
Die Architektur des intestinalen Immunsystems der Taufliege *Drosophila melanogaster*

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

vorgelegt von
Christine Fink

Kiel, 2012

Referent/in: Prof. Dr. Thomas Roeder

Korreferent/in: PD Dr. Holger Heine

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2012

Zum Druck genehmigt: 05.07.2012

gez. Dekan:

Abkürzungsverzeichnis

aaRNA	Aminoallyl-Ribonukleinsäure
aaUTP	Aminoallyl-Uridintriphosphat
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
AMPs	antimikrobielle Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CaCl ₂ *2H ₂ O	Calciumchlorid-dihydrat
cDNA	(<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>) komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cDNA-PCR	Amplifikation der gesamten cDNA mittels PCR
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CM	(<i>concentrated medium</i>) Konzentriertes Medium
CNO	Clozapin-N-Oxid
DAG	Diacylglycerol
CTP	Cytidintriphosphat
Db11	Bezeichnung für den verwendeten Stamm des Bakteriums <i>Serratia marcescens</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(<i>deoxyribonucleic acid</i>) Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Gesamtheit aller Desoxyribonukleinphosphate
DREADD	<i>Designer Receptor Exclusively Activated by a Designer Drug</i>
DUOX	Dual Oxidase
Ecs	Enterozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FOX	Forkhead-Box-Proteine
gDNA	Genomische ICH
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GNBP	Gram-negatives Bindungsprotein
GPCR	(<i>G-protein coupled receptor</i>) G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat

h	hora / Stunde
HF	High Fat Medium
HL3	Hemolymph-like Buffer / Hemolymph-ähnlicher Puffer
IHC	Immunhistochemie
ISCs	Intestinale Stammzellen
IMD	<i>(immune deficiency)</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
min	Minute
mRNA	messenger RNA
kb	Kilobasen
M	Mol
MAMP	Mikroben-assoziiertes Molekülmuster
MAP	<i>(Mitogen activated protein)</i> Mitogen-aktiviertes Protein
MC	<i>Morbus Crohn</i>
MgCl ₂ *6H ₂ O	Magnesiumchlorid-hexahydrat
ml	Milliliter
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-κB	<i>(nuclear factor κB)</i>
NGS	<i>(normal goat serum)</i> Ziegen Serum für Immunhistochemie
NLR	<i>(NOD-like receptor)</i> NOD-like Rezeptor
NM	Normalmedium
NOX	NADPH-Oxidase
Oligo	Oligonukleotide
OTUs	<i>(Operational Taxonomic Units)</i>
PAMP	<i>(Pathogen Associated Molecule Patterns)</i> Pathogen assoziiertes Molekülmuster
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>(polymerase chain reaction)</i> Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PGRP	<i>(Peptidoglycan Recognition Protein)</i> Peptidoglykan-Erkennungs-Protein
PRR	<i>(Pattern Recognition Receptor)</i> Muster-Erkennungs-Rezeptor
PLCβ	Phospholipase β
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
PS RT	Prime Script Reverse Transkriptase

RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RNA	<i>(ribonucleic acid)</i> Ribonukleinsäure
ROS	<i>(Reactive Oxygen Species)</i> Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur ODER Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sec	secunda / Sekunde
SSC	<i>(Saline sodium citrate)</i> Citrat gepufferte Salzlösung
SSIII	Superscript Reverse Transkriptase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TLR	<i>(Toll-like receptor)</i> Toll-like Rezeptor
TTP	Thymidintriphosphat
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UC	<i>Colitis ulcerosa</i>
ü. N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Eingewogene Substanz in Gramm pro 100 ml
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	9
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	9
1.1.1 Der Aufbau des menschlichen Darmgewebes	11
1.1.2 Immunabwehr im Darm des Menschen	11
1.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems	14
1.2.1 Die Verwendung von Modellorganismen – <i>Drosophila</i> als Modell zur Untersuchung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	14
1.3 Das angeborene Immunsystem von <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3.1.1 Die unterschiedlichen Abwehrmechanismen der Fliege	15
1.3.1.2 Erkennung pathogener Strukturen und Aktivierung der angeborenen Immunabwehr über unterschiedliche Signaltransduktionswege	17
1.3.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies als weiterer Mechanismus zur Bekämpfung von Pathogenen.....	20
1.3.2 Das Darmepithel von <i>Drosophila melanogaster</i>	21
1.3.3 Die Rolle des Transkriptionsfaktors dFoxO in der Taufliege.....	23
1.3.4 Der Einfluss der Mikrobiota im Darm der Taufliege	24
1.3.5 Möglichkeiten der Expressionskontrolle im Modell <i>Drosophila</i>	25
1.3.5.1 Das binäre Gal4/UAS-System	25
1.3.5.2 Das ternäre TARGET-Expressionssystem	26
1.4 Zielsetzung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Chemikalien / Futterkomponenten	29
2.1.4 Reagenziensysteme, Enzyme & Antikörper	30
2.1.5 Kultur- & Nährmedien	31
2.1.6 Puffer & Lösungen	32
2.1.7 Fliegenstämme.....	32
2.1.8 Bakterienstämme.....	33
2.1.9 Oligonukleotide.....	34
2.2 Methoden	38
2.2.1 Fliegenhaltung	38
2.2.2 Kreuzungen	38
2.2.3 Orale Infektion von adulten Fliegen	39

2.2.4	Präparation des Darmgewebes	39
2.2.5	Molekularbiologische Arbeiten zur Probengenerierung	39
2.2.5.1	RNA-Isolierung.....	39
2.2.5.2	Erststrangsynthese der cDNA.....	40
2.2.5.3	Zweitstrangsynthese der cDNA / Amplifikation mittels PCR	41
2.2.6	RT-PCR.....	42
2.2.7	Realtime PCR.....	43
2.2.8	Microarray.....	46
2.2.8.1	aa-cRNA-Synthese	46
2.2.8.2	Farbstoffkopplung	47
2.2.8.3	Hybridisierung, Waschvorgang und Scannen	47
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie / Mikroskopie.....	48
2.2.9.1	Immunhistochemie	48
2.2.9.2	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ROS mit DHE.....	49
2.2.9.3	Nachweis der NO-Synthase.....	49
2.2.10	454 Sequenzierung	50
2.2.10.1	Probengewinnung	50
2.2.10.2	Probenisolierung	51
2.2.10.3	Amplifikation mittels PCR.....	51
2.2.10.4	Emulsion-PCR & 454-Lauf.....	52
2.2.10.5	Auswertung	52
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Orale Infektion und ektopische Expression als Auslöser einer intestinalen Immunantwort	54
3.1.1	Nachweis der oralen Aufnahme der Bakterien und ihrer immunaktivierenden Wirkung	54
3.1.2	Welche Signaltransduktionswege sind für die Aktivierung der unterschiedlichen Zelltypen im Darm verantwortlich?	59
3.1.2.1	Vergleich der Translokation bzw. Aktivierung des IMD- und dFoxO-Signaltransduktionsweges nach oraler Infektion	60
3.1.2.2	Die orale Infektion führt zur Aktivierung des PLC β -Signaltransduktionsweges.....	60
3.1.2.3	Nachweis der Translokations-abhängigen Immunantwort in den Enterozyten und den Kupferzellen nach Infektion mittels Immunhistochemie im Wildtypen w^{1118}	62
3.1.2.4	Die Aktivierung des IMD- und des dFoxO-Signaltransduktionsweges durch hitzeschockinduzierte Überexpression von <i>pgrp-le</i> und <i>dfoxo</i> in den Enterozyten.....	66
3.1.3	Welche Zellen werden durch die Überexpression des klassischen IMD-Signaltransduktionsweges aktiviert?.....	73
3.2	Untersuchungen zum Einfluss der intestinalen Immunabwehr auf die Mikrobiota im Darm	80

3.2.1	Die Zusammensetzung der intestinalen Flora in unterschiedlichen Wildtypen – Faeces spiegeln die Situation im Darmlumen wider	80
3.2.2	Reaktive Sauerstoffspezies als alternatives Abwehrsystem im Darm.....	85
4	Diskussion	92
4.1	Zellspezifische Immunkompetenz im Darmepithel von <i>Drosophila melanogaster</i>	93
4.1.1	Der klassische NF- κ B-Signalweg IMD führt zur Aktivierung antimikrobieller Peptide in unterschiedlichen Zelltypen.....	93
4.1.2	Der Transkriptionsfaktor dFoxO als alternativer Regulator der Immunabwehr in den Enterozyten	97
4.1.3	Das Enzym DUOX steuert die Abwehr pathogener Organismen über die Produktion von ROS	99
4.2	Die Rolle der Mikrobiota im Darmepithel von <i>Drosophila</i>	101
4.2.1	Eine induzierte Aktivierung von Reaktiven Sauerstoffspezies führt zu einer Veränderung im Mikrobiom der Taufliege.....	101
4.2.2	Etablierung eines Systems zur Untersuchung der bakteriellen Zusammensetzung im Darms von <i>Drosophila</i>	103
4.3	Fazit	104
4.4	Ausblick	105
5	Zusammenfassung.....	106
6	Summary.....	108
7	Literaturverzeichnis	110
8	Tabellenverzeichnis	123
9	Abbildungsverzeichnis	124
10	Curriculum vitae	127
11	Publikationen.....	128
12	Danksagung.....	129
13	Erklärung	130
A	Anhang.....	131

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die Bedeutung des Krankheitsbildes chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) steht im Fokus heutiger Forschung, da die Zahl der Betroffenen seit mindestens 20 Jahren stetig steigt. Die Ursachen dieses starken Anstiegs liegen noch weitgehend im Unklaren. Deutlich ist, dass dieser Anstieg besonders in den industrialisierten Ländern Nordamerikas und Europas (Andersen et al. 2012; Baumgart & Carding 2007) zu beobachten ist. Es werden eine Reihe unterschiedlicher Ursachen diskutiert, die an der Entstehung dieses Krankheitsbildes beteiligt sind. Zu diesen zählen Autoimmunreaktionen, genetische Prädispositionen (Russell & Satsangi 2004) und die Störung der eigenen Darmflora. In neueren Studien wird der Einfluss des Lebenswandels thematisiert, der dramatische Auswirkungen auf die Entwicklung des Krankheitsbildes ausübt. Zu diesen Einflüssen zählen insbesondere die Ernährung (Geerling et al. 2000; Andersen et al. 2012), eine übermäßige Hygiene sowie das Rauchen (Mahid et al. 2006). Alle diese Faktoren können zu einer Verschlechterung der Symptomatik und des Krankheitsverlaufs führen.

Die beiden bedeutendsten Krankheitsbilder im Zusammenhang mit CED sind *Morbus Crohn* (MC) und *Colitis ulcerosa* (CU). Bei *Morbus Crohn* handelt es sich um eine chronisch-granulomatöse Entzündung des unteren Dünndarms und des Dickdarms, die durch eine Aggregation von Makrophagen gekennzeichnet ist (Xavier & Podolsky 2007). Es handelt sich um eine rezidivierende transmurale, sprich gewebsthroughdringende Entzündung was bedeutet, dass hier sowohl die Mukosa als auch die darunter liegenden Gewebsschichten inklusive der Submukosa betroffen sind (Xavier & Podolsky 2007) die häufig schubweise auftritt, was damit einhergeht, dass die Entzündungsherde segmentweise bzw. punktuell auftreten (Baumgart & Sandborn 2007). Ihm gegenüber steht das Krankheitsbild der *Colitis ulcerosa*, bei der es sich um eine krankhaft gesteigerte Immunreaktion gegen die eigene Darmflora handelt. Bei der CU ist im Gegensatz zum MC hauptsächlich der Dickdarm stark befallen, die Entzündung entwickelt sich hier von anal ausgehend oralwärts. Es kommt gleichmäßig auftretenden nicht-transmuralen Entzündung der Mukosa. Endoskopische Aufnahmen und morphologische Schnitte aus dem Gewebe erkrankter Patienten zeigen die typischen Symptome einer CED der beiden erwähnten Krankheitsbilder (*Abb. 1.1*).

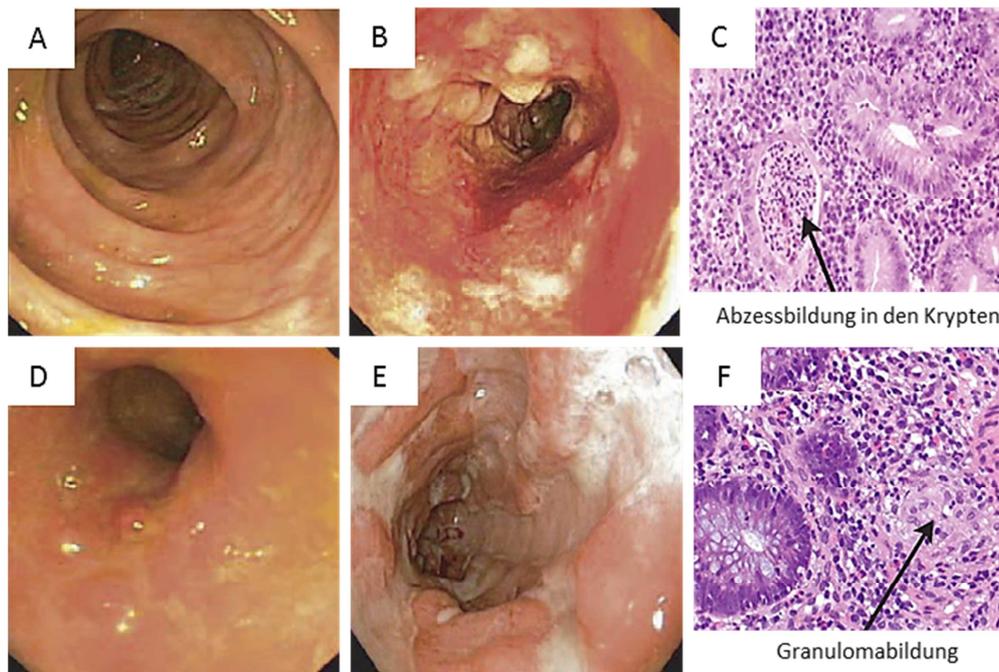


Abb. 1.1: Endoskopie & Histologie von CED – [A-C] Colitis ulcerosa; [D-F] Morbus Crohn (verändert nach Xavier und Podolsky 2007; Baumgart und Sandborn 2007)

Um eine weitere Ausbreitung dieser Krankheiten zu verhindern und um bessere Therapieansätze für Patienten zu entwickeln, stehen derzeit Untersuchungen, die sich der Wechselwirkung zwischen Darm und endogener Mikrobiota widmen, im Zentrum des Interesses. Es ist bekannt, dass die mikrobielle Gemeinschaft von CED Patienten eine wesentlich geringere Vielfalt aufweist als diejenige von gesunden Personen. Aus dieser Beobachtung wurde die Hypothese entwickelt, dass die starke Immunreaktion gegen die endogene Darmflora eine der Hauptursachen chronisch entzündlicher Erkrankungen des Darms ist (Reiff & Kelly 2010a).

Die Symbiose mit den im Darm lebenden Bakterien ist förderlich für den Wirt, da sie eine effektivere Verdauung von Nährstoffen ermöglicht. Die Bakterien der Mikrobiota schließen z. B. komplexe Zucker auf und regulieren darüber auch das Wachstum und die Differenzierung von Enterozyten (Moens & Veldhoen 2012). Neben ihrer unterstützenden Eigenschaft für Verdauung und Anabolismus des Wirts, scheint die Mikrobiota eine Schutzfunktion in der epithelialen Barriere vor Pathogenen auszuüben (Hooper & Macpherson 2010a; Hooper et al. 2002). Außerdem ist die Mikrobiota von zentraler Bedeutung für die Entwicklung des intestinalen Immunsystems. Auf diese Weise bestimmt sie die Antwortcharakteristika dieses sehr wichtigen Teils unseres Immunsystems über sehr lange Zeiträume (Pagnini et al. 2010).

Um dieses sehr komplexe epitheliale Immunsystem zu verdeutlichen, möchte ich damit beginnen, den Aufbau des Darms und die Struktur des Abwehrsystems genauer zu beschreiben.

1.1.1 Der Aufbau des menschlichen Darmgewebes

Der Darm ist grundsätzlich aus vier unterschiedlichen Gewebeschichten aufgebaut. Die äußere Schicht, die *Tunica serosa* (oder auch *Peritoneum viscerale*) bildet die Abgrenzung des Darms zu anderen inneren Organen. Sie sondert nach außen hin Flüssigkeit ab, um ein Gleiten der im Bauchraum liegenden Organe zu ermöglichen und somit Verletzungen zu vermeiden. An diese Schicht grenzt die Darmmuskulatur, die aus glatten Muskelzellen besteht und sowohl von Längs- als auch von Ringmuskulatur gebildet wird. Es folgt die Submukosa, eine schmale Bindegewebsschicht, welche die Grenze zwischen der Muskulatur und der eigentlichen Darmschleimhaut, der Mukosa, bildet (s. Abb. 1.2).

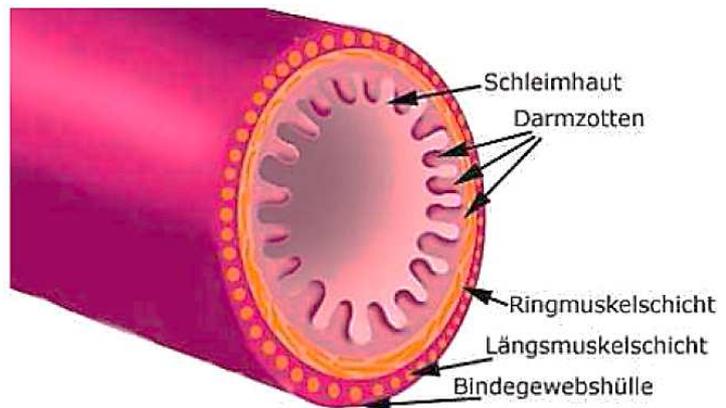


Abb. 1.2: Aufbau des menschlichen Darmgewebes.
(©NetDoktor.de)

Die Mukosa erfüllt die eigentliche Barrierefunktion bei der Abwehr gegen Pathogene und andere Umwelteinflüsse, da sie im stetigen Kontakt mit dem Nahrungsbrei und mit den Mikroorganismen steht (Groschwitz & Hogan 2009). Durch die Bildung von Darmzotten und -krypten erhält die Mukosa ihre typische morphologische Struktur und ermöglicht somit eine starke Vergrößerung des resorbierenden Epithels. Sie besteht aus einem *Monolayer* aus unterschiedlichen Zelltypen, denen jeweils unterschiedliche Funktionen in der Immunabwehr des Darms zukommen, was im Folgenden unter 1.1.2 beschrieben ist.

1.1.2 Immunabwehr im Darm des Menschen

Am Beispiel des Dünndarmepithels lassen sich diese Zelltypen besonders gut darstellen und ihre Funktion für Resorption und Abwehr erläutern. Der typische Aufbau von Darmzotten und -krypten ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

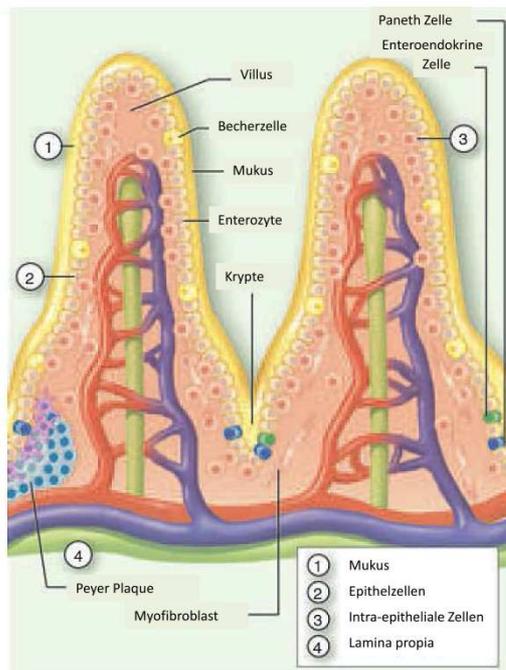


Abb. 1.3: Strukturelle Organisation der Mukosa (verändert nach Moens et al. 2011). Schematische Darstellung der intestinalen Mukosa als Barriere und Schutz vor Mikroorganismen. Sie besteht aus einer Mukus-Schicht (1), der darunter liegenden Epithelzellschicht (2) aus Enterozyten, Becherzellen (gelb), Paneth Zellen (blau) und den Enteroendokrinen Zellen (grün), den intraepithelialen Lymphozyten (3, rot) und der Lamina propria (4).

Die erste Barriere, der eine Schutzfunktion vor Mikroorganismen zukommt, ist die den Enterozyten aufgelagerte Mukusschicht. Sie wird aus Glykoproteinen und dem sezernierten Mukus der Becherzellen gebildet und enthält Immunglobuline (insbesondere IgA) und

Antimikrobielle Peptide, die eine Störung des Epithels durch Bakterien grundsätzlich verhindern können (Moens & Veldhoen 2012). Ebenfalls kann das einschichtige Epithel, aufgebaut aus Enterozyten, eine Einwanderung von Pathogenen vermeiden, da die Zellen untereinander mit sog. *Tight Junctions* verbunden sind. Diese *Tight Junctions* formen eine Art Ring um die gesamte Zelle, die einen Austausch von Ionen und Nährstoffen ermöglichen, jedoch aufgrund ihrer engen Proteinstruktur, ein Eindringen von Antigenen, Mikroorganismen und somit deren Toxinen verhindern (Groschwitz & Hogan 2009). Allerdings ist bekannt, dass es bei einer gesteigerten Immunabwehrreaktion und einer damit verbundenen Freisetzung von Cytokinen zu einer Beeinflussung der Zell-Zell-Verknüpfungen kommen kann und somit die Permeabilität durch den Stabilitätsverlust erhöht wird (Zolotarevsky 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Dysfunktion der epithelialen Barrierefunktion einen verstärkenden Effekt auf die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen haben kann (Meddings et al. 1999). Die Enterozyten dienen hauptsächlich der Nährstoffgewinnung. Es wird noch immer kontrovers diskutiert, ob sie selbst eine tragende Rolle in der Abwehr pathogener Organismen haben oder eben nicht (Artis 2008). Jedoch wird davon ausgegangen, dass sie eine essentielle Rolle in der Regulation des mikrobiellen Gleichgewichtes haben, da sie die Mikroorganismen für die Nährstoffgewinnung benötigen und ihre eigene Lebensdauer, ihre Zellgröße und auch ihre Neubildung indirekt über diese Interaktion gesteuert wird (Moens & Veldhoen 2012). Ursprünglich wurden die sog. Paneth-Zellen als die eigentlichen Abwehrzellen im Darm beschrieben, da in diesen Zellen antimikrobielle Peptide wie Defensine und Lysozyme gebildet werden (Bevins & Salzman 2011). Es gibt es im Dünndarm des Menschen noch einen weiteren Zelltypus, der eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr ausübt. Es handelt sich hier um sog. Intra-epitheliale Lymphozyten

(IELs), die über die Freisetzung von Cytokinen die Rekrutierung anderer Immunzellen wie z.B. Makrophagen fördern und eine Aktivierung der adaptiven Immunantwort auslösen (Moens & Veldhoen 2012). Letztendlich stellt sich die Frage, wie Mikroorganismen erkannt werden und wie zwischen Symbionten und Pathogenen unterschieden wird. Dieses erfolgt mit Hilfe des angeborenen Immunsystems. In Wirbeltieren gibt es unterschiedliche Typen von Mustererkennungs-Rezeptoren (PRRs), die an der Erkennung von Mikroben-assoziierten Molekülmustern (MAMPs) beteiligt sind. Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die NOD-like Rezeptoren (NLRs) gehören zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe. Die meisten TLRs detektieren dabei Pathogen-assoziierte Signale im extrazellulären Raum, während die NLRs und einige TLRs (z.B. TLR-3) für die Erkennung von fremdartigen Strukturen im Zytoplasma zuständig sind. Gemeinsam ist beiden jedoch die schnelle Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die über MAP-Kinasen (Mitogen-activated protein kinases), NF- κ B (nuclear factor κ B) oder Caspase-abhängige Signalkaskaden gesteuert werden. Dabei kommt es bei einer geringen mikrobiellen Belastung zu einer Aktivierung zellschützender Antworten. Steigt jedoch die Intensität dieser Signale, so reagiert das angeborene Immunsystem mit der Produktion von Antimikrobiellen Peptiden und der verstärkten Ausschüttung von Cytokinen, was zu einer Entzündungsreaktion im Epithel führt. Als letzte Möglichkeit zum Schutz vor einwandernden Mikroorganismen in die Epithelzellen bleibt häufig nur noch die Einleitung der Apoptose (Neish 2009).

Alternativ zu dieser Form der Pathogenbekämpfung im Darm ist es möglich, die pathogenen Bakterien über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu inaktivieren. Bekannt sind diese als Nebenprodukte der Atmungskette, die einen zellschädigenden Charakter besitzen. Sie können jedoch mittels einer Enzym-gesteuerten Reaktion durch NADPH Oxidasen (NOX) und Duale Oxidasen (DUOX) gebildet werden, was zu einer schnellen und effektiven Abwehr von Pathogenen im infizierten Gewebe führt (Lambeth et al. 2007). Die genaue Regulation und Aktivierung dieser Enzyme wird in 1.3.1.3 beschrieben.

Von zentraler Bedeutung für die Entstehung von CED bleibt jedoch das konventionelle angeborene Immunsystem, das intrazelluläre Signalkaskaden nutzt, die auf NF- κ B Faktoren konvergieren. Deshalb wird im Folgenden näher auf die Bedeutung angeborener Abwehrmechanismen und die Verwendung von Modellorganismen eingegangen.

1.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems

1.2.1 Die Verwendung von Modellorganismen – *Drosophila* als Modell zur Untersuchung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Aufgrund der Erkenntnis, dass NF- κ B-gesteuerte Signalkaskaden an der Entstehung von CED beteiligt sind, ist es erforderlich, diese Zusammenhänge eingehender zu untersuchen. Dazu eignen sich sog. Modellorganismen hervorragend, da sie eine Nachstellung des Pathotyps ermöglichen, gleichzeitig aber vielfältige genetische und physiologische Interventionen und Analysemöglichkeiten eröffnen. Das Modell zur Untersuchung der intestinalen Abwehr im Bereich der Wirbeltiere ist die Maus (Wirtz & Neurath 2007). Obwohl die Maus unschätzbare Dienste in der Analyse des angeborenen Immunsystems geleistet hat, weist sie einige Nachteile auf, die alternative Modelle wünschenswert erscheinen lassen. So können angeborenes und adaptives Immunsystem nicht voneinander getrennt werden, was eine genaue Analyse der Bedeutung des angeborenen Immunsystems für z.B. die CED erschwert. Sehr einfache Modelle, unter denen die Taufliege *Drosophila melanogaster* den *Primus inter pares* darstellt, können diese Lücke schließen, da ihnen ein erworbenes Immunsystem fehlt, was eine ungestörte Betrachtung der Bedeutung des angeborenen Immunsystems ermöglicht.

Bereits seit ca. einhundert Jahren wird *Drosophila* in der Forschung als Modellorganismus eingesetzt. Zunächst fand sie nur in der klassischen Genetik Verwendung, eingeführt von William Ernest Castle und Thomas Hunt Morgan. In den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden mit der Taufliege dann revolutionäre Ergebnisse in der Entwicklungsbiologie hervorgebracht: Zu diesen gehört die Entdeckung von Paarregelgenen bei der Musterbildung im Fliegenembryo (Nüsslein-Vollhard 1977). Schließlich wurde die Taufliege vor ca. 15 Jahren als Modellorganismus für immunologische Fragestellungen etabliert. Dieses ging einher mit der Wiederentdeckung der angeborenen Immunität, die seit Metchnikoff kaum Beachtung gefunden hatte. Die Arbeitsgruppe um Bruno Lemaitre und Jules Hoffmann entdeckte, dass der Toll-Rezeptor, der von zentraler Bedeutung für die dorso-ventrale Achsenbildung ist, essentiell für die Abwehrreaktion gegen Pilze ist (Lemaitre et al. 1996). Nachdem ein Jahr später die homologen Toll-like Rezeptoren (TLRs) in Menschen und Mäusen nachgewiesen wurden (Medzhitov et al. 1997) und die Sequenz des gesamten Fliegen-genoms im Jahr 2000 publiziert wurde (Adams 2000), war die Taufliege als Modellorganismus für die Untersuchung der angeborenen Immunität etabliert und gewann hier zusehends an Bedeutung (Hultmark 2003).

1.3 Das angeborene Immunsystem von *Drosophila melanogaster*

1.3.1.1 Die unterschiedlichen Abwehrmechanismen der Fliege

Aufgrund ihrer Lebens- und Ernährungsweise ist die Taufliege in ihrer natürlichen Umgebung dauerhaft mit Pathogenen wie Bakterien und Pilzen konfrontiert. Die Epithelien der Fliege stehen in dauerhaftem Kontakt mit der Umwelt und bieten als physikalische Barriere die Möglichkeit vor einer Infektion zu schützen. Dennoch kommt es immer wieder zu einem Eindringen der Pathogene in die Epithelzellen oder die Körperhöhle des Tieres. In diesen Fällen ermöglicht der systemische Teil des angeborenen Immunsystems von *Drosophila* vielfältige Möglichkeiten zur Abwehr dieser Mikroorganismen.

Die zelluläre Abwehr basiert auf der Aktivität sog. Hämocyten, die z.B. mittels Phagozytose von Pathogenen eine Ausbreitung dieser in der Hämolymphe verhindern. Außerdem können sie Fremdpartikel oder körpereigene, apoptotische Zellen aufnehmen. Eine Subgruppe der Hämocyten, die Plasmatozyten erfüllen in der Regel diese Funktion und ähneln somit den Makrophagen der Wirbeltiere (Govind & Nehm 2004). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der Einkapselung körperfremder Teilchen mit Hilfe von Lamelloyten. Parasitierende Wespeneier, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr phagozytotisch abgebaut werden können, werden auf diese Art inaktiviert. Als dritte Gruppe von Zellen fungieren die sog. Kristallzellen, die als Speicher für die Enzyme der Melanisierungskaskade dienen, über die der Wundverschluss von zerstörtem Gewebe möglich ist. Diese Reaktion wird über eine Serin-Protease-Kaskade ausgelöst und beruht auf der Aktivierung der Phenoloxidase aus ihrer inaktiven Form, der Pro-Phenoloxidase. Die aktive Form der Phenoloxidase oxidiert Phenole und ermöglicht deren Bindung an Proteine, was zu deren Polymerisierung im Gewebe führt (Brennan & Anderson 2004; Hultmark 2003). Daneben kann es durch eine Aktivierung der Phenoloxidase zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen, die als toxische Intermediate ebenfalls zu einer Zerstörung mikrobieller Strukturen führen können (Kim & Kim 2005), doch darauf wird unter 1.3.1.3 näher eingegangen.

Von ganz besonderem Interesse bei der Abwehr gegen Pathogene erscheint jedoch die Produktion antimikrobieller Peptide, die auch als humorale Abwehr bezeichnet wird, da es zu einer Ausschüttung löslicher Substanzen in die Hämolymphe oder das befallene Gewebe kommt. Grundsätzlich unterscheidet man hier zwischen der systemischen und der epithelialen Antwort. Die systemische Abwehrreaktion tritt ein, wenn es zu einem Eindringen von Pathogenen in die Körperhöhle des Tieres kommt. Hier führt die Erkennung pathogener Strukturen zur Produktion der AMPs im Fettkörper, dem Hauptimmunorgan in *Drosophila*. Diese werden dann über die Hämolymphe durch den

gesamten Körper transportiert und führen zu einer Inaktivierung bzw. Zerstörung der Pathogene (Govind & Nehm 2004).

Bei der epithelialen oder lokalen Abwehr hingegen kommt es zu einer gewebsspezifischen Expression der für die AMPs-kodierenden Gene. D.h. die Produktion beschränkt sich auf die befallenen Epithelstrukturen, während der übrige Organismus nicht betroffen ist. Die Steuerung der AMP-Synthese erfolgt dabei stets über die Aktivierung des IMD-Signaltransduktionsweges (Tzou et al. 2000). Früher wurde davon ausgegangen, dass auch die Toll-Signalkaskade eine epitheliale AMP-Synthese auslösen kann, doch in unabhängigen Studien konnte aufgeklärt werden, dass dieser in diesem Zusammenhang keine Bedeutung hat (Tingvall et al. 2001; Ferrandon et al. 1998).

Die Produktion von antimikrobiellen Peptiden ist ein wirkungsvoller Mechanismus um die Fliege vor der Vermehrung und Ausbreitung eingewanderter Mikroorganismen zu schützen. Bei antimikrobiellen Peptiden handelt es sich um kleine Peptide mit ca. 12 bis 50 Aminosäuren. Sie haben einen amphipatischen Charakter, was ihnen ermöglicht mit der Zellmembran der Pathogene zu interagieren. Auf diese Weise kann es zu einer sog. Porenbildung in der Zellmembran des Pathogens kommen, was ein Zugrundegehen des Zielorganismus zur Folge hat. Neben dem Abtöten von Bakterien haben die AMPs auch einen immun-modulatorischen Effekt, indem sie beispielsweise als Chemokine fungieren. So können auch die Hämözyten aktivieren und rekrutieren oder andere Abwehrfunktionen wie die Phenoloxidase aktivieren.

Die sieben in *Drosophila* beschriebenen AMP-Familien lassen sich anhand ihres Wirkungsspektrums bzw. anhand ihrer Aktivierung durch spezifische Typen von Mikroorganismen unterscheiden. Wie die Abbildung 1.4 aufzeigt, wirken Cecropin, Attacin, Diptericin und Drosocin hauptsächlich gegen Gram-negative Bakterien, Defensin gegen Gram-positive Bakterien, Metchnikowin und Drosomycin gegen Pilze (Imler & Bulet 2005). Glaubt man älteren Studien, so kann auch Metchinkowin eine Wirkung auf Gram-positive Bakterien haben und eine vermehrte Produktion von Cecropin nach einer Pilzinfektion nachgewiesen werden (Hetru et al. 2003).

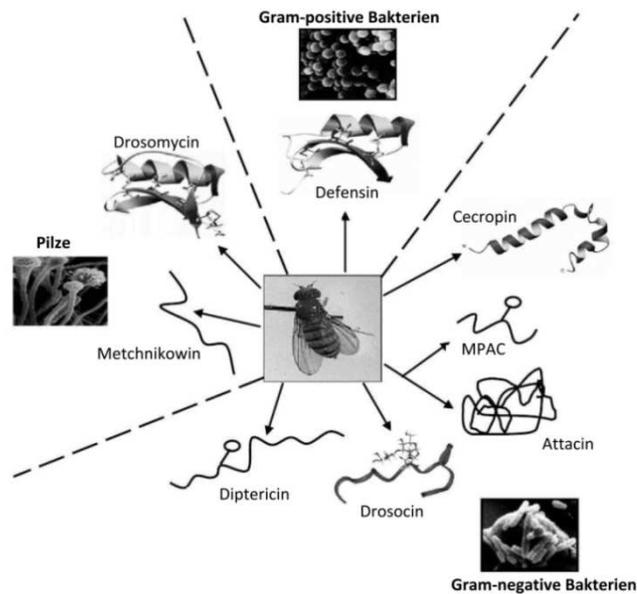


Abb. 1.4: Darstellung der im Fettkörper produzierten AMPs nach einer Konfrontation mit unterschiedlichen Mikroorganismen (verändert nach Imler und Bulet, 2005)

1.3.1.2 Erkennung pathogener Strukturen und Aktivierung der angeborenen Immunabwehr über unterschiedliche Signaltransduktionswege

In *Drosophila* sind sowohl der Toll- als auch der IMD Signalweg an der Produktion antimikrobieller Peptide als Reaktion auf einen Pathogenbefall bekannt. Es handelt sich bei beiden um eine intrazelluläre Signalkaskade, die zu der Translokation NF- κ B homologer Transkriptionsfaktoren führt, was in der Synthese von AMPs endet. Wichtig ist hier im Grunde die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Dies erfolgt über sog. Pathogen-assoziierte Molekülmuster (*Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs*) (Lemaitre & Hoffmann 2007) oder auch Mikrobiell-assoziierte Molekülmuster (*Microbial Associated Molecular Patterns, MAMPs*) (Neish 2009), die von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors, PRRs*) erkannt und gebunden werden. Bei den PAMPs bzw. MAMPs handelt es sich um typisch mikrobielle Strukturen wie Flagellin, Lipopolysaccharid (LPS) oder Peptidoglykan. Die Taufliege hat die Möglichkeit diese Strukturen über zwei spezifische Proteinfamilien zu detektieren, die Peptidoglykan-Rezeptoren (*PGRPs, Peptidoglycan Recognition Proteins*) oder die Gram-negativ Bindenden Proteinen (*GNBPs, Gram-negative Binding Proteins*) (Pinheiro & Ellar 2006). Gekennzeichnet durch ihre Struktur, welche eine N-terminale β -1,3-Glykan-Bindungsdomäne aufweist (Ochiai & Ashida 2000), wurden GNBPs bisher mit der Erkennung Gram-negativer Bakterien in Verbindung gebracht (Kim et al. 2000), jedoch konnten anschließende Studien zeigen, dass z.B. GGBP1 eine Funktion bei

der Erkennung Gram-positiver Bakterien hat (Leclerc & Reichhart 2004) und somit eine Aktivierung der Toll-Signalkaskade auslöst. Entsprechend verhält es sich mit dem GNB3, für das gezeigt werden konnte, dass es sich hier eindeutig um einen Mustererkennungsrezeptor für Zellwandstrukturen aus Pilzen handelt (Gottar et al. 2007).

Die Gruppe der PGRPs spielt eine entscheidende Rolle in der Erkennung von Komponenten Gram-negativer Bakterien. Sie umschließt 13 für PGRPs kodierende Gene (Werner et al. 2000), wovon sieben zu den sog. kleinen PGRPs (PGRP-S) gezählt werden, die mit einer Größe von 20 kDa gelöst in der Hämolymphe verteilt sind, während die übrigen sechs zu den sog. großen PGRPs (PGRP-L) gehören und als intrazelluläre oder gar membranständige Rezeptoren fungieren (Dziarski 2004). Die großen PGRPs PGRP-LC und PGRP-LE sind bei der Erkennung sowohl monomerer als auch polymerer Signalstrukturen wichtig und ermöglichen so die Aktivierung des IMD-Signalweges (Lemaitre & Hoffmann 2007). Hierbei ist anzumerken, dass es vermutlich zu einer Interaktion des löslichen PGRP-LEs mit dem membranständigen PGRP-LC kommen kann (Kaneko et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, wird die Toll-Kaskade durch die Erkennung von Zellwandbestandteilen Gram-positiver Bakterien oder Pilze aktiviert. Erstmals wurde der Toll-Signalweg bei der Achsenbildung während der Embryogenese (Anderson, 1985) beschrieben. Seine Funktion in der Immunabwehr bei der Infektion mit Pilzen wurde schließlich 1996 aufgedeckt (Lemaitre et al. 1996). Toll selbst ist ein integrales Membranprotein mit einer zytoplasmatischen und einer leucinreichen extrazellulären Domäne (Hashimoto 1988). Erkannt werden die pathogenen Strukturen über die bereits erwähnten löslichen PRRs PGRP-SA und GNB1 (Gobert et al. 2003). Die Aktivierung von Toll erfolgt anschließend indirekt über die Bindung seines Liganden Spätzle. Spätzle ist ein Cytokin, welches in seiner inaktiven Form als Dimer in der Hämolymphe auftritt, nach der proteolytischen Spaltung durch Serinproteasen wie Persephone, kommt es zu der spezifischen Bindung an die extrazelluläre Domäne des Toll-Rezeptors (Weber et al. 2003). Durch diese Bindung wird eine Signalkaskade, vermittelt über dMyD88, ausgelöst. Im Verbund mit den Proteinen Pelle und Tube kommt es zu einer Degradation des Inhibitors Cactus. Jüngste Untersuchungen haben zur Hypothese geführt, dass dMyD88 primär der Rekrutierung von Tube dient. Durch den Abbau von Cactus werden die NF- κ B-homologen Transkriptionsfaktoren Dif und Dorsal freigesetzt. Sie können nun in den Zellkern translozieren und die Expression spezifischer Gene auslösen. Der Transkriptionsfaktor Dorsal ist dem Namen nach an der Achsenbildung während der Embryogenese beteiligt, während Dif als auslösender Faktor bei der Synthese von AMPs bei der Immunantwort auftritt.

Der IMD-Signaltransduktionsweg, welcher homolog zum TNF α -Signalweg der Wirbeltiere ist, dient der Erkennung von Zellwandstrukturen Gram-negativer Bakterien. Entdeckt

wurde er in IMD-defizienten Fliegen, da es bei ihnen nicht zu einer Produktion von AMPs als Antwort auf eine Infektion mit Gram-negativen Bakterien kam (Lemaitre et al. 1995). Wie bereits erwähnt, erfolgt die Erkennung hier direkt über den integralen Rezeptor PGRP-LC (Choe et al. 2002) oder indirekt über die Bindung des löslichen PGRP-LEs an den membranständigen Rezeptor PGRP-LC (Kaneko et al. 2006). Nach der Bindung kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade über IMD und dTAK1. Bei dTAK1 handelt es sich um eine Kinase, die den IKK-Komplex bestehend aus ird5 (IKKb) und Kenny (IKKr) phosphoryliert und so eine proteolytische Spaltung des Transkriptionsfaktors Relish führt (Kaneko & Silverman 2005; Silverman 2000; Tanji et al. 2007). Des Weiteren gibt es noch die Möglichkeit Relish schnell und Proteasom-unabhängig zu aktivieren, indem es durch die Protease Dredd, welche zu der Familie der Caspasen gehört, endo-proteolytisch gespalten wird (Stöven et al. 2000). Lediglich das N-terminale Rel-68 Fragment besitzt die NF- κ B homologe Struktur und somit eine DNA-bindende Domäne. Es erfüllt die eigentliche Rolle des Transkriptionsfaktors, wandert in den Zellkern und führt zu einer Synthese der AMPs. Das im Zytoplasma verbleibende C-terminale Fragment Rel-49 fungiert vermutlich als I κ B Inhibitor und reguliert somit die Aktivität des Rel-Proteins (Khush 2001).

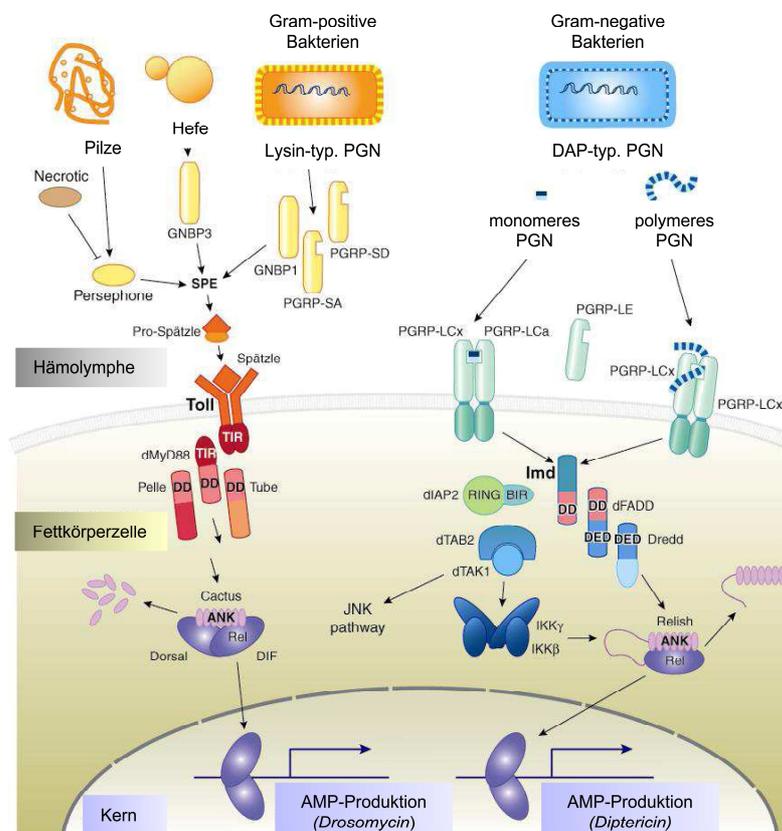


Abb. 1.5: Darstellung der Toll- & IMD-Signalkaskade (verändert nach Hoffmann & Lemaitre, 2007)

1.3.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies als weiterer Mechanismus zur Bekämpfung von Pathogenen

Wie bereits beschrieben, steht das intestinale Epithel in stetigem Kontakt mit Mikroorganismen, was dazu führt, dass diese Gewebe mit effektiven Abwehrmechanismen ausgestattet sein müssen, um bei einer Störung der normalen Mikroflora, wie z.B. durch die verstärkte Vermehrung vorherrschender Bakterien oder aber die Einwanderung neuer Pathogene, schnell reagieren zu können. Die unter 1.3.1.2 beschriebenen NF- κ B homologen Signaltransduktionswege können durch die Synthese von AMPs eingreifen, doch handelt es sich hier nicht zwingend um die entscheidende Abwehrfunktion bei der Entzündung des Darmepithels. Außerdem wird die AMP-Produktion häufig durch das Homöoboxgen *caudal* unterdrückt, um die Bakterien der körpereigenen Darmflora zu schützen (Ryu et al. 2008), da diese für den Wirt unerlässlich sind. Daher scheint das Gewebe vielmehr durch die schnelle Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und ihrem ebenso schnellen Abbau auf Pathogene zu reagieren (Ha et al. 2005). Die Produktion von ROS wird über das Enzym DUOX (Duale Oxidase) gesteuert, welche zu der Familie der NADPH-Oxidasen gehört. Die Aktivität von DUOX wird über die Aktivierung der Phospholipase C, genauer über die PLC β gelenkt, was einen drastischen Anstieg von ROS nach oraler Infektion zur Folge hat (Bae et al. 2010). Die Phospholipase C reguliert viele Zellprozesse, indem es Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) generiert. Diese Umwandlung führt in der Zelle zu einer verstärkten Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytoplasma (Thore et al. 2005). Die Aktivierung der PLC β erfolgt durch das G α q-Protein, welches eine Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins darstellt (Ha et al. 2009). Lediglich die Frage um was für einen G-Proteingekoppelten Rezeptor es sich handelt, der zur Aktivierung der gesamten Kaskade führt, ist noch unklar (Bae et al. 2010). Was allerdings bereits bekannt ist, ist, dass die Aktivierung dieses Rezeptors Peptidoglykan (PG)-unabhängig erfolgt, was im Gegensatz zu der AMP-Synthese über den IMD-Signaltransduktionsweg steht (Ha et al. 2009). Letztendlich ist es jedoch die verstärkte Calciumkonzentration im Zytoplasma, die zu einer Aktivierung von DUOX über die Bindung an die EF-Domäne des Enzyms führt und somit in einer gesteigerten Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies endet (Ha et al. 2009; Ha et al. 2005). Die schematische Darstellung des G α q-PLC β -Ca²⁺-DUOX-ROS-Signalweges ist in Abbildung 1.6 gezeigt. Hier ist, im Vergleich, die Standardsituation bei normal vorherrschender Darmflora [A] und bei starker bakterieller Belastung durch orale Infektion [B] einander gegenübergestellt.

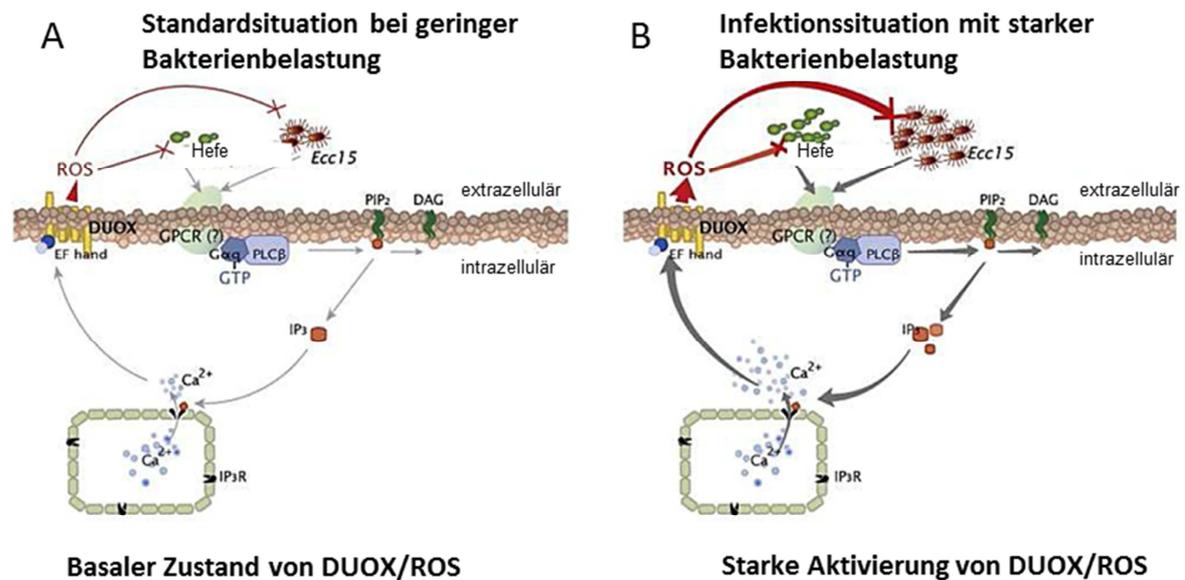


Abb. 1.6: Modell der DUOX-gesteuerten ROS Produktion (verändert nach Ha et al., 2009) Unter Normalbedingungen [A] kommt es zu einem ständigen Kontakt zwischen dem Darmepithel und Mikroorganismen wie Hefen aus der Nahrung und Bakterien. Um die Situation unter Kontrolle zu halten, wird stets eine geringe Menge an ROS produziert, um das Gleichgewicht zu halten. Unter Infektionsbedingungen [B], wie z.B. durch eine orale Infektion mit *Ecc15*, kommt es zu einer gesteigerten Ausschüttung von Ca²⁺ aus dem ER und daher zu einer gesteigerten ROS-Produktion.

Ein Erhalt der Homöostase dieses Redox-Systems scheint von großer Bedeutung zu sein (Ha et al. 2009), da bekannt ist, dass ein Ungleichgewicht in der Regulation und Eliminierung von ROS einen starken Einfluss auf die Entstehung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, insbesondere im Darmepithel, nimmt (Geiszt et al. 2003; Geiszt & Leto 2004).

1.3.2 Das Darmepithel von *Drosophila melanogaster*

Wie bei den meisten Insekten stellt sich der Darm als lange Röhre dar, die längs durch den gesamten Fliegenkörper verläuft. Er wird in den Vorderdarm, den Mitteldarm und den Enddarm gegliedert (Skaer & Bate 1993), wie in Abbildung 1.6 gezeigt (Charroux & Royet 2012). Im Folgenden soll ein besonderes Augenmerk auf den Mitteldarm gelegt werden. Zum einen handelt es sich hierbei um den resorbierenden Teil des Darmepithels (Denholm & Skaer 2009) und zum anderen stellt er das Homolog zum Dünndarm des Menschen dar. Wie der humane Dünndarm ist auch der Mitteldarm der Fliege endodermalen Ursprungs und wird in der Embryogenese aus mesenchymalen Zellclustern angelegt (Charroux & Royet 2012; Murakami et al. 1999).

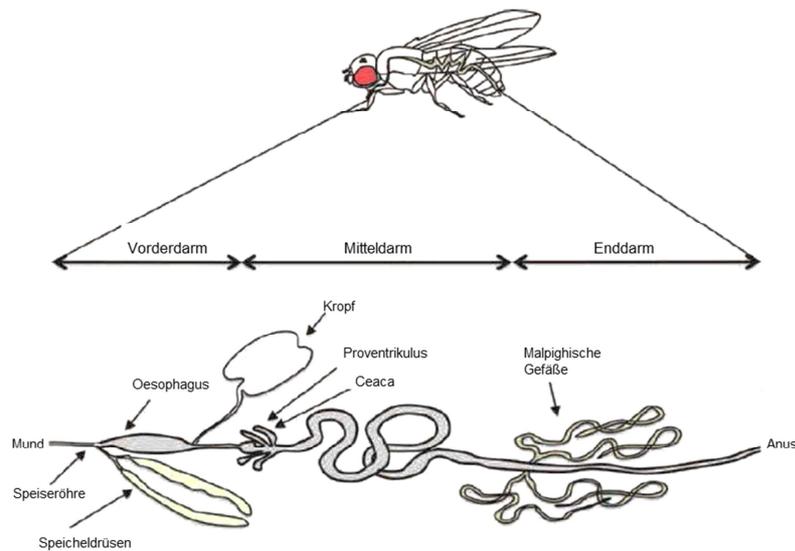


Abb. 1.7: **Übersicht über den Aufbau des Fliegendarms** (verändert nach Charroux, 2012). Es ist anzumerken, dass die Ceaca am Proventrikulus nur im larvalen Stadium vorhanden sind.

Das Darmepithel von *Drosophila* ist aus vier unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut. Der Großteil des *Monolayers* besteht aus Enterozyten (ECs), welche für die Resorption, sprich die Nährstoffgewinnung, verantwortlich sind. Daneben tragen sie eine wichtige Funktion in der lokalen Immunabwehr, da sie sowohl AMPs als auch ROS produzieren können (Charroux & Royet 2010). Des Weiteren gibt es die sog. Kupferzellen, von welchen es nur eine geringe Anzahl gibt (etwa 100), die sich als distinkte Zellpopulation im vorderen Drittel des Mitteldarms eingrenzen lassen. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie neben der Detoxifikation und Speicherung von Metallkationen auch zu einer Ansäuerung der aufgenommenen Nahrung führen. Somit erfüllen diese Zellen ähnliche Funktionen wie die Becherzellen im Magen von Wirbeltieren, überhaupt scheint es weitgehende Übereinstimmungen in Aufbau und Funktion dieser Zellen zu geben (Dubreuil 2004). Bei den enteroendokrinen Zellen handelt es sich um einen weiteren Zelltypus des Epithels, der der Bildung von Hormonen dient und somit eine Signalvermittlung im Gewebe ermöglicht. Der letzte Zelltyp ist von zentraler Bedeutung, da er für die Aufrechterhaltung dieser Struktur unerlässlich ist. Es handelt sich hier um die sog. intestinalen Stammzellen. Aus ihnen können sowohl Enterozyten als auch enteroendokrine Zellen entstehen. Teilt sich eine Stammzelle, so entstehen aus ihr stets wieder eine Stammzelle und ein Enteroblast, aus dem sich je nach vorherrschender Signalkaskade ein neuer Enterozyt oder eine enteroendokrine Zelle entwickelt. Somit sind diese Zellen für die Erhaltung bzw. Erneuerung von Darmzellen verantwortlich um das Zellgleichgewicht im Darm aufrecht zu erhalten (Micchelli & Perrimon 2006).

