase erbrachte keine Molekulargewichtsveränderung und das Lektin erkannte unverändert das gesuchte Protein. Dieses Ergebnis kann als Nachweis langer oder auch stark verzweigter Zuckerketten am Protein gewertet werden. Möglicherweise kam das Enzym aus sterischen Gründen nicht an seine Spaltungsstellen heran. Die Wiederholung dieses Versuchs mit einer vorherigen Neuraminidase-Inkubation könnte diese Annahme u.U. klären (siehe auch REHM 2000). Eine Verlängerung von Zuckerketten über die Grundstruktur N-acetylgalactosamin und Galactose hinaus ist für Insekten aber eher ungewöhnlich (THEOPOLD et al. 2001).

Erst nach der Bestimmung der Proteinsequenz ist es möglich, über *in situ*-Hybridisierung den Expressionsort dieses Proteins unter verschiedenen Bedingungen zu testen. Erst dann kann auch geklärt werden, ob die sphärulären Zellen tatsächlich nach einer Infektion das Protein exprimieren, oder ob das Protein aus den granulären Zellen abgegeben wird und sich an die Membran der sphärulären Zellen anlagert. Nicht ganz auszuschließen ist die Möglichkeit, daß die sphärulären Zellen nach Infektion ein neues Protein mit ähnlicher Glycosylierung exprimieren. Da bisher wenig über die Funktion der sphärulären Zellen bekannt ist, wären Untersuchungen hierzu interessant.

#### 4.5.2 Solubilisierung und Anreinigung des Liganden

Aus Versuchen zur Solubilisierung ging hervor, daß es sich bei dem durch das *Arachis hypogaea*-Lektin markierten Liganden um ein membranständiges Protein handelt. Auch für Hemomucin ist bekannt, daß es eine Domäne zur Verankerung in der Membran hat, allerdings während des Koagulationsgeschehens über Mikropartikel in die Hämolymphe abgegeben wird. Zur Solubilisierung des Hemomucins wurde das nicht ionische Detergenz Nonidet P-40 eingesetzt (THEOPOLD et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit war eine Solubilisierung mit der nicht ionischen Seife Triton X-114 im Vergleich zur ionischen Seife SDS weniger erfolgreich. Letztendlich konnte die erfolgreiche Solubilisierung mit 1% SDS auch über Ultrazentrifugation bei 128.000 x g bewiesen werden.

Leider gelang keine für die Ansequenzierung ausreichende Anreicherung des markierten Proteins mit den angewendeten Methoden, da es offensichtlich nur in geringen Mengen in den Hämocyten vorhanden ist. Die deutliche Markierung in der Western-Blot-Analyse, die eine hohe Kopienzahl vortäuschte, beruhte vermutlich auf der starken Glykosylierung des Proteins. Nach Meinung von U. Theopold ist die Suche nach der DNA-Sequenz eines vergleichbaren Proteins in *M. sexta* mit Hilfe der bekannten Sequenz aus *D. melanogaster* wenig Erfolg versprechend, da Mucine im Allgemeinen wenig konserviert sind. Deshalb wurde von einem solchen Experiment im Rahmen dieser Arbeit Abstand genommen.

Mucine sind durch repetitive Sequenzen charakterisiert, die die für O-Glycosylierungen typischen Aminosäuren betreffen. Um eventuelle Mucinkandidaten ausfindig zu machen, gibt es bisher zu wenige Informationen zum Genom von *M. sexta*.

Es sei erwähnt, daß zur Reinigung von Hemomucin 500 ml einer dichtgewachsenen *Drosophila*-Hämocytenzelllinie verwendet wurden, bei der nahezu alle Zellen das Protein enthielten (THEOPOLD et al. 1996). Für eine vergleichbare Menge an Zellen, müßten mindestens 1000 *Manduca*-Larven entblutet werden.

Alternativ wurden zwei Strategien überdacht, um den Liganden des *Arachis hypogaea*-Lektins anzureinigen. Zum einen wurden die Speicheldrüsen von Larven im Wanderstadium mit vergleichsweise hoher Proteinmenge untersucht (siehe 4.5.1). Zum anderen wurden die im Labor zur Verfügung stehenden *Manduca*-Zelllinien embryonalen Ursprungs in der Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein eines entsprechenden Proteins getestet (hier nicht dargestellt). In beiden Fällen entsprachen die durch das *Arachis hypogaea*-Lektin markierten Proteinbanden in ihrem Molekulargewicht nicht der Bande der Hämocytenlysate. Eine Anreinigung des gesuchten Proteins über einen dieser Wege wurde im Rahmen dieser Arbeit

nicht vorgenommen, da davon ausgegangen wurde, daß es sich jeweils um verschiedene Proteine mit ähnlicher Glykosylierung handelte. Eventuell sind aber für diese Unterschiede im Molekulargewicht unterschiedliche posttranslationale Modifikationen des gleichen Proteins in den verschiedenen Geweben verantwortlich. So ist es nicht gänzlich ausgeschlossen, letztendlich doch Sequenzdaten für den Liganden des *Arachis hypogaea*-Lektins über einen dieser Wege zu erhalten.

Erfolgversprechender scheinen die Hinweise, daß es sich bei dem markierten Protein um ein Fibroin-ähnliches Protein handeln könnte (siehe 4.5.1). Fibroin-Sequenzdaten anderer Lepidopteraspezies, z.B. von *Bombyx mori* und *Galleria mellonella* sind verfügbar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Damit ergibt sich die Möglichkeit, das entsprechende Gen über die Fibroin-typischen Glycin-reichen repetitiven Sequenzen zu suchen (Z. Petrin, mündliche Mitteilung).

## **4.6 Charakterisierung und Reinigung des Liganden zu MS#75**

### **4.6.1 Charakterisierung des Liganden zu MS#75**

Der Antikörper MS#75 war der einzige Antikörper aus der Fusion von WILLOTT und Mitarbeitern (1994), der in Hämocytenpräparaten der Larven Plasmatozyten, Oenozytoide und sphärule Zellen markierte. Dieses Muster veränderte sich nicht nach Infektion der Larven mit *Micrococcus luteus*. Auch in der Markierung in der Western-Blot-Analyse gab es zwischen gesunden und infizierten Larven keinen Unterschied. Daraus läßt sich schließen, daß sich das Expressionsmuster des durch MS#75 markierten Proteins während des Immun-geschehens nicht verändert. Vermutlich gehört dieses Protein zur "Grundausrüstung" der larvalen Zellen.

In Puppenpräparaten markierte der Antikörper alle Hämocyten, d.h. neben Plasmatozyten auch granuläre Zellen. Die pupalen granulären Zellen zeigten eher eine cytoplasmatische Markierung, was im Gegensatz zur membranständigen Markierung aller anderen Larven- und Puppenhämocyten steht. Dieses Muster war auch nach Behandlung der Zellen mit Triton X-100 unverändert.

Sowohl in den Querschnittpräparaten als auch in der Western-Blot-Analyse der Organlysate markierte MS#75 neben den Hämocyten lediglich die larvalen hämatopietische Organe bzw.

die Zellen in den Organen. Damit ergab sich auch die Hoffnung, über die Identifizierung des entsprechenden Antigens Informationen über das hämatopoietische Organ zu erhalten.

Je nach Behandlung der Proben für die Gelelektrophorese ergaben sich unterschiedliche Bandenmuster, wobei das Bild bei den Puppenhämozyten konstant blieb. Während der Anreicherung des Proteins aus larvalen Hämozyten zeigte sich jedoch im Allgemeinen nur eine Bande von ca. 150 kDa. Das "variable" Bandenmuster im Larvenhämozytenlysat könnte Ausdruck von Untereinheiten, unterschiedlichen Modifikationsformen oder Degradationsstadien des Proteins sein.

Interessanterweise inhibiert MS#75 Einkapselungsreaktionen *in vivo* (D. Levin, mündliche Mitteilung), sogar stärker als MS#13 (WIEGAND et al. 2000). MS#13 ist spezifisch für Plasmatozyten und markiert in der Western-Blot-Analyse ein 90-kDa-Protein. Die Isolierung des Proteins gelang lange Zeit nicht. Nun liegen erste Hinweise vor, daß es sich um ein Integrin handelt (Nardi, mündliche Mitteilung). Auch im histologischen Querschnitt der Larven zeigten sich Parallelen zwischen MS#75 und MS#13. Beide Antikörper markierten außer den Hämozyten lediglich Zellen im hämatopoietischen Organ (eigene Beobachtungen, siehe 3.10.1).

Ob es sich bei dem mit MS#75 markierten Protein auch um ein Integrin handelt, kann nur über die Reinigung und Sequenzierung des Proteins geklärt werden. Bisher ist noch kein Integrin aus Lepidopteren bekannt. Aus *D. melanogaster* liegen einige Integrin-Sequenzdaten vor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ein Zusammenhang zwischen Integrinen und Hämozyten wurde aber noch nicht festgestellt. Wie alle Integrine setzen sie sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammen, die nicht kovalent verbunden sind. Die angegebenen Molekulargewichte sind sehr variabel. Das durch MS#75 markierte 150-kDa-Protein läge im Molekulargewichtsbereich der  $\alpha$ -Untereinheiten.

Es gibt in der Literatur einige Hinweise, die die Anwesenheit von Integrinen in der Membran der Hämozyten wahrscheinlich machen:

- Mit Hilfe von RGD-Sequenzen, einer Bindungssequenz für Integrine, gelang es, Einkapselungsreaktionen durch Hämozyten zu hemmen (PECH & STRAND 1995, 1996).
- Für Fokalkontakte, wie sie z.B. von Plasmatozyten auf Glasoberflächen zu beobachten sind oder von Zellen für die Initiation der Zellteilung ausgebildet werden müssen (siehe 4.10.2), werden Integrine benötigt (ALBERTS et al. 2001, HORWITZ 1997).
- Das Croquemort-ähnliche Protein aus dem Vertebratenbereich - CD36 - benötigt für seine Funktion die Interaktion mit Integrinen (z.B. CHEN et al. 2000). Croquemort wurde in der

Membran embryonaler Makrophagen in *D. melanogaster* nachgewiesen (FRANC et al. 1996, 1999).

- Integrine wurden auch auf den Blutzellen der Cnidaria, Crustacea und Echinodermata nachgewiesen (BURKE 1999).

#### 4.6.2 Solubilisierung und Anreinigung des Liganden

Der Versuch, das gesuchte Protein aus der Zellmembran zu solubilisieren, stellte sich als sehr aufwendig heraus. Da Membranproteine unterschiedlich auf verschiedene Detergenzien reagieren, konnten keine konkreten Rezepte oder Erfahrungen genutzt, sondern lediglich verschiedene Möglichkeiten ausprobiert werden (REHM 2000). Nach ersten Tests stellte sich zunächst der Einsatz von Chaps als erfolgreichste Methode heraus. Der anschließende Solubilisierungsnachweis über eine Sepharose Cl 6B -Säule bestätigte den Erfolg allerdings nicht.

Der erste Anreinigungsversuch im analytischen Maßstab über Immunpräzipitation war erfolgreich. Die Anreinigung einer ausreichenden Proteinmenge zum Ansequenzieren im größeren Maßstab scheiterte dann letztendlich daran, daß es nicht gelang, das Protein zu solubilisieren. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind verschiedene Erklärungen möglich:

- Mißinterpretation der Ergebnisse der Immunpräzipitation
- Negativer Einfluß einer höheren Zellzahl auf die Solubilisierung des Proteins.

Zudem könnte in den Lösungen nach der Solubilisierung die Detergenzkonzentration zu gering gewesen sein, so daß eine erneute Zusammenlagerung der verschiedenen Proteine und Membranbestandteile möglich war.

Der methodische Unterschied der Immunpräzipitation im Vergleich zur Affinitätschromatografie liegt vor allem im rigorosen "Abkochen" des Proteins vom Antikörper mit SDS-Probenpuffer. Bei der Affinitätschromatografie wurde versucht, das Protein im nativen Zustand aus der Bindung mit dem Antikörper zu lösen. Aus diesem Vergleich leitet sich die Idee ab, daß das denaturierte Protein evtl. leichter zu handhaben ist als das native. Erste Versuche ein mit SDS-Probenpuffer gekochtes Zellysat über die Affinitätschromatografie-säule zu trennen, führte zu einem starken "Ausbluten" des gebundenen Antikörpers von der Säulenmatrix (hier nicht dargestellt).

Für weitere Versuche werden daher zwei Strategien empfohlen. Zum einen könnte die Immunpräzipitation in einem größeren Maßstab wiederholt und die geringen Proteinmengen

z.B. über die MALDI-TOF-Methode analysiert werden. Allerdings ist aufgrund mangelnder "time-of-flight"-Daten für *Manduca*-Proteine nicht unbedingt mit einer Identifizierung des gesuchten Proteins zu rechnen. Zum anderen wäre über eine weitere Optimierung des Denaturierungsansatzes nachzudenken. Allein, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion mit MS#75 zur Anreicherung genutzt werden kann, ist als erster Garant einer letztendlich erfolgreichen Isolierung und Identifizierung des gesuchten Proteins zu werten.

Eine Alternative bildet das Screenen einer Hämocyten-cDNA-Bank mit dem monoklonalen Antikörper MS#75. Eine cDNA-Bank aus Hämocyten von infizierten Larven steht der AG Trenczek seit 2001 zur Verfügung. Erste Screen-Versuche brachten aber keinen Erfolg (C. Lesch, persönliche Mitteilung). Es ist aber zu bedenken, daß die Expression des gesuchten Proteins infolge einer Infektion offensichtlich nicht ansteigt, wie die immunhistochemischen Präparate zeigten (siehe 4.6.1). Sollte es sich bei dem markierten Protein tatsächlich um ein Intergrin handeln, ist es eher, wie für Integrine beschrieben (ALBERTS et al. 2001), konstitutiv und in geringer Kopienzahl exprimiert.

#### **4.7 Trennung von Hämocyten über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation**

Eine Fraktionierung der Gesamthämocytenpopulation in die verschiedenen Typen ist z.B. zur Untersuchung der Eigenschaften und des Zusammenspiels der einzelnen Zelltypen sinnvoll. Einen experimentellen Ansatz zur Fraktionierung der larvalen Hämocyten von *M. sexta* gab es vor Beginn der vorliegenden Arbeit lediglich durch MEAD und Mitarbeiter (1986). Ziel war es deshalb, eine Separation der einzelnen Hämocytentypen zu etablieren. Gleichzeitig sollte dabei das Verhalten der Hämocyten aus Larven und Puppen im Dichtegradienten verglichen werden. Ein Fernziel war weiterhin, nach einer erfolgreichen Fraktionierung die Proteinzusammensetzung der Proben über eine zweidimensionale Gelelektrophorese zu vergleichen.

Die Ergebnisse, die von MEAD und Mitarbeitern (1986) erreicht wurden, waren im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht zu reproduzieren. In der zitierten Arbeit gelang es über einen 54%igen kontinuierlichen Gradienten drei voneinander abgrenzbare Zellbanden, die jeweils andere Zelltypen enthielten, zu isolieren und damit die Typen voneinander zu trennen. Dies gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht. Lediglich die prinzipielle Lage von Oenocytoiden, sphäkulen Zellen (beide in Bereichen hoher Dichte) und dem Großteil der Plasmatozyten (im Dichtebereich über den Oenocytoiden und sphäkulen Zellen) konnte bestätigt werden. Beson-

ders abweichend von den publizierten Daten verhielten sich die granulären Zellen. In den eigenen Untersuchungen waren sie fast über den gesamten Gradienten verteilt. Dabei trat eine Häufung der granulären Zellen in zwei Bereichen auf, eine im Bereich der Plasmatozyten und eine im Bereich geringerer Dichte. Eventuell handelt es sich dabei um zwei "Subpopulationen".

Eine Trennung der larvalen Hämocytyentypen wurde auch bei anderen Lepidopteraspezies versucht. PECH und Mitarbeitern (1994) gelang für die Hämocyten von *Pseudoplusia includens* sogar eine reproduzierbare Trennung von einer Fraktion granulärer Zellen, einer Fraktion Plasmatozyten und einer Fraktion Oenocytoide und sphärunder Zellen über einen diskontinuierlichen Gradienten, wobei die Dichten dieser Zellen denen von *M. sexta* ähnlich sind. ANGGRAENI und RATCLIFFE (1991) separierten die Hämocyten von *Galleria mellonella* über einen kontinuierlichen Gradienten in ähnlicher Weise, allerdings besaßen die Plasmatozyten hier eine geringere Dichte als die granulären Zellen. Eventuell ist dies ein Hinweis darauf, daß die Dichte der Zellen mit dem Alter der Larven korreliert. Vermutlich verwendeten ANGGRAENI und RATCLIFFE (1991) *Galleria*-Larven am Ende des letzten Larvenstadiums, wohingegen die Trennung der Hämocyten von *M. sexta* sowohl von MEAD und Mitarbeitern (1986) als auch in der vorliegenden Arbeit mit Tieren zu Beginn des letzten Larvenstadiums durchgeführt wurde. Wie aus der Fraktionierung der pupalen Hämocyten ersichtlich, ändern offensichtlich sowohl granuläre Zellen als auch Plasmatozyten ihre spezifische Dichte im Verlauf der Entwicklung.

Bisher gibt es keine Angaben über die Anwendung der Percolldichtegradientenzentrifugation zur Separation von Puppenhämocyten. Diese Trennung war wesentlich erfolgreicher als der Versuch, die Hämocyten der Larven zu trennen. Pupale Plasmatozyten reicherten sich in den oberen Fraktionen des eingesetzten 40%igen kontinuierlichen Gradienten an, vermutlich als Konsequenz aus geringer Dichte und ausgeprägtem Spreitungsvermögen. Pupale granuläre Zellen dagegen hatten offensichtlich eine sehr hohe Dichte, evtl. auch aufgrund der Aufnahme von Speicherproteinen (siehe 4.4.1). Sie waren in den unteren Fraktionen zu finden. Diese Trennung war eindeutig und reproduzierbar.

Sowohl für Hämocyten aus Larven als auch aus Puppen wurde letztendlich ein diskontinuierlicher Percollgradient entworfen. Die granulären Zellen der Larven konnten dadurch in einer Fraktion angereichert werden, waren jedoch immer mit Plasmatozyten kontaminiert. Eine weitere Fraktion enthielt alle vier identifizierten Hämocytyentypen. Die Puppenhämocyten konnten mit dem eingesetzten Gradienten in Plasmatozyten und granuläre Zellen fraktioniert



werden. Durch die starken Unterschiede zwischen den Zellseparationen individueller Tiere war es stets notwendig, die Trennungen auf ihre Qualität hin zu prüfen.

Die Trennung der larvalen Hämocyten blieb unbefriedigend. Vor einer weiteren Optimierung des Gradienten müßte zuerst die Frage geklärt werden, ob das offensichtliche Vorkommen von zwei Subpopulationen granulärer Zellen mit dem Alter der Larven korreliert. Eine Untersuchung sowohl der Auftrennung von Hämocyten aus Larven direkt zu Beginn des fünften Larvenstadiums (L5d0) als auch von Hämocyten aus Larven während des Wanderstadiums könnte Aufschluß darüber geben. Für eine Trennung der Oenocytoide und sphäkulen Zellen von Plasmatozyten und granulären Zellen sollte in Folgeversuchen ein höher prozentiger kontinuierlicher Percollgradient ausgetestet werden. Eventuell gelänge auf diese Weise sogar eine Anreicherung von Oenocytoiden gegenüber sphäkulen Zellen, da letztere eine etwas geringere Dichte zeigen.

Zur Anreicherung granulärer Zellen und Plasmatozyten ist prinzipiell über eine alternative Methode nachzudenken. Eine Anreicherung von Plasmatozyten aus Larven von *G. mellonella* wurde z.B. durch den Einsatz von Nylonwolle erreicht (WIESNER & GÖTZ 1993). Durch das Vorhandensein spezifischer monoklonaler Antikörper für granuläre Zellen und Plasmatozyten in unserem Labor wäre eine Trennung der Zellen über Antikörper-gekoppelte magnetische Kugeln oder über Fluoreszenzzytometrie möglich.

#### **4.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Der Vergleich larvaler und pupaler Hämocyten über eine Auftrennung der Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese erwies sich als sehr erfolgversprechend. Eine Identifizierung der als unterschiedlich angesehenen Proteinspots war nicht möglich, da es bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine vergleichbaren Arbeiten über Insektenhämocyten gibt. Darüberhinaus gibt es keine "Bestandsaufnahme", welche Proteine von den Hämocyten im Allgemeinen exprimiert oder aufgenommen werden. Für die Expression einiger Immunproteine in Hämocyten liegen Nachweise vor (siehe 4.2.2.4). Für die Hämocyten von *D. melanogaster* ist bekannt, daß sie Bestandteile der extrazellulären Matrix synthetisieren, dies gilt auch für Lacunin bei *M. sexta* (siehe 4.2.2.1). Bekannt ist auch, daß Hämocyten am Ab- und Umbau zumindest der Basallamina diverser Organe beteiligt sind (siehe 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3, 4.2.2.9). Damit ist eine Aufnahme diverser Moleküle verbunden. Mit Hilfe

von Antikörpern bekannter Spezifität konnte in der vorliegenden Arbeit die Zunahme von Lipophorin und Arylphorin in den Granulen der granulären Zellen der Puppe im Vergleich zur Larve gezeigt werden (siehe 4.4.1).

