

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Einsatz des Modellorganismus *Galleria mellonella* zur
Bestimmung neuer Therapieansätze bei Infektionen –
Untersuchungen auf Basis einer Transkriptom-
Sequenzierung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Nagel, Lisa Andrea

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professorin Dr. J.-S. Frick
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ossowski

Tag der Disputation: 29.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 <i>Galleria mellonella</i>	1
1.1.1 Der Einsatz von <i>Galleria mellonella</i> als Modellorganismus	1
1.1.2 Die Hämolymphe von <i>Galleria mellonella</i>	2
1.1.3 Das Immunsystem von <i>Galleria mellonella</i>	3
1.2 Neue Methoden, neue Möglichkeiten	6
1.3 Bedeutung im medizinischen Kontext	7
1.4 Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	11
2.1.3 Reagenzien	12
2.1.4 Kits	12
2.1.5 Medien und Puffer	13
2.1.6 Primer qRT-PCR	14
2.1.7 Bakterienstämme und Pilzstamm	14
2.1.8 <i>G. mellonella</i> Larven	15
2.1.9 Zellkultur: Raw 264.7 Zellen	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 Bakterienanzucht	16
2.2.2 Systemische Infektion von <i>G. mellonella</i> Larven	16
2.2.3 Vorbereitung der Proben für die mRNA-Seq Genexpressionsanalyse	16
2.2.4 Analyse der mRNA-Seq Daten	17
2.2.5 Vergleich von Aminosäuresequenzen aus <i>G. mellonella</i> mit <i>M. musculus</i> und <i>H. sapiens</i> Sequenzen	17

2.2.6	Titration der <i>P. aeruginosa</i> oder <i>S. Typhimurium</i> Keimzahl zur Infektion von <i>G. mellonella</i>	18
2.2.7	Bestimmung koloniebildender Einheiten (KbE) aus <i>G. mellonella</i> Hämolymphe	19
2.2.8	Bestimmung der Hämozytenzahl in <i>G. mellonella</i> Hämolymphe	19
2.2.9	Genexpressionsanalyse <i>G. mellonella</i> durch qRT-PCR	20
2.2.10	Zellkultur	24
2.2.11	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	27
3.1	<i>Galleria mellonella</i> Genexpressionsanalyse durch mRNA-Seq Profilerung	27
3.1.1	Regulation von Muster-Erkennungs-Rezeptoren nach Infektion	28
3.1.2	Hochregulation Antimikrobieller Peptide nach Infektion	32
3.1.3	Hochregulation des Insekten Metalloproteinase-Inhibitor Proteins (IMPI) nach Infektion	33
3.1.4	Regulation des Enzyms Stickoxid-Synthase (NOS) nach Infektion	34
3.1.5	Hochregulierte Sequenzen unbekannter Funktion	34
3.1.6	Ausgewählte Sequenzen zur näheren Untersuchung	35
3.1.7	<i>G. mellonella</i> , <i>M. musculus</i> und <i>H. sapiens</i> weisen homologe Proteinsequenzen auf	37
3.2	Charakterisierung von systemischen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium Infektionen in <i>Galleria mellonella</i>	41
3.2.1	Eine systemische Infektion mit <i>P. aeruginosa</i> ist für <i>G. mellonella</i> letaler als eine systemische Infektion mit <i>S. Typhimurium</i>	41
3.2.2	<i>G. mellonella</i> eliminiert <i>S. Typhimurium</i> nach Infektion aus der Hämolymphe, <i>P. aeruginosa</i> kann persistieren	44
3.2.3	Systemische Infektion von <i>G. mellonella</i> resultiert in einer erhöhten Hämozytenzellzahl in der Hämolymphe	46
3.3	Wirkung systemischer Infektionen auf die Expression infektionsspezifischer Gene von <i>Galleria mellonella</i>	48
3.3.1	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> und <i>S. Typhimurium</i> induzieren eine vermehrte Expression von Cecropin und IMPI in <i>G. mellonella</i>	49
3.3.2	Anstieg der MRC1 und SERPINB1 mRNA-Expression in <i>G. mellonella</i> nach allen untersuchten bakteriellen Infektionen	52

3.3.3	<i>P. aeruginosa</i> und <i>S. Typhimurium</i> induzieren im Zeitverlauf ansteigende RNA-Expressionslevel von Cecropin und IMPI _____	54
3.3.4	<i>P. aeruginosa</i> und <i>S. Typhimurium</i> induzieren einen starken Anstieg der MRC1 und SERPINB1 mRNA-Expression im Zeitverlauf ____	57
3.3.5	Mit <i>P. aeruginosa</i> oder <i>S. Typhimurium</i> infizierte Raw 264.7 Zellen sezernieren TNF α _____	60
3.3.6	Anstieg der CHI3L1-Sekretion von mit <i>P. aeruginosa</i> oder <i>S. Typhimurium</i> infizierten Raw 264.7 Zellen _____	62
4	Diskussion _____	64
4.1	Veränderung der Genexpression nach Infektion _____	64
4.2	Charakterisierung von <i>P. aeruginosa</i> und <i>S. Typhimurium</i> Infektionen in <i>G. mellonella</i> _____	66
4.3	Genexpression infektionsrelevanter Proteine in <i>G. mellonella</i> , <i>M. musculus</i> und <i>H. sapiens</i> _____	70
4.4	Grenzen des <i>G. mellonella</i> Alternativmodells und Ausblick _____	83
5	Zusammenfassung _____	85
6	Literaturverzeichnis _____	86
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	94
8	Anhang _____	95
9	Danksagung _____	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl unbekannter, hochregulierter Gene nach <i>E. coli</i> bzw. <i>S. aureus</i> Infektion.....	35
Abbildung 2: MAFFT-Alignment des Proteins Alkaline Ceramidase (ACER)....	40
Abbildung 3: Überlebenskurven von <i>G. mellonella</i> nach systemischer Infektion mit <i>P. aeruginosa</i> oder <i>S. Typhimurium</i>	43
Abbildung 4: Koloniebildende Einheiten (KbE) aus <i>G. mellonella</i> Hämolymphe	45
Abbildung 5: Hämozytenzahl aus <i>G. mellonella</i> Hämolymphe nach systemischer Infektion	47
Abbildung 6: mRNA-Expression immunrelevanter Proteine	50
Abbildung 7: mRNA-Expression stressinduzierter Proteine	51
Abbildung 8: mRNA-Expression von ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1	53
Abbildung 9: mRNA-Expression immunrelevanter Proteine von <i>G. mellonella</i> im Zeitverlauf.....	55
Abbildung 10: mRNA-Expression stressinduzierter Proteine von <i>G. mellonella</i> im Zeitverlauf.....	56
Abbildung 11: mRNA-Expression ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 von <i>G. mellonella</i> im Zeitverlauf.....	59
Abbildung 12: TNF α -Sekretion nach Infektion.....	61
Abbildung 13: CHI3L1 und MRC1 ELISA nach Infektion von Raw 264.7 Zellen	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	11
Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände.....	11
Tabelle 3: Reagenzien	12
Tabelle 4: Kits.....	12
Tabelle 5: Zutaten <i>G. mellonella</i> Substrat	13
Tabelle 6: Oligonukleotidsequenzen qRT-PCR.....	14
Tabelle 7: Verwendete Infektionsdosen <i>P. aeruginosa</i> Titration.....	18
Tabelle 8: Verwendete Infektionsdosen <i>S. Typhimurium</i> Titration.....	19
Tabelle 9: Mastermix qRT-PCR.....	22
Tabelle 10: Programm qRT-PCR	22
Tabelle 11: Genexpression nach Infektion	28
Tabelle 12: Regulation Muster-Erkennungs-Rezeptoren.....	29
Tabelle 13: Regulation Antimikrobieller Peptide	32
Tabelle 14: Regulation IMPI	33
Tabelle 15: Regulation NOS.....	34
Tabelle 16: Zur näheren Untersuchung ausgewählte Sequenzen.....	36
Tabelle 17: Homologie-Analyse von <i>G. mellonella</i> , <i>M. musculus</i> und <i>H. sapiens</i> Sequenzen	39
Tabelle 18: Anteile der am Ende des Beobachtungszeitraums lebenden Larven	44
Tabelle 19: Anzahl der überlebenden Larven nach <i>P. aeruginosa</i> bzw. <i>S. Typhimurium</i> Infektion vor der Hämolymphe-Abnahme und dem anschließenden Ausplattieren	46
Tabelle 20: Probenanzahl Hämocyten Auszählung.....	48
Tabelle 21: <i>G. mellonella</i> Aminosäuresequenzen der zu untersuchenden Proteine.....	95

Abkürzungsverzeichnis

AC	Saure Ceramidase
ACER1	Alkalische Ceramidase 1
<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
apoLp-III	Apolipoprotein-III
BCP	1-Bromo-3-chloropropan
C1P	Ceramid-1-Phosphat
<i>C. a./ C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAT	Katalase
CHI3L1	Chitinase-3-like Protein 1
Ct	Cycle threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
E	Effizienz
<i>E. c./ E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC	<i>fold change</i>
<i>G. m./ G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
GPx	Glutathion-Peroxidase
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>H. s./ H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IMPI	Insekten Metalloproteinase-Inhibitor
INF γ	Interferon- γ
IL-6	Interleukin-6
IPS	Insektenphysiologische Kochsalzlösung
KbE	Koloniebildende Einheiten
LB	Luria-Bertani-Medium
LD50	Letale Dosis 50
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäuren
MAFFT	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform

MAMP	Mikroben-assoziierte molekulare Muster
MOI	Multiplicity of infection/ Multiplizität der Infektion
MRC1	Makrophagen-Mannose-Rezeptor 1
NC	Neutrale Ceramidase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>M. m./ M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
NOS	Stickoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
<i>P. a./ P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PO	Phenoloxidase
ProPO	Prophenoloxidase
PRR	Pattern-Recognition-Receptors/ Muster-Erkennungs-Rezeptoren
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA-Seq	mRNA-Sequenzierung
ROS	Reactive oxygen species/ reaktive Sauerstoffspezies
RNS	Reactive nitrogen species / reaktive Stickstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
<i>S. a./ S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. T./ S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium
syst.	systemisch
SERPINB1	Leukozyten-Elastase-Inhibitor B1
SOD	Superoxid-Dismutase
TNF α	Tumornekrosefaktor α
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 *Galleria mellonella*

1.1.1 Der Einsatz von *Galleria mellonella* als Modellorganismus

Insekten besitzen ein angeborenes Immunsystem, das sich aus zellulären und humoralen Komponenten zusammensetzt. Eine adaptive Immunantwort, wie sie beispielsweise bei Säugetieren die Regel ist, ist bei ihnen nicht ausgebildet (Hultmark, 1993). Was zunächst als sehr einfaches und kaum mit Säugetieren vergleichbares System erscheint, stellt bei genauerer Betrachtung einen entscheidenden Vorteil für den wissenschaftlichen Einsatz im Vergleich zum Beispiel zum Mausmodell dar: das angeborene Immunsystem der Insekten kann unabhängig von adaptiven Immunreaktionen beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden die Larven der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) als Modellorganismus eingesetzt. *G. mellonella* gehören der Ordnung *Lepidoptera* (Schmetterlinge) und der Familie *Pyralidae* (Zünsler) an. Sie sind von Imkern gefürchtet, da sie das Wachs der Bienenstöcke fressen und diese somit zerstören (Dickman, 1933). Die Tiere durchlaufen in ihrer Entwicklung vom Ei bis zur adulten Motte acht bis zehn Larvenstadien und nehmen währenddessen an Größe und Gewicht zu. Am Ende des Larvenstadiums verpuppen sich die Tiere, woraus schließlich die adulten Motten schlüpfen (Charrière und Imdorf, 1999). Als Modellorganismen kommen vor allem Larven kurz vor der Verpuppung zum Einsatz. Die Tiere haben zu diesem Zeitpunkt eine Größe von rund 2 cm und ein Gewicht von bis zu 250 mg (Ramarao et al., 2012). Das *G. mellonella* Genom wurde im Jahr 2018 erstmals sequenziert und durch Lange *et al.* veröffentlicht. Hierdurch wurde die Basis für weitere Untersuchungen, wie beispielsweise Vergleiche mit Säugetieren wie *Mus musculus* (*M. musculus*) und *Homo sapiens* (*H. sapiens*), geschaffen (Lange et al., 2018).

Das Modell *G. mellonella* bietet mehrere Vorteile gegenüber bereits länger bestehenden Insektenmodellen. Durch ihre Größe ist eine präzise Infektion mit Pathogenen sowie die Abnahme von Hämolymphe durchführbar. Außerdem

können Versuche mit *G. mellonella* Larven bei 37°C durchgeführt werden, was der menschlichen Körperkerntemperatur entspricht (Ramarao et al., 2012; Wojda, 2017). Die Haltung von *G. mellonella* ist in großem Umfang und mit einfachen Mitteln möglich (Ramarao et al., 2012). Neben der eigenen Zucht der Tiere können auch bereits geschlüpfte Larven kostengünstig erworben werden. Da *G. mellonella* zu den Wirbellosen zählen, bestehen weniger ethische Bedenken für den Einsatz in der Infektionsforschung als beim Einsatz von Wirbeltieren.

Die Anzahl wissenschaftlicher Untersuchungen, die *G. mellonella* als Modellorganismus nutzen, ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Allein im Jahr 2020 sind rund 300 Artikel im Zusammenhang mit *G. mellonella* als Modellorganismus auf der Plattform Pubmed erschienen. Es wurde bereits die Wirkung vieler Humanpathogene auf *G. mellonella* untersucht, beispielsweise *Streptococcus pyogenes* (Loh et al., 2013), *Staphylococcus aureus* (Desbois und Coote, 2011), *Escherichia coli* (Alghoribi et al., 2014), *Klebsiella spp.* (Wand et al., 2013) und *Acinetobacter spp.* (Peleg et al., 2009). Diese Untersuchungen legten den Schwerpunkt dabei hauptsächlich auf Pathogenität und Virulenz einzelner Bakterien für *G. mellonella*. Außerdem wurden *G. mellonella* Larven als Modellorganismus zur Entwicklung und Testung antibakterieller Therapeutika eingesetzt (Peleg et al., 2009; Desbois und Coote, 2011; Tsai et al., 2016).

1.1.2 Die Hämolymphe von *Galleria mellonella*

Als Hämolymphe wird die zirkulierende Körperflüssigkeit von *G. mellonella* bezeichnet. Sie wird in der Literatur häufig als ein Medium dargestellt, das mit dem menschlichen Blut vergleichbar oder gar analog ist (Tsai et al., 2016; Pereira et al., 2018; Asai et al., 2021). Bergin *et al.* (2005) beschrieben beispielsweise Gemeinsamkeiten zwischen der Hämolymphe und dem Blut auf zellulärer Ebene wie die Phagozytose durch Hämozytenzellen und Neutrophile Granulozyten. Sheehan *et al.* (2018) stellten Gemeinsamkeiten in Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Signalwegen sowie im Gerinnungssystem und in der Produktion von Antimikrobiellen Peptiden und Metalloproteinasen dar. Die bisher in der Literatur beschriebenen Ähnlichkeiten zwischen der Hämolymphe der

Insekten und dem Blut des Menschen bestehen also vorrangig in der Funktionsweise von zellulären und humoralen Mechanismen des Immunsystems und nicht in den für den Menschen so essenziellen Blutfunktionen wie beispielsweise dem Sauerstofftransport. Bei Insekten ist ein Transport des aufgenommenen Sauerstoffs durch die Hämolymphe nicht notwendig, da bei ihnen der Sauerstoff durch Diffusion direkt von den Tracheolen in die umliegenden Zellen gelangt (Burmester und Hankeln, 2007; Nys et al., 2020).