1.3.3 Die Rolle des Transkriptionsfaktors dFoxO in der Taufliede

Der Transkriptionsfaktor dFoxO gehört zu der Familie der Forkhead-Box-Proteine (FOX) und ist in allen Eukaryoten konserviert. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine DNA-Bindungsdomäne und ermöglichen durch Translokation in den Zellkern die induzierte Expression spezifischer Gene. Funktionell sind FoxO Faktoren an der Steuerung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelllebensdauer beteiligt. Bei Wirbeltieren werden diese komplexen Aufgaben von vier unterschiedlichen Mitgliedern dieser Familie ausgeführt (Weigel & Jäckle 1990). Im Gegensatz hierzu ist in Wirbellosen, wie z.B. in *Drosophila*, nur ein für FoxO-kodierendes Gen vorhanden. Hier ist bekannt, dass eine verstärkte *dfoxO* Expression zu einer längeren Lebensdauer führen kann (Giannakou et al. 2004; Hwangbo et al. 2004). Die Aktivität von dFoxO wird über eine große Bandbreite externer Stimuli gesteuert, wie z.B. über Insulin, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (*Insulin-like growth factors, IGF-1*), andere Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Cytokine und Stimuli des oxidativen Stresses (Calnan & Brunet 2008). In der Fliege spielt dFoxO ebenfalls eine essentielle Rolle im Zusammenhang mit dem Insulin-Signalweg. Kommt es zu einer verstärkten Insulin-Ausschüttung wird dFoxO negativ über den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg gesteuert. Die Proteinkinase Akt reguliert dFoxO, indem es seine Bindungsstellen phosphoryliert und somit eine Translokation in den Zellkern verhindert (Brunet et al. 1999). Andererseits kann die Phosphatase PTEN, welche als Gegenspieler der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) fungiert, eine Aktivierung von Akt unterbinden und eine Translokation von dFoxO fördern. Des Weiteren ist bekannt, dass dFoxO über Stressfaktoren bzw. äußere Stress-Einflüsse aktiviert werden kann (Brunet et al. 2004), so kann auch oxidativer Stress zu einer Translokation führen und die Expression von Zielgenen fördern. Derzeit gibt es kaum Berichte, die den Einfluss von dFoxO auf die Synthese Antimikrobieller Peptide beschrieben haben. Hunger zeigte sich als ein Stimulus, der in der Lage ist, die Expression von AMP Genen in Larven zu induzieren. Diese Induktion der AMP-Produktion war in dFoxO-defizienten Mutanten nicht mehr nachweisbar, obwohl andere, Hunger-induzierte Antworten erhalten blieben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine künstlich induzierte dFoxO Translokation zur AMP Induktion führt, eine Beobachtung, die insbesondere für das *drosomycin*-Gen zu gelten scheint. Die Promotorregion dieses Genes enthält mehrere potentielle dFoxO Bindungsstellen, sowie auch eine NF- κ B Bindungsstelle. Auch in Toll- und IMD- defizienten Tieren erfolgte eine Translokation von dFoxO nach Hunger, sowie eine gesteigerte *drosomycin* Expression (Becker et al. 2010). Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass auch dFoxO unabhängig vom IMD-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr in *Drosophila* einnimmt.

1.3.4 Der Einfluss der Mikrobiota im Darm der Taufliege

Die Anzahl der Untersuchungen, die sich der Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung des Darms in *Drosophila* widmeten, hat in den letzten Jahren dramatisch zugenommen (Cox & Gilmore 2007; Ren et al. 2007; Chandler et al. 2011). Anhand dieser Studien konnte gezeigt werden, dass die Taufliege nur eine relativ geringe Komplexität an beherbergten Bakterien aufweist, es wurden 15 unterschiedliche Bakteriengattungen gefunden, von denen lediglich fünf dominant auftreten (Wong et al. 2011).

Es hat sich gezeigt, dass einige Bakterienarten einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie der Fliegen haben, so konnte gezeigt werden, dass diese Symbionten einen positiven Effekt auf die Lebensdauer und die Fitness unter nicht optimalen Nahrungsbedingungen haben (Brummel et al. 2004; Storelli et al. 2011). Nachgewiesen wurde dies anhand von Studien mit axenisch aufgewachsenen Fliegen. Durch Zugabe des Bakteriums *Lactobacillus plantarum* konnte ein wachstumsfördernder Effekt erzeugt werden. Ähnliches zeigt sich auch am Beispiel des Bakteriums *Acetobacter pomorum*, welches in gnotobiotisch aufgewachsenen Fliegen wieder ein normales Nahrungsgleichgewicht ermöglicht. Diese Effekte werden über den Insulinsignalweg vermittelt (Shin et al. 2011).

Es ist zu erwähnen, dass es eine starke Varianz zwischen den unterschiedlichsten Wildtypstämmen in ihrer bakteriellen Zusammensetzung gibt, was eine Analyse natürlicher Stämme mittels eines 454-Sequenzierungs-basierten *Phylotypings* ergeben hat (Wong et al. 2011). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Laborstämme eine noch geringere Vielfalt ihrer bakteriellen Besiedlung aufweisen und es des Weiteren zu großen Unterschieden in der bakteriellen Zusammensetzung gleicher Stämme in unterschiedlichen Laboren kommt. Es ist davon auszugehen, dass dies im Zusammenhang mit der jeweiligen Nahrungsquelle steht, denn schließlich kommt es erst im Zuge der Nahrungsaufnahme zu einer Bildung des Mikrobioms (Chandler et al. 2011). Schließlich ist aus mehreren Studien bekannt, dass auch in *Drosophila* die Mikrobiota einen starken Einfluss auf die Homöostase des Darmepithels nimmt, darunter fallen insbesondere die gesteigerte Aktivität der intestinalen Stammzellen und von Signalkomponenten der epithelialen Immunabwehr (Ryu et al. 2008; Lhocine et al. 2008; Buchon et al. 2009).

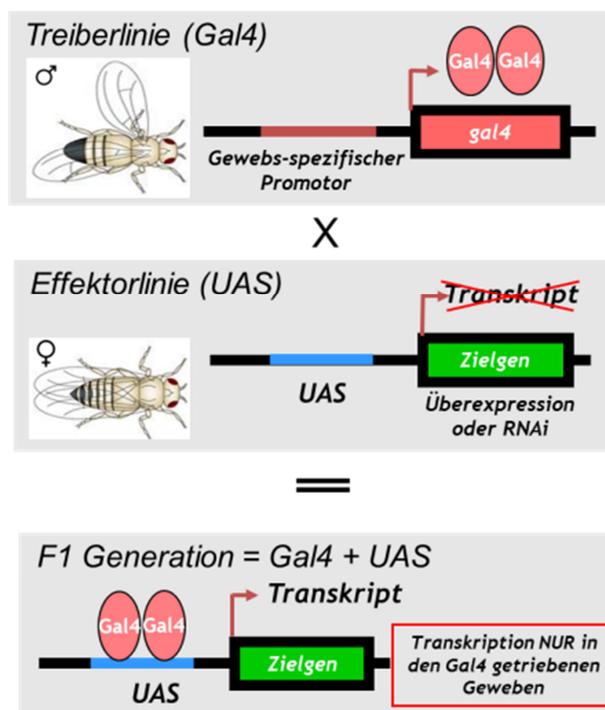
Aufgrund all der bisher gewonnenen Erkenntnisse wird deutlich, dass auch in *Drosophila* die Darmflora einen starken Einfluss auf die Physiologie im Allgemeinen, aber auch auf die Immunabwehr ausübt. Diese Erkenntnisse und auch das Vorhandensein einer relativ geringen Artenvielfalt in der bakteriellen Zusammensetzung im Darm zeichnet die Fliege als ein gutes Modell zur Untersuchung der Wirt-Symbiont-Interaktionen aus. Basierend auf diesen Untersuchungen wäre es möglich, die Einflüsse der Bakterien auf die

Immunabwehr im intestinalen Epithel zu verifizieren und ihre Rolle bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu klären.

1.3.5 Möglichkeiten der Expressionskontrolle im Modell *Drosophila*

1.3.5.1 Das binäre Gal4/UAS-System

Mit Hilfe des binären Gal4/UAS-Expressionssystems kann man ektopisch Gene in einem unabhängigen räumlichen Muster exprimieren (Brand & Perrimon 1993; Phelps & Brand 1998). Bei Gal4 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher von einem schwachen Promotor kontrolliert wird. Es stehen einige tausend unterschiedlicher sog. Gal4 Linien zur Verfügung, die Expression dieses Transkriptionsfaktors in unterschiedlichen Organen und Zellen zeigen. Das Gal4 bindet schließlich spezifisch an die sog. UAS-Sequenz (*Upstream Activated Sequence*) welche wiederum die Expression des Zielgens steuert und somit eine Überexpression oder auch ein *Gene-Silencing* des gewünschten Gens erlaubt. In *Drosophila* lässt sich dieses System dadurch anwenden, dass die beiden für Gal4 und UAS-kodierenden Elemente in zwei unterschiedlichen Elternlinien vorhanden sind. Erst in der F1-Generation



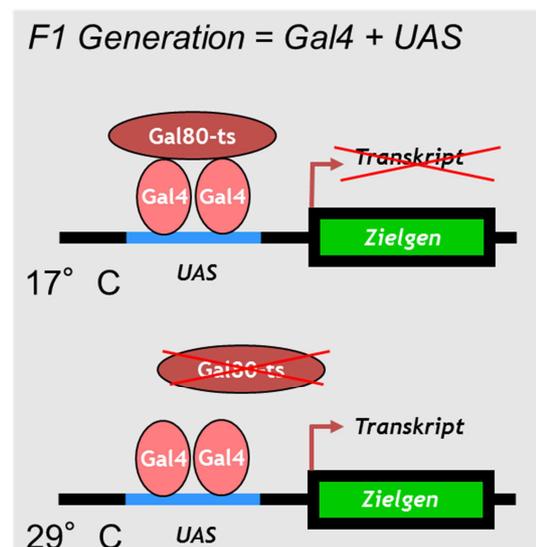
kommt es zu einer Zusammenführung des Gal4s und des UAS-Elements, was zu einer Aktivierung oder Stilllegung des Gens von Interesse in dem gewünschten Gewebe führt (Duffy 2002). Die Abbildung 1.8 stellt das System noch einmal schematisch dar.

Abb. 1.8: Das binäre Gal4-UAS-System in *Drosophila* Durch das Kreuzen der Treiberlinie (Gal4) mit der Effektorlinie (UAS) kommt es zu einer Aktivierung und Expression des Zielgens in dem gewünschten Gewebe der F1-Generation.

1.3.5.2 Das ternäre TARGET-Expressionssystem

Eines der wesentlichen Probleme, das bei der Verwendung des binären Systems auftritt, ist, dass es zwar nur in der F1-Generation zu einer Aktivierung des gewünschten Gens kommt, dass diese Aktivierung allerdings auch während der gesamten Entwicklung in dem Gewebe erfolgt. D. h. man kann auf diesem Wege nicht zweifelsfrei klären, ob die beobachtete phänotypische Veränderung tatsächlich auf die veränderte Expression des Zielgens zurückzuführen ist, oder ob Veränderungen während der Entwicklung dafür verantwortlich sind. Um dieses Problem zu umgehen, bietet das erweiterte TARGET-Expressionssystem (*Temporal And Regional Gene Expression Targeting*) die Möglichkeit, das Zielgen nur zu bestimmten Zeitpunkten unabhängig von dem Entwicklungszyklus der Fliege zu aktivieren (McGuire et al. 2003). In der Hefe wird die Transkriptionsaktivität des Gal4 von einem weiteren Protein, namens Gal80, kontrolliert. Ist keine Galactose mehr vorhanden, bindet das Gal80 an die aktivierende Bindungsdomäne des Gal4s und verhindert so dessen Translokation (Pilauri et al. 2005). Daraus folgt, dass es selbst in der F1-Generation zu keiner Expression des gewünschten Zielgenes kommen kann, wenn die Tiere bei einer Temperatur von 17°C heranwachsen (restriktive Temperatur). Erst ein Temperaturshift auf 29°C (permissive Temperatur) ermöglicht die Degradation des inhibierenden Gal80-Proteins, das Gal4 Protein wird frei und kann über die Bindung an die UAS-Sequenz zu einer Expression des gewünschten Zielgens führen, wie in Abbildung 1.9 dargestellt.

Abb. 1.9: Das TARGET-Expressionssystem – Die Änderung der Temperatur ermöglicht in der F1-Generation die Expression des Zielgens, da der inhibierende Effekt des Gal80-Proteins aufgehoben wird. Es kommt zu einer zeitlich unabhängigen Genexpression im gewünschten Gewebe der F1-Generation.



1.4 Zielsetzung

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Architektur des intestinalen Immunsystems von *Drosophila melanogaster* aufzuklären und diejenigen Mechanismen und Signalwege zu identifizieren, die an der Abwehr potentieller Pathogene beteiligt sind. Dieses Wissen soll letztlich genutzt werden, um die Entstehung und Persistenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen besser verstehen zu können.

Um diesen Zielen näher zu kommen, wurden zwei zentrale Hypothesen aufgestellt, die als Ausgangs- und Referenzpunkte für die Arbeit dienten:

These 1: Die Abwehr von Pathogenen im Mitteldarm der Taufliege besteht aus mehreren unabhängigen Modulen.

Daraus ergeben sich folgende zentrale Fragen, die experimentell bearbeitet werden sollen: a) Welche Zelltypen sind bei der Immunabwehr beteiligt und welche Aufgabe erfüllen sie in diesem Zusammenhang?

b) Wie erfolgt die Aktivierung dieser zellspezifischen Abwehr? Handelt es sich hierbei nur um die klassischen Aktivierungsmechanismen über die Toll- und die IMD-Signalkaskade oder gibt es noch weitere Möglichkeiten der zellulären Transduktion wie z.B. über den Transkriptionsfaktor dFoxO?

These 2: Die Mikrobiota im Darm der Taufliege spielt bei der Abwehr von Pathogenen eine zentrale Rolle. Außerdem führt die Dysregulation der Mikrobiota zu einer veränderten epithelialen Immunreaktion, die Ausgangspunkt für die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen sein könnte?

a) Ziel ist die Etablierung eines Systems in *Drosophila* zur nicht-invasiven Manipulation und der Bestimmung des Bakterienpools im Darm der Fliege.

b) Identifizierung von Möglichkeiten und Mechanismen, mit denen das intestinale Epithel die Zusammensetzung der endogenen Mikrobiota steuern kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage ABS/ABJ, Kern & Sohn GmbH, Balingen – **Bandelin Sonorex**, Hassa Laborbedarf, Lübeck – **Centrifuge 5417R**, Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf – **Centrifuge 5415D**, Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf – **Compact M Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus**, Biometra, Göttingen – **Gene Pix 4000B**, Axon Instruments, Biozym Scientific, Hess. Oldendorf – **Heiz-ThermoMixer HTMR-2-133**, Heap Labor Consult (HLC), Bovenden – **Hybridofen**, Thermo electron corporation, Dreieich – **IEC Centra CL3R**, Thermo Electron Corporation, Dreieich – **Mikrowelle MWDGCE-25**, AFK Elektrogeräte – **Molecular Imager Gel Doc**, Bio-Rad, München – **My Cycler thermal Cycler**, Bio-Rad, München – **Mikroskop SZX12 + Kamera DP 71**, Olympus, Hamburg – **Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer**, Peqlab, Erlangen – **Nikon SMZ 745T**, Nikon GmbH, Düsseldorf - **Rotanta 460R**, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen - **Schüttler Unimax 1010 + Inkubator 1000**, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach – **Schulwaage EMB**, Kern & Sohn GmbH, Balingen – **StepOne RealTime PCR System**, Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt – **Thermostatschrank Lovibond**, Tintometer GmbH, Dortmund – **Thermostatschrank**, Aqualytic, Dortmund – **Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation**, Peqlab GmbH, Erlangen – **Temperierter Shaker (Arrayhybridisierung) Inhenco**, Quantifoil Instruments GmbH, Jena – **Ultrospec 1100 pro**, Amersham Biosciences Eurpe GmbH, Freiburg - **Varioklav**, Thermo scientific, Dreieich - **VortexAdaptor**, Mobio, Dianova, Hamburg – **VortexGenie2**, Scientific Industries, New York – **Imager.Z1 + HPX120 + Power Supply 230 + Apotome**, Zeiss, Göttingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien, die nicht in der folgenden Auflistung berücksichtigt werden, wurden von der Firma Sarstedt, Nümbrecht bezogen.

Zuchtröhrchen 28,5 x 95 mm	Genesee Scientific, Dutscher Scientific UK, Essex
Stopfen	Genesee Scientific, Dutscher Scientific UK, Essex
PS-Zuchtröhrchen Ø 22 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Ceaprenstopfen Ø 22 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen

Milbenstopfen Ø 22 mm	K.TK e.K., Retzstadt
PS-Zuchtröhrchen Ø 36 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Ceaprenstopfen Ø 36 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Milbenstopfen Ø 36 mm	K.TK e.K., Retzstadt
PS-Zuchtröhrchen Ø 50 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Ceaprenstopfen Ø 50 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Milbenstopfen Ø 50 mm	K.TK e.K., Retzstadt
PS-Abstrichbesteck 16,0/100 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
MicroAmp® Fast Reaction Tubes	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
MicroAmp® Optical 8-Cap-Strip	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
MicroAmp® 48-Well Optical Adhesive Film	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.3 Chemikalien / Futterkomponenten

Alle Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

1kb-GeneRuler™	Fermentas, St. Leon-Roth
50bp-GeneRuler™	Fermentas, St. Leon-Roth
Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Alexa Fluor (555/647)	Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Aminoallyl UTP	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Aminotriazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
CNO	Charles Nichols, New Orleans
DIG Easy Hyb	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dNTPs	Promega, Mannheim
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hoechst-Farbstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
NGS	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNAmagic	Biobudget, Krefeld
Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
PrepProtect	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Yeast tRNA	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Formaldehydlösung 36,5 – 38%	Sigma-Aldrich, Steinheim
My-Budget RNAmagic	Bio-Budget Technologies, GmbH, Krefeld
Zuckerrübensirup	Kanne Brottrunk® GmbH & Co.KG, Selm- Bork
Zuckerrohrmelasse	Biohof-Heidelicht GbR, Gr. Sünstedt
Bierhefe	Leiber GmbH, Bramsche
Maismehl	Mühle Schlingemann, Waltrop
Methyl-4-Hydroxybenzoate (Nipagin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schweineschmalz	Laru, Bottrop
Propionsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.4 Reagenziensysteme, Enzyme & Antikörper

DyNAmo™ Flash SYBR Green qPCR Kit	Finnzymes, Bezug über Biozym, Hess. Oldendorf
MEGA Script-T7	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
PowerSoil® DNA Isolation Kit	MoBio, Dianova, Hamburg
Pwo DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RiboLock™ Ribonuclease-Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Phusion® Hot Start DNA-Polymerase	Finnzymes, Bezug über Biozym, Hess. Oldendorf
Prime Script Reverse Transcriptase	Takara, Takara Bio Europe, SAS, Saint- Germain-en-Laye, Frankreich
LA Taq DNA Polymerase	Takara, Takara Bio Europe, SAS, Saint- Germain-en-Laye, Frankreich KaRa
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Quanti-iT™ dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Quiagen MiniElut Gel Extraktions-Kit	Quiagen, Hilden

THU-A-DFOXO (GST-dFoxO(1-214aa)) (Hase, polyclonal)	1:1000 (Glycerol-Stock)	Cosmo Bio Co., LTD, über Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln
Anti-GFP (recGFP), (Hase, monoclonal)	1:500 (Glycerol-Stock)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-delta (<i>Drosophila</i> delta extracellular domain), (Maus, monoclonal)	1:100	DSHB, Iowa
Anti-relish-C 21F3 (Relish C-terminus) (Maus, monoclonal)	1:50	DSHB, Iowa
AlexaFluor 350 Donkey Anti-Rabbit		Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
DyLight 488-conjugated Donkey Anti- Rabbit	1:250 (Glycerol-Stock)	
DyLight 549-conjugated Goat Anti-Rat IgG		JacksonImmunoResearch, Bezug über Dianova, Hamburg
DyLight 649-conjugated Donkey Anti- rabbit IgG		JacksonImmunoResearch, Bezug über Dianova, Hamburg
DyLight 549-conjugated Goat Anti- mouse IgG	1:200	JacksonImmunoResearch, Bezug über Dianova, Hamburg

2.1.5 Kultur- & Nährmedien

Alle Medien wurden stets vor der Verwendung für 20 min bei 121°C autoklaviert, bei den *Drosophila*-Medien wurden Propionsäure und Nipagin-Lösung erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

LB-Medium	20 g LB-Broth (Lennox L Broth Base) ad 1 l Aqua bidest; pH 7,5 eingestellt mit NaOH
<i>Drosophila</i> – normales Nährmedium (NM)	500 ml Leitungswasser, 31,25 g Bierhefe, 31,25 g Maismehl, 5 g Agar-Agar, 10 g Glucose, 15 g Melasse, 15 g Zuckerrübensirup (das Medium wird 10 – 15 min gekocht und anschließend autoklaviert) – im Anschluss werden noch 5 ml 10 % (v/v) Propionsäure und 15 ml Nipagin 10 % (v/v) bei einer Mediumstemperatur von ca. 60°C hinzugefügt.

2.1.6 Puffer & Lösungen

10 x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O und 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l mit ddH ₂ O, autoklaviert
10 x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8) ad 1 l mit ddH ₂ O, autoklaviert
20 x SSC	175,3 g NaCl und 88,2 g Natriumcitrat ad 1 l mit ddH ₂ O, pH-Wert auf 7 eingestellt, autoklaviert
HL3	4,09 g NaCl, 0,373 g KCl, 0,221 g CaCl ₂ ·2H ₂ O, 4,066 g MgCl ₂ ·6H ₂ O, 8,4 g NaHCO ₃ , 1,892 g Trehalose, 39,36 g Saccharose, 1,192 g HEPES ad 1 l mit ddH ₂ O, pH 7,2, steril filtrieren
PBT	0,1 % (v/v) Tween in 1 x PBS
10 % ige Nipagin-Lösung (w/v)	10 g Nipagin ad 100 ml 70% Ethanol
10 % ige Propionsäure (v/v)	10 ml Propionsäure ad 100 ml mit ddH ₂ O
4 % iges PFA	4 g Paraformaldehyd ad 100 ml 1xPBS pH 7,3; auf 50-60°C erhitzen
5 % ige Saccharoselösung (w/v)	5 g Saccharose ad 100 ml mit steril filtriertem HL3 Puffer
3 M Natriumazetat	40,8 g Natriumazetat ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 5,5 eingestellt mit Eisessig
10% Triton® X-100	1 ml Triton® X-100 ad 9 ml mit ddH ₂ O

2.1.7 Fliegenstämme

Tab. 2.1: Verwendete Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezug / Quelle
<u>Wildtypen</u>		
Canton S	Canton-S	Bloomington
Oregon	Oregon-R-C	Bloomington
w ¹¹¹⁸	w[1118]	Bloomington
yw ¹¹¹⁸	y[1] w[1118]	Bloomington
<u>Knockout-Mutanten</u>		
Imd-KO	w[1118]; Rel[E38] e[s]	Bloomington
foxO-KO	yw;*;dfoxo24/dfoxo24	Marc Tatar, Rochelle, Yamamoto
foxO-KO	y[1] w[*]; foxo w24/ TM6B, Tb, Hue	Marc Tatar, Rochelle, Yamamoto
<u>GAL4-Treiber</u>		
NP1-Gal4		D. Ferrandon, Straßburg
NP1-Gal4 HS induzierbar		D. Ferrandon, Straßburg

Npc1b		L. Pallanck, Seattle, WA, USA
<u>UAS-Responder</u>		
YW UAS-PGRP-LCx		Kathryn Anderson, Developmental Biology Program, Sloan-Kettering Institute, New York; NY 10021
UAS-PGRP-LE	DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-PGRP-LE (II)	Kurata; Ihoichiro Kurata
pUAST foxo-GFP	w[1118]; P{UAS-foxo-gfp}	C. Wagner, 2009
UAS-foxO TM	w[*]	Marc Tatar, Rochelle, Yamamoto
M1D1		Charles Nichols, New Orleans, USA
UAS-PLCβ-mRFP	P{w[+mC]=PLC β -mRFP}	HW Lee, Gwangju-Si, Südkorea
<u>GFP-Reporter</u>		
Defensin::GFP		Tzou <i>et al.</i> 2000, Straßburg
Attacin::GFP		Tzou <i>et al.</i> 2000, Straßburg
<u>Doppel-Balancer</u>		
CyO; TM2/TM6(B)	w-; Sp/CyO P[elav-lacZ, ry+]; TM2/TM6 B P[ubx-lacZ, w+]	Tobias Storck, Münster (<i>Lindsley und Zimm, 1992 Klämbt C. unveröffentlicht</i>)

2.1.8 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezug / Quelle
<i>Serratia marcescens</i> IgXI	<i>S. marcescens</i> IgX-1	
<i>Serratia marcescens</i> IgXI-GFP		D. Ferrandon, Straßburg

2.1.9 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt bezogen, Ausnahmen sind eindeutig gekennzeichnet.

Tab. 2.2: Primer für die Erst- & Zweitstrangsynthese

Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
Erststrangsynthese	
CapFinder SP6rG	CAG CGG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG ArGrGrG (Bezug über <i>biomers.net</i>)
OdTT7 I	Biot-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA(T) ₂₅ A/C/G/
Zweitstrangsynthese	
Adaptor SP6-PCR	GAC GCC TGC AGG CGA TGA ATT TAG G
OdTT7 II	GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G

Tab. 2.3: Genspezifische Primer für die cDNA-Synthese

CG Nummer	Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
7939	cDNA RpL32	GAA CTC TCA AGA ATC TTA AGC
8995	cDNA PGRP-LE	GTT GTA CGC AAT GTC ATT CC
4432	cDNA PGRP-LC	GTC GTC ATC TCT GAT CTT AC
3143	cDNA foxO	GGC CAG CGG TAT ATT GAT GT

Diese Oligonukleotide sind speziell für die cDNA-Erststrangsynthese ausgewählt und eingesetzt worden und ersetzen somit den OdTT7 I Primer. In dieser Erststrangsynthese wurde nur der genspezifische Primer verwendet, um sicher zu gehen, dass das gewünschte Gen auch eindeutig in der qRT-PCR erkannt werden kann. Besonders in der Analyse zur Ermittlung der Überexpression war dies von Bedeutung, da nicht alle Gene in einem Vektor lagen, der eine PolyA-Kodierung besitzt.

Tab. 2.4: Genspezifische Primer für die RT-PCR & die qRT-PCR

CG Nummer	Oligo-Bezeichnung	Sequenz Sense (5' – 3') / Antisense (5' – 3')
Referenzgen		
7939	RpL32	TTG GCT TCG GTT TCC GGC AAG ATC GAT CCG ACT GGT GGC GGA T
Gene für antimikrobielle Peptide		
10146	Attacin A	CAATCTGGATGCCAAGGTCT TCCCGTGAGATCCAAGGTAG
1385	Defensin	GCTATCGCTTTTGCTCTGCT GCCGCCTTTGAACCCCTTGG
12763	Diptericin	GCAATCGCTTCTACTTTGGC TAGGTGCTTCCCACTTTCCA
10810	Drosomycin	ACCAAGCTCCGTGAGAACCTT TTGTATCTTCCGGACAGGCAG

1373	Cecropin C	AAGATCTTCGTTTTCGTCGC GTTGCGCAATTCCCAGTC
8175	Metchnikowin	CCACCGAGCTAAGATGCAA AATAAATTGGACCCGGTCTTG
10816	Drosocin	GTTACCATCGTTTTCTGC GGCAGCTTGAGTCAGGTGAT
Gene für mustererkennende Rezeptoren		
8995	PGRP-LE	ACGAGCCACTGCCCTTGCAAC AGTCTTACGTTGATCGCCCCG
Gene für Transkriptionsfaktoren		
3143	foxo	GCATGCACAATGCAAGAGAT GCCTCGTTATTGAGCACCTC
Gene für Enzyme		
3131	Dual Oxidase	TAATGTTGGCGCGGGCGGAG CGCCTTCGTCGTTCTCCGGG

Tab. 2.5: Bakterienspezifische Primer für die qRT-PCR

Bakterium	Bezeichnung (intern)	Sequenz (5' – 3')	Quelle
<i>Acetobacter pomorum</i>	ApF	TGTTTCCCAGCAAG	(Wong et al. 2011)
	ApR	AGAGTGCCAGC	
<i>Acetobacter tropicalis</i>	AtF	TAGCTAACGCGATAAGCACA	(Wong et al. 2011)
	AtR	ACAGCCTACCCATACAAGCC	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	LfF	AACCTGCCAGAAAGGGGA	(Wong et al. 2011)
	LfR	GCGCCGCGGATCCATCCAAA	
<i>Lactobacillus brevis</i>	LbF	GCAGTTGCCGAGGTCCAA	(Stevenson et al. 2006)
	LbR	CCAACGCATTTTCAGCATCA	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LpF	TGTCTCAGTCCCAATGTGGCCG	(Wong et al. 2011)
	LpR	GGCTATCACTTTGGATGGTCCCGC	
<i>Gluconobacter morbifer</i>	GspF1	ATGATGACGGTACCCGTAGA	(Gammon et al. 2007)
	GspR1	CTAGCCCCCTTCGTATTACC	
<i>Commensalibacter intestini</i>	Ci3F	CAGCTCGTGTCTGAGATGT	diese Arbeit
	Ci3R	TGACGTCATCCCTACCTTCC	
<i>Escherichia coli</i>	EcF	TGGGAAGCGAAAATCCTG	(Maheux et al. 2009)
	EcR	CAGTACAGGTAGACTTCTG	

Referenzprimer für alle Bakterienstämme (16S rDNA)

Oligo- Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Quelle
V2_27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Rausch et al. 2011)
V2_338R	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT	

Primer für den Nachweis der Wolbachia-Infektion

Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Quelle
Wsp_81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	(Zhou & Neill 1998)
Wsp_691R	AAAAATTAACGCTACTCCA	
12SAI	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	(O'Neill et al. 1992)
12SBI	AAGAGCGACGGGCGATGTGT	

Tab. 2.6: MID-Primer für die 454-Sequenzierung

Forward Oligo B für alle Adaptor A reversen Oligos verwendet

Oligo-Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'
V2_B_Pyro_27F	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGTTTGATCCTGGC TCAG

Reverse Oligos mit tag-Sequenz & Adaptor A-Sequenz

MID-Kennung	Oligo-Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'
MID1	V2_A_338R_tMID1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGAGTGCGTCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID2	V2_A_338R_tMID2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACACATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID3	V2_A_338R_tMID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGCACTCCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID4	V2_A_338R_tMID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID5	V2_A_338R_tMID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID6	V2_A_338R_tMID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID7	V2_A_338R_tMID7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTCTACATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID8	V2_A_338R_tMID8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGCGTGTCCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID9	V2_A_338R_tMID9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID10	V2_A_338R_tMID10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATACGTCTCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID11	V2_A_338R_tMID11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATAGTAGTGATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID12	V2_A_338R_tMID12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGAGATACCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID13	V2_A_338R_tMID13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATACGACGTACATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID14	V2_A_338R_tMID14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGTACTACATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID15	V2_A_338R_tMID15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTCTAGTACCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID16	V2_A_338R_tMID16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTACGTAGCCATGCTGC CTCCCGTAGGAGT

MID17	V2_A_338R_tMID17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGT GTACTACTC CATGCTGCC TCCCGTAGGAGT
MID18	V2_A_338R_tMID18	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACGACTACAG CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID19	V2_A_338R_tMID19	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CGTAGACTAG CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID20	V2_A_338R_tMID20	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TACGAGTATG CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID21	V2_A_338R_tMID21	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TACTCTCGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID22	V2_A_338R_tMID22	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TAGAGACGAG CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID23	V2_A_338R_tMID23	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCGTGCTCG CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID24	V2_A_338R_tMID24	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACATAACGCGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID25	V2_A_338R_tMID25	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACGCGAGTAT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID26	V2_A_338R_tMID26	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACTACTATGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID27	V2_A_338R_tMID27	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACTGTACAGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID28	V2_A_338R_tMID28	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGACTATACT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID29	V2_A_338R_tMID29	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGCGTCTCT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID30	V2_A_338R_tMID30	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGTACGCTAT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID31	V2_A_338R_tMID31	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATAGAGTACT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID32	V2_A_338R_tMID32	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CACGCTACGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID33	V2_A_338R_tMID33	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGTAGACGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID34	V2_A_338R_tMID34	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CGACGTGACT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID35	V2_A_338R_tMID35	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TACACACACT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID36	V2_A_338R_tMID36	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TACACGTGAT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID37	V2_A_338R_tMID37	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TACAGATCGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID38	V2_A_338R_tMID38	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TACGCTGTCT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID39	V2_A_338R_tMID39	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TAGTGAGAT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID40	V2_A_338R_tMID40	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCGATCACGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID41	V2_A_338R_tMID41	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCGCACTAGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID42	V2_A_338R_tMID42	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCTAGCGACT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID43	V2_A_338R_tMID43	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCTATACTAT CATGCTGCC

		TCCCGTAGGAGT
MID44	V2_A_338R_tMID44	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGT GACGTATGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID45	V2_A_338R_tMID45	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGT TGTGAGTAGT CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID46	V2_A_338R_tMID46	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACAGTATATA CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID47	V2_A_338R_tMID47	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACGCGATCGA CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID48	V2_A_338R_tMID48	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACTAGCAGTA CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID49	V2_A_338R_tMID49	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGCTCACGTA CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT
MID50	V2_A_338R_tMID50	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGTATACATA CATGCTGC CTCCCGTAGGAGT

Die hier aufgeführten Primer enthalten den 454 Life Science Adaptor A (für die reversen Primer) und B (für den Vorwärtsprimer). Außerdem wurden sog. Barcodes mit einer Länge von 10 bp (dargestellt in rot) an die reversen Primer editiert. Die in schwarz gezeigten Sequenzen stehen für die konservierten Bakterienprimer 27F und 338R. Eine Zwei-Basen-Linker-Sequenz (blau) und eine 4-Basen-Schlüsselsequenz (TCAG) wurde ebenfalls angefügt

2.2 Methoden

2.2.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden zur Erhaltung stets in mit NM gefüllten Fliegenröhrchen (Genesee Scientific; Dutscher Scientific UK, Essex) bei Raumtemperatur gehalten und etwa alle zwei Wochen auf neues Medium gesetzt. Für alle Versuche wurden 5 – 7 Tage alte, verpaarte Weibchen verwendet.

2.2.2 Kreuzungen

Für das Ansetzen von Kreuzungen wurden stets jungfräuliche Weibchen der Treiberlinien (GAL4-Linien) verwendet. Um eine ausbleibende Paarung zu gewährleisten wurden die Tiere bereits einige Stunden nach dem Schlüpfen separiert und in ein frisches mit Medium gefülltes Röhrchen gegeben. Die Tiere wurden bis zur Kreuzung in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 17°C gehalten.

Wurden genug Jungfrauen separiert, wurden Männchen der sog. Responderlinie (UAS-Linie) unterschiedlichen Alters zu den Weibchen gegeben. Handelte es sich um Hitzeschock-empfindliche Linien, wurden diese in einem Brutschrank bei 17°C gehalten.

Alle anderen nicht hitzeempfindlichen Kreuzungen wurden in einem Brutschrank bei 25°C gehalten.

2.2.3 Orale Infektion von adulten Fliegen

Die orale Infektion adulter Fliegen stellt sich schwieriger dar als bei Larven, da sie sich im Reproduktionsstadium befinden und nicht mehr im Fressstadium. Um eine Bakterienaufnahme zu erzielen, wurden auf die Röhrchen mit Normalmedium Whatman-Papierscheiben gelegt, welche sofort mit 350 µl der Bakteriensuspension (SmlgXI, $OD_{600} > 50$ in 5% iger Saccharoselösung) oder mit 350 µl der Kontrolllösung (5% ige Saccharoselösung) getränkt wurden. Die Fliegen wurden nach ca. 15 min auf die jeweiligen Röhrchen verteilt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 29°C inkubiert.

2.2.4 Präparation des Darmgewebes

Die verpaarten Weibchen wurden in einem Alter von 5 - 7 Tagen zur Präparation verwendet. Die Tiere wurden mit Stickstoff betäubt und anschließend direkt in HL3 Puffer präpariert. Der Darm wurde vom Proventrikulus bis zum Bereich der Malpighischen Gefäße entnommen und bis zur RNA-Isolierung in PrepProtect®Puffer aufbewahrt.

2.2.5 Molekularbiologische Arbeiten zur Probengenerierung

Bei den folgenden angewendeten Methoden handelt es sich um Standardarbeiten, die für die meisten nachfolgenden Experimente wie z. B. die Microarray-Analyse (2.2.6) oder die quantitative Realtime PCR (2.2.7) als Grundlage dienen. Daher werden sie im Folgenden kurz zusammengefasst.

Ausnahmen oder andere grundlegende Methoden werden unter dem jeweiligen Unterpunkt gesondert besprochen.

2.2.5.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus dem Darmgewebe der Tiere erfolgte mittels der Reagenz RNAmagic. Das in PrepProtect® Puffer gelagerte Gewebe wurde in 1 ml des Reagenz überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren, auf Eis aufgetaut und anschließend gevortext, um einen Aufschluss des Gewebes zu ermöglichen. Um zu gewährleisten, dass kein intaktes Darmgewebe erhalten bleibt, wurde dieser Vorgang drei

Mal wiederholt. Im Anschluss wurde das Gewebe in dem Reagenz für 5 min bei RT inkubiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, für 10 sec gevortext und schließlich für 10 min auf Eis inkubiert, um eine bessere Phasentrennung zu erreichen. Nach einem Zentrifugationsschritt (stets bei 4°C und 17.000 x g) wurde die obere wässrige Phase mit der Gesamtheit an vorhandener RNA für die weiteren Schritte verwendet. Zur Fällung der RNA wurde die Phase mit einem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und bei -20°C für mindestens 2 Stunden gefällt. Nach erfolgreicher Fällung und mehreren Waschschritten mit 70 % igem EtOH wurde das Pellet in HPLC-H₂O (65°C) gelöst. Die Quantität wurde anschließend im Nanodrop ermittelt.

2.2.5.2 Erststrangsynthese der cDNA

Da es sich bei der isolierten RNA um ein Gemisch aus rRNA, tRNA und mRNA handelt, erfolgt die Umschreibung der kodierenden mRNA in eine komplementäre, einzelsträngige DNA Sequenz (*cDNA – complementary DNA*) mittels des viralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT).

Um eine große Ausbeute der gesamten mRNA-Transkripte zu erzielen, wurde für die Erststrangsynthese die sog. CapFinder Methode angewendet (Franz et al. 1999). Bei dieser Methode wird eine M-MLV (*moloney murine leukemia virus*) Reverse Transkriptase verwendet, die die Gesamtheit der mRNA von einem Oligod(T)-Primer aus umschreibt. Dieser Oligod(T)-Primer besitzt 10-15 Thyminbasen, die eine Bindung an den Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ermöglichen und so eine spezifische Synthese erlauben. Sobald die Cap-Struktur erreicht ist, werden ca. 2-4 Cytosinreste an das 5'-Ende angehängt. Der CapFinder Primer besitzt an seinem 3'-Ende sog. r(G)-Basen, die mit den Cytosinresten eine stabile Basenpaarung eingehen. Die weitere Sequenz des CapFinders dient der RT nun als Matrize für die weitere Synthese. Nach der vollständigen Replikation des Primers wird diese schließlich in die cDNA-Sequenz integriert.

Der Ansatz für die Erststrangsynthese setzte sich wie folgt zusammen (20 µl Ansatz):

- 4 µl PrimeScript 5x Puffer
- 2 µl dNTPs (10 mM, 2,5 mM each)
- 1 µl Oligo d(T) T7 I (10 µM)
- 1 µl CapFinder Sp6rG (10 µM)
- 0,5 µl MnCl₂ (40 mM)
- 0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/ µl)
- 1 µl PrimeScript RT (200U/ µl)

Als Matrize wurden stets 150 ng der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt und mit HPLC gereinigtem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl mit den o.a. Komponenten eingestellt.

Dieser Ansatz wurde für 60 min bei 42°C im Hybridofen inkubiert, im Anschluss wurden die Proben bis zur Amplifikation bei -20°C für bis zu zwei Wochen gelagert.

2.2.5.3 Zweitstrangsynthese der cDNA / Amplifikation mittels PCR

Da es sich bei cDNA um ein einzelsträngiges Molekül (ss-cDNA) mit geringer Stabilität handelt, ist es empfehlenswert dieses Molekül mittel der Polymerasekettenreaktion (PCR) in doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) umzuschreiben und zu amplifizieren. Neben der erhöhten Stabilität bietet diese Reaktion eine gute Möglichkeit um eine größere Ausbeute für die anschließenden Analysen zu erhalten.

Bei der PCR handelt es sich um eine *in vitro*-Vervielfältigung der DNA-Moleküle unter Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen. Die DNA dient den Polymerasen als Matrize für die Synthese eines Zweitstranges, der komplementär zur vorliegenden Sequenz ist. Durch die stetige Denaturierung des Doppelstranges vor einem Amplifikationszyklus wird die Anzahl an Matrizen gesteigert und somit ein exponentieller Anstieg an DNA-Molekülen erzielt. In dieser Arbeit wurde die sog. 5'- RACE-PCR nach Schramm (Schramm et al. 2000) angewendet.

Der Ansatz für die Zweitstrangsynthese setzte sich wie folgt zusammen (50 µl Ansatz):

- 39,75 µl ddH₂O
- 5 µl F-101 PCR (10x) Puffer
- 2 µl dNTPs (10 mM, 2,5 mM each)
- 1 µl Oligo d(T) T7 II (10 µM)
- 1 µl CapFinder Sp6rG-Adaptor PCR (10 µM)
- 0,25 µl Taq/Pwo (20:1)
- 1 µl cDNA aus der Erststrangsynthese

Die PCR-Bedingungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 2.7: PCR-Bedingungen für die cDNA-Zweitstrangsynthese

Zyklus	Denaturierung 95°C	Primer- Annealing 53°C	Elongation 72°C	Wiederholungen
1	1 min	---	---	1
2	20 sek	20 sek	2 min 30 + 30 sek pro Zyklus	30
3	---	---	5 min	1
4		Kühlung 4°C	∞	

2.2.6 RT-PCR

Einzelne Gene können unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide durch die Amplifikation mittels der Reversen Transkriptase-PCR qualitativ nachgewiesen werden. Als Ausgangsmaterial kann man hier entweder die direkte, in der Erststrangsynthese generierte, ss-cDNA verwenden oder auch die bereits amplifizierte ds-cDNA aus der oben dargestellten RACE-PCR. Durch das Verwenden ganz spezifischer, ausgewählter Sense- und Antisense-Primer kommt es zu der Bildung eines Amplifikats mit bekannter Größe, meist handelt es sich hier um Größen zwischen 70 und 250 bp.

Die RT-PCR diente in dieser Arbeit zunächst zur Überprüfung der ausgewählten genspezifischen Primer, um eine spätere quantitative Analyse mittels der qRT-PCR durchführen zu können.

Im Anschluss an alle PCR-Läufe wurde stets eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt. Sie dient der Überprüfung und Qualitätsbestimmung der gebildeten Produkte. Je nach erwarteten Größen wurden 1 - 1,5 % ige Agarose-Gele mit einer Ethidiumbromid-Endkonzentration von 0,5 µg / ml verwendet. Als Standard wurden der 1kb-GeneRuler™ oder der 50bp-GeneRuler™ benutzt.

Des Weiteren würde die ds-cDNA für weitere Versuche mittels des NucleoSpin® Extract II-Kits von Machery Nagel gereinigt. Die Säule wurde im letzten Schritt stets mit 30 µl ddH₂O eluiert. Im Anschluss wurden die Proben im Nanodrop quantifiziert und ihr Reinheitsgrad wurde bestimmt.

Der Ansatz für die RT-PCR setzte sich wie folgt zusammen (25 µl Ansatz):

- 19,75 µl ddH₂O
- 2,5 µl PCR-Puffer (10 x)
- 0,5 µl dNTPs (10 mM, 2,5 mM each)
- 0,5 µl Sense Primer (10 p µM)
- 0,5 µl Antisense Primer (10 µM)
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- 1 µl ds-cDNA/ss-cDNA

Die PCR-Bedingungen sind in der folgenden Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.8: PCR-Bedingungen für die RT-PCR

Zyklus	Denaturierung 95°C	Primer- Annealing 55°C	Elongation 72°C	Wiederholungen
1	1 min	---	---	1
2	30 sek	30 sek	1 min	30
3	---	---	5 min	1
4	Kühlung 4°C		∞	

2.2.7 Realtime PCR

Bei der Realtime PCR handelte es sich prinzipiell um eine herkömmliche PCR, die der Vervielfältigung von Nukleinsäuren dient. Besonders ist an diesem Typ der PCR, dass neben der Vervielfältigung eine Quantifizierung spezifischer Genprodukte durch die Verwendung genspezifischer Oligonukleotide möglich ist. Die Quantifizierung lässt sich über das Einbringen von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen erreichen und ermöglicht eine Messung der ansteigenden Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Phase der PCR.

Die Quantifizierung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem Fluoreszenzmarker SYBR Green, welcher in der Elongationsphase in die doppelsträngige DNA eingebaut wird und dessen Fluoreszenzsignal proportional zur amplifizierten DNA-Menge in Echtzeit detektiert wird. Bei der Verwendung von SYBR Green ist eine Schmelzkurvenanalyse der verwendeten Oligonukleotide unerlässlich, um die Fragmentlänge und -spezifität bestimmen zu können. Bei der Schmelzkurvenanalyse werden die doppelsträngigen PCR-

Produkte bei einer kontinuierlich ansteigenden Temperatur von 50°C – 95°C aufgeschmolzen, der interkalierende Farbstoff wird freigesetzt und die Fluoreszenzabnahme registriert. Spezifische Genprodukte weisen hierbei eine höhere Schmelztemperatur auf als unspezifische Produkte wie z.B. Primerdimere.

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, der sog. Relativen Quantifizierung. Hierzu wird ein Referenzgen als interne Kontrolle verwendet, um Abweichungen der Ausgangsmenge anzugleichen. Wichtig ist, dass es sich bei diesem Referenzgen um ein Gen handelt, welches weder in der Kontrolle noch in den zu untersuchenden Proben reguliert wird. Um das richtige Gen für die eigentliche Quantifizierung zu erhalten, wurden zunächst Testläufe mit mehreren möglichen Referenzgenen durchgeführt. Mittels des Programms geNorm wurde schließlich das optimale Referenzgen (Wiedemann et al. 2004) für die in dieser Arbeit verwendeten Proben ermittelt. Es handelt sich stets um das ribosomale Gen Rpl32, welcher weder in der Kontrolle noch in den behandelten Proben einer Regulierung unterlag.

Die Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene werden als n-fache Expression mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Hierbei werden die CT-Werte (*cycle threshold*) der jeweiligen Proben als Maß für den signifikanten Anstieg der Fluoreszenz am Beginn der exponentiellen Phase verwendet. Die folgenden Formeln dienen dem besseren Verständnis (Pfaffl 2004):

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Problem ist, dass bei dieser Form der Quantifizierung von einer konstanten Verdopplung der eingesetzten Probe pro Zyklus ausgegangen wird, daher wird die Basis 2 in der o. a. Formel verwendet. Es ist jedoch sinnvoll unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der verwendeten Oligonukleotide, die Effizienzen der jeweiligen Paarungen zu untersuchen und diese als Korrekturfaktor in der o. a. Formel zu verwenden (Michael W. Pfaffl und Riedmaier):

$$\frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Behandlung})}}$$

Für die Berechnung von E gilt:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung [R]})}$$

Der Ansatz für die qRT-PCR setzte sich wie folgt zusammen (20 µl Ansatz):

cDNA-Läufe

10 µl SYBR – Mix
 0,4 µl ROX
 1 µl Sense Primer (20 pmol)
 1 µl Antisense Primer (20 pmol)
 ng gereinigte ds-DNA
 ad 20 µl mit ddH₂O

gDNA-Läufe

10 µl SYBR – Mix
 0,4 µl ROX
 1 µl Sense Primer (8 pmol)
 1 µl Antisense Primer (20 pmol)
 2 µl gDNA
 ad 20 µl mit ddH₂O

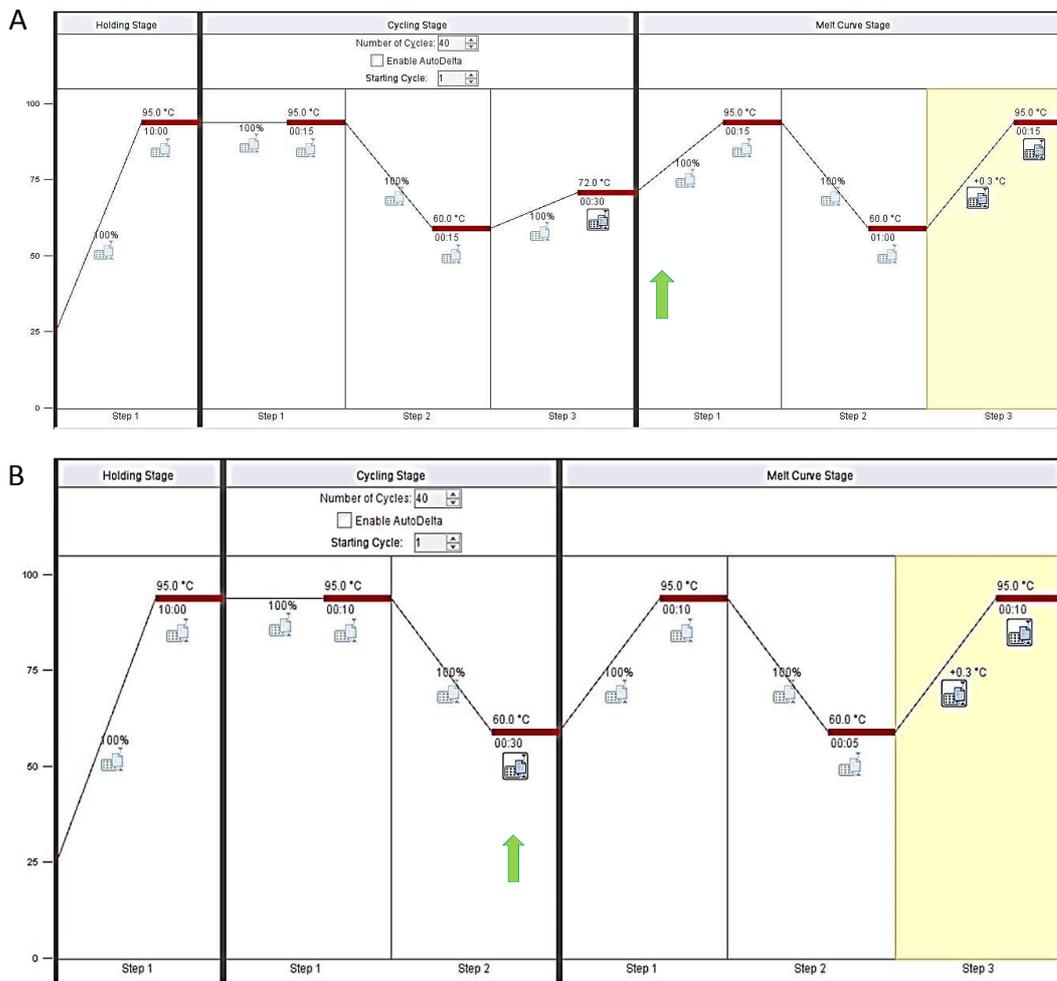


Abb. 2.1: Darstellung der qRT-PCR-Bedingungen für die Amplifikation. In [A] ist das Profil für die cDNA-Läufe dargestellt, in [B] das Profil für die gDNA-Amplifikation. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt in der Elongationsphase [A] oder in der Annealingphase [B], wie durch den grünen Pfeil gekennzeichnet.

2.2.8 Microarray

Zur Untersuchung des Transkriptoms wurden Genexpressionsstudien mit Hilfe des Microarray-Verfahrens angefertigt. Hierbei ist es möglich, alle Gene eines Organismus oder eines gewünschten Gewebes nach unterschiedlichen Behandlungen in einem Versuch zu verifizieren. Im Folgenden werden die einzelnen Synthese & Hybridisierungsschritte genau erläutert.

2.2.8.1 aa-cRNA-Synthese

Bei dieser *in vitro* Transkription wird die gereinigte ds-cDNA aus der Zweitstrangsynthese enzymatisch mittels einer T7-RNA-Polymerase in einen komplementären RNA-Einzelstrang umgeschrieben (*cRNA = complementary RNA*). Die Transkription wurde mit dem MEGAScript T7 Kit der Firma Ambion nach deren Protokoll durchgeführt. Durch den Einbau von Aminoallyl-UTP (aaUTP) in die cRNA, ist eine spätere Farbstoffkopplung zur Markierung der RNA möglich.

Der Ansatz für die Transkription setzte sich wie folgt zusammen (20 µl Ansatz):

- 2 µl T7 10 x Reaktionspuffer
- 2 µl ATP (75 mM)
- 2 µl GTP (75mM)
- 2 µl CTP (75mM)
- 1 µl UTP (75mM)
- 1,5 µl aaUTP (50mM)
- 2 µl T7-Enzym-Mix

Als Template wurden stets 800 ng der gereinigten PCR aus der Zweitstrangsynthese eingesetzt und mit DEPC behandeltem H₂O (Kit) auf ein Endvolumen von 20 µl mit den o.a. Komponenten eingestellt.

Die Synthese erfolgte für 14 – 18 Stunden bei 42°C im Hybridofen.

Im Anschluss an die Synthese erfolgte eine Reinigung des Produktes mittels des NucleoSpin® RNA II Kits von Macherey Nagel. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde hier kein DNase Verdau mehr durchgeführt. Des Weiteren wurde die Säule im letzten Schritt 2 x mit 50 µl ddH₂O (65°C) eluiert, um alle cRNA Rückstände aus der Säule zu spülen. Eine anschließende Präzipitation führte zur Konzentrierung der cRNA. Die Fällung der Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M

Natriumacetatlösung (pH 5,5) und einem 2,5 fachen Volumen von 100 % igem EtOH bei -20°C über Nacht durchgeführt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 17.000 x g wurde das Pellet in 70% igem EtOH gewaschen, das luftgetrocknete Pellet in 10 – 15 µl ddH₂O aufgenommen und anschließend wieder im Nanodrop quantifiziert.

2.2.8.2 Farbstoffkopplung

Die Markierung der cRNA erfolgt indirekt über die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 555 und 647 an das in der *in vitro* Transkription eingefügte aaUTP. Diese Farbstoffe tragen eine N-Hydroxysuccinimidester, über den es ihnen möglich ist eine starke kovalente Bindung mit dem Aminoallyl einzugehen. Um die Bindungsaffinität zu unterstützen, wurde die Reaktion stets unter alkalischen Bedingungen bei einem pH von 9 durchgeführt.

Die Reaktion setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

15 – 20 µg cRNA	(1 Volumenanteil)
NaHCO ₃ Puffer (0,3 M, pH9)	(2 Volumenanteile)
Alexa Farbstoff in DMSO gelöst	(3 Volumenanteile)

Die Kontrolle wurde stets mit AF555 gekoppelt, die zu untersuchende Probe stets mit AF647.

Der Ansatz wurde schließlich für zwei Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Reinigung der farbstoff-markierten Proben mit dem NucleoSpin® RNA II Kits von Macherey Nagel und gefällt (s. 2.2.9.1). Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 5 µl ddH₂O aufgenommen und anschließend wurde die Effizienz der Farbstoffkopplung mit verdünnten Proben (1:20) im Nanodrop bestimmt.

Da es häufig zu unterschiedlichen Bindungseffizienzen der Farbstoffe kommt, ist es für die Hybridisierung unerlässlich, die farbstoffgekoppelten Proben auf die gleiche Konzentration einzustellen.

2.2.8.3 Hybridisierung, Waschvorgang und Scannen

Für die Hybridisierung wurden Oligonukleotid-Chips (Oligo14kv2) des Canadian Drosophila Microarray Centers, Toronto / Kanada verwendet. Dieser Chip zeichnet sich durch das Spotting von 48 Subarrays mit jeweils 336 enthaltenen Spots aus. Von den insgesamt 16.128 gespotteten Oligonukleotiden, handelt es sich um 14.444 Transkript-spezifische Spots, die übrigen setzen sich aus Kontrollproben zusammen.