Spence und Mitarbeiter trennten Hämolympfplasmaproteine von Larven und Puppen über zweidimensionale Gelelektrophorese und fanden unter den Puppenproteinen im Vergleich zu den Larvenproteinen Spots, die sie u.a. Lysozym, Attacin und Hemolin zuordneten (HUGHES et al. 1983, HURLBERT et al. 1985). Eine Identifizierung erfolgte nicht. Daß immunrelevante Proteine im Puppenplasma unabhängig von einer Infektion detektierbar sind, ist inzwischen mehrfach belegt (z.B. SAMAKOVLIS et al. 1990, TRENCZEK 1998, CHUNG & OURTH 2000). Ob auch Hämozyten zu diesen erhöhten Proteintitern beitragen und / oder diese Proteine im Zellinneren akkumulieren, ist nicht im Detail bekannt.

Insgesamt gibt es nur vereinzelte belegte Anwendungen für die zweidimensionale Gelelektrophorese in der Insektenforschung (z.B. TRUMBLY & JARRY 1983, ERICSSON 1999, HAN et al. 1999). Die Gründe liegen vermutlich zum einen im enormen Aufschwung der molekularbiologischen Techniken, der Standardisierung dieser Methoden durch kommerziell erhältliche Kits und die relative Kostengünstigkeit, so daß selbst kleine Labore sich eine Standardausrüstung leisten können. Die "Proteomics"-Forschung dagegen ist teuer in der Ausstattung und erfordert vor allem sehr viel Know-how. Außerdem ist eine gewisse Proteinmenge erforderlich, deren Gewinnung bei relativ kleinen Individuen wie den Insekten problematisch sein kann. Für die meisten Fragestellungen in der Insektenforschung ist daher die molekularbiologische Herangehensweise die einfachere und erfolgversprechendere Variante. Doch es bleibt zu bedenken, daß so nicht zwangsläufig Aussagen über die Veränderungen der Proteinzusammensetzung einer Zelle gemacht werden können.

Für die in der vorliegenden Arbeit bearbeitete Fragestellung ist die zweidimensionale Gelelektrophorese die Methode der Wahl. Beim Vergleich der larvalen und pupalen Hämozyten geht es nicht nur um den Nachweis von Proteinen, die unterschiedlich in den entsprechenden Zellen exprimiert werden, sondern auch um Proteine, die zwecks Speicherung, Transport oder Verdau aufgenommen werden, z.B. nach der Desintegration der Basallamina. Letztere lassen sich nicht durch Expressionstudien in den Hämozyten nachweisen.

Schon allein aus den ersten Versuchen, die in dieser Arbeit dargestellt sind, konnten viele unterschiedliche Proteinspots gefunden werden. Der Vergleich zwischen den Proteinen der Hämozyten der Larven und Puppen zeigte neben "neuen" Spots auf jeweils einem der beiden Gele auch viele Spots, die sich in ihrer Stärke von einem Gel zum anderen unterschieden. Die quantitative Auswertung dieser Muster war schwierig, da sich auch die relative Zusammen-

setzung der Hämozytenpopulation von Larve zu Puppe verändert, so daß die unterschiedliche Stärke einzelner Spots allein darauf zurückzuführen sein kann. Es wurde daher angestrebt, die Hämozytentypen voneinander zu trennen, um z.B. einen Vergleich der larvalen granulären Zellen mit den entsprechenden pupalen Zellen durchführen zu können.

Beim Vergleich der Proteinmuster des Lysats der hämatopoietischen Organe mit dem Lysat der Larvenhämozyten fiel auf, daß sich wesentlich mehr "neue" Spots im Gel der Larvenhämozyten im Vergleich zu den hämatopoietischen Organen fanden als umgekehrt. Dieses Bild paßt zur Vorstellung, daß sich im hämatopoietischen Organ undifferenzierte Vorläufer- oder Stammzellen bzw. hauptsächlich Plasmatozyten befinden (siehe 4.10.1). Bei einigen der Proteinspots, die sich nur im Lysat der hämatopoietischen Organe fanden, kann es sich um Proteine der Basallamina handeln, die die einzelnen Loben umgibt, oder um Proteine der trachealen Epidermiszellen, die mit den Tracheen bis in die einzelnen Loben reichen. Für einige Insektenpezies wurden besondere Zellen in den hämatopoietischen Organen beschrieben. LANOT und Mitarbeiter (2001) bezeichneten sie als sekretorische Zellen. Nach MONPEYSSIN und BEAULATON (1978) gibt es diese besonderen Zellen in den hämatopoietischen Organen der Lepidoptera nicht. Sollten sie dennoch hier vorhanden sein, könnten bestimmte Proteinspots spezifisch für diesen Typ sein.

Der Vergleich der beiden Fraktionen aus der Separation der Larvenzellen zeigte, daß mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese auch mit der Identifizierung von für Hämozytentypen spezifischen Proteinen gerechnet werden kann. In Kombination mit der vergleichbaren Darstellung des hämatopoietischen Organs kann der Frage nachgegangen werden, welche Hämozyten letztendlich aus dem hämatopoietischen Organ generiert werden, um z.B. zu "Reifungsmarkern" zu gelangen.

Im Vergleich zum Screening mit monoklonalen Antikörpern gibt es wesentliche Vorteile:

- Monoklonale Antikörper können neben Proteinen auch gegen Kohlenhydrate, Lipide und DNA gerichtet sein (FRIEMEL 1991). Auf einem 2D-Gel können unterschiedlich exprimierte Proteine direkt untersucht werden.
- Monoklonale Antikörper können, sofern sie gegen native Zellen gewonnen wurden, ihr Epitop nach der Aufbereitung der Probe für die Gelelektrophorese teilweise nicht mehr erkennen. Damit ist eine weitere Untersuchung des korrespondierenden Antigens z.B. über Western-Blot-Analyse unmöglich. Im 2D-Gel können die Proteine direkt ausgewertet werden.
- Die Isolierung und Identifizierung von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern ist teilweise erst nach verschiedenen Reinigungsschritten möglich und kann z.B. an einer geringen

Antigen-Antikörper-Affinität scheitern. Im 2D-Gel können Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt der interessanten Proteine abgelesen und für eventuelle Reinigungsschritte genutzt werden. Eine Anreinigung ist nach dem heutigen Stand der Technik nicht mehr in jedem Fall notwendig, denn über das "Picken" der Spots und einer nachfolgenden Massenspektroskopie oder Mikrosequenzierung ist es möglich, die Proteine aus dem Gel zu identifizieren.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese hat aber auch Nachteile, die besonders deutlich werden, wenn Membranproteine untersucht werden sollen (REHM 2000, SANTONI et al. 2000). Für die in unserem Labor bearbeiteten Fragestellungen sind Membranproteine besonders interessant, z.B. in Bezug auf Signaltransduktion, Zelladhäsion und Phagozytose. Man rechnet, daß 30% aller Proteine der Zelle Transmembranproteine sind. Diese Proteine bereiten in der Isoelektrischen Fokussierung sehr viele Schwierigkeiten, denn nur wenn sie solubiliert vorliegen, bewegen sie sich im pH-Gradienten. Dabei muß mit der Auswahl der Detergenzien vorsichtig umgegangen werden; SDS-Proteinkomplexe z.B. fokussieren nicht.

Über die Proteine von *M. sexta* gibt es nur wenige Daten, so daß eine Identifizierung der Proteine aus dem Gel über Massenspektroskopie, z.B. MALDI-TOF, nur selten zu den erhofften Ergebnissen führen wird. Daher muß mit einer Mikrosequenzierung über Edman-Abbau gerechnet werden, die aber eine wesentlich größere Proteinmenge voraussetzt. Wird eine größere Proteinmenge auf das Gel geladen, so führt das zu einer wesentlichen Verschlechterung der Auflösung. Die interessanten Bereiche sollten daher mit "Zoom-in" Gelen aufgetrennt werden.

Die auf einem 2D-Gel darstellbaren Proteine sind nur ein Ausschnitt des Gesamtprotein gehaltes einer Zelle. Immerhin wird im Allgemeinen diese Menge auf 2/3 aller Zellproteine geschätzt (SANTONI et al. 2000). In Anbetracht der wenigen Informationen, die es zur Proteinausstattung von Hämocyten gibt, bleiben damit genug Möglichkeiten, zu Ergebnissen über Entwicklung und Funktion dieser Zellen zu gelangen. Dabei sind viele Ansätze vorstellbar. Neben der Gegenüberstellung von Zellen und Plasma von Larven und Puppen ist besonders eine Fraktionierung der Zellproteine in lösliche, membranassoziierte und integrale Membranproteine interessant.

## **4.9 *In vitro*-Kultivierung von Hämozyten in Anwesenheit von *b-Ecdyson***

### **4.9.1 Bemerkungen zur *in vitro*-Kultivierung der Hämozyten**

Die Etablierung von *in vitro*-Assays mit Hämozyten wird in vielen Laboren angestrebt. Der große Vorteil liegt in der Möglichkeit, die Hämozyten isoliert zu betrachten und die Einflüsse einzelner Komponenten aus dem Insektenorganismus auf diese Zellen zu untersuchen, z.B. von Hormonen, wie in der vorliegenden Arbeit, oder von modulierend wirkenden Peptiden aus der Hämolymphe (z.B. KANOST et al. 1994, CLARK et al. 1997).

Die *in vitro*-Kultivierung der Insektenhämozyten wird durch mehrere Faktoren erschwert. Zum einen werden die Hämozyten über das Setzen einer Wunde aus dem Tier gewonnen. Es ist anzunehmen, daß die Hämozyten, die ja u.a. für den Wundverschluß und die Bekämpfung eventuell eindringender Pathogene verantwortlich sind, eine Aktivierung erfahren. Zum anderen gehen durch weitere Aufbereitungsschritte sehr viele Zellen kaputt. Letztendlich werden die Hämozyten in Kulturgefäße ausgesät, die für sie eine fremde Oberfläche darstellen. Das Spreiten der Plasmatozyten ist in dieser Hinsicht als eine Art Immunreaktion zu werten. In der Regel kann also für *in vitro*-Assays nicht von naiven Zellen ausgegangen werden. Das gestaltet die Interpretation der Beobachtungen schwierig. Um die Zellen in einem möglichst "naturnahen" Zustand zu halten, sind vor allem die Kultivierungsbedingungen zu optimieren. So wurden beispielsweise die Hämozyten von *Pseudoplusia includens* in MatriGel beschichteten Kulturgefäßen kultiviert (PECH et al. 1995). Diese Beschichtung imitiert eine intakte Basallamina (allerdings von Vertebraten). Die Hämozyten blieben abgerundet und frei flottierend im Medium. Entsprechende Beobachtungen konnten für Hämozyten aus *Pieris brassicae* aber nicht für Hämozyten aus *M. sexta* gemacht werden (Trenczek, persönliche Mitteilung). Die *Manduca*-Zellen adhärirten auf MatriGel ebenso wie auf Glas oder Plastik. Andere Möglichkeiten sind zu testen z.B. die Verwendung von Kulturgefäßen mit einer besonderen Ladung oder Beschichtung oder "Roll over"-Inkubationen.

Vergleichbare Arbeiten in Bezug auf die primäre Kultivierung von Hämozyten aus Lepidopteren liegen kaum vor. WALTERS (1970) beobachtete pupale Hämozyten verschiedener Seidenraupenarten *in vitro*. JUDY und MARKS (1971) kultivierten larvale Hämozyten aus *M. sexta* unter Ecdysoneinfluß, eine detaillierte Auswertung gibt es dazu allerdings nicht.

Die Etablierung einer Dauerkultur aus Hämozyten könnte die oben beschriebenen Probleme lösen. Außerdem wären mehrere Versuche aus ein und demselben Zellansatz möglich. Die großen individuellen Unterschiede der Tiere spielten keine Rolle mehr. Es gibt nur vereinzelt

Insektenzelllinien, die ursprünglich aus Hämocyten entstanden sind, so u.a. l(2)mbn aus *D. melanogaster* (GATEFF 1978) und MD-66 aus *Malacosoma distria* (SOHI 1971). Aus *M. sexta* wurde eine embryonale Zelllinie gewonnen (GV1, LYNN & OBERLANDER 1981). Alle drei Zelllinien sind in Bezug auf ihre Reaktion gegenüber  $\beta$ -Ecdyson gut untersucht und sollen in der Diskussion als Vergleich für die vorliegenden Versuche dienen.

#### 4.9.2 Adhärenz und Migrationsverhalten der Hämocyten *in vitro*, Einfluß von $\beta$ -Ecdyson

Bei der *in vitro*-Kultivierung der Hämocyten wurden weitere Unterschiede zwischen den Hämocyten von Larven und Puppen deutlich. Die pupalen Plasmatozyten zeigten bereits 10 min nach dem Aussäen in Grace-Insektzellmedium eine deutliche Adhärenz zur Oberfläche (siehe auch Präparate für die Immunhistologie), flachten stark ab und bedeckten eine viel größere Fläche als die Plasmatozyten der Larven. Im Folgenden zeigten die Plasmatozyten der Puppen ein viel ausgeprägteres Migrationsverhalten im Vergleich zu den Zellen der Larven. Nach 48 h Inkubation waren bereits starke Aggregationen zu beobachten.

Die Zunahme der Adhärenz der Plasmatozyten im Verlauf des letzten Larvenstadiums wurde auch von LANOT und Mitarbeitern (2001) in *D. melanogaster* beobachtet. Durch Injektion von  $\beta$ -Ecdyson in Larven des letzten Larvenstadiums konnte eine entsprechende Veränderung der Plasmatozyten hervorgerufen werden. Ein ähnlich angelegter Versuch mit Larven von *M. sexta* erbrachte nicht das erhoffte Ergebnis (Holthusen, persönliche Mitteilung). Vermutlich hat eine einmalige Injektion mit  $\beta$ -Ecdyson bei dem wesentlich längeren letzten Larvenstadium von *M. sexta* einen zu geringen Einfluß und sollte durch Perfusionsversuche ersetzt werden (siehe auch DOMINICK & TRUMAN 1985). Als Alternative wurde der hier dargestellte Versuch im *in vitro*-System entwickelt.

Sowohl SOHI und Mitarbeiter (1995) für MD-66, als auch DIMARQ und Mitarbeiter (1997) für l(2)mbn und LAN und Mitarbeiter (1997) für GV1 beschrieben eine verstärkte Adhärenz und Aggregationsbestreben der Zellen nach  $\beta$ -Ecdysongabe. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden auch für die larvalen Plasmatozyten eine stärkere Adhärenz und Migration unter Ecdysoneinfluß erwartet, in etwa vergleichbar mit dem Verhalten unbehandelter Puppenhämocyten *in vitro*. Dieses Ergebnis wurde nicht beobachtet. Sowohl larvale als auch pupale Plasmatozyten wurden in ihrem Migrationsverhalten durch die Anwesenheit von  $\beta$ -Ecdyson inhibiert.

Die beobachtete Migrationshemmung kann zwei Ursachen haben: Zum einen kann sie auf eine inhibitorische Wirkung des  $\beta$ -Ecdysons auf die für die Migration verantwortlichen

Bestandteile der Zelle zurückzuführen sein (Rezeptoren, Signalübertragung, Cytoskelett etc.). Zum anderen wäre die Verhinderung der Migration durch die Zunahme der Adhärenz der Zellen an Ort und Stelle vorstellbar.

Eine verstärkte Adhärenz der Hämocyten durch den Einfluß von  $\beta$ -Ecdyson wäre im Hinblick auf die diskutierte Funktion dieser Zellen während der Metamorphose vorstellbar. Die Anlagerung der Hämocyten an die zu desintegrierende Basallamina ist Voraussetzung für entsprechende Aktivitäten (siehe 4.2.2.1). Die beobachtete Abnahme der frei flottierenden Hämocytenpopulation am Ende des letzten Larvenstadiums bis zum Puppenstadium unterstützt diese Hypothese (siehe 4.1.2).

#### 4.9.3 Apoptose unter dem Einfluß von $\beta$ -Ecdyson

In den Präparaten der Larvenhämocyten wurden in den mit  $\beta$ -Ecdyson behandelten Kulturen mehr fragmentierte Zellkerne beobachtet als in den Kontrollen. In den Puppenpräparaten waren im Vergleich zu den Larvenzellen viele Hämocyten mit fragmentierten Kernen zu finden, eine Ab- oder Zunahme dieses Phänomens unter  $\beta$ -Ecdyson im Vergleich zu den anderen Ansätzen war aber nicht erkennbar. Interessanterweise wurden diese Zellkerne immer innerhalb von Zellaggregaten gefunden. Die Identifizierung der entsprechenden Zellen war schwierig. In den Puppenpräparaten waren eher die Kerne der Plasmatozyten betroffen.

Die durch den interkallierenden DNA-Farbstoff DAPI markierten "Punkte" weisen auf tote Zellen in der Kultur hin. Ob diese Zellen aufgrund von apoptotischen oder nekrotischen Vorgängen letztendlich einen solch strukturierten Zellkern aufweisen, müßte in nachfolgenden Versuchen mit Hilfe anderer Methoden (z.B. TUNEL-Assay für den Nachweis der Apoptose) untersucht werden.

Zumindest für die larvalen Hämocyten ist anhand der Beobachtungen zu vermuten, daß  $\beta$ -Ecdyson ein vermehrtes Sterben der Zellen in der Kultur auslöste. Dabei wird in der Interpretation die Apoptose-Hypothese favorisiert. Im Verlauf der Metamorphose werden viele larvale Organe bzw. bestimmte Organbereiche durch programmierten Zelltod entfernt. Die Induktion dieser Vorgänge durch  $\beta$ -Ecdyson ist nachgewiesen (Bsp.: HEGSTROM & TRUMAN 1996, JIANG et al. 1997a, FUJIWARA & OGAI 2001, TSUZUKI et al. 2001, ZEE & WEEKS 2001).

Vermutlich bilden die toten Zellen in der Kultur den "Keimherd" der beobachteten Aggregationen. Wie DIMARCQ und Mitarbeiter (1997) für die *Drosophila*-Zelllinie l(2)mbn nachweisen konnten, steigert die Anwesenheit von  $\beta$ -Ecdyson die Phagozytosekapazität und die Expres-

sion von Scavenger-Rezeptoren. RESS und Mitarbeiter (2000) beobachteten bei der gleichen Zelllinie nach  $\beta$ -Ecdysongabe eine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen. Diese Zellen wurden durch andere Zellen in der Kultur phagozytiert.  $\beta$ -Ecdyson könnte also beide Prozesse auslösen, zum einen die Apoptose einiger Zellen, zum anderen die Fähigkeit anderer Zellen, apoptotische Zellen zu erkennen und zu entfernen.

Es ist vorstellbar, daß in der *in vitro*-Kultur ähnliche Prozesse ablaufen wie bei einer Einkapselungsreaktion. Nach der Hypothese von M.R. Strand und Mitarbeitern sind es granuläre Zellen, die sich als erste an die fremde Oberfläche heften und dort apoptotisch werden (PECH & STRAND 1996, LORET & STRAND 1998, PECH & STRAND 2000). Dabei werden Faktoren frei, die Plasmatozyten anlocken und zum Bilden der Kapsel veranlassen (PECH & STRAND 1996, STRAND & CLARK 1999). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Migration der Plasmatozyten zu bestimmten "Zentren" und die dortige Aggregation dieser Zellen läßt sich unter diesem Gesichtspunkt erklären. Weiterhin konnten die Wissenschaftler um M.R. Strand nachweisen, daß Plasmatozyten Faktoren ausschieden, die eine Apoptose der granulären Zellen bewirkten. Dabei ist interessant, daß vorinkubiertes Medium von stark gespreiteten Plasmatozyten in wesentlich stärkerem Maße die Apoptose der granulären Zellen auslöste als Medium von nicht gespreiteten Plasmatozyten (PECH & STRAND 2000). Unter der Voraussetzung, daß  $\beta$ -Ecdyson in den vorliegenden Versuchen die Adhärenz der Plasmatozyten erhöhte (siehe 4.9.2), ließe sich eine größere Anzahl apoptotischer Kerne in den Ansätzen mit  $\beta$ -Ecdyson als sekundärer Effekt erklären. Es bleibt aber zu beachten, daß es offensichtliche Unterschiede zwischen den Spezies in der Abfolge der Zellaktionen während einer Einkapselungsreaktion gibt (WIEGAND et al. 2001).

In den hier dargestellten Versuchen wurde besonderer Wert auf die Oenozytoide gelegt, denn im Verlauf der vorliegenden Arbeit ergaben sich Hinweise auf eine apoptotische Reaktion dieser Zellen auf  $\beta$ -Ecdyson. Oenozytoide waren die einzigen Hämocyten, die im immunhistologischen Präparat eine Markierung mit den Anti-Ecdysonrezeptor-Antikörpern zeigten (siehe 4.4.3). Im Verlauf des letzten Larvenstadiums verschwinden sie nachweislich aus der frei flottierenden Hämocytenpopulation (siehe 4.1, 4.2.2). Leider spiegelte sich die hohe Fragilität der Zellen dieses Types auch in der *in vitro*-Kultur wider, so daß diesbezüglich keine Aussage getroffen werden konnte.