1.1.3 Das Immunsystem von *Galleria mellonella*

Das angeborene Immunsystem von *G. mellonella* besteht aus zellulären und humoralen Anteilen. Die vollständige Trennung des angeborenen Immunsystems in das humorale und das zelluläre System ist jedoch nicht sinnvoll möglich, da humorale Komponenten Einflüsse auf die zellulären Komponenten haben und umgekehrt viele humorale Komponenten von den zellulären produziert werden (Lavine und Strand, 2002). Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden die beiden Komponenten hier nacheinander näher beschrieben.

Das zelluläre Immunsystem besteht aus den Hämozytenzellen, die sich in der Hämolymphe befinden. Es sind fünf verschiedene *G. mellonella* Hämozytenzellen bekannt: Prohämozyten, Plasmatozyten, Granulozyten, Spherulozyten und Oenozyten (Price und Ratcliffe, 1974). Um sich mechanisch vor dem Eindringen von Pathogenen zu schützen, enthält die äußere Haut, die Trachea sowie Teile des Gastrointestinaltrakts von *G. mellonella* Chitin (Wojda, 2017). Dringen trotz dieser schützenden Schicht Pathogene in den Körper ein, werden diese durch Phagozytose und Nodulation von den Hämozyten bekämpft. Die Phagozytose von Bakterien erfolgt in *G. mellonella* durch die Plasmatozyten und die Granulozyten, welche zusammen über die Hälfte der Hämozyten ausmachen (Boman und Hultmark, 1987; Lavine und Strand, 2002). Eine größere Anzahl an Bakterien in der Hämolymphe eliminiert *G. mellonella* durch Nodulation. Dabei verbinden sich Granulozyten und Plasmatozyten so miteinander, dass die Pathogene eingeschlossen werden (Ratcliffe und Gagen, 1977).

Die humorale Immunantwort besteht aus Abwehrmolekülen, die vorrangig im Fettkörper, einem der menschlichen Leber ähnlichen Organ, synthetisiert werden. Weitere Orte der Synthese sind die Hämocyten, der Verdauungstrakt, die Speicheldrüsen und der Fortpflanzungstrakt von *G. mellonella* (Hoffmann, 1995; Tsai et al., 2016). Zum breiten Spektrum der synthetisierten Abwehrmoleküle sind antimikrobielle Peptide, Opsonine sowie Enzyme zu nennen, die hier kurz vorgestellt werden sollen.

Antimikrobielle Peptide (AMPs) kommen äußerst vielfältig in allen Lebensformen vor (Zasloff, 2002). Wojda fasste (2017) die Eigenschaften der AMPs in einem Artikel ausführlich zusammen. Demnach wirken AMPs vor allem über eine Destabilisierung der Zellmembran des Pathogens. Durch ihre Vielfältigkeit wirken sie gegen viele verschiedene Pathogene. Außerdem ist ihre Wirkung selektiv gegenüber Pathogenen und schneller als deren Verdopplungszeit. Brown et al. (2009) beschrieben insgesamt 18 bekannte oder vermutete AMPs in *G. mellonella*. Bereits gut charakterisierte *G. mellonella* AMPs stellen Moricin, Cecropin, Gallerimycin sowie Lysozym dar. Moricin und Cecropin sind α -helikale Moleküle, die bakterielle Zellwände penetrieren und dadurch einen Verlust von Ionen verursachen können (Hara und Yamakawa, 1995; Kim et al., 2004; Tsai et al., 2016). Sie sind wirksam gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie Pilzen (Vilcinskas, 2011). Gallerimycin besitzt eine antifungale Wirkung (Schuhmann et al., 2003). Lysozym hydrolysiert durch seine Muramidase-Aktivität Peptidoglykane in bakteriellen Zellmembranen. Außerdem ist eine nichtenzymatische Aktivität gegenüber Pilzen beschrieben (Sowa-Jasiłek et al., 2014; Tsai et al., 2016).

G. mellonella Opsonine sind Proteine, die dazu in der Lage sind, konservierte Mikroben-assoziierte bzw. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (MAMPs bzw. PAMPs) auf Pathogenoberflächen zu erkennen. PAMPs sind vorrangig Bestandteile der Zellmembran von Pathogenen wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäuren (LTA), β -1,3-Glucan sowie fungale Konidien. Opsonine haben also eine mit Mustererkennungsrezeptoren (Pattern-recognition receptors, PRRs) der Säugetiere vergleichbare Funktion. Außerdem markieren sie durch ihre Bindung Pathogene für die Phagozytose durch

Phagozyten (Opsonierung) (Tsai et al., 2016). Ein *G. mellonella* Opsonin, das bereits näher charakterisiert ist, ist Apolipoprotein-III (ApoLp-III) (Wojda, 2017). Tsai et al. (2016) fassten zusammen, dass ApoLp-III in der Lage ist, LPS, LTA, β -1,3-glucan und fungale Konidien zu binden und darüber hinaus die Aktivität antimikrobieller Peptide und des Cecropins stimulieren kann. Außerdem wirkt ApoLp-III synergistisch mit Lysozym in der Wirkung gegen Gram-negative Bakterien (Zdybicka-Barabas et al., 2013). Weitere Opsonine, die unter anderem in *G. mellonella* vorkommen, sind Peptidoglykan-Erkennungsproteine. Sie nehmen ebenfalls Erkennungs- und Signalfunktionen in angeborenen Immunabwehr ein (Dziarski und Gupta, 2006). Hemolin, ein weiteres *G. mellonella* Opsonin, bindet LPS und LTA und trägt damit zur Pathogenabwehr bei (Yu und Kanost, 2002; Tsai et al., 2016). Ein Opsonin, das erst im Jahr 2010 aus *G. mellonella* isoliert wurde, ist GmCP8. Es zeigt Bindungsaktivität gegenüber LPS, LTA, und β -1,3-glucan (Kim et al., 2010).

Eine weitere wichtige Komponente der *G. mellonella* Immunabwehr ist die Melanisierung, die außerdem ein Beispiel für eine direkte Verbindung zwischen dem zellulären und dem humoralen System darstellt. Die Melanisierungsreaktion wird durch das Eindringen von Pathogenen und deren Bindung durch Opsonine sowie durch äußere Verletzungen der Haut aktiviert (Sheehan et al., 2018). Sie ist makroskopisch durch die dunkle Färbung von *G. mellonella* sichtbar und beginnt unmittelbar nach dem schädigenden Ereignis (Söderhäll und Cerenius, 1998). Das Enzym, das die Reaktion katalysiert, ist die Phenoloxidase (PO). Sie wird in den Hämocyten als Proenzym Prophenoloxidase (ProPO) gebildet und gespeichert (Schmit et al., 1977). Bei einer Invasion oder Verletzung wird die ProPO in kürzester Zeit durch eine Kaskade von Serinproteasen zur PO aktiviert und in die Hämolymphe freigesetzt (Cerenius et al., 2008; Wojda, 2017). PO katalysiert dort die Reaktion von Phenolen zu Chinonen, die dann zu Melanin polymerisieren (Söderhäll und Cerenius, 1998). Die Phenoloxidase-Kaskade trägt außerdem dazu bei, dass Pathogene eingekapselt sowie Wunden durch Koagulation verschlossen werden (Li et al., 2002; Cerenius et al., 2008). Bei der Reaktion entstehen Nebenprodukte wie Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und freie Radikale, die die eingedrungenen Pathogene direkt schädigen. Außerdem

werden weitere antimikrobielle Substanzen induziert (Cerenius et al., 2008; Wojda, 2017). Um Schäden des Organismus durch eine überschießende Reaktionskaskade zu vermeiden, wird die Reaktion unter anderem durch Protease-Inhibitoren wie zum Beispiel Serinprotease-Inhibitoren (SERPINE) genau reguliert (Cerenius et al., 2008).

Auch die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (reactive oxygen species (ROS) und reactive nitrogen species (RNS)) durch die Enzyme Stickoxidsynthase (NOS) und NADPH-Oxidase (NOX) in den Hämozyten ist Teil der Abwehrreaktionen von *G. mellonella* (Krishnan et al., 2006; Bismuth et al., 2021). Die Wirkungsweise, sowie die die Reaktion auslösenden Mechanismen sind noch nicht im Detail verstanden. Da die stark reaktiven ROS/RNS auch die Wirtszellen des Organismus angreifen, müssen entgiftende und regulierende Substanzen produziert werden. Beispiele für antioxidative Enzyme stellen Glutathion-S-Transferasen (GST), Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (CAT) oder Glutathion-Peroxidasen (GPx) dar (Enayati et al., 2005; Erdem et al., 2016).

Metalloproteasen sind Virulenzfaktoren, die von Bakterien und Pilzen sezerniert werden. Sie wirken im humanen Organismus pathogen und können nekrotische sowie hämorrhagische Gewebsschädigungen verursachen (Miyoshi und Shinoda, 2000). Das Metalloproteinase-Inhibitor Protein (IMPI) wurde 1998 erstmals aus *G. mellonella* isoliert (Wedde et al., 1998). Es wird als Reaktion auf eine Infektion mit Bakterien oder Pilzen induziert und wirkt in der Hämolymphe inhibitorisch gegenüber zinkhaltigen mikrobiellen Metalloproteinasen (Vilcinskas und Wedde, 2002). IMPI stellt neben den AMPs einen vielversprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für Infektionen des Menschen dar (Vilcinskas, 2011).

1.2 Neue Methoden, neue Möglichkeiten

Die Summe aller Gene, die zu einem Zeitpunkt in einer Zelle in mRNA transkribiert werden, wird als Transkriptom bezeichnet. Ein Ziel der Transkriptomik ist die Charakterisierung aller Transkripte einer Zelle sowie die Interpretation ihrer Funktionen im Organismus. Um ein Verständnis über den Zustand einer Zelle in einem Organismus zu erlangen, ist es von großer

Bedeutung, die sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen verändernden Expressionsniveaus der Transkripte untersuchen zu können. Dieses Wissen kann entscheidend zum Verständnis über die Entstehung von Krankheiten und deren Behandlung beitragen (Wang et al., 2009). Es sind verschiedene Analysemethoden der Expressionsniveaus möglich. Während ab Mitte der 1990er-Jahre vor allem Microarray-basierte Methoden Anwendung fanden, werden mittlerweile Genexpressionsanalysen durch RNA-Seq durchgeführt, einer auf Next-Generation Sequencing (NGS) basierenden Methode (Marioni et al., 2008). Hierbei wird eine RNA Probe in cDNA umgeschrieben und in kürzere Fragmente aufgeteilt. Die Länge der Fragmente ist dabei abhängig vom verwendeten Sequenzierungs-Verfahren und beträgt rund 30-400 Basenpaare cDNA. Die Fragmente werden sequenziert und die Ergebnisse anschließend einem Referenz-Genom oder Referenz-Transkriptom zugeordnet (sog. „read mapping“). Diese bioinformatische Aufarbeitung der Daten stellt eine Herausforderung der RNA-Seq-Methode dar (Wang et al., 2009). Die Methode hat jedoch mehrere Vorteile gegenüber älteren Verfahren: es ist beispielsweise möglich, unbekannte Transkripte und Varianten zu finden und es besteht darüber hinaus eine hohe Sensitivität auch für nur schwach exprimierte Transkripte (Li et al., 2016; Wang et al., 2009).

In dieser Arbeit sollte unter anderem durch eine RNA-Seq der Expressionsunterschied zwischen Bakterien-stimulierten und nicht-stimulierten *G. mellonella* gemessen werden. Die Sequenzierung erfolgte dabei auf Basis des Illumina NextSeq™500-Systems (Illumina).

1.3 Bedeutung im medizinischen Kontext

Nach aktuellem Stand der Forschung wird eine Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion verursacht wird, definiert (Singer et al., 2016). Dieser Zustand kann Folge einer Infektion mit Bakterien, Pilzen, Parasiten oder Viren sein und unabhängig von Alter und Geschlecht des betroffenen Menschen auftreten (Fleischmann-Struzek et al., 2021). Die Sepsis ist eine häufige Erkrankung und kann weltweit mit jedem 5. Todesfall assoziiert werden. Darüber hinaus ist die Letalität der Sepsis auch in Deutschland noch immer sehr hoch und wird in der Literatur mit 30-50% der

Sepsis-erkrankten angegeben (Engel et al., 2007; Fleischmann-Struzek et al., 2021). Diese hohe Letalität kommt unter anderem dadurch zustande, dass eine Erkennung und Behandlung dieses kritischen Zustandes oftmals (zu) spät erfolgt (Fleischmann et al., 2016). Des Weiteren sind die Daten zur Sepsis Inzidenz und Letalität oftmals unzureichend genau, da diesbezügliche Untersuchungen häufig auf Abrechnungsdaten basieren, die eine korrekte Kodierung der Erkrankungen erfordert. Diese ist aber bei einem so breitgefächerten Krankheitsbild wie der Sepsis nicht immer gegeben (Fleischmann-Struzek et al., 2021). Die Verfügbarkeit effektiver Antiinfektiva ist für eine adäquate Sepsis-Therapie und der Therapie von Infektionen im Allgemeinen von höchster Bedeutung. Besonders bedenklich ist dabei jedoch die Tatsache, dass in den letzten Jahrzehnten antibiotikaresistente Bakterienstämme schneller auftreten, als neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) sieht die Zunahme von Antibiotika-Resistenzen als eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme unserer Zeit an. Die hohe Letalität der Sepsis sowie die sich zuspitzende Resistenzlage vieler Pathogene machen die Notwendigkeit der Grundlagenforschung zur Entwicklung neuer Diagnostika und Therapeutika in diesem Bereich deutlich.

Laut eines Berichts der WHO waren Gastroenteritiden sowie Infektionen der unteren Atemwege die Hauptursachen der weltweiten septischen Mortalität im Jahr 2017 (WHO, 2020). Gastroenteritiden werden häufig durch Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) oder *Salmonella enterica* und Atemwegserkrankungen durch Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) oder *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ausgelöst (Stoll et al., 2011; Rudd et al., 2020).

P. aeruginosa stellt in den Kliniken aufgrund einer ansteigenden Zahl an Patienten mit Immunsuppression sowie der intrinsischen Resistenz gegenüber vielen Antibiotika ein Gesundheitsproblem dar (Botelho et al., 2019). *P. aeruginosa* ist ein bewegliches, obligat aerobes, gram-negatives Stäbchenbakterium, das nicht in der Lage ist, Kohlenhydrate fermentativ abzubauen. Es besteht eine hohe Umweltpersistenz bei gleichzeitig bescheidenen Nährstoffansprüchen. Als Erreger nosokomialer Infektionen sind hauptsächlich immunsupprimierte sowie hospitalisierte Patienten gefährdet

(Lyczak et al., 2000). *P. aeruginosa* verursacht meist zunächst lokale eitrige Infektionen, die dann im Verlauf septisch generalisieren können (Wu et al., 2011). Eine hinreichende Therapie ist aufgrund verschiedener Virulenzfaktoren sowie zunehmender Antibiotikaresistenzen oftmals schwierig. Beispielsweise kann *P. aeruginosa* Biofilme bilden, in denen sich die Bakterien vor antimikrobiellen Faktoren sowie der Phagozytose schützen können (Costerton et al., 1999).