Für die Hybridisierung wurden jeweils zwei miteinander zu vergleichende Proben eingesetzt, die zuvor mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (mit einer Endkonzentration von 200 pmol pro Farbstoff) gekoppelt wurden (2.2.9.2). Um die perfekten Hybridisierungsbedingungen zu erhalten, wurden 54 µl des DIGEasyHyb-Puffers der Firma Roche verwendet. Des Weiteren wurden 2,88 µl yeast tRNA (10mg/ml) und 2,88 µl salmon sperm DNA (100mg/ml) ebenfalls der Hybridisierungslösung hinzugefügt, um unspezifische Bindungen auf dem Microarray zu unterbinden bzw. möglichst gering zu halten. Vor der Beschickung des Arrays wurde dieser mit einem Coverslip abgedeckt und in einer Hybridisierungskammer bei 42 °C vorgewärmt. Die in dem o.a. Puffer angesetzten Proben wurden 10 min bei 65°C denaturiert, anschließend auf den Array pipettiert und nach Verschließen des Coverslips für etwa 16 Stunden bei 42°C inkubiert.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde der Coverslip entfernt und der Chip wurde nach folgendem Protokoll gewaschen:

Tab. 2.9: Waschprotokoll des Microarray-Chips

Waschlösung	Temperatur	Zeit	Wiederholung
1 x SSC	RT	60 min	1
1 x SSC, 0,1 % Triton-X-100	60°C	15 min	2
0,1 x SSC, 0,1 % Triton-X-100	37°C	15 min	2
0,1 x SSC	RT	30 sek	1
ddH₂O	RT	spülen	1
Umgehendes Trocknen des Arrays mit Stickstoff			

Alle Waschschriffe erfolgen in lichtgeschützten Falcons auf dem Schüttler.

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie / Mikroskopie

2.2.9.1 Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis der zu untersuchenden Proteine wurde das Darmgewebe in 4% igem Paraformaldehyd in 0,3 % PBT fixiert, was zur Proteinvernetzung und der Immobilisierung der Antigene dient. Anschließend wurde das Gewebe mehrmals mit PBT-Puffer bei RT gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden folgte ein Blockierschritt mit 10% igem NGS (*Normal Goat Serum*) in 0,3 % PBT (Blockierpuffer). Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte stets in einem Endvolumen von 100 µl Blockierpuffer mit der in 2.1.4 entsprechend angegebenen Verdünnung bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper in mehreren Waschschriffen in 0,3 % PBT entfernt und der zweite Antikörper wurde in

einem Endvolumen von 125 µl Blockierpuffer mit der entsprechenden Konzentration (s. 2.1.4) für die Inkubation ü. N. bei 4°C hinzugefügt. Auch hier folgte das Waschen des Gewebes mehrmals mit 0,3 % igem PBT. Anschließend wurde das Gewebe auf einen Objektträger übertragen und in Roti[®]-Mount eingedeckt. Durch das Verwenden dieses Einbettmediums war keine Kernfärbung mit Hoechst mehr nötig, da DAPI als DNA-markierender Farbstoff bereits in der Lösung vorhanden ist.

Die angefertigten Präparate wurden umgehend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

2.2.9.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von ROS mit DHE

Für den Nachweis von ROS mit DHE wurden die Därme in Schneider's Medium (RT!) präpariert und bis zur endgültigen Färbung darin gelagert. Das DHE wurde stets frisch angesetzt. Zunächst wurde 1 mg DHE in DMSO als Stammlösung angesetzt, anschließend wurde diese Lösung 1:1000 in Schneider's Medium verdünnt. Die präparierten Därme wurden für 7 min bei RT im Dunkeln auf einem Vertikalschüttler inkubiert und anschließend 3 x für 5 min in Schneider's Medium gewaschen. Anschließend erfolgte eine kurze Fixierung für 5 min in 7 % PFA. Anschließend wurden die Därme kurz in Schneider's Medium gespült und in Roti[®] Mount eingedeckelt. Die Bilder wurden sofort im Anschluss am Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

Die Belichtungszeiten wurden für jedes Experiment entsprechend gewählt, wobei Kontrolle und Behandlung eines einzelnen betrachteten Experimentes stets gleich waren.

2.2.9.3 Nachweis der NO-Synthase

Für den Nachweis der aktivierten NO-Synthase wurde das isolierte Gewebe mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) unter Verwendung des Reduktionsmittels NADPH verwendet. Für die Färbelösung wurde 1 mg NBT in 250 µl Methanol gelöst und ad 5 ml mit Tris/HCl/Triton Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde dem Gemisch 1 mg NADPH hinzugefügt, dies allerdings erst direkt VOR der eigentlichen Inkubation des Gewebes in der Färbelösung. D.h. zunächst wurde das Gewebe präpariert und für 45 min bei RT in 4% PFA fixiert und schließlich drei Mal für 10 min in 1 x PBS gewaschen, um alle PFA-Rückstände zu entfernen. Dann wurde das Gewebe für 30 min in dem Tris/HCl/Triton Puffer bei RT vorinkubiert, um daraufhin das Gewebe 30 min bei RT in der frisch angesetzten Färbelösung zu inkubieren. Um die Rückstände der Färbelösung zu entfernen, wurde nochmals je drei Mal für 10 min mit 1 x PBS gewaschen. Das Gewebe wurde dann umgehend in 30 % Glycerol / 1x PBS (v/v) eingebettet und für die mikroskopische Analyse herangezogen.

2.2.10 454 Sequenzierung

2.2.10.1 Probengewinnung

Die Untersuchungen mittels der 454 Sequenzierung können in zwei unterschiedliche Experimente gegliedert werden. In Experiment I sollte die bakterielle Zusammensetzung unterschiedlicher Gewebe bzw. Proben der drei Wildtyplinien Canton S, Oregon R-C und w¹¹¹⁸ untersucht werden. In Experiment II hingegen wurde der Einfluss von CNO auf das Mikrobiom in den Faeces von der F1-Generation der Kreuzung NP1-Gal4 x DREADD-UAS-M1D1 mittels eines Zeitreihenexperimentes überprüft. Daher wird im Folgenden bei der Probengewinnung zwischen Experiment I und II unterschieden.

Experiment I

Alle Versuche wurden mit befruchteten Weibchen oder mit den Geweben bzw. Faeces befruchteter Weibchen durchgeführt. Die jungfräulichen Weibchen wurden direkt nach dem Schlüpfen gemeinsam mit jungen Männchen in ein frisches Mediumsröhrchen überführt und dort für 6 Tage belassen. Anschließend wurden die drei unterschiedlichen Proben wie folgt entnommen:

- a) 5 Weibchen wurden direkt für die gDNA Isolierung verwendet.
- b) Die Därme von 10 Weibchen wurden in HL3 Puffer präpariert und direkt in das PowerSoil Aufschlussgefäß überführt.
- c) 50 Weibchen wurden zur Defäkation in ein frisches Mediumsröhrchen überführt und für ca. 24 Stunden darin belassen. Die adulten Tiere wurden anschließend verworfen und der Kot wurde mit einem sterilen, in HL3-Puffer getränkten Speichelabstrichtupfer entnommen. Anschließend wurde der Tupfer mit einer sterilen Schere in das Powersoil-Aufschlussgefäß übertragen.

Die Isolierung der gDNA aus den Geweben ist in 2.2.10.2 beschrieben.

Experiment II

Auch hier wurden alle Experimente mit befruchteten Weibchen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x DREADD-UAS-M1D1 durchgeführt. Durch die Zufütterung von CNO, dem künstlichen Liganden des in der DREADD-Linie inserierten humanen, muskarinischen Acetylcholinrezeptors, kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung von Calciumionen und somit einer Produktion von ROS, wie in der Einleitung bereits unter 1.3.4.3 erläutert wurde. Mittels eines Zeitreihenexperimentes sollte überprüft werden, ob es durch die

künstliche Aktivierung des PLC β -Signalweges zu einer Veränderung im Mikrobiom der isolierten Faeces-Proben kommt und, ob es sich um einen reversiblen Prozess handelt.

Es wurden jeweils 3 biologische Replikate erstellt, in denen jeweils der Kot von 50 Weibchen zu den Zeitpunkten T0 (vor der Behandlung), T1 (24 Stunden CNO-Gabe), T2 (24 Stunden Refeeding auf NM), T3 (48 Stunden Refeeding auf NM) und T4 (72 Stunden Refeeding auf NM) mit einem sterilen in HL3-Puffer getränkten Speichelabstrichtupfer entnommen. Anschließend wurde der Tupfer mit einer sterilen Schere in das Powersoil-Aufschlussgefäß übertragen.

Die Isolierung der gDNA aus den Geweben ist in 2.2.10.2 beschrieben.

2.2.10.2 Probenisolierung

Zu Isolierung der gDNA aus den unterschiedlichen Proben (ganze Fliege, Darm und Faeces) wurde das PowerSoil Kit der Firma MoBio nach Herstellerangaben verwendet. Einzige Modifikationen waren ein zu Beginn durchgeführter Proteinase K Verdau für 2 Stunden bei 50°C im Schüttler (750 rpm). Des Weiteren wurden die Säulen mit 2 x 30 μ l HPLC-H₂O eluiert, um 2 Durchflussproben pro Ansatz zu erhalten.

2.2.10.3 Amplifikation mittels PCR

Mittels PCR wurde eine 311 bp lange Nukleotidsequenz amplifiziert, welche die hypervariablen Regionen der 16S rRNA flankiert. Für jeden Ansatz wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Primer verwendet. Jeder Amplifikationsansatz von 25 μ l Endvolumen, wurde mit der Phusion[®] Hot Start DNA-Polymerase von Finnzymes nach Standardprotokoll durchgeführt.

Der Ansatz für die RT-PCR setzte sich wie folgt zusammen (25 μ l Ansatz):

- 16,25 μ l ddH₂O
- 5 μ l PCR-Puffer (10 x)
- 0,5 μ l dNTPs (10 mM, 2,5 mM each)
- 0,5 μ l Sense Primer (10 μ M)
- 0,5 μ l Antisense Primer (10 μ M)
- 0,25 μ l Taq-Polymerase
- 2 μ l DNA

Die PCR-Bedingungen sind in der folgenden Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tab. 2.10: PCR-Bedingungen für die RT-PCR

Zyklus	Denaturierung 98°C	Primer- Annealing 55°C	Elongation 72°C	Wiederholungen
1	30 sek	---	---	1
2	9 sek	30 sek	30 sek	35
3	---	---	10 min	1
4	Kühlung 4°C		∞	

2.2.10.4 Emulsion-PCR & 454-Lauf

Alle Reaktionen wurden im Duplikat angefertigt und nach der PCR vereint, auf ein 1,5 % iges Agarose-Gel gegeben, um die Qualifikation und Reinheit der Amplifikate sicher zu stellen. Anschließend wurde die Fragmente ausgestanzt und mit dem Quiagen MiniElut Gel Extraktions-Kit extrahiert. Die Quantitätsbestimmung erfolgte unter Verwendung des Quanti-iTTM dsDNA BR Assay Kits im NanoDrop 3300 Fluorometer.

Für die weitere Nutzung der Proben im 454 Sequenziergerät wurden die Proben jeweils auf die gleiche Konzentration eingestellt und in einer gemeinsamen Bibliothek zusammengefasst. Schließlich wurden die gereinigten PCR Produkte mit AmpureBeads (Agencourt, Kalifornien, USA) nochmals gereinigt und ein Teil der Proben wurden nach einer vorher durchgeführten Emulsion-PCR im Agilent Bioanalyzer sequenziert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Anschließend wurden die amplifizierten Proben aus der Emulsion-PCR im 454 GS-FLX unter der Verwendung der Titanium Sequenzier-Reagenzien für die weitere Analyse sequenziert.

(Die Arbeiten für diesen Versuchsteil wurden von Dr. Sven Künzel am MPI für Evolutionsbiologie, Plön durchgeführt.)

2.2.10.5 Auswertung

Die aus der 454 Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurde schließlich mittels MOTHUR v1.22.2 (Schloss 2009) anhand ihrer MID-Zielsequenz sortiert und die Kennzeichnungs-(TAG) und Primersequenzen entfernt. Für die weitere Analyse wurden nur Sequenzen verwendet, die eindeutig anhand ihrer MID und den bakteriellen V2 Primern identifiziert wurden. Die so erhaltenen Sequenzen wurden schließlich wie folgt gefiltert: Im Durchschnitt mussten mind. 35 Basenpaare in einer Sequenzlänge von 50 Basenpaaren übereinstimmen, wobei eine Länge von mind. 250 Basenpaaren berücksichtigt wurde, wobei Homopolymere, sprich gleiche aufeinanderfolgende Basen, nur bis zu einer Länge von 8 bp berücksichtigt wurden. Die gefilterten Sequenzen wurden schließlich mittels der Silva Reference Database abgeglichen (Pruesse et al. 2007) und unter Verwendung der

Standardbedingungen des kmer Algorithmus in MOTHUR. Sequenzen, die kein Alignment vorweisen konnten, wurden aus der Analyse entfernt.

Die Sequenzen wurden unter der Verwendung des Befehls „classify.seqs“ in MOTHUR nach bakteriellen Taxa unter Verwendung der Silva Reference Database und der zugehörigen Taxonomie geordnet. Die daraus erhaltenen Ergebnisse wurden dann mittels der R-Statistik v.2.13.1 (R Development Core Team 2010) graphisch dargestellt.

(Die Auswertung der Daten wurden von Dr. Fabian Staubach von der Stanford Universität, Kalifornien durchgeführt.)

Das gesamte Projekt um die 454 Sequenzierung wurde in Kooperation mit Prof. John Baines vom MPI für Evolutionsbiologie, Plön bzw. der IEM am UKSH Kiel ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Orale Infektion und ektopische Expression als Auslöser einer intestinalen Immunantwort

3.1.1 Nachweis der oralen Aufnahme der Bakterien und ihrer immunaktivierenden Wirkung

Für die Charakterisierung der Immunreaktion des Darms adulter Weibchen der Taufliege *Drosophila melanogaster* war es zunächst notwendig, ein stabiles System zur oralen Infektion der Tiere zu etablieren. Das Hauptproblem hierbei ist, dass adulte Tiere, im Gegensatz zu den Larvenstadien, nicht mehr so viel Nahrung zu sich nehmen und die Infektionen demzufolge weniger effektiv erfolgen. Wie bereits unter 2.2.3 beschrieben, wurden die Infektionsversuche in mit normalem Medium befüllten Röhrchen durchgeführt, welche mit einem bakteriengetränkten Filterpapier beschichtet wurden. Auf diese Weise wurde den Fliegen über die Geruchswahrnehmung vorgetäuscht „normales“ Futter zu sich zu nehmen. Um einen gelungenen Versuchsaufbau und die orale Aufnahme der Bakterien zu beweisen, wurde in diesem ersten Experiment eine Infektion mit einem grün-fluoreszierenden Bakterium *Serratia marcescens::GFP* durchgeführt, da so mittels der Fluoreszenzmikroskopie eine Darstellung der Bakterien im Lumen der präparierten Därme möglich war. In Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse zur Bakterienaufnahme dargestellt. In [A-C] ist jeweils eine Übersichtsaufnahme eines präparierten Darms gezeigt. Bereits hier sieht man ein starkes Fluoreszenzsignal in einem Bereich des Epithels, welcher in [D-F] vergrößert dargestellt ist. Der weiße Pfeil in [F] markiert die grün-fluoreszierenden Bakterien im Darmlumen. Des Weiteren ist auffällig, dass die umliegenden Epithelzellen ebenfalls grün fluoreszieren (roter Pfeil), was für einen Befall der Enterozyten mit den GFP-gekoppelten Bakterien spricht. Letztendlich zeigen diese Ergebnisse, dass die orale Infektion erfolgreich war.

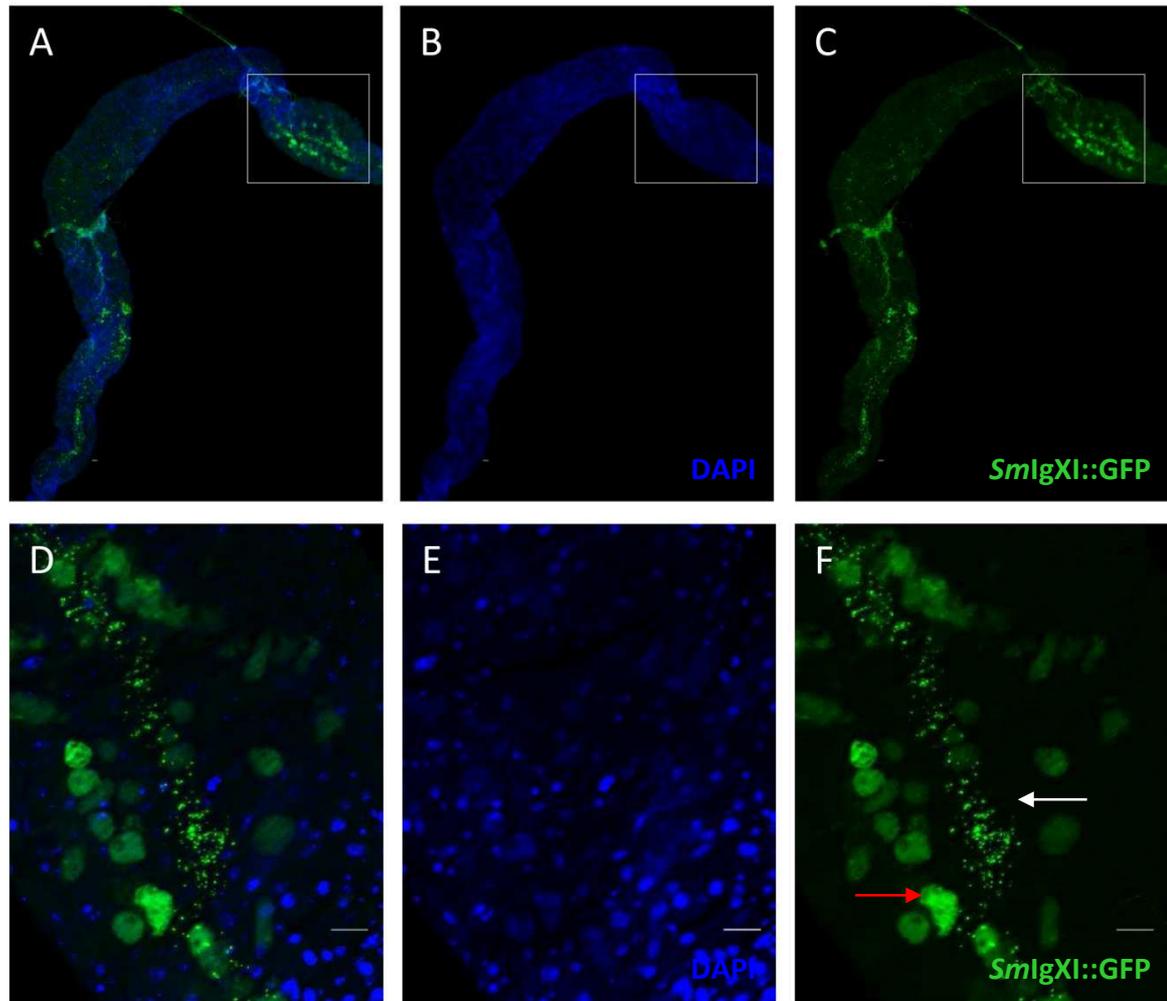


Abb. 3.1: **Orale Infektion von w^{1118} mit *Sm IgXI-GFP* zur Überprüfung der Bakterienaufnahme.** [A-C] Übersicht des Mitteldarms nach einer 24 stündigen oralen Infektion. In [D-F] ist der markierte Bereich vergrößert dargestellt. Zu erkennen sind zum einen die Bakterien im Darmlumen (weißer Pfeil) und bereits infizierte Enterozyten im Darmepithel (roter Pfeil). Der Messbalken entspricht 20 μm .

In den sich anschließenden Experimenten zur oralen Infektion sollte ihre Auswirkung auf die Immunantwort im Darmepithel der Fliegen untersucht werden. Hierfür wurden sog. GFP-Promotorlinien verwendet, die unter der Promotoraktivität eines antimikrobiellen Peptidgens (AMP) das grün-fluoreszierende Protein (GFP), exprimieren. Aus diesem Grunde wurde in den weiteren Versuchen auf die Verwendung des *Serratia marcescens::GFP* Stammes verzichtet und der Stamm *Serratia marcescens IgXI* eingesetzt. Somit konnte sichergestellt werden, dass es sich bei dem detektierten GFP-Signal ausschließlich um eine Aktivierung des entsprechenden Promotors handelt. Es wurden unterschiedliche AMP-Promotorlinien untersucht, exemplarisch sind in Abbildung 3.2 und 3.3 die Aufnahmen nach erfolgter 24-stündiger Inkubation mit der Bakterienlösung zweier derartiger Linien gezeigt. Die beiden Linien unterscheiden sich in den Regionen der lokalen Immunantwort im Darmepithel der Tiere. In 3.2 zeigt die Infektion der Defensin-Promotorlinie eine deutliche Expression in den Enterozyten, wie in [D-F] bzw. vergrößert

in [G-I] dargestellt. Zum Beweis, dass es sich tatsächlich um eine infektionsabhängige Antwort handelt, sind in [A-C] die korrespondierenden Kontrollen dargestellt. Die Kontrolltiere wurden stets gleich behandelt, lediglich wurden sie nur mit dem Lösungsmedium der Bakterien, in 5%iger Saccharose, gefüttert. Es ist hier kein verstärktes GFP-Signal zu sehen, d.h. der Defensin-Promotor zeigt keine gesteigerte Aktivität. Dieses Ergebnis unterstützt die erfolgreiche Umsetzung des Versuchsaufbaus, denn es wird deutlich, dass der Nahrungsmittelwechsel keinen Einfluss auf die Immunreaktion im intestinalen Gewebe der Tiere hat.

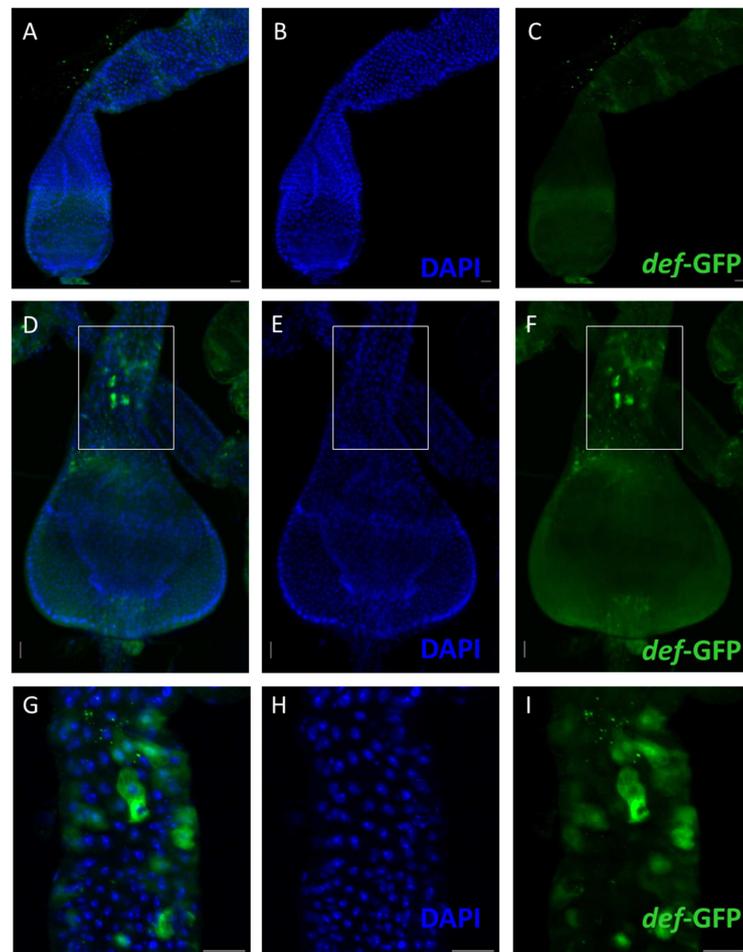


Abb. 3.2: Die orale Infektion mit *Serratia marcescens* führt zur Aktivierung von antimikrobiellen Peptiden I. Dargestellt sind Därme von Weibchen einer defensin-GFP-Linie. In [A-C] ist die Kontrolle gezeigt, es kommt zu keiner GFP-Expression. In [D- F] hingegen sieht man nach einer 24 stündigen oralen Infektion mit Sm IGXI eine GFP-Expression in einigen Enterozyten. Dieser markierte Bereich ist in [G-I] vergrößert dargestellt. Der Messbalken entspricht jeweils einer Größe von 20 μm .

Anders als die Defensin-Promotorlinie verhält sich die in Abbildung 3.3 gezeigte Attacin-Promotorlinie. Die Attacin-Aktivität ist auf den Proventrikulus beschränkt, wie in [D-F] deutlich zu erkennen, so zeigt lediglich eine spezifische Zellpopulation in diesem vorderen Bereich des Darms eine antimikrobielle Antwort auf die Infektion, welcher sich ringförmig darstellt. Auch hier zeigen die Kontrollen [A-C] keine gesteigerte Promotoraktivität.

Mit Hilfe dieser einfachen Versuche konnte also deutlich gemacht werden, dass eine orale Infektion zu einer gesteigerten Immunabwehr im Darmepithel der Taufliège kommt und, dass diese Abwehr Regionen-spezifisch zu sein scheint.

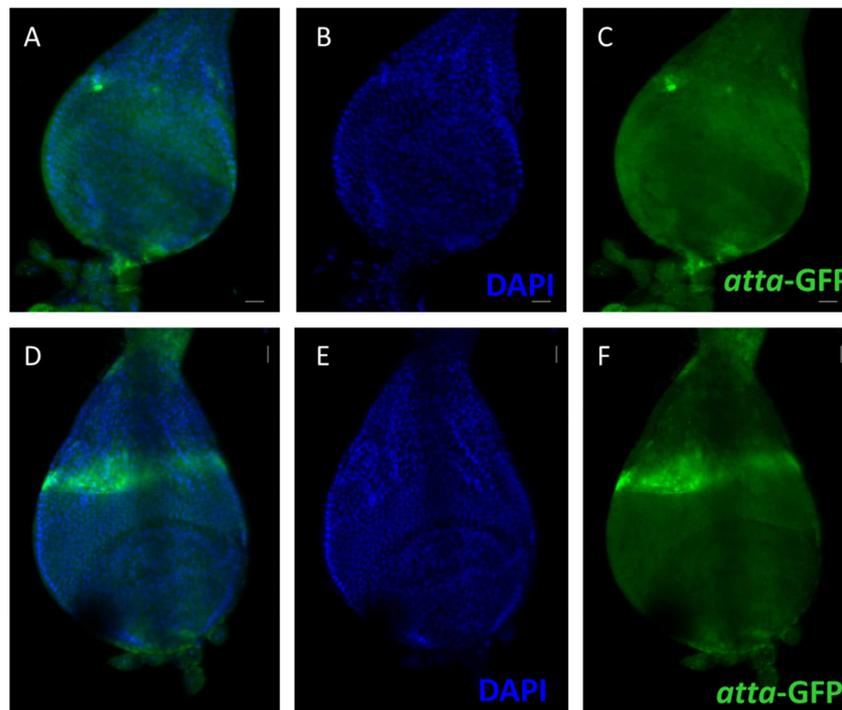


Abb. 3.3: Die orale Infektion mit *Serratia marcescens* führt zur Aktivierung von antimikrobiellen Peptiden II. Dargestellt sind Därme von Weibchen einer attacin-GFP-Linie. In [A-C] ist die Kontrolle gezeigt, es kommt zu keiner GFP-Expression. In [D- F] hingegen sieht man nach einer 24 stündigen oralen Infektion mit Sm IGXI eine GFP-Expression in einigen Zellen des Proventrikulus, welcher sich ringförmig im mittleren Bereich darstellt.

Um Näheres zur induzierten Genexpression über die Infektion im Darm der Tiere zu erfahren, wurde der Labor-Wildtyp w^{1118} unter den gleichen Bedingungen infiziert, um eine Analyse mittels der DNA Microarray Technologie durchzuführen. Hierbei wurde die isolierte RNA aus dem Darmgewebe infizierter Weibchen mit denen nicht infizierter verglichen und die verstärkt transkribierten Gene identifiziert. Bei einem solchen Screening kommt es häufig zu einer großen Anzahl regulierter Gene, in diesem Fall

wurden unter Infektionsbedingungen 1076 Gene mindestens 1,5-fach verstärkt reguliert als in dem Gewebe der Kontrollgruppe. Um einen Überblick über die immunrelevanten Gene unter diesen Bedingungen zu erhalten, wurde die ermittelte Genliste mit den Genen bereits bekannter Listen von *Gregorio et al, 2002* und *Buchon et al, 2009* verglichen, wie im Venn-Diagramm (Abb. 3.4) dargestellt. Bei der Liste von *Gregorio et al.* handelt es sich um Gene, die in der Immunabwehr eine Rolle spielen, während es sich bei der Liste von *Buchon et al.* um eine infektionsspezifische Auflistung handelt. Aus diesem Grunde ist die Schnittmenge der beiden bereits publizierten Listen relativ gering. Auch die Schnittmengen der hier durchgeführten Microarray-Analyse nach oraler Infektion im Vergleich zu den beiden publizierten Listen sind mit 0,1% ungewöhnlich niedrig.

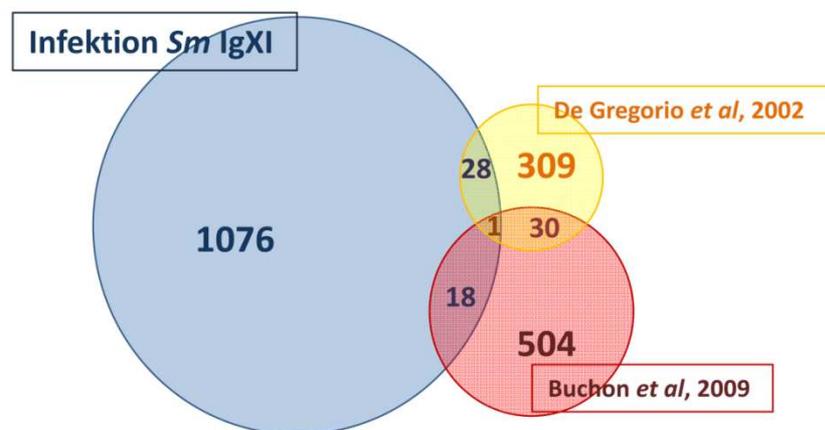


Abb. 3.4: Venn-Diagramm – Vergleich der nach Infektion hoch regulierten Gene im Darm von w^{1118} mit den regulierten Immungenlisten von Gregorio & Buchon.

Die wichtigsten immunrelevanten Gene, sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Es sind unterschiedlichste Gene des Toll-Signaltransduktionsweges in ihrer Expression verstärkt, zu ihnen zählen zum einen die löslichen mustererkennenden Rezeptoren (*pattern recognitions receptors, PRRs*) PGRP-SA (CG11709) und PGRP-SC2 (CG14745) als auch der Ligand Spätzle 4 (CG14928), welcher aktivierend auf den membranständigen Toll-Rezeptor wirkt. Eine weitere wichtige Komponente in der Aktivierungskaskade stellt das zytoplasmatische Protein Cactus (CG5848) dar, es inhibiert die Transkriptionsfaktoren Dorsal und DIF. Kommt es nun zur Degradation von Cactus erfolgt die Translokation der Transkriptionsfaktoren und anschließend für die Synthese von antimikrobiellen Peptiden wie z. B. Drosomycin (CG10810), Drosomycin-5 (CG10812) und auch Defensin (CG1385), welche ebenfalls laut Array-Analyse verstärkt exprimiert werden. Neben diesen klassischen Komponenten der Toll-Signalkaskade kommt es außerdem zur verstärkten

Regulation anderer immunsteuernder Elemente wie der Melanization-Protease 1 (CG1102) und der Superoxid-Dismutase (CG11793), welche beide eine Rolle in der Aktivierung der Phenoloxidase erfüllen und zu einer Einkapselung bzw. Tötung eingedrungener Bakterien führen können. Auch die Matrix Metalloprotease 2 (CG1794) steht für eine Aktivierung des Immunsystems nach erfolgter Infektion mit Pathogenen.

Tab. 3.1: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den den Därmen des Wildtyps *w¹¹¹⁸* nach einer 24 stündigen Infektion mit *Serratia marcescens* IgXI.

CG Nummer	Gen-Name
10610	ECSIT
10810	Drosomycin
10812	Drosomycin-5
1102	Melanization Protease 1
11709	Peptidoglycan recognition protein SA
1385	Defensin
14745	PGRP-SC2
14928	spatzle 4
1794	Matrix metalloproteinase 2
4006	Akt1
5848	Cactus
1063	Inositol 1,4,5,-tris-phosphate receptor
11621	Phosphatidylinositol 3 kinase 68D
11124	secretory Phospholipase A2
11793	Superoxide dismutase

3.1.2 Welche Signaltransduktionswege sind für die Aktivierung der unterschiedlichen Zelltypen im Darm verantwortlich?

Nachdem nun mittels der ersten Experimente deutlich gezeigt wurde, dass über die orale Infektion eine Aktivierung des Immunsystems im Darmepithel von *Drosophila* möglich ist, stellt sich die Frage nach den Aktivierungsmechanismen und der Abwehrreaktion der einzelnen Zelltypen.

Hierzu wurden ebenfalls orale Infektionsexperimente durchgeführt, in denen Komponenten verschiedener Signalkaskaden überexprimiert wurden. Das in 1.2.5.2 dargestellte binäre Gal4/UAS-Expressionssystem konnte für diese Analysen angewendet werden. Die zu untersuchenden Gene in den verwendeten UAS-Linien waren mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert, d.h. die Translokation konnte hier ebenfalls über ein Fluoreszenzsignal dargestellt werden.

3.1.2.1 Vergleich der Translokation bzw. Aktivierung des IMD- und dFoxO-Signaltransduktionsweges nach oraler Infektion

Zunächst wurde die Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren Relish und dFoxO nach oraler Infektion mittels der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Da es sich bei der Treiberlinie (Gal4) um einen spezifischen Treiber für Enterozyten im Darm der Taufliege handelt, wurden diese spezifisch markiert. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, gibt es deutliche Unterschiede im Translokationsverhalten der beiden Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionsfaktor Relish stellt das klassische Bindeglied für die Aktivierung der Synthese von antimikrobiellen Peptiden über den IMD-Signalweg dar. Jedoch zeigt er nach der oralen Infektion mit dem gramnegativen Bakterium *Serratia marcescens* keine Translokation in den Zellkern, wie in [A-D] dargestellt. Der Transkriptionsfaktor dFoxO hingegen zeigt das entgegengesetzte Bild, es kommt deutlich zu einer gesteigerten Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern der Enterozyten, siehe [E-H].

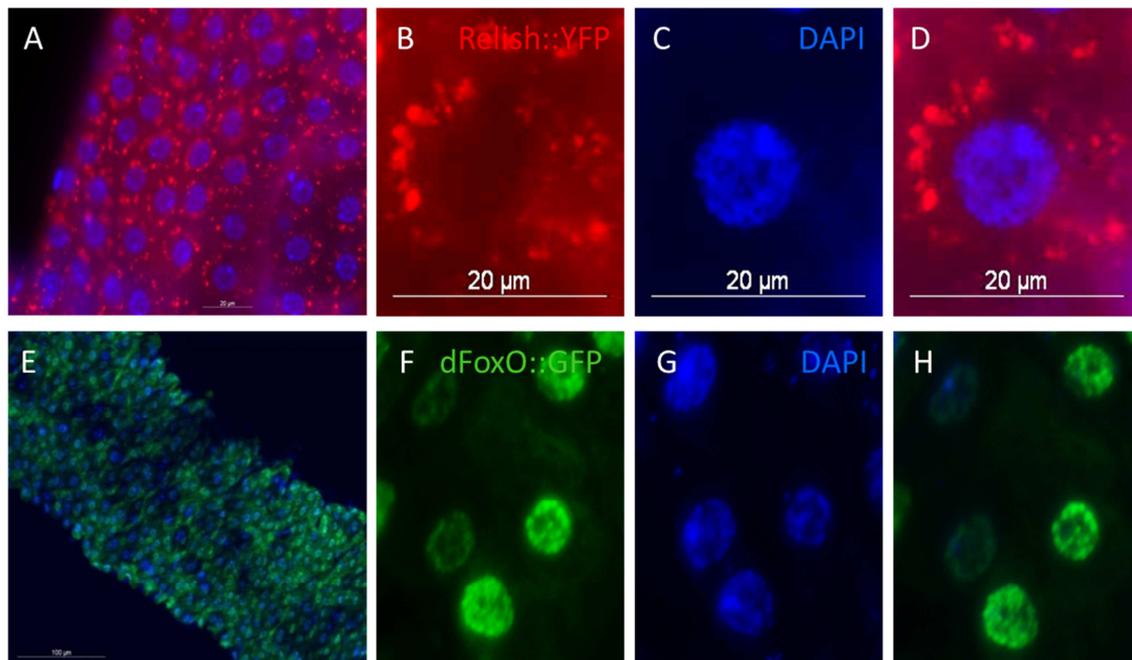


Abb. 3.5: Orale Infektion der F1 Generation der Kreuzungen NP1Gal4 x UAS-Relish-YFP [A-D] und NP1Gal4 x UAS-dFoxO-GFP [E-H] mit *Serratia marcescens*. Nur dFoxO zeigt eine Kerntranslokation nach oraler Infektion.

3.1.2.2 Die orale Infektion führt zur Aktivierung des PLCβ-Signaltransduktionsweges

Eine weitere Möglichkeit der Abwehr nach oraler Infektion erfolgt über die Aktivierung des PLCβ-Signaltransduktionsweges, welcher zu einer Aktivierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen des Darmepithels führt, was eine Abtötung bzw. Inaktivierung von eingewanderten Pathogenen zur Folge hat. Um zu sehen, ob eine solche

Aktivierung der PLC β erfolgt, wurden Infektionsexperimente mit dem fusionierten PLC β -RFP in den Enterozyten durchgeführt. In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse nach 24 stündiger Infektion [D-F] im Vergleich zur Kontrolle [A-C] aufgeführt.

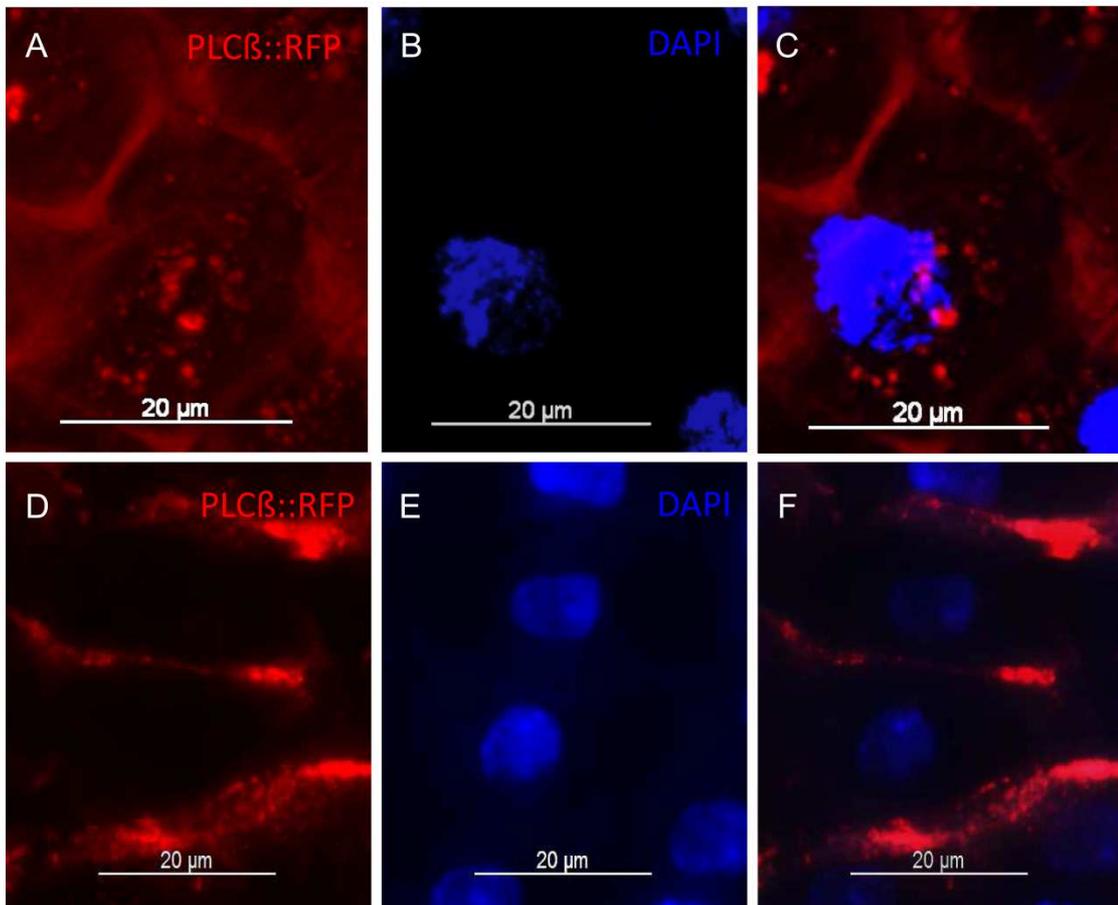


Abb. 3.6: Die Orale Infektion der F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x PLC β -mRFP mit *Serratia marcescens* zeigt eine Rekrutierung des PLC β s zur Zellmembran der Enterozyten. [A-C] zeigt die Kontrolle ohne Infektion, [D-F] zeigt die Situation in den Zellen nach 24 stündiger Infektion mit IgXI.

In den Enterozyten der Kontrolle sieht man deutlich ein Fluoreszenzsignal sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der Zelle. Nach Infektion hingegen, wird die Phospholipase C β zur Zellmembran rekrutiert was einer Aktivierung der nachgeschalteten Kaskade entspricht. Somit wird deutlich, dass auch die Produktion von ROS eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr der Enterozyten im Darm von *Drosophila* spielt.

3.1.2.3 Nachweis der Translokations-abhängigen Immunantwort in den Enterozyten und den Kupferzellen nach Infektion mittels Immunhistochemie im Wildtypen w¹¹¹⁸

Um die bisher dargebrachten Ergebnisse der oralen Infektion zu verifizieren und zu beweisen, dass der dFoxO-Signaltransduktionsweg eine Aktivierung in den Enterozyten erfährt und, um zu erklären welche Rolle der Transkriptionsfaktor Relish als klassisches Bindeglied zur Synthese antimikrobieller Peptide über den IMD-Signalweg zukommt, wurden immunhistochemische Untersuchungen am Wildtypen w¹¹¹⁸ nach oraler Infektion durchgeführt. Dies sollte zeigen, dass eine Aktivierung auch ohne die Verwendung von Überexpressionslinien wie in 3.1.2.1 erfolgt. Anhand einer Zeitreihe mit unterschiedlichen Infektionsperioden sollte außerdem aufgeklärt werden, wann der Effekt der Translokation am stärksten ausgeprägt ist.

Um eindeutig die Unterschiede in der Effektivierung von Relish und dFoxO zu klären, wurden die präparierten Därme gleichzeitig mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und mittels der Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse für das Translokationsverhalten der beiden Transkriptionsfaktoren in den Enterozyten dargestellt. Um aussagen zu können, ob es sich wirklich um eine Kernwanderung handelt, wurden die Zellkerne mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff Hoechst gegengefärbt. Wie sich aus der Abbildung erkennen lässt, zeigte die Kontrolle zum Zeitpunkt 0 [A] keinerlei Translokation beider Transkriptionsfaktoren. Das gleiche Bild zeigt sich nach einer Inkubation mit den Bakterien nach 2 [B], 4 [C] bzw. 6 [D] Stunden. Erst nach einer Infektionsdauer von 8 Stunden lässt sich eine Translokation von dFoxO in den Kern der Enterozyten nachweisen [E], wie durch die weißen Pfeile in [E''] gekennzeichnet. Um dieses Ergebnis eindeutiger darzustellen, zeigt der Ausschnitt [G] einige Zellen in Vergrößerung. Auch hier ist die Translokation von dFoxO mit weißen Pfeilen gekennzeichnet [G''], außerdem beweist die Kolo-kalisation des Kernfarbstoffes Hoechst und des grün-fluoreszierenden α -dFoxO-Antikörpers in [G] eine eindeutige Aktivierung von dFoxO durch die orale Infektion mit dem Bakterium *Serratia marcescens*. Es handelt sich allerdings nicht um eine dauerhafte Aktivierung [F] .

Im Gegensatz zu dFoxO zeigt der Transkriptionsfaktor Relish keine gesteigerte Neigung einer Kerntranslokation. Zu keinem Zeitpunkt kommt es zu einer Translokation in den Kern [A'' – G'']. Diese Ergebnisse entsprechen also denen aus 3.1.2.1, es kommt zu keiner Aktivierung des IMD-Signaltransduktionsweges in den Enterozyten nach einer oralen Infektion der Fliegen.

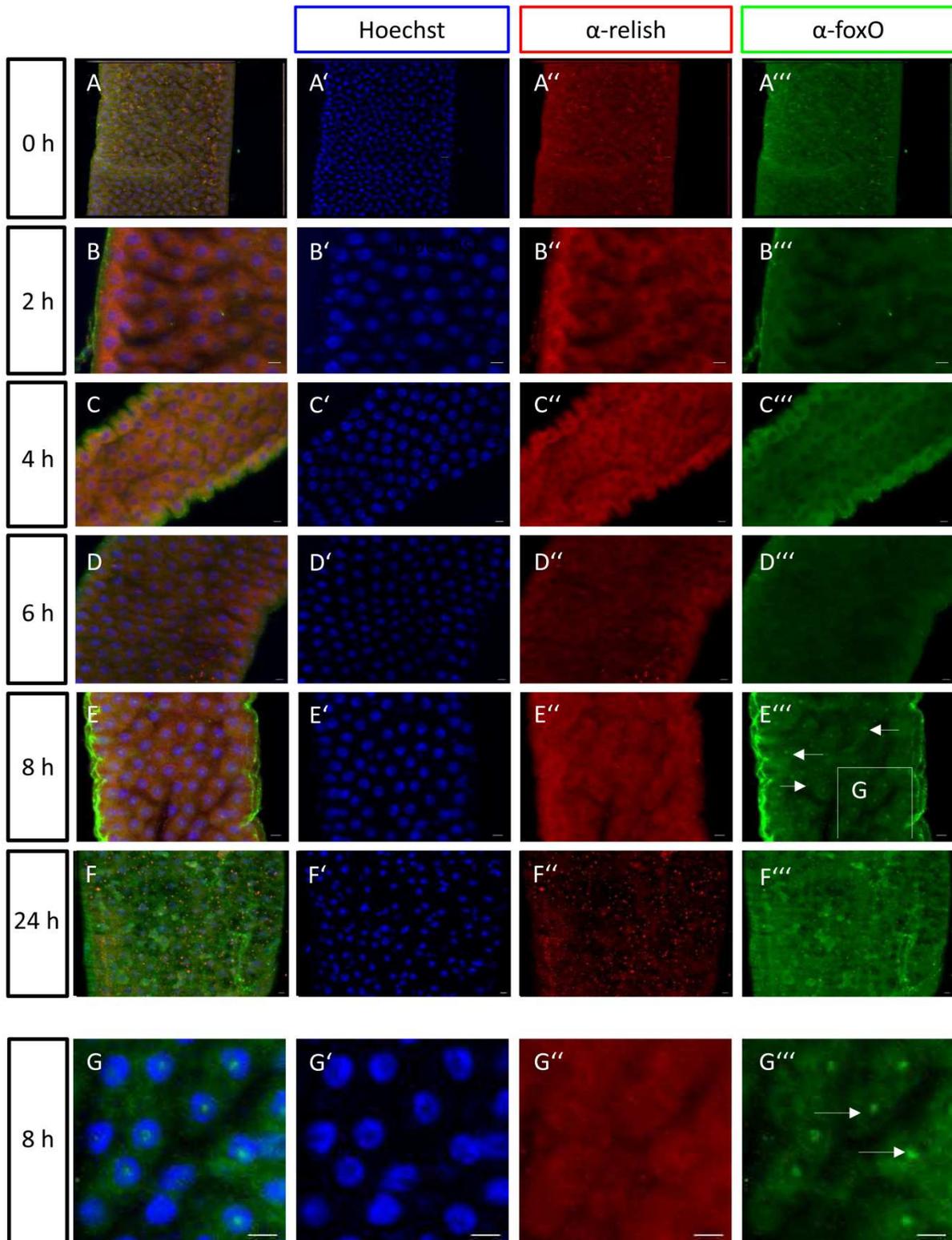


Abb. 3.7: Immunhistochemischer Nachweis der Relish- bzw. dFoxO-Translokation in den Enterozyten nach unterschiedlichen Zeitpunkten oraler Infektion mit *Serratia marcescens*. In [A-E] sind die Ergebnisse nach unterschiedlicher Infektionsdauer aufgezeigt. In [G] ist der in [D'''] markierte Bereich vergrößert dargestellt, da hier eine Translokation von dFoxo nachgewiesen werden konnte. Der Messbalken entspricht jeweils 20 μ m.

Allerdings konnte bei der Untersuchung des Darmepithels mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ein weiterer Zelltyp identifiziert werden, bei dem es zu einer Translokation eines der beiden Transkriptionsfaktoren kam. Hierbei handelte es sich um die Kupferzellen, die nur in einem definierten Bereich des Mitteldarms lokalisiert sind. Wie in Abbildung 3.8 gezeigt, verhalten sich die beiden Transkriptionsfaktoren genau gegensätzlich. Es konnte kein grün-fluoreszierendes Signal in den Kernen der Kupferzellen detektiert werden, d.h. dFoxO zeigt keine Translokation in diesem Zelltypen. Jedoch zeigt Relish eine eindeutige Translokation. Anders als in den Enterozyten ist erstmals nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden mit dem Bakterium *Serratia marcescens* eine Kernwanderung des Transkriptionsfaktors zu beobachten wie in [D''] anhand von weißen Pfeilen gekennzeichnet. In [D] sieht man auch hier eine Kolokalisation mit dem DNA-Farbstoff Hoechst, was die Translokation eindeutig beweist. Des Weiteren zeigt sich deutlich, dass Relish sich im Aktivierungsverhalten von dFoxO unterscheidet, denn auch nach einer Infektionsdauer von 8 [E] bzw. 24 [F] Stunden, verbleibt Relish im Zellkern der Kupferzellen.

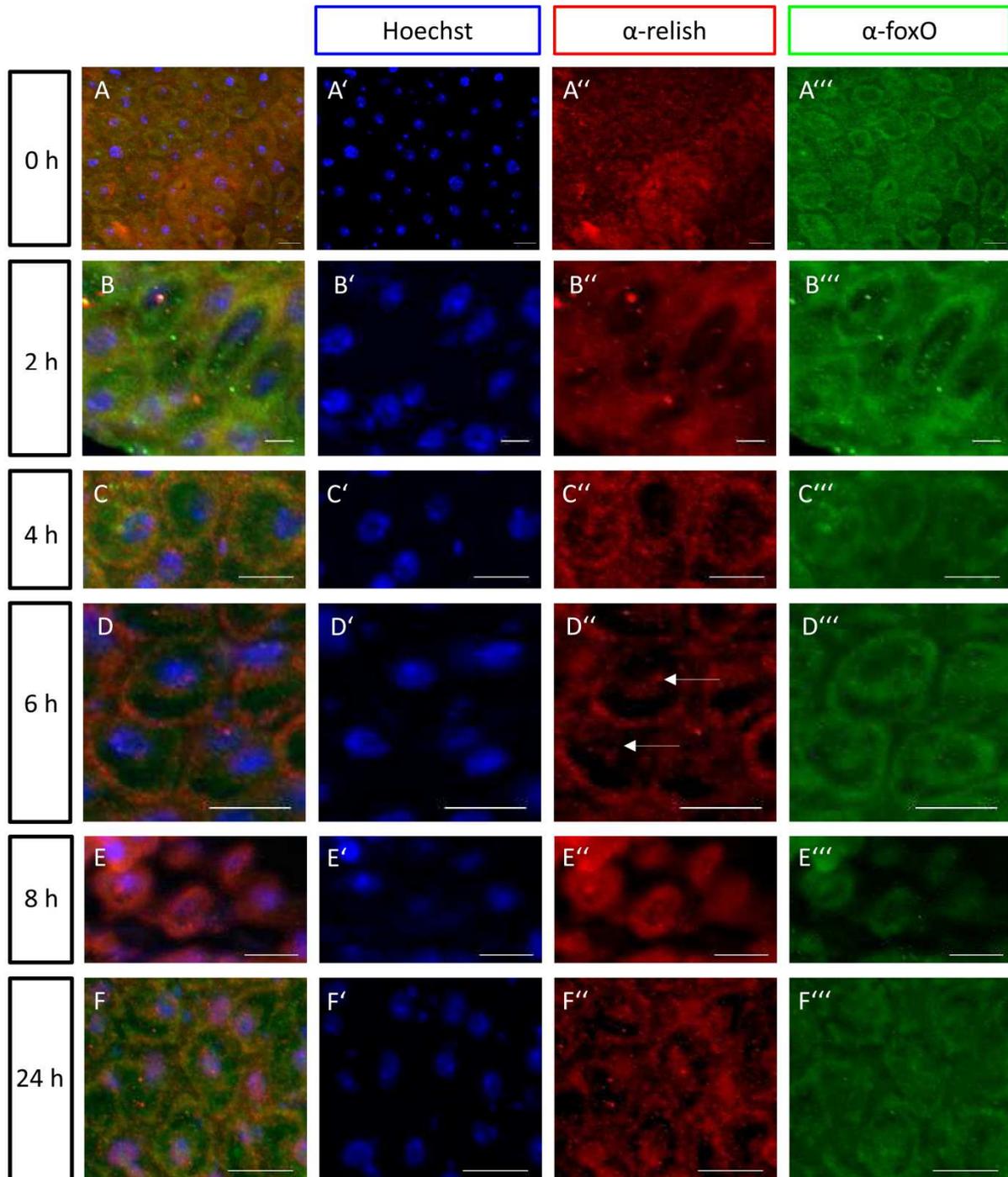


Abb. 3.8: Immunhistochemischer Nachweis der Relish- bzw. dFoxo-Translokation in den Kupferzellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten oraler Infektion mit *Serratia marcescens*. Es zeigt sich sowohl nach 6 Stunden [C''], aber insbesondere nach 24 Stunden [E''] eine Translokation von Relish (weiße Pfeile). Der Messbalken entspricht jeweils einer Größe von 20 μ m.

Um das Verhalten der beiden Transkriptionsfaktoren zu verifizieren, wurden weitere Experimente mit Hitzeschock-induzierbaren Überexpressionslinien durchgeführt, wie im Folgenden unter 3.1.2.4 beschrieben.

3.1.2.4 Die Aktivierung des IMD- und des dFoxO-Signaltransduktionsweges durch hitzeschockinduzierte Überexpression von *pgrp-le* und *dfoxo* in den Enterozyten

Im Anschluss an die durchgeführten Infektionsexperimente und die damit einhergehenden Ergebnisse stellte sich die Frage, über welche Signalkaskade die Immunantwort in den Enterozyten des Darmepithels gesteuert wird und inwieweit eine gesteigerte Aktivität von immuninduzierten Genen wie z.B. antimikrobiellen Peptiden gesteuert wird.

Um dies zu untersuchen, wurde das TARGET-Expressionssystem eingesetzt, das in 1.2.5.2 erläutert wurde. In den folgenden Untersuchungen war es somit möglich, die Überexpression spezifisch unter der Verwendung der NP1Gal4;tubGal80-Treiberlinie in den Enterozyten zu steuern.