#### 4.9.4 Weitere mögliche $\beta$ -Ecdysonwirkungen

Die Regulation der Genexpression und damit auch des Verhaltens der Zellen durch  $\beta$ -Ecdyson ist sehr vielschichtig. Zumindest für *D. melanogaster* wird das sogenannte Ashburner-Modell postuliert. Es sagt u.a. aus, daß einige Gene direkt unter dem Einfluß des Ecdysons exprimiert werden ("early puff genes", "late early puff genes"), wogegen andere zwar den Ecdysonpeak für die Expression benötigen, aber erst exprimiert werden, wenn der Ecdyson-Rezeptor-Komplex nicht mehr vorhanden ist ("late late puff genes") (ASHBURNER et al. 1974, THUMMEL 2002). In den vorliegenden Versuchen wurden die Hämozyten durchgängig mit  $\beta$ -Ecdyson inkubiert. Bestimmte Veränderungen wären eventuell erst nach dem Entfernen des  $\beta$ -Ecdysons aus der Kultur aufgetreten, wie z.B. von ZEE und WEEKS (2001) bei der *in vitro*-Kultivierung von Motoneuronen beobachtet. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, daß  $\beta$ -Ecdyson *in vivo* in der Hämolymphe nur eine Halbwertszeit von drei Stunden in Larven und einem Tag in Puppen hat (CHAPMAN 1998).

Ein kritischer Punkt bei den durchgeführten Versuchen, ist die extrem hohe Hormonkonzentration, die erst zu einer morphologisch sichtbaren Veränderung der Hämozyten führte. Im Insektenorganismus selbst ist die Konzentration des  $\beta$ -Ecdysons entscheidend für seine Wirkung (THUMMEL 1996, CHAPMAN 1998). Die maximalen Konzentrationen in der Hämolymphe liegen bei ca. 2  $\mu\text{g/ml}$  ( $4 \times 10^{-6}$  M) vor der Häutung zur Puppe und 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $1 \times 10^{-5}$  M) während des Puppenstadiums (BOLLENBACHER et al. 1981, WOLFGANG & RIDDIFORD 1986). Die letztendlich verwendeten Ecdysonkonzentrationen in den vorliegenden Untersuchungen betragen 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $1 \times 10^{-5}$  M), 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $1 \times 10^{-4}$  M) und 250  $\mu\text{g/ml}$  ( $5 \times 10^{-4}$  M), was wesentlich über den *in vivo*-Verhältnissen liegt.

*In vitro* konnte an einigen Zelllinien und Organen gezeigt werden, daß niedrige  $\beta$ -Ecdysonkonzentrationen die mitotische Aktivität der Zellen erhöhten während hohe Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die Zellteilung hatten bzw. zum Zelltod führten (z.B. MITSUHASHI & GRACE 1970, WYSS 1976, COTTAM & MILNER 1997).

Demgegenüber konnte bei anderen Versuchen eine Dosis-Zeitabhängigkeit der Veränderungen auf  $\beta$ -Ecdyson ermittelt werden: Je höher die Dosis, desto schneller trat die Reaktion ein (z.B. RIDDIFORD 1976, 1978, SOHI et al. 1995). Die Ermittlung einer solchen Abhängigkeit war für die Hämozyten unter den hier angewendeten Versuchsbedingungen nicht möglich. Das starke Aggregationsbestreben der Hämozyten verhinderte das Beobachten anderer morphologischer Veränderungen während eines längeren Zeitraumes.

Die Reaktion der Zellen auf  $\beta$ -Ecdyson wurde in der vorliegenden Arbeit nur rein morphologisch ausgewertet. Für eventuelle Folgeversuche wäre der Vergleich der Proteinexpression der Zellen ohne und mit  $\beta$ -Ecdyson interessant. Zumindest für die *Drosophila*-Blutzelllinie l(2)mbn wurde nachgewiesen, daß  $\beta$ -Ecdyson die Expression von immunrelevanten regulatorischen Proteinen bewirkt (DIMARCQ et al. 1997). Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von entsprechenden Rezeptoren, die ihrerseits auch von  $\beta$ -Ecdyson reguliert werden (LAN et al. 1997, siehe 4.4.3). In ersten Versuchen mit Hilfe der Anti-Ecdysonrezeptor-Antikörper gelang keine Markierung der in der Kultur befindlichen Hämocyten (nicht dargestellt). Es ist jedoch offen, ob das richtige experimentelle "Zeitfenster" gewählt wurde (siehe auch 4.4.3).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde lediglich die Wirkung von  $\beta$ -Ecdyson analysiert. Es ist aber bekannt, daß auch andere Ecdysonderivate eine physiologische Bedeutung haben (WARREN & GILBERT 1986, TRUMAN & RIDDIFORD 2002). Neuere Veröffentlichungen weisen auf die Bedeutung des Juvenilhormons und besonders der Juvenilhormonsäure hin, die über die bisher bekannte Rolle als "Status quo"-Hormon hinaus geht. Juvenilhormonsäure scheint Voraussetzung für die Kompetenz zur Metamorphose einiger Gewebe zu sein (ISMAIL et al. 1998, ISMAIL et al. 2000). Zudem ist interessant, daß USP als Juvenilhormonrezeptor diskutiert wird (TRUMAN & RIDDIFORD 2002). USP ist für die DNA-Bindung des Ecdyson-Ecdysonrezeptor-Komplexes notwendig (HALL & THUMMEL 1998). Über den Einfluß von Juvenilhormon auf die Hämatopoiese und die Hämocyten selbst gibt es lediglich einen Hinweis: HOFFMANN (1970b) zeigte den Einfluß der Corpora allata auf Produktion und Differenzierung der Hämocyten in *Locusta migratoria*. Ein Test in der *in vitro*-Kultur wäre interessant.

#### **4.10 Untersuchungen zur Hämatopoiese im fünften Larvenstadium**

##### **4.10.1 Aufbau der hämatopoietischen Organe**

Die Herkunft der zirkulierenden Hämocyten durch mitotische Teilungen aus sich heraus oder aus hämatopoietischen Organen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert (JONES 1970, AKAI & SATO 1971, ARNOLD & HINKS 1976, HINKS & ARNOLD 1977, FEIR 1979, RATCLIFFE et al. 1985). Erst die Etablierung von Blutzelltumormutanten für *D. melanogaster* belegte die Existenz eines solchen Organs eindeutig (GATEFF 1978, SHRESTA & GATEFF 1982b). In Lepi-

dopteren werden Zelloben mit hoher mitotischer Aktivität nahe den Flügelanlagen in den Larven als hämatopoietische Organe bezeichnet. Einen eindeutigen Beweis für diese Funktion erbrachte das Entfernen bzw. Zerstören dieser Organe und die darauf folgenden Veränderungen im Blutzelltiter (NITTONO 1964, BEAULATON 1979). Trotz allem ist bis heute nicht geklärt, ob alle oder nur einzelne Blutzelltypen aus den hämatopoietischen Organen entstehen. Große Differenzen von Art zu Art sind anzunehmen (siehe auch GARDINER & STRAND 2000).

Wie bei allen Lepidopteren befinden sich in *M. sexta* die hämatopoietischen Organe um die Flügelanlagen im meso- und metathorakalen Segment der Larve. Im Vergleich mit anderen Insektenordnungen ist diese Lage einmalig. In *D. melanogaster* befindet sich das hämatopoietische Organ nahe dem Dorsalgefäß im thorakalen Bereich (SHRESTHA & GATEFF 1982a; RIZKI & RIZKI 1984, LANOT et al. 2001). Bei *Gryllus bimaculatus* und *Grylloptalpa grylloptalpa* liegen die blutzellbildenden Organe posterior entlang und verbunden mit dem Dorsalgefäß (NUTTING 1951, HOFFMANN et al. 1979). Ähnlich ist die Lage bei *Locusta migratoria* (HOFFMANN 1970a) und *Calliphora erythrocephala* (CROSSLEY 1964, ZACHARY & HOFFMANN 1973) allerdings ohne direkte Verbindung zum Herzen. Über die Besonderheiten der hämatopoietischen Organe in Lepidopteren aus phylogenetischer Sicht gibt es keine Angaben.

Zur äußeren Anatomie der hämatopoietischen Organe der Lepidoptera finden sich unterschiedliche Darstellungen (HINKS & ARNOLD 1977). Während das hämatopoietische Organ von *M. sexta* die assoziierte Flügelanlage zu ungefähr drei Vierteln umschließt, ist es bei anderen Arten lose assoziiert oder bildet einen Ring (HINKS & ARNOLD 1977, GARDINER & STRAND 2000). Die für andere Lepidopteraspezies beschriebene Lage der einzelnen Loben um Tracheen und die Abgrenzung der Loben voneinander durch eine Basallamina wurde in der vorliegenden Arbeit auch für *M. sexta* beobachtet (HINKS & ARNOLD 1977, MONPEYSSIN & BEAULATON 1978).

Die Basallamina behindert nicht das Austreten von Hämozyten aus dem hämatopoietischen Organ. Diverse elektronenmikroskopische Bilder zeigen Lücken, durch die die Hämozyten durch amöboide Bewegung in die Hämolymphe gelangen (AKAI & SATO 1971, HINKS & ARNOLD 1977, MONPEYSSIN & BEAULATON 1978, LANOT et al. 2001).

Nach intensiven elektronenmikroskopischen Beobachtungen unterteilten MONPEYSSIN und BEAULATON (1978) die Loben in weitere kleinere Loben, die sich in ihrer Struktur unterscheiden. Kompakte kleine Loben enthalten undifferenzierte Zellen, kleine Loben mit lockerer Struktur enthalten differenzierte Zellen. Diese Feinstruktur konnte in den

vorliegenden Untersuchungen nicht erkannt werden. Weitere intensivere Beobachtungen sind notwendig. Unterschiede zwischen den meso- und metathorakalen Organen sind denkbar (siehe für *D. melanogaster* LANOT et al. 2001).

HOFFMANN und Mitarbeiter (1979) beschrieben im hämatopoietischen Organ von *Gryllus bimaculatus* sogenannte retikuläre Zellen. Entsprechende Zellen wurden auch in *Calliphora erythrocephala* identifiziert (ZACHARY & HOFFMANN 1973). Für das hämatopoietische Organ in *D. melanogaster* beschrieben LANOT und Mitarbeiter (2001) einen ähnlichen Zelltyp und bezeichneten ihn als "sekretorische Zellen". Eine vergleichbare Struktur konnte in den elektronenmikroskopischen Präparaten für das hämatopoietische Organ von *M. sexta* nicht identifiziert werden. Nach MONPEYSSIN und BEAULATON (1978) gibt es diese besonderen Zellen in den hämatopoietischen Organen der Lepidoptera nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hämozyten-spezifische monoklonale Antikörper genutzt, um die Blutzelltypen innerhalb der hämatopoietischen Organe zu identifizieren. Dabei wurden fast alle Zellen durch beide für Plasmatozyten spezifischen Antikörper markiert. Der Marker für granuläre Zellen erkannte nur Zellen außerhalb des Organs, nie innerhalb. Das gleiche Markierungsmuster mit ihren Antikörpern erzielten GARDINER und STRAND (2000). Die meisten älteren Arbeiten gehen davon aus, daß sich in den Loben des hämatopoietischen Organs Prohämozyten befinden (NITTONO 1964, SHRIVASTAVA & RICHARDS 1965, HINKS & ARNOLD 1977, MONPEYSSIN & BEAULATON 1978, BEAULATON 1979). Nach diesen Vorstellungen differenzieren sich aus diesen Vorläuferzellen entweder noch innerhalb des Organs Plasmatozyten und Oenozytoide (HINKS & ARNOLD 1977), Plasmatozyten und granuläre Zellen (SHRIVASTAVA & RICHARDS 1965) oder alle Zelltypen (MONPEYSSIN & BEAULATON 1978, BEAULATON 1979) oder sie werden in die Hämolymphe entlassen und differenzieren sich dort (NITTONO 1964). Die Markierung der Plasmatozyten-spezifischen Antikörper in der vorliegenden Arbeit kann zum einen darauf hinweisen, daß sich in den Loben des hämatopoietischen Organs von *M. sexta* tatsächlich fast ausschließlich Plasmatozyten befinden. Zum anderen wäre denkbar, daß sowohl Plasmatozyten als auch eventuelle Vorläufer- oder Stammzellen in den hämatopoietischen Organen die entsprechenden Proteine exprimieren, die durch beide eingesetzten Antikörper erkannt werden.

Bei einem Vergleich der immunhistochemischen Untersuchungsmethoden sind sowohl Kryoschnitte als auch *whole mount*-Präparationen (siehe auch ANDERL 2001) mit bestimmten Interpretationsunsicherheiten verbunden, z.B.: Inwieweit verändern die Prozeduren (Verwundung des Tieres, viele Waschschrte) das hämatopoietische Organ? Konnte der Antikörper gleichmäßig in das Gewebe eindringen? Zur Verifizierung der hier beschriebenen

Beobachtungen sollten weitere Methoden angewendet werden. In ersten Versuchen wurden die Zellen aus isolierten hämatopoietischen Organen durch Aufreißen der Basallamina auf einen Objektträger gebracht und fixiert. So konnte ein Zellmonolayer erhalten werden (nicht dargestellt). Auf diese Weise können in zukünftigen Experimenten die Zellmorphologien und die Antikörpermarkierung an den einzelnen Zellen besser evaluiert werden als im Gewebeverband. Wichtig scheint auch die Kombination aus Elektronenmikroskopie und Antikörpermarkierung. So können in Ultrastrukturanalysen die Zellen innerhalb der hämatopoietischen Organe typisiert und der Aufbau der Loben im Detail geklärt werden.

#### 4.10.2 Theorien zur Hämatopoiese

Es gibt viele unterschiedliche Ansichten zur Bedeutung der hämatopoietischen Organe für die Bildung der zirkulierenden Blutzellen (siehe 4.10.1). Ergebnisse der eigenen Arbeit legen nahe, daß die Funktion der hämatopoietischen Organe in der Aufrechterhaltung der frei flottierenden Hämozytenpopulation besteht (siehe auch NITTONO 1964, ZACHARY & HOFFMANN 1973, BEAULATON 1979). Darüber hinaus fungieren sie möglicherweise als "Blutzellspeicher", aus dem aufgrund von besonderen Umständen kurzfristig Hämozyten rekrutiert werden könnten (siehe auch CARTON & NAPPI 1997, LANOT et al. 2001).

Auffällig ist der Anstieg der Hämozytenzahl vor den larvalen Häutungen (z.B. NITTONO 1960, HOLTHUSEN 1999). Während dieser "Übergangsphasen" nimmt das Volumen der hämatopoietischen Organe in *Bombyx mori* ab (AKAI & SATO 1971). Erste eigene Untersuchungen scheinen dies auch für *M. sexta* zu bestätigen (nicht dargestellt). Vom Beginn des letzten Larvenstadiums bis zum Beginn des Wanderstadiums nahm die Anzahl frei flottierender Hämozyten, besonders der Plasmatozyten, stetig zu (HOLTHUSEN 1999, 4.1). Parallel dazu degenerierte das hämatopoietische Organ mit Eintritt ins Wanderstadium. In der Präpuppe war es nicht mehr zu finden (nicht dargestellt). LANOT und Mitarbeiter (2001) konnten elektronenmikroskopisch verfolgen, wie sich das hämatopoietische Organ von *D. melanogaster* im Verlauf des letzten Larvenstadiums entleerte.

Sowohl die eigenen Beobachtungen als auch die anderer Autoren (AKAI & SATO 1971, HINKS & ARNOLDS 1977, GARDINER & STRAND 2000, ANDERL 2001) lassen vermuten, daß die hämatopoietischen Organe der Lepidoptera hauptsächlicher Bildungsort der Plasmatozyten sind. Der Nachweis frei flottierender mitotischer Plasmatozyten (AKAI & SATO 1976, GARDINER & STRAND 2000, eigene Beobachtungen) steht dabei nicht im Widerspruch, denn Zellteilungskompetenz kann im begrenzten Umfang auch von differenzierten Zellen, z.B.

Vertebratenblutzellen beibehalten werden (ALBERTS et al. 2001). Plasmatozyten sind involviert in Phagozytose, Einkapselung und Wundverschluß. Gerade für die beiden letzteren Reaktionen werden viele Zellen benötigt, die aus dem hämatopoietischen Organ ohne Zeitverzögerung rekrutiert werden könnten. LANOT und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, daß sich die Loben der hämatopoietischen Organe auch nach erfolgreicher Parasitierung von *Drosophila*-Larven entleeren. ANDERL (2001) fand die hämatopoietischen Organe in *M. sexta* weniger kompakt nach Injektion von Tusche oder Bakterien.

Sollten tatsächlich nur Plasmatozyten in hämatopoietischen Organen gebildet werden, stellt sich die Frage, woher die anderen Hämozytentypen stammen. In den vorliegenden Untersuchungen waren unter den frei flottierenden Zellen vor allem die granulären Zellen mitotisch aktiv. Dies ist konform mit den Ergebnissen von ARNOLD und HINKS (1976, 1983) und GARDINER und STRAND (2000). Aufgrund einer hohen mitotischen Rate postulierten diese Autoren, daß granuläre Zellen ihre Population aus sich selbst heraus erhalten und vermehren können, unabhängig von blutbildenden Organen. Andere Autoren wiederum postulierten die Differenzierung der granulären Zellen aus Plasmatozyten (SHRIVASTAVA & RICHARDS 1965, BEAULATON & MONPEYSSIN 1976, BEAULATON 1979) bzw. zirkulierenden Prohämozyten (LAI-FOOK 1973, YAMASHITA & IWABUCHI 2001). In Anbetracht der starken Zunahme der Zahl zirkulierender granulärer Zellen im Verlauf des letzten Larvenstadiums (HOLTHUSEN 1999, 4.1) ist die Generierung dieser Zellen nur aus sich heraus nicht vorstellbar. Verschiedentlich finden sich Hinweise auf sessile Populationen von Hämozyten, besonders in Fettkörperspalten, unterhalb der Epidermis oder an Tracheen (GAGEN & RATCLIFFE 1976, CLARK et al. 1997, ANDERL 2001, LANOT et al. 2001, eigene Beobachtungen). Diese Populationen könnten ebenso Blutzellbildungsorte unabhängig von den eigentlichen hämatopoietischen Organen sein. Die Zunahme frei flottierender Hämozyten kann aber ebenso auf der Veränderung der Adhärenz dieser sessilen Zellen beruhen.

An dieser Stelle sei bemerkt, daß Zellen als Voraussetzung zum Eintritt in den Zellzyklus Fokalkontakte zur Substratoberfläche ausbilden müssen (ALBERTS et al. 2001). Dieses allgemeine Phänomen könnte ein Hinweis sein, daß es neben den zirkulierenden Hämozyten auch eine große Population sessiler Zellen gibt.

Weit auseinander gehen die Meinungen über die Herkunft der sphäkulen Zellen. Aufgrund ähnlicher Eigenschaften und beobachteter Übergangsformen wird eine Verwandtschaft zu den granulären Zellen vorgeschlagen (LAI-FOOK 1973, NEUWIRTH 1973, RATCLIFFE & PRICE 1974, GARDINER & STRAND 1999). YAMASHITA und IWABUCHI (2001) konnten die Differenzierung von sphäkulen Zellen aus granulären Zellen *in vitro* beobachten. BEAULATON und

MONPEYSSIN (1977) vermuten eher die Entstehung der sphäruligen Zellen aus den Plasmatozyten. Bei *M. sexta* sind die sphäruligen Zellen eher unabhängig von anderen Zelltypen zu sehen (siehe auch ARNOLD & HINKS 1976, 1983, GARDINER & STRAND 2000) und entstammen eventuell eigenen Bereichen der hämatopoietischen Organe (siehe MONPEYSSIN & BEAULATON 1978). Der Nachweis dieser Zellen in den Organen mit monoklonalen Markern gelang GARDINER und STRAND (2000) nicht. Dies könnte aber auf Unterschiede zwischen zirkulierenden und evtl. "unreifen" sphäruligen Zellen innerhalb der Organe beruhen. Für *M. sexta* steht kein Marker für diesen Hämozytentyp zur Verfügung. Mitotisch aktive sphärulige Zellen, wie in der Literatur beschrieben (ARNOLD & HINKS 1976, 1983, GARDINER & STRAND 2000), konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Der Grund dafür liegt vermutlich in der geringen Häufigkeit dieser Zellen.

Oenozytoide wurden in allen zugänglichen Arbeiten als auch in den eigenen Untersuchungen nie in Teilung beobachtet (LEA & GILBERT 1966, ARNOLD & HINKS 1976, GARDINER & STRAND 2000). Auch wenn in einigen Arbeiten Übergangsformen zwischen Oenozytoiden und Plasmatozyten (BEAULATON & MONPEYSSIN 1977) oder granulären Zellen (LAI-FOOK 1973) beschrieben wurden, werden diese Zellen in der Regel unabhängig von den anderen Zelltypen diskutiert (AKAI & SATO 1976, HINKS & ARNOLD 1977). Eventuell bilden sich die Oenozytoide ähnlich den funktionell analogen Kristallzellen von *D. melanogaster* (LANOT et al. 2001) aus Vorläuferzellen in bestimmten Bereichen der hämatopoietischen Organe. Die Identifizierung dieser Zellen in den Loben der Organe von *M. sexta* über den Nachweis der Peroxidaseaktivität gelang nicht. Diese Methode ist allerdings nicht adäquat, wenn davon ausgegangen wird, daß es sich im Organ um "unreife" Zellen handelt. Deshalb sollte der Versuch unter Verwendung anderer Marker wiederholt werden.