Salmonella enterica Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ist ein weit verbreitetes, aerobes, gram-negatives Stäbchenbakterium. Eine Infektion mit *S. Typhimurium* ist weltweit eine der Hauptursachen für infektiöse Gastroenteritiden, die Infektion erfolgt meist über kontaminierte Nahrungsmittel und ist somit vorrangig im Gastrointestinaltrakt lokalisiert (Majowicz et al., 2010). Nicht nur in Entwicklungsländern sondern auch in Industrienationen wie Deutschland gehören Salmonellosen zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten (Robert-Koch-Institut, 2020). Eine Infektion mit *S. Typhimurium* kann auf verschiedene Weise verlaufen: asymptomatische Dauerausscheider, Gastroenteritiden, fokale eiternde Infektionen sowie bakteriämische Verläufe sind möglich (Gordon, 2008). In der Regel besteht für immunkompetente Patienten keine Behandlungsnotwendigkeit, jedoch sind Neugeborene, ältere oder immunsupprimierte Patienten bei einer Infektion mit *S. Typhimurium* besonders durch eine Blutstrominfektion hochgefährdet. Außerdem hat sich die Resistenzlage in den letzten Jahren verschlechtert (Crump et al., 2015). Die Blutstrominfektion von *S. Typhimurium* sowie *P. aeruginosa* soll im *G. mellonella* Alternativmodell durch eine systemische Applikation simuliert werden.

1.4 Zielsetzung

Die Grundlage dieses Projektes ist ein mRNA-Seq Datensatz von *G. mellonella* Larven nach einer systemischen Infektion mit *E. coli*, *S. aureus* oder *C. albicans*. Durch die Analyse der von den *G. mellonella* Larven transkribierten mRNA, können Veränderungen in der Genexpression von *G. mellonella* als Reaktion auf eine Infektion in einer Momentaufnahme sichtbar gemacht werden. Auf dieser Basis sollen neue Transkripte, die auf Infektionen und Sepsis hinweisen können,

in *G. mellonella* gefunden werden. Anschließend sollen die daraus resultierenden Ergebnisse in qRT-PCR Messungen verifiziert und durch Proben von *G. mellonella* nach zwei weiteren bakteriellen Infektionen und zu weiteren Zeitpunkten ergänzt werden. Als weitere Bakterien wurden hierfür *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* ausgewählt. Perspektivisch könnten diese neuen Erkenntnisse in der Humanmedizin in Form von Biomarkern für Infektion und Sepsis oder neuer Therapieansätze genutzt werden. Außerdem tragen die Erkenntnisse, die durch die Untersuchungen mit verschiedenen Bakterien im Modell *G. mellonella* gewonnen werden, dazu bei, die eingesetzten Bakterien im Hinblick auf ihre Virulenz für *G. mellonella* näher zu charakterisieren, das angeborene Immunsystem der Insekten besser zu verstehen sowie das Modell *G. mellonella* in der medizinischen Forschung weiter zu etablieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Photometer	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus
ELISA Messgerät Infinite F50	TECAN
ELISA Waschgerät M8/4R Columbus	TECAN
Injektor Manual Microsyringe Pump	World Precision Instruments
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific
Neubauer-Zählkammer	Preciss
Lightcycler 480	Roche

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände

Gegenstand	Hersteller
Columbia-Blutagar mit 5% Schafblut	Oxoid
Küvetten	Sarstedt
Mikrotiterplatte 96 x 0,2 mL	Nerbe plus
Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf
Spitzboden-Röhrchen 15 mL	Becton Dickinson Bioscience Falcon
Spitzboden-Röhrchen 50 mL	Becton Dickinson Bioscience Falcon
U-100 Spritze 0.3 x 8 mm	Becton Dickinson
Zellkulturflaschen 200 mL	Greiner bio-one, CELLSTAR®
Zellkulturplatten 6-Well	Greiner bio-one
Zellschaber	BD Falcon
Zuchtboxen <i>G. m.</i> Larven	Handelsübliche Kunststoffboxen 2,8 L

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5g/l) mit Glutamin	PAA Cell Culture Company
1-Bromo-3-Chloropropan (BCP)	Sigma Aldrich, MERCK
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, MERCK
Gentamycin sulfat	AppliChem, A4854,0005
Na-Pyruvat	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
Trypanblau	Sigma Aldrich, MERCK
TRIzol	Sigma Aldrich, MERCK

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Kits

Kit	Hersteller
DNA-free™ Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Mouse CHI3L1 ELISA Kit	Cusabio
Mouse MRC1 ELISA Kit	Cusabio
BD OptEIA Mouse TNFα ELISA Set	Becton Dickinson Bioscience
QuantiFast SYBR®Green qRT-PCR Kit	Qiagen
RNeasy-Kit	Qiagen

2.1.5 Medien und Puffer

2.1.5.1 G. mellonella Substrat

Für die Herstellung des Substrats zur Anzucht von *G. mellonella* Larven wurden die Zutaten, die in Tabelle 5 aufgelistet sind, miteinander vermischt und anschließend bei 60 °C für 60 min erwärmt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Bei der Auswahl der Rohstoffe ist auf Bioqualität ohne Rückstände von Pestiziden zu achten. Die Boxen zur Zucht der Larven wurden zu maximal einem Drittel mit dem Substrat gefüllt.

Tabelle 5: Zutaten *G. mellonella* Substrat

Anteil	Zutat	Hersteller
22 %	Maisgrieß	Ostermühle Naturkost
22 %	Weizenschrot	Ostermühle Naturkost
17,5 %	Bienenwachs	Mixed-store creativity & fantasy
11 %	Magermilchpulver	Sucofin
11 %	Blütenhonig	Deutscher Imkerverbund Imker Hubert Hoffmann
11 %	Glycerin	Sigma Aldrich
5,5 %	Trockenhefeflocken	Rapunzel

2.1.5.2 Insektenphysiologische Kochsalzlösung (IPS-Puffer)

IPS-Puffer wird zur Verdünnung der *G. mellonella* Hämolymphe nach Hämolymp-Abnahme eingesetzt. Der Puffer sowie das Lagern der Proben auf Eis hemmen die Reaktion der Phenoloxidase. Der Puffer wurde nach Wago und Ichikawa (1988) in folgendem Verhältnis angesetzt: 150mM NaCl, 5mM KCl, 0,1 MTris-HCl Puffer und einigen Phenylthiourea (PTU) Kristallen. Der pH-Wert beträgt 6,9 (zitiert nach Tojo et al., 2000).

2.1.5.3 RAW 264.7 Zellkultur Medium

Das Medium zur Kultivierung der RAW 264.7 Zellen bestand aus DMEM High Glucose mit Glutamin, dem 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Natrium-Pyruvat zugesetzt wurden.

2.1.6 Primer qRT-PCR

Tabelle 6: Oligonukleotidsequenzen qRT-PCR

Gen		Sequenz 5'-3'
ACER1	Forward	GTGGCAGTTTGTCTGTTGGC
	Reverse	ATATGCCAGACACCGTGCAT
Cecropin	Forward	CTGTTTCGTGTTTCGCTTGTGT
	Reverse	GTAGCTGCTTCGCCTACCAC
CHI3L1	Forward	TTGCATCGCCTACAACAGAGT
	Reverse	TAAACGGAACAGTCAGGGGC
GST	Forward	GACAGAAGTCCTCCGGTCAG
	Reverse	TCCGTCTTCAAGCAAAGGCA
IMPI	Forward	ATACGTTTCGCGTCGTTCCAT
	Reverse	GGGAATGTTGCATTTGTGGA
MRC1	Forward	GTGCGCACTCAATTCGTGTT
	Reverse	AACGCTGTTTCGATTCTGCCT
NOS	Forward	ATGAAGGTGCTGAAGTCACAA
	Reverse	GCCATTTTACAATCGCCACAA
SERPINB1	Forward	CGTTTGCTGTTGTTCGCGTTA
	Reverse	GCTGCTTTGTTGTCCCACAG

2.1.7 Bakterienstämme und Pilzstamm

2.1.7.1 *Escherichia coli* MG1655/K-12 DSM 18039

Für die Infektion mit *E. coli* wurde der Stamm K-12/ MG1655, DSM 18039 (Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) verwendet.

2.1.7.2 *Staphylococcus aureus* DSM 20231

Für die Infektion mit *S. aureus* wurde der Referenzstamm DSM 20231 (Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) verwendet.

2.1.7.3 Candida albicans DSM 11225

Für die Infektion mit *C. albicans* wurde der Referenzstamm DSM 11225 (Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) verwendet.

2.1.7.4 Pseudomonas aeruginosa DSM 19880

Für die Infektion mit *P. aeruginosa* wurde der Referenzstamm DSM 19880 (Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) verwendet.

2.1.7.5 Salmonella enterica Serovar Typhimurium SB300

Für die Infektion mit *S. Typhimurium* wurde der Stamm SB300 verwendet. Der Stamm enthält eine intrinsische Resistenz gegen Streptomycin und wurde von der AG Wagner, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Uniklinikum Tübingen, bezogen.

2.1.8 *G. mellonella* Larven

G. mellonella Larven wurden von b.t.b.e. Insektenzucht GmbH bezogen und direkt nach Ankunft in das eigenhergestellte Substrat gegeben. Die Larven wurden im Dunkeln bei 30 °C gehalten. Frühestens 7 Tage nach Lieferung der Tiere wurden diese für Versuche verwendet, um einen Einfluss von Stressreaktionen der Tiere auf das Versuchsergebnis zu verhindern. Außerdem wurden ausschließlich Tiere mit einem Gewicht über 130 mg aber noch reger Beweglichkeit ausgewählt, um zu gewährleisten, dass sich alle Tiere im letzten Larvenstadium befinden.

2.1.9 Zellkultur: Raw 264.7 Zellen

Es wurden Raw 264.7 Mausmakrophagen verwendet. Die Zelllinie stammt aus dem Bauchwasser einer mit dem Abselon Leukaemia Virus (A-MuLV) infizierten Balb/C Maus. Raw 264.7 Zellen sind adhärente, schnell wachsende Zellen mit den Eigenschaften normaler Makrophagen (Raschke et al., 1978).

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht

Um Bakterienlösungen zur Infektion von *G. mellonella* Larven herzustellen, wurde ein kleiner Teil der jeweiligen Bakterienprobe am Vortag des Experiments auf Columbia-Blutagar ausgestrichen. Am Tag der Infektion wurden 2-3 Kolonien von der Agarplatte abgenommen, in LB-Medium überimpft und 2-3 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Lösung wurde bei 4000 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 mL PBS gelöst. Die Messung der im PBS enthaltenen Bakterienzahl erfolgte mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm, wobei davon ausgegangen wurde, dass eine Extinktion von $E = 2$ einer Bakterienzahl von 10^9 Bakterien/ mL entspricht. Anschließend wurde die Lösung bis zur erforderlichen Keimzahl mit PBS verdünnt. Um sicherzustellen, dass die erforderliche Keimzahl durch die Verdünnung erreicht wurde, wurden je 100 µL der Infektionslösung auf eine Columbia-Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Durch Zählung der gewachsenen Kolonien kann so die Infektionsdosis kontrolliert werden.

2.2.2 Systemische Infektion von *G. mellonella* Larven

Zur Durchführung einer systemischen Infektion wurde eine U-100 Insulin Spritze 0.3 x 8 mm (Becton Dickinson) in einem Präzisionsinjektor (World Precision Instruments) verwendet. Die Injektion von 10 µL Bakteriensuspension erfolgte in eines der beiden hinteren Bauchfüße. Es wurde darauf geachtet, die Infektionslösung zwischen den Infektionen der einzelnen Larven kühl zu halten, um eine konstante Zielkonzentration zu erreichen.

2.2.3 Vorbereitung der Proben für die mRNA-Seq Genexpressionsanalyse

Die Vorbereitung des Versuchs von der Infektion der Larven bis zur isolierten RNA erfolgte bereits vor Beginn dieser Arbeit durch Dr. Anna Lange, AG Frick. Geeignete Keimzahlen zur systemischen Infektion von *G. mellonella* Larven wurden durch Vorversuche ermittelt: *E. coli* 10^7 / mL, *S. aureus* 10^6 / mL und *C. albicans* 10^4 / mL. Es wurden je drei Larven mit 10 µL einer Infektionslösung infiziert. Drei Larven wurde lediglich 10 µL PBS injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C und Dunkelheit wurden die Tiere in

Reaktionsgefäße gegeben und in ihnen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Larven einzeln mit Mörser und Pistill zerrieben. Mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) wurde nach Herstelleranweisung RNA isoliert und anschließend die noch enthaltene DNA mit dem DNafree Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) entfernt. Die mRNA-Seq der Proben sowie die bioinformatische Aufarbeitung erfolgte durch c.ATG, Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universitätsklinikum Tübingen.

2.2.4 Analyse der mRNA-Seq Daten

Die relative Veränderung der Genexpression zwischen zwei Versuchsbedingungen wird als Expressionsverhältnis bzw. „fold-change“ (FC) angegeben. Durch die Logarithmierung der Werte zur Basis 2 wird erreicht, dass Hoch- sowie Herabregulation auf ein kontinuierliches Intervall abgebildet werden. Als miteinander zu vergleichende Versuchsbedingungen lagen in diesem Fall stimulierte Proben im Vergleich zu PBS Kontrollproben vor. Der mRNA-Seq Datensatz wurde nach hochregulierten und herabregulierten Genen strukturiert. Als Bedingung hierfür wurde ein Expressionsverhältnis von $\log_{2}FC > 1,00$ als hochreguliert, ein Expressionsverhältnis von $\log_{2}FC < -1,00$ als herabreguliert gewertet. Die Daten wurden ab einem p-Wert $< 0,05$ als verlässlich angenommen.

2.2.5 Vergleich von Aminosäuresequenzen aus *G. mellonella* mit *M. musculus* und *H. sapiens* Sequenzen

Der Datensatz wurde nach Genen, für die in der Literatur bereits eine Rolle für die Immunreaktion vermutet wird, durchsucht. Die Proteinsequenzen dieser Gene wurden mit entsprechenden *M. musculus* und *H. sapiens* Aminosäuresequenzen aus der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) verglichen. Hierfür wurde die Anwendung „Protein Blast (BLASTX)“ des NCBI verwendet. BLAST stellt die englische Abkürzung für „Basic Local Alignment Search Tool“ dar. Der Erwartungswert (E-value) der Untersuchung gibt an, wie viele zufällige Übereinstimmungen beim Durchsuchen einer Datenbank zu erwarten sind. Je kleiner der Erwartungswert, desto signifikanter ist die Übereinstimmung zwischen den beiden Vergleichssequenzen. Protein zu Protein Vergleiche sind sensibler

als Untersuchungen auf DNA-Ebene. In der Literatur werden Protein zu Protein Vergleiche mit Erwartungswerten, die $< 10^{-3}$ unterschreiten, als homolog angenommen (Pearson, 2013). Die Sequenzabdeckung (query coverage) gibt an, wie viel Prozent der beiden Vergleichssequenzen miteinander in Verbindung gebracht werden können. Der Wert „identity“ beschreibt dabei den Prozentsatz der Positionen, für die eine absolute Übereinstimmung vorliegt. In dieser Arbeit wurde Homologie zwischen zwei Sequenzen ab Erwartungswerten $< 10^{-4}$, einer Übereinstimmung von $> 30\%$ und einer Sequenzabdeckung von $> 65\%$ angenommen.