Damit sichergestellt werden konnte, dass es tatsächlich nur unter Hitzeschockbedingungen zu einer Überexpression des gewünschten Gens kommt, wurde die Treiberlinie zunächst mit der Responderlinie UAS-Cameleon::GFP gekreuzt. Bei Gelingen sollte es nur zu einem GFP-Fluoreszenzsignal kommen, wenn es zu einer Aktivierung des Gens nach einer Hitzeschockbehandlung kommt. Wie in Abbildung 3.9 sichtbar, funktioniert das System wie erwartet. Die Kontrollen bei einer Haltung von 17°C zeigen kein GFP-Signal in den Enterozyten, hingegen kommt es nach einer 24-stündigen Inkubation bei 29°C zu einer Expression des gewünschten Gens, was sich anhand des auftretenden GFP-Signals erklären lässt. Da auch diese Experimente grundsätzlich mit verpaarten Weibchen der F1-Generation durchgeführt werden sollten, wurden trotzdem beide Geschlechter für diesen Treibertest heran gezogen, um sichergehen zu können, dass beide Geschlechter der F1-Generation gleich reagieren. Wie sich anhand der Abbildung erkennen lässt, gibt es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Expressionsverhalten; die Ergebnisse von Männchen [A,C] und Weibchen [B,D] stimmen weitgehend überein. Somit konnten die Weibchen der F1-Generation für die weiteren Experimente verwendet werden.

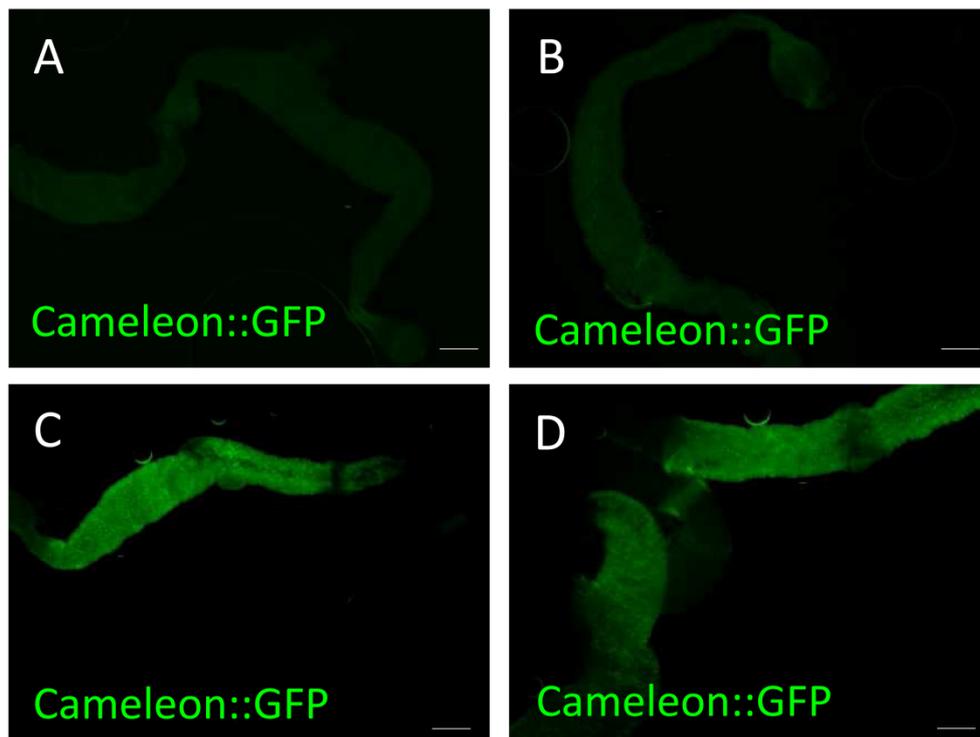


Abb. 3.9: Test zum Nachweis der induzierbaren Genexpression nach 24 stündigem Hitzeschock. Dargestellt ist die F1-Generation der Kreuzung *NP1Gak4;tubGal80 x Cam2.1*. In [A] und [B] sind die Kontrollen bei 17°C dargestellt, in [C] und [D] sieht man die in den Enterozyten-spezifische GFP-Expression nach 24 stündiger Inkubation bei 29°C. Es zeigen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen Männchen [A,C] und Weibchen [B,D]. Der Messbalken entspricht einer Größe von 20 µm.

Nach erfolgreicher Prüfung der Hitzeschock-induzierbaren Treiberlinie folgte die Untersuchung des IMD- und dFoxO-Signalweges unter Verwendung des ternären Expressionssystems. Hierzu wurden die beiden Überexpressionslinien *UAS-pgrp-le* und *UAS-foxoTM* mit der Enterozyten-spezifischen *Gal4;tubGal80*-Linie gekreuzt und die verpaarten Weibchen für die Darmpräparation herangezogen. Mittels der quantitativen Realtime-PCR wurde auch hier zunächst überprüft, ob es zu einer gesteigerten Genexpression von *pgrp-le* bzw. *dfoxo* nach 24-stündiger Inkubation bei 29°C kommt.

Die in Abbildung 3.10 dargestellten Säulendiagramme beweisen eindeutig, dass es zu einer gesteigerten Expression der beiden induzierten Gene im Darmepithel der Fliegen kommt. In [A] ist die Überexpression des löslichen Musterkennungsrezeptors PGRP-LE nach Induktion bei 29°C im Vergleich zu den Kontrollen bei 17°C dargestellt. Es kommt zu einer ca. 100-fach gesteigerten Expression des Rezeptors. Auch die bei 29°C induzierten Därme der *UAS-foxoTM*-Linie zeigen eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors um den Faktor 5 im Vergleich zur Kontrolle [B].

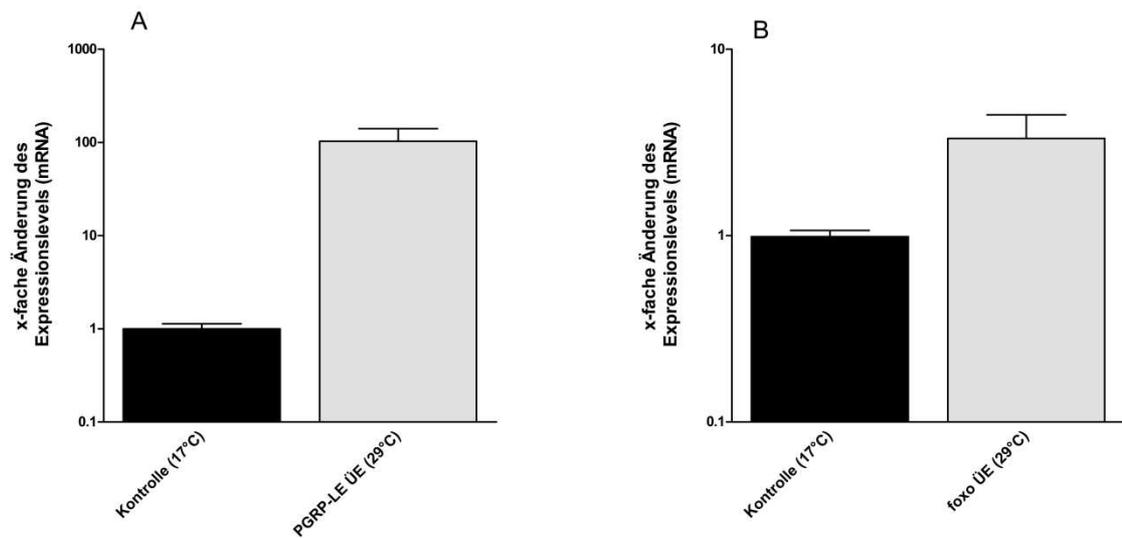


Abb. 3.10: Nachweis über die induzierte Überexpression von *pgrp-le* und *dfxo* nach 24 stündiger Hitzeschockinduzierung. Bei beiden Abbildungen handelt es sich jeweils um die F1-Generation der Kreuzungen mit *NP1Gal4; tubGal80*. In [A] wurde der Transmembranrezeptor PGRP-LE aktiviert in [B] der Transkriptionsfaktor *foxO*. In beiden Fällen ist die Hitzeschock-induzierte Überexpression (24 Stunden bei 29°C) im Vergleich zur Kontrolle (17°C) dargestellt.

Da es in beiden Linien eindeutig zu einer gesteigerten Genaktivität kommt, wurden Microarrays zum Screening der Gesamtgenaktivität im Transkriptom beider F1-Generationen durchgeführt und wie schon bei den Infektionsexperimenten mit den bereits publizierten immunregulierten Genlisten von *Gregorio et al.* und *Buchon et al.* verglichen.

Der im Venn-Diagramm (*Abb. 3.11*) grün dargestellte Kreis repräsentiert die hoch regulierten Gene nach erfolgter Hitzeschockinduktion des PGRP-LEs. Insgesamt wurden 341 Gene mindestens 1,5-fach stärker exprimiert als in der Kontrolle. Ähnlich wie bereits bei der oralen Infektion sind die Schnittmengen im Vergleich zur Gesamtgenaktivität relativ gering.

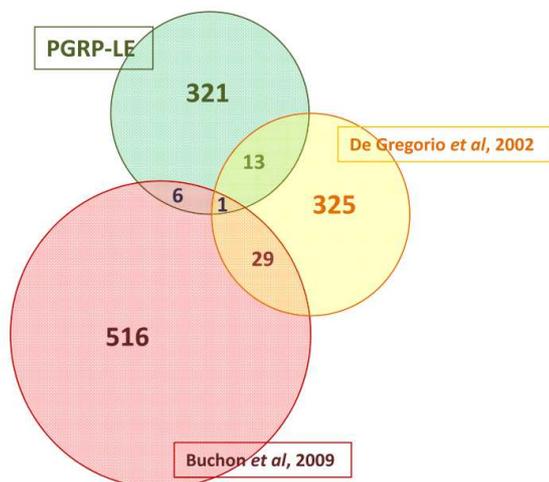


Abb. 3.11: Venn-Diagramm - Vergleich der durch *pgrp-le* Überexpression induzierten höher exprimierten Gene mit bereits bekannten immunrelevanten Genen. Es wurden jeweils drei biologische Replikate für Induktion und Kontrolle angefertigt, dargestellt sind hier die 1,5-fach verstärkt exprimierten Gene. Die Liste wurde mittels des Programms Acuity 4.0 erstellt.

Jedoch lassen sich unter den gemeinsam aktivierten Genen aller Listen einige Gene herausfinden, die eine eindeutige Rolle in der Immunabwehr einnehmen. Zunächst ist zu erwähnen, dass der Rezeptor PGRP-LE (CG8995) selbst auch anhand der Arraydaten eine gesteigerte Expressionsrate zeigt. Des Weiteren zeigen die beiden für die antimikrobiellen Peptide Diptericin und Drosomycin-6 kodierenden Gene CG12763 und CG32268 eine gesteigerte Expressionsrate. Daraus lässt sich schließen, dass es tatsächlich zu einer Aktivierung der IMD-Signalkaskade über den löslichen Musterkennungsrezeptor PGRP-LE kommt. Zwei weitere Gene von Interesse sind noch in Tabelle 3.2 aufgeführt, bei ihnen handelt es sich um Metallothionein B (CG4312) und D (CG33192), welche neben ihrer Stress-induzierten Aktivität vermutlich eine wichtige Funktion in der Abwehr über Reaktive Sauerstoffspezies haben.

Tab. 3.2: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung *NP1Gal4;tubGal80 x UAS-PGRP-LE*

CG Nummer	Gen-Name
33192	Metallothionein D
12763	Diptericin
32268	Drosomycin-6
4312	Metallothionein B
8995	PGRP-LE

Ferner wurden parallel Microarrays mit den Därmen der F1-Generation der Kreuzung *NP1Gal4;tubGal80 x UAS-foxOTM* angefertigt. In Abbildung 3.12 ist ein Venn-Diagramm der hoch regulierten Gene nach einer Überexpression von *dfoxO* im Darmepithel im Vergleich zu den immuninduzierten Genen nach den Listen von *Gregorio et al.* und *Buchon et al.* demonstriert.

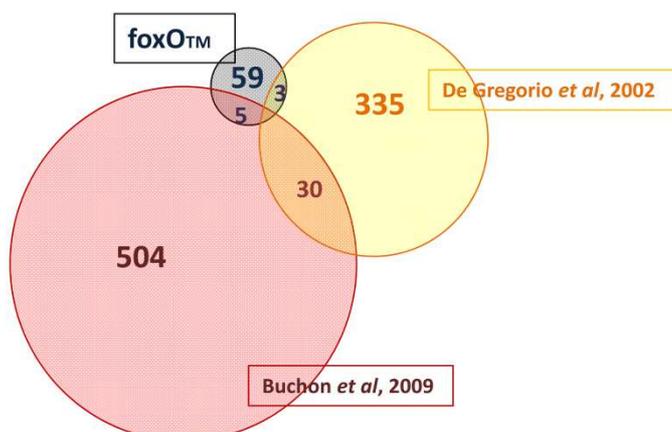


Abb. 3.12: Venn-Diagramm – Vergleich der durch *foxoTM* Überexpression induzierten stärker exprimierten Gene mit bereits bekannten immunrelevanten Genen. Es wurden jeweils drei biologische Replikate für Induktion und Kontrolle angefertigt, dargestellt sind hier die 1,5-fach verstärkt exprimierten Gene. Die Liste wurde mittels des Programmes Acuity 4.0 erstellt.

In dem Fall der Überexpression

des Transkriptionsfaktor kodierenden Gens *dfoxo* wird nur ein relativ kleiner Genpool von 67 Genen verstärkt exprimiert. Die Schnittmengen mit den bereits bekannten Genen der Immunabwehr, d.h. den allgemein induzierten Immungenen nach *Gregorio et al.* bzw. die durch Infektion induzierten Genen nach *Buchon et al.* sind auch hier relativ klein. Jedoch lässt sich auch hier eine kleine Gruppe von Genen identifizieren, die bei der Induktion der Immunabwehr über dFoxO eine tragende Rolle einnehmen, wie in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.3: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung *NP1Gal4;tubGal80 x UAS-foxOTM*

CG Nummer	Gen-Name
10371	PTEN-like phosphatase
10913	Serin Protease Inhibitor 6
32042	Peptidoglycan Recognition Protein LA
32282	Drosomycin-4

Zunächst ist zu erwähnen, dass es zu einer gesteigerten Expression des für die PTEN-like Phosphatase kodierenden Gens CG10371 kommt. PTEN ist in sofern von Bedeutung, dass es den natürlichen Inhibitor von dFoxO, die Kinase Akt1, dephosphoryliert und somit die Translokation des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Zellkern bedingt. Die gesteigerte Expression von PTEN beweist dementsprechend eine verstärkte Expression von *dfoxO* und zeigt somit deutlich, dass die Hitzeschock-induzierte Überexpression des Transkriptionsfaktors gelungen ist. Anhand der Gene, kodierend für den Mustererkennungsrezeptor PGRP-LA und das Antimikrobielle Peptid Drosomycin-4 wird deutlich, dass die Überexpression von *dfoxo* zu einer Aktivierung der Immunreaktion im Darmgewebe führen kann.

Interessant ist ebenfalls, dass die verstärkte Produktion von dFoxO zu einer Inhibierung bzw. zu einer erniedrigten Regulation spezifischer Gene anderer Immunsignalkaskaden führen kann. Repräsentiert werden diese Gene in der unten aufgeführten Tabelle 3.3.

Tab. 3.4: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten herunter regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung *NP1Gal4;tubGal80 x UAS-foxOTM*

CG Nummer	Gen-Name
5848	Cactus
7393	p38b
8896	18 wheeler
8913	Immune-regulated catalase

Das für das Protein Cactus kodierende Gen CG5848 wurde bereits bei der Microarray-Analyse nach oraler Infektion unter 3.1.1 erklärt. Es handelt sich um den natürlichen Inhibitor der Transkriptionsfaktoren Dorsal und DIF, die über den Toll-Signalweg zu einer Produktion antimikrobieller Peptide führen. Möglicherweise kommt es durch die

Überexpression von *dfoxO* zu einer Interaktion der beiden Signalwege. Andere Komponenten wie z.B. 18 wheeler (CG8896) führen in der Regel nach oraler Infektion als Komponente der humoralen Immunabwehr zu der Synthese von antimikrobiellen Peptiden. Des Weiteren scheint es durch die Überexpression von *dfoxo* Auswirkungen auf weitere Immunsignalkaskaden wie den JNK-Pathway zu haben, der über MAP-Kinasen aktiviert wird, p38b (CG7393) spielt hier eine entscheidende Rolle in der Aktivierung. Die *Immune-regulated Catalase* (CG8913) bestimmt besonders bei der Interaktion zwischen Wirt und Pathogenen eine Schlüsselfunktion in der Immunaktivierung.

Um die mit der Microarray-Technologie ermittelten Ergebnisse aus den Überexpressionsexperimenten und dem Infektionsexperiment abschließend zu vergleichen, wurden die hoch und herunter regulierten Genlisten in Venn-Diagrammen einander gegenüber gestellt, wie in Abbildung 3.13 gezeigt.

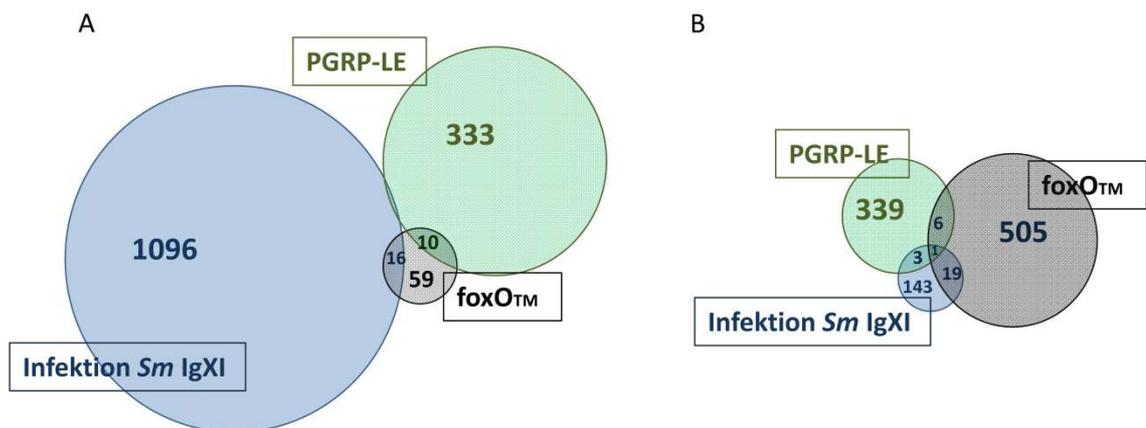


Abb. 3.13: Venn-Diagramm – Vergleich aller immunrelevanten-Arraydaten: In [A] ist der Vergleich der hochregulierten Gene aus der Infektion und den beiden Überexpressionsexperimenten dargestellt, in [B] zum Vergleich die Listen der herunter regulierten Gene.

Es ist deutlich erkennbar, dass auch hier die Schnittmengen der jeweiligen Listen in [A] und in [B] sehr gering sind. Außerdem konnten keinerlei Gene identifiziert werden, die eine einschlägige Funktion in der Vermittlung immunbedingter Signalkaskaden erfüllen. Daher wird hier auf eine Aufzählung der Gene verzichtet, eine vollständige Liste befindet sich im Anhang (A, S. 135 – 165).

Da es sich bei der Microarray-Analyse um ein reines Screening-Verfahren handelt und die erzielten Daten zwar einen Einblick über die Aktivität der Immunabwehr geben, aber

keine wirkliche Aussage über die abschließende Regulation getroffen werden kann, wurden mit vergleichbaren Proben quantitative Realtime-PCRs durchgeführt, in denen die Transkriptmengen der antimikrobiellen Peptide nach erfolgter Überexpression des IMD- bzw. dFoxO Signaltransduktionsweges quantifiziert werden sollten. Die Fragestellung hierbei war, ob es in den Enterozyten zu einer Aktivierung der Abwehr über den IMD-Signalweg kommt oder ob dFoxO einen stärkeren Effekt auf die antimikrobielle Reaktion in diesem speziellen Zelltypus hat, wie bereits nach der oralen Infektion unter 3.1.2.1 und 3.1.2.3 gezeigt werden konnte.

In Abbildung 3.14 sind die relativen Transkriptmengen der unterschiedlichen antimikrobiellen Peptidgene nach erfolgter Induktion über einen 24-stündigen Hitzeschock bei 29°C im Vergleich zu der Kontrolle bei 17°C aufgezeigt. [A] repräsentiert die Daten für die Aktivierung über den IMD-Signalweg mittels der Überexpression des löslichen Mustererkennungsrezeptors *pgrp-le*, [B] zeigt die Ergebnisse für die Aktivierung der AMP-Expression durch eine verstärkte *dfoxo*-Expression.

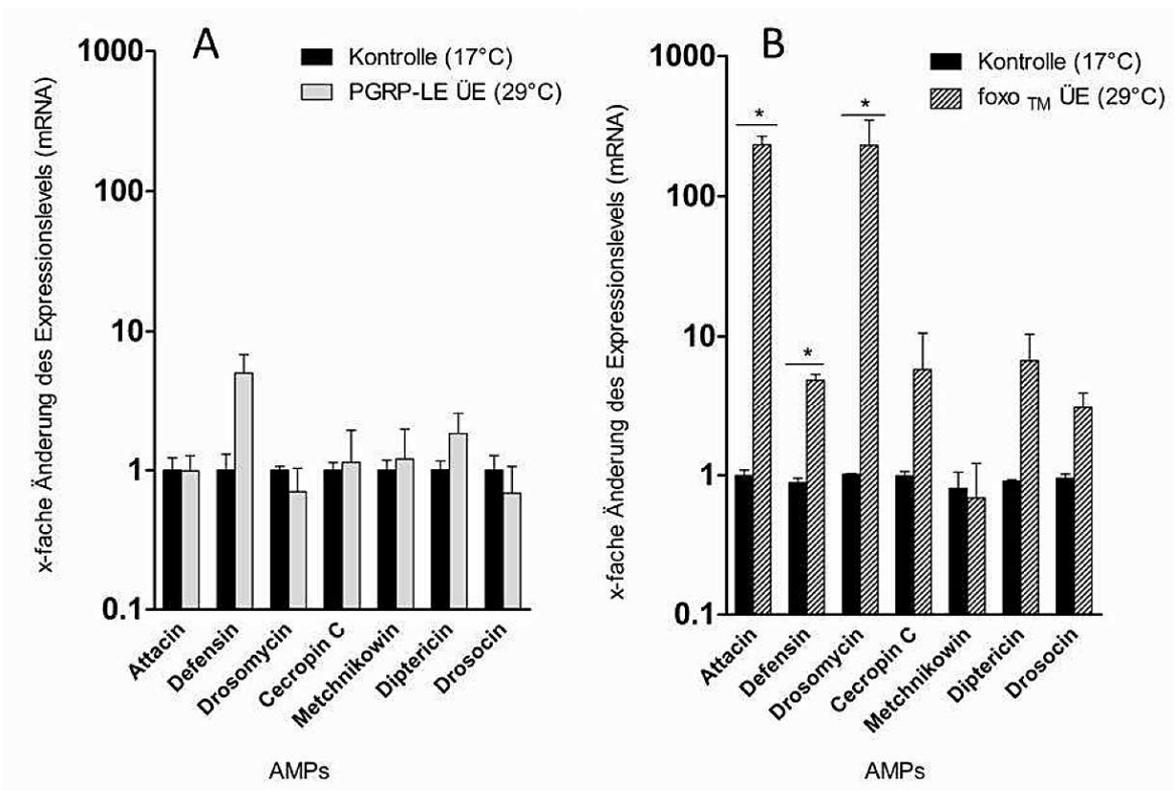


Abb. 3.14: Realtime PCR nach der Überexpression des IMD- und dFoxO-Signalweges in adulten Weibchen. Dargestellt ist jeweils die durch Hitzeschock (24 Stunden bei 29°C) aktivierte Überexpression des Transmembranrezeptors PGRP-LE und des Transkriptionsfaktors *foxO* im Vergleich.

Bereits auf den ersten Blick wird deutlich, dass die Überexpression von *dfoxo* einen wesentlich stärkeren Effekt auf die Produktion und die Expressionsrate nahezu aller antimikrobiellen Peptide ausübt. Bis auf Metchnikowin werden alle AMPs um mindestens den Faktor 10 verstärkt transkribiert, die Peptidgene *attacin* und *drosomycin* werden sogar um das 200 fache höher reguliert als in der Kontrolle. In den Därmen der F1-Generation mit dem induzierten *pgrp-le* hingegen, wird nur das kodierende Gen für das AMP Defensin verstärkt exprimiert, alle anderen zeigen keine Unterschiede im Expressionslevel im Vergleich mit ihrer Kontrolle.

Abschließend zeigt sich also anhand der durchgeführten Experimente und der daraus erzielten Ergebnisse, dass die Immunabwehr in den Enterozyten über eine gesteigerte Translokation des Transkriptionsfaktors dFoxO gesteuert wird.

Da eine Aktivierung über den IMD-Signaltransduktionsweg in den Enterozyten weder über die orale Infektion noch über die Überexpression nachweisbar ist, stellt sich die Frage, ob es nicht andere Zelltypen im Darmepithel der Taufliege gibt, die ihre Immunabwehr über diesen Mechanismus steuern. Wie in Abbildung 3.8 gezeigt wurde, konnte eine Translokation des Transkriptionsfaktors Relish in den Zellkern der Kupferzellen mittels IHC nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten sollte die Aktivität des IMD-Signalweges im Darmgewebe spezifischer untersucht werden.

3.1.3 Welche Zellen werden durch die Überexpression des klassischen IMD-Signaltransduktionsweges aktiviert?

Für die Untersuchung der IMD-Aktivität in den Epithelzellen des Darms wurden Kreuzungen mit der darmspezifischen Treiberlinie *Npc1b-Gal4* und der *pgrp-le* überexprimierenden Responderlinie (UAS) angesetzt. Da in dieser Linie gleichzeitig ein *Drosomycin*-Promotor-GFP-Konstrukt vorhanden ist, entsprechen die detektierbaren GFP-Signale einer *drosomycin* Promotoraktivität unter dem Einfluss des überexprimierten PGRP-LE Rezeptors.

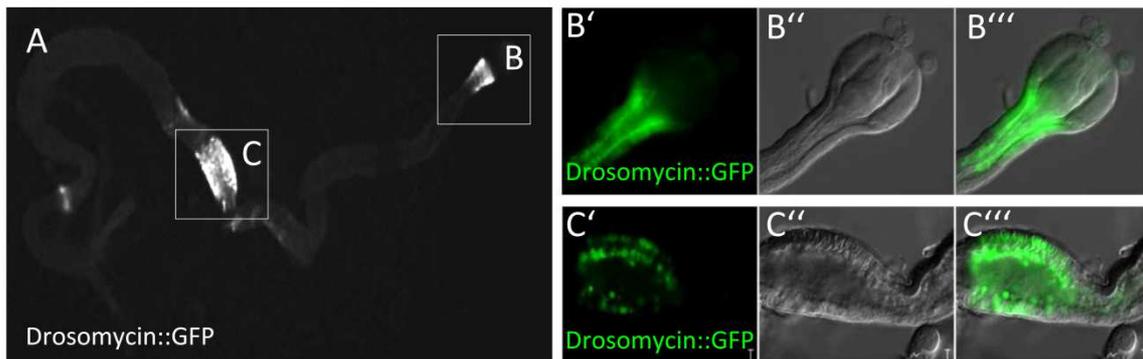


Abb. 3.15: In dieser Abbildung ist ein Darm einer adulten Fliege der F1 Generation der Kreuzung *Npc1b Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-le (II)* in [A] dargestellt. Das PGRP-LE ist mit einem *Drosomycin-GFP* Gen fusioniert, d.h. die GFP-Signale entsprechen einer Expression von *Drosomycin* unter Aktivierung des PGRP-LEs. Es treten besonders zwei Regionen mit verstärkter antimikrobieller Aktivität hervor: In B'-B''' ist eine Vergrößerung des Proventrikulus abgebildet; C'-C''' zeigt die Kupferzellregion im Mitteldarm der Tiere.

Wie in Abbildung 3.15 [A] gezeigt, konnten insbesondere zwei grün-fluoreszierende Regionen im Darmepithel der F1-Generation ermittelt werden. In diesen Regionen kommt es zu einer Produktion des AMPs *Drosomycin* durch die gesteigerte Aktivität des löslichen mustererkennenden Rezeptors PGRP-LE. Es kommt also zu einer Immunabwehr, induziert über den IMD-Signalweg im Bereich des Proventrikulus [B] und in den Kupferzellen [C]. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen aus der oralen Infektion. Denn wie anhand der AMP-Promotorlinien unter 3.1.1 bereits gezeigt wurde, kommt es auch hier zu einer antimikrobiellen Aktivität im Proventrikulus und auch zu einer Translokation von Relish in den Zellkern der Kupferzellen.

Um die Daten allerdings besser mit den Hitzeschock-induzierten Ergebnissen vergleichen zu können, wurden weitere Kreuzungen angefertigt. Hier wurde ebenfalls der darmspezifische Treiber NP1Gal4 verwendet. Da es jedoch zu einer chronischen Aktivierung des Immunsignalweges kommen sollte, um eine stetige Aktivierung der Zellen über IMD zu gewährleisten, wurde auf das Hitzeschock-Element Gal80 verzichtet. Außerdem sollte die Aktivität des *drosomycin*-Promotors auf Proteinebene nachgewiesen werden, weshalb zur Detektion erneut die immunhistochemische Analyse unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers verwendet wurde.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.16 spiegeln die Situation aus der Kreuzung NP1Gal4 x UAS-PGRP-LE wider. D.h., auch hier führt die Überexpression von *pgrp-le* unter Verwendung des darmspezifischen Treibers NP1Gal4 zu einer Aktivierung der Immunabwehr im Proventrikulus [A-C] und der Kupferzellregion [D-F] im Darm von *Drosophila*. Wie in den Teilabbildungen [G-I] zu erkennen ist, wurde ein weiterer Zelltypus im Darm entdeckt, der

eine antimikrobielle Aktivität zeigt. Diese Zellen scheinen dem Darmepithel aufgelagert zu sein und zeigen den typischen Stammzellhabitus. Es handelt sich um kleine, sternförmige Zellen, die zum Teil in Zwei-Zell-Clustern auftreten. Sowohl die antimikrobielle Aktivität in den Kupferzellen, als auch die mögliche immunrelevante Aktivität in den intestinalen Stammzellen wurde im Weiteren untersucht.

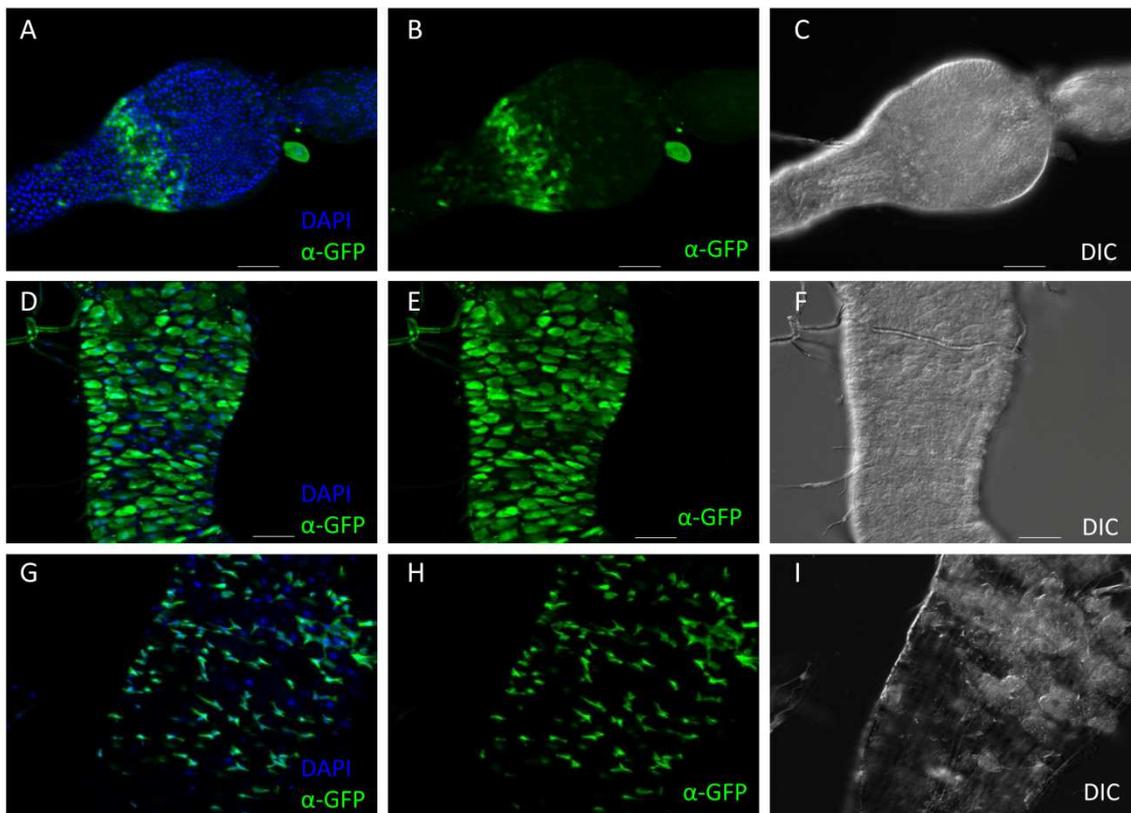


Abb. 3.16: Dargestellt sind hier die unterschiedlichen Darmregionen eines adulten Weibchens aus der F1 Generation der Kreuzung *NP1 Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-le (II)*. In [A-C] ist die Aktivität im Proventrikulus dargestellt. In [D-F] sieht man einen Darmausschnitt mit den GFP-exprimierenden Kupferzellen. In [G-I] erkennt man weitere GFP-exprimierende Zellen bei denen es sich vermutlich um Intestinale Stammzellen (ISCs) handelt.

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den Zellen im Mitteldarmbereich der Tiere tatsächlich um Kupferzellen handelt, wurden Versuche mit L3 Larven der Kreuzung *Npc1bGal4 x UAS-pgrp-le* durchgeführt. Da Kupferzellen ihrem Namen nach die Eigenschaft besitzen Kupfer zu akkumulieren, wurde dem Nährmedium CuSO_4 mit einer im Medium enthaltenen Endkonzentration von 1mM hinzugefügt. Es wurden für diesen Versuch Larven verwendet, da sich diese im Fressstadium befinden und man somit sicher davon ausgehen konnte, dass genug Kupfer in den Darm der Tiere gelangt. Nach einer Fressphase von 24 Stunden wurden die Därme präpariert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.17 präsentiert.

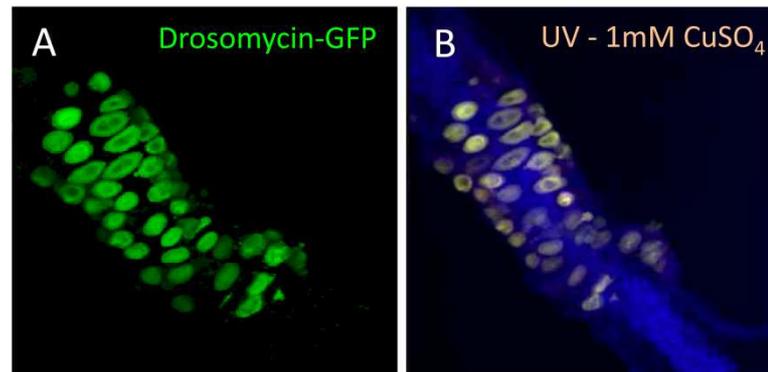


Abb. 3.17: Nachweis der Überexpression von Drosomycin-GFP in den Kupferzellen des Mitteldarms von L3 Larven aus der Kreuzung *Npc1b Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-Ie (II)*. In [A] sieht man die GFP-Expression in den Kupferzellen. Zum Nachweis, dass es sich um diesen aktivierten Zelltyp handelt, wurden die L3 Larven für 24 Stunden mit 1mM CuSO₄ Medium gefüttert, anhand der Akkumulation von Kupfer in diesen Zellen [B] ist der Nachweis erbracht.

Wie in [A] erkennbar ist der Bereich der Kupferzellen auf einen bestimmten Darmabschnitt begrenzt. Schon anhand des GFP-Signales lässt sich ersehen, dass es sich bei diesem Zelltypen nicht um Enterozyten handeln kann, da sie eindeutig eine andere morphologische Struktur aufweisen. Es kommt zu keinerlei Kontakt unter den Einzelzellen, was der morphologischen Anordnung der Kupferzellen in *Drosophila* entspricht, da sie von sog. Füllzellen, den interstitiellen Zellen, räumlich voneinander getrennt werden. Ein weiterer Beweis dafür, dass es sich um Kupferzellen handelt, wird in [B] geliefert. Mittels UV-Bestrahlung lässt sich das aufgenommene Kupfer in den Zellen nachweisen. Es ist eindeutig, dass das GFP-Signal und das Signal des akkumulierten Kupfers in den Zellen übereinstimmen. Somit ist bewiesen, dass die Kupferzellen im Darm der Taufliege eine antimikrobielle Aktivität über die Steuerung des IMD-Signaltransduktionsweges erfahren.

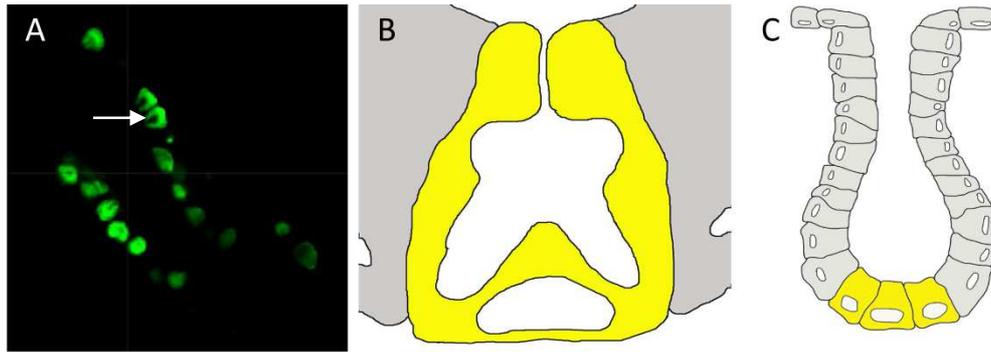


Abb. 3.18: Morphologische Struktur der Kupferzellen – [A] zeigt einen konfokalen Schnitt der Kupferzellen der F1-Generation der Kreuzung *Npc1bGal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-le*. Eine schematische Abbildung der genauen Struktur ist in [B] gezeigt. In [C] ist schematisch eine Krypte aus dem Darmepithel des Menschen dargestellt. Bei den in Gelb markierten Zellen handelt es sich um die sog. Paneth-Zellen.

Um die morphologische Struktur der Kupferzellen noch einmal genau zu zeigen, wurden Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop angefertigt. In Abbildung 3.18, Teilabbildung [A] ist ein Schnitt einer solchen Aufnahme präsentiert. Bei Kupferzellen handelt es sich um invaginierte Zellen, der Porus ist mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Aus dieser Abbildung ließ sich ein Schema über die Struktur der Zellen erstellen, welches in [B] dargestellt ist. Es ist davon auszugehen, dass die antimikrobiellen Peptide über den Invaginationsporus nach außen in das Darmlumen abgegeben werden. Zum Vergleich mit dem humanen Darmepithel ist in [C] die Struktur einer Krypte des Dünndarms schematisiert abgebildet. Die gelb gekennzeichneten Strukturen beider Teilabbildungen entsprechen einer ähnlichen Funktion bei der Produktion antimikrobieller Peptide. Dies wird in der sich anschließenden Diskussion näher erläutert.

Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass Kupferzellen eine antimikrobielle Aktivität aufweisen, soll der Fokus nun auf den letzten Zelltypen gelegt werden, welcher mittels der IHC in Abbildung 3.16 [G-I] eine Produktion des AMPs Drosomycin zeigte. Die Vermutung, dass es sich hierbei um Intestinale Stammzellen handelt, lässt sich ebenfalls über einen immun-histochemischen Nachweis unter der Verwendung des Stammzell-spezifischen Antikörpers α -Delta nachweisen. Durch eine gleichzeitige Inkubation von α -Delta und α -GFP konnte eine Kolo-kalisation der beiden Proteine nachgewiesen werden, wie in Abbildung 3.19 gezeigt.

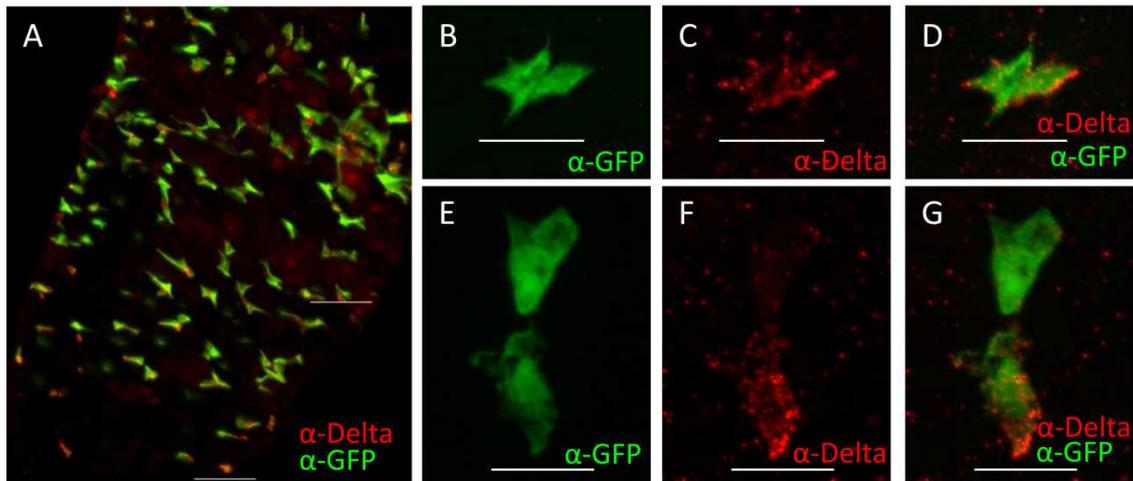


Abb. 3.19: Nachweis der immunaktivierten Antwort in den ISCs in der F1 Generation der Kreuzung NP1 Gal4 x DDI (*Drs-GFP; Dipt.-lacZ*::*UAS-Flag-pgrp-le (II)*) mit dem Stammzell-spezifischen Antikörper Delta I. [A] zeigt die Übersicht des Zellausschnitts wie bereits in Abb 2.5 [G, H]. In [B-D] und [E-G] sind jeweils Vergrößerungen der einzelnen Zelltypen dargestellt. Der Messbalken entspricht 20 μm .

Wie bereits in der Übersichtsaufnahme [A] zu sehen ist, kommt es zu einer Überlappung des rot- (α -Delta) und grün- (α -GFP) fluoreszierenden Signals. Des Weiteren sind Vergrößerungen von Einzelzellen dargestellt. In [B-D] ist eine einzelne intestinale Stammzelle mit typisch sternförmiger Struktur abgebildet, während in [E-G] ein ebenfalls Zelltyp-spezifisch vorkommendes Zwei-Zell-Cluster präsentiert ist. Das rot-fluoreszierende Signal für α -Delta ist etwas schwächer als das des grün-fluoreszierenden GFPs, allerdings hängt dies mit den Bindungseigenschaften des Antikörpers zusammen. Aber es lässt sich allein anhand der Überlagerungen [D, G] eindeutig zeigen, dass es sich bei den Drosomycin-GFP produzierenden Zellen um die vermuteten intestinalen Stammzellen des Darmepithels in *Drosophila* handelt. Die in Abbildung 3.20 angefertigten Aufnahmen unterstützen diese Aussage weiter. Hier wurden die Präparate noch mit dem DNA-markierenden Fluoreszenzfarbstoff gegengefärbt, um den vollständigen Habitus der Zellen nachweisen zu können.

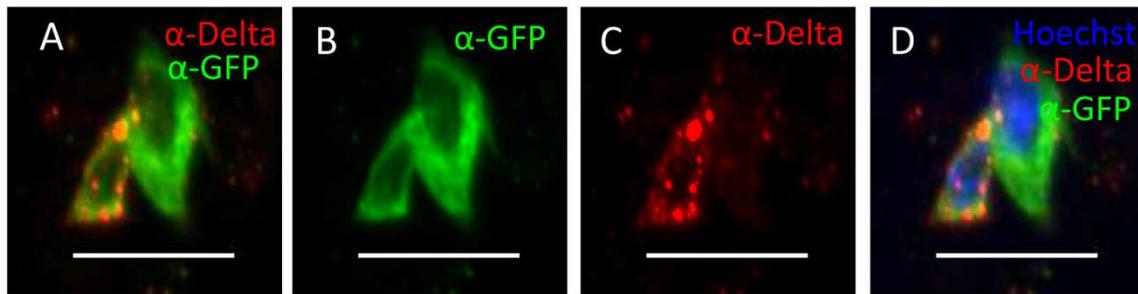


Abb. 3.20: Nachweis der immunaktivierten Antwort in den ISCs in der F1 Generation der Kreuzung *NP1 Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-PGRP-LE (II)* mit dem Stammzell-spezifischen Antikörper Delta II

Um den ersten Ergebnisteil zur Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Immunabwehr und ihrer Aktivierung im Darm noch einmal zusammen zu fassen, wurde das in Abbildung 3.21 präsentierte Schema zum Aufbau der intestinalen Immunabwehr in *Drosophila melanogaster* entwickelt.

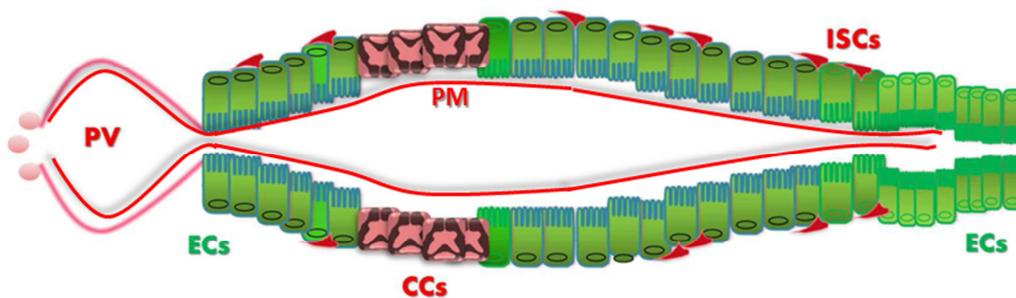


Abb. 3.21: Schema zur zellspezifischen Aktivierung der Immunabwehr im Darmepithel der Taufliege *Drosophila melanogaster* – Die in rot markierten Bereiche entsprechen den Zellbereichen, die ihre Aktivierung via des IMD-Signalweges erfahren (PV-Proventrikulus; PM – Peritrophe Membran; CCs-Kupferzellen; ISCs-Intestinale Stammzellen). In grün sind die Enterozyten dargestellt, die über die Aktivierung von *foxO* gesteuert werden.

Anhand des Modells zeigt sich, dass die Immunantwort in den Enterozyten über eine Aktivierung des dFoxO-Signaltransduktionsweges gesteuert wird. Dies zeigt sich sowohl anhand der Ergebnisse der oralen Infektion des Darmepithels als auch durch die Hitzeschock-induzierbare Überexpression des Transkriptionsfaktors dFoxO in diesen Zellen. Die Steuerung der übrigen Zelltypen, wie den Kupferzellen und den intestinalen Stammzellen unterscheidet sich grundsätzlich von denen der Enterozyten, da hier die Produktion antimikrobieller Peptide über den klassischen IMD-Signalweg gelenkt wird.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss der intestinalen Immunabwehr auf die Mikrobiota im Darm

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte zunächst die bakterielle Zusammensetzung im Darm der Taufliege untersucht werden und ein Modell etabliert werden, mit dessen Hilfe eine nicht-invasive Analyse der Mikrobiota möglich ist.

Daraufhin sollte gezeigt werden, dass eine temporäre Aktivierung der Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies in den Enterozyten zu einer ebenso temporären Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung führt.

3.2.1 Die Zusammensetzung der intestinalen Flora in unterschiedlichen Wildtypen – Faeces spiegeln die Situation im Darmlumen wider

In dem ersten Experiment dieser Versuchsreihe wurde ein 16s rRNA basiertes *Phylotyping* mit Hilfe der 454-Sequenzierung mit den beiden Wildtypstämmen w¹¹¹⁸ und Canton S durchgeführt. Um die Situation der mikrobiellen Zusammensetzung zu untersuchen wurde jeweils die gDNA aus drei unterschiedlichen Quellen für jeden Fliegenstamm isoliert. Zum einen wurden ganze, verpaarte Fliegenweibchen verwendet, zum anderen der präparierte Darm und außerdem die Faeces, die von 50 Tieren im Zeitraum von 24 Stunden produziert wurde. Als Negativkontrolle wurden Abstriche von leeren Mediumsröhrchen verwendet. Die Proben wurden wie in 2.2.10 beschrieben isoliert und in der 454-Sequenzierung eingesetzt.

Der in Abbildung 3.22 dargestellte *Plot* zeigt die Anzahl der gefundenen OTUs (*Operational Taxonomic Units*) in Abhängigkeit zu der entsprechenden Häufigkeit ihrer gelesenen Sequenzen. Im Regelfall sollte diese Analyse eine Sättigungskurve hervorbringen, da in jeder Probe grundsätzlich nur eine gewisse Anzahl an OTUs vorkommt. Die Ergebnisse zeigten ein leicht abweichendes Bild. Es wurden viele OTUs aufgezeigt, deren Sequenzen nur wenige Male detektiert werden konnten. Da sich diese Ergebnisse sowohl in den untersuchten Proben als auch in den Kontrollen wieder fanden, wurden die OTUs mit einer geringeren Häufigkeit als 2 % als Kontaminationen betrachtet und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

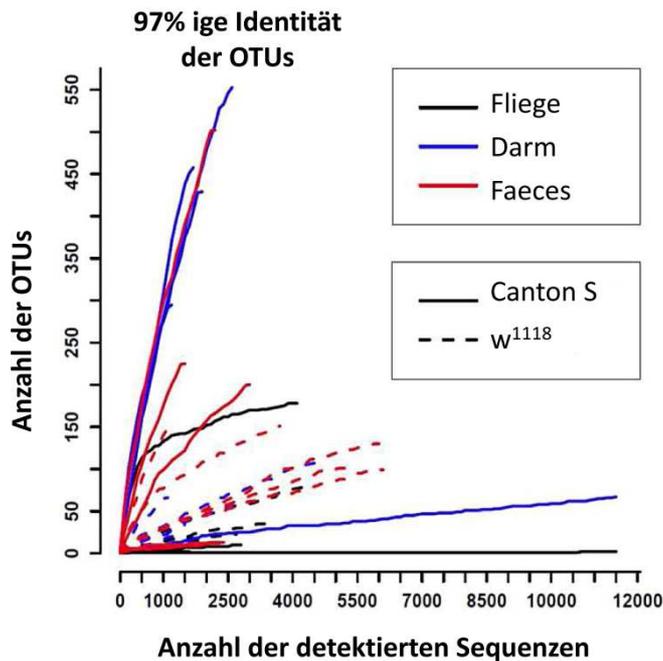


Abb. 3.22: Sättigungskurve – Präsentiert ist die Relative Häufigkeit der bakteriellen Taxa ermittelt via 454-Sequenzierung nach Roche. – Taxa mit einer relativen Häufigkeit unter 2% wurden ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der Analyse nach Ausschluss der Kontaminationen sind in Abbildung 3.23 aufgezeigt. Teilabbildung [A] repräsentiert die Situation in den drei verwendeten Proben des Wildtyps w^{1118} , Teilabbildung [B] stellt die Situation in Canton S dar. Bereits auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass die bakterielle Zusammensetzung beider Fliegenlinien extrem unterschiedlich zu sein scheint. Betrachtet man die Daten genauer, sieht man eindeutig, dass zumindest in den gDNA Proben ganzer Fliegen bzw. in den Proben der isolierten Därme Stamm-spezifische Schwankungen auftreten. In allen Replikaten der Proben „Fliege“ bzw. „Darm“ des Stammes w^{1118} konnte per Sequenzierung mit der Häufigkeit von 97% nur die Sequenzen der Bakteriengattung *Wolbachia* detektiert werden. Es handelt sich hierbei vermutlich zumeist um das gramnegative Bakterium *Wolbachia pipientis*, von dem bekannt ist, dass es in 40% aller *Drosophila*-Populationen parasitisch lebend auftritt. Im Wildtyp Canton S hingegen ist keine Infektion mit diesem Bakterium nachweisbar. Entscheidend ist allerdings in diesem Zusammenhang, die Zusammensetzung der Faecesproben in w^{1118} , hier konnte ebenfalls keine nennenswerte Anzahl entsprechender *Wolbachia*-Signale nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde ist davon auszugehen, dass der Bakterienpool in den Faeces die Situation im Darmlumen der Tiere widerspiegelt. Aufgrund der hohen Anzahl an detektierten *Wolbachia* Sequenzen scheint es in diesen Proben zu einer Verdrängung der anderen bakteriellen Komponenten zu kommen. Betrachtet man im Vergleich die Faecesproben von Canton S mit denen von w^{1118} so zeigt sich jedoch deutlich, dass die Zusammensetzung jeweils korreliert. Es können in beiden Fliegenstämmen etwa vier dominant auftretende Sequenzen der Bakteriengattungen *Sphingomonas* (türkis), der *Enteric-Bacteria-Cluster* (blau),

Acetobacter (gelb) und auch teils *Acetobacter* (grün) nachgewiesen werden. Bei allen Bakterienarten handelt es sich um gramnegative Bakterien.

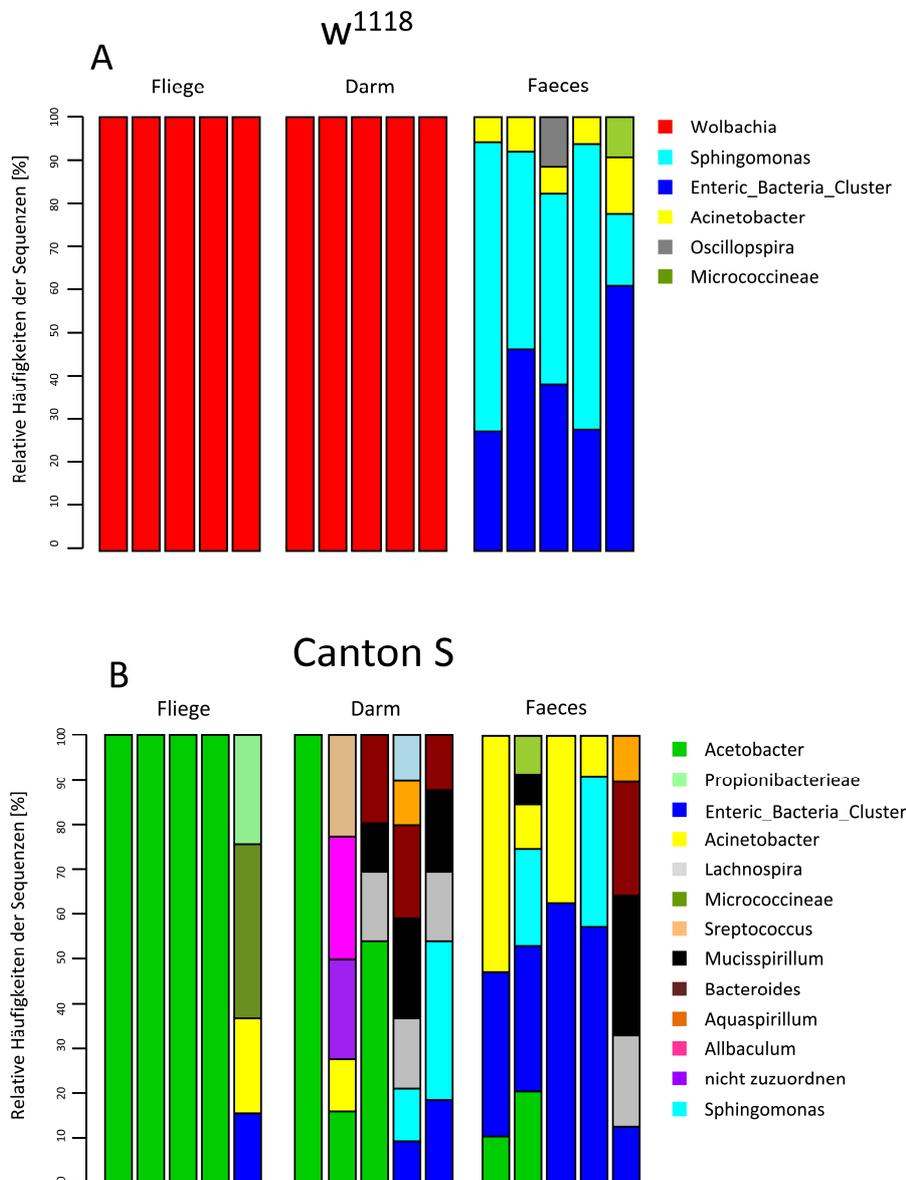


Abb. 3.23: Sequenzanalyse bakterieller Bestandteile – Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der aufgetretenen Bakteriensequenzen. Es sind jeweils die 5 Replikate der drei unterschiedlichen Gewebe (ganze Fliege, Darm und Faeces) der beiden Wildtypen w^{1118} [A] und Canton S [B] aufgeführt.