Sowohl Oenozytoide als auch sphärulige Zellen waren mit Beginn des Wanderstadiums kaum noch in der Hämolymphe zu finden (HOLTHUSEN 1999, 4.1). Genau zu diesem Zeitpunkt begann die Degeneration der hämatopoietischen Organe (nicht dargestellt). Dieser Wegfall des "Maintainance" und die normale Turn-over-Rate könnten zur Reduktion der ohnehin kleinen Population von Oenozytoiden und sphäruligen Zellen führen. Die Oenozytoide waren zudem der einzige Blutzelltyp, der eine Markierung mit den Anti-Ecdysonrezeptor-Antikörpern zeigte (4.4.2). Eine entsprechende Reaktion auf das  $\beta$ -Ecdysonsignal, z.B. mit dem Eintritt in die Apoptose ist vorstellbar.

Bisher liegt nur eine Arbeit vor, in der das Schicksal einzelner Hämozyten *in vitro* verfolgt wurde (YAMASHITA & IWABUCHI 2001). Isolierte Prohämozyten aus der Hämolymphe des vierten Larvenstadiums von *Bombyx mori* teilten sich entweder wieder in Prohämozyten oder

in granuläre Zellen und Plasmatozyten, wobei asymmetrische und symmetrische Teilungen beobachtet wurden. Beide Zelltypen waren in der Lage, sich symmetrisch weiter zu teilen. Sphärule Zellen entstanden durch Differenzierung aus granulären Zellen. Interessanterweise entstanden mehr granuläre Zellen, wenn die Prohämozyten mit Plasma aus Larven des fünften Larvenstadiums inkubiert wurden.

Sowohl bei eigenen Untersuchungen als auch jenen von GARDINER und STRAND (1999, 2000) wurden nie frei flottierende Prohämozyten beobachtet. Zellen, die morphologisch ähnlich den von YAMASHITA und IWABUCHI (2001) beschriebenen Prohämozyten sind, wurden in eigenen Untersuchungen stets mit Plasmatozyten-spezifischen monoklonalen Antikörpern markiert. Dieser Zelltyp wurde von ANDERL (2001) als "Runde Plasmatozyten" bezeichnet. Im Labor von M.R. Strand existiert ein Plasmatozyten-spezifischer monoklonaler Antikörper, der diese runden Plasmatozyten in *Pseudoplusia includens* nicht markiert (CLARK et al. 1997, GARDINER & STRAND 1999). Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte dargestellt werden, daß der Anteil runder Plasmatozyten im Verlauf des letzten Larvenstadiums zugunsten der gespreiteten Zellen abnahm.

Ähnliche Unklarheiten in der Nomenklatur gibt es bei den Hämozyten von *D. melanogaster*. Während einige Forscher eine Differenzierung von Plasmatozyten in Lamellozyten im Verlauf des letzten Larvenstadiums beschrieben (RIZKI & RIZKI 1982, SHRESTA & GATEFF 1982a), zeigten LANOT und Mitarbeiter (2001), daß sich die im Elektronenmikroskop als Plasmatozyten identifizierten Zellen unter Ecdysoneinfluß in ihrer Adhärenz veränderten und damit im lichtmikroskopischen Bild eine Lamellozyten-ähnliche Gestalt annahmen.

Für die Lepidoptera bleibt zu testen, ob es sich bei den zirkulierenden "Prohämozyten", den "Runden Plasmatozyten" und den Zellen innerhalb der hämatopoietischen Organe tatsächlich um ein und denselben Zelltyp handelt, und ob dieser wiederum identisch mit den "normalen" Plasmatozyten ist. Daraus ergibt sich die Frage, ob granuläre Zellen und evtl. auch sphärule Zellen und Oenozytoide "Spezialformen" der Plasmatozyten sind, die sich erst aufgrund von Signalen aus dem Plasma differenzieren, und / oder ob es entsprechende Vorläuferzellen für diese Zelltypen innerhalb oder außerhalb der hämatopoietischen Organe gibt. Die Identifizierung von "Reifungsmarkern" für die einzelnen Zelltypen wäre für solche Untersuchungen sinnvoll. Interessant sind in diesem Zusammenhang die für *D. melanogaster* bekannten Transkriptionsfaktoren Serpent, Glial cells missing und Lozenge, deren Bedeutung für die Blutzellendifferenzierung beschrieben wurde (BERNARDONI et al. 1997, LEBESTKY et al. 2000).

Vergleichende Untersuchungen der Zellpopulationen innerhalb und außerhalb der hämatopoietischen Organe, z.B. nach Parasitierung, Bakterieninjektion oder im Verlauf der Ent-



---

wicklung könnten zu neuen Erkenntnissen über die Hämatopoiese in *M. sexta* führen. Das Anlegen von *in vitro*-Kulturen mit hämatopoietischen Organen ist zu empfehlen, um letztendlich Entwicklungsprozesse direkt verfolgen und modulieren zu können, z.B. durch Zugabe von Hormonen oder bestimmten Plasmafaktoren.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der Dissertation waren "Vergleichende Untersuchungen zum Hämocytenbild von Larve und Puppe des Tabakswärmers *Manduca sexta* L.". Dabei wurden insbesondere die Blutzellen während der ersten Tagen des letzten Larvenstadiums und der ersten Tage des Puppenstadiums miteinander verglichen. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten beginnt die Metamorphose, was ein "Umprogrammieren" vieler Zellen und Gewebe im Insektenorganismus bedeutet.

Zunächst wurde die Morphologie der Hämocyten der Larven und Puppen vergleichend licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. In Larven wurden Plasmatozyten, granuläre Zellen, sphärule Zellen und Oenocytoide unterschieden, in Puppen dagegen nur Plasmatozyten und granuläre Zellen. Die pupalen Hämocyten unterschieden sich zudem in ihren Eigenschaften von ihren larvalen Gegenstücken. Besonders die pupalen Zellen hatten im Vergleich zu den larvalen Zellen wesentlich größere Granulen, die u.a. Lipophorin und Arylphorin enthielten. Auch die Zellzahlen in der Hämolymphe änderten sich. Während Plasmatozyten und granuläre Zellen zu Beginn des letzten Larvenstadiums ähnlich häufig auftraten, überwogen Plasmatozyten in der Hämolymphe der Puppen. Oenocytoide und sphärule Zellen waren mit Beginn des Wanderstadiums nicht mehr frei flottierend in der Hämolymphe zu beobachten. Für die Oenocytoide gelang der Nachweis von Ecdysonrezeptoren, so daß die direkte Reaktion dieser Zellen auf das Hormon nahe liegt.

Das Kernstück der Arbeit war die Charakterisierung der Hämocyten durch monoklonale Antikörper und Lektine. Dabei wurden alle zur Verfügung stehenden 214 monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT und Mitarbeitern (1994) und deren Subklone genutzt. 28 monoklonale Antikörper zeigten Markierungsunterschiede im Vergleich zwischen Larven- und Puppenhämocyten. Diese Muster wurden zu 10 Kategorien zusammengefasst. Daneben wurden 14 Lektine getestet, zwei davon banden unterschiedlich an larvale und pupale Hämocyten.

Im folgenden wurden die korrespondierenden Liganden biochemisch charakterisiert und die Hämocytenspezifität dieser Antikörper / Lektine bzw. Bindungseigenschaften an andere Gewebe incl. des Hämolympplasmas bestimmt.

Ein Antikörper und ein Lektin mit jeweils eindeutiger Hämocytenspezifität und einer distinkten Bande in der Western-Blot-Analyse der Hämocytenlysate wurden ausgewählt, um den entsprechenden Liganden zu isolieren und zu identifizieren. Beides waren integrale Membranproteine, die Proteinreinigungsversuche erwiesen sich daher als schwierig. Ähnliche

Untersuchungen bei anderen Insektenarten lassen vermuten, daß es sich bei dem Liganden des Lektins um ein Mucin handelt. Der Antikörper bindet vermutlich an ein Integrin.

Daneben wurden weitere Methoden angewendet, um Unterschiede zwischen larvalen und pupalen Hämocyten zu finden. Besonders die Auftrennung der Hämocytenproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine vielversprechende Methode, um die unterschiedliche Proteinausstattung von Larven- und Puppenhämocyten zu charakterisieren. Diese Methode konnte während der Arbeit so weit optimiert werden, daß zumindest im pH-Bereich 4-7 eine auswertbare Auftrennung der Proteine gelang.

Parallel dazu wurde die Percolldichtegradientenzentrifugation angewendet, um Gesamthämocyten aus Larven und Puppen in einzelne Fraktionen, d.h. in die unterschiedlichen Hämocytentypen zu trennen. Pupale Plasmatozyten und granuläre Zellen konnten eindeutig getrennt werden. Bei larvalen Hämocyten gelang zumindest eine Anreicherung bestimmter Typen. Die Kombination aus Percolldichtegradientenzentrifugation und zweidimensionaler Gelelektrophorese ist vielversprechend, um spezifisch exprimierte Proteine der einzelnen Zelltypen zu identifizieren. Erste Versuche dazu liegen vor.

Für ergänzende Untersuchungen wurde die *in vitro*-Primärkultivierung von Hämocyten etabliert. Diese Methode wurde benutzt, um die Veränderungen der Hämocyten zu Beginn der Metamorphose *in vitro* zu analysieren. Dazu wurde der direkte Einfluß von  $\beta$ -Ecdyson auf Larven- und Puppenhämocyten untersucht. Die Zellen beider Stadien reagierten mit verstärkter Adhärenz.

Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Hypothesen bezüglich Hämatopoiese sowie Differenzierung und Funktion der Blutzellen entwickelt und getestet. In diese Untersuchungen wurde auch das hämatopoietische Organ einbezogen. Eine der wesentlichen Beobachtungen dabei war, daß Plasmatozyten vermutlich aus Vorläuferzellen aus dem hämatopoietischen Organ entstehen. Unter den frei flottierenden waren die mitotisch aktiven Zellen zumeist granuläre Zellen.

## 6 Literatur

- ABU-HAKIMA R. & FAYE I. (1981): An ultrastructural and autoradiographic study of the immune response in *Hyalophora cecropia* pupae. *Cell Tissue Res* **217**: 311-320
- AKAI H. & SATO S. (1971): An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* **17**: 1665-1676
- AKAI H. & SATO S. (1973): Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Int J Insect Morphol Embryol* **2**: 201-231
- AKAI H. & SATO S. (1976): An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* **17**: 1665-1676
- ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. & WALTER P. (2001): "Lehrbuch der molekularen Zellbiologie." Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH
- AMANAI K., SAKAI M., SAKURAI S., MORI T., NIKAIIDO O. & OHTAKI T. (1991): Occurrence of lectin in the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop Growth Differ* **33**: 421-427
- ANDERL I. (2001): Untersuchungen zur Phagozytose bei *Manduca sexta* L., Sphingidae. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen
- ANGGRAENI T. & RATCLIFFE N.A. (1991): Studies on cell-cell co-operation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* **37**: 453-460
- ARNOLD J.W. & HINKS C.F. (1976): Haemopoiesis in Lepidoptera. I. The multiplication of circulating haemocytes. *Can J Zool* **54**: 1003-1012
- ARNOLD J.W. & HINKS C.F. (1983): Haemopoiesis in Lepidoptera. III. A note on the multiplication of spherule cells and granular haemocytes. *Can J Zool* **61**: 275-277
- ASANO T. & ASHIDA M. (2001): Cuticular Pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *J Biol Chem* **276**: 11100-11112
- ASHBURNER M., CHIHARA C., MELTZER P. & RICHARDS G. (1974): Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**: 655-662
- ASHHURST D.E. & RICHARDS A.G. (1964): Some histochemical observations on blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *J Morph* **114**: 247-254
- ASHHURST, D.E. (1979): Hemocytes and connective tissue: a critical assessment. In "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 319-330, Cambridge: Cambridge University Press
- ASHHURST D.E. (1982): Histochemical properties of the spherulocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Int J Insect Morphol Embryol* **11**: 285-292
- ASHIDA M. & BREY P.T. (1995): Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10698-10702
- ASLING B., DUSHAY M.S. & HULTMARK D. (1995): Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 511-518
- BAHADUR, J. & PATHAK, J.P.M. (1971): Changes in the total hemocyte counts of the bug *Halys dentata*, under certain specific conditions. *J Insect Physiol* **17**: 329-334

- BALL E.E., DE COUET H.G., HORN P.L. & QUINN J.M. (1987): Haemocytes secrete basement membrane components in embryonic locusts. *Development* **99**: 255-259
- BEAULATON J. & MONPEYSSIN M. (1976): Ultrastructure et cytochimie des hemocytes d'*Antheraea pernyi* Guer. (Lepidoptera, Attacidae) au cours du cinquieme age larvaire. I. Prohemocytes, plasmatocytes et granulocytes. *J Ultrastructure Research* **55**: 143-156
- BEAULATON J. & MONPEYSSIN M. (1977): Ultrastructure et cytochimie des hemocytes d'*Antheraea pernyi* Guer. (Lepidoptera Attacidae). II. Cellules a spherules et oenocytoides. *Biol Cellulaire* **28**: 13-18
- BEAULATON J. (1979): Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms. *Biochimie* **61**: 157-164
- BEAULATON J. (1985): Ultrastructural visualization of lectin-binding sites and anionic groups on the cell surface of immunocompetent hemocytes in the oak silkworm *Antheraea pernyi*. *Proc DCI* **9**: 164
- BENDER M., IMAM F.B., TALBOT W.S., GANETZKY B. & HOGNESS D.S. (1997): *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91**: 777-788
- BERNARDONI R., VIVANCOS V. & GIANGRANDE A. (1997): glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Development* **191**: 118-130
- BETTENCOURT R., GUNNE H., GASTINEL L., STEINER H. & FAYE I. (1999): Implications of hemolin glycosylation and Ca<sup>2+</sup>-binding on homophilic and cellular interactions. *Eur J Biochem* **266**: 964-976
- BLUM H., BEIER H. & GROSS H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- BOLLENBACHER W.E., SMITH S.L., GOODMAN W. & GILBERT L.I. (1981): Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* **44**: 302-306
- BOULANGER N., EHRET-SABATIER L., BRUN R., ZACHARY D., BULET P. & IMLER J.L. (2001): Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagellate parasite *Crithidia* spp. *Insect Biochem Molec Biol* **31**: 129-137
- BRADFORD M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemie* **72**: 248-251
- BRAUN A., HOFFMANN J.A. & MEISTER M. (1998): Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14337-14342
- BREHELIN M., ZACHARY D. & HOFFMANN J.A. (1978): A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. *Cell Tissue Res* **195**: 45-57
- BULET P., DIMARQ J.-L., HETRU C., LAGUEUX M., CHARLET M., HEGY G., VANDORSSELAER & HOFFMANN J.A. (1993): A novel antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem* **268**: 14893-14897
- BURKE R.D. (1999): Invertebrate integrins: Structure, function and evolution. *Internat Rev Cytol* **191**: 257-284
- BURMESTER T. & SCHELLER K. (1995): Complete cDNA-sequence of the receptor responsible for arylphorin uptake by the larval fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 981-989
- BURMESTER T. & SCHELLER K. (1997): Developmentally controlled cleavage of the *Calliphora* arylphorin receptor and posttranslational action of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone. *Eur J Biochem* **247**: 695-702
- CALLAERTS P., VULSTEKE V., PEUMANS W. & DELOFF A. (1995): Lectin binding sites during *Drosophila* embryogenesis. *Roux's Arch Dev Biol* **204**: 229-243
- CARTON Y. & NAPPI A.J. (1997): *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* **13**: 218-227

- CHAIN B.M. & ANDERSON R.S. (1983): Observation on the cytochemistry of the hemocytes of an insect, *Galleria mellonella*. *J Histochem Cytochem* **31**: 601-607
- CHAIN B.M., LEYSHON-SORLAND K. & SVA-JOTHY M.T. (1992): Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analysed using monoclonal antibodies. *J Cell Sci* **103**: 1261-1267
- CHAPMAN R.F. (1998): "The insects. Structure and function." Cambridge: Cambridge University Press
- CHEN C., ROWLEY A.F., NEWTON R.P. & RATCLIFFE N.A. (1999): Identification, purification and properties of a  $\beta$ -1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis*, which is implicated in immune defence reactions. *Comp Biochem Physiol B* **122**: 309-319
- CHEN H., HERNDON M.E. & LAWLER J. (2000): The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* **19**:597-614
- CHUNG K.T. & OURTH D.D. (2000): Larval and pupal induction and N-terminal amino acid sequence of lysozyme from *Heliothis virescens*. *J Insect Physiol* **46**: 563-572
- CLATWORTHY A. (1998): Neural-immune interactions - an evolutionary perspective. *Neuroimmunomodulation* **5**: 136-142
- CLARK K.D., PECH L.L. & STRAND M.R. (1997): Isolation and identification of a plasmatocyte spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *J Biol Chem* **272**: 23440-23447
- CLARK K.D., WITHERELL A. & STRAND M.R. (1998): Plasmatocyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*. *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 479-485
- COTTAM D.M. & MILNER M.J. (1997): Effect of age on the growth and response of a *Drosophila* cell line to moulting hormone. *Tiss Cell* **29**: 727-732
- CROSSLEY A.S.C. (1964): An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the blue-fly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). *J Exp Zool* **157**: 375-398
- CROSSLEY A.C. (1968): The fine structure and mechanism of breakdown of larval intersegmental muscles in the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *J Insect Physiol* **14**: 1389-1407
- CROSSLEY A.C. (1979): Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage, and secretion in hemocytes. In: "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 452-474, Cambridge: Cambridge University Press
- CSIKOS G., MOLNAR K., BORHEGYI N.H., TALIAN G.C. & SASS M. (1999): Insect cuticle, an in vivo model of protein trafficking. *J Cell Sci* **112**: 2113-224
- D'AMICO P. & JACOBS J.R. (1995): Lectin histochemistry of the *Drosophila* embryo. *Tiss Cell* **27**: 23-30
- DANIELLI A., LOUKERIS T.G., LAGUEUX M., MÜLLER, H.-M., RICHMAN A. & KAFATOS F.C. (2000): A modular chitin-binding protease associated with hemocytes and hemolymph in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7136-7141
- DE GREGORIO E., SPELLMAN P.T., RUBIN G.M. & LEMAITRE B. (2001): Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12590-12595
- DETTLOFF M., WITTEW D., WEISE C. & WIESNER A. (2001): Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell Tissue Res* **306**: 449-458.
- DIMARCQ J.-L., MLER J.-L., LANOT R., EZEKOWITZ R.A.B., HOFFMANN J.A., JANEWAY C.A. & LAGUEUX M. (1997): Treatment of l(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem Molec Biol* **27**: 877-886
- DOMINICK O.S. & TRUMAN J.W. (1985): The physiology of wandering behaviour in *Manduca sexta*. II. The endocrine control of wandering behaviour. *J Exp Biol* **117**: 45-68

- DUNPHY G.B. & HALWANI A.E. (1997): Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenhorabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *J Insect Physiol* **43**: 1023-1029
- DUVIC B. & BREHELIN M. (1998): Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a b-1,3-glucan. *Insect Biochem Molec Biol* **28**: 959-967
- ERICSSON C. (1999): 2-D protein extracts from *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol Biol* **112**: 35-41
- FAYE I. & KANOST M.R. (1998): Function and regulation of hemolin. In "Molecular mechanisms of immune responses in insects", eds P.T. Brey & D. Hultmark, pp. 173-188, New York: Chapman & Hall
- FEIR D. (1979): Multiplication of hemocytes. In: "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 67-82, Cambridge: Cambridge University Press
- FERNANDO-WARNAKULASURIYA G.J.P., TSUCHIDA K. & WELLS M.A. (1988): Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* **18**: 211-214
- FERRANDON D., JUNG A.C., CRIQUI M., LEMAITRE B., UTTENWEILER-JOSEPH S., MICHAUT L., REICHHART J. & HOFFMANN J.A. (1998): A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J* **17**: 1217-1227
- FESSLER J.H. & FESSLER L.I. (1989): *Drosophila* extracellular matrix. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 309-339
- FESSLER L.I., CAMPBELL A.G., DUNCAN K.G. & FESSLER J.H. (1987): *Drosophila* laminin: characterization and localization. *J Cell Biol* **105**: 2383-2391
- FOGERTY F.J., FESSLER L.I., BUNCH T.A., YARON Y., PARKER C.G., NELSON R.E., BROWER D.L., GULLBERG D. & FESSLER J.H. (1994): Tiggrrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* **120**: 1747-1758
- FRANC N.C., DIMARQ J.-L., LAGUEUX M., HOFFMANN J.A. & EZEKOWITZ R.A.B. (1996): Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**: 431-443
- FRANC N.C., HEITZLER P., EZEKOWITZ R.A.B. & WHITE K. (1999): Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**: 1991-1994
- FRIEMEL H. (1991): "Immunologische Arbeitsmethoden". Jena: Gustav Fischer Verlag
- FUJIWARA H., JINDRA M., NEWITT R., PALLI S.R., HIRUMA K. & RIDDIFORD L.M. (1995): Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 845-856
- FUJIWARA H. & OGAI S. (2001): Ecdysteroid-induced programmed cell death and cell proliferation during pupal wing development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Gene Evol* **211**: 118-123
- FURUKAWA S., TANIAI K., SHIBASHI J., HARA S., SHONO T. & YAMAKAWA M. (1997): A novel member of leucocin gene family from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 769-774
- GAGEN S.J. & RATCLIFFE N.A. (1976): Studies on the *in vivo* cellular reactions and fate of injected bacteria in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J Invert Pathol* **28**: 17-24
- GARDINER E.M.M. & STRAND M.R. (1999): Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *J Insect Physiol* **45**: 113-126
- GARDINER E.M.M. & STRAND M.R. (2000): Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochem Physiol* **43**: 147-164
- GATEFF E. (1978): Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **200**: 1448-1459
- GEIBLER M. (2001): *In-vitro*-Untersuchungen zur Induzierbarkeit einer Immunantwort von Hämocyten des Tabakswärmers *Manduca sexta*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen

- GILLESPIE J.P., KANOST M.R. & TRĘNCZEK T. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* **42**: 611-643
- GORMAN M.J. & PASKEWITZ S.M. (2001): Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Molec Biol* **31**: 257-262
- GOTO H., TOMONO Y., AIRO K., KOSAKO H., FUJITA M., SAKURAI M., OKAWA K., IWAMATSU A., OKIGAKI T., TAKAHASHI T. & INAGAKI M. (1999): Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* **274**: 25543-25549
- GUPTA A.P. (1979): Hemocyte types: Their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. In: "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 85-127, Cambridge: Cambridge University Press
- HAKIM R.S. & KAFATOS F.C. (1974): The structure and salivary function of the labial gland in adult *Manduca sexta*. *Tiss Cell* **6**: 729-750
- HALL B.L. & THUMMEL C.S. (1998): The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* **125**: 4709-4717
- HALWANI A.E. & DUNPHY G.B. (1999): Apolipoprotein III in *Galleria mellonella* potentiates hemolymph lytic activity. *Dev Comp Immunol* **23**: 563-570
- HAN Y.S., CHUN J., SCHWARTZ A., NELSON S. & PASKEWITZ S.M. (1999): Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding. *Dev Comp Immunol* **23**: 553-562
- HANSEN I.A., MEYER S.R., SCHAFFER I. & SCHELLER K. (2002): Interaction of the anterior fat body protein with the hexamerin receptor in the blowfly *Calliphora vicina*. *Eur J Biochem* **269**: 954-960
- HAQ S., KUBO T., KURATA S., KOBAYASHI A. & NATORI S. (1996): Purification, characterization, and cDNA cloning of a Galactose-specific C-type lectin from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* **271**: 20213-20218
- HAUNERLAND N.H. & SHIRK P.D. (1995): Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Ann Rev Entomol* **40**: 121-145
- HEGSTROM C.D. & TRUMAN J.W. (1996): Steroid control of muscle remodeling during metamorphosis in *Manduca sexta*. *J Neurobiol* **29**: 535-550
- HINKS C.F. & ARNOLD J.W. (1977): Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of hematopoietic organs. *Can J Zool* **55**: 1740-1755
- HOFFMANN J.A. (1970a): Les organes hematopoiétiques de deux insectes orthoptères: *Locusta migratoria* et *Gryllus bimaculatus*. *Z Zellforsch* **106**: 451-472
- HOFFMANN J.A. (1970b): Régulations endocrines de la production et de la différenciation des hématocytes chez un insecte Orthoptère: *Locusta migratoria migratoroides*. *Gen Comp Endocrinol* **15**: 198-219
- HOFFMANN J.A., ZACHARY D., HOFFMANN D., BREHELIN M. & PORTE A. (1979): Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. In: "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 29-66, Cambridge: Cambridge University Press
- HOFFMANN J. A., KAFATOS F.C., JANEWAY C. A. & EZEKOWITZ R.A.B. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318
- HOLTHUSEN T.K. (1999): Veränderungen des Hämocytenbildes von *Manduca sexta* im Verlauf der Metamorphose. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen
- HORI S., KOBAYASHI A. & NATORI S. (1997): Monoclonal antibodies against pupa-specific surface antigens of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) hemocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 497-501
- HORI S., KOBAYASHI A. & NATORI S. (2000): A novel hemocyte-specific membrane protein of *Sarcophaga* (flesh fly). *Eur J Biochem* **267**: 5397-5403



- HOROHOV D.W. & DUNN P.E. (1982): Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *J Invert Pathol* **40**: 327-339
- HORWITZ A.F. (1997): Integrins and health. *Sci Am* **276**: 68-75
- HUGHES J.A., HURLBERT R.E., RUPP R.A. & SPENCE K.D. (1983): Bacteria-induced haemolymph proteins of *Manduca sexta* pupae and larvae. *J Insect Physiol* **29**: 625-632
- HURLBERT R.E., KARLINSEY J.E. & SPENCE K.D. (1985): Differential synthesis of bacteria-induced proteins of *Manduca sexta* larvae and pupae. *J Insect Physiol* **31**: 205-215
- HUXHAM I.M. & LACKIE A.M. (1988): Behaviour *in vitro* of separated fractions of haemocytes of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* **251**: 677-684
- IIMURA Y., ISHIKAWA H., YAMAMOTO K. & SEHNAL F. (1998): Hemagglutinating properties of apolipoprotein III from the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* **38**: 119-125
- IMLER J.-L., HOFFMANN J.A. (2000): Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 16-22
- IMLER J.-L., HOFFMANN J.A. (2001): Toll receptors in innate immunity. *TCB* **11**: 304-311
- IRVING P., TROXLER L., HEUER T.S., BELVIN M., KOPCZYNSKI C., REICHHART J.-M., HOFFMANN J.A. & HETRU C. (2001): A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15119-15124
- ISMAIL S.M., SATYANARAYANA K., BRADFIELD J.Y., DAHM K.H. & BHASKARAN G. (1998): Juvenile hormone acid: evidence for a hormonal function in induction of vitellogenin in larvae of *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* **37**: 305-314
- ISMAIL S.M., GOIN C., MUTHUMANI K., KIM M., DAHM K.M. & BHASKARAN G. (2000): Juvenile hormone acid and ecdysteroids together induce competence for metamorphosis of the Vernon's gland in *Manduca sexta*. *J Insect Physiol* **46**: 56-68
- IWAMA R. & ASHIDA M. (1986): Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem* **16**: 547-555
- JIANG C., BAEHRECKE E.H. & THUMMEL C.S. (1997a): Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**: 4673-4683
- JIANG H., WANG Y., MA C. & KANOST M.R. (1997b): Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunits ProPo-P1. *Insect Biochem Molec Biol* **27**: 835-850
- JIANG H., WANG Y. & KANOST M.R. (1999): Four serine proteinases expressed in *Manduca sexta* haemocytes. *Insect Mol Biol* **8**: 39-53
- JINDRA M., MALONE F., HIRUMA K. & RIDDIFORD L.M. (1996): Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* **180**: 258-272
- JOESTEN M.E., ROYSTON M.E., JIMENEZ M., WADEWITZ A., MELIAN D. & LOCKSHIN R.A. (1982): Gain and loss of fluid in metamorphosing larvae of *Manduca sexta*. *J Insect Physiol* **28**: 589-599
- JOCHOVA J., QUAGLINO D., ZAKERI Z., WOO K., SIKORSKA M., WEAVER V. & LOCKSHIN R.A. (1997): Protein synthesis, DNA degradation, and morphological changes during programmed cell death in labial glands of *Manduca sexta*. *Dev Genet* **21**: 249-257
- JOHANSSON M.W., LIND M.I., HOLMBLAD T., THORNQVIST P.-Q. & SÖDERHÄLL K. (1995): Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochem Biophys Res Commun* **216**: 1079-1087
- JONES, J.C. (1956): The hemocytes of *Sarcophaga bullata* Parker. *J Morph* **94**: 71-124

- JONES J.C. (1962): Current concepts concerning insect hemocytes. *Am Zool* **2**: 209-246
- JONES, J.C. (1967): Normal differential counts of hemocytes in relation to ecdysis and feeding in *Rhodnius*. *J Insect Physiol* **13**: 1133-1141
- JONES J.C. (1970): Hemocytogenesis in insects. In "Regulation of Hematopoiesis", ed. A.S. Gordon, pp. 7-65, New York: Appleton Press
- JONES M.E.E. & SCHWARTZ L.M. (2001): Not all muscles meet the same fate when they die. *Cell Biol Internat* **25**: 539-545
- JUDY K.J. & MARKS E.P. (1971): Effects of ecdysterone in vitro on hindgut and hemocytes of *Manduca sexta* (Lepidoptera). *Gen Comp Endocrinol* **17**: 351-359
- KANG D., LIU G., GUNNE H. & STEINER H. (1996): PCR differential display of immune gene expression in *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem Molec Biol* **26**: 177-184
- KANOST M.R., ZEPPE M.K., LADENDORFF N.E. & ANDERSSON L.A. (1994): Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* **27**: 123-136
- KANOST M.R., JIANG H., WANG Y., YU X.Q., MA C. & ZHU Y. (2001): Hemolymph proteinases in immune responses of *Manduca sexta*. *Adv Exp Med Biol* **484**: 319-328
- KARIM F.D. & THUMMEL C.S. (1992): Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J* **11**: 4083-4093
- KAWAGUCHI N., KOMANO H. & NATORI S. (1991): Involvement of *Sarcophaga* lectin in development of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina* in an autocrine manner. *Dev Biol* **144**: 86-93
- KAWASAKI K., KUBO T. & NATORI S. (1996): Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem Molec Biol* **26**: 355-364
- KIEHART D.P. & FEGHALI R. (1986): Cytoplasmic myosin from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **103**: 1517-1525
- KIGER J.A., NATZLE J.E. & GREEN M.M. (2001): Hemocytes are essential for wing maturation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10190-10195
- KNIBIEHLER B., MIRRE C., CECCHINI J.-P. & LEPARCO Y. (1987): Haemocytes accumulate collagen transcripts during *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Roux's Arch Dev Biol* **196**: 243-247
- KOBAYASHI H., KURATA S. & NATORI S. (1991): Purification of the 200 kDa hemocyte membrane protein of *Sarcophaga peregrina* and its specific interaction with fat body. *Insect Biochem* **21**: 517-522
- KOIZUMI N., IMAMURA M., KADOTANI T., YAOI K., IWAHANA H. & SATO R. (1999): The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett* **443**: 139-143
- KOTANI E., YAMAKAWA M., IWAMOTO S.-I., TASHIRO M., MORI H., SUMIDA M., MATSUBARA F., TANIAI K., KADONO-OKUDA K., KATO Y. & MORI H. (1995): Cloning and expression of the gene hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochim Biophys Acta* **1260**: 245-258
- KRAMEROV A.A., METAKOVSKY E.V., POLUKAROVA L.G. & GVOZDEV, V.A. (1983): Glycoprotein patterns in different established cell-lines of *Drosophila melanogaster* responding to 20-hydroxyecdysone. *Insect Biochem* **13**: 655-663

- KRAMEROV A.A., ARBATSKY N.P., ROZOVSKY Y.M., MIKHALEVA E.A., POLESSKAYA O.O., GVOZDEV V.A. & SHIBAEV V.N. (1996): Mucin-type glycoprotein from *Drosophila melanogaster* embryonic cells: characterization of carbohydrate component. *FEBS Lett* **378**: 213-218
- KRAMEROV A.A., MIKHALEVA E.A., ROZOVSKY Y.M., POCHUEVA T.V., BAIKOVA N.A., ARSENJEVA E.L. & GVOZDEV V.A. (1997): Insect mucin-type glycoprotein: Immunodetection of the o-glycosylated epitope in *Drosophila melanogaster* cells and tissue. *Insect Biochem Molec Biol* **27**: 513-521
- KURATA S., KOMANO H. & NATORI S. (1989): Dissociation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) fat body by pupal hemocytes in vitro. *J Insect Physiol* **35**: 559-565
- KURATA S., KOBAYASHI H. & NATORI S. (1991): Participation of a 200-kDa hemocyte membrane protein in the dissociation of the fat body at the metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev Biol* **146**: 179-185
- KURATA S., SAITO H. & NATORI S. (1992a): Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga peregrina*. *Eur J Biochem* **204**: 911-914
- KURATA S., SAITO H. & NATORI S. (1992b): The 29 kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev Biol* **153**: 115-121
- KUSCHE-GULLBERG M., GARRISON K., MACKRELL A.J., FESSLER L.I. & FESSLER J.H. (1992): Laminin A chain: Expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *EMBO J* **11**: 4519-4527
- LACKIE A.M. (1988): Haemocyte behaviour. *Adv Insect Physiol* **21**: 85-178
- LAEMMLI U.K. (1969): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LAI-FOOK J. (1973): The structure of the haemocytes of *Calpododes ethlius* (Lepidoptera). *J Morph* **139**: 79-104
- LAN Q., WU Z. & RIDDIFORD L.M. (1997): Regulation of the ecdysone receptor, USP, E75 and MHR3 mRNAs by 20-hydroxyecdysone in the GV1 cell line of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Mol Biol* **6**: 3-10
- LANOT R., ZACHARY D., HOLDER F. & MEISTER M. (2001): Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **230**: 243-257
- LEA M.S. & GILBERT L.I. (1966): The hemocytes of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera). *J Morph* **118**: 197-216
- LEBESTKY T., CHANG T., HARTENSTEIN V. & BANERJEE U. (2000): Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**: 146-149
- LESHKO-LINDSAY L.A. & CORCES V.G. (1997): The role of selectins in *Drosophila* eye and bristle development. *Development* **124**: 169-180
- LEVENBOOK L. (1985): Insect storage proteins. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology", eds. G.A. Kerkut & L.I. Gilbert, Vol 10, pp. 307-346, Oxford: Pergamon Press Oxford
- LI J.Y. & CHRISTENSEN B.M. (1990): Immune competence of *Aedes trivittatus* hemocytes as assessed by lectin binding. *J Parasitol* **76**: 276-278
- LIU G., KANG D. & STEINER H. (2000): *Trichoplusia ni* lebecin, an inducible immune gene with a downstream insertion element. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 803-807
- LOCKE M. (1989): Secretion by insect heart muscle cells. *J Insect Physiol* **35**: 53-56
- LORET S.L. & STRAND M.R. (1998): Follow-up of protein release from *Pseudoplusia includens* hemocytes: a first step toward identification of factors mediating encapsulation in insects. *Eur J Cell Biol* **76**: 146-155
- LUNSTRUM G.P., BACHINGER H.P., FESSLER L.I., DUNCAN K.G., NELSON R.E. & FESSLER J.H. (1988): *Drosophila* basement membrane procollagen IV. I. Protein characterization and distribution. *J Biol Chem* **263**: 18318-18327

- LYNN D.E. & OBERLANDER H. (1981): The effect of cytoskeletal disrupting agents on the morphological response of a cloned *Manduca sexta* cell line to 20-hydroxyecdysone. *Roux's Arch Dev Biol* **190**: 150-155
- MANSFIELD S.G., AL-SHIRAWI D.Y., KETCHUM A.S., NEWBERN E.C. & KIEHART D.P. (1996): Molecular organization and alternative splicing in zipper, the gene that encodes the *Drosophila* non-muscle myosin II heavy chain. *J Mol Biol* **255**: 98-109
- MARMARAS V.J. & CHARALAMBIDIS N. (1992): Certain hemocyte proteins of the medfly, *Ceratitis capitata*, are responsible for nonself recognition and immobilization of *Escherichia coli* in vitro. *Arch Insect Biochem Physiol* **21**: 281-288
- MARMARAS V.J., BOURNAZOS S.N., KATSORIS P.G. & LAMBROPOULOU M. (1993): Defense mechanisms in insects: Certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. *Arch Insect Biochem Physiol* **23**: 169-180
- MARMARAS V.J., CHARALAMBIDIS N.D. & LAMBROPOULOU M. (1994): Cellular defense mechanisms in *C. capitata*: Recognition and entrapment of *E. coli* by hemocytes. *Arch Insect Biochem Physiol* **26**: 1-14
- MARMARAS V.J., CHARALAMBIDIS N.D. & ZERVAS C.G. (1996): Immune response in insects: The role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch Insect Biochem Physiol* **31**: 119-133
- MCKENZIE A.N.J. & PRESTON T.M. (1992): Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation. *Dev Comp Immunol* **16**: 99-130
- MEAD G.P., RATCLIFFE N.A. & RENWRANTZ L.R. (1986): The separation of insect haemocyte types on percoll gradients; methodology and problems. *J Insect Physiol* **32**: 167-177
- MEISTER M. & RICHARDS G. (1996): Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipterin gene in *Drosophila* larvae. *Insect Biochem Molec Biol* **26**: 155-160
- MIRRE C., CECCHINI J.P., LE PARCO Y. & KNIBIEHLER B. (1988): De novo expression of a type IV collagen gene in *Drosophila* embryos is restricted to mesodermal derivatives and occurs at germ band shortening. *Development* **102**: 369-376
- MITSUHASHI J. & GRACE T.D.C. (1970): The effects of insect hormones on the multiplication rates of cultured insect cells in vitro. *Appl Entomol Zool* **5**: 182-188
- MOHRIG W. & MESSNER B. (1967): Lysozym im humoralen Abwehrmechanismus spezifisch und unspezifisch immunisierter Insektenlarven. *Biol Rundsch* **5**: 181-183
- MOLNAR K., HOLDERITH BORHEGYI N., CSIKOS G. & SASS M. (2001): Distribution of serpins in the tissues of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) larvae. Existence of new serpins possibly encoded by a gene distinct from the serpin-1 gene. *J Insect Physiol* **47**: 675-687
- MONPEYSSIN M & BEAULATON J. (1978): Hemocytogenesis in the oak silkworm *Antheraea pernyi* and some other Lepidoptera I. Ultrastructural study of normal processes. *J Ultrastructure Research* **64**: 35-45
- MORI H. (1979): Embryonic hemocytes: Origin and development. In "Insect Hemocytes", ed A.P. Gupta, pp. 3-27, Cambridge: Cambridge University Press
- MULLETT H., RATCLIFFE N.A. & ROWLEY A.F. (1993): The generation and characterisation of anti-insect blood cell monoclonal antibodies. *J Cell Sci* **105**: 93-100
- MURRAY M.A., FESSLER L.I. & PALKA J. (1995): Changing Distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **168**: 150-165
- NANBU R., NAKAJIMA Y., ANDO K. & NATORI S. (1988): Novel feature of expression of the sarcotoxin IA gene in development of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem Biophys Res Commun* **150**: 540-544
- NAPPI A.J. & SILVERS M. (1984): Cell surface changes associated with cellular immune reactions in *Drosophila*. *Science* **225**: 1166-1168

- NARDI J.B. & MIKLASZ S.D. (1989): Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tiss Cell* **21**: 559-567
- NARDI J.B., MARTOS R., WALDEN K.K.O., LAMPE D.J. & ROBERTSON H.M. (1999): Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Molec Biol* **29**: 883-897
- NARDI J.B., GAO C. & KANOST M.R. (2001): The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. *J Insect Physiol* **47**: 997-1006
- NATORI S., SHIRAIISHI H., HORI S. & KOBAYASHI A. (1999): The roles of *Sarcophaga* defense molecules in immunity and metamorphosis. *Dev Comp Immunol* **23**: 317-328
- NEUWIRTH M. (1973): The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J Morph* **139**: 105-124
- NISHIKAWA T. & NATORI S. (2001): Targeted disruption of a pupal hemocyte protein of *Sarcophaga* by RNA interference. *Eur J Biochem* **268**: 5295-5299
- NITTONO Y. (1960): Studies on the blood cells of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Bull seric Exp Sta Tokyo* **16**: 171-266
- NITTONO Y. (1964): Formation of hemocytes near the imaginal wing disc in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J seric Sci Japan* **33**: 43-45
- NUTTING W.L. (1951): A comparative anatomical study of the heart and accessory structures of the orthopteroid insects. *J Morph* **89**: 501-597
- OCHIAI M., NIKI T. & ASHIDA M. (1992): Immunocytochemical localization of beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res* **268**: 431-437
- OCHIAI M. & ASHIDA M. (1999): A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **274**: 11854-11858
- OGEL, S. (1954): A contribution to the study of blood-cells in Orthoptera. *Commun Fac Sci Univ Ankara Ser C* **4**: 15-41
- ONISHI A., HAYAKAWA Y., MATSUDA Y., KWON K.W., TAKAHASHI T.A. & SEKIGUCHI S. (1995): Growth-blocking peptide titer during larval development of parasitized and cold-stressed armyworm. *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 1121-1127
- OTTAVIANI E. & FRANCESCHI C. (1997): The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine system. *Immun Today* **18**: 169-173
- PATTON, R.L. & FLINT, R.A. (1959): The variation in blood-cell count of *Periplaneta americana* during a molt. *Ann Entomol Soc Amer* **52**: 240-242
- PEARSON A., LUX A. & KRIEGER M. (1995): Expression cloning of dSR-C1, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4056-4060
- PECH L.L. & STRAND M.R. (1995): Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) involves an RGD-dependent cell adhesion mechanism. *J Insect Physiol* **41**: 481-488
- PECH L.L. & STRAND M.R. (1996): Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci* **109**: 2053-2060
- PECH L.L. & STRAND M.R. (2000): Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J Insect Physiol* **46**: 1565-1573