Die Erstellung eines MAFFT-Alignments („Multiple Alignment using Fast Fourier Transform“) erfolgte mit dem Programm Unipro UGENE. Als Einstellung wurde eine strikte Übereinstimmung („consensus type“) gewählt, mit einem Schwellenwert von 90%.

2.2.6 Titration der *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* Keimzahl zur Infektion von *G. mellonella*

Um eine geeignete *P. aeruginosa* sowie *S. Typhimurium* Infektionsdosis für weitere Versuche zu ermitteln, wurde eine Titration verschiedener Keimzahlen durchgeführt. Dazu wurden Larven mit je 10 μL einer Bakterienlösung systemisch infiziert. Die Infektionsdosen pro Larve sind in den Tabellen 7 und 8 zu finden. Einer Kontrollgruppe wurde PBS-Lösung injiziert. Für fünf aufeinanderfolgende Tage wurden die Tiere bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert und täglich auf Lebendigkeit kontrolliert. Die Auswertung erfolgte mit der Anwendung „survival“ der Software GraphPad 8 Prism.

Tabelle 7: Verwendete Infektionsdosen *P. aeruginosa* Titration

Konzentration	Bakterienzahl pro Tier	Anzahl Tiere
5 x 10 ² / mL	5	24
10 ³ / mL	10	23
2,5 x 10 ³ / mL	25	23
5 x 10 ³ / mL	50	23
PBS	-	23

Tabelle 8: Verwendete Infektionsdosen *S. Typhimurium* Titration

Konzentration	Bakterienzahl pro Tier	Anzahl Tiere
10 ⁴ / mL	10 ²	12
10 ⁵ / mL	10 ³	12
10 ⁶ / mL	10 ⁴	12
10 ⁷ / mL	10 ⁵	12
10 ⁸ / mL	10 ⁶	12
PBS	-	12

2.2.7 Bestimmung koloniebildender Einheiten (KbE) aus *G. mellonella*

Hämolymphe

G. mellonella Larven wurden mit je 10 µL PBS-Lösung, die *S. Typhimurium* (10⁵/ mL) oder *P. aeruginosa* (5x10²/ mL) enthielt, systemisch infiziert. Nach 15 min sowie nach 2, 3, 4, 6 und 24 h Inkubationszeit bei 37 °C wurde bauchseitig Hämolymphe entnommen. Dazu wurde mit einer Nadelspitze die Haut an der Bauchseite vorsichtig verletzt und 13 µL der austretenden Hämolymphe mittels Pipettenspitze abgenommen. Die Hämolymphe wurde in 117 µL IPS gelöst und mehrere Verdünnungen im Abstand von je einer Zehnerpotenz angefertigt, um später eine genaue Auszählung zu gewährleisten. Es wurden 100 µL pro Verdünnungsstufe auf Columbia-Blutagar ausplattiert. Die Agarplatten wurden 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und das Ergebnis in KbE pro 10 µL Hämolymphe angegeben.

2.2.8 Bestimmung der Hämozytenzahl in *G. mellonella* Hämolymphe

G. mellonella Larven wurden mit je 10 µL PBS-Lösung, die *S. Typhimurium* (10⁵/ mL) oder *P. aeruginosa* (5x10²/ mL) enthielt, systemisch infiziert. Außerdem wurde Larven als Kontrollgruppe (Mock) lediglich 10 µL PBS injiziert. Nach 2, 4, 6, 8 sowie 24 h Inkubation bei 37 °C und Dunkelheit erfolgte eine bauchseitige Abnahme von 10 µL Hämolymphe von den stimulierten Tieren. Außerdem wurde nicht-stimulierten, nativen Tieren als weitere Kontrollgruppe Hämolymphe abgenommen. Die Hämolymphe wurde in 90 µL IPS-Puffer

gegeben. Der IPS-Puffer sowie das Kühlen der Reaktionsgefäße auf Eis hemmen die Reaktion der Phenoloxidase. Eine Reaktion der Phenoloxidase wäre an einer schwarzen Verfärbung der Lösung zu erkennen. Die Anzahl der Hämozytenzellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei wurden alle runden Zellen gezählt, eine Bestimmung der Zellart erfolgte nicht. Entrundete Zellen oder Zelltrümmer wurden nicht mitgezählt.

2.2.9 Genexpressionsanalyse *G. mellonella* durch qRT-PCR

Es handelt sich bei der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) um eine erweiterte Form der herkömmlichen PCR. Die zuvor isolierte RNA wird hierbei mithilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche in den darauffolgenden Zyklen der qPCR vervielfältigt und quantifiziert wird. Die Quantifizierung erfolgte durch den Einsatz eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, dem SYBR®Green (Qiagen) (Zipper et al., 2004).

Für die Genexpressionsanalyse wurden *G. mellonella* Larven mit 10 µL *P. aeruginosa* (5×10^2 / mL) oder *S. Typhimurium* (10^5 / mL) infiziert. Außerdem wurden Mock-Kontrollen je 10 µL PBS gespritzt. Die Durchführung der Infektion erfolgte wie bereits in 2.2.2 beschrieben.

Die mit *E. coli* (10^7 / mL) bzw. *S. aureus* (10^6 / mL) infizierten Larven entsprechen den Proben aus 2.2.3. Von einem Teil der in 2.2.3 zerriebenen *G. mellonella* Larven wurde mittels RNeasy Kit (Qiagen) RNA isoliert und für die mRNA-Seq verwendet. Das restliche Pulver wurde hier weiter für die qRT-PCR Messungen verwendet, bei dem die RNA-Isolation mittels einer TRIzol-basierten Methode erfolgte (2.2.9.1).

2.2.9.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde ein TRIzol-basiertes Protokoll (Sigma-Aldrich) verwendet. Dazu wurden *G. mellonella* mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit einem Pistill zerrieben und in 1 mL TRIzol gegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Proben gevortext und bei 8.000 x g für 15 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 200 µL 1-Bromo-3-chloropropan (BCP, Sigma-

Aldrich) versetzt. Nach sorgfältigem vortexen wurde die Probe zunächst 5 min bei RT und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 18.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 500 µL Isopropanol wurden die Proben für 5 min invertiert und erneut bei 18.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurden zum Waschen des Pellets 500 µL 75% Ethanol zugegeben, gevortext und bei 18.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µL H₂O mit RNasin (Promega) (Verhältnis 1:50) gelöst und auf Eis inkubiert. Die Qualität und Konzentration der isolierten RNA wurde via NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Um DNA-Verunreinigungen der Proben zu entfernen, wurde nach der RNA-Isolation ein DNase-Verdau durchgeführt. Verwendet wurde das DNA-free™ Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. Bis zum Einsatz in der qRT-PCR wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2 Primererstellung

Um Primer für die quantitative RT-PCR zu erstellen, wurde das Primer-BLAST design tool des NCBI verwendet. Die Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH 2020 produziert. Anhand eines *G. mellonella*-RNA-Probenpools wurde mittels qRT-PCR die Spezifität sowie die Amplifikationseffizienz geprüft. In Tabelle 6 sind die verwendeten Oligonukleotidsequenzen aufgelistet.

2.2.9.3 Durchführung der qRT-PCR

Zunächst wurde für alle Proben zusammen ein Mastermix pipettiert (Tabelle 9). Anschließend wurden 100 ng RNA-Probe pro Well auf die 96-Well-Platte aufgetragen und 9 µL des Mastermix hinzu pipettiert. Zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurden aus einem *G. mellonella*-RNA-Probenpool Standards vier Mal in einer 1:5 Verdünnungsreihe verdünnt und eingesetzt. Außerdem wurde eine Negativkontrolle eingesetzt, bei der die RNA-Probe durch Wasser im entsprechenden Volumenanteil ersetzt wurde. Die qRT-PCR wurde im LightCycler® 480 SW 1.5 (Roche) durchgeführt (Tabelle 10). Zur Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte wurde das QuantiFast

SYBR®Green qRT-PCR Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung verwendet. Die Spezifität der Reaktion wurde durch die Analyse der Schmelzkurven bestimmt. Dazu werden im Anschluss des qRT-PCR Durchlaufs die doppelsträngigen PCR-Produkte durch Erhitzung auf bis zu 95 °C wieder in Einzelstränge aufgeschmolzen. Hierbei wird folglich auch das SYBR®Green wieder freigesetzt. Durch die Messung der Fluoreszenzabnahme kann die Schmelztemperatur des PCR-Produkts bestimmt werden. Dabei unterscheiden sich die Schmelzpunkte von spezifischen und unspezifischen Genprodukten, beispielsweise weisen unspezifische Primerdimere geringere Schmelztemperaturen als spezifische PCR-Produkte auf.

Tabelle 9: Mastermix qRT-PCR

Reagenz	Pro Probe
QuantiFast SYBR®Green qRT-PCR Master MIX	5 µL
Forward Primer	0,1 µL
Reverse Primer	0,1 µL
Nucleasefreies Wasser	3,7 µL
QuantiFast RT Mix (Reverse Transkriptase)	0,1 µL
Gesamt	9 µL

Tabelle 10: Programm qRT-PCR

	Zyklen	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	1	50 °C	10 min
Denaturierung	1	95 °C	5 min
Amplifikation	40	95 °C	10 sek
		60 °C	30 sek
Schmelzkurve	1	46 °C	0,06 °C/ sek
		95 °C	
Kühlung	1	40 °C	-

2.2.9.4 Quantitative RT-PCR Auswertung

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte semiquantitativ mit Hilfe der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Hierfür wird ein Referenzgen benötigt, das konstitutiv exprimiert und weder in der stimulierten noch in der Kontrollprobe reguliert wird (sog. „Housekeepinggen“). Hierzu wurde Ubiquitin eingesetzt. Als Kontrollproben wurden PBS-stimulierte *G. mellonella* verwendet. Der Ct-Wert (cycle threshold) stellt den Zyklus der PCR dar, bei dem die Fluoreszenzintensität des SYBR®Greens eine bestimmte Schwelle überschreitet. Der Ct-Wert ist also umgekehrt proportional zu Konzentration des Transkriptes. Je mehr Transkript in der Probe vorhanden war, desto früher überschreitet die Fluoreszenzintensität des SYBR®Greens den Schwellenwert und desto kleiner ist demnach der Ct-Wert.

Berechnung durch die $\Delta\Delta Ct$ -Methode:

$$\Delta Ct = Ct_{Testgen} - Ct_{Ubiquitin}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Stimulation} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

An der Zahl 2 wird ersichtlich, dass von einer idealen Amplifikationseffizienz, also der konstanten Verdopplung der Genprodukte in jedem Zyklus, ausgegangen wird. Durch das Einsetzen der tatsächlichen Effizienz der jeweiligen Paarung können unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Primer ausgeglichen werden. Damit die Spezifität der Reaktion dabei nicht vernachlässigt wird, wurden nur Messungen mit Effizienzen zwischen 1,8 und 2,2 akzeptiert. Die Effizienz der Reaktion berechnet sich nach folgender Formel:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

$m \triangleq$ Steigung der Standardkurve

Die relativen transkriptionellen Unterschiede wurden schließlich nach folgender Formel berechnet:

$$R = \frac{E_{Testgen}^{Ct(Kontrolle)_{Testgen} - Ct(Stimulation)_{Testgen}}}{E_{Ubiquitin}^{Ct(Kontrolle)_{Ubiquitin} - Ct(Stimulation)_{Ubiquitin}}}$$

2.2.10 Zellkultur

2.2.10.1 Anzucht der Raw 264.7 Zellen

Die Kultivierung der Raw 264.7 Maus Makrophagen erfolgte im unter 2.1.5.3 bereits beschriebenen Medium im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂. Alle 2-3 Tage wurde das Medium erneuert. Falls mehr als 80% der Kulturflasche bedeckt waren, wurden die Zellen aufgeteilt.

2.2.10.2 Vorbereitung der Zellen für die Infektion

Die Zellen wurden mittels Zellschaber in das Medium abgekratzt. Das die Zellen enthaltende Medium wurde bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau in einer 1:20 Verdünnung gefärbt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Trypanblau wird nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. So kann sichergestellt werden, dass nur intakte Zellen mitgezählt werden. Es wurden 2 x 10⁶ Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und die Zellen über 24 h zum Anwachsen in den Inkubator gegeben.

2.2.10.3 Infektion der Raw 264.7 Zellen

Am Versuchstag wurde das Medium durch frisches Medium, das kein Penicillin/Streptomycin enthielt, ersetzt und nochmals 2 h inkubiert, um restliche Spuren des Antibiotikums aus den Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgte die

Infektion der Zellen. Hierzu wurde das Medium durch Medium ersetzt, das *S. Typhimurium* bzw. *P. aeruginosa* in einer MOI (multiplicity of infection) von 1 enthielt. Dies bedeutet, dass gleich viele Bakterien wie Zellen im Reaktionsansatz vorhanden waren, das Infektionsverhältnis betrug also 1:1. Die infizierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 1 h erfolgte die Abtötung der Bakterien im Medium durch Zugabe von 2 µL Gentamicin (10 µg/ mL).

2.2.10.4 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte nach 0, 2, 3, 4, 6 und 24 h. Hierbei wurden die Zellkulturüberstände aus den Wells in Spitzboden-Röhrchen pipettiert und für 1 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in ein neues Spitzboden-Röhrchen gegeben und bei -20 °C eingefroren.

Die Reste des in den Wells verbliebenen Überstands wurden vollständig abgesaugt. Es wurden 500 µL PBS-Lösung pro Well hinzugegeben und die adhärennten Zellen mittels Zellschaber in die PBS-Lösung abgekratzt. Die nun in PBS suspendierten Zellen wurden in Spitzboden-Röhrchen pipettiert. Zur Lyse der Zellen wurde die Suspension je drei Mal eingefroren und unter gründlichem vortexen wieder aufgetaut. Um überschüssige Zellbestandteile zu entfernen, wurde 5 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der den lysierten Zellinhalt enthielt, wurde abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

2.2.10.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Durchführung der ELISA Messungen erfolgte nach Herstelleranweisung des jeweiligen Kits. Zum Waschen der Platten wurde ein Waschgerät (Tecan M8/4R Columbus Plus) verwendet. Die Messungen erfolgten im Absorptions-Mikroplatten-Reader für ELISA TECAN infinite F50 und der Software Magellan for 50.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8. Durch einen Kolmogorov-Smirnov Test wurde bestimmt, ob eine Normalverteilung der Daten vorlag. Bei zwei zu vergleichenden Gruppen wurde,

sofern eine Normalverteilung vorlag, ein Welchs-t-test angewandt, bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Bei unterschiedlichen Standardabweichungen in den zu vergleichenden Gruppen wurde eine Wells-Korrektur durchgeführt. Um mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde je nach Anzahl der zu analysierenden Faktoren eine einfaktorielle oder multiple Varianzanalyse (one-way bzw. two-way ANOVA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 *Galleria mellonella* Genexpressionsanalyse durch mRNA-Seq

Profilierung

Durch die Sequenzierung der mRNA einer Zelle (mRNA-Seq) kann eine Momentaufnahme der zu diesem Zeitpunkt transkribierten Gene geschaffen werden. Sie eignet sich somit als Blick in die Zellen eines Organismus und erlaubt damit eine Analyse der Genaktivität beispielsweise nach einer Infektion. Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurde durch Dr. rer. nat. Anna Lange, AG Frick bei *G. mellonella* Larven eine systemische Infektion mit *E. coli*, *S. aureus* sowie *C. albicans* durchgeführt und nach 3 h Inkubationszeit die RNA aus den Larven isoliert. Als Negativkontrolle wurde Larven PBS injiziert und die RNA isoliert. Die Durchführung der mRNA-Seq dieser Proben sowie die bioinformatische Aufarbeitung erfolgte durch das Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen. Auf dem daraus resultierenden Datensatz basiert der folgende Teil der Arbeit.