Um die Ergebnisse dieses Sequenzierungsversuches weiter zu untersuchen bzw. um eindeutig nachzuweisen, dass die Faecesproben des w^{1118} frei von einer *Wolbachia*-Kontamination sind, wurden PCR Ansätze aller isolierten Proben mit *Wolbachia*-spezifischen Oligonukleotiden (*Wsp_81F* & *Wsp_691R*) durchgeführt. Des Weiteren

wurden die Oligonukleotid-Primer SAI und SBI verwendet, um eine erfolgreiche Isolierung der gDNA zu dokumentieren. Wie in Abbildung 3.24 dargestellt, sind jeweils die drei unterschiedlichen Quellen zur Amplifikation eingesetzt worden. In den Reihen 1, 3 und 5 wurden die *Wolbachia*-spezifischen Oligonukleotid-Primer verwendet, in den Reihen 2, 4 und 6 die allgemeinen Eubakteria-Oligonukleotid-Primer. Wie die weißen Pfeile in Spur 1 und 3 markieren, konnte hier eindeutig eine Infektion mit *Wolbachia* nachgewiesen werden. Die Faecesproben [Spur 5] sind auch hier *Wolbachia*-frei.

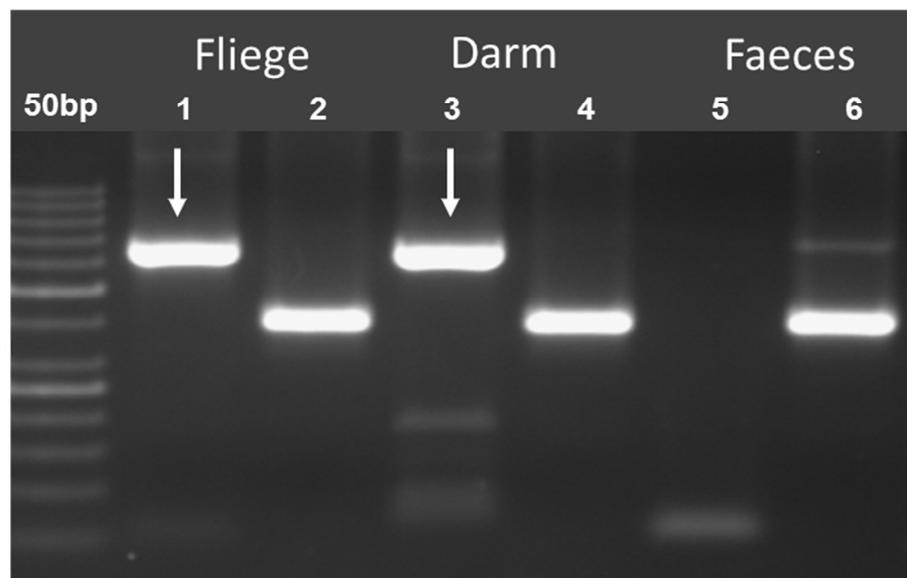


Abb. 3.24: Nachweis der *Wolbachia*-Infektion in der isolierten gDNA aus ganzen Tieren, den Därmen und den Faeces-Proben der Linie w^{118} . In den Spalten 1, 3 und 5 wurden die *Wolbachia*-spezifischen Oligonukleotid-Primer *Wsp_81F* und *Wsp_691R* für die Amplifikation verwendet. In den Spalten 2, 4 und 6 wurden die Oligonukleotid-Primer SAI und SBI eingesetzt, um eine erfolgreiche gDNA-Isolierung zu dokumentieren.

Da sich auch aus diesen Ergebnissen schließen lässt, dass sich Fliegenfaeces durchaus als geeignetes Material für weitere nicht-invasive Untersuchungen bzw. Manipulationen eignen, wurde in einem nachfolgenden Versuch mittels quantitativer Realtime-PCR die bakterielle Zusammensetzung in der gDNA isolierter Därme und den Faeces-Abstrichen aus drei unterschiedlichen Wildtypstämmen (w^{118} , *Canton S* & *Oregon R-C*) mit Bakterienart-spezifischen Oligonukleotid-Primern untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.25 demonstriert. Hierbei sind in [A] die Ergebnisse der Amplifikation im Darm der Tiere dargestellt, vergleichend mit den Faecesproben in [B]. Es wurden jeweils drei biologische Replikate im Duplikat getestet. Die Werte wurden anhand der Detektion aller Bakterien mit dem V2 Primerpaar berechnet, dargestellt ist der arithmetische Mittelwert aller im Duplikat getesteten biologischen Replikate mit Standardabweichung (*SEM-standard error of the mean*).

Es zeigt sich, dass die bakterielle Zusammensetzung in den Därmen der unterschiedlichen Wildtypen zum Teil variiert, lediglich die Verteilung für die Bakterienarten *Acetobacter pomorum*, *Lactobacillus plantarum* und *Commensalibacter intestini* ist in allen drei Linien annähernd gleich. Viel wichtiger ist jedoch, dass die im Darm nachgewiesenen Bakterien größtenteils auch in den amplifizierten gDNA-Proben aus den Faeces-Abstrichen nachgewiesen werden konnten. Somit konnten nahezu alle anderen Arten in den Faeces nachgewiesen werden, selbst die Rate der Amplifikation verhält sich in den meisten Fällen ähnlich.

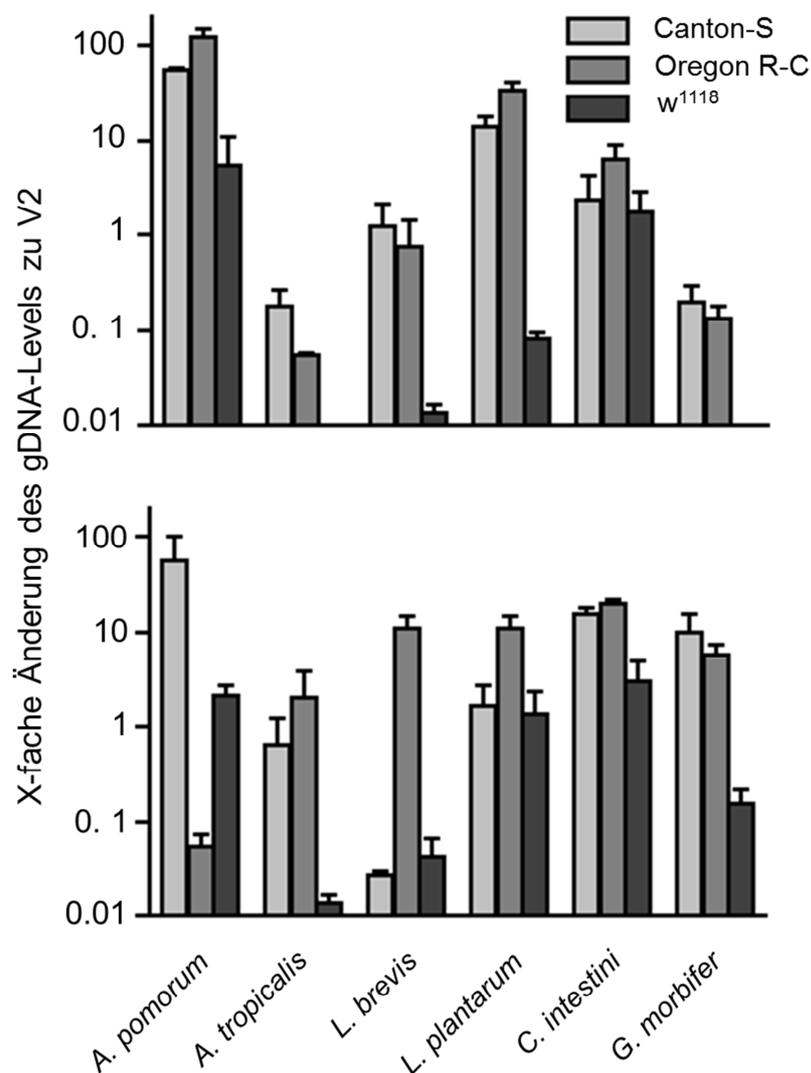


Abb. 3.25: *Realtime PCR der genomischen DNA aus Därmen [A] und Faeces-Proben [B] der Wildtypen Canton S, Oregon und w¹¹¹⁸. Dargestellt ist der Mittelwert der biologischen Replikate mit SEM.*

Abschließend lässt sich also die Aussage treffen, dass sich die Verwendung von Faeces der Tauflye sehr gut als Ausgangsmaterial für weitere Versuche eignet, da hier die Untersuchung der jeweils gleichen Fliegenkohorte für z.B. Zeitreihenexperimente unter Infektions- oder Medikationsbedingungen möglich ist.

3.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies als alternatives Abwehrsystem im Darm

Nachdem bereits in den ersten Experimenten zur zellspezifischen Immunabwehr im Darm von *Drosophila* gezeigt werden konnte, dass es auch zu einer Aktivierung des PLC β -Signaltransduktionsweges (3.1.2.1, Abb. 3.6) in den Enterozyten kommt und somit vermutlich eine Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird, sollte dies in den folgenden Untersuchungen vertiefend überprüft werden.

Unter der Verwendung einer spezifischen DREADD-UAS-Responderlinie (M1D1) in Verbindung mit der NP1Gal4-Treiberlinie war es möglich, diesen Signalweg in der F1-Generation über die Fütterung mit CNO-versetztem Medium [1mM] zu aktivieren. Wie im Folgenden unter 4.1.3 beschrieben, führt die Aktivierung über CNO zu einer erhöhten Calciumausschüttung des Endoplasmatischen Retikulums in das Zytoplasma der Zellen. Eine solche Erhöhung führt zu der Produktion des Enzyms DUOX (Duale Oxidase), deren Aktivierung wiederum zu einer Produktion von ROS führt.

Auch hier wurde zum Screening zunächst eine Microarray-Analyse durchgeführt. Es wurden die verpaarten Weibchen für 24 Stunden mit CNO versetztem Medium gefüttert und die isolierte RNA im Vergleich zu der Kontrollgruppe verwendet, die nur mit dem Lösungsmittel des CNOs (1 x PBS) gefüttert wurde. In Tabelle 3.5 sind die in diesem Zusammenhang hoch regulierten Gene zusammengefasst.

Tab. 3.5: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS-M1D1.

CG Nummer	Gen-Name
10913	Serine protease inhibitor 6
8905	Superoxide dismutase 2 (Mn)
9470	Metallothionein A
14680	Cyp12e1
8453	Cyp6g1
11821	Cyp12a5
1844	Selenoprotein G
7629	Attacin-D
17531	Glutathione S transferase E7
17522	Glutathione S transferase E10

Die Gene Cyp12e1 (CG14680), Cyp6g1 (CG8453) und Cyp12a5 (CG11821) gehören zu der Enzymklasse der Oxidoreduktasen und haben eine wichtige Funktion in der Elektronenübertragung. Gemeinsam mit dem Selenoprotein G (CG1844), welches an der Ausschüttung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist, spielen sie eine Rolle in der Aktivierungskaskade von DUOX. Des Weiteren zeigen die Gene kodierend

für die Superoxid-Dismutase 2 (CG8905) und die beiden Glutathion S Transferasen (CG17531, CG17522) eine verstärkte Expression nach CNO-Gabe, sie haben z.B. eine entscheidende Bedeutung in der Entgiftung Reaktiver Sauerstoffspezies und entsprechend modifizierter Produkte.

Den hoch regulierten Genen können einige wenige herunter regulierte Gene gegenüber gestellt werden, die eindeutig eine Funktion in der Signalübertragung durch die Phospholipase C einnehmen, zu ihnen zählen im Speziellen die Inositol-1,4,5-Triphosphat-Kinase (CG12724) und die Ipk2 (CG13688), siehe Tabelle 3.6. Diese beiden Kinasen modifizieren unter Normalbedingungen den IP₃-Signaltransduktionsweg, indem sie IP₃ zu IP₄ phosphorylieren. Da diese beiden Kinasen herunter reguliert werden, spricht dies für den Erhalt des IP₃ und somit zu einer gesteigerten Aktivierung der Calciumausschüttung.

Tab. 3.6: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten herunter regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS-M1D1.

CG Nummer	Gen-Name
12724	Inositol 1,4,5-triphosphate kinase 2
13688	Ipk2
15793	Downstream of raf1

Es lässt sich also anhand der Microarray-ermittelten Daten schließen, dass CNO tatsächlich zu einer Aktivierung der Calcium-abhängigen Produktion von ROS in den Enterozyten führt.

Mittels der quantitativen Realtime-PCR sollte daher nachgewiesen werden, dass es tatsächlich zu einer erhöhten Expression des für die DUOX-kodierenden Gens nach CNO-Fütterung kommt. Wie Abbildung 3.26 zeigt, kommt es zu einer 2fach erhöhten Expression von DUOX, woraus sich schließen lässt, dass CNO eine Calciumausschüttung fördert und somit die DUOX-Aktivität erhöht.

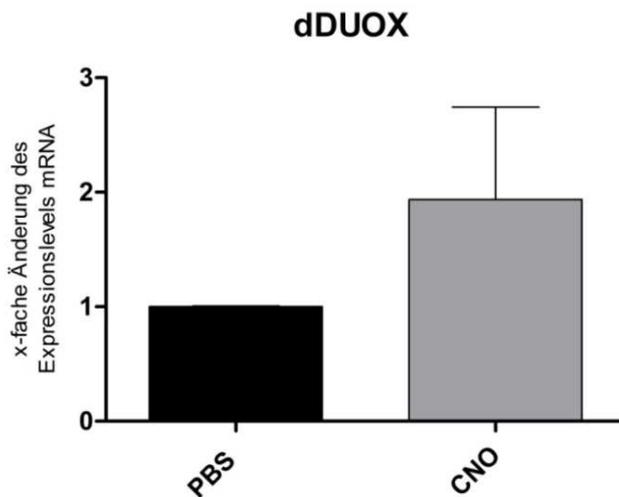


Abb. 3.26: Nachweis der relativen Expressionsänderung von dDUOX in unbehandelten und behandelten Tieren der F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x M1D1 unter Verwendung von direkter cDNA.

Eine solche Erhöhung in der Genaktivität würde dafür sprechen, dass es durch den vermehrten Einbau von dDUOX in die Zellmembran zu einer gesteigerten Produktion von ROS kommt. D.h.

eine gesteigerte ROS-Produktion müsste eine Reduktion der Gesamtbakterienzahl im Darmlumen der Tiere nach sich ziehen.

Um die Aussage über die Aktivierung von ROS durch die Gabe von CNO in den F1-Fliegen der Kreuzung NP1Gal4 x DREADD-UAS-M1D1 zu verifizieren, sollte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DHE (Dihydroethidium) eine Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies mittels des Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden. DHE kann problemlos durch die Zellmembran dringen und ist sehr sensitiv, um die Produktion von ROS zu detektieren. Es kommt hierbei vermutlich nach der Reaktion mit Superoxid-Anionen zu einer Bildung von 2-Hydroxyethidium, welches mit der DNA interkalieren kann (Amir et al. 2008) und ein rotes Fluoreszenzsignal liefert. Es wurden jeweils verpaarte Weibchen der F1-Generation der o.a. Kreuzung verwendet und unter den bisher üblichen Bedingungen eingesetzt, d.h. eine Kontrollgruppe, die für 24 Stunden mit 1 x PBS versetztem Medium gefüttert wurde und die Testgruppe mit dem CNO-vermengten Medium.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 3.27 spiegeln die Situation in den Enterozyten der F1-Generation wieder. In den Teilabbildungen [A-F] sind die Bilder aus den mit CNO gefütterten Därmen dargestellt, in [G-L] die Aufnahmen der Kontrollgruppe. Es zeigen sich bereits in den Übersichtsaufnahmen [A-C] bzw. [G-I] eindeutige Unterschiede im Fluoreszenzverhalten des Farbstoffes. In den mit CNO behandelten Därmen erkennt man eindeutig eine stark rote Fluoreszenz in den Zellkernen der Enterozyten und eine eher schwache zytoplasmatische Verteilung des Farbstoffes. In den Kontrollen ist das Ergebnis gegensätzlich, es zeigt sich ein starkes, diffuses Signal im Zytoplasma der Zellen, das Zellkernsignal hingegen scheint nicht sehr spezifisch. Betrachtet man die Vergrößerungen der Enterozyten unter den jeweiligen Bedingungen, so ergibt sich hier das gleiche Ergebnis. In den Kontrollen ist kein Signal in den Enterozytenkernen zu detektieren [J,K], während der Kernfarbstoff Hoechst und das DHE in den CNO behandelten Zellen

eindeutig eine Kolo­kalisierung aufweisen [D;E]. Die Granula-ähnlichen Einschlüsse, die sich bei den CNO-behandel­ten Zellen [E] erkennen lassen, sind ebenfalls typisch bei einem Nachweis von ROS mittels DHE.

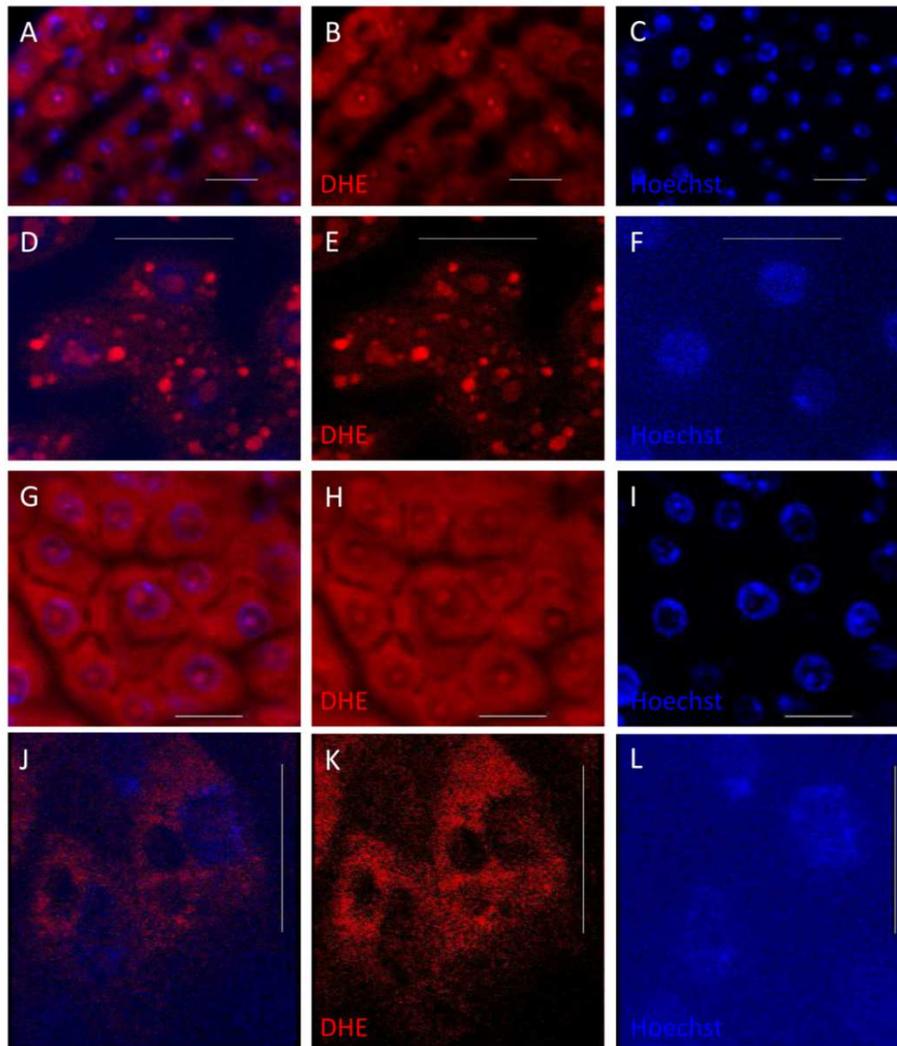


Abb. 3.27: Nachweis von ROS in der F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x DREADD-UAS-M1D1 mittels DHE. In [A-F] sind die Enterozyten der für 24 Stunden mit CNO gefütterten Tiere dargestellt, in [G-L] hingegen die Enterozyten der Kontrolltiere, welche für 24 Stunden mit 1xPBS versetztes Medium zu fressen bekommen haben.

Die eben beschriebene Beeinflussung des Enterozytenverhaltens sollte in den folgenden Experimenten anhand des Einflusses von CNO bzw. ROS auf die Bakterienmenge in den Faecesproben von *Drosophila* untersucht werden.

Hierzu wurden pro Replikat 30 verpaarte Weibchen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS-DREADD-M1D1 täglich auf frisches Medium gesetzt und für 24 Stunden darin belassen, anschließend wurden die Proben wie in 2.2.10 beschrieben, entnommen und isoliert. Anhand des allgemeinen Bakterien-Olionukleotid-Primerpaares V2 konnte nun aus allen Proben die Gesamtmenge an Bakterien zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung mittels der Realtime-PCR bestimmt werden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 3.27 exemplarisch dargestellt. In diesem Diagramm

sieht man den jeweiligen Ct-Wert der unterschiedlich behandelten Proben bei Zyklus „x“. In den Faeces der Kontrolltiere (weiße Säulen), in denen das Medium nur mit dem Lösungsmittel des CNOs (1 x PBS) versetzt wurde, kommt es zu keiner Änderung im Detektionsniveau des Amplifikats, in allen Proben wurde stets ein Signal um Zyklus 30 detektiert. Bei den mit CNO-behandelten Tieren sieht man hingegen einen deutlichen Effekt nach einer 24-stündigen Behandlung (schwarze Säulen). Die Detektion der Amplifikate tritt nach der Behandlung um etwa drei Zyklen später auf als in den Proben des Kontrollwertes, wie mit dem roten Pfeil gekennzeichnet. Da man bei der Realtime PCR meist von einer Verdopplung des Produktes pro Amplifikationszyklus spricht, würde es in diesem Fall bedeuten, dass in den Kontrollfaeces zum Zeitpunkt (Wert) 0 eine 8-fach höhere Menge an Bakterien zu detektieren gab als in den Faeces der mit CNO behandelten Tiere.

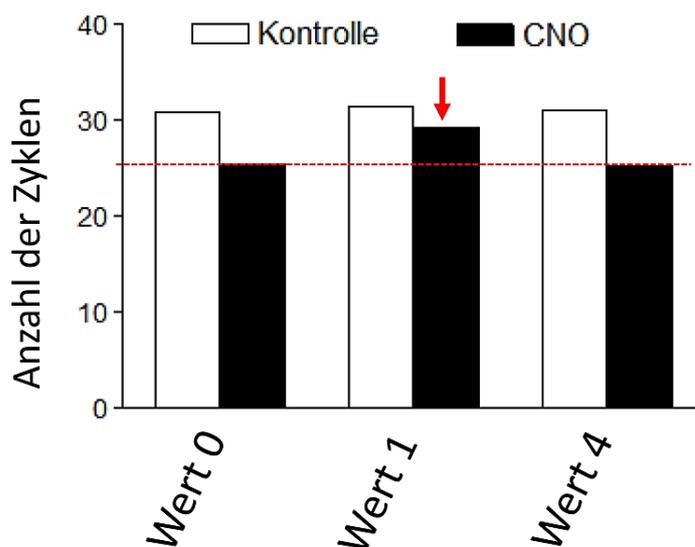


Abb. 3.28: Nachweis der relativen Bakterienmenge mittels Realtime-PCR in der F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x M1D1. Dargestellt ist die Änderung des amplifizierten V2-Primerpaares in der mit 1x PBS gefütterten Kontrollgruppe und den mit CNO gefütterten F1-Fliegen.

W0= NM vor der Behandlung
 W1 = 24 h auf dem manipulierten Medium
 W4 = 72 h Refeeding NM

Außerdem zeigt sich anhand des Refeedings, dass sich der Effekt der CNO Behandlung auf die Produktion von ROS und die damit korrelierende Menge an Bakterien in den Faeces, umkehren lässt. Denn es kommt nach einer 72-stündigen Fütterung auf normalem Medium wieder zu einem Anstieg der Gesamtbakterienmenge, was anhand der roten Linie in Abbildung 3.28 repräsentiert werden soll.

Um zu zeigen, dass das CNO tatsächlich einen Effekt auf die ROS-Produktion in den Fliegen hat und, dass Faeces sich wirklich für die nicht-invasive Manipulation via die medikamentöse Behandlung eignen, wurde auch für dieses Zeitexperiment eine 454-Sequenzierung durchgeführt.

Die Ergebnisse sind auch hier anhand der relativen Häufigkeiten der ermittelten Bakteriensequenzen in Abbildung 3.29 dargestellt. Leider ist hier anzumerken, dass es in den mit 1 x PBS gefütterten Kontrolltieren zu einer Kontamination mit der Bakteriengattung *Ralstonia* kam, hierbei handelt es sich um ein gramnegatives Bodenbakterium. Jedoch ändert dies nichts an der wesentlichen Aussage dieses Versuches, denn wie man erkennt, sind keinerlei Änderungen im Bakterienpool der Kontrollen sichtbar, die Fütterung von 1 x PBS-versetztem Medium allein hat keinen Effekt auf die bakterielle Zusammensetzung der Fliegenfaeces, dementsprechend zeigt auch das Refeeding keinerlei Effekt.

Anders sieht es bei den Proben aus, in denen 24 Stunden lang CNO gefüttert wurde. Hier ist auf den ersten Blick zu sehen, dass die Aufnahme von CNO zu einer Änderung im Bakterienpool der isolierten Faecesproben führt. Nach der Fütterung sind deutlich weniger Bakterien zu detektieren, die der Gruppe des *Enteric-Bacteria-Clusters* (grün) zuzuordnen sind. Nur noch knapp 20 % der detektierten Amplifikate entfallen auf die Gruppe dieser Darmbakterien, wo zum Zeitpunkt (Wert) 0 (vor der Behandlung) fast 90 % aller Amplifikate in diese Bakteriengruppe einzuordnen waren. Des Weiteren zeigt sich auch hier anhand des Refeeding-Experimentes, dass der CNO-Effekt umkehrbar zu sein scheint. 72 h nachdem die Fliegen wieder unbehandeltes Medium zu fressen bekamen, stieg die relative Häufigkeit der Darmbakteriengruppe wieder auf bis zu 70 % an.

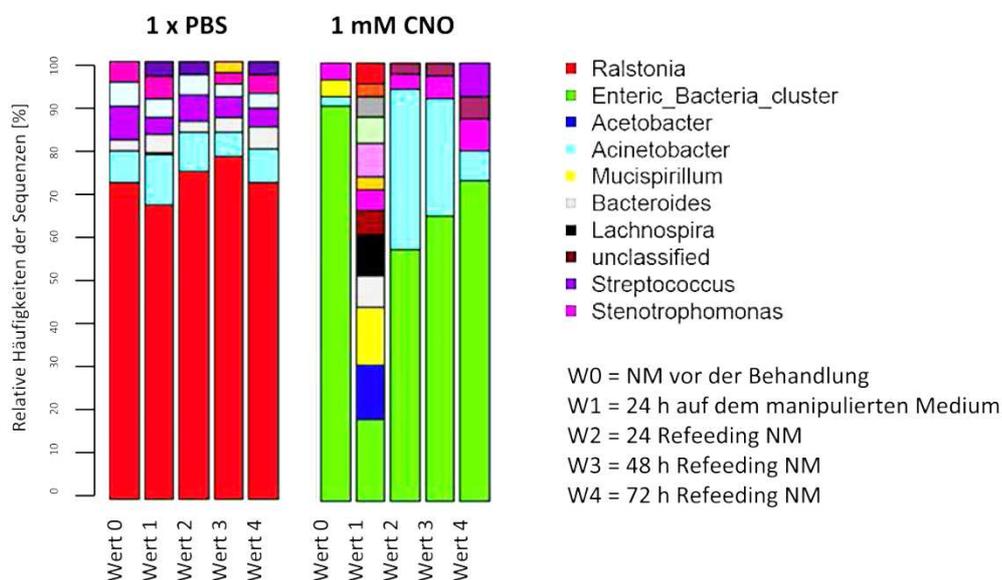


Abb. 3.29: Detektion der einzelnen Bakteriengruppen der behandelten F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x M1D1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels 454-Sequenzierung. In der linken Bildhälfte ist die Kontrollreihe mit dem 1xPBS-versetztem Medium dargestellt, auf der rechten Bildhälfte die Aktivierung des PLC β -Signalweges über die Zufütterung von 1mM CNO.

Die hier dargebrachten Ergebnisse unterstützen noch einmal die bereits getroffene Aussage, dass es möglich ist, den Faeces von *Drosophila* für Untersuchungen in Zeitreihenexperimenten wie hier unter der Behandlung von CNO zu verwenden.

Da bekannt ist, dass es bei der Infektion mit Pathogenen ebenfalls zu einer Aktivierung der NO-Synthase (NOS) kommen kann, sollte überprüft werden, ob es durch die künstliche Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies über die Behandlung mit CNO auch hier zu einer gesteigerten Aktivität der NOS kommt. Dies lässt sich einfach mittels einer Färbung unter Verwendung von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und NADPH als Reduktionsmittel nachweisen. Kommt es zu einer verstärkten Produktion von NOS, so wird dies anhand einer stark bläulichen Färbung kenntlich.

In Abbildung 3.30 sind die stereomikroskopischen Aufnahmen der Kontrollgruppe [A] und der mit CNO-behandelten Gruppe [B] repräsentiert. Es zeigt sich deutlich, dass es nach der Aktivierung des PLC β -Signalweges in den Enterozyten über den künstlichen Liganden CNO zu einer gesteigerten Produktion der NO-Synthase kommt. In den Kontrollen ist nur ein schwaches Signal erkennbar, bei dem es sich vermutlich um die konstitutive Expression von NOS unter Normalbedingungen handelt.



Abb. 3.30: Nachweis der NO-Synthase-Aktivität im Darm der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS- DREADD-M1D1. Die Tiere wurden jeweils für 24 Stunden auf dem präparierten Medium bei 25°C inkubiert. In [A] ist die Kontrolle mit PBS dargestellt, in [B] wurde der DREADD-Rezeptor mittels einer 1mM CNO-Fütterung aktiviert.

4 Diskussion

Das Darmepithel von *Drosophila* steht in ständigem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen. Einerseits handelt es sich dabei um Symbionten, die an der Nährstoffresorption beteiligt und somit unerlässlich für den Wirt sind, andererseits kommt es aber durch den ständigen Kontakt mit der Außenwelt, z.B. über die Nahrungsaufnahme, zur Einwanderung pathogener Organismen in das Epithel. Daher ist es notwendig, dass das Darmepithel mit Mechanismen ausgestattet ist, die eine Unterscheidung zwischen Bakterien der Darmflora und Pathogenen gewährleistet. Für diese Erkennung sind in der Fliege Rezeptoren des angeborenen Immunsystems verantwortlich. Kommt es zu einer spezifischen Bindung von z.B. Membranbestandteilen pathogener Bakterien, erfolgt eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden wie dem Toll- und dem IMD-Signalweg, die zur Produktion mikrobizider Effektormoleküle führen. Allerdings ist derzeit noch ungeklärt, ob die einzelnen Zelltypen des Darmepithels unabhängig voneinander reagieren bzw., ob sie unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen unterliegen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur zellspezifischen Immunabwehr im Darmepithel von *Drosophila* durchgeführt. Anhand oraler Infektionsexperimente und Überexpressionen unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems konnte zunächst gezeigt werden, dass es neben der klassischen Immunaktivierung über den bereits bekannten IMD-Signalweg zu einer Produktion antimikrobieller Peptide durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors dFoxO in den Enterozyten kommt. Dies ist deswegen besonders interessant, da bisher völlig ungeklärt ist, ob Enterozyten tatsächlich Teil des angeborenen Immunsystems sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Abwehrreaktion über die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies im Darmepithel eingeleitet wird. Dies erfolgt über die Aktivierung des Enzyms Duale Oxidase (DUOX), welches über den PLC β -Signalweg gesteuert wird. Daraus kann geschlossen werden, dass die Immunabwehr im Darmepithel der Tauflye über drei unterschiedliche Mechanismen gelenkt wird. Diese sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

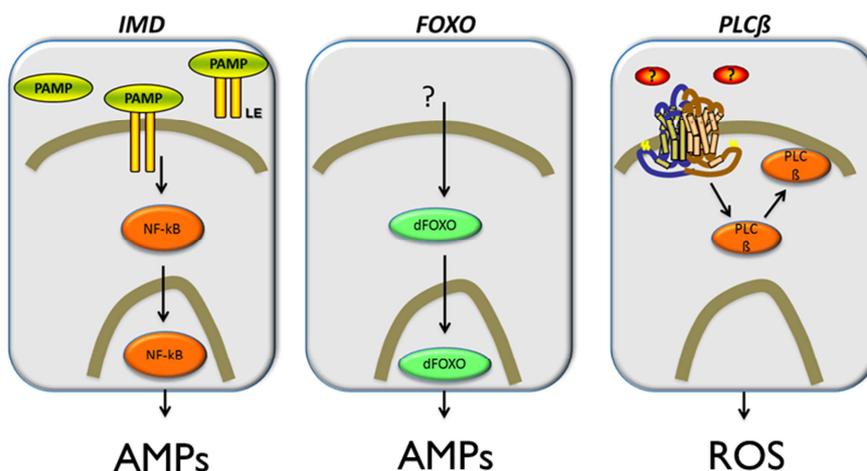


Abb. 4.1: Darstellung der drei Aktivierungsmechanismen, die eine Rolle bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen im Darm von *Drosophila* haben.

Eingehende Untersuchungen zum Gleichgewicht der bakteriellen Zusammensetzung im Darm der Taufliege zeigen ebenfalls die Bedeutung der ROS-Aktivierung zum Erhalt der Homöostase im Epithel. Die Etablierung eines Systems zur Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung in Faecesproben der Fliegen liefert die in diesem Zusammenhang besonders wertvolle Möglichkeit nicht-invasiv vorzugehen.

4.1 Zellspezifische Immunkompetenz im Darmepithel von *Drosophila melanogaster*

Der Mitteldarm von *Drosophila* setzt sich, wie bereits unter 1.3.2 erläutert, aus vier unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Jedoch ist über die spezifischen Eigenschaften dieser Zellen bei der Abwehr von Mikroorganismen noch nicht allzu viel bekannt. Daher habe ich die einzelnen Zellpopulationen in der vorliegenden Arbeit unter dem Aspekt der immunregulatorischen Aktivierung analysiert, und es zeigte sich, dass es deutliche Unterschiede in der Effektivierung der einzelnen Zelltypen gibt.

4.1.1 Der klassische NF- κ B-Signalweg IMD führt zur Aktivierung antimikrobieller Peptide in unterschiedlichen Zelltypen

Aus unterschiedlichen Studien ist bekannt, dass es im Zuge einer oralen Infektion mit Gram-negativen Bakterien wie *Serratia marcescens* oder *Erwinia carotovora* zu einer Produktion antimikrobieller Peptide über die Aktivierung des IMD-Signaltransduktionsweges im Darmepithel der Taufliege kommt (Nehme et al. 2007; Cronin et al. 2009; Basset et al. 2003; Tzou et al. 2000). Eine Erkennung der bakteriellen Membranstrukturen wie dem DAG-Typ Peptidoglykan erfolgt dabei über den membranständigen Rezeptor PGRP-LC (Aggarwal & Silverman 2008; Lemaitre & Hoffmann 2007) oder aber indirekt, indem der lösliche Rezeptor PGRP-LE das Peptidoglykan in der Hämolymphe bindet, um anschließend mit dem Membranrezeptor PGRP-LC zu interagieren. Um eindeutig zu definieren, welche Regionen im Darm mit einer Produktion antimikrobieller Peptide auf eine orale Infektion reagieren, wurden unterschiedliche Infektionsexperimente mit dem Gram-negativen Bakterium *Serratia marcescens* in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Zunächst konnte auch hier die Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie z.B. Drosomycin, Drosomycin-5 und Defensin mittels einer Microarray-Analyse nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expressionsrate bei Genen, die in den Toll-Signaltransduktionsweg involviert sind (PGRP-SA, Spätzle-4, Cactus) oder eine Funktion bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ausüben, wie die Superoxid-Dismutase, der Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor und die Phosphatidylinositol 3 Kinase 68D (zum Vergleich s. Tab. 3.1).

Außerdem konnte durch die Verwendung spezifischer AMP-Promotorlinien, welche GFP unter Kontrolle der jeweiligen Promotoren exprimieren (Tzou et al. 2000) gezeigt werden, dass der Proventrikulus als vorderste Struktur des Mitteldarms eine eindeutige Produktion der antimikrobiellen Peptide Defensin (Abb. 3.1) und Attacin (Abb. 3.2) in jeweils unterschiedlichen Zellpopulationen aufweist. Eine der Hauptaufgaben der peritrophen Matrix, die bei *Drosophila* von dem Proventrikulus gebildet wird, liegt in der Bildung einer semipermeablen Membran und somit der Bereitstellung einer weiteren physikalischen Barriere zur Abwehr pathogener Mikroorganismen (Lehane 2007). Die starke Expression der AMP-Gene im Proventrikulus deutet darauf hin, dass diese in die peritrophe Membran abgegeben werden und somit eine ortsgebundene Abwehr vor dem Epithel ermöglichen und ein Eindringen von Mikroorganismen in die Epithelzellen verhindern können. Jüngst konnte gezeigt werden, dass in *Drosophila* das Protein Drosocrystallin (Dcy) entscheidend an der Bildung der peritrophen Membran beteiligt ist. In *Dcy-loss-of-function* Mutanten konnte eine erniedrigte Bildung der peritrophen Membran gezeigt werden, sie zeigte eindeutig eine geringere Dicke und wies eine erhöhte Durchlässigkeit für Bakterien auf. Nach der oralen Infektion mit den Bakterien *Serratia marcescens* und *Pseudomonas entomophila* kam es zu einer gesteigerten Produktion antimikrobieller Peptide über die Aktivierung des IMD-Signaltransduktionsweges, woraus sich schließen lässt, dass die peritrophe Membran selbst deutlich einen Einfluss auf die Abwehr pathogener Bakterien über die Bildung mikrobizider Wirkstoffe hat (Kuraishi et al. 2011). Dies stimmt mit den hier dargestellten Ergebnissen überein. Damit übernimmt die peritrophe Matrix eine zum Mukus des Darmepithels des Menschen homologe Funktion. Auch im Mukus des menschlichen Darms befinden sich antimikrobielle Peptide, insbesondere α -Defensine, die von den Paneth-Zellen sezerniert werden (Ayabe et al. 2000). Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass nur diejenigen Keime in Berührung mit AMPs kommen, die auch tatsächlich versuchen, in das Epithel einzudringen.

Zur genauen Lokalisation der über den IMD-Signalweg gesteuerten Zellpopulationen im Mitteldarm wurde der lösliche Mustererkennungsrezeptor PGRP-LE im gesamten Darm überexprimiert. Über die Einbeziehung eines Drosomycin::GFP-Reporterkonstrukts, konnten anhand des GFP-Signals die antwortenden Zellpopulationen identifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden bereits unter 3.1.3 (Abb. 3.15. und 3.16) vorgestellt und auch hier lässt sich zeigen, dass es im Proventrikulus zu einer gesteigerten Produktion von Drosomycin kommt. Doch es gibt eine weitere Zellregion, die eine starke Aktivierung über den IMD-Signalweg erfährt. Bei der in Abbildung 3.16 [D-F] dargestellten Zellpopulation handelt es sich um Kupferzellen. Dies sind sezernierende Zellen im vorderen Mitteldarm der Taufliege, welche der Detoxifikation und des Ansäuerns des Nahrungsbreies dienen (Dubreuil 2004) (z. Vgl. s. 1.3.2). Diese Zellen sind nicht nur den Becherzellen des Magens im Menschen funktionell ähnlich, sondern auch den bereits oben erwähnten Paneth-

Zellen im Dünndarm des Menschen. Durch ihren morphologischen Aufbau, gekennzeichnet durch einen invaginierten Hohlraum, der über einen kleinen Porus mit dem Darmlumen in Kontakt steht, stellen die Zellen sich selbst als eine Art Krypte im Fliegenepithel dar (Abb. 3.18). Genauso verhält es sich im Grunde bei den Paneth-Zellen im Dünndarm der Vertebraten, in dem dieser Zelltyp in den Lieberkühnschen Gruben der einzelnen Darmkrypten lokalisiert ist. Neben strukturellen Gemeinsamkeiten, zeigen beide Zelltypen ein sehr ähnliches Repertoire an Proteinen wie den antimikrobiellen Peptiden, Lysozymen, Metallothioneinen und der löslichen Phospholipase A₂ (sPLA₂). Ein Nachteil dieser räumlichen Struktur der Kupferzellen in *Drosophila* ist jedoch, dass sie eine nahezu ideale Nische für kolonisierende Bakterien darstellen, die über den Porus einwandern können und somit nicht mehr mit dem Darminhalt weitertransportiert werden. Dieses Verhalten konnte in einer Studie nach der oralen Infektion mit dem Bakterium *Serratia marcescens* nachgewiesen werden (Nehme et al. 2007). Daher bedarf es besonders in diesen Zellen einer effektiven Möglichkeit der bakteriellen Abwehr über antimikrobielle Peptide. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in einem Zeitreihenexperiment nach der oralen Infektion mit *Serratia marcescens* eine deutlich gesteigerte Aktivität des IMD-Signalweges in den Kupferzellen nachgewiesen werden. Durch den immunhistochemischen Nachweis mit einem spezifischen Antikörper, wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors Relish im Kern dieser Zellen eindeutig aufgezeigt (Abb. 3.8). Diese Zellen müssen sich, aufgrund ihrer strukturellen Besonderheiten vor einer Infektion schützen, da der Hohlraum, den sie bilden einen nahezu optimalen Ort für eindringende Bakterien darstellt. Im gesamten Epithel (vor allem in den Enterozyten) sind allerdings Regulationsprozesse aktiv, die eine dauerhafte Produktion mikrobizider Effektoren eindämmen, vermutlich auch um die endogene bakterielle Flora zu schützen. Dieser Kontrollprozess wird in der Fliege über einige Mustererkennungsrezeptoren der PGRP-Familie gewährleistet, im Speziellen handelt es sich dabei um PGRP-LB, PGRP-SC1 und PGRP-SC2, da diese eine Amidase-Aktivität besitzen (Bischoff et al. 2006; Zaidman-Rémy et al. 2006). Diese PGRPs können Peptidoglykan der Bakterien schneiden, und somit ein Auslösen der Immunabwehr verhindern. Da es auch in den hier durchgeführten Versuchen nach Infektion des Wildtypen zu einer verstärkten Expression von PGRP-SC2 kommt, ist davon auszugehen, dass der korrespondierende Rezeptor im Zuge der Infektion für die Regulation des IMD-Signalweges verantwortlich ist (s. Tab 3.1). Alternativ ist eine Regulation der Abwehr über eine verstärkte Expression von *caudal* beschrieben, was die Aktivität der NF-κB Faktoren im Darmepithel unterdrückt (Ryu et al. 2006).

Neben den bereits beschriebenen Strukturen, wie Proventrikulus und Kupferzellregion, wird von der chronischen Aktivierung des IMD-Signalweges noch ein weiterer Zelltypus angesprochen. In Abbildung 3.16 [G,H] lassen sich anhand des GFP-Signals kleine, dem Epithel aufgelagerte Zellen nachweisen, welche ebenfalls antimikrobielle Peptide exprimieren. Diese Zellen zeigen die typische morphologische Struktur intestinaler

Stammzellen von *Drosophila*. Bisher ist wenig darüber bekannt, ob Stammzellen im intestinalen Epithel selbst eine Rolle in der Abwehrreaktion spielen bzw., ob dieser Zelltyp zur Produktion antimikrobieller Peptide im Stande ist und warum eine solche Peptidsynthese in diesem Zelltyp überhaupt von Interesse sein könnte. Grundsätzlich dient die Differenzierung der Stammzellen zur Erneuerung von Epithelzellen und somit zum Erhalt eines intakten Epithels, um eine gleichbleibende Resorption über Enterozyten und die sekretorische Signalvermittlung über enteroendokrine Zellen zu gewährleisten (Micchelli & Perrimon 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass Stammzellen nach oraler Infektion eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen (Buchon et al. 2009; Buchon et al. 2010) und auch, dass ein geschädigtes Epithel durch den Verlust von Enterozyten eine Aktivierung der Stammzellproliferation induzieren kann (Amcheslavsky et al. 2009). In der Regel werden alternde ausdifferenzierte Zellen des Mitteldarms in der Fliege aus Stammzellen neu generiert, welche größtenteils im posterioren Mitteldarm lokalisiert sind (Micchelli & Perrimon 2006; Ohlstein & Spradling 2006). Hierbei kommt es zu einer asymmetrischen Teilung der Zellen, indem sowohl eine neue intestinale Stammzelle gebildet wird, als auch eine unreife, undifferenzierte Tochterzelle, der Enteroblast (EB). Die so gebildeten Enteroblasten können sich entweder zu Enterozyten oder enteroendokrinen Zellen entwickeln (Micchelli & Perrimon 2006; Ohlstein & Spradling 2006). Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Stammzellen in *Drosophila* spielt der Notch-Signalweg. Die Aktivierung von Notch in den generierten Enteroblasten ist notwendig, um eine weitere Stammzellproduktion zu unterbinden und um die Entwicklung von Enterozyten zu fördern bzw. die Entstehung von enteroendokrinen Zellen zu verhindern (Wang & Hou 2010). Um nun zu zeigen, dass es sich bei den AMP-produzierenden Zellen tatsächlich um intestinale Stammzellen handelt, wurde sich die spezifische Expression von Delta in neu generierten Stammzellen zu Nutze gemacht, indem die Überlappung der Expression von Drosomycin und Delta gezeigt werden konnte (Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Im Jahr 2011 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen Stammzellen und der Expression antimikrobieller Peptide zufällig erkannt. Die Arbeitsgruppe um Michael Boutros wollte überprüfen, ob der RAS/MAPK-Signalweg einen inhibierenden Einfluss auf den IMD-Signalweg ausübt. Sie konnten zeigen, dass das Ausschalten des Proteins Ras85D zu einer gesteigerten Produktion von Diptericin führt und, dass es in Diptericin-lacZ-Linien mit einem für Ras85D inserierten RNAi-Konstrukt zu einer Diptericin-Expression in allen Zellen des Mitteldarms kommt, im Speziellen aber in den intestinalen Stammzellen. Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass auch eine Überexpression von Ras85D zu einer gesteigerten Proliferationsrate der Zellen im adulten Fliegendarm führt (Ragab et al. 2011). Die Produktion antimikrobieller Peptide wie Drosomycin (nachgewiesen in der vorliegenden Arbeit) oder Diptericin (Ragab et al. 2011) könnte aber grundsätzlich eine Schutzfunktion haben, sozusagen als Wächter der Epithelerneuerung. Denn im Zuge einer Infektion und einer damit einhergehenden

gesteigerten Proliferation besteht die Gefahr einer Zerstörung der soeben neu generierten Zellen und somit wäre die Folge eine Störung des epithelialen Gleichgewichtes.

Zu bemerken ist schließlich noch, dass es bei einer darmweiten, chronischen Aktivierung des IMD-Signalweges nicht zur Synthese antimikrobieller Peptide in den Enterozyten des Darmepithels kommt. Da jedoch vermutet wird, dass auch dieser Zelltyp eine immunregulatorische Funktion hat, wurde in den weiteren Versuchen nach alternativen Signalwegen gesucht, die einen entsprechenden Effekt auf die Abwehrreaktionen in diesen Zellen haben könnten.

4.1.2 Der Transkriptionsfaktor dFoxO als alternativer Regulator der Immunabwehr in den Enterozyten

Da es in den Enterozyten keinen Einfluss des IMD-Signalwegs zu geben scheint, aber davon auszugehen ist, dass auch die Enterozyten selbst befähigt sind, sich vor Pathogenen zu schützen, haben ich die Hypothese aufgestellt, dass der Transkriptionsfaktor dFoxO hier eine tragende Rolle einnimmt. Wie bereits unter 1.3.3 beschrieben, ist dFoxO grundsätzlich an der nahrungsbezogenen Signaltransduktion beteiligt sowie an der Transkription spezifischer Gene als Antwort auf oxidativen Stress (Brunet et al. 2004; Hwangbo et al. 2004). Daraus folgt, dass die Expression von dFoxO als Indikator für eine Stressantwort steht und für die Steuerung einer stressinduzierten Abwehr zuständig ist. Um die Rolle von dFoxO bei der Immunabwehr von Pathogenen in Enterozyten aufzuklären, wurden orale Infektionsexperimente mit *Serratia marcescens* durchgeführt. Unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems konnten spezifisch die beiden Transkriptionsfaktoren dFoxO und Relish in den Enterozyten ektopisch exprimiert werden. Die beiden Transkriptionsfaktoren waren an Fluoreszenzreporter gekoppelt, um den Nachweis der Translokation nach einer Infektion mikroskopisch darstellen zu können. Wie sich anhand der Abbildung 3.5 eindeutig darstellt, kommt es zu keiner Translokation von Relish im Zuge der Infektion. dFoxO hingegen zeigt eine Translokation in den Kern als Reaktion auf eine intestinale Infektion. Um sicher zu stellen, dass es sich hier nicht um ein Artefakt aufgrund der Verwendung des Gal4/UAS-Systems handelt, wurde auch der Wildtyp w^{1118} im Zuge eines Zeitreihenexperimentes untersucht und die Lokalisation der beiden Transkriptionsfaktoren mittels spezifischer Antikörper zeitgleich detektiert. Es konnte auch mittels dieser immunhistochemischen Analyse keinerlei Translokationsaktivität von Relish in den Enterozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.7, rot), jedoch die Translokation des α -dFoxO Signals vom Zytoplasma in den Zellkern (Abb. 3.7, grün). Eine Infektion mit Bakterien führt höchstwahrscheinlich zur Freisetzung sog. Gefahrensignale, die eine Aktivierung von dFoxO auslösen können. Ob die Aktivierung von dFoxO ausreicht, um eine intestinale Immunantwort zu erzeugen, habe ich mit

Überexpressionsanalysen untersucht. Die Überexpression von *dfoxo* in den Enterozyten führte zu einer stark gesteigerten Transkription nahezu aller Antimikrobiellen Peptidgene, wohingegen diejenige des Mustererkennungsrezeptor PGRP-LE lediglich einen sehr kleinen Effekt auf die Transkription des *defensin*-Gens ausübt (s. Abb. 3.14). Es stellt sich nun die Frage, worin die Vorteile bzw. Nachteile einer Induktion der Antimikrobiellen Peptidsynthese durch den Transkriptionsfaktor dFoxO liegen und warum der IMD-Signalweg und der hierfür essentielle Transkriptionsfaktor Relish keinerlei Einfluss auf die Produktion ausüben.

In den Enterozyten des humanen Dünndarms wird die Synthese antimikrobieller Substanzen über die Aktivierung des zellulären Mustererkennungsrezeptors NOD2 ausgelöst. Dieser erkennt intrazelluläre Signale pathogener Organismen und führt zu einer Produktion insbesondere von α -Defensinen (Gersemann et al. 2012). In den meisten wirbellosen Organismen, vor allem in *Drosophila*, sind hingegen keine homologen Strukturen zu den NOD-like Rezeptoren bekannt. Ich vermute daher, dass dFoxO als intrazellulärer Effektor eine funktionell ähnliche Rolle in den Enterozyten übernimmt, wie die NOD-like Rezeptoren der Wirbeltiere. Durch eine derartige Architektur würde gewährleistet sein, dass eine intestinale Immunantwort nur dann induziert wird, wenn das Epithel geschädigt wird, d.h. Bakterien in das Epithel eindringen möchten. Das Erkennen bakterieller Muster wäre demgegenüber nicht sinnvoll, da es eine Unterscheidung zwischen pathogenen und nützlichen Bakterien nicht ermöglicht. Andere Studien konnten ebenfalls belegen, dass es insbesondere im Zuge einer Änderung in der Nährstoffzufuhr wie z.B. unter Hungerbedingungen, zu einer gesteigerten Expression AMP-kodierender Gene im Gewebe kommen kann. Daraus lässt sich folgern, dass eine Produktion antimikrobieller Peptide durch dFoxO besonders in Zeiten schlechter Energiebilanzen zu einem Erhalten der Abwehrbarriere dienen kann (Becker et al. 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass dFoxO auch in humanen Zelllinien der entscheidende Transkriptionsfaktor bei der IIS-abhängigen Bildung von Defensinen ist (Becker et al. 2010). Andererseits stellt sich die Frage, welcher Regulationsprozess hier eingreift, um eine Überproduktion von antimikrobiellen Substanzen zu unterbinden.

Aufgrund der Annahme, dass die Immunabwehr in den Enterozyten über die Aktivierung von dFoxO gesteuert wird und somit nicht nur Membranbestandteile pathogener Organismen zu einer Aktivierung führen, sondern auch andere Gefahrensignale, lässt sich folgern, dass der IMD-Signalweg keine tragende Rolle bei der Abwehr in diesem Zelltypen spielt.

4.1.3 Das Enzym DUOX steuert die Abwehr pathogener Organismen über die Produktion von ROS

Wie bereits oben erwähnt, gibt es noch eine weitere Möglichkeit den Organismus vor pathogenen Bakterien zu schützen, indem sie über Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inaktiviert werden. Da die Produktion von ROS über den PLC β -Signalweg aktiviert wird, wurde in einem ersten Versuch die gesteigerte Aktivität von PLC β nach oraler Infektion mit *Serratia marcescens* nachgewiesen. Unter Verwendung des Gal4/UAS-Systems wurde eine F1-Generation hergestellt, in der es zur Expression des PLC β s in den Enterozyten des Darmepithels kommt. Aufgrund der Kopplung von PLC β mit einem roten Fluoreszenz-Reporter gen, war eine fluoreszenzmikroskopische Detektion möglich. Wie in Abbildung 3.6 gezeigt, ist PLC β unter normalen Bedingungen zytoplasmatisch in der Zelle verteilt (Abb. 3.6 [A,C]). Nach einer oralen Infektion kommt es jedoch zu einer Aktivierung der PLC β , gefolgt von ihrer Rekrutierung an die Plasmamembran. Entsprechend des unter 1.3.1.3 beschriebenen Signalweges handelt es sich hier um den Wirkungsort der Phospholipase. Sie wandelt das in der Plasmamembran verankerte Phospholipid PIP $_2$ in DAG und IP $_3$ um. Daraufhin erhöht sich der Anteil von IP $_3$ im Zytoplasma und führt als *second messenger* zu einer Freisetzung von Ca $^{2+}$ -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma (Thore et al. 2005).