- PECH L.L., TRUDEAU D. & STRAND M.R. (1994): Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens*. *Cell Tissue Res* **277**: 159-167
- PECH L.L., TRUDEAU D. & STRAND M.R. (1995): Effects of basement membranes on the behavior of hemocytes from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera; Noctuidae): Development of an in vitro encapsulation assay. *J Insect Physiol* **41**: 801-807
- PENDLAND J.C. & BOUCIAS D.G. (1996): Phagocytosis of lectin-opsonized fungal cells and endocytosis of the ligand by insect *Spodoptera exigua* granular hemocytes: an ultrstructural and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **28**: 57-67
- PENDLAND J.C. & BOUCIAS D.G. (1998): Characterization of monoclonal antibodies against cell wall epitopes of the insect pathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*: differential binding to fungal surfaces and cross-reactivity with host hemocytes and basement membrane components. *Eur J Cell Biol* **75**: 118-127
- PENDLAND J.C. & BOUCIAS D.G. (2000): Comparative analysis of the binding of antibodies prepared against the insect *Spodoptera exigua* and against the mycopathogen *Nomuraea rileyi*. *J Invert Pathol* **75**: 107-116
- PRASAD S.V., TSUCHIDA K., COLE K.D. & WELLS M.A. (1987): Lipophorin biosynthesis during the life cycle of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. In "Molecular Entomology" ed. J.H. Law, pp. 267-273, New York: Liss
- RANTAMAKI J., DURRANT H., JIANG Z., RATCLIFFE N.A., DUVIC B. & SÖDERHÄLL K. (1991): Isolation of a 90 kDa protein from haemocytes of *Blaberus craniifer* which has similar properties to the 76 kDa protein from crayfish haemocytes. *J Insect Physiol* **37**: 627-634
- RATCLIFFE N.A. & PRICE C.D. (1974): Correlation of light and electron microscopic hemocyte structure in the Dictyoptera. *J Morph* **144**: 485-498
- RATCLIFFE N.A. & ROWLEY A.F. (1979): Role of hemocytes in defense against biological agents. In: "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 331-414, Cambridge: Cambridge University Press
- RATCLIFFE N.A., ROWLEY A.F., FITZGERALD S.W. & RHODES C.P. (1985): Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int Rev Cytol* **97**: 186-350
- REHM H. (2000): "Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics." Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- REHORN K.P., THELEN H., MICHELSON A.M. & REUTER R. (1996): A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**: 4023-4031
- REINECKE J.P., BUCKNER J.S. & GRUGEL S.R. (1980): Life cycle of laboratory-reared tobacco hornworms, *Manduca sexta*, a study of development and behavior, using time-lapse cinematography. *Biol Bull* **158**: 129-140
- RESS C., HOLTMANN M., MAAS U., SOFSKY J. & DORN A. (2000): 20-Hydroxyecdysone-induced differentiation and apoptosis in the *Drosophila* cell line, l(2)mbn. *Tiss Cell* **32**: 464-477
- REYNOLDS, E.S. (1963): The use of leadcitrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**: 208-217
- RHEUBEN M.B. (1992): Degenerative changes in the muscle fibers of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J Exp Biol* **167**: 91-117
- RIDDIFORD L.M. (1976): Hormonal control of insect epidermal cell commitment in vitro. *Nature* **259**: 115-117
- RIDDIFORD L.M. (1978): Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol* **34**: 438-446
- RIDDIFORD L.M., CURTIS A.T. & KIGUCHI K. (1979): Culture of the epidermis of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *TCA Manual* **5**: 975-985
- RIDDIFORD L.M. & HICE R.H. (1985): Developmental profiles of the mRNA for the *Manduca* arylphorin and two other storage proteins during the final larval instar of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* **15**: 489-502

- RIZKI, T.M. (1957): Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*. *J Morph* **100**: 437-458
- RIZKI R.M. & RIZKI T.M. (1980): Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Roux's Arch Dev Biol* **189**: 207-213
- RIZKI T.M. & RIZKI R.M. (1982): The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In "Insect Ultrastructure and Functioning of Insect Cells", eds. H. Akai et al., pp. 173-176, Japan: Soc Insect Cells
- RIZKI T.M. & RIZKI R.M. (1983): Blood cell surface changes in *Drosophila* mutants with melanotic tumors. *Science* **220**:73-75
- RIZKI R.M., RIZKI T.M., BEBBINGTON C.R. & ROBERTS D.B. (1983): *Drosophila* larval fat body surfaces, changes in transplant compatibility during development. *Roux's Arch Dev Biol* **192**: 1-7
- RIZKI T.M. & RIZKI R.M. (1984): The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In "Insect Ultrastructure" Vol 2., eds. R.C. King & H. Akai, pp. 579-604, New York: Plenum Publishing Corporation
- ROWLEY A.F. & RATCLIFFE N.A. (1976): The granular cells of *Galleria mellonella* during clotting and phagocytic reactions in vitro. *Tiss Cell* **8**: 437-446
- ROWLEY A.F. & RATCLIFFE N.A. (1981): Insects. In "Invertebrate blood cells", eds. N.A. Ratcliffe & A.F. Rowley, pp. 421-488, London - New York: Academic Press
- RUDD P.M., ELLIOTT T., CRESSWELL P. WILSON I.A. & DWEK R.A. (2001): Glycosylation and the immune system. *Science* **291**: 2370-2376
- RUSSELL, V.W. & DUNN, P.E. (1991): Lysozyme in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol* **17**: 67-80
- RUSSO J. DUPAS S., FEY F., CARTON Y. & BREHELIN M. (1996): Insect immunity: Early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitol.* **112**: 135-142
- RYAN R.O., ANDERSON D.R., GRIMES W.J. & LAW J.H. (1985): Arylphorin from *Manduca sexta*: Carbohydrat structure and immunological studies. *Arch Biochem Biophys* **243**: 115-124
- SALZET M., VIEAU D. & DAY R. (2000): Crosstalk between nervous and immune systems through the animal kingdom: focus on opioids. *Trends Neurosci* **23**: 550-555
- SAMAKOVLIS C., KIMBRELL D.A., KYLSTEN P., ENGSTROM A. & HULTMARK D. (1990): The immune response in *Drosophila*: Pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J* **9**: 2969-2976
- SANTONI V., MOLLOY M. & RABILLOU T. (2000): Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* **21**: 1054-1070
- SASS M., KISS A. & LOCKE M. (1994): Integument and hemocyte peptides. *J Insect Physiol* **40**: 407-421
- SATOH D., HORII A., OCHIAI M & ASHIDA M. (1999): Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem* **274**: 7441-7453
- SCHUBIGER M., WADE A.A., CARNEY G.E., TRUMAN J.W. & BENDER M. (1998): *Drosophila* EcR-B ecdysone receptor isoforms are required für larval molting and for neuron remodeling during metamorphosis. *Development* **125**: 2053-2062
- SHANMUGAVELU M., BAYTAN A.R., CHESNUT J.D. & BONNING B.C. (2000): A novel protein that binds juvenil hormone esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. *J Biol Chem* **275**: 1802-1806
- SHAPIRO M. (1979): Changes in hemocyte populations. In: "Insect Hemocytes", ed. A.P. Gupta, pp. 475-523, Cambridge: Cambridge University Press

- SHRESTHA R. & GATEFF E. (1982a): Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth Differ* **24**: 65-82
- SHRESTHA R. & GATEFF E. (1982b): Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the tumorous hematopoietic organs and the hemolymph of the mutant lethal (1) malignant blood neoplasm (l(1)mbn) of *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth Differ* **24**: 83-98
- SHRIVASTAVA S.C. & RICHARDS A.G. (1965): An autoradiographic study of the relation between haemocytes and connective tissue in the wax moth, *Galleria mellonella*. *Biol Bull* **128**: 337-345
- SOHI S.S. (1971): In vitro cultivation of hemocytes of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Can J Zool* **49**: 1355-1358
- SOHI S.S., PALLI S.R., COOK B.J. & RETNAKARAN A. (1995): Forest insect cell lines responsive to 20-hydroxyecdysone and two nonsteroidal ecdysone agonists, RH-5849 and RH-5992. *J Insect Physiol* **41**: 457-464
- STRAND M.R. & JOHNSON J.A. (1996): Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*. *J Insect Physiol* **42**: 21-31
- STRAND M.R. & CLARK K.D. (1999): Plasmacyte spreading peptide induces spreading of plasmacytes but represses spreading of granulocytes. *Arch Insect Biochem Physiol* **42**: 213-223
- STRAND M.R., HAYAKAWA Y. & CLARK K.D. (2000): Plasmacyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *J Insect Physiol* **46**: 817-824
- SUN D., ZIEGLER R., MILLIGAN C.E., FAHRBACH S. & SCHWARTZ L.M. (1995): Apolipoprotein III is dramatically up-regulated during the programmed cell death of insect skeletal muscle and neurons. *J Neurobiol* **26**: 119-129
- TAKAHASHI N., KURATA S. & NATORI S. (1993): Molecular cloning of cDNA for the 29-kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body during metamorphosis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *FEBS Lett* **334**: 153-157
- TALBOT W.S., SWYRYD E.A. & HOGNESS D.S. (1993): *Drosophila* tissues with different metamorphic responses express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**: 1323-1337
- TELFER W.H., KEIM P.S. & LAW J.H. (1983): Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: Comparisons with calliphorin and manducin. *Insect Biochem* **13**: 601-613
- TEPASS U., FESSLER L.I., AZIZ A. & HARTENSTEIN V. (1994): Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**: 1829-1837
- THEOPOLD U., SAMAKOVLIS C., ERDJUMENT-BROMAGE H., DILLON N., AXELSSON, B., SCHMIDT O., TEMPEST P. & HULTMARK D. (1996): *Helix pomatia* lectin, an inducer of *Drosophila* immune response binds to hemomucin, a novel surface mucin. *J Biol Chem* **271**: 12708-12715
- THEOPOLD U. & SCHMIDT O. (1997): *Helix pomatia* lectin and annexin V, two molecular probes for insect microparticles: possible involvement in hemolymph coagulation. *J Insect Physiol* **43**: 667-674
- THEOPOLD U., RISSLER M., FABBRI M., SCHMIDT O. & NATORI S. (1999): Insect glycobiology: A lectin multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 923-927
- THEOPOLD U., DORIAN C. & SCHMIDT O. (2001): Changes in glycosylation during *Drosophila* development. The influence of ecdysone on hemomucin isoforms. *Insect Biochem Molec Biol* **31**: 189-197
- THEOPOLD U., LI D., FABBRI M., SCHERFER C. & SCHMIDT O. (2002): The coagulation of insect hemolymph. *Cell Mol Life Sci* **59**: 363-372
- THUMMEL C.S. (1996): Files on steroids - *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet* **12**: 306-310
- THUMMEL C.S. (2002): Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect Biochem Molec Biol* **32**: 113-120



- TRENCZEK T. & FAYE I. (1988): Synthesis of immune proteins in primary cultures of fat body from *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem* **18**: 299-312
- TRENCZEK T. & BENNICH H. (1992): Characterization of haemocytes of *Hyalophora cecropia* by monoclonal antibodies. *Verh Dtsch Zool Ges* **85**: 216
- TRENCZEK T., WILLOTT E. & KANOST M.R. (1998): Production of monoclonal antibodies to study insect hemocytes. In "Techniques in Insect Immunology 21-33 SOS Publication", eds. A. Wiesner et al., Fair Haven: Techn Fish Immun - SOS Publications, Vol Insects
- TRENCZEK T. (1998): Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology* **101**: 298-315
- TRENCZEK T., SCHOLZ F.R., POPPE R., FRANKE S. & GATEFF E. (1999): Characterization of a hemocyte component typical of granular cells of *Hyalophora cecropia* pupae and crystal cells of *Drosophila melanogaster* but also present in garland cells of late *Drosophila* embryo. *Proceedings DGfI, Jena*
- TRUMAN J.W., TALBOT W.S., FAHRBACH S.E. & HOGNESS D.S. (1994): Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. *Development* **120**: 219-234
- TRUMBLY R.J. & JARRY B. (1983): Stage-specific protein synthesis during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **2**: 1281-1290
- TRUMAN J.W. & RIDDIFORD L.M. (2002): Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu Rev Entomol* **47**: 467-500
- TSAKAS S. & MARMARAS V.J. (1990): Detection of haemocyte proteins in the integument of the developing mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. Evidence that certain haemocyte proteins serve as tyrosine carriers. *Roux's Arch Dev Biol* **199**: 281-288
- TSUCHIDA K. & WELLS M.A. (1990): Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *J Biol Chem* **265**: 5761-5767
- TSUZUKI S., IWAMI M. & SAKURAI S. (2001): Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochem Molec Biol* **31**: 321-331
- TURNER M.W. (1996): Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* **17**: 532-539
- UTTENWEILER-JOSEPH S., MONIATTE M., LAGUEUX M., VANDORSSEÖAER A., HOFFMANN J.A. & BULET P. (1998): Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11342-11347
- VOLKMAN B.J., ANDERSON M.E., CLARK K.D., HAYAKAWA Y., STRAND M.R. & MARKLEY J.L. (1999): Structure of the cytokine plasmatocyte spreading peptide from *Pseudoplusia includens*. *J Biol Chem* **274**: 4493-4496
- WALTERS D.R. (1970): Hemocytes of saturniid silkworms: their behavior in vivo and in vitro in response to diapause, development, and injury. *J. Experimental Zool* **174**: 441-450
- WANG Y., JIANG H. & KANOST M.R. (1999): Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. *Insect Biochem Mol Biol* **29**: 1075-1086
- WARREN J.T. & GILBERT L.I. (1986): Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* **16**: 65-82
- WEBB B.A. & RIDDIFORD L.M. (1988a): Synthesis of two storage proteins during larval development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* **130**: 671-681
- WEBB B.A. & RIDDIFORD L.M. (1988b): Regulation of expression of arylphorin and female-specific protein mRNAs in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* **130**: 682-692

- WERNER T., LIU G., KANG D., EKENGREN S., STEINER H. & HULTMARK D. (2000): A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13772-13777
- WHEELER R.E. (1963): Studies on the total haemocyte count and haemolymph volume in *Periplaneta americana* (L.) with special reference to the last moulting cycle. *J Insect Physiol* **9**: 223-235
- WHITTEN J.M. (1964): Haemocytes and the metamorphosing tissues in *Sarcophaga bullata*, *Drosophila melanogaster*, and other cyclorrhaphous diptera. *J Insect Physiol* **10**: 447-469
- WHITTEN J.M. (1969): Haemocyte activity in relation to epidermal cell growth, cuticle secretion, and cell death in a metamorphosing cyclorrhaphan pupa. *J Insect Physiol* **15**: 763-778
- WIEGAND C., LEVIN D., GILLESPIE J.P., WILLOTT E., KANOST M.R. & TRENCZEK T. (2000): Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Arch Insect Biochem Physiol* **45**: 95-108
- WIESNER A. & GÖTZ P. (1993): Silica beads induce cellular and humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae and in isolated plasmatocytes, obtained by a newly adapted nylon wool separation method. *J Insect Physiol* **39**: 865-876
- WIESNER A., LOSEN S., KOPACEK P., WEISE C. & GÖTZ P. (1997): Isolated Apolipoprotein III from *Galleria mellonella* stimulates the immune reactions of this insect. *J Insect Physiol* **43**: 383-391
- WIGGLESWORTH V.B. (1956): The haemocytes and connective tissue formation in an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Q J Micr Sci* **97**: 89-98
- WIGGLESWORTH V.B. (1973): Haemocyte and basement membrane formation in *Rhodnius*. *J Insect Physiol* **19**: 831-844
- WIGGLESWORTH V.B. (1979a): Hemocytes and growth in insects. In "Insect Hemocytes", ed A.P. Gupta, pp. 303-318, Cambridge: Cambridge University Press
- WIGGLESWORTH V.B. (1979b): Secretory activities of plasmatocytes and oenocytoids during the moulting cycle in an insect (*Rhodnius*). *Tiss Cell* **11**: 69-78
- WILKIN M.B., BECKER M.N., MULVEY D., PHAN I., CHAO A., COOPER K., CHUNG H.-J., CAMPBELL I.D., BARON M. & MACINTYRE R. (2000): *Drosophila* Dumpy is a giant extracellular protein required to maintain tension to epidermal-cuticle attachment sites. *Curr Biol* **10**: 559-567
- WILLOTT E., TRENCZEK T., THROWER L.W. & KANOST M.R. (1994): Immunochemical identification of insect hemocyte populations: Monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *Eur J Cell Biol* **65**: 417-423
- WILSON R., CHEN C. & RATCLIFFE N.A. (1999): Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J Immunol* **162**: 1590-1596
- WOLFGANG W.J. & RIDDIFORD L.M. (1986): Larval cuticular morphogenesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its hormonal regulation. *Dev Biol* **113**: 305-316
- WYSS C. (1970): Juvenile hormone analogue counteracts growth stimulation and inhibition by ecdysones in clonal *Drosophila* cell line. *Experientia* **32**: 1272-1274
- YAMAKAWA M. & TANAKA H. (1999): Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol* **23**: 281-289
- YAMAMOTO R.T. (1969): Mass rearing tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation. *J Econ Entomol* **62**: 1427-1431

- YAMANO Y., MATSUMOTO M., INOUE K., KAWABATA T. & MORISHIMA I. (1994): Cloning of cDNAs for cecropins A and B, and expression of the genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 1476-1478
- YAMASHITA M. & IWABUCHI K. (2001): *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual monocultures. *J Insect Physiol* **47**: 325-331
- YAMASHITA R.A., SELLERS J.R. & ANDERSON J.B. (2000): Identification and analysis of the myosin superfamily in *Drosophila*: a database approach. *J Musc Res Cell Motil* **21**: 491-505
- YANG J., FURUKAWA S., SAGISAKA A., SHIBASHI J., TANAI K., SHONO T. & YAMAKAWA M. (1999): cDNA cloning and gene expression of cecropin D, an antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **122**: 409-414
- YU X.Q., PRAKASH O. & KANOST M.R. (1999): Structure of a paralytic peptide from an insect, *Manduca sexta*. *J Pept Res* **54**: 256-261
- YU X.Q. & KANOST M.R. (1999): Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin. *Arch Insect Biochem Physiol* **42**: 198-212.
- ZACHARY D. & HOFFMANN J.A. (1973): The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig. Diptera). *Z Zellforsch* **141**: 55-73
- ZEE M.C. & WEEKS J.C. (2001): Developmental change in the steroid hormone signal for cell-autonomous, segment-specific programmed cell death of a motoneuron. *Dev Biol* **235**: 45-61
- ZIEGLER R., WILLINGHAM L.A., SANDERS S.J., TAMEN-SMITH L. & TSUCHIDA K. (1995): Apolipoprotein-III and adipokinetic hormone in lipid metabolism of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 101-108.

## 7 Abkürzungen

A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes bzw. entsalzenes Wasser
AC-Saline	Antikoagulanzsaline
AG	Arbeitsgruppe
BSA	"bovine serum albumin", Rinderserumalbumin
Cy 3	Cyanin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DHC	"differential hemocyte count", differentieller Zelltiter [%]
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
FBS	"fetal bovine serum", Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GR	Granuläre Zelle
Ig	Immunglobulin
L	Larvenstadium, z.B. L5 - Larve im fünften Larvenstadium
L5dx	Larve im fünften Larvenstadium, x Tage alt
<i>M. sexta</i>	<i>Manduca sexta</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
OE	Oenozytoid
P	Puppenstadium
Pdx	Puppe, x Tage alt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PL	Plasmatozyt
SDS	"sodium dodecyl sulfate", Natriumdodecylsulfat
SP	Sphärule Zelle
TBS	"Tris buffered saline", Tris-gepufferte Saline
THC	"total hemocyte count", Titer aller Zellen [Zellen/ml]
THCg	Zelltiter bezogen auf das Körpergewicht [Zellen/ml x g]
Tris	Trisaminomethanbase
Tris-Puffer	Tris in Lösung mit HCl auf den entsprechenden pH eingestellt
β-Ecdyson	20-Hydroxy-Ecdyson

Schreibweise der Antikörpernumerierung

Bsp.: "Z19E06 [MS#115]" bedeutet der Antikörper Z19E06 wurde getestet, der entsprechende Subklon MS#115 stand nicht zur Verfügung oder hatte andere Bindungseigenschaften

Bsp.: "MS#112 [X02C11]" bedeutet der Subklon MS#112 wurde getestet, der Mutterklon X02C11 stand nicht zur Verfügung oder hatte andere Bindungseigenschaften

Bsp.: "X12F01 und Subklon MS#32" bedeutet sowohl Mutterklon X12F01 als auch Subklon MS#32 wurden getestet und zeigten die gleichen Bindungseigenschaften

Bemerkung: das Mitführen der entsprechenden Mutter- oder Subklon wurde von mir für sinnvoll erachtet, um die Zuordnung zu vereinfachen. In den Kooperationslaboren von E. Willott und M.R. Kanost wird teilweise mit Mutter- oder Subklonen gearbeitet, die uns nicht zur Verfügung stehen und umgekehrt.