Die Anzahl der regulierten Gene für die jeweilige Versuchsbedingung ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Bei der Versuchsbedingung der *E. coli* Infektion war bei 1.134 Genen eine vermehrte Transkription durch *G. mellonella* messbar (Hochregulation). 1.336 Gene wurden in den *E. coli* stimulierten Larven im Vergleich zu den PBS stimulierten Larven weniger stark transkribiert (Herabregulation). Nach einer Infektion mit *S. aureus* waren 660 Gene hoch- und 657 Gene herunterreguliert. Eine Infektion mit *C. albicans* verursachte lediglich in 209 Fällen eine Hoch- und in 125 Fällen eine Herabregulation. Daher wurde mit den Ergebnissen der beiden Bakterien weitergearbeitet. In dieser Arbeit wurde im weiteren Verlauf außerdem vorrangig auf Gene eingegangen, die hochreguliert waren.

Tabelle 11: Genexpression nach Infektion

Anzahl der regulierten Gene 3 h nach einer systemischen Stimulation von *G. mellonella* Larven mit *C. albicans* (10^2 / Larve), *E. coli* (10^5 / Larve) oder *S. aureus* (10^4 / Larve).

Stimulus	Beschreibung	Hoch-regulation	Herab-regulation	Gesamt
<i>C. albicans</i>	Effekt der <i>C. albicans</i> Infektion	209	125	334
<i>E. coli</i>	Effekt der <i>E. coli</i> Infektion	1.134	1.336	2.470
<i>S. aureus</i>	Effekt der <i>S. aureus</i> Infektion	660	657	1.317

3.1.1 Regulation von Muster-Erkennungs-Rezeptoren nach Infektion

Muster-Erkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors (PRRs)) sind Strukturen, die Oberflächenmerkmale von Mikroorganismen anhand von Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (MAMPs) bzw. Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) erkennen und binden können. In Tabelle 12 sind *G. mellonella* PRRs-Gene aus dem mRNA-Seq Datensatz dargestellt, die 3 h nach der systemischen Infektion reguliert waren. Sieben Peptidoglykan-Erkennungs-Proteine waren hochreguliert, bei einer Isoform wurde dabei allerdings das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht unterschritten. Es wurden insgesamt neun Toll-like Rezeptoren reguliert, wovon drei nur bei der *E. coli* Versuchsbedingung hochreguliert waren, nicht jedoch bei der *S. aureus* Versuchsbedingung. Zwei der Toll-like Rezeptoren waren nach beiden Infektionen vermindert exprimiert. Hemolin war besonders stark hochreguliert. Interessanterweise waren die beiden Beta-1,3-Glucan-Erkennungs-Proteine nur bei *E. coli* infizierten Proben hochreguliert, bei *S. aureus* infizierten Proben fand keine Regulation statt.

Tabelle 12: Regulation Muster-Erkennungs-Rezeptoren

Regulation von Muster-Erkennungs-Rezeptoren 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (10^5 / Larve) bzw. *S. aureus* (10^4 / Larve).

Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	PValue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
Peptidoglykan-Erkennungs-Proteine						
PREDICTED: peptidoglycan recognition protein-like [Amyelois transitella] peptidoglycan recognition protein-like, partial [Galleria mellonella] PREDICTED: peptidoglycan recognition protein-like [Papilio machaon]	9,36	3×10^{-4}	up	4,89	0,006	up
PREDICTED: peptidoglycan recognition protein-like [Amyelois transitella] peptidoglycan recognition protein-like, partial [Galleria mellonella] PREDICTED: peptidoglycan recognition protein-like [Papilio machaon]	6,26	0,0046	up	3,03	0,0687	
uncharacterized protein LOC113515206 [Galleria mellonella] peptidoglycan recognition protein B [Antheraea pernyi] peptidoglycan-recognition protein LB-like [Helicoverpa armigera] uncharacterized protein LOC113515206 [Galleria mellonella] peptidoglycan-recognition protein-S [Galleria mellonella] peptidoglycan-recognition protein-LB, partial [Galleria mellonella] peptidoglycan-recognition protein LB-like [Galleria mellonella]	5,86	10^{-5}	up	3,72	10^{-4}	up
peptidoglycan-recognition protein D [Helicoverpa armigera] peptidoglycan-recognition protein LB-like [Helicoverpa armigera]	5,71	2×10^{-4}	up	3,33	0,0034	up
PREDICTED: peptidoglycan recognition protein-like [Amyelois transitella] peptidoglycan recognition-like protein B, partial [Galleria mellonella] PREDICTED: peptidoglycan recognition protein-like [Papilio machaon]	5,63	10^{-5}	up	1,12	0,0011	up
peptidoglycan-recognition protein SB2-like isoform X3 [Galleria mellonella] peptidoglycan-recognition protein SB2-like isoform X2 [Galleria mellonella] peptidoglycan-recognition protein SB2-like isoform X1 [Galleria mellonella]	5,39	0,0571		4,17	0,1088	
	2,36	4×10^{-5}	up	1,55	8×10^{-4}	up

Tabelle 12, Fortsetzung 1:

Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	PValue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
Hemolin						
hemolin-like [Galleria mellonella] PREDICTED: hemolin-like [Amyeloidis transitella] hemolin [Heliothis virescens] hypothetical protein B5V51_93 [Heliothis virescens]	5,87	2x10 ⁻⁵	up	3,97	3x10 ⁻⁴	up
Toll-like Rezeptoren						
protein toll-like, partial [Galleria mellonella] protein toll-like [Galleria mellonella]	2,46	0,0027	up	0,77	0,2285	
protein toll-like, partial [Galleria mellonella] uncharacterized protein LOC113514683, partial [Galleria mellonella]	2,20	0,002	up	0,85	0,1310	
protein toll-like, partial [Galleria mellonella] toll-like receptor 13, partial [Galleria mellonella]	1,86	0,009	up	1,03	0,1007	
protein toll-like, partial [Galleria mellonella] hypothetical protein evm_013120 [Chilo suppressalis]	1,86	3x10 ⁻⁴	up	1,97	2x10 ⁻⁴	up
uncharacterized protein LOC113509183 [Galleria mellonella] protein toll-like, partial [Galleria mellonella] PREDICTED: protein toll-like [Amyeloidis transitella] hypothetical protein evm_013120 [Chilo suppressalis]	1,38	0,0205	up	1,15	0,0437	up
toll-like receptor 7 [Galleria mellonella] toll-like receptor 7 [Helicoverpa armigera] PREDICTED: slit homolog 2 protein-like [Amyeloidis transitella]	1,34	0,0172	up	1,13	0,0364	up
toll-like receptor 7 [Galleria mellonella] toll-like receptor 7 [Helicoverpa armigera] PREDICTED: slit homolog 2 protein-like [Amyeloidis transitella]	-1,66	0,0036	down	-1,29	0,0137	down
toll-like receptor Tollo [Galleria mellonella] PREDICTED: slit homolog 3 protein [Amyeloidis transitella] toll protein 8 [Leguminivora glycinivorella]	-2,21	0,004	down	-1,49	0,0278	down
uncharacterized protein LOC113514683, partial [Galleria mellonella] protein toll-like, partial [Galleria mellonella] protein toll-like [Galleria mellonella]	1,11	0,1584		3,29	0,0018	up

Tabelle 12, Fortsetzung 2:

Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	PValue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
Beta-1,3-glucan-Erkennungs-Proteine						
hypothetical protein evm_006509 [Chilo suppressalis] beta-1,3-glucan-binding protein-like [Helicoverpa armigera] RecName: Full=Beta-1,3-glucan-binding protein; Short=BGBP; AltName: Full=Beta-1,3-glucan recognition protein; Short=BetaGRP; AltName: Full=Gram negative bacteria-binding protein; Flags: Precursor uncharacterized protein LOC113498223 [Trichoplusia ni]	3,46	10 ⁻⁴	up	0,97	0,0901	
beta-1,3-glucan recognition protein precursor [Galleria mellonella] PREDICTED: beta-1,3-glucan-binding protein-like [Amyelois transitella] hypothetical protein B5V51_2038 [Heliothis virescens]	2,30	3x10 ⁻⁵	up	0,81	0,0247	

3.1.2 Hochregulation Antimikrobieller Peptide nach Infektion

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind ein Bestandteil der humoralen Immunantwort von *G. mellonella*. In Tabelle 13 ist die Regulation von AMPs aufgelistet. Es wurden drei Gloverin Gene reguliert. Eine Isoform wurde bei Infektion mit *E. coli* sowie bei Infektion mit *S. aureus* als deutlich hochreguliert gemessen. Zwei weitere Gloverin-Isoformen zeigten sich nur in der Versuchsbedingung der *E. coli* Infektion hochreguliert. Außerdem wurden zwei Lysozym-Gene reguliert. Die eine Lysozym-Isoform wurde bei beiden Versuchsbedingungen hochreguliert, die weitere Lysozym-Isoform wurden nur in der mit *E. coli* infizierten Gruppe hochreguliert. Weitere in der Literatur beschriebene *G. mellonella* AMPs wie beispielsweise Cecropin, Galiomycin, Gallerimycin oder Moricin konnten 3 h nach der Infektion nicht gemessen werden.

Tabelle 13: Regulation Antimikrobieller Peptide

Regulation der antimikrobiellen Peptide Gloverin und Lysozym 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (10^5 / Larve) bzw. *S. aureus* (10^4 / Larve).

Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	PValue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
Gloverin						
hypothetical protein evm_009769 [Chilo suppressalis] gloverin [Chilo suppressalis] gloverin-like protein [Antheraea mylitta]	8,80	10^{-5}	up	4,40	0,0004	up
gloverin-like [Galleria mellonella] PREDICTED: gloverin-like [Amyelois transitella]	3,56	0,0254	up	0,42	0,7404	
gloverin-like [Galleria mellonella] PREDICTED: gloverin-like [Amyelois transitella]	3,43	0,0247	up	1,10	0,3787	
Lysozym						
lysozyme [Galleria mellonella] RecName: Full=Lysozyme; AltName: Full=1,4-beta-N-acetylmuramidase lysozyme-like [Galleria mellonella]	3,46	0,0106	up	1,30	0,2311	
uncharacterized protein LOC113509430 isoform X2 [Galleria mellonella] lysozyme-like [Trichoplusia ni] uncharacterized protein LOC113499265 [Trichoplusia ni]	1,51	0,0011	up	2,39	4×10^{-5}	up

3.1.3 Hochregulation des Insekten Metalloproteinase-Inhibitor Proteins (IMPI) nach Infektion

Es wurden zwei Transkripte des Induzierbaren Metalloproteinase-Inhibitor Proteins detektiert (Tabelle 14). Beide IMPI Isoformen wurden 3 h nach der Infektion mit *E. coli* sowie nach der Infektion mit *S. aureus* deutlich hochreguliert. Die Regulation fiel dabei in der Gruppe der *E. coli* Infektion stärker aus als in der Gruppe der *S. aureus* Infektion.

Tabelle 14: Regulation IMPI

Regulation des Insekten Metalloproteinase-Inhibitor Proteins 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (10^5 / Larve) bzw. *S. aureus* (10^4 / Larve).

Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	PValue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Galleria mellonella] PREDICTED: venom peptide BmKAPI-like [Amyelois transitella] venom peptide BmKAPI-like [Spodoptera litura]	4,11	4×10^{-6}	up	2,52	2×10^{-4}	up
inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Galleria mellonella] zonadhesin-like [Galleria mellonella] Serine protease inhibitor 28, partial [Operophtera brumata]	4,08	0,001	up	3,05	0,005	up

3.1.4 Regulation des Enzyms Stickoxid-Synthase (NOS) nach Infektion

Vom Enzym Stickoxid-Synthase wurden drei Transkripte detektiert (Tabelle 15). Nach der *E. coli* Infektion waren zwei dieser drei Transkripte signifikant hochreguliert. Nach einer Infektion mit *S. aureus* war ein Transkript signifikant hochreguliert.

Tabelle 15: Regulation NOS

Regulation des Enzyms Stickoxidsynthase (NOS) 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (10⁵/ Larve) bzw. *S. aureus* (10⁴/ Larve).

Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	PValue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
nitric oxide synthase-like isoform X2 [Galleria mellonella]						
nitric oxide synthase-like isoform X1 [Galleria mellonella]	2,12	0,1505		0,64	0,6382	
nitric oxide synthase [Manduca sexta]						
nitric oxide synthase-like isoform X2 [Galleria mellonella]						
nitric oxide synthase-like isoform X1 [Galleria mellonella]	3,69	0,0275	up	-0,70	0,6125	
PREDICTED: nitric oxide synthase-like [Amyelois transitella]						
nitric oxide synthase-like isoform X1 [Galleria mellonella]						
nitric oxide synthase-like isoform X2 [Galleria mellonella]	2,56	0,0027	up	2,45	0,0034	up
nitric oxide synthase [Manduca sexta]						

3.1.5 Hochregulierte Sequenzen unbekannter Funktion

Eine Schwierigkeit der Genexpressionsanalyse mit der mRNA-Seq-Methode ist die Zuordnung der detektierten Sequenzen zu ihrer Funktion im jeweiligen Organismus. Dies gelang bei 323 hochregulierten Sequenzen der mit *E. coli* infizierten Larven sowie bei 213 der mit *S. aureus* infizierten Larven nicht. In der Abbildung 1 ist dargestellt, in welchem logFC-Bereich sich wie viele der unbekannt hochregulierten Gene befinden. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die überwiegende Mehrheit der hochregulierten Gene mit unbekannter Funktion bei beiden Versuchsbedingungen in einem schwach regulierten Bereich mit $\logFC < 2$ befindet. Es ist jedoch auch sichtbar, dass es noch unbekannte Gene gibt, die im Rahmen einer Infektion sehr stark reguliert werden. So konnten beispielsweise in der Versuchsbedingung der *E. coli* Infektion 42 Gene detektiert werden, die um logFC Werte > 5 hochreguliert waren. In der *S. aureus* Versuchsbedingung zeigten sich 18 Gene um logFC Werte > 5 reguliert.