Um des Weiteren die dadurch gesteigerte Produktion von ROS zu erklären, wurde ein Nachweis der gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies mit DHE durchgeführt. Durch die Oxidation von DHE durch ROS kommt es zu einer Bindung des Farbstoffes 2-Hydroxyethidium mit den Nukleinsäuren im Kern der Zellen (Amir et al. 2008). Für den Nachweis wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezielle DREADD-UAS-Linie verwendet. DREADD steht für Designer Receptor Exclusively Activated by a Designer Drug, d.h. es handelt sich hierbei um einen künstlich eingebrachten Rezeptor in der Effektorlinie der Fliege, welcher nur über einen spezifischen Liganden aktiviert werden kann und darüber eine Signalkaskade in der Zelle auslöst. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um die Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*GPCRs*, *G-Protein-coupled receptors*). Die Rezeptor-Typen sind ubiquitär in Wirbeltieren und auch Wirbellosen verteilt und kommen im gesamten Organismus in den verschiedensten Geweben vor und sind für die Aktivierung unterschiedlichster Signalwege unerlässlich. Mit dem Einbringen eines künstlichen Rezeptors, der nur über die Bindung eines spezifischen Liganden gesteuert wird, besteht die Möglichkeit die verschiedenen Signalwege ganz spezifisch zu aktivieren. In dem hier verwendeten System wurde in die *Drosophila* Effektorlinie ein Gen, kodierend für den humanen muskarinen Acetylcholinrezeptor 4 eingefügt, der nicht mehr über seinen Liganden, das Acetylcholin, aktiviert wird, sondern nur über das Pharmakon Clozapin-N-Oxid (CNO). Bringt man den Rezeptor unter die Abhängigkeit der UAS-Sequenz und bringt diesen über die Kreuzung mit einer gewebsspezifischen Treiberlinie in

räumliche Nähe zu seinem Transkriptionsfaktor Gal4, so ist es möglich einen spezifischen Signalweg in der F1-Generation über die Fütterung von CNO zu induzieren (Pei et al. 2008; Armbruster et al. 2007; Nawaratne et al. 2008; Nichols & Roth 2009). Der hier verwendete Rezeptor führt ausschließlich zu einer Aktivierung der PLC β und letztlich zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen in das Zytoplasma. Wie in Abbildung 3.27 aufgezeigt, kommt es in den mit CNO-aktivierten Epithelzellen zu einer Verlagerung des detektierten Fluoreszenzsignales vom Zytoplasma in den Zellkern (Abb. 3.27 [A-F]), was auf eine gesteigerte Produktion von ROS hinweist. Auch in den Kontrollen (Abb. 3.27 [G-L]) kommt es zu einem schwachen Signal in den Zellkernen, allerdings ist hier das Fluoreszenzsignal im Zytoplasma eindeutig stärker als in den mit CNO-behandelten Tieren, was für eine geringere Oxidationsrate des DHE-Farbstoffes spricht. Ein schwaches Signal in den Kontrollen lässt sich außerdem nie vollends ausschließen, da es auch über die Atmungskette zur Bildung von ROS kommt (Dröge 2002). Anhand dieser Versuche lässt sich schließen, dass die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies ein Mechanismus zur Abwehr gegen Pathogene darstellt, dessen natürliches „Eingangssignal“ bislang allerdings nicht bekannt ist. Eine derartige Reaktion ist insbesondere auch bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen der unterschiedlichsten Gewebe von Bedeutung. Auch im Lungenepithel konnte ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von z.B. COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*), der damit einhergehenden Produktion pro-inflammatorischer Signalmoleküle und einer gesteigerten Produktion von ROS, vermittelt über NADPH-Oxidasen gezeigt werden (Lee & Yang 2012). In der Fliege findet eine Regulation der Produktion von ROS als systemische Antwort auf eine Infektion mit Mikroorganismen über die Enzyme NOX und DUOX statt (Bae et al. 2010). Ein Zusammenhang zwischen den beiden Enzymen NOX und DUOX konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. In den mit CNO-behandelten Därmen der F1-Generation konnte die Produktion von ROS und damit die Aktivität des Enzyms DUOX nachgewiesen werden. Außerdem konnte die Aktivität der NO-Synthase mittels einer einfachen Farbreaktion unter Verwendung von NBT und dem zugehörigen Reduktionsmittel NADPH ebenfalls eindeutig als Antwort auf eine DUOX vermittelte ROS-Produktion gezeigt werden. Daraus lässt sich folgern, dass es zu einer Aktivierung von NOS über die gleichzeitig verstärkte Aktivität von DUOX kommt und beide an der Regulation der ROS-Bildung beteiligt sind.

4.2 Die Rolle der Mikrobiota im Darmepithel von *Drosophila*

Der Darm der Metazoen beherbergt eine Vielzahl unterschiedlichster Mikroorganismen, die eine entscheidende Rolle für den Erhalt des Energiegleichgewichtes spielen. Die Zusammensetzung spiegelt die Koevolution zwischen Wirt und Mikroorganismus wider und stellt letztendlich eine für beide Partner gewinnbringende Situation dar. So unterstützen die Symbionten den Wirt insbesondere bei der Verdauung von z.B. Zuckermolekülen und kurzen Fettsäuren (Moens & Veldhoen 2012; Bäckhed et al. 2004; Hooper et al. 2002), während die Symbionten selbst Intermediate des Stoffwechsels für sich in Anspruch nehmen können und sie außerdem eine Nische für ihr Dasein erhalten. Außerdem scheinen diese Organismen einen positiven Effekt auf das Epithel auszuüben, indem sie einen Schutz vor der Besiedlung mit Pathogenen ermöglichen (Hooper & Macpherson 2010b; Mahida 2004). Kommt es allerdings aufgrund einer Entzündungsreaktion, z. B. durch eingewanderte pathogene Mikroorganismen oder durch die starke Vermehrung der eigenen Darmflora, zu einer drastischen Änderung des Wirt-Symbionten-Gleichgewichtes im Darmepithel, besteht eine erhöhte Präferenz für die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa*. Außerdem kann so auch Fettleibigkeit entstehen und es können Veränderungen auftreten, die bis hin zu Tumorbildung reichen (Bäckhed et al. 2004; Serino et al. 2009; Plottel & Blaser 2011). Um nun Untersuchungen zu der Interaktion von Wirt und Symbiont durchzuführen bzw. den Einfluss der Mikrobiota auf den Wirt besser zu verstehen, eignen sich einfache Modellorganismen sehr gut. Im Allgemeinen ist ihre mikrobielle Zusammensetzung weniger komplex als diejenige höherer Wirbeltiere (Fraune & Bosch 2007). Deshalb stellt die Taufliege ein nahezu ideales Modell für die vertiefende Analyse des Zusammenspiels von Mikrobiota und Immunabwehr dar. Das ergibt sich einerseits aus der sehr einfachen mikrobiellen Gesellschaft des Fliegendarms und andererseits aus den nahezu unerschöpflichen Möglichkeiten, verschiedenste Aspekte der Fliege zu manipulieren (Duffy 2002; McGuire et al. 2003; Phelps & Brand 1998; Roman et al. 2001; Suster et al. 2004; Venken & Bellen 2005, 2007; Venken et al. 2011).

4.2.1 Eine induzierte Aktivierung von Reaktiven Sauerstoffspezies führt zu einer Veränderung im Mikrobiom der Taufliege

Von besonderem Interesse für das Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Symbiont sind diejenigen Mechanismen des Wirts, die das mikrobielle Gleichgewicht und die damit verbundene Energiehomöostase sowie ein intaktes Epithel bewahren. Wie

bereits erwähnt wurde, kommt dem PLC β -Signalweg bei der Abwehr gegen Mikroorganismen aufgrund der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies über das Enzym DUOX eine tragende Rolle zu (*zum Vgl. s. 4.1.3*). Um nun den Einfluss von ROS auf die im Normalzustand vorherrschende Mikrobiota zu untersuchen, wurde eine induzierte Produktion von ROS über die Gabe von CNO in den Därmen der F1-Generationen derjenigen Fliegen hervorgerufen, die einen DREADD-Rezeptor exprimieren, der nach Aktivierung zur Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels führt. Mittels eines Zeitreihenexperimentes wurde hierbei anhand der 454-Sequenzierung überprüft, ob sich die bakterielle Zusammensetzung durch diese Intervention verändert und, ob es sich hierbei um einen reversiblen Prozess handelt. Um keinerlei Einfluss auf die Gesamtphysiologie des Tieres zu nehmen, wurde Faeces für die Untersuchungen verwendet, da davon auszugehen ist, dass diese Proben die bakterielle Zusammensetzung im Fliegendarm widerspiegeln (*s. 4.2.2*).

Betrachtet man die in Abbildung 3.29 dargestellten Ergebnisse der 454-Analyse so wird deutlich, dass die Kontrollgruppe, gefüttert mit 1 x PBS manipuliertem Medium, keinerlei Änderung der bakteriellen Zusammensetzung innerhalb der Experimente aufweist. Die prozentualen Anteile der detektierten Bakterien sind vor, während und nach der Behandlung mit PBS annähernd gleich. Ein anderes Bild zeigt die Gruppe der mit CNO-behandelten Fliegen. Hier kommt es nach der CNO-Fütterung zu einer deutlichen Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung in den Faeces Proben, was den aktivierenden Effekt von CNO auf die Produktion von ROS widerspiegelt. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass diese Intervention, die einer natürlichen Reaktion sehr nahe kommt, reversibel ist. Dies beweist grundsätzlich noch einmal, wie wichtig diese Regulationsprozesse bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sind, um das Gleichgewicht auf Dauer zu erhalten (Ha et al., 2009).

Da bekannt ist, dass es bei Patienten, die an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung leiden, zu einer Veränderung der Darmflora kommt (Blaut & Clavel 2007; Frank et al. 2007; Scanlan & Marchesi 2008), sind Untersuchungen die sich den diesbezüglichen Grundlagen widmen von zunehmendem Interesse. Da man außerdem davon ausgeht, dass die Ausprägung dieser Krankheitsbilder besonders mit einer gesteigerten Immunabwehr gegen wirtsspezifische Mikroorganismen einhergeht (Reiff & Kelly 2010b), steht die Frage im Raum, ob es zu einer gesteigerten Abwehrreaktion des eigenen Immunsystems aufgrund der geringeren Bakterienvielfalt und dem Fehlen spezifischer Erkennungskomponenten des Immunsystems kommt, weil z.B. keine „neuen“ bakteriellen Muster erkannt werden. Alternativ könnte die geringere Vielfalt darauf beruhen, dass das stetig aktivierte Immunsystem viele Bakterien spezifisch abtötet.

Im Menschen werden Untersuchungen des Mikrobioms häufig mit Faeces Proben durchgeführt. Das Verwenden von Faeces Proben hat den großen Vorteil, dass die Probennahme nicht-invasiv erfolgt und, dass es möglich ist, Proben einer gleich bleibenden Patientenkohorte zu untersuchen und die mikrobielle Entwicklung während des Krankheitsverlaufes zu beobachten bzw. die Wirkung bestimmter medikamentöser Behandlungen nachzuverfolgen.

Um den hier vorgestellten Versuch überhaupt durchführen zu können, war es nötig ein System zu etablieren, indem eine nicht-invasive Manipulation der Fliegen möglich ist. Dies wird im Folgenden unter 4.2.2 diskutiert.

4.2.2 Etablierung eines Systems zur Untersuchung der bakteriellen Zusammensetzung im Darms von *Drosophila*

Wie unter 1.3.4 einleitend erläutert, werden immer häufiger Studien zum Mikrobiom von *Drosophila* durchgeführt. Zum einen erfolgt das, um einen Überblick über die bakterielle Vielfalt im Darm der Fliege zu erhalten (Wong et al. 2011) und zum anderem um den Einfluss der vorherrschenden Symbionten auf physiologische Prozesse wie Alterung und Fitness zu untersuchen (Brummel et al. 2004; Storelli et al. 2011; Shin et al. 2011). Ein anderer Aspekt, der hierbei im Mittelpunkt des Interesses steht, ist der Einfluss des Mikrobioms auf die Immunabwehr im Zuge einer verstärkten Stammzellproliferation (Ryu et al. 2008; Lhocine et al. 2008; Buchon et al. 2009).

Ein wesentliches Problem, dem all diese Untersuchungen unterliegen, ist darin zu sehen, dass Mikrobiom-Untersuchungen ganze Fliegen oder isolierte Därme erfordern, was immer mit dem Tod der Tiere einhergeht. Außerdem ist es möglich, dass die eigentlich entscheidenden Bakterienspezies im Darm der Tiere durch in anderen Geweben vorherrschende Bakterienarten überlagert werden. Ein besonderes Problem scheinen hierbei Infektionen mit Bakterien der Gattung *Wolbachia* darzustellen (Clark et al. 2005). In den hier vorgestellten Untersuchungen konnten eine vergleichbare Abhängigkeit gezeigt werden. Um diese Problem zu umgehen und gleichzeitig eine Methode zu etablieren, die nicht-invasiv ist, wurde die Möglichkeit evaluiert, Mikrobiom-Analysen mit Hilfe von Faeces Proben durchzuführen.

Um einen Überblick über alle in den Geweben vertretenden Bakteriengruppen zu erhalten, wurde mit den isolierten gDNA Proben aus ganzen Fliegen, isolierten Därmen und Faecesproben einer kleinen Fliegenkohorte eine Analyse mittels der 454-Sequenzierung durchgeführt. Das erfolgte nach Amplifikation einer variablen Region der 16S rRNA, als Standardmethode für die Charakterisierung von Bakterien (Woese 1987).

Die in Abbildung 3.23 dargestellte Grafik, in der die Verteilung der detektierten Bakterien in Relation zu der Gesamtzahl an gelesenen Sequenzen dargestellt ist, zeigt deutlich, dass das Typisieren auf der Basis der 16S rRNA sehr empfindlich ist und stark auf eine Kontamination bzw. Infektion mit Bakterien reagiert. Auch in dem vorgestellten Experiment konnte eine *Wolbachia* Infektion insbesondere im Laborstamm w¹¹¹⁸ nachgewiesen werden. Dies ist ein bekanntes Phänomen, welches auch in einer Vielzahl natürlich vorkommender Populationen auftritt (Clark et al. 2005; Hedges & Johnson 2008). Zunächst wurde stets davon ausgegangen, dass eine Infektion mit dem von der Mutter übertragenden Bakterium *Wolbachia* nur in den Reproduktionsorganen vorherrscht, doch spätere Studien konnten aufzeigen, dass auch somatisches Gewebe von einer Infektion betroffen sein kann, so z.B. der Darm der Tiere (Saridaki & Bourtzis 2010). Anhand der hier durchgeführten Analyse konnte dieses Postulat eindrucksvoll bestätigt werden. Bei den aus Darmproben des Stamms w¹¹¹⁸ isolierten DNA-Populationen sind mehr als 90 % *Wolbachia*-spezifisch. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die Sequenzierung des Mikrobioms der Darmproben schwerlich Aufschluss über die tatsächliche Zusammensetzung der Mikrobiota in diesem Gewebe ergibt. Betrachtet man nun die DNA-Populationen aus den Faecesproben, so zeigt sich ein anderes Bild, welches Aufschluss über die tatsächliche bakterielle Gemeinschaft im Darmlumen ermöglicht. In den Faeces lassen sich fünf unterschiedliche Hauptcluster bakterieller Gruppen nachweisen, was mit den Ergebnissen von Wong et al, (2011) übereinstimmt, obwohl in dieser Studie isolierte Därme verwendet wurden. Wesentlich interessanter ist jedoch der Aspekt, dass weder in den Faecesproben von w¹¹¹⁸ noch von Canton S *Wolbachia* zuzuordnende Signaturen auftraten. Daraus ist zu folgern, dass sich Faeces hervorragend als Material zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften des Darms eignet, da sie zum einen die tatsächliche Situation des Mikrobioms widerspiegeln und zum anderen frei von infizierenden intrazellulären Bakterien wie *Wolbachia* sind. Auch Untersuchungen mit Hilfe der qPCR konnten diese Schlussfolgerungen unterstützen (Abb. 3.25). Faeces kann die Situation im Darm widerspiegeln und somit in der Tat für Studien zum Einfluss der Mikrobiota auf physiologische Prozesse und die Immunabwehr herangezogen werden. Der wohl größte Vorteil dieser Methode ist allerdings die Tatsache, dass die Methode nicht-invasiv ist. Das ermöglicht es, ein und dieselbe Population von Fliegen mehrfach zu analysieren und somit komplexe Versuchsprotokolle zu realisieren.

4.3 Fazit

Aus den hier vorgelegten Untersuchungen lässt sich zunächst schließen, dass sich *Drosophila* hervorragend für die Untersuchung der immunassoziierten Regulationsmechanismen im Darmepithel eignet. Die angeborene Abwehr setzt sich aus

verschiedenen Modulen zusammen, die in unterschiedlichen Zelltypen aktiv sind. Die konventionelle Immunabwehr, die auf der Erkennung bakterieller Komponenten basiert, ist auf wenige, besondere Zellgruppen beschränkt. Weit wichtiger scheint die dFoxO vermittelte Immunantwort zu sein. Dadurch erfolgt eine primär stressinduzierte Abwehr in den Enterozyten. Auslösende Signale sind hier vermutlich sog. Gefahrensignale, die z.B. aufgrund einer Störung im epithelialen Zellverband ausgelöst werden und unabhängig vom Ernährungszustand der Tiere zu einer Produktion antimikrobieller Peptide über dFoxO führen. Des Weiteren scheint eine relativ unspezifische Abwehr über die Induktion von Reaktiven Sauerstoffspezies zu erfolgen, die durch eine Aktivierung des PLC β -Signaltransduktionsweges vermittelt wird. Diese Architektur stellt sicher, dass pathogene Bakterien genau dann bekämpft werden, wenn sie tatsächlich in das Epithel eindringen wollen. Auf diese Weise wird gleichzeitig die endogene Mikrobiota geschützt.

Diese Erkenntnisse bezüglich der Architektur des intestinalen Immunsystems der Fruchtfliege, kombiniert mit neuen Methoden der Analyse der Mikrobiota ermöglicht es in Zukunft, das Modell *Drosophila* für verschiedenste Fragestellungen zu verwenden.

4.4 Ausblick

Das experimentelle System „*Drosophila* Darm“ eignet sich hervorragend um unterschiedlichste Fragen der „Darm-relevanten“ Physiologie und Pathophysiologie zu untersuchen. Eine besondere Stärke könnte in Zukunft auf verschiedenen Modellen liegen, die chronisch-entzündliche Erkrankungen des Darms möglichst genau widerspiegeln. Um das Potenzial des *Drosophila*-Systems optimal nutzen zu können, sind allerdings noch Untersuchungen erforderlich, die alle zellulären Elemente dieses Systems möglichst genau charakterisieren. Ein Weg dieses Ziel zu erreichen bestünde darin, die einzelnen Zelltypen zu isolieren und sie genauer zu charakterisieren. So könnten z.B. die Enterozyten aus ihrem Zellverband gelöst und ihr Transkriptom mit Hilfe der RNA-Sequenzierung charakterisiert werden. Auf diese Weise wäre es möglich, diejenigen Gene zu identifizieren, die in den jeweiligen Zelltypen physiologisch relevant sind. Des Weiteren könnte die Vervollständigung der experimentellen „Tools“ eine noch genauere Nachstellung pathologischer Zustände ermöglichen, was den Nutzen des Systems weiter steigern könnte.

5 Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, unter denen *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* die größte Bedeutung haben, zeigen eine dramatisch steigende Prävalenz in entwickelten Gesellschaften. Um die molekularen Grundlagen dieser Erkrankungen besser zu verstehen, sind umfassende Forschungsanstrengungen erforderlich. Dabei stehen sowohl die Komponenten des angeborenen Immunsystems als auch die Interaktionen zwischen Wirt und Mikrobiota im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Da der Darm von *Drosophila melanogaster* große Übereinstimmungen mit dem Dünndarm des Menschen hat und die wirkenden Module der angeborenen Immunabwehr sich ebenfalls ähneln, ist die Taufliege ein nahezu idealer Modellorganismus zur Untersuchung der molekularen Grundlagen dieser Krankheitsbilder. In der vorliegenden Arbeit konnte die Architektur des intestinalen Immunsystems der Taufliege aufgeklärt werden. Im Darmepithel sind mindestens drei unterschiedliche Mechanismen operativ, die zum einen dem Schutz vor potenziell pathogenen Mikroorganismen dienen und zum anderen die Erhaltung der Homöostase sicherstellen. Eine dieser Komponenten ist der klassische IMD-Signalweg, der homolog zum TNF α -Signalweg der Wirbeltiere ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Weg, ähnlich wie im Menschen, die Produktion antimikrobieller Peptide in drei unterschiedlichen Regionen bzw. Zellpopulationen steuert. Hierzu gehören der Proventrikulus, die Kupferzellen und auch die intestinalen Stammzellen. Allerdings hat der IMD-Signalweg keinerlei Bedeutung für die Abwehrreaktionen in den Enterozyten des Epithels. Die Abwehr in diesen Zellen erfolgt zum einen über die Produktion von antimikrobiellen Peptiden im Zuge einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors dFoxO, zum anderen dient die PLC β -vermittelte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies der Kontrolle mikrobieller Besiedlung des Darms.

In Ergänzung zur Charakterisierung des intestinalen Immunsystems der Taufliege, wurden wesentliche Aspekte der Interaktion des Darmepithels mit der endogenen bakteriellen Besiedlung, der Mikrobiota, analysiert. Dazu wurde ein neues System zur nicht-invasiven Analyse der Mikrobiota unter Verwendung von Faeces als Ausgangsmaterial etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Ausgangsmaterial sehr gut für diesen Zweck geeignet ist. Faeces als Probenmaterial bietet außerdem entscheidende Vorteile, unter denen die Unempfindlichkeit gegenüber Infektionen mit z.B. intrazellulären Bakterien des Genus *Wolbachia* und die Möglichkeit Populationen mehrfach zu analysieren, von größter Bedeutung sind. Mit Hilfe dieser Methode konnte erstmals gezeigt werden, dass eine kurzfristige Aktivierung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch das Enzym

dDUOX einen eindeutigen, aber transienten Effekt auf die Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben der klassischen Aktivierung über die Erkennung von Pathogen-assoziierten Molekülmustern, insbesondere in den Enterozyten eine Produktion antimikrobieller Peptide im Zuge einer Infektion über Gefahrensignale gesteuert wird. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Erkennung von Gefahrensignalen eine effektive Unterscheidung zwischen harmlosen Mitgliedern der Mikrobiota und potenziellen Pathogenen ermöglicht und somit wesentlich zum Erhalt der Wirts-Symbionten-Homöostase beiträgt.

6 Summary

The incidence of chronic inflammatory bowel diseases like *Morbus Crohn* and *Colitis ulcerosa* has increased dramatically in developed countries. To increase our understanding of disease development and to identify the underlying molecular framework, comprehensive research efforts are required. Both, components of the intestinal immune system and the host-microbiota interaction are in recent research foci. As the midgut of *Drosophila melanogaster* shares numerous commonalities with the small intestine in humans and based on the insight that innate immune reactions are also very similar between flies and vertebrates, the fruit fly is an almost ideal model for studying the underlying mechanisms of these diseases. In the presented work the architecture of the intestinal immune system of the fruit fly has been elucidated. The innate immune response of the fly's intestine is composed of at least three different modules. They have to protect the host from pathogens, while they have to ensure that the indigenous microbiota is not impaired. One of these elements is the IMD-signaling pathway, which is homologous to the vertebrate TNF α -signaling pathway. As in humans, activation of this pathway leads to a synthesis of antimicrobial peptides in three different regions of the entire midgut, namely, the proventriculus, the copper cells and the intestinal stem cells. However, the IMD-signaling pathway has no relevance in the enterocytes of the epithelium. I assume that the infection induced production of antimicrobial peptides in enterocytes is activated through activation of the transcription factor dFoxO. In addition, I could show that the production of reactive oxygen species via the activation of PLC β is a powerful tool to fight against invading pathogens.

Complementary to the elucidation of the intestinal immune system, some relevant aspects of the interaction between intestinal epithelium and indigenous microbiota have been analyzed. To enable this, a non-invasive method to evaluate the microbial community was introduced that uses feces samples as starting material. This source is ideally suited for numerous types of studies, as it is insensitive to very common infections by the intracellular bacterium *Wolbachia spec.* and it allows to analyze the same cohort of flies several times during the experiment. Based on this development, it was possible to demonstrate for the first time that a temporal activation of the reactive oxygen production via activation of the enzyme dDUOX has an unequivocal but reversible effect on the indigenous microbiota.

To sum up, I could show that beside the conventional innate immune response mediated through recognition of bacterial pattern molecules, a danger sensing system mediated via dFoxO- and PLC β -signaling is active. Thus, it can be hypothesized that recognition of

danger signals allows for an effective discrimination between beneficial members of the indigenous microbiota and potential pathogens, a mechanism that is important to maintain the host microbe homeostasis.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, M.D., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), pp.2185-2195. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5461.2185>.
- Aggarwal, K. & Silverman, N., 2008. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB reports*, 41(4), pp.267-77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452646>.
- Amcheslavsky, A., Jiang, J. & Ip, Y.T., 2009. Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell stem cell*, 4(1), pp.49-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128792>.
- Amir, Y., Edward, O.-A. & Utpal, B., 2008. A protocol for _in vivo_ detection of reactive oxygen species. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.23>.
- Andersen, V. et al., 2012. Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 44(3), pp.185-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055893> [Accessed April 5, 2012].
- Anon, Hashimoto,1988_Toll transmembrane receptor.pdf.
- Armbruster, B.N. et al., 2007. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. , 104(12), pp.5163-5168.
- Artis, D., 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology*, 8(6), pp.411-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469830>.
- Ayabe, T. et al., 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature immunology*, 1(2), pp.113-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248802>.
- Bae, Y.S., Choi, M.K. & Lee, W.-jae, 2010. Dual oxidase in mucosal immunity and host – microbe homeostasis. , 31, pp.278-287.
- Basset, A. et al., 2003. A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO reports*, 4(2), pp.205-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612613>.
- Baumgart, D.C. & Carding, S.R., 2007. Series Gastroenterology 1 Inflammatory bowel disease : cause and immunobiology. , 369, pp.1627-1640.

- Baumgart, D.C. & Sandborn, W.J., 2007. Gastroenterology 2 Inflammatory bowel disease : clinical aspects and established and evolving therapies. , 369, pp.1641-1657.
- Becker, T. et al., 2010. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature*, 463(7279), pp.369-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090753> [Accessed March 4, 2012].
- Bevins, C.L. & Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews. Microbiology*, 9(5), pp.356-68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423246> [Accessed March 25, 2012].
- Bischoff, V. et al., 2006. Downregulation of the Drosophila immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS pathogens*, 2(2), p.e14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1383489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 3, 2012].
- Blaut, M. & Clavel, T., 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of nutrition*, 137(3 Suppl 2), p.751S-5S. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311972>.
- Brand, a H. & Perrimon, N, 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), pp.401-15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268>.
- Brennan, C. a & Anderson, K.V., 2004. Drosophila: the genetics of innate immune recognition and response. *Annual review of immunology*, 22, pp.457-83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032585> [Accessed August 6, 2010].
- Brummel, T. et al., 2004. Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), pp.12974-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=516503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brunet, A. et al., 1999. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor University of California at San Diego. , 96, pp.857-868.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.-L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., et al., 2004. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 2004(8), p.or2-. Available at: <http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/2004/8/or2> [Accessed May 21, 2012].
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.-L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D. a, et al., 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors

- by the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5666), pp.2011-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976264> [Accessed March 23, 2012].
- Buchon, N. et al., 2010. Drosophila EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC biology*, 8, p.152. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3022776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Buchon, N. et al., 2009. Drosophila intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell host & microbe*, 5(2), pp.200-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19218090> [Accessed July 14, 2010].
- Bäckhed, F. et al., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), pp.15718-23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Calnan, D.R. & Brunet, a, 2008. The FoxO code. *Oncogene*, 27(16), pp.2276-88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391970> [Accessed March 16, 2012].
- Chandler, J.A. et al., 2011. Bacterial communities of diverse Drosophila species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS genetics*, 7(9), p.e1002272. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3178584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2012].
- Charroux, B. & Royet, J., 2010. Drosophila immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly*, 4(1), pp.40-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383054>.
- Charroux, B. & Royet, J., 2012. Gut-microbiota interactions in non-mammals: What can we learn from Drosophila? *Seminars in immunology*, 24(1), pp.17-24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22284578> [Accessed March 9, 2012].
- Choe, K.-M. et al., 2002. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in Drosophila. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5566), pp.359-62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872802> [Accessed September 8, 2010].
- Clark, M.E. et al., 2005. Widespread prevalence of wolbachia in laboratory stocks and the implications for Drosophila research. *Genetics*, 170(4), pp.1667-75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1449785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2012].
- Cox, C.R. & Gilmore, M.S., 2007. Native microbial colonization of Drosophila melanogaster and its use as a model of Enterococcus faecalis pathogenesis. *Infection and immunity*, 75(4), pp.1565-76. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1865669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 19, 2010].

Cronin, S.J.F. et al., 2009. Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5938), pp.340-3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520911>.

Denholm, B. & Skaer, H., 2009. Bringing together components of the fly renal system. *Current opinion in genetics & development*, 19(5), pp.526-32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2789252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2012].

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), pp.47-95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773609>.

Dubreuil, R., 2004. Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(5), pp.742-752. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272503003017> [Accessed August 19, 2010].

Duffy, J.B., 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34(1-2), pp.1-15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324939> [Accessed March 9, 2012].

Dziarski, R., 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology*, 40(12), pp.877-886. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589003003195> [Accessed March 12, 2012].

Ferrandon, D. et al., 1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *The EMBO journal*, 17(5), pp.1217-27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1170470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Frank, D.N. et al., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), pp.13780-5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1959459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Franz, O., Bruchhaus, I. & Roeder, T., 1999. Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic acids research*, 27(11), p.e3.

Fraune, S. & Bosch, T.C.G., 2007. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32), pp.13146-51. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1934924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Gammon, K.S. et al., 2007. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. *Letters in applied microbiology*, 44(3), pp.262-7.

Geerling, B.J. et al., 2000. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*, 95(4), pp.1008-13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.01942.x> [Accessed May 22, 2012].

Geiszt, Miklos et al., 2003. NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. *J. Immunol.*, 171(1), pp.299-306. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/171/1/299> [Accessed May 21, 2012].

Geiszt, Miklós & Leto, T.L., 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *The Journal of biological chemistry*, 279(50), pp.51715-8. Available at: <http://www.jbc.org> [Accessed April 20, 2012].

Gersemann, M., Wehkamp, J. & Stange, E.F., 2012. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Journal of internal medicine*, 271(5), pp.421-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324936> [Accessed March 13, 2012].

Giannakou, M.E. et al., 2004. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5682), p.361. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192154>.

Gobert, V. et al., 2003. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5653), pp.2126-30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684822>.

Gottar, M. et al., 2007. *factors.*, 127(7), pp.1425-1437.

Govind, S. & Nehm, R.H., 2004. Innate Immunity in Fruit Flies: A Textbook Example of Genomic Recycling. *PLoS Biology*, 2(8).

Groschwitz, K.R. & Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(1), pp.3-20; quiz 21-2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560575> [Accessed March 9, 2012].

Ha, E.-M., Oh, C.-T., et al., 2005. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Developmental cell*, 8(1), pp.125-32.

Ha, E.-M., Lee, K.-A., Seo, Y.Y., et al., 2009. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in

- drosophila gut. *Nature immunology*, 10(9), pp.949-57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668222> [Accessed April 12, 2012].
- Ha, E.-M., Lee, K.-A., Park, S.H., et al., 2009. Regulation of DUOX by the Galphaq-phospholipase Cbeta-Ca²⁺ pathway in Drosophila gut immunity. *Developmental cell*, 16(3), pp.386-97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289084> [Accessed October 10, 2010].
- Ha, E.-mi, Lee, K.-ah, et al., 2005. Supplemental Data Regulation of DUOX by the Gαq-Phospholipase Cβ-Ca²⁺ Pathway in Drosophila Gut Immunity.
- Hedges, L.M. & Johnson, K.N., 2008. Induction of host defence responses by Drosophila C virus. *The Journal of general virology*, 89(Pt 6), pp.1497-501.
- Hetru, C., Troxler, L. & Hoffmann, J. a, 2003. Drosophila melanogaster antimicrobial defense. *The Journal of infectious diseases*, 187 Suppl (Suppl 2), pp.S327-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792847>.
- Hooper, L.V. & Macpherson, A.J., 2010a. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*, 10(3), pp.159-169. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2710>.
- Hooper, L.V. & Macpherson, A.J., 2010b. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*, 10(3), pp.159-169.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T. & Gordon, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, 22, pp.283-307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055347> [Accessed March 9, 2012].
- Hultmark, D., 2003. Drosophila immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol*, 15, pp.12-19.
- Hwangbo, D.S. et al., 2004. Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(June), pp.562-567.
- Imler, J.-L. & Bulet, P., 2005. Antimicrobial peptides in Drosophila: structures, activities and gene regulation. *Chemical immunology and allergy*, 86(1), pp.1-21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15976485>.
- K. V. Anderson, L. Bokla, C.N.-V., 1985. Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: The Induction of Polarity by the Toll Gene Product. *Cell*, 42, pp.791 - 798.
- Kaneko, T et al., 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol.*, 7, pp.715-723.

- Kaneko, Takashi & Silverman, N., 2005. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cellular microbiology*, 7(4), pp.461-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760446> [Accessed June 29, 2010].
- Khush, R.S., 2001. *Drosophila* immunity: *Trends in Immunology*, 22(5), pp.260-264.
- Kim, T. & Kim, Y.-J., 2005. Overview of innate immunity in *Drosophila*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 38(2), pp.121-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826489>.
- Kim, Y.S. et al., 2000. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(42), pp.32721-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827089> [Accessed April 23, 2012].
- Kuraishi, T. et al., 2011. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), pp.15966-71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3179054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 16, 2012].
- Lambeth, J.D., Kawahara, T. & Diebold, B., 2007. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free radical biology & medicine*, 43(3), pp.319-31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1989153&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 18, 2012].
- Leclerc, V. & Reichhart, J.-M., 2004. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological reviews*, 198, pp.59-71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199954>.
- Lee, I.-T. & Yang, C.-M., 2012. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical pharmacology*, pp.1-10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587816>.
- Lehane, M.J., PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. *Annual Review of Entomology*, Vol. 42: 5.
- Lemaitre, B et al., 1995. A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, pp.9465-9469.
- Lemaitre, B et al., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), pp.973-83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808632>.

- Lemaitre, Bruno & Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*, 25, pp.697-743. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201680>.
- Lhocine, N. et al., 2008. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell host & microbe*, 4(2), pp.147-58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692774> [Accessed May 9, 2012].
- Maheux, A.F. et al., 2009. Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/*Shigella* in water samples. *Water research*, 43(12), pp.3019-28.
- Mahid, S.S. et al., 2006. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 81(11), pp.1462-71. Available at: <http://dx.doi.org/10.4065/81.11.1462> [Accessed May 22, 2012].
- Mahida, Y.R., 2004. Epithelial cell responses. , 18(2), pp.241-253.
- McGuire, S.E. et al., 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), pp.1765-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657498>.
- Meddings, J.B. et al., 1999. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 276(4), pp.G951-957. Available at: <http://ajpgi.physiology.org/cgi/content/abstract/276/4/G951> [Accessed May 21, 2012].
- Medzhitov, R., Preston-hurlburt, P. & Jr, C.A.J., 1997. A human homologue of the. *Nature*, 388(July), pp.6-9.
- Micchelli, C. a & Perrimon, Norbert, 2006. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*, 439(7075), pp.475-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340959>.
- Moens, E. & Veldhoen, M., 2012. Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology*, 135(1), pp.1-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3246647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 12, 2012].
- Mori, B., 2000. A Pattern-recognition Protein for β -1, 3-Glucan. , 275(7), pp.4995-5002.
- Murakami, R., Takashima, S. & Hamaguchi, T., 1999. Developmental genetics of the *Drosophila* gut: specification of primordia, subdivision and overt-differentiation. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 45(5), pp.661-76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10512197> [Accessed May 15, 2012].

- Nawaratne, V. et al., 2008. New Insights into the Function of M₄ Muscarinic Acetylcholine Receptors Gained Using a Novel Allosteric Modulator and a DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by a Designer Drug) □.
- Nehme, N.T. et al., 2007. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens*, 3(11), p.e173. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039029>.
- Neish, A.S., 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), pp.65-80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2892787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 10, 2012].
- Nichols, C.D. & Roth, B.L., 2009. Engineered G-protein Coupled Receptors are Powerful Tools to Investigate Biological Processes and Behaviors. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2(October), p.16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2773177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 11, 2012].
- Nüsslein-Vollhard, C., 1977. Genetic Analysis of pattern-formation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 268, pp.249-268.
- Ohlstein, B. & Spradling, A., 2006. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*, 439(7075), pp.470-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340960> [Accessed March 19, 2012].
- O'Neill, S.L. et al., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), pp.2699-702. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pagnini, C. et al., 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp.454-9.
- Pei, Y. et al., 2008. Engineered GPCRs as tools to modulate signal transduction. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 23, pp.313-21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074739> [Accessed May 9, 2012].
- Pfaffl, Michael Walter, Physiologie, L. & Weihenstephan, W., Real-time RT-PCR : Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, pp.92-95.
- Pfaffl, Michael W. & Riedmaier, I., 2011. Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BIOspektrum*, 17(3), pp.295-297. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12268-011-0047-x> [Accessed March 24, 2012].

- Phelps, C.B. & Brand, a H., 1998. Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system. *Methods (San Diego, Calif.)*, 14(4), pp.367-79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608508>.
- Pilauri, V. et al., 2005. Gal80 Dimerization and the Yeast GAL Gene Switch. , 1914(April), pp.1903-1914.
- Pinheiro, V.B. & Ellar, D.J., 2006. How to kill a mocking bug? *Cellular microbiology*, 8(4), pp.545-57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16548881> [Accessed October 10, 2010].
- Plottel, C.S. & Blaser, M.J., 2011. Microbiome and malignancy. *Cell host & microbe*, 10(4), pp.324-35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018233> [Accessed March 7, 2012].
- Pruesse, E. et al., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research*, 35(21), pp.7188-96. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2175337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 14, 2012].
- R Development Core Team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing Austria, ed. *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria*, 0(01/19), pp.{ISBN} 3-900051-07-0. Available at: <http://www.r-project.org>.
- Ragab, A. et al., 2011. Drosophila Ras/MAPK signalling regulates innate immune responses in immune and intestinal stem cells. *The EMBO journal*, 30(6), pp.1123-36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3061042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Rausch, P. et al., 2011. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. , 2.
- Reiff, C. & Kelly, D., 2010a. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300(1), pp.25-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800289> [Accessed April 2, 2012].
- Reiff, C. & Kelly, D., 2010b. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300(1), pp.25-33.
- Ren, C. et al., 2007. Increased internal and external bacterial load during Drosophila aging without life-span trade-off. *Cell metabolism*, 6(2), pp.144-52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681150> [Accessed April 16, 2012].
- Roman, G. et al., 2001. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), pp.12602-7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=60100&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Russell, R.K. & Satsangi, J., 2004. IBD: a family affair. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 18(3), pp.525-39. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2003.12.006> [Accessed May 22, 2012].

Ryu, J.-H. et al., 2006. An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *The EMBO journal*, 25(15), pp.3693-701. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 19, 2010].

Ryu, J.-H. et al., 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5864), pp.777-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218863>.

Saridaki, A. & Bourtzis, K., 2010. Wolbachia: more than just a bug in insects genitals. *Current opinion in microbiology*, 13(1), pp.67-72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036185> [Accessed May 2, 2012].

Scanlan, P.D. & Marchesi, J.R., 2008. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *The ISME journal*, 2(12), pp.1183-93. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670396> [Accessed March 25, 2012].

Schloss, P.D., 2009. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PloS one*, 4(12), p.e8230. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2012].

Schramm, G., Bruchhaus, I. & Roeder, T., 2000. A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic acids research*, 28(22), p.E96.

Serino, M. et al., 2009. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes & metabolism*, 35(4), pp.262-72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19419895> [Accessed March 26, 2012].

Shin, S.C. et al., 2011. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6056), pp.670-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053049> [Accessed March 8, 2012].

Silverman, 2000. IB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes & Development*, pp.2461-2471.

Skaer, H. le B. & M. Bate, A.M. (Eds. ., 1993. The Development of *Drosophilamelanogaster*,. *ColdSpring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, NY*.

- Stevenson, D.M. et al., 2006. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(3), pp.329-38. Available at: <http://www.springerlink.com/content/32716825618772w/> [Accessed May 23, 2012].
- Storelli, G. et al., 2011. Lactobacillus plantarum promotes Drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell metabolism*, 14(3), pp.403-14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907145> [Accessed April 3, 2012].
- Stöven, S. et al., 2000. Activation of the Drosophila NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO reports*, 1(4), pp.347-52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1083746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Suster, M.L. et al., 2004. Refining GAL4-driven transgene expression in Drosophila with a GAL80 enhancer-trap. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 39(4), pp.240-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286996> [Accessed August 9, 2010].
- Tanji, T. et al., 2007. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in Drosophila melanogaster. *Molecular and cellular biology*, 27(12), pp.4578-88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438142>.
- Thore, S. et al., 2005. Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca²⁺ in insulin-secreting beta-cells. *Journal of cell science*, 118(Pt 19), pp.4463-71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16159958> [Accessed May 9, 2012].
- Tingvall, T.Ö., Roos, E. & Engström, Y., 2001. expression in Drosophila barrier epithelia. , 2(3), pp.239-243.
- Tzou, P. et al., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia. *Immunity*, 13(5), pp.737-48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114385>.
- Venken, K.J.T. et al., 2011. NIH Public Access. , 8(9), pp.737-743.
- Venken, K.J.T. & Bellen, H.J., 2005. Emerging technologies for gene manipulation in Drosophila melanogaster. *Nature reviews. Genetics*, 6(3), pp.167-78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738961> [Accessed March 9, 2012].
- Venken, K.J.T. & Bellen, H.J., 2007. Transgenesis upgrades for Drosophila melanogaster. *Development (Cambridge, England)*, 134(20), pp.3571-84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905790> [Accessed March 6, 2012].
- Wang, P. & Hou, S.X., 2010. Regulation of intestinal stem cells in mammals and Drosophila. *Journal of cellular physiology*, 222(1), pp.33-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739102> [Accessed May 26, 2012].

- Weber, A.N.R. et al., 2003. Binding of the Drosophila cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature immunology*, 4(8), pp.794-800. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12872120>.
- Weigel, D. & Jäckle, H., 1990. The fork head domain: A novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*, 63(3), pp.455-456. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90439-L](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90439-L) [Accessed May 21, 2012].
- Werner, T. et al., 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), pp.13772-7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wiedemann, C., Schulz, H.L. & Weber, B.H.F., Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum*, 2, pp.6-9.
- Wirtz, S. & Neurath, M.F., 2007. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews*, 59(11), pp.1073-83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825455>.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution Background , 51(2), pp.221-271.
- Wong, C.N.A., Ng, P. & Douglas, A.E., 2011. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly Drosophila melanogaster. *Environmental microbiology*, 13(7), pp.1889-900. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21631690> [Accessed March 9, 2012].
- Xavier, R.J. & Podolsky, D.K., 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), pp.427-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653185> [Accessed March 1, 2012].
- Zaidman-Rémy, A. et al., 2006. The Drosophila amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24(4), pp.463-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618604> [Accessed October 12, 2010].
- Zhou, W. & Neill, S.O., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. , (December 1997).
- Zolotarevsky, Y., 2002. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology*, 123(1), pp.163-172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2002.34235> [Accessed May 21, 2012].

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Fliegenstämme	32
Tab. 2.2: Primer für die Erst- & Zweitstrangsynthese	34
Tab. 2.3: Genspezifische Primer für die cDNA-Synthese	34
Tab. 2.4: Genspezifische Primer für die RT-PCR & die qRT-PCR	34
Tab. 2.5: Bakterienspezifische Primer für die qRT-PCR	35
Tab. 2.6: MID-Primer für die 454-Sequenzierung	36
Tab. 2.7: PCR-Bedingungen für die cDNA-Zweitstrangsynthese	42
Tab. 2.8: PCR-Bedingungen für die RT-PCR	43
Tab. 2.9: Waschprotokoll des Microarray-Chips	48
Tab. 2.10: PCR-Bedingungen für die RT-PCR	52
Tab. 3.1: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den den Därmen des Wildtyps w^{1118} nach einer 24 stündigen Infektion mit <i>Serratia</i> <i>marcescens</i> IgXI.	59
Tab. 3.2: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4;tubGal80 x UAS-PGRP-LE 69	
Tab. 3.3: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4;tubGal80 x UAS-foxO TM ..	70
Tab. 3.4: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten herunter regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4;tubGal80 x UAS-foxO TM ..	70
Tab. 3.5: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten hoch regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS-M1D1.....	85
Tab. 3.6: Microarray-Analyse - Liste der wichtigsten herunter regulierten Gene aus den Därmen der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS-M1D1.....	86

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Endoskopie & Histologie von CED – [A-C] Morbus Crohn; [D-F] Colitis ulcerosa (verändert nach Xavier und Podolsky 2007; Baumgart und Sandborn 2007)..	10
Abb. 1.2:	Aufbau des menschlichen Darmgewebes. (©NetDoktor.de)	11
Abb. 1.3:	Strukturelle Organisation der Mukosa (verändert nach Moens et al. 2011).	12
Abb. 1.4:	Darstellung der im Fettkörper produzierten AMPs nach einer Konfrontation mit unterschiedlichen Mikroorganismen (verändert nach Imler und Bulet, 2005)	17
Abb. 1.5:	Darstellung der Toll- & IMD-Signalkaskade (verändert nach Hoffmann & Lemaitre, 2007).....	19
Abb. 1.6:	Modell der DUOX-gesteuerten ROS Produktion (verändert nach Ha et al., 2009)	21
Abb. 1.7:	Übersicht über den Aufbau des Fliegendarms (verändert nach Charroux, 2012)	22
Abb. 1.8:	Das binäre Gal4-UAS-System in Drosophila	25
Abb. 1.9:	Das TARGET-Expressionssystem	26
Abb. 2.1:	Darstellung der qRT-PCR-Bedingungen für die Amplifikation.	45
Abb. 3.1:	Orale Infektion von w^{1118} mit Sm IgXI-GFP zur Überprüfung der Bakterienaufnahme.	55
Abb. 3.2:	Die orale Infektion mit <i>Serratia marcescens</i> führt zur Aktivierung von Antimikrobiellen Peptiden I.	56
Abb. 3.3:	Die orale Infektion mit <i>Serratia marcescens</i> führt zur Aktivierung von Antimikrobiellen Peptiden II.	57
Abb. 3.4:	Venn-Diagramm – Vergleich der nach Infektion hoch regulierten Gene im Darm von w^{1118} mit den regulierten Immungenlisten von Gregorio & Buchon.	58
Abb. 3.5:	Orale Infektion der F1 Generation der Kreuzungen NP1Gal4 x UAS-relish-YFP [A-D] und NP1Gal4 x UAS-dFoxO-GFP [E-H] mit <i>Serratia marcescens</i>.	60
Abb. 3.6:	Die Orale Infektion der F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x PLCβ-mRFP mit <i>Serratia marcescens</i> zeigt eine Rekrutierung des PLCβs zur Zellmembran der Enterozyten	61
Abb. 3.7:	Immunhistochemischer Nachweis der Relish- bzw. dFoxO-Translokation in den Enterozyten nach unterschiedlichen Zeitpunkten oraler Infektion mit <i>Serratia marcescens</i>.	63
Abb. 3.8:	Immunhistochemischer Nachweis der Relish- bzw. dFoxo-Translokation in den Kupferzellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten oraler Infektion mit <i>Serratia marcescens</i>.	65

Abb. 3.9:	Test zum Nachweis der induzierbaren Genexpression nach 24 stündigem Hitzeschock.....	67
Abb. 3.10:	Nachweis über die induzierte Überexpression von pgrp-le und dfoxo nach 24 stündiger Hitzeschockinduzierung.	68
Abb. 3.11:	Venn-Diagramm - Vergleich der durch pgrp-le Überexpression induzierten höher exprimierten Gene mit bereits bekannten immunrelevanten Genen... ..	68
Abb. 3.12:	Venn-Diagramm – Vergleich der durch foxoTM Überexpression induzierten stärker exprimierten Gene mit bereits bekannten immunrelevanten Genen. ..	69
Abb. 3.13:	Venn-Diagramm – Vergleich aller immunrelevanten-Arraydaten: In [A] ist der Vergleich der hochregulierten Gene aus der Infektion und den beiden Überexpressionsexperimenten dargestellt, in [B] zum Vergleich die Listen der herunter regulierten Gene.	71
Abb. 3.14:	Realtime PCR nach der Überexpression des IMD-und dFoxO-Signalweges in adulten Weibchen.....	72
Abb. 3.15:	In dieser Abbildung ist ein Darm einer adulten Fliege der F1 Generation der Kreuzung Npc1b Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-le (II) in [A] dargestellt.	74
Abb. 3.16:	Dargestellt sind hier die unterschiedlichen Darmregionen eines adulten Weibchens aus der F1 Generation der Kreuzung NP1 Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-le (II).....	75
Abb. 3.17:	Nachweis der Überexpression von Drosomycin-GFP in den Kupferzellen des Mitteldarms.....	76
Abb. 3.18:	Morphologische Struktur der Kupferzellen.	77
Abb. 3.19:	Nachweis der immunaktivierten Antwort in den ISCs in der F1 Generation der Kreuzung NP1 Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-pgrp-le (II) mit dem Stammzell-spezifischen Antikörper Delta I.....	78
Abb. 3.20:	Nachweis der immunaktivierten Antwort in den ISCs in der F1 Generation der Kreuzung NP1 Gal4 x DDI (Drs-GFP; Dipt.-lacZ)::UAS-Flag-PGRP-LE (II) mit dem Stammzell-spezifischen Antikörper Delta II.....	79
Abb. 3.21:	Schema zur zellspezifischen Aktivierung der Immunabwehr im Darmepithel der Tauflye Drosophila melanogaster	79
Abb. 3.22:	Sättigungskurve.....	81
Abb. 3.23:	Sequenzanalyse bakterieller Bestandteile.....	82
Abb. 3.24:	Nachweis der Wolbachia-Infektion in der isolierten gDNA aus ganzen Tieren, den Därmen und den Faeces-Proben der Linie w¹¹¹⁸.	83
Abb. 3.25:	Realtime PCR der genomischen DNA	84
Abb. 3.26:	Nachweis der relativen Expressionsänderung von dDUOX.....	87
Abb. 3.27:	Nachweis von ROS in der F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x DREADD-UAS-M1D1 mittels DHE. I.....	88

Abb. 3.28: Nachweis der relativen Bakterienmenge mittels Realtime-PCR.....	89
Abb. 3.29: Detektion der einzelnen Bakteriengruppen der behandelten F1 Generation der Kreuzung NP1Gal4 x M1D1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels 454-Sequenzierung.	90
Abb. 3.30: Nachweis der NO-Synthase-Aktivität im Darm der F1-Generation der Kreuzung NP1Gal4 x UAS- DREADD-M1D1.	91
Abb. 4.1: Darstellung der drei Aktivierungs-mechanismen, die eine Rolle bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen im Darm von Drosophila haben.....	92

10 Curriculum vitae

Name	Christine
Vorname	Fink (geb. Koch)
Geburtsdatum	9. August 1981
Geburtsort	Westerland
Schulbildung	<p>1987 - 1988 Grundschule St. Nicolai, Westerland</p> <p>1988 - 1989 Falkenbergsschule, Flensburg</p> <p>1989 - 1990 Heinrich-Rantzau-Schule, Bad Segeberg</p> <p>1990 - 1992 Grundschule Lütjenburg</p> <p>1992 - 2002 Gymnasium des Hoffmann-von-Fallersleben Schulzentrums, Lütjenburg</p>
Studium	<p>2002 – 2008 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Hauptfach Zoologie und den Nebenfächern Zellbiologie und Rechtsmedizin</p> <p>2007 – 2008 Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Roeder in der Abteilung Zoophysiology II der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</p> <p>Titel: Der Einfluss des Hungerns auf die Transkriptionsaktivität isolierter Organe der Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i></p> <p>2008 Erhalt des Diploms</p>
Promotion	<p>seit 2008 bei Prof. Roeder in der Abteilung Zoophysiology II der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</p> <p>Titel: Die Architektur des intestinalen Immunsystems der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i></p>

11 Publikationen

Poster

- 2010 Fink C & Roeder T. Immune competent cells in the intestine of *Drosophila melanogaster*. DZG-Tagung Hamburg (2010) & NDI Borstel (2010)
- 2011 Fink C & Roeder T. Immune response mechanisms in the intestinal epithelium of *Drosophila melanogaster*, NDI Borstel (2011)

Vorträge

- 2008 Fink C & Roeder T. Paneth-like cells in the fruitfly's intestine. DZG-Tagung, Jena (2008)
- 2011 Fink C & Roeder T. Immune response mechanisms in the intestinal epithelium of *Drosophila melanogaster*. DZG-Tagung (2011)

Publikationen

- 2006 von Wurmb-Schwark N, Mályusz V, Fremdt H, Koch C, Simeoni E, Schwark T. Fast and simple DNA extraction from saliva and sperm cells obtained from the skin or isolated from swabs. *Leg Med* (Tokyo). 2006 May;8(3):177-81. Epub 2006 Mar 3
- 2012 Fink C, Staubach F, Kuenzel S, Baines J & Roeder T. Non-invasive analysis of intestinal microbial communities in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. (2012, close to submission)

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Thomas Roeder, zum einen für die Bereitstellung meines Themas und zum anderen für die Unterstützung bei der Umsetzung meiner Ideen und der ständigen Diskussionsbereitschaft, der Hilfe und den unzähligen Ratschlägen zum Gelingen meiner Experimente.

Dann möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Baines für die Zusammenarbeit an dem Sequenzierprojekt bedanken und allen, die an diesem Projekt beteiligt waren: Dr. Fabian Staubach, Dr. Sven Kuenzel und Katja Cloppenburg-Schmidt.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der Zoophysiologie für das super Arbeitsklima und die nette Atmosphäre. Mein ganz besonderer Dank gilt unserer TA Britta Laubenstein – ohne ihre Unterstützung wäre ich wohl noch immer nicht fertig. Dann geht ein dickes Dankeschön an Julia Hoffmann für die schöne Bürogemeinschaft, den regen Ideenaustausch und auch für die kurzfristige Übernahme meiner Endkorrektur. Ein Dankeschön auch hier an alle ehemaligen Mitarbeiter unserer Abteilung Zoophysiologie II, die mich bereits in meinen Anfängen begleitet haben: Dr. Kerstin Isermann, Dr. Christina Wagner und Dr. Sebastian Schneider.

Ein Dankeschön an meine Freunde, insbesondere an Mirja, für die ständige moralische Unterstützung und die unzähligen Aufmunterungen.

Und natürlich ein großes, herzliches Dankeschön an meine Familie, weil ihr immer an mich geglaubt habt. Danke, Mama, weil Du mich so sehr unterstützt hast und mir so oft den Rücken frei gehalten hast.

Und das Beste und Wichtigste zum Schluss:

Ein dickes Dankeschön geht an meinen kleinen Sohn, Justus. Noch wirst Du es nicht verstehen, kleiner Mann, aber Du warst total tapfer! Ich habe Dich ziemlich oft „allein“ gelassen, um meiner Arbeit in der Uni nachzukommen. Danke für die viele gemeinsame Freizeit, die wir zusammen in der Uni verbracht haben. Ich hab Dich lieb.