## 8 Anhang

### Anhang 1

Ermittelte Werte für Hämolympfmenge, THC und Körpergewicht von Larven und Puppen ausgewählten Alters

Verwendete Abkürzungen:

HL Hämolympfmenge [ $\mu$ l]

THC "total hemocyte count", Titer [Zellen/ml]

THCg THC bezogen auf das Körpergewicht [Zellen/ml x g]

Stand.abw. Standardabweichung

	HL in µl	THC	Körpergewicht	THCg
<b>L4d3</b>				
1	260	10600000	1,05	11130000
2	290	12500000	1,16	14500000
3	410	11400000	1,46	16644000
4	410	13200000	1,44	19008000
5	420	10200000	1,49	15198000
6	450	13200000	1,6	21120000
Mittelwert	373,333333	11850000	1,366666667	16266666,7
Stand.abw.	78,1451641	1308051,99	0,212947568	3517403,51
<b>L4d5</b>				
1	270	14800000	1,3	19240000
2	300	9600000	1,28	12288000
3	300	18300000	1,04	19032000
4	290	8400000	1,07	8988000
5	460	15200000	1,49	22648000
6	360	21200000	1,58	33496000
7	390	14200000	1,44	20448000
Mittelwert	338,571429	14528571,4	1,314285714	19448571,4
Stand.abw.	68,1734483	4494705,88	0,205577004	7847290,63
<b>L4d6</b>				
1	270	9200000	1,26	11592000
2	420	14800000	1,41	20868000
3	320	17400000	1,31	22794000
4	450	19200000	1,56	29952000
5	390	19400000	1,21	23474000
6	400	14800000	1,51	22348000
Mittelwert	375	15800000	1,376666667	21838000
Stand.abw.	67,1565336	3811561,36	0,140237893	5926363,88
<b>L5d0</b>				
1	260	20000000	1,5	30000000
2	340	17400000	1,61	28014000
3	530	16600000	2,66	44156000
4	220	19800000	1,81	35838000
5	280	15200000	1,87	28424000
Mittelwert	326	17800000	1,89	33286400
Stand.abw.	121,983605	2073644,14	0,455576558	6835576,55
<b>L5d2</b>				
1	260	17200000	1,87	32164000
2	420	13200000	3,35	44220000
3	690	9000000	3,88	34920000
4	540	13800000	3,35	46230000
5	720	8800000	4,07	35816000
6	240	11200000	1,95	21840000
7	690	9600000	3,84	36864000
Mittelwert	508,571429	11828571,4	3,187142857	36007714,3
Stand.abw.	205,461154	3086375,59	0,91324904	8055930,85
<b>L5d4</b>				
1	1810	7000000	11,07	77490000
2	1260	4800000	8,56	41088000
3	2330	4600000	11	50600000
4	1610	7600000	10,56	80256000
5	1320	19800000	6,92	137016000
6	1760	6800000	8,79	59772000
Mittelwert	1754	6160000	9,996	61841200

Stand.abw.	387,207954	1366747,97	1,224348807	16921371,7
<b>L5d6</b>				
1	1900	7600000	12,2	92720000
2	2580	7500000	11,6	87000000
3	2130	2600000	10,16	26416000
4	2790	1400000	11,76	16464000
5	810	1600000	11,77	18832000
6	2300	1800000	10,85	19530000
Mittelwert	2085	3750000	11,39	43493666,7
Stand.abw.	700,021428	2971699,85	0,746458304	36112982,8
<b>L5d8</b>				
1	1180	3400000	6,23	21182000
2	750	3100000	5,85	18135000
3	1890	4500000	8,31	37395000
4	1250	3900000	7,77	30303000
5	1500	5600000	7,49	41944000
6	2010	6700000	8,56	57352000
Mittelwert	1430	4533333,33	7,368333333	34385166,7
Stand.abw.	471,211205	1383714,81	1,103094133	14482583,4
<b>L5d10</b>				
1	670	8200000	5,19	42558000
2	670	9800000	6,12	59976000
3	900	15200000	5	76000000
4	790	9600000	5,43	52128000
5	440	7600000	5,3	40280000
6	580	7400000	6,1	45140000
Mittelwert	675	9633333,33	5,523333333	52680333,3
Stand.abw.	160,093723	2904938,32	0,475843111	13493889
<b>Pd0</b>				
1	290	1000000	3,58	3580000
2	200	2400000	3,67	8808000
3	190	900000	3,47	3123000
4	140	4900000	3,77	18473000
5	300	4600000	4,05	18630000
6	250	1200000	3,23	3876000
Mittelwert	228,333333	2500000	3,628333333	9415000
Stand.abw.	62,4232863	1826472,01	0,277734886	7370875,77



## Anhang 2

Ergebnisse des Screenens der monoklonalen Antikörper aus der Fusion von WILLOTT und Mitarbeitern (1994)

Verwendete Abkürzungen:

PL	Plasmatozyten
SP	sphärule Zellen
GR	Granuläre Zellen
OE	Oenozytoide
d	dots (Punkte)
c	Cytoplasma
s	Surface (Zelloberfläche)
g	Granulen
n	Nucleus (Zellkern)
>	Schwache Färbung
>>	sehr schwache Färbung
!	sehr eindeutige Färbung
?	nicht eindeutige, variable Färbung

Nummer	Subklon	Was getestet?	L5 (~d2) eingeföhren				L5 (~d2) ohne Triton				L5 (~d2) mit Triton				P(~d1) eingefr.	
			PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL	GR
X 01 B 12			d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
X 01 D 05			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 01 E 05			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 02 C 11	MS#112	X 02 C 11	d	>d	-	d!	-	-	-	-	-	-	-	>c	-	>d
X 02 E 05	MS#101	X 02 E 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 02 F 01b			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 02 F 02	MS#43	X 02 F 02	s	-	s	s	s	s	>s	s	s	s	s	s	g	s
X 03 A 01			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 03 D 11	MS#104	X 03 D 11	-	>d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c
X 03 F 10			>d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 03 G 04	MS#113	X 03 G 04	scd?	scd?	scd?	scd?	scd?	cd	cd	cd	cd	cd	cd	sc?	sc?	sc?
X 04 G 10			ds	>s	>s	s	s	s	s	s	s	s	s	>d	ds	>d
X 05 A 02	MS#26, MS#131	X 05 A 02	>d	>d	s	-	-	d	d	d	d	d	d	c	c	c
X 05 B 06			d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	>d	dg	d
X 05 E 12			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 06 A 01			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 06 C 03	MS#106	X 06 C 03	>d	>d	ds	ds	ds	ds	ds	s!	s	s	g	g,s	g	g
X 06 F 10			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 06 G 08			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 07 A 07			-	-	>d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 07 B 08	MS#70	X 07 B 08	>d	>d	s	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	s, sg	>d
X 07 C 02	MS#73	X 07 C 02	-	>>d	d	d	d	d	d	ds	ds	ds	ds	>c	sg	dg
X 07 C 04			>>d	>>d	d	>d	>d	>d	>d	d	d	d	d	>c	sg	sg
X 07 G 07a			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 07 G 07b			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 07 G 11			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 08 B 04	nicht getestet		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 08 C 10			>d	>>d	>>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>c	sg	>d
X 08 F 07			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 08 H 07a	MS#7	X 08 H 07a	-	-	g	>>g	>>g	>>g	>>g	g	g	g	g	-	g	g
X 09 E 03			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 10 C 12			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 10 D 03			>d	>>d	>>sd	>>sd	>>sd	>>sd	>>sd	>>d	>>d	>>d	>>d	-	>>sg	sg

Nummer	Subktion	Was getestet?	L5 (~d2), eingefroren			L5 (~d2) ohne Triton			L5 (~d2) mit Triton			P(~d1) eingefr.			
			PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL
X 10 H 12			>dc	>dc	>dc	>dc	>dc	>dc	>dc	>c	>c	>c	>c	>dc	>dc
X 11 A 11			>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c	>c
X 11 E 02			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 11 E 04	MS#29, MS#125	X 11 E 04	-	-	sd	sd	sd	sd	sd	-	-	-	-	d	g
X 11 G 01	MS#20	X 11 G 01	>d	>d	sd, gd	sd, gd	sd, gd	sd, gd	sd, gd	-	-	-	-	d	sd, gd
X 11 G 09			-	>d	>d	>sd	>sd	>sd	>sd	-	-	-	-	-	sg
X 11 H 08	MS#38	X 11 H 08	d	d	s	s	s	s	s	-	-	-	-	s	s; sg
X 12 D 03	nicht getestet		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 12 E 03			sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	-	-	-	-	sd	sd, sg
X 12 F 01	MS#32	X 12 F 01	n	n	n	n	n	n	n	-	-	-	-	n	n
X 12 F 08			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 12 F 11			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 13 B 08a	MS#105	X 13 B 08a	-	-	>d	c?	c?	c?	c?	-	-	-	-	-	d
X 13 D 08			>>d	sd	sd	sd	sd	sd	sd	-	-	-	-	>d	s
X 14 C 06	MS#1	X 14 C 06	cd	cd	cd	cd	cd	cd	cd	-	-	-	-	-	-
X 14 E 07	MS#24	X 14 E 07	cd	cd	cd	cd	cd	cd	cd	-	-	-	-	cd	cd
X 15 E 05			cd	cd	cd	cd	cd	cd	cd	-	-	-	-	c	c
X 15 E 11	MS#11	X 15 E 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 15 F 06	MS#35	X 15 F 06	n	n	n	n	n	n	n	-	-	-	-	n	n
X 15 G 06			n	n	n	n	n	n	n	-	-	-	-	n	n
X 16 A 02	MS#16, MS#119	X 16 A 02	-	>d	d	d	d	d	d	-	-	-	-	-	g
X 16 C 02			>d	>d	d	d	d	d	d	-	-	-	-	d	dg
X 16 E 11			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 16 H 03			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 17 B 10	MS#36	X 17 B 10	d	>d	d, dg	d, dg	d, dg	d, dg	d, dg	-	-	-	-	d	d, dg
X 17 C 03			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 17 C 06			c	c	c	c	c	c	c	-	-	-	-	c	c
X 17 D 04	MS#30	X 17 D 04	sl	sl	sl	sl	sl	sl	sl	-	-	-	-	sl	sl
X 17 F 03	nicht getestet		sl	sl	sl	sl	sl	sl	sl	-	-	-	-	sl	sl
X 17 F 11			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 17 G 05	MS#31, MS#129	X 17 G 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 17 G 06			c	c	c	c	c	c	c	-	-	-	-	c	c



Nummer	Subktion	Was getestet?	L5 (~d2) eingefroren			L5 (~d2) ohne Triton			L5 (~d2) mit Triton			P(~d1) eingefr.			
			PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL
X 27 D 01	MS#71	X 27 D 01	>d	>d	>d	>d	c	c	c	c	c	c	c, >dg	>d	>d
X 27 D 06	nicht getestet														
X 27 D 12			>d	-	s	d	s	s	s	d	.	s, sg	.	d	s, sg
X 27 E 06b			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 27 E 09	MS#103	X 27 E 09	-	-	g	>g	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 27 F 10	MS#103	MS#103	-	-	g	>s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 27 F 12	MS#13	X 27 F 12	d	d	d	d	s	s	s	cl	-	s, sg	s, sg	d	d
X 27 G 03	nicht getestet	MS#13	d	-	-	-	-	-	-	>>d	-	-	-	d	-
X 27 G 11	nicht getestet														
X 28 A 11	MS#14	nicht getestet													
X 28 C 07	MS#72	X 28 G 04	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
X 28 G 04	MS#72	MS#72	d	.	d	>d	>d	d	d	>>d	>>d	d, sg	.	d	sg
X 29 F 02			-	-	dg	d	-	-	-	-	-	sg	>s, >sg	-	>>d
X 30 B 12	MS#41	X 30 B 12	-	-	d	d	>d	s?	s?	-	-	-	>>dg	>d	d, dg
X 30 C 06			-	-	g	d	-	-	-	-	-	g	-	-	g
X 30 G 07			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 31 A 04	MS#75	X 31 A 04	d	>d	-	d	s	-	-	c?	c?	c?	c?	-	-
X 31 A 05	MS#28	MS#75	s	s	s	s	>d	>d	>d	cl	c	-	>c	d	>d
X 31 B 04	nicht getestet	MS#28	s	s	s	s	s	s	s	>d	-	ds, dg	ds, dg	s	s, sg
X 31 B 11			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X 31 F 07			d	-	d	d	d	d	d	-	-	dg	>dg	d	sg
X 32 F 07			-	-	d	d	>>d	>>d	>>d	-	-	-	>>dg	-	d
X 32 H 02	MS#37	X 32 H 02	-	-	g	d?	-	-	-	-	-	g	>g	d?	g
X 33 A 10			>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	c?	c?	c?	c?	>d	>d
X 33 E 10	MS#74	X 33 E 10	.	.	d	.	.	.	.	-	-	dg	-	d	dg
X 33 H 09		MS#74	c	c	c	c	>>d	>>d	>>d	c	>c	s, sg	>s, >sg	-	-
X 34 B 05			c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	dc	dc
X 34 D 03			c	c	c	c	n, c	n	n	n, c	n	n	n	c	c
X 34 F 04	MS#23	X 34 F 04	>d	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
X 34 G 03	nicht getestet	MS#23	-	-	-	-	>d	>d	>d	>d	>d	>d	>d	-	-
X 34 G 04	MS#111	X 34 G 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d?	c?
X 34 G 05		MS#111	-	-	-	-	>d	>d	>d	c?	c?	c?, g?	c?	-	g?











P(-d1) o. Triton		P(-d1) m. Triton		Bemerkungen	Was getestet?	Subktion	Nummer
PL	GR	PL	SP				
d	d	>d	>d	sandiger Hintergrund, vermutlich integrales Protein			X 01 B 12 X 01 D 05 X 01 E 05 X 02 C 11
d!	-	>c	-	ab und zu kleine Zellen besonders grell, Prohämozyten?	X 02 C 11 MS#112	MS#112	X 02 E 05 X 02 F 01b X 02 F 02 X 03 A 01
s	s	s	g	Im Hintergrund verschiedene Sprengel (abgerissene Zellen)	X 02 F 02	MS#43	X 03 D 11 X 03 D 11
sc?	sc?	>c	>c	sehr schwache Färbung!!! sehr schwache Färbung!!! sehr variabel	MS#104	MS#104	X 03 F 10 X 03 G 04 X 04 G 10
ds	>d	>d	>d	sandiger Hintergrund, vermutlich integrales Protein, nach Triton schwächer	X 03 G 04	MS#113	X 05 A 02 MS#26
d	d	c	c	Cytoplasma, Präparat manchmal mit Schleier mit 26 weitergearbeitet	X 05 A 02 MS#26	MS#26, MS#131	X 05 A 02
-	dg	dc	dg	Debris, sehr variabel, teilweise Zellkern			X 05 B 06 X 05 E 12 X 06 A 01
-	d	dc	dg				X 06 C 03 X 06 F 10 X 06 G 08 X 07 A 07
d	g	c	g				X 07 B 08 X 07 B 08
-	g!	-	g!	sandiger Hintergrund	X 06 C 03	MS#106	X 06 C 03 X 06 F 10 X 06 G 08 X 07 A 07
-	>dg	-	dg	Subpopulation GR?			X 07 B 08 MS#70
>d	s, sg	>c	sg!	sehr variabel, wenig Hintergrund	X 07 B 08 MS#70	MS#70	X 07 C 02 MS#73
>d	s, sg	>c	sg!	sehr variabel			X 07 C 04 X 07 G 07a X 07 G 07b X 07 G 11
-	sg	-	sg	sandiger Hintergrund	X 07 C 02 MS#73	MS#73	X 08 B 04 X 08 C 10 X 08 F 07
-	sg	-	sg	sandiger Hintergrund			nicht getestet
>d	ds, dg	>c	sg!	sandiger Hintergrund, variabel			X 08 B 04 X 08 C 10 X 08 F 07 X 08 H 07a
				sehr schwach!			X 09 E 03 X 10 C 12 X 10 D 03
				sandiger Hintergrund GR-Marker, sandiger Hintergrund	X 08 H 07a MS#7	MS#7	
-	sg	-	sg	GR-Subpopulationen bzw. selektiv Granulen, schwacher Hintergrund			



P(-d1) o. Triton		P(-d1) m. Triton		Bemerkungen	Was getestet?	Subklon	Nummer
PL	GR	PL	SP				
-	dg	-	dg	leicht sandiger Hintergrund	X 19 C 08	MS#120	X 18 D 11 X 19 C 08 X 19 C 12
				GR-Marker, sandiger Hintergrund	X 19 E 09	MS#102	X 19 E 09 X 19 F 03
s!	s!	d!	s, sg	Hintergrund wie abgerissene Filopodien	X 20 B 12	MS#15	X 20 B 11 X 20 B 12 X 20 E 03
				gesamter Hintergrund gefärbt	X 21 B 02	MS#109	X 20 H 05 X 21 B 02
				GR-Marker, sandiger Hintergrund	MS#109		X 21 E 08 X 21 F 02
s	s, sg	s	s, sg	leicht sandiger Hintergrund			X 22 A 10
d	d, sg	>d	d, sg	leicht sandiger Hintergrund, nur SP negativ!		nicht getestet	X 22 B 11
s	s, sg	s	s, sg	leicht sandiger Hintergrund	X 22 C 10	MS#33, MS#50	X 22 C 01 X 22 C 10
s	s, sg	s	s, sg	leicht sandiger Hintergrund, nur SP negativ!	MS#50		
c	c	c	c				X 23 E 11
c	c	c	c				X 23 G 04
				sandiger Hintergrund	X 23 G 12	MS#76	X 23 G 12
d?	sg	d	sg!	GR-Marker, leicht sandiger Hintergrund	X 24 A 11	MS#110	X 24 A 11
-	sg	-	sg!	leicht sandiger Hintergrund	X 24 C 11	MS#107	X 24 C 11
				sandiger Hintergrund	MS#107		
				sandiger Hintergrund	X 24 D 09	MS#12, MS#108	X 24 D 09
				GR-Marker, leicht sandiger Hintergrund	X 24 G 02	MS#40	X 24 G 02
				leicht sandiger Hintergrund		nicht getestet	X 24 G 11
-	-	-	-		X 25 E 11	MS#42	X 25 D 03 X 25 E 11
d	d	-	-	Antigen läßt sich mit Triton abwaschen, siehe 29!, wenig Hintergrund	MS#42		
d	sg	dc	sg				X 25 F 02
						nicht getestet	X 26 E 07
						nicht getestet	X 26 F 08
s	>s, sg	s, sg??	sg!	Prohämocyten mit besonders greilem Zellrand?, leicht sandiger Hintergrund			X 26 H 12
-	-	c	.				X 27 B 04
-	g	-	g	sandiger Hintergrund	X 27 C 05	MS#39	X 27 C 02
-	g	-	g	sandiger Hintergrund	MS#39		X 27 C 05
c	c	c	c	leichter Hintergrund			X 27 C 12

P(~d1) o. Triton			P(~d1) m. Triton			Bemerkungen	Was getestet?	Subktion	Nummer
PL	GR	PL	PL	SP					
>d	>d	c	c	c	teilweise Schimmer über den Präparaten	X 27 D 01	MS#71	X 27 D 01	
s	s, sg	d		sg	sandiger Hintergrund		nicht getestet	X 27 D 06	
-	g	-	g		GR-Marker, sandiger Hintergrund	X 27 E 09	MS#103	X 27 E 06b	
c?	sg	c	sg!		im Hintergrund wie Abdrücke von Filopodien			X 27 E 09	
d	-	>>d	-		sandiger Hintergrund	X 27 F 12	MS#13	X 27 F 10	
					PL-Merker	MS#13		X 27 F 12	
c	c	c	c	c		nicht getestet	nicht getestet	X 27 G 03	
d	sg	d	sg			nicht getestet	nicht getestet	X 27 G 11	
>d	s, sg	>c	sg!			nicht getestet	MS#14	X 28 A 11	
-	>>dg	-	>>dg					X 28 C 07	
d	sg	-	>d		sandiger Hintergrund, Subpopulation GR?	X 28 G 04	MS#72	X 28 G 04	
-	g	-	g						
.	>>d?	.	>>sg?		Antigen hat etwas mit Granulen zu tun			X 29 F 02	
s	-	c	c		Antigen löst sich mit Triton abwaschen, siehe 291, Filopodienabdrücke im Hintergrund	X 30 B 12	MS#41	X 30 B 12	
s	>d	c	c		GR-Marker, stark sandiger Hintergrund			X 30 C 06	
ds	ds, dg	>d	sg					X 30 G 07	
					Prohämocyten mit besonders grellem Zellrand? Oder SP?, wenig Hintergrund	X 31 A 04	MS#75	X 31 A 04	
					Antigen löst sich mit Triton abwaschen, siehe 291, stark sandiger Hintergrund	MS#75			
						MS#28	MS#28	X 31 A 05	
							nicht getestet	X 31 B 04	
d?	sg	c	sg!!!		leicht sandiger Hintergrund, manchmal Schlieren			X 31 B 11	
>>d	ds	-	>dg		Antigen löst sich mit Triton abwaschen, nur auf GR!!!, wenig Hintergrund			X 31 F 07	
-	g	n?	g		GR-Marker?, sandiger Hintergrund	X 32 H 02	MS#37	X 32 F 07	
>d	>d	c?	c?					X 32 H 02	
-	sg	-	sg!		Titerfrage!	X 33 E 10	MS#74	X 33 A 10	
>d	s, sg	>c	sg!		sehr variabel, manchmal Schlieren, etwas aus der Hämolymphe?	MS#74		X 33 E 10	
d	c	c	c					X 33 H 09	
n	n	n	n					X 34 B 05	
c	c	c	c					X 34 D 03	
c	c	c	c			X 34 F 04	MS#23	X 34 F 04	
>d	c	c	c			MS#23			
							nicht getestet	X 34 G 03	
c?	g?	c?	c?, g?			X 34 G 04	MS#111	X 34 G 04	
.	.	c?	c?			MS#111		X 34 G 05	