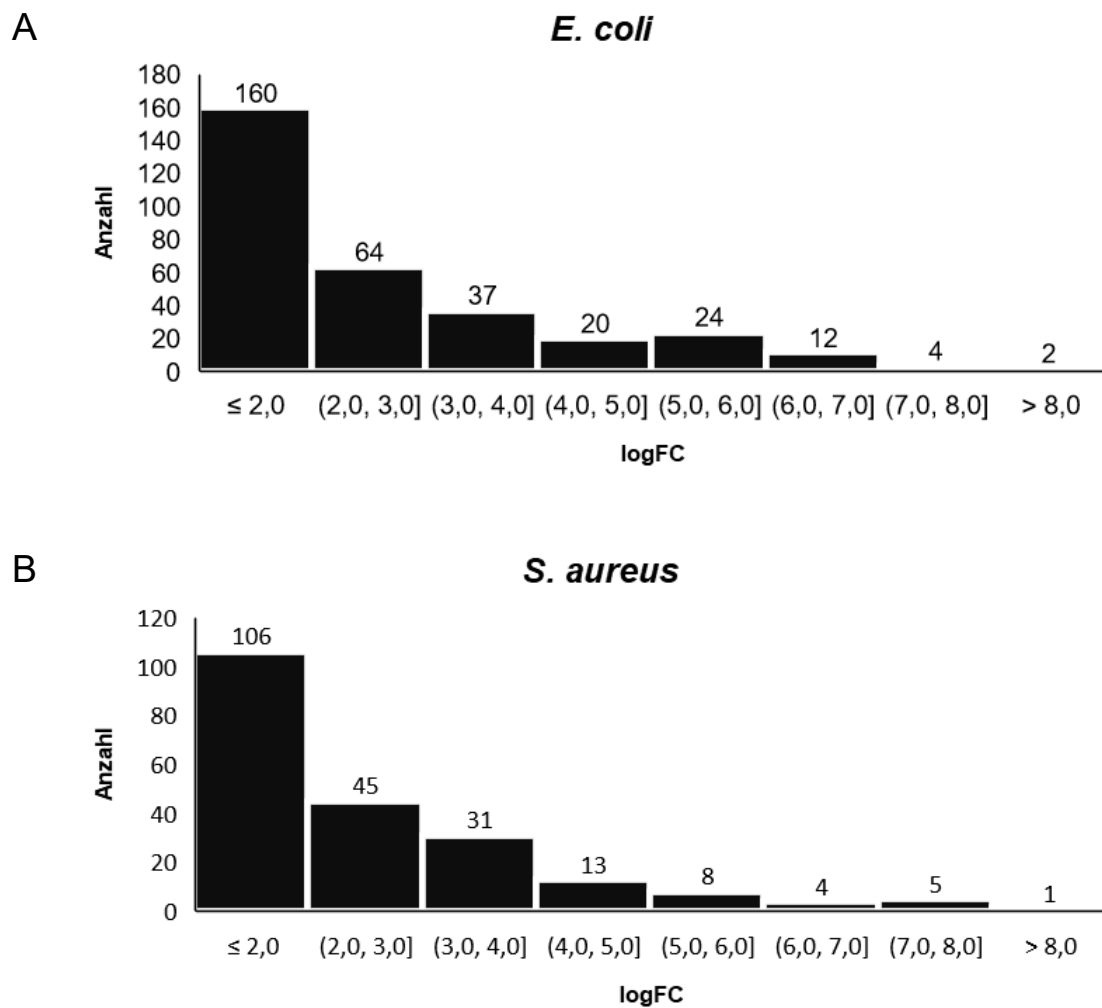


Abbildung 1: Anzahl unbekannter, hochregulierter Gene nach *E. coli* bzw. *S. aureus* Infektion

Die Anzahl der nach systemischer Infektion hochregulierten *G. mellonella* Gene unbekannter Funktion wurden gegenüber dem logFC-Wert aufgetragen. **(A)** Infektion mit *E. coli* (n=323). **(B)** Infektion mit *S. aureus* (n=213).

3.1.6 Ausgewählte Sequenzen zur näheren Untersuchung

Von besonderem Interesse für die Humanmedizin sind die *G. mellonella* Gene, die auch im menschlichen Organismus vorkommen und hier eine Rolle im Immunsystem spielen. Aus diesem Grund wurden in den mRNA-Seq-Daten Gene bestimmt, die eine deutliche Hochregulation nach beiden Infektionen aufwiesen und für die in der Literatur bereits Hinweise auf eine Rolle im humanen oder murinen Immunsystem vorhanden sind.

In Tabelle 16 sind vier *G. mellonella* Transkripte aus dem RNA-Seq Datensatz aufgelistet, deren Regulation nach systemischen Infektionen mittels qRT-PCR weiter untersucht werden soll. Ihnen ist die Hochregulation nach Infektion mit *E. coli* bzw. *S. aureus* sowie die vermutete Rolle im Immunsystem von *G. mellonella*, *M. musculus* und *H. sapiens* gemeinsam. Die Aminosäuresequenzen der Transkripte sind in Tabelle 21 im Anhang zu finden. Durch qRT-PCR Messungen sollen die Zeitpunkte erweitert sowie die Daten durch Infektionen mit weiteren Bakterien ergänzt werden.

Tabelle 16: Zur näheren Untersuchung ausgewählte Sequenzen

Regulation der Gene ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (10^5 / Larve) bzw. *S. aureus* (10^4 / Larve).

Verwendetes Kürzel und Beschreibung	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	logFC	Pvalue	Effekt	logFC	PValue	Effekt
ACER1 alkaline ceramidase isoform X1 [Galleria mellonella] alkaline ceramidase isoform X2 [Galleria mellonella] alkaline ceramidase [Bombyx mori]	7,07	0,0127	up	5,57	0,0342	up
CHI3L1 chitinase-3-like protein 1 [Galleria mellonella] PREDICTED: probable chitinase 2 [Papilio polytes] PREDICTED: probable chitinase 2 [Papilio machaon]	7,30	2×10^{-4}	up	7,29	2×10^{-4}	up
MRC1 macrophage mannose receptor 1-like [Galleria mellonella] PREDICTED: uncharacterized protein LOC105394158 isoform X1 [Plutella xylostella] PREDICTED: uncharacterized protein LOC105394158 isoform X3 [Plutella xylostella]	3,33	6×10^{-4}	up	2,63	0,0024	up
SERPINB1 leukocyte elastase inhibitor-like [Galleria mellonella] PREDICTED: antichymotrypsin-2-like [Amyeloidis transitella] hypothetical protein B5V51_7444 [Heliothis virescens]	3,83	10^{-7}	up	2,46	4×10^{-6}	up

3.1.7 *G. mellonella*, *M. musculus* und *H. sapiens* weisen homologe Proteinsequenzen auf

Um mögliche evolutionäre Beziehungen der vier *G. mellonella* Gene (Tabelle 16) mit *M. musculus* und *H. sapiens* zu ermitteln, wurde ein Sequenzvergleich auf Proteinebene mittels BLASTX durchgeführt (Tabelle 17). Die *G. mellonella* Aminosäuresequenzen stammen aus den DNA-Seq Daten und sind im Anhang zu finden (Tabelle 21). Die Vergleichssequenzen von *M. musculus* und *H. sapiens* stammen aus der Datenbank des NCBI und sind über ihre Kennung (Accession) abrufbar.

Die höchste Übereinstimmung besteht zwischen dem Protein Alkaline-Ceramidase 1 (ACER1) aus *G. mellonella* und Isoformen von ACER von *M. musculus* und *H. sapiens*. Interessanterweise war eine höhere Identität zwischen *G. mellonella* ACER1 und *M. musculus* bzw. *H. sapiens* ACER2 als zwischen *G. mellonella* ACER1 und *M. musculus* bzw. *H. sapiens* ACER1 zu beobachten. Bei einer Sequenzabdeckung (query coverage) von 97% gegenüber der *M. musculus* und 98% gegenüber der *H. sapiens* Sequenz war das *G. mellonella* Protein ACER1 zu 47% identisch mit den *M. musculus* und *H. sapiens* ACER2 Isoformen. Der Erwartungswert (E-value) des Vergleichs von ACER1 aus *G. mellonella* und ACER2 aus *M. musculus* betrug 2×10^{-56} und für den Vergleich mit ACER2 aus *H. sapiens* 6×10^{-59} . Auch die *M. musculus* und *H. sapiens* Isoformen ACER1 und ACER3 erreichten im Vergleich zur *G. mellonella* ACER1-Sequenz E-values $< 10^{-4}$. Somit wurde Homologie zwischen allen untersuchten Sequenzen angenommen.

Das *G. mellonella* Protein Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1) war bei einer Sequenzabdeckung von 67% zu 37% identisch mit CHI3L1 Sequenzen von *M. musculus* bzw. *H. sapiens*. Die E-values betragen dabei 3×10^{-53} für den Vergleich mit CHI3L1 aus *M. musculus* und 7×10^{-56} für den Vergleich mit CHI3L1 aus *H. sapiens*. Die Sequenzen können somit als homolog bezeichnet werden. Zwei weitere *M. musculus* CHI3L1 Isoformen (CHI3L1 Isoform 2; putative Chitinase precursor) und eine weitere *H. sapiens* CHI3L1 Isoform (CHI3L2) wiesen Vergleichswerte in ähnlichen Bereichen auf und sind damit ebenfalls als homolog anzusehen.

Es waren drei Isoformen des *G. mellonella* Proteins Makrophagen-Mannose-Rezeptor 1 nach der Infektion mit *E. coli* bzw. *S. aureus* reguliert (1 MRC1, 2 MRC1, 3 MRC1). Das Protein 1 MRC1 war bei einer Sequenzabdeckung von 72% zu 40% identisch mit *M. musculus* MRC1 und zu 41% identisch mit *H. sapiens* MRC1 messbar. Die E-Werte lagen bei 4×10^{-10} für den Vergleich mit *M. musculus* MRC1 und bei 3×10^{-10} für den Vergleich mit *H. sapiens* MRC1. Die Sequenzen sind demnach homolog. Außerdem ist eine weitere *M. musculus* Isoform (CD209 antigen-like Protein E) als homolog zu *G. mellonella* MRC1 anzunehmen. Für die zweite *G. mellonella* Isoform konnten keine homologen Sequenzen in *M. musculus* bzw. *H. sapiens* gefunden werden. Für das *G. mellonella* Protein 3 MRC1 konnten je zwei homologe *M. musculus* und *H. sapiens* Sequenzen bestimmt werden. Allerdings zeigte sich die Homologie in diesem Fall nicht so stark ausgeprägt wie zwischen der *G. mellonella* 1 MRC1 Sequenz und den *M. musculus* und *H. sapiens* MRC1 Isoformen.

Das *G. mellonella* Protein Leukozyten-Elastase-Inhibitor (SERPINB1) war bei einer Sequenzabdeckung von 52% zu 32% identisch mit der *M. musculus* Sequenz (Serin protease Inhibitor) und zu 30% identisch mit den beiden *H. sapiens* Sequenzen (squamous cell carcinoma antigen 1 bzw. Leucocyte elastase inhibitor). Die E-values betragen 8×10^{-33} für den Vergleich mit dem *M. musculus* Protein und 8×10^{-31} bzw. 3×10^{-30} für den Vergleich mit den *H. sapiens* Proteinen. Es kann also Homologie zwischen den Sequenzen von *G. mellonella*, *M. musculus* und *H. sapiens* angenommen werden.

Anschließend wurde ein MAFFT Protein Alignment der Sequenzen durchgeführt, das am Beispiel von ACER in Abbildung 2 dargestellt ist. Die Darstellung erfolgte mit der Anwendung Unipro UGENE. Die *G. mellonella* Sequenzen sind im Anhang zu finden (Tabelle 21), die *M. musculus* und *H. sapiens* entsprechen den Sequenzen aus Tabelle 17. Hydrophobe Aminosäuren wurden rot, hydrophile Aminosäuren blau gefärbt. Die Übereinstimmungen, die schon in der BLASTX Analyse zu sehen waren, sind hier nochmals deutlicher sichtbar. In Abschnitten, in denen die Aminosäuren nicht übereinstimmen und daher bei der BLASTX Analyse nicht als gleich gewertet werden, besteht oftmals trotzdem eine deutliche Ähnlichkeit in der Polarität und Struktur der einzelnen Aminosäuren.

Tabelle 17: Homologie-Analyse von *G. mellonella*, *M. musculus* und *H. sapiens* Sequenzen
 Vergleich von *G. mellonella* Proteinsequenzen mit Sequenzen von *M. musculus* und *H. sapiens*.
 Die *G. mellonella* Sequenzen aus der Sequenzierung befinden sich im Anhang (Tabelle 21), die
 Vergleichssequenzen stammen aus der Datenbank des NCBI. Durchführung des Vergleichs mit
 der Anwendung BLASTX. Die mit einem Stern (*) markierten *G. mellonella* Transkripte wurden
 anschließend nicht weiter in der qRT-PCR untersucht.

<i>G. mellonella</i>	<i>Mus musculus</i>						<i>Homo sapiens</i>					
	Transkript	BLAST Treffer	Kürzel	Accession	Identity	Query coverage	E value	BLAST Treffer	Kürzel	Accession	Identity	Query coverage
ACER1	Alkaline ceramidase 2	ACER2 Mm	NP_647467.1	47%	97%	2E-56	Alkaline ceramidase 2	ACER2 Hs	XP_006251505.1	47%	98%	6E-59
	Alkaline ceramidase 1	ACER1 Mm	NP_783858.1	34%	97%	5E-41	Alkaline ceramidase 1	ACER1 Hs	NP_597999.1	38%	97%	4E-43
	Alkaline ceramidase 3	ACER3 Mm	EDL38214.1	34%	97%	5E-41						
CHI3L1	Chitinase-3-like protein 1 isoform 1	1 CHI3L1 Mm	NP_031721.2	35%	67%	3E-53	Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1 Hs	AAH838354.1	37%	67%	7E-56
	Chitinase-3-like protein 1 isoform 2	2 CHI3L1 Mm	NP_001361555.1	35%	67%	3E-53	Chitinase-3-like protein 2	CHI3L2 Hs	NP_003991.2	36%	72%	2E-55
	Putative chitinase precursor	3 CHI3L1 Mm	AAF31644.1	40%	71%	8E-67						
1 MRC1	Macrophage mannose receptor 1	1 MRC1 Mm	NP_032651.2	40%	72%	4E-10	Macrophage mannose receptor 1	1 MRC1 Hs	NP_002429.1	41%	72%	3E-10
2 MRC1*	CD209 antigen-like protein E	2 MRC1 Mm	NP_570975.1	39%	66%	6E-10						
3 MRC1*	Collectin-10 isoform X1	3 MRC1 Mm	XP_011243917.1	33%	53%	3E-05	COLEC10	2 MRC1 Hs	AAQ89397.1	30%	74%	6E-05
	Collectin-11 isoform X1	4 MRC1 Mm	XP_006515284.1	29%	76%	4E-04	Chain A, Pulmonary Surfactant-associated Protein D	3 MRC1 Hs	PDB:4M17_A	44%	36%	5E-05
SERPINB1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor	1 SERPIN Mm	NP_035590.1	32%	52%	8E-33	Squamous cell carcinoma antigen 1	1 SERPIN Hs	AAO92272.1	30%	52%	8E-31
							Leukocyte elastase inhibitor	2 SERPIN Hs	NP_109591.1	30%	56%	3E-30

3.2 Charakterisierung von systemischen *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infektionen in *Galleria mellonella*

Für die mRNA-Seq wurde zur systemischen Infektion von *G. mellonella* Larven lediglich je ein Referenzstamm von *E. coli* und *S. aureus* verwendet. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die mRNA-Expression der ausgewählten Gene auch durch die Infektion mit weiteren Bakterien reguliert wird. Hierfür wurden je ein *S. Typhimurium* und *P. aeruginosa* Stamm für die Versuche ausgewählt. Um eine geeignete Infektionsdosis zu ermitteln, wurden zunächst Überlebenszeitanalysen von *G. mellonella* während einer systemischen Infektion mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* durchgeführt.