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Datum, Ort

Unterschrift

A Anhang

Tab. A.1 Liste der immun-regulierten Gene nach DeGregorio et al, 2002

ID Nummer	Symbol	ID Nummer	Symbol	ID Nummer	Symbol
CG1102	MP1	CG6429	CG6429	CG11459	CG11459
CG1106	Gel	CG6449	NijA	CG11642	TRAM
CG1149	MstProx	CG6467	Jon65Aiv	CG11709	PGRP-SA
CG1165	LysS	CG6493	Dcr-2	CG11819	CG34349
CG1179	LysB	CG6524	Cp19	CG11841	CG11841
CG1180	LysE	CG6531	wgn	CG11842	CG11842
CG1358	CG1358	CG6639	CG6639	CG11937	amn
CG1361	Anp	CG6667	dl	CG11943	CG11943
CG1365	CecA1	CG6672	CG6672	CG11992	Rel
CG1367	CecA2	CG6687	Spn88Eb	CG12116	CG12116
CG1373	CecC	CG6713	Nos	CG12245	gcm
CG1385	Def	CG6794	Dif	CG12297	BG4
CG1388	Tak1	CG6822	ergic53	CG12489	dnr1
CG1507	Pur-alpha	CG6890	Tollo	CG12494	CG12494
CG1594	hop	CG6895	GNBP1	CG12502	CG12502
CG1600	CG1600	CG6898	Zip3	CG12505	Arc1
CG1607	CG1607	CG7000	Snmp1	CG12763	Dpt
CG1607	CG1607	CG7002	Hml	CG12780	CG12780
CG1676	cactin	CG7016	CG7016	CG12789	santa-maria
CG1689	lz	CG7033	CG7033	CG12919	egr
CG1697	rho-4	CG7052	TepII	CG13077	CG13077
CG1780	ldgf4	CG7068	TepIII	CG13193	CG13193
CG1851	Ady43A	CG7121	Tehao	CG13311	CG13311
CG1857	nec	CG7138	r2d2	CG13323	CG13323
CG1878	CecB	CG7171	Uro	CG13324	CG13324
CG1887	CG1887	CG7219	Spn28D	CG13325	CG13325
CG2045	Ser7	CG7227	CG7227	CG13422	CG13422
CG2056	spirit	CG7228	pes	CG13497	CG34370
CG2078	Myd88	CG7250	Toll-6	CG13618	CG13618
CG2081	Vago	CG7296	CG7296	CG13641	CG13641
CG2086	drpr	CG7356	Tg	CG13795	CG13795
CG2163	Pabp2	CG7393	p38b	CG13905	CG13905
CG2217	CG2217	CG7417	Tab2	CG13941	Arc2
CG2248	Rac1	CG7439	AGO2	CG14027	TotM
CG2275	Jra	CG7486	Dredd	CG14219	CG14219
CG2471	ScIp	CG7496	PGRP-SD	CG14226	dome
CG2615	ik2	CG7586	Mcr	CG14401	CG14401
CG2727	emp	CG7602	DNApol-iota	CG14567	CG14567
CG2736	CG2736	CG7604	Eig71Ee	CG14599	CG14599

CG2762	ush	CG7629	AttD	CG14625	CG14625
CG2875	CG2875	CG7635	Mec2	CG14661	CG14661
CG2913	yin	CG7695	CG7695	CG14704	PGRP-LB
CG2952	CG42640	CG7717	Mekk1	CG14745	PGRP-SC2
CG3048	Traf4	CG7738	CG7738	CG14746	PGRP-SC1a
CG3066	Sp7	CG7778	CG7778	CG14762	CG14762
CG3099	CG42797	CG7780	DNasell	CG14841	CG14841
CG3101	l(1)G0232	CG7798	CG7798	CG14895	Pak3
CG3131	Duox	CG7850	puc	CG14907	CG14907
CG3132	Ect3	CG8157	CG8157	CG14957	CG14957
CG3212	Sr-CIV	CG8175	Mtk	CG15043	CG15043
CG3505	CG3505	CG8193	CG8193	CG15046	CG15046
CG3604	CG3604	CG8222	Pvr	CG15065	CG15065
CG3666	Tsf3	CG8293	lap2	CG15066	IM23
CG3705	aay	CG8345	Cyp6w1	CG15067	CG15067
CG3759	CG3759	CG8348	Dh44	CG15126	CG15126
CG3798	Nmda1	CG8358	CG8358	CG15282	CG15282
CG3821	Aats-asp	CG8400	casp	CG15293	CG15293
CG3829	CG3829	CG8492	CG8492	CG15566	CG34347
CG3858	gcm2	CG8502	Cpr49Ac	CG15678	pirk
CG3936	N	CG8556	Rac2	CG15745	CG15745
CG3962	Keap1	CG8577	PGRP-SC1b	CG15784	CG15784
CG3992	srp	CG8595	Toll-7	CG15825	fon
CG4057	tamo	CG8791	CG8791	CG15829	CG15829
CG4099	Sr-CI	CG8826	gkt	CG15829	CG15829
CG4144	GNBP2	CG8846	Thor	CG16705	SPE
CG4199	CG4199	CG8855	nimA	CG16713	CG16713
CG4201	ird5	CG8856	Sr-CII	CG16718	CG16718
CG4250	CG4250	CG8896	18w	CG16743	CG16743
CG4257	Stat92E	CG8913	Irc	CG16756	CG16756
CG4261	Hel89B	CG8965	CG8965	CG16772	CG16772
CG4269	CG4269	CG8995	PGRP-LE	CG16799	CG16799
CG4280	crq	CG9080	Listericin	CG16836	CG16836
CG4353	hep	CG9111	LysC	CG16887	CG33307
CG4384	PGRP-LA	CG9116	LysP	CG16910	key
CG4393	CG4393	CG9118	LysD	CG16978	CG16978
CG4432	PGRP-LC	CG9120	LysX	CG16983	skpA
CG4437	PGRP-LF	CG9186	CG9186	CG17019	CG17019
CG4472	Idgf1	CG9358	Phk-3	CG17107	CG17107
CG4475	Idgf2	CG9434	Fst	CG17119	CG17119
CG4559	Idgf3	CG9441	Pu	CG17278	CG17278
CG4618	CHMP2B	CG9453	Spn4	CG17560	CG17560
CG4636	SCAR	CG9616	CG9616	CG17800	Dscam
CG4665	Dhpr	CG9631	CG9631	CG18067	CG18067
CG4693	Nha2	CG9649	CG9649	CG18096	Tepl

CG4740	CecA1	CG9675	spheroide	CG18106	IM2
CG4823	LpR2	CG9681	PGRP-SB1	CG18108	IM1
CG4909	POSH	CG9696	dom	CG18241	Toll-4
CG5008	GNBP3	CG9697	PGRP-SB2	CG18279	IM10
CG5059	CG5059	CG9701	CG9701	CG18319	ben
CG5097	MtnC	CG9733	CG9733	CG18348	Cpr67Fb
CG5118	CG5118	CG9928	CG9928	CG18372	AttB
CG5188	CG5188	CG9976	Lectin-galC1	CG18426	ytr
CG5212	Pli	CG9989	CG9989	CG18467	CG18467
CG5475	Mpk2	CG10118	ple	CG18525	Spn5
CG5490	TI	CG10146	AttA	CG18550	yellow-f
CG5493	CG5493	CG10197	kn	CG18563	CG18563
CG5527	CG5527	CG10332	CG10332	CG18608	prod
CG5528	Toll-9	CG10345	CG10345	CG30062	CG30062
CG5550	CG5550	CG10360	ref(2)P	CG30080	CG30080
CG5576	imd	CG10363	TepIV	CG30087	CG30087
CG5609	TotB	CG10383	CG10383	CG31193	TotX
CG5680	bsk	CG10420	CG10420	CG31326	CG31326
CG5730	AnnIX	CG10487	CG32413	CG31507	TotZ
CG5765	Muc55B	CG10520	tub	CG31508	TotC
CG5773	CG5773	CG10610	ECSIT	CG31509	TotA
CG5778	CG5778	CG10640	Uev1A	CG31691	TotF
CG5779	proPO-A1	CG10641	CG10641	CG31741	CG31741
CG5791	CG5791	CG10680	CG10680	CG31764	vir-1
CG5848	cact	CG10697	Ddc	CG31770	He
CG5896	grass	CG10794	DptB	CG31962	Sr-CIII
CG5909	CG5909	CG10810	Drs	CG32268	dro6
CG5974	pll	CG10812	dro5	CG32279	dro2
CG6073	CG6073	CG10816	Dro	CG32282	dro4
CG6124	eater	CG10843	Cyp4p3	CG32283	dro3
CG6127	Ser	CG10910	CG10910	CG33117	Victoria
CG6134	spz	CG10912	CG10912	CG33532	lectin-37Da
CG6183	CG42807	CG10961	Traf6	CG33533	lectin-37Db
CG6186	Tsf1	CG11064	Rfabg	CG33717	PGRP-LD
CG6202	Surf4	CG11086	Gadd45	CG32382	sphinx2
CG6357	CG6357	CG11159	CG11159	CG32383	sphinx1
CG6361	CG6361	CG11172	NFAT	CG11390	PebIII
CG6367	psh	CG11313	CG11313	CG11413	CG11413
CG6426	CG6426	CG11331	Spn27A	CG11417	CG11417

Tab. A.2 Liste der immun-regulierten Gene nach Buchon et al, 2009

ID Nummer	Symbol	ID Nummer	Symbol	ID Nummer	Symbol
CG7629	AttD	CG15792	zip	CG4859	Mmp1
CG4421	GstD8	CG32697	I(1)G0232	CG18635	CG18635
CG31216	CG31216	CG2715	Syx4	CG3903	Gli
CG7496	PGRP-SD	CG6171	CG6171	CG15100	CG15100
CG10146	AttA	CG8890	Gmd	CG1560	mys
CG8620	CG8620	CG30090	CG30090	CG32476	mthl14
CG15678	CG15678	CG11897	CG11897	CG14027	TotM
CG4367	CG4367	CG18748	CR18748	CG6876	CG6876
CG8317	CG8317	CG6489	Hsp70Bc	CG6272	CG6272
CG9080	CG9080	CG2191	CG2191	CG5202	escl
CG9434	Fst	CG4463	Hsp23	CG3790	CG3790
CG9495	Scm	CG14746	PGRP-SC1a	CG32155	CG32155
CG15282	CG15282	CG8577	PGRP-SC1b	CG5953	CG5953
CG2909	CG2909	CG15210	CG15210	CG7668	CG7668
CG13325	CG13325	CG16712	CG16712	CG6649	Ugt35b
CG32302	CG32302	CG31344	CG31344	CG7874	CG7874
CG14219	CG14219	CG16775	CG16775	CG4183	Hsp26
CG3397	CG3397	CG4817	Ssrp	CG10531	CG10531
CG4269	CG4269	CG13388	Akap200	CG7876	CG7876
CG2065	CG2065	CG10842	Cyp4p1	CG17570	CG17570
CG32284	CG32284	CG9987	CG9987	CG15127	CG15127
CG3448	CG3448	CG14934	CG14934	CG8805	wun2
CG14695	CG14695	CG31694	CG31694	CG12926	CG12926
CG10146	AttA	CG33057	CG33057	CG13506	CG13506
CG18372	AttB	CG7163	mkg-p	CG1697	rho-4
CG15829	CG15829	CG10215	Ercc1	CG3937	cher
CG33468	CG33468	CG13654	CG13654	CG17158	cpb
CG15154	Socs36E	CG31864	CG31864	CG13321	CG13321
CG31789	CG31789	CG5202	escl	CG13610	Orct2
CG3401	betaTub60D	CG43119	Ect4	CG13281	Cas
CG10182	CG10182	CG32185	CG32185	CG8977	Cctgamma
CG8175	Mtk	CG12970	CG12970	CG13511	CG13511
CG6429	CG6429	CG15083	CG15083	CG4466	Hsp27
CG3703	CG3703	CG31704	CG31704	CG5084	CG5084
CG31366	Hsp70Aa	CG10491	vn	CG42566	CG13512
CG18743	Hsp70Ab	CG4445	pgant3	CG7574	bip1
CG5581	Ote	CG10810	Drs	CG5730	AnnIX
CG4373	Cyp6d2	CG18596	CG18596	CG11318	CG11318
CG3986	Cht4	CG30084	CG30084	CG5055	baz
CG13941	CG13941	CG12399	Mad	CG9996	CG9996
CG32282	dro4	CG42280	CG32143	CG31158	CG31158
CG1385	Def	CG42280	ome	CG3884	CG3884
CG32283	dro3	CG32107	CG32107	CG6014	CG6014

CG14957	CG14957	CG2196	CG2196	CG4625	Dhap-at
CG5371	RnrL	CG10794	DptB	CG2163	Pabp2
CG10140	CG10140	CG9273	CG9273	CG3298	Jhl-1
CG4437	PGRP-LF	CG4637	hh	CG6353	CG6353
CG5630	CG5630	CG7088	bnb	CG2275	Jra
CG2914	Ets21C	CG3074	CG3074	CG6066	CG6066
CG12224	CG12224	CG10660	CG10660	CG4208	XRCC1
CG16965	CG16965	CG18212	CG18212	CG18744	CG18744
CG6658	Ugt86Di	CG31324	CG31324	CG2163	Pabp2
CG4267	CG4267	CG33956	kay	CG32754	vanin-like
CG16963	Cry	CG1303	agt	CG11968	CG11968
CG15009	ImpL2	CG5800	CG5800	CG5520	Gp93
CG7296	CG7296	CG6720	UbcD2	CG33258	CG33258
-	CG7738	CG7756	Hsc70-2	CG32023	CG32023
CG1698	CG1698	CG9646	CG9646	CG12918	CG12918
CG12845	Tsp42Ef	CG10062	CG10062	CG13311	CG13311
CG31041	CG31041	CG32485	CG32485	CG3168	CG3168
CG14869	CG14869	CG11750	CG11750	CG5436	Hsp68
CG33958	CG33958	CG11425	CG11425	CG33109	CG33109
CG12242	GstD5	CG16844	IM3	CR10102	CG10102
CG13324	CG13324	CG14206	RpS10b	CG12505	CG12505
CG31530	CG31530	CG31508	TotC	CG4825	CG4825
CG33510	CG33510	CG11686	CG11686	CG31000	heph
CG9453	Spn4	CG7365	CG7365	CG14302	CG14302
CG18213	CG18213	CG4016	Spt-I	CG10724	CG10724
CG4797	CG4797	CG3988	gammaSnap	CG15784	CG15784
CG11086	Gadd45	CG15211	CG15211	CG32368	CG32368
-	CG15893	CG16928	mre11	CG33979	capt
CG6449	NijA	CG4080	CG4080	CG3595	sqh
CG8353	CG8353	CG32713	CG32713	CG7435	Arf84F
CG10178	CG10178	CG33223	CG33223	CG5734	CG5734
CG4711	sqh	CG6231	CG6231	CG13510	CG13510
CG10363	TepIV	CG6048	CG6048	CG6536	mthl4
CG14949	CG14949	CG8785	CG8785	CG30269	CG30269
CG32195	CG32195	CG17611	elF6	CG33338	p38c
CG18179	CG18179	CG12132	c11.1	CG1105	CG1105
CG14906	CG14906	CG12428	CG12428	CG4781	CG4781
CG5550	CG5550	CG10675	CHKov2	CR31953	CG31953
CG9358	Phk-3	CG43119	Ect4	CG8825	gkt
CG6125	CG6125	CG14872	CG14872	CG5869	CG5869
CG7142	CG7142	CG8596	CG8596	CG11242	CG11242
CG33542	upd3	CG43313	CG4351	CG4944	cib
CG1890	CG1890	CG6733	CG6733	CG8416	Rho1
CG16969	CG16969	CG31686	CG31686	CG8524	NK7.1
CG7171	Uro	CG14704	PGRP-LB	CG4244	Su(dx)

CG6074	CG6074	CG15818	CG15818	CG10550	CG10550
CG6967	CG6967	CG10645	lama	CG9617	CG9617
CG10638	CG10638	CG1009	Psa	CG18009	Trf2
CG6805	CG6805	CG11512	GstD4	CG31280	Gr94a
CG6891	CG6891	CG1572	CG1572	CG2310	CG2310
CG14226	dome	CG13482	CG13482	CG6742	cenB1A
CG42335	CG31177	CG33469	CG33469	CG1560	mys
CG13688	lpk2	CG31436	CG31436	CG6330	CG6330
CG3604	CG3604	CG11992	Rel	CG11454	CG11454
CG1004	rho	CG7810	CG7810	CG32579	CG32579
CG9453	Spn4	CG30160	CG30160	CG13780	Pvf2
CG6869	FucTA	CG18816	Tsp42Eb	CG32053	CG32053
CG7816	CG7816	CG13323	CG13323	CG10943	CG10943
CG11470	CG11470	CG14193	CG14193	CG1407	CG1407
CG16713	CG16713	CG12876	CG12876	CG11847	CG11847
CG13077	CG13077	CG9424	bocksbeutel	CG9209	vap
CG2948	rev7	CG6769	CG6769	CG5010	CG5010
CG1143	CG1143	CG17227	CG17227	CG4472	ldgf1
CG4354	slbo	CG7272	CG7272	CG7806	CG7806
CG18801	Ku80	CG13977	Cyp6a18	CG11141	CG11141
CG12868	CG12868	CG34043	CG34043	CG6281	Timp
CG10641	CG10641	CG32304	CG32304	CG32177	CG32177
CG6933	CG6933	CG31313	CG31313	CG4162	lace
CG5765	CG5765	CG8629	CG8629	CG6264	Best1
CG14339	CG14339	CG42807	CG13335	CG31884	Trx-2
CG13075	CG13075	CG12752	Nxt1	CG12818	CG12818
CG33048	Mocs1	CG11378	CG11378	CG15671	cv-2
CG10560	CG10560	CG4559	ldgf3	CG1623	CG1623
CG13488	CG13488	CG10962	CG10962	CG3348	CG3348
CG7170	Jon66Cii	CG42709	CG17667	CG4780	CG4780
CG9633	RpA-70	CG5446	CG5446	CG10973	CG10973
CG33147	CG33147	CG4852	Sras	CG16836	CG16836
CG4917	wfs1	CG33057	CG33057	CG10300	CG10300
CG5760	rtet	CG32179	Krn	CG13270	Ugt36Ba
CG7298	CG7298	CG5518	sda	CG15199	CG15199
CG33116	CG33116	CG8624	melt	CG32024	CG32024
CG1794	Mmp2	CG5205	CG5205	CG5452	dnk
CG12766	CG12766	CG15044	CG15044	CG3619	DI
CG8733	Cyp305a1	CG5910	CG5910	CG9999	RanGap
CG8776	nemy	CG11709	PGRP-SA	CG9579	AnnX
CG31272	CG31272	CG14205	CG14205	CG31509	TotA
CG10337	CG10337	CG6357	CG6357	CG14121	CG14121
CG5247	lrbp	CG10638	CG10638	CG10433	CG10433
CG14879	CG14879	CG34376	CG13845	CG3717	bcn92
CG9681	PGRP-SB1	-	CG15281	CG4944	cib

CG31087	CG31087	CG7052	TepII	CG7778	CG7778
CG17608	fu12	CG10580	fng	CG32699	CG32699
CG33542	upd3	CG31274	CG31274	CG6417	Oatp33Eb
CG42335	CG13420	CG31447	MESK4	CG14939	CG14939
CG3792	CG3792	CG10559	CG10559	CG3413	wdp
CG32982	CG32982	CG7118	Jon66Ci	CR40354	CG40354
CG8083	CG8083	CG1697	rho-4	CG3265	Eb1
CG10843	Cyp4p3	CG31363	Jupiter	CG18593	viaf
CG15220	CG15220	CG13252	CG13252	CG18817	Tsp42Ea
CG5883	CG5883	CG5730	AnnIX	CG6944	Lam
CG13419	burs	CG5921	CG5921	CG31004	CG31004
CG5036	CG5036	CG8497	Rhp	CG31794	Pax
CG32982	CG32982	CG8209	CG8209	CG3881	GlcAT-S
CG31633	CG31633	CG33107	CG33107	CG15394	CG15394
CG1718	CG1718	CG8095	scb	CG15870	CG15870
CG6186	Tsf1	CG15085	edl	CG4433	CG4433
CG6891	CG6891	CG3299	Vinc	CG4180	l(2)35Bg
CG6900	CG6900	CG31148	CG31148	CG18659	CG18659
CG42826	CG6640	CG10126	CG10126		Nup98 - unknown ID
CG14872	CG14872	CG3172	twf	CG32038	CG32038
CG12843	Tsp42Ei	CG10916	CG10916	CG43119	Ect4
CG12051	Act42A	CG14080	Mkp3	CG5707	CG5707
CG7103	Pvf1	CG14907	CG14907	CG4600	yip2
CG6757	SH3PX1	CG3884	CG3884	CG1634	Nrg
CG14204	CG14204	CG42678	CG30193	CG17294	CG17294
CG3380	Oatp58Dc	CG15112	ena	CG10618	CHKov1
CG31449	Hsp70Ba	CG2822	Shaw	CG1692	mal
CG31359	Hsp70Bb	CG18188	Damm	CG13645	Nmnat
CG5834	Hsp70Bbb	CG4591	Tsp86D	CG1898	HBS1
CG6489	Hsp70Bc	CG16910	key	CG6281	Timp
CG17108	CG17108	CG1242	Hsp83	CG13176	CG13176
CG7017	CG7017	CG12176	Lig4	CG9968	Anxb11
CG9009	CG9009	CG5205	CG5205	CG32130	stv
CG9988	CG9988	CG4650	CG4650	CG3940	CG3940
CG8678	CG8678	CG14606	CG14606	CG15068	CG15068
CG12112	CG12112	CG13905	CG13905	CG5547	Pect
CG10962	CG10962	CG4740	AttC	CG5809	CaBP1
CG5664	CG5664	CG7252	CG7252	CG8776	CG8776
CG33336	p53	CG17325	CG17325	CG3382	Oatp58Db
CG3008	CG3008	CG10570	CG10570	CG2187	CG2187
CG32054	CG32054	CG12288	CG12288	CG10513	CG10513
-	CG32224	CG15423	CG15423	CG14292	CG14292
CG7402	CG7402	CG31955	CG31955	CG4181	GstD2
CG3290	CG3290	CG10540	cpa	CG3165	CG3165
CG4835	CG4835	CG5730	AnnIX	CG1152	Gld

CG4563	CG4563	CG18067	CG18067	CG1634	Nrg
CG6337	CG6337	CG14872	CG14872	CG32717	sdt
CG10922	La	CG10345	CG10345	CG10086	CG10086
CG2064	CG2064	CG33486	asparagine- synthetase		

Tab. A 3 Liste der verstärkt exprimierten Gene in *w1118* nach oraler Infektion mit *Serratia marcescens*

ID Nummer	Symbol	Mittelwert	ID Nummer	Symbol	Mittelwert
AB007987		0.675	CG18779	Lcp65Ag3	2.575
CG10019	CG10019	0.937	CG18809	CG18809	0.619
CG10021	bowl	3.096	CG18823	CG18823	0.732
CG10023	Fak56D	0.816	CG1885	CG1885	1.244
CG10036	otp	0.627	CG1897	Dr	0.911
CG100435		1.866	CG1902	CG1902	0.681
CG10063	CG10063	1.636	CG1909	CG1909	0.972
CG10071	RpL29	1.081	CG1951	CG1951	4.177
CG10081	CG10081	0.916	CG1960	mu2	1.376
CG10082	CG10082	2.178	CG1968	CG1968	0.612
CG10093	Cyp313a3	0.641	CG1977	dlt	1.929
CG10101	lr84a	0.664	CG2009	bip2	0.717
CG10107	CG10107	1.409	CG2016	CG2016	1.011
CG10119	LamC	1.113	CG2023	CG2023	1.198
CG10120	Men	1.475	CG2031	Hpr1	1.199
CG10121	SP1173	0.759	CG2062	Cyp4e1	0.950
CG10159	BEAF-32	4.672	CG2108	Rab23	0.638
CG10165	CG10165	0.588	CG2109	mRpL44	1.242
CG10191	Poc1	0.641	CG2114	FR	0.654
CG10243	Cyp6a19	1.116	CG2120	CG2120	1.590
CG10284	CG42564	0.641	CG2621	sgg	3.741
CG10337	CG10337	0.918	CG2650	CG2650	0.751
CG10352	CG10352	0.659	CG2678	CG2678	1.627
CG10428	CG10428	0.777	CG2701	CG2701	0.888
CG10447	Nf-YB	3.183	CG2816	CG2816	0.901
CG10459	CG10459	0.752	CG2837	CG2837	2.146
CG10465	CG10465	0.790	CG2843	Cwc25	1.208
CG10469	CG10469	0.859	CG2864	Parg	0.679
CG10486	CG10486	0.708	CG2911	CG2911	0.581
CG10522	sti	0.672	CG2913	yin	0.589
CG10546	Cralbp	3.785	CG2950	CG2950	1.004
CG10555	CG10555	0.893	CG2962	CG2962	1.454
CG10561	CG10561	1.094	CG2999	unc-13	0.669
CG10591	CG10591	1.068	CG30010	CG30010	1.000
CG10592	CG10592	0.943	CG30015	CG30015	0.746
CG10610	ECSIT	2.082	CG30037	CG30037	1.131
CG1063	ltp-r83A	0.634	CG30044	s-cup	0.758
CG10635	CG10635	0.647	CG30045	Cpr49Aa	1.506

CG10639	CG10639	1.501	CG3006	Fmo-1	0.609
CG10651	CG10651	1.744	CG30079	trpm	0.878
CG10682	vih	0.676	CG30084	Zasp52	0.584
CG10703	CG10703	0.702	CG30090	CG30090	0.861
CG10704	toe	0.641	CG30097	Menl-2	0.790
CG10721	CG10721	0.755	CG30099	CG30099	0.833
CG10723	Kua	1.227	CG30103	CG30103	6.091
CG10739	pigeon	0.802	CG30116	CG30116	1.046
CG10747	CG10747	0.756	CG30125	lr56a	0.818
CG10752	CG10752	1.262	CG30150	Obp57d	1.692
CG10754	CG10754	0.764	CG30163	Cpr60D	0.943
CG10755	Cyp4ae1	0.650	CG30173	HSPC300	1.023
CG10776	wit	2.454	CG30174	Mlp60A	1.015
CG10810	Drs	0.765	CG30176	wibg	0.893
CG10812	dro5	1.996	CG30182	CG42559	0.711
CG10838	robl22E	0.892	CG30186	Gr59c	1.306
CG1084	Cont	1.538	CG30189	Gr59a	1.481
CG10845	CG10845	1.198	CG30190	CG42678	0.973
CG10853	CG10853	0.598	CG30191	Gr59b	0.960
CG10862	CG10862	0.857	CG3021	CG3021	0.766
CG10907	CG10907	0.605	CG3022	GABA-B-R3	1.875
CG10916	CG10916	2.384	CG30263	CG30263	1.219
CG10919	CG10919	0.980	CG30268	CG30268	2.147
CG10922	La	2.580	CG30269	CG30269	2.004
CG10931	CG10931	1.877	CG30270	CG30270	0.690
CG10936	CG10936	0.735	CG30275	CG30275	1.077
CG10944	RpS6	1.101	CG30279	CG30279	1.423
CG10953	CG10953	0.771	CG30282	CG30282	3.055
CG10971	Hip1	0.944	CG30288	CG30288	1.019
CG10977	CG33523	1.109	CG302951		0.601
CG10981	dgrn	0.714	CG30324	CG30324	0.855
CG10997	Clic	1.309	CG30329	Vha100-3	0.897
CG10998	r-cup	0.597	CG3034	MED22	1.202
CG10999	CG42675	0.711	CG30340	CG30340	0.814
CG11000	CG11000	0.732	CG30374	CR30374	0.635
CG11007	CG11007	0.880	CG30390	Sgf29	2.122
CG11008	CG42588	1.184	CG30414	CG30414	0.672
CG11018	CG11018	1.225	CG30431	CG30431	0.795
CG11019	CG31688	1.218	CG3045	CG3045	1.595
CG1102	MP1	1.123	CG30465	CG30465	0.937
CG110270		4.568	CG30470	CG43729	1.014
CG11029	CG11029	1.870	CG30479	CG30479	1.029
CG1104	CG1104	0.928	CG3048	Traf4	0.858
CG11051	Nplp2	1.658	CG30489	Cyp12d1-p	0.634
CG11060	CG11060	1.107	CG3058	Dim1	1.730
CG11079	CG34424	3.888	CG31038	CG31038	0.951
CG1109	CG1109	0.636	CG3109	mRpL16	0.847
CG11091	CG11091	1.157	CG31279	CG31279	1.683
CG11092	CG11092	0.669	CG312941		2.524

CG111001		0.724	CG31319	cv-c	0.609
CG11101	pwn	0.831	CG31321	CG31321	0.891
CG11112	CG11112	1.090	CG31326	CG31326	0.595
CG11113	CG11113	0.773	CG3134	shf	1.107
CG11123	CG11123	0.811	CG31351	Octbeta3R	0.766
CG11124	sPLA2	0.624	CG31381	CG31381	0.660
CG11139	p47	1.328	CG31385	Neu3	0.693
CG11140	Aldh-III	1.228	CG31392	CG42727	2.046
CG11144	mGluRA	1.875	CG31412	CG34409	0.911
CG1116	CG1116	0.895	CG31414	CG31414	0.834
CG11160	CG11160	0.588	CG31460	CG31460	1.584
CG11163	CG11163	0.732	CG31463	CG31463	0.737
CG11184	Upf3	0.618	CG31475	CG31475	0.593
CG11194	Hey	0.779	CG31482	CG31482	0.676
CG11198	ACC	0.656	CG31493	CG31493	0.758
CG11203	CG11203	2.150	CG31551	CG31551	1.078
CG11206	Liprin-gamma	0.851	CG31557	Obp83ef	1.465
CG11207	feo	1.074	CG31561	Osi16	0.711
CG11211	CG11211	0.652	CG31629	Pvf3	1.495
CG11228	hpo	1.354	CG31630	milt	0.895
CG11237	Oseg6	0.737	CG31639	CG31639	0.777
CG11268	ste14	1.285	CG31643	CG31643	1.936
CG11276	RpS4	0.597	CG31647	CR31647	2.122
CG1129	CG1129	0.773	CG31657	PNUTS	0.733
CG11294	CG11294	1.746	CG31658	Nnf1b	1.093
CG11295	l(2)dtl	0.804	CG31665	wry	0.792
CG11297	CG11297	1.277	CG31668	CG31668	0.748
CG11298	CG11298	2.224	CG31671	tho2	0.738
CG11299	Sesn	0.686	CG31674	CG31674	1.397
CG1130	scrt	1.169	CG31690	CG31690	1.846
CG11319	CG11319	0.770	CG31699	CG31699	0.782
CG11326	Tsp	1.090	CG31713	Apf	2.932
CG11384	CG11384	0.784	CG3172	twf	0.676
CG11403	CG11403	0.968	CG31732	yuri	1.264
CG11404	CG11404	0.592	CG31737	CG42266	0.593
CG11416	uri	1.400	CG31758	Pde1c	0.649
CG11425	CG11425	0.727	CG31773	CG31773	1.303
CG11438	CG11438	0.581	CG31793	CG31793	1.126
CG11454	CG11454	0.686	CG31796	CG31796	2.173
CG11491	br	1.115	CG31800	CG31800	1.196
CG11498	CG11498	1.582	CG31818	CG42266	0.951
CG1150	Osi3	1.165	CG31824	CR31824	0.862
CG11513	armi	0.638	CG31839	nimB2	2.375
CG11518	pygo	0.657	CG31842	mRpS23	1.423
CG11533	Asator	1.553	CG31869	CG31869	1.028
CG11534	CG11534	0.816	CG31908	CG31908	2.565
CG11596	CG11596	2.131	CG3191	CG3191	0.712
CG11608	CG11608	0.677	CG31915	CG31915	0.638
CG11621	Pi3K68D	0.703	CG31923	CG31923	0.638

CG11648	Abd-B	0.839	CG31932	Gr22f	0.587
CG11656	CG11656	0.843	CG31950	CG31950	0.780
CG11665	CG11665	0.912	CG31974	CG31974	0.880
CG11680	mle	0.751	CG32038	CG32038	0.640
CG1169	Osi18	1.683	CG32061	CG32061	0.608
CG11694	CG11694	2.013	CG32073	CG32073	1.197
CG11709	PGRP-SA	1.637	CG32121	CG32121	1.229
CG1171	Akh	2.031	CG32143	ome	1.840
CG11756	CG11756	1.042	CG32145	ome	0.736
CG11783	Hr96	1.275	CG32149	RhoGAP71E	0.666
CG11784	CG11784	0.800	CG32228	CG32228	0.729
CG11793	Sod	1.112	CG3223	CG3223	0.612
CG11804	ced-6	1.310	CG32255	Gr64f	1.944
CG11856	Nup358	1.548	CG32262	CG32262	0.594
CG11975	CG11975	0.663	CG32263	CG32263	0.701
CG11986	CG11986	0.953	CG32306	CG42669	0.710
CG12023	GV1	0.787	CG32308	CG42357	0.838
CG12026	Tmhs	0.769	CG3231	sname	0.750
CG12034	CG12034	1.716	CG32377	Ank2	1.078
CG12052	lola	0.747	CG32379	CG32379	0.666
CG12069	CG12069	0.805	CG32389	Dscam2	4.129
CG12070	Sap-r	0.778	CG3242	sob	0.610
CG12071	CG12071	0.642	CG32425	CG32425	0.580
CG12084	CG12084	1.057	CG32444	CG32444	1.081
CG12114	spn-F	0.838	CG32454	CG32454	1.089
CG12125	CG12125	1.128	CG32459	CG32459	0.657
CG12149	c12.2	4.582	CG32464	l(3)82Fd	1.013
CG12155	CG12155	0.921	CG32468	CG32468	0.682
CG12178	Nhe1	0.851	CG32556	chas	1.084
CG1218	CG1218	3.082	CG32563	CG32563	1.063
CG12192	Klp59D	2.419	CG3264	CG3264	0.881
CG12205	Bsg25A	0.694	CG32710	CG32710	1.003
CG12232	Galpha73B	0.678	CG32741	CG32741	0.929
CG12241	CG12241	0.948	CG32742	l(1)G0148	0.631
CG12249	mira	1.275	CG3277	CG3277	0.670
CG1225	RhoGEF3	0.700	CG327963		1.328
CG12251	AQP	0.803	CG32798	CG32798	0.994
CG12259	CG12259	1.239	CG32803	CG32803	0.829
CG12263	CG12263	0.679	CG3281	CG3281	0.704
CG12272	CG12272	0.767	CG32810	inc	1.159
CG12273	angel	0.823	CG32820	CG32820	0.600
CG12274	CG34353	1.079	CG32824	CG32824	1.089
CG12289	CG12289	1.091	CG328360		0.629
CG12301	CG12301	2.645	CG32846	CG32846	0.974
CG12303	lr67b	2.935	CG3285	CG3285	0.587
CG12309	CG12309	1.670	CG3287	CG3287	0.672
CG12320	CG12320	1.653	CG32920	Prx5	2.159
CG12324	RpS15Ab	0.797	CG32922	Skeletor	5.171
CG12347	CG12347	0.808	CG3294	CG3294	0.899

CG12348	Sh	3.342	CG32954	Adhr	0.869
CG12372	spt4	0.974	CG3307	pr-set7	2.290
CG12419	CG12419	0.673	CG33075	Tyler	1.368
CG12462	tlk	0.872	CG33119	nimB1	1.499
CG12493	CG12493	0.814	CG33150	Gr59f	1.047
CG12498	CG12498	1.547	CG33157	Gr64d	0.798
CG12590	CG12590	1.328	CG33160	CG33160	0.875
CG12600	kibra	0.831	CG3318	Dat	1.985
CG12620	CG12620	1.634	CG33194	CheA29a	0.943
CG12625	CG42683	1.311	CG33201	CG33201	2.582
CG12645	CG12645	0.963	CG33257	CG33257	0.618
CG12665	Obp8a	1.068	CG33267	CG33267	0.988
CG12683	CG12683	2.458	CG33298	CG33298	0.837
CG12685	CG12685	0.967	CG33346	CG33346	0.937
CG12691	CG12691	0.669	CG3337	CG3337	0.731
CG12708	CG12708	0.612	CG3342	CG3342	1.272
CG1271	CG1271	0.713	CG3344	CG3344	0.679
CG12753	ema	1.126	CG33475	CG33475	0.741
CG12792	l(2)09851	1.406	CG33485	dpr9	1.991
CG12841	Tsp42Ek	0.719	CG3351	mRpL11	0.844
CG12848	CG12848	0.926	CG3385	navy	1.551
CG12877	CG12877	1.061	CG3422	Pros28.1	0.785
CG12879	CG43320	1.188	CG34439	CG34439	1.462
CG1288	CG1288	3.043	CG3485	CG34406	0.776
CG12899	CG42732	0.933	CG3540	Cyp4d14	0.810
CG12946	Whamy	0.787	CG3608	CG3608	1.671
CG12976	CG42337	0.802	CG3735	CG3735	0.645
CG12992	CG12992	0.676	CG3869	Marf	0.657
CG12996	f	3.356	CG3883	Saf6	0.635
CG13022	CG13022	1.677	CG3886	Psc	3.171
CG13024	CG13024	0.764	CG3920	l(2)k16918	0.604
CG13033	CG13033	0.656	CG3921	CG3921	0.715
CG13049	CG13049	1.100	CG3923	Exp6	0.803
CG1307	CG1307	2.302	CG3924	Chi	1.318
CG13074	CG13074	0.954	CG3925	CG3925	2.679
CG13084	CG13084	0.633	CG3931	Rrp4	0.631
CG13134	CG42843	3.400	CG3945	Rad9	0.771
CG1314	CG1314	1.279	CG3955	CG3955	0.685
CG13160	CG13160	0.614	CG3956	sna	2.223
CG1317	CG1317	0.756	CG3972	Cyp4g1	0.769
CG1318	Hexo1	0.606	CG3973	pigs	1.281
CG13189	CG13189	0.838	CG3981	Unc-76	1.089
CG13196	CG13196	3.144	CG3984	CG3984	0.628
CG1320	mRpL23	0.754	CG3991	TppII	0.901
CG13214	Cpr47Ef	0.617	CG3992	srp	1.080
CG13222	Cpr47Ee	0.849	CG40040	CG40040	0.962
CG13224	Cpr47Eb	0.990	CG40050	nvd	1.351
CG13228	CG13228	1.020	CG40057	CG40057	1.416
CG13247	CG13247	4.493	CG4006	Akt1	1.691

CG13252	CG13252	0.983	CG40092	CG40092	1.212
CG13260	CG42389	2.025	CG40103	CG40103	0.950
CG13272	CG13272	1.070	CG40109	CG41520	7.104
CG13279	Cyt-b5-r	0.937	CG40138	CG40138	0.606
CG13280	CG13280	1.204	CG40169	CG40169	0.690
CG13283	CG13283	1.571	CG40196	CG40196	1.007
CG13285	CG13285	2.476	CG40207	CG40207	0.745
CG13313	CG13313	0.679	CG40268	CG40268	2.853
CG13316	Mnt	0.884	CG40290	CG40290	1.018
CG13318	CG13318	0.603	CG40337	CG40337	0.805
CG13320	Sans	0.640	CG40343	CG40343	0.957
CG13359	CG13359	1.933	CG40390	CG40390	1.054
CG13360	CG13360	1.301	CG40392	CG40392	0.641
CG13364	CG13364	1.254	CG4042	CG4042	1.217
CG13373	CG13373	0.705	CG4043	Rrp46	0.768
CG13380	CG13380	1.183	CG40477	Caps	0.933
CG13394	CG42820	0.927	CG40478	Dyrk3	2.144
CG13415	Cby	0.973	CG4051	egl	0.912
CG13416	CG13416	0.919	CG4054	Fili	0.699
CG13421	Obp57c	0.967	CG4060	TwdlW	1.025
CG13427	CG13427	5.677	CG4071	Vps20	0.951
CG13428	CG13428	0.828	CG41049	CG41049	0.704
CG13434	Nnf1a	0.844	CG41056	CG41056	0.704
CG13461	CG13461	1.030	CG41087	CG41087	3.209
CG13479	CG13479	1.006	CG41105	CG42346	0.689
CG13494	CG13494	5.954	CG41118	CG41118	0.595
CG13495	Gr58b	0.586	CG4133	CG4133	4.761
CG13534	CG13534	0.590	CG4174	CG4174	1.086
CG1354	CG1354	0.749	CG4184	MED15	1.315
CG13548	CG34371	1.086	CG4185	NC2beta	1.444
CG13575	CG13575	2.794	CG4187	CG34411	1.199
CG13582	lr60d	0.669	CG4216	term	0.813
CG13590	CG13590	0.799	CG4274	fzy	1.630
CG13648	tnc	0.861	CG4300	CG4300	0.958
CG13651	danr	0.693	CG4408	CG4408	0.856
CG13653	CG13653	0.585	CG4612	CG4612	3.210
CG13675	CG13675	0.789	CG4619	CG4619	2.647
CG13678	CG13678	1.444	CG4633	Aats-ala-m	1.103
CG13783	Pvf3	0.906	CG4646	CG4646	0.604
CG13833	CG13833	2.169	CG4665	Dhpr	1.021
CG13834	CG34375	0.989	CG4684	nwk	0.920
CG13849	Nop56	3.450	CG4705	CG4705	1.849
CG1385	Def	3.003	CG4716	CG4716	1.301
CG13858	CG34377	0.947	CG4767	Tektin-A	0.755
CG13873	Obp56g	0.598	CG4775	Tango14	1.267
CG13886	CG42554	0.914	CG4784	Cpr72Ec	0.630
CG1389	tor	0.841	CG4867	bc10	1.047
CG13891	CG13891	0.690	CG4869	betaTub97EF	0.662
CG1391	sol	0.877	CG4886	cyp33	1.135

CG13921	CG13921	0.939	CG4891	CG4891	0.926
CG13925	Dbx	0.840	CG4894	Ca-alpha1D	0.915
CG13926	CG13926	1.374	CG4903	MESR4	1.067
CG13928	CG13928	0.999	CG4911	CG4911	0.670
CG13931	CG13931	1.063	CG4916	me31B	0.642
CG13941	Arc2	0.733	CG4918	RpLP2	1.062
CG13942	Shroom	2.346	CG4920	ea	0.697
CG140243		0.813	CG4928	CG4928	0.779
CG14031	Cyp4ac3	2.162	CG4935	CG4935	0.767
CG14039	qtc	0.801	CG4947	Tgt	2.805
CG14053	CG14053	2.355	CG4953	CG4953	0.745
CG14085	CG14085	0.658	CG4963	mfrn	1.545
CG14130	CG14130	0.820	CG4972	CG4972	1.074
CG14147	CG14147	0.894	CG4977	kek2	0.608
CG1417	slgA	1.378	CG4989	CG4989	2.757
CG1418	CG1418	0.718	CG4991	CG4991	1.102
CG14180	CG14180	0.994	CG4995	CG4995	1.164
CG14181	Use1	0.771	CG4996	CG4996	1.089
CG14206	RpS10b	1.120	CG5005	HLH54F	1.193
CG14218	CG14218	0.638	CG5009	CG5009	1.057
CG14232	CG14232	0.598	CG5026	CG5026	1.073
CG14243	TwdID	1.105	CG5037	CG5037	1.023
CG14264	CG42534	2.495	CG5038	CG5038	0.674
CG14271	Gas8	1.161	CG5070	CG5070	0.679
CG14310	CG14310	0.687	CG5084	CG5084	1.309
CG14354	CG14354	0.697	CG5105	Plap	1.697
CG14358	CCHa1	0.934	CG5110	CG5110	0.762
CG14436	C3G	0.967	CG5122	CG5122	0.890
CG14497	CG34386	0.849	CG5123	W	1.317
CG14501	CG33958	0.717	CG5124	adp	0.712
CG14514	Brd8	2.017	CG5150	CG5150	1.022
CG14537	CG14537	0.733	CG5162	CG5162	1.110
CG14548	HLHmbeta	1.143	CG5163	TfIIA-S	1.348
CG14550	CG14550	1.525	CG5168	CG5168	0.806
CG14551	CG14551	3.628	CG5188	CG5188	0.683
CG14559	CG33970	1.069	CG5189	CG5189	0.848
CG14562	CG14562	1.918	CG5231	Las	1.244
CG14567	CG14567	0.621	CG5250	CG5250	1.387
CG14568	CG14568	0.932	CG5252	Ranbp9	1.439
CG14573	CG14573	2.655	CG5255	CG5255	0.847
CG1461	CG1461	0.673	CG5266	Pros25	0.653
CG14615	CG14615	5.229	CG5284	CIC-c	1.103
CG14617	Cp110	0.657	CG5341	sec6	0.854
CG14625	CG14625	0.587	CG5343	CG5343	0.948
CG14627	CG14627	0.899	CG5359	CG5359	0.634
CG14647	CG14647	2.234	CG5360	mi	1.151
CG14658	CG14658	0.722	CG5376	CG5376	0.580
CG14659	CG14659	0.592	CG5422	Rox8	0.586
CG14661	CG14661	0.614	CG5429	Atg6	1.053

CG14669	CG14669	1.085	CG5439	CG5439	0.847
CG14671	CG14671	0.701	CG5467	scrib	1.186
CG14692	CG14692	0.739	CG5473	SP2637	0.738
CG14701	CG14701	1.642	CG5480	Tb	1.017
CG14709	Mrp4	0.953	CG5495	Txl	1.307
CG14713	CG42327	1.105	CG5506	CG5506	0.679
CG14728	sad	1.835	CG5525	CG5525	1.022
CG14745	PGRP-SC2	0.666	CG5558	CG42359	0.766
CG14777	CG14777	0.583	CG5620	app	0.941
CG14787	CG14787	0.896	CG5634	dsd	0.666
CG14799	CG42666	0.824	CG5655	Rsf1	1.135
CG14811	CG14811	1.364	CG5656	CG5656	0.693
CG14814	CG14814	2.406	CG5663	Dip-C	0.696
CG14851	CG14851	0.645	CG5674	CG5674	1.151
CG14856	CG14856	0.792	CG5697	CG5697	1.391
CG14872	CG14872	0.723	CG5714	ecd	1.704
CG14890	CG42342	1.028	CG5732	Gld2	0.995
CG14928	spz4	1.617	CG5742	CG5742	0.787
CG14935	Mal-B2	1.747	CG5773	CG5773	0.699
CG14964	CG14964	0.958	CG57862		0.774
CG14966	CG14966	1.299	CG5790	CG5790	0.629
CG14992	Ack	1.327	CG5818	mRpL4	2.111
CG15013	dyl	0.893	CG5836	SF1	0.633
CG15015	Cip4	0.964	CG5848	cact	1.242
CG15027	CG15027	0.590	CG5860	CG5860	0.660
CG15098	CG15098	0.647	CG5883	CG5883	0.632
CG15133	tweek	1.036	CG5907	Frq2	0.877
CG15160	CG15160	1.165	CG5911	ETHR	1.063
CG15171	robl37BC	1.208	CG5932	mag	0.765
CG15194	CG43155	1.659	CG5945	CG5945	0.842
CG15196	CG15196	0.913	CG5949	DNApol-delta	2.113
CG15210	CG15210	0.656	CG5953	CG5953	1.156
CG15212	CG15212	1.018	CG5962	Arr2	1.228
CG15245	CG42262	1.637	CG5984	CG5984	0.763
CG15254	CG15254	1.050	CG6000	CG6000	0.613
CG15260	CG15260	1.152	CG6026	CG6026	0.812
CG15292	CG15292	0.609	CG6046	Bin1	1.607
CG15316	CG15316	0.820	CG6057	SMC1	0.637
CG15352	rdgA	0.977	CG6074	CG6074	0.604
CG15356	CG15356	0.633	CG6103	CrebB-17A	1.421
CG15361	Nplp4	1.215	CG6122	piwi	0.650
CG15364	CG42388	0.820	CG6138	CG6138	1.687
CG15375	CG15375	4.280	CG6202	Surf4	0.592
CG15376	CG43689	2.029	CG6223	betaCop	0.614
CG15414	CG15414	0.770	CG6277	CG6277	0.610
CG1543	Tbh	3.047	CG6318	Rad51D	0.953
CG15435	CG15435	1.041	CG6327	CG43693	0.591
CG15480	CG15480	1.585	CG6358	Xpac	1.268
CG15485	CG15485	1.479	CG6382	Elf	0.876

CG15526	CG15526	1.078	CG6391	Aps	0.646
CG15537	CG15537	0.953	CG6417	Oatp33Eb	1.741
CG15549	CG15549	0.754	CG6464	salm	0.819
CG15589	Osi24	0.895	CG6544	fau	0.763
CG15594	CG15594	0.602	CG6569	CG6569	0.693
CG15611	CG15611	1.390	CG66050		4.524
CG15635	CG15635	1.352	CG6607	CG6607	1.732
CG15663	Rgk3	0.968	CG6610	CG6610	0.854
CG15729	CG15729	0.828	CG6612	Adk3	0.850
CG15738	CG15738	1.000	CG6621	CG6621	0.735
CG15743	CG15743	0.689	CG6628	CG6628	1.640
CG15747	CG15747	0.921	CG6639	CG6639	1.141
CG15767	CG15767	0.998	CG6640	CG42826	1.154
CG15800	CG15800	1.493	CG6650	CG6650	1.112
CG15803	CG15803	1.787	CG6695	CG6695	0.881
CG15817	CG15817	1.166	CG6696	CG6696	2.470
CG15824	CG15824	0.712	CG6719	CG6719	0.604
CG158488		0.783	CG6736	llp4	0.934
CG15877	CG15877	0.583	CG6753	CG6753	0.643
CG15899	Ca-alpha1T	3.033	CG6770	CG6770	3.321
CG15929	lin-52	0.767	CG6788	CG6788	1.930
CG1603	CG1603	1.060	CG6808	CG6808	1.713
CG1648	CG1648	0.914	CG6817	foi	1.249
CG1651	Ank	0.961	CG6818	MESR6	1.373
CG1665	CG1665	0.706	CG6821	Lsp1gamma	0.912
CG16707	vsg	1.179	CG6824	ovo	0.815
CG16725	Smn	0.946	CG6859	Pex3	1.760
CG16735	CR16735	1.899	CG6868	tld	1.039
CG16736	CG16736	0.751	CG6893	CG6893	0.736
CG16742	CG16742	0.925	CG6896	MYPT-75D	2.318
CG1675	Ntmt	0.700	CG6912	CG6912	4.354
CG16789	CG16789	2.582	CG6939	Sbf	1.283
CG16799	CG16799	1.442	CG6995	Saf-B	0.716
CG1681	CG1681	0.712	CG7014	RpS5b	0.595
CG16857	CG16857	1.170	CG7026	VhaPPA1-2	0.782
CG16868	CG16868	0.752	CG7031	CG7031	0.993
CG16918	CG34437	1.122	CG7039	CG7039	0.668
CG16931	Eig71Ea	0.900	CG7107	up	0.755
CG16964	CG16964	1.265	CG7121	Tehao	0.909
CG169733		1.391	CG7125	PKD	1.979
CG17019	CG17019	2.355	CG7144	LKR	1.149
CG17042	CG42319	0.618	CG7158	CG7158	2.627
CG17104	CG17104	0.719	CG7175	CG7175	1.022
CG17117	hth	0.649	CG7201	CG7201	0.935
CG17124	CG17124	1.463	CG7203	CG7203	0.629
CG17136	Rbp1	0.981	CG7207	cert	1.031
CG17191	CG17191	0.941	CG7212	cdm	0.656
CG17216	KP78b	0.955	CG7221	Wwox	0.819
CG17221	CG17221	1.081	CG7222	CG7222	1.176

CG17302	Prosbeta4R2	2.818	CG7276	CG7276	0.612
CG17304	CG17304	0.767	CG7280	CG7280	0.813
CG17328	CG17328	1.570	CG7285	star1	0.709
CG17331	CG17331	1.113	CG7292	Rrp6	0.950
CG17333	CG17333	0.603	CG7297	pgant8	1.831
CG17349	CG17349	0.785	CG7306	obst-F	1.919
CG17350	CG17350	0.607	CG7309	CG7309	1.300
CG17360	CG17360	1.265	CG7320	CG7320	1.070
CG1738	CG1738	0.583	CG7321	Rim	1.444
CG17380	CG17380	1.325	CG7328	CG7328	1.088
CG17387	CG17387	0.639	CG7337	CG7337	1.347
CG17397	MED21	0.708	CG7342	CG7342	1.270
CG1750	CG1750	0.814	CG7358	CG7358	1.751
CG17527	GstE5	0.605	CG7367	CG7367	0.676
CG17528	CG17528	1.110	CG7369	CG7369	0.736
CG1753	Cbs	1.661	CG7379	CG7379	1.060
CG17549	CG17549	0.773	CG7380	baf	1.187
CG17560	CG17560	0.825	CG7398	Trn	0.630
CG17568	CG17568	2.007	CG7407	CG7407	0.598
CG17664	CG17664	0.952	CG7433	CG7433	0.704
CG17673	Acp70A	1.011	CG7435	Arf84F	0.681
CG1768	dia	3.367	CG7437	mub	2.397
CG17689	Spt20	0.711	CG7450	CrebA	0.735
CG17776	CG17776	0.755	CG7480	Pgant35A	0.647
CG17781	CG17781	1.125	CG7554	comm2	0.584
CG1780	ldgf4	0.695	CG7638	CG7638	0.845
CG17818	rdgBbeta	0.615	CG7641	Nca	1.413
CG17819	CG17819	0.646	CG7673	Edg78E	2.285
CG17826	CG17826	2.953	CG7678	Vha100-4	6.614
CG17838	CG17838	0.588	CG7685	CG7685	0.580
CG17840	CG17840	0.703	CG7697	CstF-64	0.696
CG17861		1.540	CG7700	Gos28	3.242
CG17876	Amy-d	0.682	CG7725	rogdi	0.742
CG17924	Acp95EF	1.159	CG7729	Fit2	0.997
CG17931	CG17931	0.797	CG7737	CG7737	1.012
CG1794	Mmp2	3.795	CG7772	CG7772	0.914
CG17952	Rbbp5	0.669	CG77761		0.749
CG17959	CG17959	0.607	CG7779	Cng	1.382
CG17962	Z600	1.341	CG77857		0.855
CG18001	RpL38	0.916	CG7820	CAH1	0.671
CG18004	CG18004	0.680	CG7825	Rad17	3.227
CG18009	Trf2	2.324	CG7837	CG7837	1.105
CG18028	It	0.983	CG7840	CG7840	0.628
CG1804	kek6	0.832	CG7863	dream	1.262
CG18064	Met75Cb	1.820	CG7864	Pex10	0.756
CG18069	CaMKII	0.679	CG7873	Src42A	0.800
CG18087	Sgs7	1.819	CG7874	Mur18B	1.247
CG18143	DhpD	0.710	CG7897	gp210	1.450
CG1815	CG1815	0.631	CG7904	put	3.034

CG18156	Mis12	1.207	CG7908	Tace	1.174
CG18188	Damm	2.263	CG7910	CG7910	1.109
CG1819	CG34120	1.021	CG7913	PP2A-B'	1.284
CG18193	CG18193	1.496	CG7916	CG7916	1.002
CG18217	CR18217	2.050	CG7919	fan	1.577
CG1822	bif	0.943	CG7920	CG7920	2.730
CG18268	CG18268	1.190	CG7921	Mgat2	1.180
CG18273	CG18273	1.928	CG7930	TpnC73F	0.964
CG18324	CG18324	0.998	CG7945	CG7945	0.926
CG18340	Ucp4B	0.792	CG7946	CG7946	1.010
CG18358	CG18358	1.711	CG7956	CG7956	1.015
CG18361	dsh	1.170	CG7958	tna	0.740
CG18371	CG18371	1.988	CG7962	CdsA	1.766
CG18374	Gyk	0.883	CG7971	CG7971	0.844
CG18506	NaCP60E	1.673	CG7972	mus301	2.811
CG18507	CG18507	0.940	CG7981	trol	1.598
CG18537	CG18537	3.139	CG7990	CG7990	0.683
CG18542	CG18542	2.363	CG7993	CG7993	0.790
CG18586	CG18586	0.828	CG7999	MED24	0.875
CG18594	Pebp1	2.721	CG8005	CG8005	0.822
CG18609	CG18609	1.526	CG8010	CG8010	0.606
CG18617	Vha100-2	0.656	CG8012	CG8012	1.319
CG1864	Hr38	0.978	CG8013	Su(z)12	1.686
CG18647	bin	0.749	CG8023	eIF4E-3	0.810
CG18675	CG18675	0.712	CG8032	CG8032	0.941
CG1868	CG1868	1.116	CG8193	CG8193	0.747
CG18746	CG18746	0.632	CG8226	Tom7	0.815
CG18747	CG18747	1.096	CG8241	pea	0.619
CG18777	Cpr65Ax2	0.707	CG8271	Sln	1.693
CG18778	Cpr65Au	0.914	CG8273	CG8273	0.920
CG90631		0.794	CG8290	CG8290	0.642
CG9064	Ucp4C	8.670	CG8338	mRpS16	0.807
CG9066	MSBP	1.356	CG8348	Dh44	0.644
CG9088	lid	0.587	CG8351	Tcp-1eta	0.701
CG9104	CG9104	0.654	CG8404	Sox15	0.582
CG9111	LysC	0.765	CG8416	Rho1	0.586
CG9121	CG9121	0.863	CG8455	CG8455	0.598
CG9160	mtacp1	0.669	CG8474	Meics	0.621
CG9163	mmd	1.445	CG8483	CG8483	0.699
CG9166	312	1.898	CG8494	CG8494	0.780
CG9195	Scamp	0.618	CG8509	CG8509	0.581
CG91954		1.235	CG8510	Cpr49Af	0.821
CG9198	shtd	0.846	CG8519	CG8519	1.386
CG9248	CG9248	0.824	CG8589	tej	0.617
CG9269	CG9269	0.793	CG8616	BHD	1.514
CG9328	CG9328	0.629	CG8637	trc	0.698
CG9345	Adgf-C	0.887	CG8641	CG8641	0.635
CG9346	CG9346	1.274	CG8668	CG8668	0.724
CG8839	CG8839	1.205	CG8671	CG8671	0.702