P(~d1) o. Triton		P(~d1) m. Triton		Bemerkungen	Was getestet?	Subklon	Nummer
PL	GR	PL	SP				
>d	s	-	>d	leicht sandiger Hintergrund	X 34 H 03	nicht getestet	X 34 H 02
-	-	c?	c?	sehr variabel, leicht sandiger Hintergrund einige wenige Zellen, Prohämozyten?, wenn dann mit neuem Überstand!	MS#2	MS#2	X 34 H 03
d	>d	>d	>dg	sehr variabel, Färbung nicht zeitypspezifisch, könnte interessant sein	Z 01 A 10	MS#6	Z 01 A 10
-	-	-	-		Z 01 E 10	MS#8	Z 01 E 08
c	-	c	c	wenig sandiger Hintergrund, relativ schwach	MS#8		Z 01 E 10
						nicht getestet	Z 02 B 01
						nicht getestet	Z 03 F 12
							Z 04 C 11
						nicht getestet	Z 04 F 04
						nicht getestet	Z 05 A 11
						nicht getestet	Z 05 D 08
d	-	c	-	fibrilläre Struktur in PL			Z 05 E 10
						nicht getestet	Z 05 F 10
						nicht getestet	Z 06 E 07
						nicht getestet	Z 06 F 06
						nicht getestet	Z 06 F 11
						nicht getestet	Z 06 G 07
						nicht getestet	Z 07 B 04
d	-	>>d	-	PL-Marker, aber nur ohne Triton Antigen im Cytoplasma	Z 07 H 09	MS#22	Z 07 E 08
dc	c	dc	c				Z 07 H 09
-	-	c?	c?			nicht getestet	Z 08 F 01
-	c	c	c			nicht getestet	Z 08 H 07
-	c	c	c				Z 09 A 12
-	c	c	c				Z 09 B 03
-	-	-	-				Z 09 E 10
-	-	-	-				Z 09 F 01b
						nicht getestet	Z 09 H 09b
						MS#44	Z 10 A 03
						nicht getestet	Z 10 B 10
-	-	-	-				Z 10 D 11
						nicht getestet	Z 10 H 02
						nicht getestet	Z 11 A 06

P(-d1) o. Triton			P(-d1) m. Triton			Bemerkungen	Was getestet?	Subklon	Nummer
PL	GR	PL	PL	SP					
C	C	C	C	C					Z 11 C 11
-	-	-	-	-	koagulierte Hämolymphe gefärbt				Z 11 F 07
-	-	-	-	-					Z 11 H 01
-	C	C	C	C	koagulierte Hämolymphe gefärbt				Z 11 H 10
-	-	-	-	-					Z 12 D 03
-	-	-	-	-					Z 12 D 06
S	-	S	>dg		PL-Marker	Z 13 H 05	nicht getestet		Z 12 H 07
-	-	-	-	-	Subclone hat Färbung verloren	MS#9	MS#3, MS#9		Z 13 H 05
C	C	C	C	C					Z 14 D 11
-	-	-	-	-	Schleier über Präparaten				Z 14 E 08
S	S,sg	>s	sg		Antigen in Membran, sandiger Hintergrund		nicht getestet		Z 14 F 10
-	-	-	-	-					Z 15 A 08
-	-	-	-	-	sandiger Hintergrund (Sternenhimmel)				Z 15 H 02
-	-	-	-	-					Z 16 B 06
-	C	C	C	C	fibrilläre Struktur der Färbung				Z 16 D 08
-	C	C	C	C	leicht sandiger Hintergrund (Sternenhimmel)				Z 16 E 03
-	-	-	-	-					Z 17 A 11
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 17 B 07
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 17 C 07
-	-	-	-	-					Z 17 E 07
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 17 F 07
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 17 H 02
S	>sg	C	sg!		Prohämocyten gefärbt?	Z 18 E 07	MS#77		Z 18 D 09
S	>sg	C	sg!			MS#77			Z 18 E 07
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 18 E 08
-	-	-	-	-	sehr variabel		MS#116		Z 19 A 04
-	-	-	-	-	Antigen in der Hämolymphe, heftiger Hintergrund				Z 19 E 06
-	sg	C	sg!			Z 19 E 07	MS#115		Z 19 E 07
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 19 E 10
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 19 F 12
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 19 G 12
C	C	C	C	C					Z 19 H 12
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 20 A 11
-	-	-	-	-		Z 20 A 12	MS#25, MS#126		Z 20 A 12
-	-	-	-	-		MS#25			Z 20 C 08
-	-	-	-	-			nicht getestet	nicht getestet	Z 20 C 10







### Anhang 3

#### Ergebnisse des Screenens verschiedener Lektine

##### Verwendete Abkürzungen:

PL	Plasmatozyten
SP	Sphärule Zellen
GR	Granuläre Zellen
OE	Oenozytoide
d	dots (Punkte)
c	Cytoplasma
s	Surface (Zelloberfläche)
g	Granulen
n	Nucleus (Zellkern)
>	Schwache Färbung
>>	sehr schwache Färbung
!	sehr eindeutige Färbung
?	nicht eindeutige, variable Färbung

Was getestet? Lektin aus	L5 (-d2) ohne Triton				L5 (-d2) mit Triton				P(-d1) o. Triton				P(-d1) m. Triton				Bemerkungen
	PL	SP	GR	OE	PL	SP	GR	OE	PL	GR	PL	GR	PL	GR			
<i>Abrus precatorius</i>	s!	-	s	>s	C	C	g	g	ds	>g	C	g	C	g	Ohne Triton: leichter Schleier über Präparat		
<i>Arachis hypogaea</i>	-	-	g	>g	-	-	g	>g	-	g	-	g!	-	g!	Ohne Triton: Schleier über Präparat		
<i>Bauhinia purpurea</i>	s	-	>s	>s	>s	-	g	>g	s	sg	>s	g	>s	g	Ohne Triton: sandiger Hintergrund		
<i>Erythrina corallodendron</i>	>c	-	>>dc	C	C	C	C	C	C	>dc	C	C	C	C	Ohne Triton: etwas sandiger Hintergrund		
<i>Glycine max</i>	ds	ds	ds	s	d	-	g	g	ds	g	ds	g	>s	g	Ohne Triton: heftig sandiger Hintergrund		
<i>Helix pomatia</i>	s	ds	s	>s	sd	-	g	g	s	sg	sd	g	sd	g	Ohne Triton: Punkte über gesamten Präparat		
<i>Lens culinaris</i>	>s	-	g	sg	-	-	g!	g	>s	g	-	g!	-	g!	größer Schleier über allen Präparaten		
<i>Maclura pomifera</i>	-	-	g	g	>c	-	g	g	>c	g	>cn?	g	>cn?	g	Ohne Triton: Schleier über Präparat		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Ohne Triton: sandiger Hintergrund		
<i>Phytolacca americana</i>	C	C	C	C	C	C	C	C	cd	g	C	C	C	C	sandiger Hintergrund		
<i>Succinyl-Concanavalin A</i>	s	>s	>s>g	>s>g	ds	-	g!	g	s	g	ds	g!	ds	g!	Ohne Triton: sandiger Hintergrund		
<i>Tetragonolobus purpureus</i>	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Ohne Triton: Schleier über Präparat		
<i>Triticum vulgaris</i>	ds!	-	>>ds	>>ds	sn	-	sn>sg	sn>sg	ds!	>ds	sn	sn>sg	sn	sn>sg	Ohne Triton: Schleier über Präparat		
<i>Vicia villosa</i> Isolectin B4	s	>d	>s	>s	s	>d	g	>g	>s	g	>s	g	>s	g	einige PLs waren kräftig an s gefärbt, Prohämozyten?		

## Anhang 4

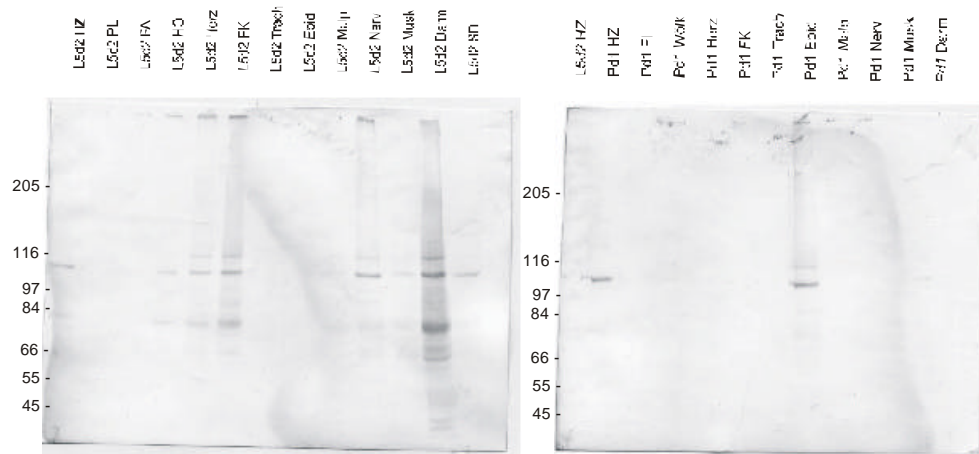
Western-Blot-Analyse der Organlysate, inkubiert nur mit Streptavidin (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase)

Trenngel: 6%

Sammelgel: 4%

### Verwendete Abkürzungen

HZ	Hämozyten
PL	Plasma
FA	Flügelanlage
HO	hämatopoietisches Organ
FK	Fettkörper
Trach	Tracheen
Epid	Epidermis
Malp	Malpighische Gefäße
Nerv	Nerven
Musk	Muskeln
SD	Speicheldrüse
Wölk	"Wölkchen", speziell geformter Fettkörper nahe der Flügelanlage in der Puppe



## Anhang 5

Ergebnisse der DHC-Bestimmung der Hämocytenfraktionen nach Percolldichtegradientenzentrifugation

Verwendete Abkürzungen:

DHC "differential hemocyte count", differentieller Zelltiter [%]

PL Plasmatozyten

SP Sphärule Zellen

GR Granuläre Zellen

OE Oenozytoide

ges. gesamt

Die rot markierten Zahlen kennzeichnen die jeweiligen Maximalwerte.

## Präparationen von Larven (L5d2)

Fraktion	Tier Zelltyp	05.04.00 / 5		01.09.00 / 4		21.09.00 / 1		21.09.00 / 2		21.09.00 / 3		21.09.00 / 4	
		DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.
1	PL	14	500	35,1	1800	57	900	50,2	2300	51,5	700	42,4	2000
	GR	45,3		39,3		40,5		31,9		21,2		40,6	
	OE	0,7		0,4		0		1,4		0		0,2	
	SP	0		0,2		0		0		0		0	
2	PL	20,8	500	26,9	2000	39,5	1800	26,5	4500	31,2	100	36,9	4500
	GR	53,7		56		41,2		34,3		26,7		57,6	
	OE	0,5		0,4		0,6		1,9		0		0,7	
	SP	0		0,1		0,2		0		0		0,9	
3	PL	3,9	2600	15,8	9700	19,7	6000	31,3	6500	29	500	32	2200
	GR	85,9		88		66,8		49,4		29		53,9	
	OE	0,6		0,2		0,3		1,9		0		0,7	
	SP	0		0,2		1,4		0,1		0		0,3	
4	PL	4,7	4700	12,9	5000	20,3	5100	23,6	7500	17,1	500	41,1	7700
	GR	97,4		64,6		68,6		77,7		48,9		48,1	
	OE	0,3		0,1		0,6		1		0		1,1	
	SP	0		0		0,4		0,1		0		0,4	
5	PL	4,8	4800	24,4	6800	27,2	5000	30,4	28000	17,6	2000	25	4200
	GR	97,7		72,3		82,4		60,3		51,9		71,5	
	OE	0,4		0		0,3		1		0,3		0,7	
	SP	0		0		0		0		0		0,2	
6	PL	6,7	4000	36,7	12000	31,3	50000	51,3	23000	5,5	6900	56,1	14000
	GR	90		55,2		53,4		59,3		41,3		28,9	
	OE	0,1		0,3		0,5		0,1		1,1		0,4	
	SP	0		0,8		0,7		0		0,2		0,3	
7	PL	27,1	6000	18,6	7200	51,2	27000	52,1	32000	59,4	16600	52,9	11000
	GR	72,6		42,8		55,4		55,2		26,3		40,2	
	OE	0,7		0,3		0,9		0,2		0,4		1,3	
	SP	0		2,1		1		0,4		0,3		0,2	
8	PL	42,9	9500	15,6	16500	60,8	28000	58,6	53000	71	30600	54,5	34500
	GR	56,8		36,9		51,9		40,6		21,7		35,4	
	OE	14,6		0,4		1,9		0,8		0,9		5,4	
	SP	2,2		2,8		2		0,4		1,1		3,9	
9	PL	20,6	3000	56,5	30000	48,1	53000	52,7	38000	67,7	24100	51,1	22000
	GR	63,4		20		25,8		33		12,3		35,4	
	OE	5,3		6,9		6		14,1		11,3		12,9	
	SP	2,8		0,3		5		1,2		1,2		12,8	
10	PL	10,4	1500	48,3	6700	55,2	250	44,7	7600	71	28000	26,3	8600
	GR	17,8		26,6		25,9		33		8		8,4	
	OE	3,2		4		7,5		7,6		8,7		35	
	SP	1,2		0,8		0		0,2		1,4		6,6	
Zellen aller Fraktionen			37100		97700		177050		202400		110000		110900

## Präparationen von Puppen (Pd1)

Fraktion	Tier	04.04.00 / 2		05.04.00 / 1		05.04.00 / 2		05.04.00 / 4		07.04.00 / 1		07.04.00 / 2	
		DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.	DHC in %	Zellen ges.
1	PL	69,2	60	75	40	60,9	40	85,7	30	100	120	97,5	80
	GR	15,4		22,7		11,1		35,7		6,7		4,5	
2	PL	92	2300	83,3	30	85,3	350	100	130	97,9	250	96,3	3500
	GR	1,3		33,3		4,8		17,6		9,7		2,1	
3	PL	98,6	8500	96	600	75,3	1000	97,5	1200	98,7	7000	98,9	8000
	GR	1,4		23,2		1,6		2,2		0,5		1,9	
4	PL	88,7	320	94,1	500	88,3	670	97	1200	99	2500	90	330
	GR	8,5		12,7		11,5		0,3		0,9		8,7	
5	PL	41	90	56,2	160	0	100	80	120	99	350	72,7	90
	GR	23,9		56,9		47,5		17,8		2		15,8	
6	PL	74,1	70	43,9	70	9,5	30	0	40	97,9	1200	81	80
	GR	14,6		88,9		66,7		23,7		3,9		10	
7	PL	70,2	230	14,1	100	0	40	20	30	100	200	70,5	200
	GR	38,8		57,1		68,8		4,3		12,6		45	
8	PL	27,8	60	3,5	120	9,5	100	10	20	73,9	100	19,7	130
	GR	82,1		75		76		66,7		47,1		54,2	
9	PL	8	290	2,3	250	17,4	340	13,3	80	75	30	9,5	240
	GR	68,2		81,9		86,8		96		87		84,3	
10	PL	0	60	0	3	0	60	22,2	40	50	30	12,3	100
	GR	77,3		100		90,7		80		100		87,1	
Zellen aller Fraktionen			11980		1873		2730		2890		11780		12750



## Danksagung

***Frau Prof. Tina Trenczek*** möchte ich für die Überlassung des Themas, ihre hervorragende Betreuung und besonders für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung beim Einschlagen eigener Wege danken.

### **Vielen Dank an:**

***Frau Diebel:*** für das unermüdliche Einbetten und Schneiden und den Beistand am Elektronenmikroskop, für die Aufzucht der Tiere, die Unterstützung bei der Zellkultur und... ich hab sicher etwas vergessen...

***Traute:*** für die Superzusammenarbeit, die hoffentlich bald Früchte trägt

***Ines:*** für die vielen Gespräche, die (hoffentlich) beide Seiten beflügelten, und natürlich für die gemeinsamen Stunden am Binokular, bis das hämatopoietische Organ endlich frei lag

***Marion:*** für die Zusammenarbeit bei den Percollexperimenten und für die Geschichten aus dem Gießener Unileben

***Thomas:*** für die Hilfe bei den ersten Schritten mit Grafikprogrammen und die gute Laune

***Florian:*** besonders für die Optimierung der Antikörperreinigung über die Protein G-Säule

***Marlene:*** für ihre Unterstützung bei den ersten Reinigungsversuchen des Antigens zu MS#75

***Tine:*** für so manche Tat im Hintergrund (z.B. Elektrophoreseglasplatten für umsonst) und dafür, daß sie meine Übergriffe auf ihren Schreibtisch ertragen hat

***Alle Studenten der Tierphysiologie- und Zellbiologiepraktika,*** die meine Ergebnisse verifizierten oder wieder in Frage stellten

***Herrn Prof. A. Dorresteijn:*** für seine Bereitschaft, als Zweitkorrektor zu fungieren, und die Unterstützung bei Bewerbungen

***Dr. Steffen Schaffer:*** für die Einweisung und Durchführung etlicher 2D-Elektrophoresen und die Aufnahme in seiner kleinen Wohnung (Dank auch an Steffi!)

***Dr. Joachim Schachtner:*** für das Anlernen der Chemilumineszenz und die stimulierenden Gespräche besonders zur Optimierung von Methoden

***Dr. Ralph Hückelhoven:*** für sein offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft, "Lücken zu stopfen", Dank auch für das Korrekturlesen meiner Forschungsanträge

***Frau Prof. Renkawitz-Pohl & Dr. Achim Paululat:*** für die Anti-Myosin-Antikörper

***Frau Prof. Renkawitz-Pohl, Herrn Prof. Preißner, Herrn Dr. Uli Theopold, Herrn Prof. Schoner, PhD Elisabeth Willott:*** für die Zeit, die sie sich für mich nahmen, und die hilfreichen Ideen

***Elisabeth Gardiner*** aus der AG Strand: für die Bereitstellung diverser Antikörper

***Herrn Hubert Rehm:*** für sein Buch "Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics" (Sein Zynismus hat mich in manch schwerer Stunde über Wasser gehalten.)

**Vielen Dank an *Ines* und *Zlatko* fürs Korrekturlesen und natürlich für den Drucker.**

**Vielen Dank an *Suse, Beate, Daxe, Regina, Peter* und allen anderen, die mich beim Spagat zwischen Forschung und Familie unterstützten.**

**Vielen Dank an *Thorsten* für die "Stütze" und an *Leo* für die Bodenhaftung.**

**Mein besonderer Dank gilt meinen *Eltern*, ohne deren uneingeschränkte Hilfe und Glauben an mich die Arbeit in der Form undenkbar gewesen wäre. Auch dem gesamten "*Familienclan*" sei gedankt.**

## Lebenslauf

Name: Susann Beetz  
geboren: 22. Dezember 1969 in Stralsund  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Kind: Jakob Leonard Beetz, geboren am 31. März 1994

1976-1979 Aufenthalt und Schulbesuch in Leningrad (UdSSR)  
1979-1986 Polytechnische Oberschule mit erweitertem Sprachunterricht in Berlin  
Juli 1986 Abschluß der 10. Klasse  
1986-1988 Erweiterte Oberschule mit erweitertem Sprachunterricht in Berlin  
Juli 1988 Hochschulreife  
1988-1995 Studium der Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Februar 1991 Laborpraktikum am Institut für Allgemeine Zoologie der Freien Universität Berlin im Labor von Prof. P. Götz unter der Anleitung von Dr. T. Trenzcek im Bereich Insektenimmunologie  
Februar/März 1992 Laborpraktikum am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch im Bereich Onkologie / Immuntherapie  
Juli/August 1992 Diplomprüfungen in Zoologie und den Nebenfächern Physiologie und Molekularbiologie der Mikroorganismen sowie Immunologie  
1992-1993 Studium an der University of Oregon in Eugene (USA), Forschungsarbeit im Bereich Insektenimmunologie im Labor von Prof. J. Postlethwait  
1993-1995 Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald im Labor "Vergleichende Immunologie" unter der Anleitung von PD D. Ehlers  
Juni 1995 Erhalt des akademischen Grades eines Diplombiologen  
1995-1997 Forschungsarbeiten am Zoologischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald unter Förderung der Heinrich-Böll-Stiftung  
seit April 1997 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Beteiligung an Lehre und Forschung, Dissertation im Labor von Prof. T. Trenzcek

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Gießen, im März 2002