3.2.1 Eine systemische Infektion mit *P. aeruginosa* ist für *G. mellonella* letaler als eine systemische Infektion mit *S. Typhimurium*

Eine für die Fragestellung optimale systemische Infektionsdosis stellt die Dosis dar, bei der eine Immunantwort von *G. mellonella* hervorgerufen wird, es jedoch nicht zu schnell zum Versterben der Tiere kommt. Um eine optimale Infektionsdosis von *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* zu bestimmen, wurden Larven mit verschiedenen Bakteriendosen infiziert und einer Kontrollgruppe PBS injiziert. Die Tiere wurden anschließend bei 37 °C und Dunkelheit inkubiert und über fünf Tage beobachtet (Abbildung 3).

Eine systemische Infektion mit *P. aeruginosa* führte bei einer Infektionsdosis von 50 und 25 Bakterien pro Larve zum Versterben aller Larven bis zum zweiten Beobachtungstag. Die Infektionsdosis 10 Bakterien pro Larve führte in 96 % der Fälle zum Versterben der Larven innerhalb des Beobachtungszeitraums. Lediglich Larven mit der kleinsten Infektionsdosis, 5 Bakterien pro Larve, konnten die Infektion längerfristig überstehen, am Ende des Beobachtungszeitraums von 5 Tagen waren noch 33 % der Larven am Leben (Abbildung 3A; Tabelle 18). Somit wurde die Infektionsdosis 5 *P. aeruginosa* pro Larve (5×10^2 / mL) für die nachfolgenden Versuche mit systemischen *P. aeruginosa* Infektionen festgelegt.

Die systemische Infektion mit *S. Typhimurium* führte im Vergleich zur Infektion mit *P. aeruginosa* erst bei deutlich höheren Infektionsdosen zum Versterben der Larven. Bei einer Infektionsdosis von 10^6 Bakterien pro Larve verstarben alle Larven spätestens am 2. Beobachtungstag. Bei einer Infektionsdosis von 10^5 pro Larve überlebten 8 % der Larven den gesamten Beobachtungszeitraum von 5 Tagen. Eine Infektionsdosis von 10^4 Bakterien überlebten 75 % der Larven. Alle Larven, die mit Keimzahlen von 10^3 sowie 10^2 Bakterien pro Larve infiziert wurden, überlebten die Infektion (Abbildung 3B; Tabelle 18). Die Infektionsdosis 10^3 *S. Typhimurium* pro Larve (10^5 /mL) wurde für die weiteren Versuche mit systemischen *S. Typhimurium* Infektionen festgelegt.

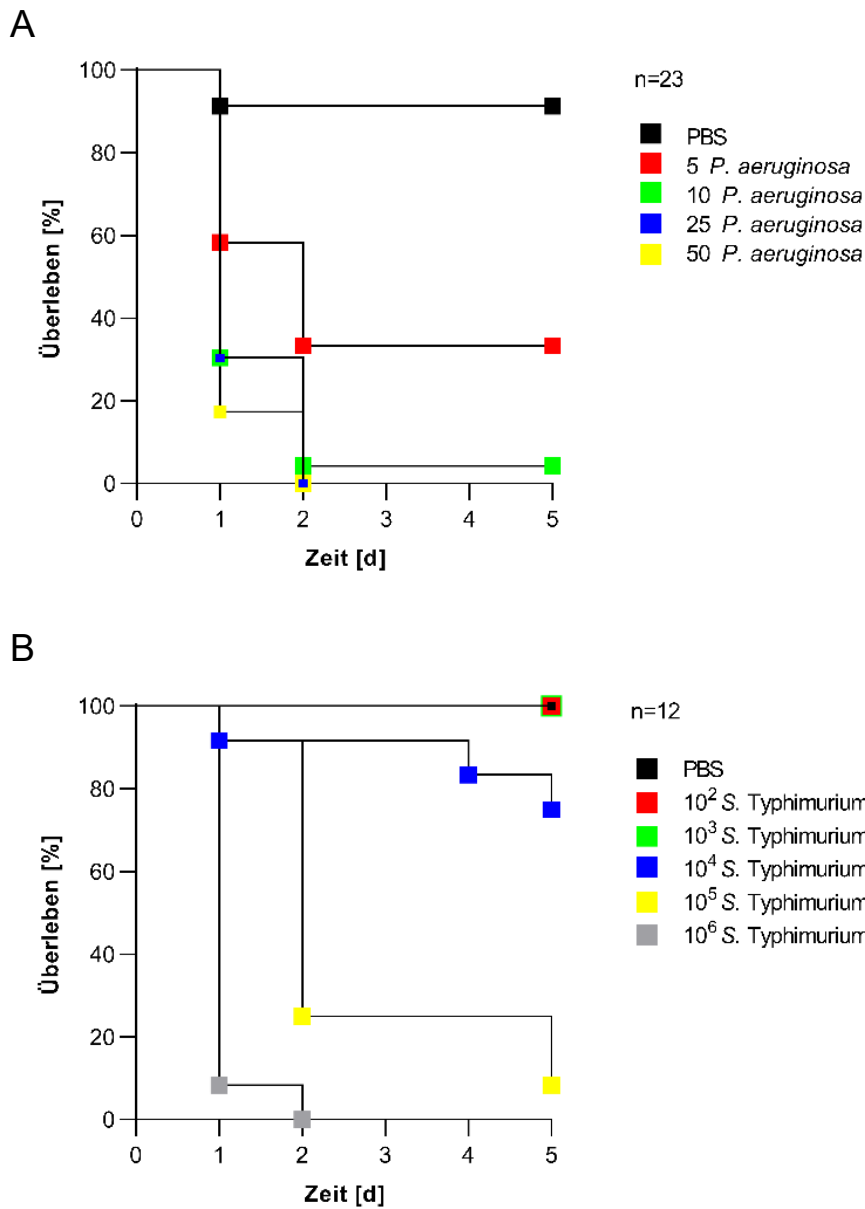


Abbildung 3: Überlebenskurven von *G. mellonella* nach systemischer Infektion mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium*

Infektion von *G. mellonella* Larven mit 10 μ L einer Bakterien-enthaltenden PBS-Lösung verschiedener Keimzahlen. Inkubation bei 37° C und Dunkelheit über 5 Tage und tägliche Kontrolle auf Lebendigkeit. **(A)** Injektion von 10 μ L PBS bzw. *P. aeruginosa* in den Infektionsdosen 5/ Larve, 10/ Larve, 25/ Larve und 50/ Larve (n=23; 5/ Larve: n=24). **(B)** Injektion von 10 μ L PBS bzw. *S. Typhimurium* in den in den Infektionsdosen 10^2 / Larve, 10^3 / Larve, 10^4 / Larve, 10^5 / Larve und 10^6 / Larve (n=12).

Tabelle 18: Anteile der am Ende des Beobachtungszeitraums lebenden Larven

Die Anzahl sowie der prozentuale Anteil an Larven, die die systemische Infektion mit *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* über 5 Tage überlebt haben, ist in dieser Tabelle dargestellt. Die Larven wurden im Beobachtungszeitraum einmal täglich auf Lebendigkeit überprüft.

Infektionsdosis	Überlebende Larven		Infektionsdosis	Überlebende Larven	
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil
5 <i>P. a.</i> (n=24)	8	33,3 %	10 ² <i>S. T.</i> (n=12)	12	100 %
10 <i>P. a.</i> (n=23)	1	4,3 %	10 ³ <i>S. T.</i> (n=12)	12	100 %
25 <i>P. a.</i> (n=23)	0	0%	10 ⁴ <i>S. T.</i> (n=12)	9	75 %
50 <i>P. a.</i> (n=23)	0	0%	10 ⁵ <i>S. T.</i> (n=12)	1	8,3 %
			10 ⁶ <i>S. T.</i> (n=12)	0	0%
PBS (n=23)	21	91,3 %	PBS (n=12)	12	100 %

3.2.2 *G. mellonella* eliminiert *S. Typhimurium* nach Infektion aus der Hämolymphe, *P. aeruginosa* kann persistieren

Dieser Versuch sollte die Frage beantworten, ob *G. mellonella* dazu in der Lage sind, die *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* Bakterien nach einer systemischen Infektion aus der Hämolymphe zu beseitigen. Daher wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) aus der Hämolymphe im Zeitverlauf bestimmt.

Hierzu wurden Larven systemisch mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* infiziert und nach der jeweiligen Inkubationszeit Hämolymphe entnommen. Diese wurde auf Columbia-Blutagar ausplattiert und die nach 24 h darauf gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die systemische Infektion mit *P. aeruginosa* (Abbildung 4A; Tabelle 19) führte zu einem Anstieg der KbE ab einer Inkubationszeit von 4 h. Ein Maximum wurde nach 6 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei neun Larven eine sehr hohe Anzahl an KbE ausgezählt werden, bei vier Larven waren keine KbE messbar. Eine Larve war zum Zeitpunkt 6 h bereits verstorben. Nach 24 h waren lediglich noch drei Larven lebendig, von denen keine KbE *P. aeruginosa* auszählbar waren. Diese drei Larven, die die Infektion über 24 h überlebt haben, zeigten deutliche Krankheitsanzeichen wie eine Melanisierung der Haut sowie eine reduzierte Beweglichkeit.

Die systemische Infektion mit *S. Typhimurium* (Abbildung 4B; Tabelle 19) führte ab dem Zeitpunkt 2 h bei allen Larven zu einem messbaren Anstieg der KbE aus der Hämolymphe. Der Anzahl der KbE stieg im Vergleich zu der Infektion mit *P. aeruginosa* (Abbildung 4A) im Zeitverlauf deutlich früher an. Während bei der *P. aeruginosa* Infektion der Anstieg der KbE erst zum Zeitpunkt 4 h begann, wurde bei der *S. Typhimurium* Infektion zum Zeitpunkt 4 h bereits ein Maximum erreicht. Nach 6 h sowie 24 h waren kaum mehr KbE in der Hämolymphe nachzuweisen. An allen sechs Zeitpunkten waren alle Larven, die mit *S. Typhimurium* infiziert wurden, lebendig und zeigten keine Anzeichen einer Melanisierung der Haut.

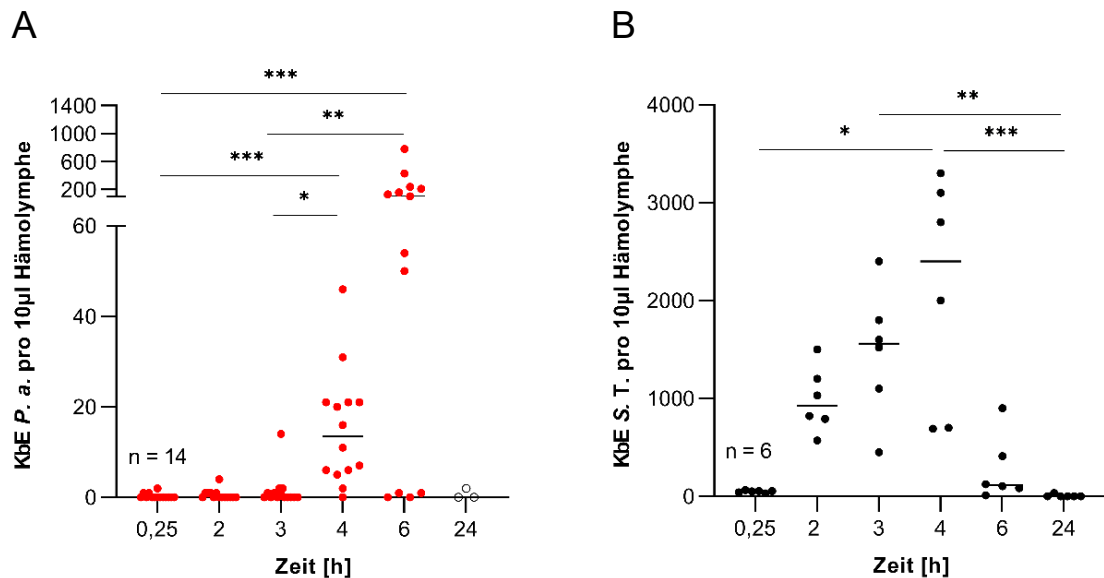


Abbildung 4: Koloniebildende Einheiten (KbE) aus *G. mellonella* Hämolymphe

G. mellonella Larven wurden systemisch mit *P. aeruginosa* (5/ Larve; n=14) oder *S. Typhimurium* (10^3 / Larve; n=6) infiziert. Nach Inkubation der Larven bei 37 °C (0,25, 2, 3, 4, 6, 24 h) wurden 10 µL Hämolymphe bauchseitig entnommen, auf Columbia-Blutagar ausplattiert und 24 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Zählung der Kolonien nach 24 h. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test (* p = <0,05, ** p = <0,01, *** p = <0,001). **(A)** Infektion mit *P. aeruginosa*. Nach 24 h konnte lediglich bei drei Larven eine Abnahme erfolgen (leere Kreise). **(B)** Infektion mit *S. Typhimurium*.

Tabelle 19: Anzahl der überlebenden Larven nach *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* Infektion vor der Hämolympf-Abnahme und dem anschließenden Ausplattieren

In dieser Tabelle ist aufgetragen, wie viele Tiere zum Zeitpunkt der Hämolympf-Abnahme lebendig waren. Hämolymphe wurde nur von lebendigen Tieren abgenommen.

Überlebende Larven <i>P. a.</i> (n=14)			Überlebende Larven <i>S. T.</i> (n=6)		
Zeit [h]	Anzahl	Anteil	Zeit [h]	Anzahl	Anteil
0,25	14	100 %	0,25	6	100 %
2	14	100 %	2	6	100 %
3	14	100 %	3	6	100 %
4	14	100 %	4	6	100 %
6	13	92,9 %	6	6	100 %
24	3	21,4 %	24	6	100 %

3.2.3 Systemische Infektion von *G. mellonella* resultiert in einer erhöhten Hämozytenzellzahl in der Hämolymphe

Bei einer systemischen Infektion von *G. mellonella* kommen die Hämozytenzellen der Larve räumlich direkt mit dem Pathogen in Kontakt. In diesem Versuch sollte der Frage, ob sich eine systemische Infektion auf die Zellzahl in der Hämolymphe auswirkt, nachgegangen werden.