CG8852	CG8852	1.448	CG8675	CG8675	2.033
CG8987	tam	1.273	CG8694	Mal-A2	0.808
CG8988	S2P	4.534	CG8705	pnut	1.112
CG8991	Sobp	0.596	CG8733	Cyp305a1	0.595
CG9008	CG9008	2.104	CG9010	CG9010	0.710
CG9745	D1	0.664	CG9871	RpL22-like	0.836
CG9807	Rab9Db	0.666	CG9916	Cyp1	0.920
CG9861	CG9861	0.596	CG9969	Or63a	0.612
CG9863	CG9863	0.775	CG9972	spz5	0.908
CG9975	CG9975	1.142			
CG9981	CG9981	1.091	CG9353	mRpL54	5.246
CG9984	TH1	1.090	CG9354	RpL34b	1.424
CR30241	tRNA:CR30241	1.561	CG9363	CG9363	0.740
CR31877	snoRNA:Me18 S-A1576	0.967	CG9364	Treh	0.743
CR32385	CR32385	1.004	CG9375	Ras85D	0.657
CR32864	7SLRNA:CR328 64	1.272	CG9376	CG9376	2.255
CR32998	snRNA:U4:25F	0.625	CG9378	Rlc1	1.186
CR33315	CR33315	2.039	CG9390	AcCoAS	1.616
CR7249	Cyp6a16Psi	1.864	CG9424	bocksbeutel	0.677
CG9505	CG9505	0.814	CG9432	l(2)01289	1.528
CG9511	CG42370	1.452	CG9438	Cyp6a2	1.723
CG9517	CG9517	0.857	CG9448	trbd	0.609
CG9543	epsilonCOP	1.065	CG9452	CG9452	1.514
CG9552	rost	0.873	CG9460	Spn42De	2.984
CG9554	eya	0.639	CG9487	CG34398	0.793
CG9570	CG9570	1.235	CG9497	CG9497	1.447
CG9578	CG9578	0.708	CG9498	CG9498	0.718
CG9610	Poxm	1.091	CG9635	RhoGEF2	0.624
CG9704	Nrt	0.936	CG9698	CG9698	1.448

Tab. A 4 Liste der niedriger exprimierten Gene in w1118 nach oraler Infektion mit *Serratia marcescens*

ID Nummer	Symbol	Mittelwert	ID Nummer	Symbol	Mittelwert
CG10659	CG10659	-1.063	CG32095	CG32095	-0.679
CG10694	CG10694	-1.119	CG32099	eap	-0.650
CG10712	Chro	-2.018	CG32117	CG32117	-2.701
CG1077	CG1077	-0.670	CG32505	Pp4-19C	-0.650
CG10811	eIF4G	-0.705	CG32689	CG34408	-0.680
CG10834	CG10834	-1.044	CG329405		-1.411
CG10851	B52	-1.296	CG33114	Gyc32E	-0.646
CG10852	Acp63F	-3.087	CG33198	pen-2	-0.660
CG1086	Glut1	-1.234	CG33224	CG42388	-1.201
CG10874	CG10874	-2.732	CG33225	CG33225	-0.727
CG10958	CG10958	-3.181	CG33340	CG33340	-2.019
CG11261	CG11261	-0.637	CG3340	Kr	-0.670
CG11348	nAcRbeta-64B	-1.394	CG3345	CG3345	-4.095

CG11391	CG11391	-1.363	CG3346	pon	-1.871
CG11437	CG11437	-2.729	CG33493	CG33493	-0.933
CG11475	CG11475	-0.831	CG3479	osp	-1.017
CG11489	srpk79D	-0.952	CG3664	Rab5	-0.661
CG11576	CG11576	-1.068	CG3776	CG3776	-1.175
CG11661	Nc73EF	-0.679	CG3891	Nf-YA	-1.024
CG11692	CG11692	-0.926	CG4000	CG4000	-1.425
CG11760	CG11760	-3.400	CG40053	CG40053	-0.729
CG11828	CG11828	-1.963	CG40156	CG40156	-0.886
CG12017	CG12017	-0.672	CG40303	CG40303	-1.004
CG12072	wts	-2.056	CG40378	CG40378	-3.587
CG12384	CG12384	-0.668	CG404522		-0.691
CG12385	thetaTry	-1.136	CG40461	CR40461	-1.684
CG12395	CG12395	-1.222	CG41069	CG41069	-2.760
CG12423	klhl10	-0.786	CG4271	CG4271	-0.605
CG124372		-0.856	CG4542	CG4542	-1.048
CG12516	CG12516	-3.098	CG47930		-1.375
CG12963	CG12963	-0.604	CG4848	CG4848	-0.802
CG13167	Vha36-2	-2.092	CG4852	Sras	-0.665
CG13335	CG42807	-0.830	CG5029	SamDC	-1.561
CG13439	dpr	-0.662	CG5059	CG5059	-0.585
CG13556	CG43795	-1.409	CG5108	mRpS7	-0.662
CG13557	CG13557	-1.648	CG5178	Act88F	-2.208
CG13566	CG13566	-0.631	CG5442	SC35	-2.081
CG14540	CG14540	-2.273	CG5548	CG5548	-0.743
CG14561	CG14561	-4.269	CG5864	AP-1sigma	-0.718
CG14648	lost	-1.346	CG6323	Tsp97E	-0.757
CG1469	Fer2LCH	-1.231	CG6359	Snx3	-0.743
CG14920	Ast-CC	-0.606	CG6521	Stam	-0.716
CG15475	CG15475	-2.677	CG6677	ash2	-2.051
CG1553	Nop17l	-0.729	CG6735	cp309	-6.442
CG15596	Osi11	-0.703	CG6756	Tom70	-0.934
CG15634	CG15634	-0.986	CG67657		-0.802
CG15646	CG15646	-1.053	CG6869	FucTA	-5.583
CG15684	CG42668	-2.088	CG6883	trh	-3.298
CG15758	Tango13	-0.737	CG7057	AP-50	-0.932
CG15765	CG15765	-0.692	CG7138	r2d2	-1.801
CG16786	CG16786	-0.614	CG7146	CG7146	-2.538
CG16827	alphaPS4	-1.319	CG7169	S1P	-1.178
CG1693	tty	-0.696	CG7180	CG7180	-1.032
CG17540	Spf45	-1.070	CG7188	CG7188	-0.673
CG17599	CG17599	-3.163	CG7323	CG42674	-0.649
CG17623	CG42686	-1.372	CG7509	CG7509	-0.929
CG17941	ds	-1.564	CG7742	CG7742	-1.160
CG18030	Jon99Fi	-1.470	CG7760	cato	-1.253
CG180427		-1.358	CG7870	wol	-1.317
CG18278	CG18278	-1.563	CG7878	CG7878	-0.808
CG1845	Br140	-0.684	CG7926	Axn	-0.825
CG18525	Spn5	-0.688	CG7953	CG7953	-1.877

CG18585	CG18585	-0.660	CG7998	Mdh2	-3.392
CG18731	CG18731	-0.907	CG8060	CG8060	-0.685
CG18787	CG18787	-3.458	CG8072	CG8072	-1.766
CG1882	CG1882	-0.812	CG8095	scb	-0.800
CG2127	CG2127	-0.776	CG8442	Glu-RI	-2.276
CG2171	Tpi	-0.823	CG8448	mrj	-0.627
CG2187	CG2187	-0.663	CG85810		-0.798
CG2714	dwg	-3.392	CG8651	trx	-0.595
CG30184	CG30184	-0.632	CG8663	nrv3	-2.078
CG30196	CG30196	-0.897	CG9068	CG9068	-1.109
CG30273	CG30273	-1.288	CG9102	bab2	-1.327
CG30332	CG30332	-1.059	CG9147	CG9147	-2.180
CG30457	CG30457	-1.114	CG9214	Tob	-0.755
CG30460	CG30460	-1.588	CG9396	CG9396	-0.674
CG30485	CG30485	-0.796	CG9447	CG9447	-3.698
CG3051	SNF1A	-1.031	CG9486	CG9486	-1.296
CG3126	C3G	-4.376	CG9684	CG9684	-1.147
CG31305	fabp	-0.861	CG9726	PH4alphaMP	-0.609
CG31316	CG31316	-0.641	CG9961	CG9961	-0.863
CG31757	Pde1c	-1.137	CR32894	snoRNA:U29:54Ec	-1.207
CG31954	CG31954	-2.462	CR32895	snoRNA:U29:54Ed	-0.725

Tab. A 5 Liste der verstärkt exprimierten Gene nach Überexpression von *dfxoO*

ID Nummer	Symbol	Mittelwert	ID Nummer	Symbol	Mittelwert
CG10184	CG10184	1,739	CG1819	CG34120	-0,098
CG10371	Plip	0,635	CG2852	CG2852	0,798
CG10580	fng	0,703	CG30029	CR30029	1,303
CG10601	mirr	0,560	CG30416	CG30416	-0,499
CG10811	eIF4G	1,942	CG31229	CG31229	0,800
CG10913	Spn6	0,388	CG32042	PGRP-LA	1,290
CG11237	Oseg6	0,792	CG32151	CG32151	0,493
CG11671	CG11671	0,804	CG32238	CG32238	1,867
CG11858	CG11858	1,121	CG32282	dro4	1,149
CG12072	wts	1,052	CG3234	tim	1,011
CG12112	CG12112	0,994	CG32485	CG32485	0,621
CG12275	RpS10a	1,637	CG3264	CG3264	0,556
CG12372	spt4	0,328	CG32821	CR32821	1,308
CG12736	CG12736	1,716	CG3707	wapl	1,544
CG12892	Caf1-105	1,058	CG5059	CG5059	0,421
CG13322	CG13322	0,244	CG5196	CG5196	1,219
CG13503	Vrp1	1,683	CG5989	CG5989	1,041
CG13661	lobo	0,282	CG6353	CG6353	0,639
CG13862	CG13862	1,209	CG6404	CG6404	1,536
CG13869	CG13869	0,640	CG6420	CG6420	1,209
CG14248	beat-VII	0,012	CG6472	CG6472	0,350

CG1427	CG1427	1,303	CG6496	Pdf	0,082
CG14528	CG14528	0,506	CG6546	Bap55	0,143
CG14736	CG14736	1,194	CG6597	CG6597	0,686
CG14936	Tsp33B	1,782	CG6607	CG6607	1,502
CG15010	ago	0,900	CG6827	Nrx-IV	1,020
CG15329	hdm	1,026	CG7592	Obp99b	1,621
CG1621	Coop	-0,055	CG8353	CG8353	0,905
CG16987	daw	0,708	CG9484	hyd	0,497
CG17570	CG17570	1,840	CG9570	CG9570	0,577
CG17681	CG17681	1,655	CG96484		1,412
CG17689	Spt20	0,482	CG9797	CG9797	1,171
CG17914	yellow-b	1,934	CR31273	bxd	2,483

Tab. A 6 Liste der niedriger exprimierten Gene nach Überexpression von *dfoxO*

ID Nummer	Symbol	Mittelwert	ID Nummer	Symbol	Mittelwert
CG10068	CG10068	-0,824	CG3273	sced	-1,421
CG10083	CG10083	-0,613	CG3281	CG3281	-0,040
CG10105	Sin1	-0,791	CG32921	CG33934	-0,539
CG10128	tra2	2,120	CG32940	Pif1B	-0,591
CG10131	CG10131	-0,270	CG3301	CG3301	-1,602
CG10137	CG10137	-0,703	CG330452		-2,076
CG10151	CG10151	-0,533	CG331262		-0,844
CG10207	NaPi-T	-1,545	CG33142	ste24c	-1,321
CG10209	CG10209	-1,017	CG33169	CG33169	0,007
CG10241	Cyp6a17	-0,830	CG33189	CG33189	-1,019
CG10243	Cyp6a19	-1,371	CG332962		-0,862
CG10248	Cyp6a8	-0,899	CG33298	CG33298	-1,707
CG10249	CG10249	-1,243	CG3347	CG3347	-0,944
CG10262	CG10262	-0,401	CG33493	CG33493	-1,024
CG10264	CG10264	-1,122	CG3351	mRpL11	-1,098
CG10281	TfIIIFalpha	-0,777	CG3397	CG3397	-0,657
CG10289	CG10289	-0,996	CG34010	CG34010	-1,327
CG10305	RpS26	-0,765	CG3411	bs	-0,919
CG10324	CG10324	-0,897	CG3436	CG3436	-1,177
CG10376	CG10376	-0,414	CG3499	CG3499	-0,724
CG10449	Catsup	-0,609	CG3626	CG3626	-1,165
CG10459	CG10459	-0,720	CG3665	Fas2	-1,554
CG10478	CG10478	-0,752	CG3669	CG3669	-0,989
CG10493	Phlpp	-1,133	CG3723	Dhc93AB	-0,527
CG10541	Tektin-C	-0,497	CG3735	CG3735	-0,530
CG10646	CG10646	-1,520	CG3763	Fbp2	-0,929
CG10657	CG10657	-0,722	CG3772	cry	-1,133
CG10669	CG10669	-0,416	CG3810	Edem1	-0,756
CG10685	l(2)37Cg	-0,721	CG3891	Nf-YA	-0,587
CG10728	vls	-1,115	CG3905	Su(z)2	-1,480
CG10846	dyn-p25	-0,766	CG3924	Chi	-0,624

CG10952	eag	-0,734	CG3945	Rad9	-0,519
CG10975	Ptp69D	-0,427	CG3988	gammaSnap	-0,609
CG10989	CG34113	-0,711	CG4004	CG4004	-1,651
CG11112	CG11112	-1,082	CG40044	CG40044	-0,892
CG11124	sPLA2	-0,745	CG40049	mRpS5	-0,641
CG11133	BoYb	-1,063	CG40091	CG40091	-0,893
CG11137	CG11137	-0,625	CG40203	CG40203	-1,057
CG11146	CG42251	-0,835	CG4022	CG4022	-0,545
CG11151	CG11151	-1,095	CG40367	CG40367	-0,440
CG11153	Sox102F	-0,898	CG4046	RpS16	-0,864
CG11263	CG11263	-0,729	CG4049	CG4049	-0,694
CG11268	ste14	-1,598	CG4090	Mur89F	-0,711
CG11271	CG17672	-1,170	CG4170	vig	-0,869
CG11281	snky	-0,681	CG4187	CG34411	-0,575
CG11284	CG11284	-0,827	CG4205	Fdxh	-0,691
CG11299	Sesn	-0,630	CG4212	Rab14	-1,374
CG11348	nAcRbeta-64B	-0,458	CG4290	Sik2	-1,334
CG114277	CG114277	-0,920	CG4341	CG4341	-1,027
CG11489	srpk79D	-0,980	CG4372	CG4372	-0,672
CG11555	CG11555	-0,780	CG4408	CG4408	-1,252
CG11601	CG11601	-0,815	CG4488	wee	-1,475
CG11624	Ubi-p63E	-1,090	CG4525	CG4525	0,020
CG11661	Nc73EF	-1,023	CG4594	CG4594	-0,671
CG11672	CG11672	-0,828	CG4596	CG4596	-1,220
CG11692	CG11692	-1,519	CG4654	Dp	-0,720
CG11698	CG11698	-0,783	CG4730	CG4730	-0,914
CG11727	CG11727	-0,902	CG4738	Nup160	-0,467
CG11765	Prx2540-2	-0,851	CG4760	bol	-0,902
CG11767	Or24a	-1,094	CG4770	CG4770	-0,743
CG11804	ced-6	-0,753	CG4810	CG4810	-0,388
CG11852	CG11852	-0,547	CG4848	CG4848	-1,063
CG11880	CG11880	-1,549	CG4851	Ppt2	-0,768
CG11922	fd96Cb	-0,432	CG48595	CG48595	-0,673
CG11928	CG34351	-0,372	CG4928	CG4928	-0,814
CG11985	CG11985	-1,539	CG4935	CG4935	-0,722
CG12057	CG12057	-0,931	CG4947	Tgt	-0,542
CG12071	CG12071	-0,766	CG5018	l(3)72Dn	-1,585
CG12111	CG12111	-0,831	CG5070	CG5070	-1,002
CG12119	CG12119	-0,704	CG5104	CG5104	-0,731
CG12170	CG12170	-0,653	CG5105	Plap	-0,935
CG12192	Klp59D	-1,288	CG5119	hyd	-0,570
CG12263	CG12263	-2,122	CG5125	ninaC	1,797
CG12279	CG12279	-0,632	CG5134	MED9	-0,847
CG12333	CG12333	-0,474	CG5202	escl	-1,311
CG12355	CG12355	-0,829	CG5229	chm	-0,903
CG12358	Paip2	-1,374	CG5252	Ranbp9	-1,315
CG12388	kappaTry	-0,906	CG5271	RpS27A	-0,614
CG12424	ckn	-0,428	CG5282	CG5282	-0,561
CG12488	CG42663	-1,700	CG5322	CG5322	-0,771

CG12519	CG12519	-0,750	CG5381	CG5381	-0,995
CG12532	Bap	-0,636	CG5382	CG5382	-0,760
CG12552	CG12552	-0,367	CG5461	bun	-0,839
CG1257	alpha-Est3	-0,911	CG5469	Gint3	-0,664
CG12750	ncm	-0,663	CG5474	SsRbeta	-0,701
CG12767	Dip3	-1,380	CG5498	CG5498	-0,712
CG12870	CG34362	-0,691	CG5502	RpL4	-0,967
CG12883	CG12883	-0,346	CG5505	scny	-0,685
CG12891	whd	-1,473	CG5509	CG5509	-0,661
CG12963	CG12963	-0,516	CG5554	CG5554	-0,830
CG13041	CG13041	-1,030	CG5619	trk	-1,258
CG13079	CG13079	-0,471	CG5634	dsd	-1,220
CG1308	CG43367	-1,447	CG5653	CG5653	-1,298
CG13085	CG13085	-1,002	CG5695	jar	-0,599
CG13109	tai	-0,977	CG5718	CG5718	-0,965
CG13158	Or49a	-1,250	CG5727	CG5727	-0,437
CG13178	CG13178	-1,076	CG5738	lolal	-0,685
CG13211	CG42336	-0,272	CG5741	CG43783	-0,574
CG13278	CG13278	-0,274	CG5848	cact	-0,980
CG13397	CG13397	-0,640	CG5855	cni	-0,906
CG13463	CG13463	-1,021	CG5887	desat1	-1,098
CG13568	CG13568	-0,394	CG5932	mag	-0,703
CG13717	axo	-0,249	CG5938	CG5938	-1,164
CG13786	CG13786	-0,709	CG5969	CG5969	-0,860
CG13901	CG13901	-1,002	CG6012	CG6012	-0,778
CG14017	CG14017	-0,217	CG6014	rgn	-0,992
CG14035	Msp-300	-0,371	CG6025	Arf72A	-0,391
CG14214	Sec61gamma	-0,855	CG6027	cdi	-1,318
CG14218	CG14218	-0,735	CG6056	AP-2sigma	-0,747
CG14223	CG14223	-0,731	CG6092	Dak1	-0,365
CG14269	CG14269	-0,970	CG6167	PICK1	-1,149
CG14443	CG14443	-1,292	CG6280	CG6280	-0,773
CG14458	CG33769	-0,576	CG6284	Sirt6	-0,312
CG14500	CG14500	-0,684	CG6293	CG6293	-0,601
CG14502	CG14502	-0,968	CG6322	U4-U6-60K	-0,526
CG14762	CG14762	-0,653	CG6343	ND42	-0,973
CG14770	CG14770	-1,566	CG6395	Csp	-0,775
CG14788	ns3	-0,597	CG6447	Twddl	-0,938
CG14794	Nmdar2	-0,697	CG6492	Ucp4A	-0,932
CG14806	CG14806	-0,618	CG6519	Cp15	-0,906
CG14821	tow	-0,516	CG6567	CG6567	-0,641
CG14888	CG42342	-0,852	CG6585	Cyp308a1	-1,060
CG148895		-0,865	CG66061	CG66061	-0,705
CG14897	CG42232	-0,745	CG6633	Ugt86Dd	-0,866
CG14982	CG14982	-0,374	CG6659	CG6659	-1,151
CG14997	CG14997	-1,138	CG6673	CG6673	-1,129
CG15007	Cpr64Ab	-0,926	CG6709	CG6709	-0,708
CG15015	Cip4	-1,309	CG6727	gom	-0,291
CG15019	CG15019	-1,243	CG6768	DNApol-	-0,898

			epsilon		
CG15049	CG32547	-1,421	CG6798	nAcRbeta-96A	-0,376
CG1506	Ac3	-2,094	CG6802	Cyp313a4	-0,710
CG15067	CG15067	-1,941	CG6805	CG6805	-0,708
CG1507	Pur-alpha	-1,562	CG6824	ovo	-1,115
CG15080	CG15080	-1,365	CG6852	CG6852	-0,400
CG15081	l(2)03709	-0,811	CG6854	CTPsyn	-0,900
CG15085	edl	-0,826	CG6904	CG6904	-0,663
CG15097	CG15097	-1,040	CG6946	glo	-0,725
CG15152	CG15152	-0,457	CG6985	CG6985	-1,221
CG15202	CG15202	-0,890	CG7012	nct	-0,671
CG1524	RpS14a	-0,912	CG7049	CG7049	-0,913
CG15283	CG15283	-0,592	CG7062	Rab-RP3	-0,904
CG15321	nej	-0,657	CG7070	PyK	-0,948
CG15335	cyr	-0,664	CG7074	mio	-0,743
CG15389	ey5	-0,593	CG7083	CG7083	-0,564
CG15393	CG15393	-0,516	CG7110	CG7110	-0,429
CG15634	CG15634	-0,944	CG7161	Oseg1	-0,808
CG15675	CG42364	-1,550	CG7272	CG7272	-0,980
CG15753	CG15753	-0,702	CG7277	CG7277	-0,724
CG15756	CG15756	-0,590	CG7333	CG7333	-0,861
CG15760	CG15760	-0,432	CG7376	CG7376	-0,325
CG15766	CG15766	-0,455	CG7393	p38b	-1,586
CG15817	CG15817	-0,389	CG7395	sNPF-R	-0,665
CG15824	CG15824	-0,675	CG7428	halo	-1,441
CG15883	Obp18a	-0,660	CG7429	CG7429	-0,640
CG15930	CG15930	-0,872	CG7454	Or85a	-0,922
CG1635	CG1635	-0,546	CG7506	CG7506	-0,697
CG1637	CG1637	-0,550	CG7619	Pros54	-2,021
CG1644	Cyp6t1	-0,809	CG7628	CG42575	-0,706
CG1650	unpg	-0,906	CG7730	CG7730	-0,397
CG1674	CG1674	-0,417	CG7749	kug	-0,882
CG16786	CG16786	-0,653	CG7816	CG7816	-0,193
CG16787	CG16787	-0,521	CG7863	dream	-0,680
CG16836	CG16836	-0,850	CG7919	fan	-0,764
CG16918	CG34437	-0,689	CG7924	CG7924	-0,794
CG1693	tty	-0,921	CG7936	mex1	-0,271
CG16970	CG43778	-1,057	CG7940	Arp5	-1,665
CG16979	CG16979	-0,710	CG7961	alphaCop	-0,102
CG16986	CG16986	-1,176	CG7972	mus301	-0,747
CG16996	Phae1	-0,884	CG7973	CG42729	-0,318
CG17029	CG17029	-0,848	CG7991	CG7991	-0,496
CG17063	inx6	-1,006	CG7996	snk	-0,722
CG17191	CG17191	-1,066	CG7998	Mdh2	-0,638
CG17273	CG17273	-0,889	CG7999	MED24	-0,451
CG17360	CG17360	-0,628	CG8042	CG8042	-0,830
CG17436	vtd	-1,042	CG8044	HP4	-0,807
CG17470	CG17470	-1,175	CG8048	Vha44	-0,346
CG17498	mad2	-0,577	CG8049	Btk29A	-1,094

CG17556	CG17556	-0,511	CG8066	CG8066	-0,864
CG17592	Usf	-0,193	CG8072	CG8072	-0,641
CG17601	CG17601	-1,074	CG8084	ana	0,015
CG17669	CG17669	-1,181	CG8085	RN-tre	1,880
CG17793	CG34402	-0,672	CG8090	CG8090	-0,592
CG17814	Peritrophin-15a	-0,456	CG8092	row	-0,047
CG17883	CG17883	-1,103	CG8095	scb	-1,430
CG17903	Cyt-c-p	-1,493	CG8128	CG8128	-1,075
CG17931	CG17931	-0,876	CG8135	CG8135	-0,981
CG18108	IM1	-0,555	CG8195	CG8195	-0,480
CG18130	CG18130	-1,081	CG82461		-0,390
CG1825	Map60	-0,727	CG8280	Ef1alpha48D	-0,551
CG18271	slx1	-0,623	CG8311	CG8311	-0,996
CG18467	CG18467	-0,588	CG8322	ATPCL	4,864
CG18619	CG18619	-0,591	CG8396	Ssb-c31a	-0,609
CG1862	Ephrin	-0,754	CG8397	CG8397	-0,851
CG1942	CG1942	-0,125	CG8398	CG8398	-0,451
CG1965	CG1965	-0,738	CG8416	Rho1	-0,124
CG1966	Acf1	-1,434	CG8422	Dh44-R1	-0,684
CG1987	Rbp1-like	-0,932	CG8435	CG8435	-0,319
CG2046	CG2046	-0,858	CG8448	mrj	-1,234
CG2081	Vago	-0,608	CG8486	Piezo	-0,832
CG2249	CoVIlc	-1,377	CG8525	CG8525	-0,731
CG2316	CG2316	-0,958	CG85810	CG85810	-0,697
CG2342	Ccp84Ag	-0,729	CG8589	tej	-0,817
CG2512	alphaTub84D	-1,439	CG8605	CG8605	-0,732
CG2519	CG2519	-1,630	CG8610	Cdc27	-0,580
CG25200		-1,140	CG8625	lswi	-0,911
CG2684	lds	-0,278	CG8628	CG8628	-1,307
CG2813	cold	-0,554	CG8630	CG8630	-0,696
CG2819	Pph13	-0,586	CG8639	Cirl	-0,972
CG2830	Hsp60B	-0,963	CG8660	Fibp	-0,819
CG2861	CG2861	-0,542	CG8676	Hr39	-0,161
CG2924	CG2924	-0,696	CG86761	CG86761	-0,703
CG2947	HIP-R	-0,925	CG8681	clumsy	-0,641
CG2986	RpS21	-0,195	CG8709	Lpin	-1,212
CG30015	CG30015	-1,107	CG8725	CSN4	-0,958
CG30035	Tret1-1	-0,691	CG8791	CG8791	-0,838
CG30160	CG30160	-0,472	CG8819	achi	-0,369
CG30166	prom	-0,560	CG8827	Ance	-0,478
CG30183	CG30183	-0,402	CG8828	dgt5	-0,686
CG30185	CG30185	-0,605	CG8884	Sap47	-1,047
CG30196	CG30196	-0,875	CG8888	CG8888	-1,298
CG30278	CG30278	-0,676	CG8896	18w	-0,892
CG30279	CG30279	-0,754	CG8913	Irc	-1,546
CG30281	CG30281	-0,614	CG8914	CklIbeta2	-1,061
CG30282	CG30282	-0,578	CG8948	Graf	-1,176
CG30321	CG30321	-1,281	CG8961	tef	-1,265

CG3033	CG3033	-0,586	CG8996	wal	-0,522
CG30338	CG30338	-0,749	CG9042	Gpdh	-0,585
CG30383	CG30383	-0,880	CG9096	CycD	-0,798
CG30415	CG30415	-0,487	CG9115	mtm	-0,771
CG30437	laccase2	-0,780	CG9122	Trh	-1,001
CG30457	CG30457	-0,936	CG9129	CG9129	-0,737
CG30460	CG30460	-0,822	CG9144	Fbw5	-0,631
CG30485	CG30485	-0,995	CG9271	Vm34Ca	-0,925
CG30503	CG30503	-0,867	CG9284	CR9284	-0,767
CG3052	HLH4C	-1,619	CG9293	CG9293	-0,887
CG31043	gukh	-1,160	CG9333	Oseg5	-1,210
CG31088	CG31088	-1,088	CG9335	CG9335	-1,306
CG31096	Lgr3	-1,499	CG9366	RhoL	-0,702
CG31141	CG31141	-1,048	CG9379	by	-0,553
CG31249	CG31249	-0,532	CG9391	CG9391	-1,108
CG31257	CG31257	-0,935	CG9463	CG9463	-1,412
CG312680		-0,580	CG9468	CG9468	-1,613
CG31286	CG31286	-0,738	CG9471	CG9471	-1,037
CG31301	CG31301	-0,250	CG9476	alphaTub85E	0,222
CG31308	CG31308	-1,432	CG9480	Glycogenin	-1,176
CG31320	CG31320	-0,573	CG9487	CG34398	-1,075
CG31345	CG31345	-1,131	CG9503	CG9503	-0,678
CG31355	CG31355	-1,069	CG9507	CG9507	-1,253
CG31364	l(3)neo38	-0,959	CG9509	CG9509	-1,402
CG31411	CG34409	-0,723	CG9517	CG9517	-1,830
CG3153	Npc2b	-0,970	CG9533	rut	-1,154
CG31549	CG31549	-0,836	CG9556	alien	-0,770
CG31605	Bsg	-0,275	CG9710	nudC	-0,809
CG31659	CG31659	-1,334	CG9734	glob1	-1,243
CG31673	CG31673	-1,571	CG9834	endoB	-0,949
CG31776	CG31776	-2,302	CG9843	CG9843	-0,971
CG31784	CG31784	-1,989	CG9863	CG9863	-0,811
CG31822	CR31822	-0,107	CG9882	Art7	-0,714
CG32217	Su(Tpl)	-0,186	CG9888	Fib	-0,972
CG3239	CG3239	-0,635	CG9926	CG9926	-0,791
CG32417	Myt1	-1,000	CG9948	CG9948	-1,206
CG32444	CG32444	-2,026	CG9992	CG9992	-1,287
CG32614	CG32614	-0,638	CG9998	U2af50	-1,314
CG32634	CG32634	-0,447			

Tab. A 7 Liste der verstärkt exprimierten Gene nach Überexpression von PGRP-LE

ID Nummer	Symbol	Mittelwert	ID Nummer	Symbol	Mittelwert
CG10017	CG34340	0,967	CG31714	CG31714	1,395
CG10061	Sas-4	1,352	CG31784	CG31784	1,006
CG10068	CG10068	1,308	CG31900	CG43394	1,605
CG10219	CG10219	1,468	CG3191	CG3191	0,944

CG10303	Osi4	0,699	CG31923	CG31923	0,818
CG10307	CG10307	0,776	CG32164	CG32164	0,853
CG10309	pad	1,391	CG32185	edin	1,368
CG10339	CG10339	0,877	CG32193	CG32193	1,221
CG10419	Gem2	0,979	CG32230	CG32230	1,204
CG10483	CG10483	1,718	CG32245	CG42540	1,014
CG10590	CG10590	1,173	CG32268	dro6	1,120
CG10669	CG10669	1,373	CG32295	CG32295	1,612
CG10912	CG10912	1,023	CG32401	Or65a	0,971
CG11015	CoVb	1,348	CG32443	Pc	1,144
CG11052	CG11052	0,980	CG32447	CG32447	1,140
CG11120	CG11120	1,838	CG32485	CG32485	1,220
CG11159	CG11159	0,655	CG32656	Muc11A	0,808
CG1124	CG1124	1,226	CG3295	CG3295	1,057
CG11260	CG11260	1,014	CG33222	CR33222	0,838
CG11466	Cyp9f2	1,118	CG33308	CG33308	1,493
CG11482	Mlh1	1,240	CG33338	p38c	1,129
CG11502	svp	1,233	CG33461	CG33461	1,379
CG1152	Gld	1,478	CG3373	Hmu	1,247
CG11666	CG11666	1,855	CG3622	stl	1,171
CG11753	CG11753	1,321	CG3638	CG3638	1,436
CG11807	CG11807	2,727	CG3675	Art2	1,044
CG11821	Cyp12a5	2,055	CG3688	l(2)35Bd	1,549
CG11865	CG11865	1,223	CG3700	CG3700	0,917
CG11913	CG11913	1,259	CG3730	csul	0,883
CG11921	fd96Ca	1,598	CG3734	CG3734	1,111
CG11975	CG11975	1,580	CG3735	CG3735	1,028
CG11986	CG11986	1,191	CG3820	Nup214	1,552
CG12012	CG12012	1,159	CG3881	GlcAT-S	1,147
CG12026	Tmhs	0,808	CG3941	pita	1,039
CG12038	CG12038	1,016	CG3962	Keap1	0,960
CG12061	CG12061	1,604	CG4001	Pfk	0,724
CG12063	mey	0,803	CG40460	CG17162	1,337
CG12065	CG12065	1,501	CG40463	CG40463	1,444
CG12082	CG12082	1,125	CG4090	Mur89F	0,978
CG12115	CG12115	0,974	CG41130	Mitf	1,148
CG12373	mRpL18	0,975	CG4139	Karl	1,254
CG12396	Nnp-1	0,946	CG4184	MED15	1,370
CG12400	CG12400	1,325	CG4301	CG4301	0,754
CG12414	nAcRalpha-80B	1,213	CG4312	MtnB	1,407
CG12442	wuc	0,900	CG4313	CG4313	0,984
CG12763	Dpt	1,434	CG4324	CG4324	1,285
CG12787	hoe1	1,149	CG4497	CG4497	1,117
CG12898	CG12898	1,334	CG4545	SerT	0,768
CG12918	sel	0,969	CG4553	CG4553	0,903
CG12921	mRpL42	1,290	CG4602	Srp54	0,995
CG12946	Whamy	0,889	CG4603	CG4603	1,282
CG1304	CG1304	1,227	CG4651	RpL13	1,028

CG13090	CG13090	0,985	CG4709	CG4709	1,219
CG13229	CG13229	1,374	CG4781	CG4781	1,049
CG13243	CG13243	1,123	CG4852	Sras	0,777
CG13325	CG13325	1,425	CG4869	betaTub97EF	1,161
CG13394	CG42820	0,879	CG4914	CG4914	1,102
CG13480	Lk	1,219	CG4925	CG4925	0,742
CG13775	CG13775	0,798	CG4926	Ror	1,202
CG13822	CG13822	0,816	CG4996	CG4996	1,200
CG13862	CG13862	1,654	CG5271	RpS27A	1,252
CG13896	CG13896	0,774	CG5300	Klp31E	1,112
CG13951	l(2)k10201	1,004	CG5692	raps	1,276
CG13984	CG13984	0,796	CG5739	CG5739	0,883
CG14035	Msp-300	1,013	CG5835	CG5835	1,275
CG1404	ran	1,315	CG5851	sds22	1,263
CG14043	CG14043	0,874	CG5919	CG5919	0,763
CG14084	Bet1	1,097	CG5991	CG5991	0,947
CG14120	CG14120	1,160	CG6020	CG6020	1,403
CG14129	CG34420	1,190	CG6022	Cchl	1,060
CG14141	CG14141	1,060	CG6034	CG6034	1,351
CG14151	CG14151	0,935	CG6058	Ald	1,087
CG1442	eIF4E-6	1,252	CG6115	CG6115	1,173
CG14501	CG33958	1,553	CG6147	Tsc1	1,077
CG14551	CG14551	1,101	CG6191	CG6191	1,462
CG14646	CG14646	0,903	CG6207	GlcAT-P	1,293
CG1472	sec24	1,302	CG6214	MRP	1,411
CG14752	CG14752	1,497	CG6298	Jon74E	0,911
CG14777	CG14777	1,263	CG6327	CG43693	0,868
CG14793	Nmdar2	0,923	CG6333	CG6333	0,957
CG14870	CG14870	1,131	CG6394	GalNAc-T2	0,887
CG14910	CG42747	0,771	CG6404	CG6404	1,123
CG14984	CG14984	1,397	CG6459	P32	1,140
CG15102	Jheh2	1,051	CG6464	salm	1,695
CG15157	CG42750	0,775	CG6472	CG6472	1,347
CG15191	e(y)2	1,159	CG6484	CG6484	1,365
CG15207	CG15207	1,046	CG6521	Stam	1,474
CG15307	CG43740	1,357	CG6764	RpL24-like	1,104
CG15319	nej	0,841	CG6827	Nrx-IV	1,261
CG15335	cyr	1,432	CG6885	CG6885	0,854
CG15414	CG15414	0,885	CG7013	Manf	0,866
CG1543	Tbh	0,883	CG7014	RpS5b	1,301
CG15437	morgue	1,265	CG7130	CG7130	1,073
CG15438	MFS18	1,065	CG71847	CG71847	1,086
CG15504	dmrt99B	0,907	CG7199	Hr78	1,029
CG15526	CG15526	1,064	CG7225	wbl	0,874
CG15630	CG15630	1,301	CG7292	Rrp6	1,038
CG15730	CG15730	1,294	CG7437	mub	1,022
CG15738	CG15738	0,999	CG7604	Eig71Ee	1,197
CG15831	CG15831	1,543	CG7644	beat-lb	0,823
CG15864	CG15864	1,048	CG76600	CG76600	1,035

CG15877	CG15877	1,097	CG7713	CG7713	1,211
CG1658	Doa	1,214	CG7772	CG7772	1,393
CG16710	CG16710	1,043	CG7853	Papst2	1,290
CG16952	CG16952	1,272	CG7918	CG7918	1,106
CG16976	CG43375	1,225	CG7924	CG7924	1,409
CG16987	daw	1,106	CG7935	msk	1,265
CG17030	CG17030	1,404	CG7961	alphaCop	1,350
CG17246	SdhA	0,924	CG8005	CG8005	1,396
CG17388	Oaz	1,005	CG8023	eIF4E-3	1,254
CG17525	GstE4	0,913	CG8084	ana	0,968
CG17533	GstE8	1,672	CG8157	CG8157	1,280
CG17559	dnt	1,615	CG8195	CG8195	1,052
CG17642	mRpL48	1,506	CG8197	CG8197	1,339
CG17816	CG17816	1,620	CG8209	CG8209	0,885
CG17904	CG17904	1,565	CG8210	Vha14-1	1,045
CG17928	CG17928	1,248	CG8226	Tom7	1,339
CG17976	sut3	0,778	CG8237	CG8237	1,122
CG17991	CG17991	0,793	CG8239	CG8239	1,011
CG18039	KaiRIA	2,028	CG8258	CG8258	1,436
CG18212	alt	1,069	CG8261	Ggamma1	0,835
CG1830	PhKgamma	0,969	CG8268	Srp9	1,049
CG18335	CG18335	1,030	CG8280	Ef1alpha48D	1,047
CG18341	Prosbeta2R1	1,343	CG8334	CG8334	0,792
CG1836	Rad23	0,764	CG8340	128up	1,150
CG18369	S-Lap5	0,908	CG8348	Dh44	0,913
CG1839	FbxI4	1,446	CG8370	CG8370	1,018
CG1840	CG1840	1,059	CG8372	CG8372	0,834
CG18426	ytr	0,987	CG8453	Cyp6g1	1,305
CG18437	CG18437	1,399	CG8474	Meics	1,272
CG18467	CG18467	1,051	CG8494	CG8494	0,761
CG18539	CG18539	1,085	CG8565	CG8565	1,271
CG18550	yellow-f	1,134	CG8571	smid	1,178
CG18554	Octbeta3R	1,104	CG8580	akirin	1,496
CG18561	CG18561	0,959	CG8582	Sh3beta	1,461
CG18578	Ugt86Da	1,483	CG8603	Shroom	0,904
CG18598	CG18598	0,643	CG8611	CG8611	0,864
CG1873	Ef1alpha100E	1,064	CG8640	Cpr65Ea	1,552
CG18817	Tsp42Ea	1,084	CG8665	CG8665	0,772
CG1967	p24-1	0,926	CG8701	CG8701	0,859
CG2054	Cht2	1,232	CG8859	Cyp6g2	1,804
CG20827		0,913	CG8905	Sod2	1,195
CG2124	CG2124	1,593	CG8956	Ahcy89E	1,126
CG2493	CG2493	1,497	CG8995	PGRP-LE	1,355
CG27232		1,010	CG9000	ste24a	0,969
CG2772	CG2772	1,470	CG9004	CG9004	1,317
CG2862	CG2862	0,781	CG90631		1,182
CG2863	Nle	1,276	CG9093	Tsp26A	0,665
CG2985	Yp1	1,144	CG9099	CG9099	1,198
CG3001	Hex-A	0,842	CG9242	bur	1,034

CG30033	CG30033	1,202	CG9498	CG9498	1,087
CG30059	CG30059	1,113	CG9527	CG9527	0,936
CG30274	CG30274	1,252	CG9533	rut	1,273
CG3036	CG3036	1,414	CG9541	CG9541	1,488
CG30445	Tdc1	1,347	CG9589	CG9589	1,371
CG31000	heph	1,108	CG9590	CG9590	0,851
CG31043	gukh	1,197	CG9704	Nrt	0,950
CG31051	CG31051	0,829	CG9741	Dhod	0,785
CG31265	CG31265	1,313	CG9742	SmG	0,998
CG31308	CG31308	0,851	CG9764	yrt	1,369
CG31373	CG31373	1,278	CG9777	CG9777	0,758
CG31410	Npc2e	1,405	CG9778	Syt14	0,819
CG31415	CG31415	1,126	CG9786	hb	1,108
CG31510	CG31510	1,072	CG9811	Rgk1	1,096
CG31607	CG43394	2,409	CG9815	CG9815	0,941
CG31628	ade3	1,234	CG9862	Rae1	1,124
CG31657	PNUTS	0,871	CG9865	CG9865	1,594
CG31709	CG31709	1,405	CG9901	Arp14D	0,799
CG9983	Hrb98DE	1,153	CG9936	skd	0,914

Tab. A 8 Liste der niedriger exprimierten Gene nach Überexpression von PGRP-LE

ID Nummer	Symbol	Mittelwert	ID Nummer	Symbol	Mittelwert
CG10016	drm	-1,384	CG30110	CG30110	-1,854
CG10073	CG10073	-0,889	CG30148	CG30148	-1,828
CG10091	GstD9	-1,639	CG30154	CG30154	-1,305
CG10101	lr84a	-1,300	CG31061	Gr98d	-1,729
CG10112	Cpr51A	-1,537	CG31064	CG31064	-1,360
CG10152	beat-IV	-1,458	CG3108	CG3108	-1,888
CG10346	Grip71	-2,010	CG311630	CG311630	-2,994
CG10370	Tbp-1	-2,385	CG31217	modSP	-1,871
CG10413	CG10413	-2,400	CG31285	lqfR	-1,890
CG10492	CG10492	-1,212	CG3132	Ect3	-0,948
CG10512	CG10512	-1,281	CG3134	shf	-1,355
CG10513	CG10513	-1,941	CG3135	shf	-1,102
CG10534	Lcp65Ag2	-1,990	CG31561	Osi16	-1,402
CG10541	Tektin-C	-0,766	CG31595		-1,535
CG10570	CG10570	-1,049	CG31652	CG34124	-1,299
CG10795	CG10795	-0,723	CG31690	CG31690	-1,995
CG10958	CG10958	-1,154	CG31788	CG31788	-1,758
CG10962	CG10962	-1,978	CG31834	CG31834	-0,690
CG10971	Hip1	-1,287	CG32158	CG43373	-1,415
CG11070	CG11070	-1,278	CG32168	scaf6	-1,949
CG11208	CG11208	-1,198	CG3217	CklIalpha-i3	-1,372
CG11318	CG11318	-1,644	CG32226	Pex23	-2,139
CG11381	CG11381	-1,827	CG32234	axo	-1,564
CG1142	CG1142	-1,317	CG3228	kz	-1,424

CG1158	Tim17b1	-1,343	CG32368	CG32368	-1,360
CG11601	CG11601	-1,658	CG32532	CG32532	-0,631
CG11607	H2.0	-1,818	CG32568	CG32568	-2,024
CG11614	nkd	-1,586	CG32636	CG32636	-1,502
CG11635	CG11635	-1,545	CG32726	CG32726	-1,279
CG11658	CG11658	-1,108	CG32852	Csk	-0,705
CG11679	CG11679	-1,166	CG32918	CG15892	-1,213
CG11720	Sgs3	-1,618	CG33096	CG33096	-0,873
CG11732	Obp85a	-1,036	CG33129	CG33129	-1,534
CG1176	Pbprp4	-2,062	CG33137	CG33137	-1,268
CG11838	rempA	-1,144	CG33138	CG33138	-1,589
CG11971	E(var)3-9	-0,897	CG3314	RpL7A	-1,129
CG12001	CG12001	-1,778	CG33162	SrpRbeta	-1,491
CG1211	CG33966	-0,997	CG33192	MtnD	-0,918
CG12132	c11.1	-2,235	CG33226	CG33226	-1,921
CG12139	mgI	-0,660	CG33265	Muc68E	-0,896
CG12323	Prosbeta5	-1,197	CG33292	CG33292	-2,284
CG12330	Cpr65Az	-1,665	CG33297	CSN8	-1,056
CG123486		-1,337	CG33321	CheB38b	-0,698
CG12359	Ulp1	-1,191	CG34010	CG34010	-1,509
CG12369	Lac	-1,595	CG3446	CG3446	-1,190
CG12525	Ir67a	-1,285	CG3494	CG3494	-1,524
CG12535	CG12535	-1,534	CG3581	CG3581	-2,372
CG12584	CG34357	-1,027	CG3810	Edem1	-1,388
CG12612	CG12612	-1,053	CG3902	CG3902	-1,035
CG12637	CG12637	-1,300	CG3957	wmd	-1,647
CG12673	olf413	-1,602	CG3979	Indy	-0,965
CG12862	CG12862	-1,006	CG4026	IP3K1	-1,310
CG12879	CG43320	-1,395	CG40298	CG40298	-2,086
CG12907	CG12907	-1,667	CG40402	CG40402	-0,903
CG12923	CG12923	-1,610	CG40484	CG40484	-1,273
CG12950	CG12950	-1,305	CG4059	ftz-f1	-1,497
CG12993	p-cup	-1,931	CG4096	CG4096	-1,667
CG13027	Obp73a	-1,348	CG41106	CG41106	-2,473
CG13048	CG13048	-1,439	CG4116	CG4116	-1,227
CG13077	CG13077	-1,184	CG4125	rst	-0,727
CG13102	CG13102	-1,241	CG4207	bonsai	-1,314
CG13170	CG13170	-2,358	CG4433	CG4433	-0,964
CG13311	CG13311	-1,089	CG4439	S-Lap8	-1,415
CG13374	pcl	-3,307	CG4445	pgant3	-1,506
CG13400	D12	-1,199	CG4451	Hs6st	-0,879
CG13416	CG13416	-1,434	CG4477	CG4477	-2,918
CG13423	CG13423	-2,256	CG4537	CG4537	-2,126
CG13426	CG13426	-1,367	CG4575	CR4575	-2,082
CG13466	DCX-EMAP	-2,803	CG4604	GLaz	-1,258
CG13526	CG13526	-1,474	CG4618	CHMP2B	-1,572
CG13577	CG13577	-1,207	CG4621	YL-1	-1,225
CG13586	itp	-1,183	CG4699	wah	-2,122
CG13605	CG13605	-1,173	CG4702	CG4702	-1,225

CG13618	CG13618	-0,869	CG4733	CG4733	-1,578
CG13658	CG13658	-1,309	CG4744	CG4744	-0,995
CG13676	CG13676	-1,049	CG4752	CG4752	-1,073
CG13688	lpk2	-1,800	CG4774	CLS	-1,198
CG13762	brv3	-1,151	CG4854	CG4854	-1,213
CG13830	CG13830	-2,469	CG4972	CG4972	-0,943
CG13923	CG42676	-1,662	CG4973	CG4973	-1,913
CG13924	CG13924	-1,577	CG4980	CG4980	-0,966
CG13935	Cpr62Bb	-1,139	CG5016	Mst57Db	-0,693
CG13977	Cyp6a18	-1,926	CG5021	CG5021	-1,072
CG13980	CG42534	-2,783	CG5025	Sps2	-1,338
CG14066	larp	-1,379	CG5039	CG5039	-0,674
CG14088	CG14088	-1,854	CG5083	Rbf2	-2,380
CG1409	CG1409	-1,254	CG5326	CG5326	-1,965
CG14117	CG14117	-1,222	CG5327	CG5327	-1,280
CG14143	CG14143	-2,235	CG5334	CG5334	-2,472
CG14164	CG14164	-1,474	CG5451	CG5451	-2,324
CG14258	CG14258	-1,260	CG5455	CG5455	-1,926
CG14314	CG14314	-1,190	CG5557	sqz	-1,414
CG14457	CG14457	-2,309	CG5565	CG5565	-1,637
CG14538	CG14538	-2,199	CG5575	ken	-1,031
CG14597	CG34127	-1,804	CG56386	CG56386	-1,151
CG14634	CG14634	-2,206	CG5747	mfr	-1,545
CG14662	CG14662	-1,393	CG5913	CG5913	-0,839
CG14688	CG14688	-1,343	CG6071	CG6071	-1,264
CG14724	CoVa	-0,942	CG6149	CG6149	-0,798
CG14781	mei-38	-1,523	CG6179	CG6179	-0,773
CG14837	CG14837	-1,457	CG6194	CG6194	-1,384
CG14884	CSN5	-1,537	CG6320	Ca-beta	-1,265
CG149409	CG149409	-1,733	CG6321	CG6321	-2,258
CG14957	CG14957	-1,334	CG6545	lbe	-2,223
CG15002	mas	-1,076	CG6559	CG6559	-0,986
CG15005	CG15005	-1,128	CG6620	ial	-1,825
CG15071	CG15071	-0,858	CG67551	CG67551	-2,166
CG15083	CG15083	-2,256	CG6770	CG6770	-1,640
CG15086	CG15086	-1,068	CG6889	tara	-1,148
CG15173	Ttc19	-0,871	CG6891	CG6891	-1,613
CG15209	CG15209	-1,092	CG6896	MYPT-75D	-1,047
CG15234	CG15234	-1,870	CG6907	CG6907	-1,259
CG15275	CG42313	-0,803	CG70736	CG70736	-0,905
CG1529	CG1529	-1,555	CG7080	CG7080	-1,829
CG15311	CG15311	-1,437	CG7140	CG7140	-1,850
CG15327	lr7f	-1,996	CG7166	CG7166	-1,956
CG15380	dpr3	-0,989	CG7194	CG7194	-1,729
CG15442	mRpL27	-1,508	CG7290	CG7290	-1,805
CG15461	CG15461	-1,677	CG7298	CG7298	-1,237
CG15535	CG15535	-1,680	CG7345	Sox21a	-1,061
CG15564	CG15564	-1,139	CG7364	TM9SF4	-2,240
CG15596	Osi11	-1,112	CG7639	CG7639	-1,148

CG15742	CG15742	-1,814	CG7719	gwl	-1,226
CG15860	pain	-1,596	CG7740	prominin-like	-1,217
CG1631	CG1631	-1,083	CG7834	CG7834	-1,936
CG1644	Cyp6t1	-1,736	CG7878	CG7878	-1,389
CG1656	lectin-46Ca	-2,528	CG7986	Atg18	-0,755
CG16707	vsg	-1,101	CG8198	l(1)G0136	-1,726
CG1673	CG1673	-1,242	CG8249	CG8249	-0,962
CG16905	eloF	-1,315	CG8291	bdg	-0,974
CG16922	Myo10A	-0,995	CG8357	Drep-1	-1,671
CG1693	tty	-0,906	CG8367	cg	-0,828
CG16932	Eps-15	-1,772	CG8380	DAT	-1,273
CG16937		-0,682	CG8384	gro	-1,740
CG16983	skpA	-1,372	CG8399	CG8399	-0,801
CG17058	Peritrophin-A	-2,445	CG8543	CG8543	-1,081
CG17068	CG17068	-1,457	CG8609	MED4	-1,051
CG17203	mun	-1,000	CG8649	Fim	-1,826
CG17226	Or59c	-1,644	CG8674	l(2)k14505	-1,046
CG17244	CG17244	-1,297	CG8677	CG8677	-2,096
CG17284	Obp93a	-1,626	CG8740	CG8740	-1,990
CG17358	Taf12	-1,843	CG8749	snRNP-U1-70K	-1,230
CG17601	CG17601	-1,888	CG8806	prel	-1,378
CG1763	nod	-2,045	CG8821	vis	-1,646
CG1768	dia	-1,291	CG8860	CG8860	-1,485
CG17697	fz	-2,489	CG8915	CG8915	-2,762
CG17721	CG17721	-0,830	CG8953	Actn3	-2,092
CG17911	Or85c	-1,158	CG9018	CG9018	-1,003
CG1801	CG1801	-2,318	CG9125	CG9125	-0,976
CG18063	CG18063	-2,247	CG9204	Ate1	-1,632
CG18262	CG18262	-1,609	CG9207	Gas41	-1,494
CG18317	CG18317	-0,922	CG9270	CG9270	-1,281
CG18398	Tango6	-3,010	CG9310	Hnf4	-0,725
CG18549	CG18549	-1,800	CG9324	Pomp	-1,718
CG1957	Cpsf100	-1,324	CG9327	Pros29	-0,850
CG1998	CG1998	-1,230	CG9356	CG9356	-1,054
CG2022	CG2022	-1,229	CG93684		-1,581
CG2175	dec-1	-1,673	CG9377	CG9377	-1,290
CG2191	Smvt	-1,826	CG9413	CG9413	-1,198
CG2212	sws	-1,314	CG9460	Spn42De	-1,060
CG2222	Psf3	-1,499	CG9475	Rpt3R	-1,364
CG2321	CG2321	-1,228	CG9511	CG42370	-1,499
CG2330	Neurochondrin	-1,205	CG9535	mmy	-1,124
CG2346	Fmrf	-1,096	CG9572	CG9572	-1,155
CG2488	phr6-4	-1,521	CG9576	CG9576	-1,116
CG2681	CG2681	-1,460	CG9579	AnnX	-1,016
CG2818	CG2818	-2,254	CG9666	CG9666	-1,981
CG2851	Gsc	-1,187	CG9677	Int6	-0,978
CG2988	ems	-1,474	CG9750	rept	-0,989
CG30001	CG30001	-1,068	CG9760	CG9760	-2,187
CG300180		-1,851	CG9765	tacc	-1,078

CG30049	CG30049	-1,022	CG9819	CanA-14F	-1,142
CG30053	CG30053	-1,418	CG9984	TH1	-1,278