Um eine mögliche Veränderung der Zellzahl in Reaktion auf eine Infektion messen zu können, wurde *G. mellonella* Larven nach systemischer Stimulation mit PBS, *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium*, sowie Larven gänzlich ohne Stimulation (nativ), Hämolymphe bauchseitig entnommen. Unter dem Lichtmikroskop wurde die enthaltene Zellzahl ausgezählt. Dabei wurden alle sichtbaren und runden Zellen gewertet und nicht zwischen der Art der Zelle unterschieden. Entrundete oder offensichtlich defekte Zellen wurden nicht mitgezählt.

Die Hämozytenzahl war zum Zeitpunkt 2 h bei allen systemischen Stimulationen im Vergleich zu den nativen Larven auf rund das Doppelte erhöht (Abbildung 5). Dabei war es nicht von Bedeutung, ob die Injektionslösung Bakterien enthielt, oder es sich lediglich um PBS-Lösung handelte. Zwischen der Anzahl der Hämozyten nativer Larven und PBS-injizierter Larven sowie zwischen nativen Larven und der *P. aeruginosa* Infektion war diese Differenz am Zeitpunkt 2 h

signifikant. Während sich die Zellzahl der mit PBS stimulierten Larven nach 24 h wieder der Zellzahl der nativen Larven annäherte, blieb die Zellzahl der mit *S. Typhimurium* infizierten Larven auf konstant hohem Niveau. Die Zellzahl der Larven, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, sank nach einem Maximum bei 2 h ab. Ein 24 h Wert der *P. aeruginosa* Infektion konnte nur von drei Larven (n=10) bestimmt werden, da die weiteren 7 Larven nach 24 h bereits verstorben waren (Tabelle 20). Die Hämozytenzahl in der Hämolymphe dieser drei Larven war im Vergleich zu den anderen Messergebnissen stark erniedrigt und lag auch deutlich unter dem Niveau der nativen Larven. Zum Zeitpunkt 24 h bestanden signifikante Unterschiede in der Zellzahl von *P. aeruginosa* infizierten Larven im Vergleich zu PBS-injizierten Larven sowie im Vergleich zu *S. Typhimurium* infizierten Larven. Außerdem zeigten diese drei Larven am Zeitpunkt 24 h deutliche Krankheitsanzeichen wie eine Melanisierung der Haut und eine verminderte Beweglichkeit.

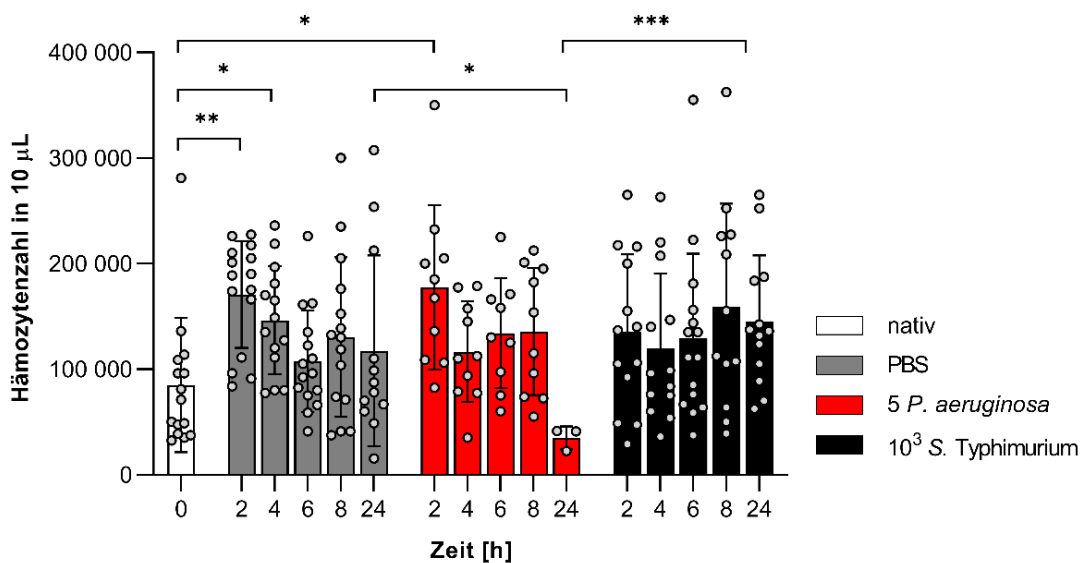


Abbildung 5: Hämozytenzahl aus *G. mellonella* Hämolymphe nach systemischer Infektion
G. mellonella Larven wurden systemisch 10 µL PBS (n=15), *P. aeruginosa* (5/ Larve; n=10) oder *S. Typhimurium* (10³/ Larve; n=15) injiziert. Nach Inkubation bei 37 °C wurden 10 µL Hämolymphe bauchseitig entnommen. Larven ohne Injektion (nativ) wurde lediglich 10 µL Hämolymphe entnommen. Die enthaltenen Hämozyten wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Von den mit *P. aeruginosa* infizierten Larven waren nach 24 h nur noch drei Larven lebendig, bei den restlichen 7 Larven konnte demnach keine Abnahme erfolgen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Test (*p= <0,05, **p=<0,01, ***p=<0,001).

Tabelle 20: Probenanzahl Hämozyten Auszählung

In dieser Tabelle ist aufgetragen, von wie vielen Tieren eine Hämolymp-Abnahme erfolgreich durchgeführt werden und somit eine Zellzahl bestimmt werden konnte. Hämolymphe wurde nur von lebendigen Tieren abgenommen. Die nativen Larven sind nicht aufgeführt, da diese nicht stimuliert wurden.

Zeit	PBS (n=15)		5 <i>P. aeruginosa</i> (n=10)		10 ³ <i>S. Typhimurium</i> (n=15)	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
2 h	15	100 %	10	100 %	13	86,7 %
4 h	14	93,3 %	10	100 %	13	86,7 %
6 h	15	100 %	9	90 %	15	100 %
8 h	15	100 %	10	100 %	12	80 %
24 h	12	80 %	3	30 %	13	86,7 %

3.3 Wirkung systemischer Infektionen auf die Expression infektionsspezifischer Gene von *Galleria mellonella*

Nach der Durchführung und Auswertung der mRNA-Seq Daten und der Charakterisierung systemischer *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* Infektionen von *G. mellonella* sollte in diesem dritten Schritt die Genexpression der Larven mittels quantitativer qRT-PCR untersucht werden. Ziel war es, die gewonnenen Daten mit einer weiteren Methode zu validieren und zu erweitern.

Für die Messungen der *E. coli* bzw. *S. aureus* Versuchsbedingung in der qRT-PCR wurden dieselben Proben wie bei der mRNA-Seq Analyse verwendet. Die Versuchsbedingungen, unter denen die Proben entstanden sind, sind somit identisch und damit die Ergebnisse der beiden Methoden vergleichbar. Zusätzlich wurden weitere Larven mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* infiziert und die Genexpression dieser Proben im Vergleich zu PBS-stimulierten Proben mittels qRT-PCR an vier Zeitpunkten gemessen.

3.3.1 *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* induzieren eine vermehrte Expression von Cecropin und IMPI in *G. mellonella*

Die Auswirkung einer systemischen Infektion mit *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* auf die Genexpression von *G. mellonella* sollte per qRT-PCR bestimmt werden. Zunächst wurde der mRNA-Gehalt bereits bekannter Infektionsmarker gemessen, um zum einen die erfolgreiche Stimulation der Larven und die Funktion der Methode zu überprüfen und um zum anderen die Wirkung der vier Infektionen auf die Larven miteinander vergleichen zu können. Dazu wurde via qRT-PCR der Cecropin, IMPI, GST sowie NOS mRNA-Gehalt der Proben im Vergleich zu PBS stimulierten Negativkontrolle (Mock Probe) bestimmt. Durch die Normierung der Messwerte auf die Mock-Proben können Stressreaktionen, die neben der Infektion durch die Versuchsbedingungen in den Tieren entstehen, vernachlässigt werden.

Alle vier untersuchten Bakterienstämme induzierten eine Hochregulation der mRNA-Expression von Cecropin und IMPI in *G. mellonella* (Abbildung 6). Die Induktion von Cecropin war bei einer Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* signifikant stärker als bei einer Infektion mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* (Abbildung 6A). Auch die mRNA-Expression von IMPI wurde tendenziell stärker durch eine Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* als durch eine Infektion mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* beeinflusst (Abbildung 6B).

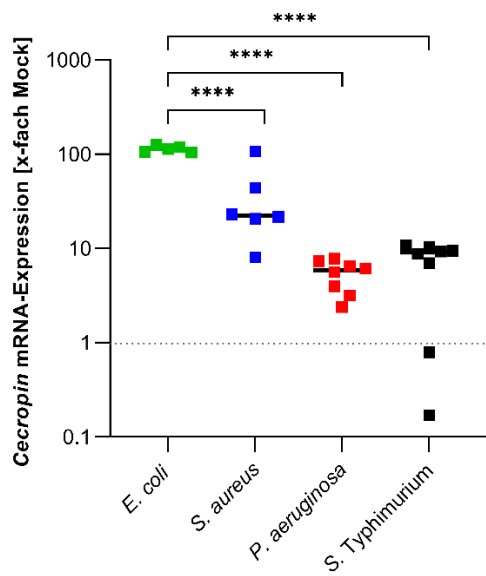
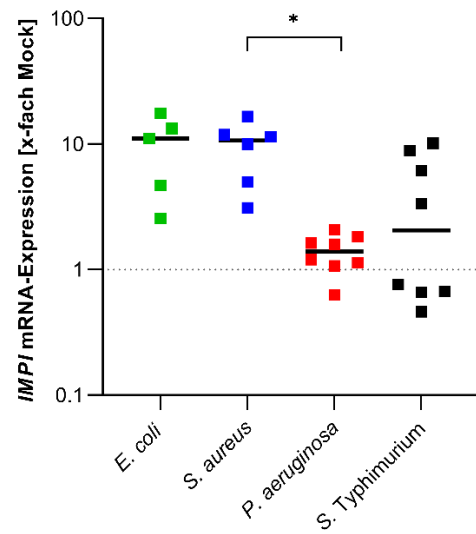
A**B**

Abbildung 6: mRNA-Expression immunrelevanter Proteine

Die Messung der mRNA-Expression erfolgte 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (n=5; 10⁵/ Larve), *S. aureus* (n=6; 10⁴/ Larve), *P. aeruginosa* (n=8; 5/ Larve) oder *S. Typhimurium* (n=8; 10³/ Larve). Die Ergebnisse wurden auf PBS-injizierte *G. mellonella* Larven (Mock) normiert. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Brown-Forsythe ANOVA Test mit Wells-Korrektur (**p* = <0,05, *****p* = <0,0001). **(A)** qRT-PCR Messung der mRNA-Expression von Cecropin. **(B)** qRT-PCR Messung der mRNA-Expression von IMPI.

Keine der vier untersuchten Infektionen (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium*) rief in *G. mellonella* eine Hochregulation der mRNA-Expression von GST hervor (Abbildung 7A). Die GST mRNA-Expression der mit *E. coli* infizierten Larven war als herabreguliert und signifikant kleiner gegenüber der GST mRNA-Expression bei der *S. Typhimurium* Infektion zu messen.

Eine Induktion der NOS mRNA-Expression war lediglich bei mit *E. coli* oder *S. aureus* infizierten Proben messbar (Abbildung 7B). Bei den Larven, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, war die NOS mRNA-Expression herabreguliert. Die NOS mRNA-Expression, der mit *S. Typhimurium* infizierten Larven, wurde nicht reguliert.

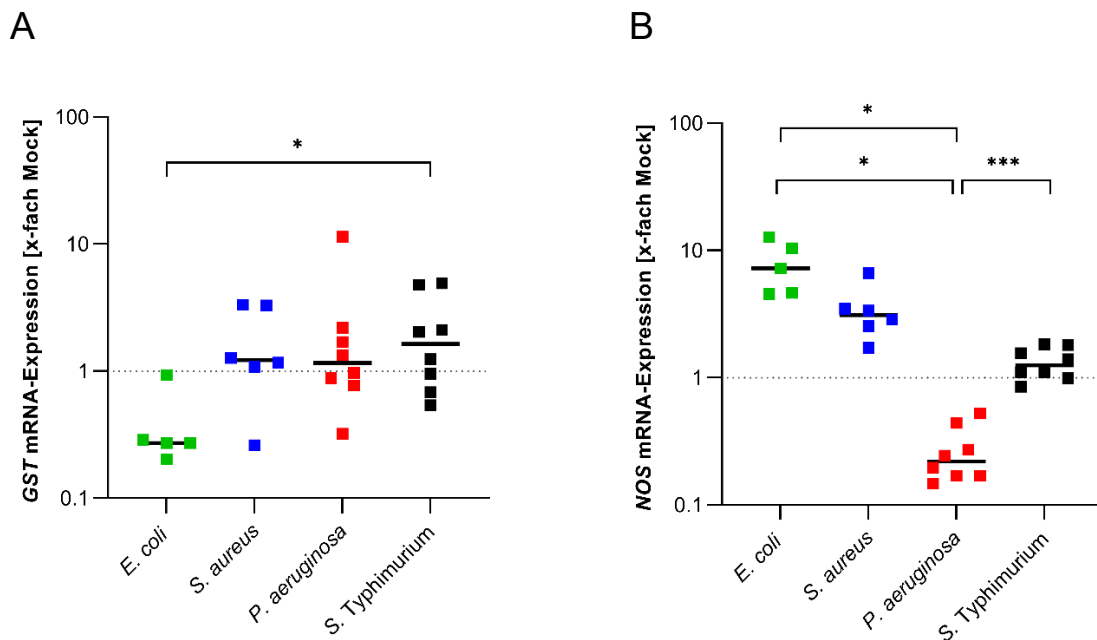


Abbildung 7: mRNA-Expression stressinduzierter Proteine

Die Messung der mRNA-Expression erfolgte 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (n=5; 10⁵/ Larve), *S. aureus* (n=6; 10⁴/ Larve), *P. aeruginosa* (n=8; 5/ Larve) oder *S. Typhimurium* (n=8; 10³/ Larve). Die Ergebnisse wurden auf PBS-injizierte *G. mellonella* (Mock) normiert. **(A)** qRT-PCR Messung der mRNA-Expression von GST. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Kruskal-Wallis Test (**p*<0,05). **(B)** qRT-PCR Messung der mRNA-Expression von NOS. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Brown-Forsythe ANOVA Test mit Wells Korrektur (**p*<0,05, ****p*<0,001).

3.3.2 Anstieg der MRC1 und SERPINB1 mRNA-Expression in

G. mellonella nach allen untersuchten bakteriellen Infektionen

Nach der Messung der Genexpression von Cecropin, IMPI, GST und NOS nach Infektion in Versuch 3.3.1, sollte in diesem Versuch der Frage nachgegangen werden, ob die Hochregulation der aus dem mRNA-Seq Datensatz ausgewählten Gene ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 (Tabelle 16) auch in qRT-PCR Messungen nachweisbar ist (Abbildung 8).

Die ACER1 mRNA-Expression von *G. mellonella* war 3 h nach einer systemischen Infektion mit *P. aeruginosa* erhöht (Abbildung 8A). Nicht reguliert war die mRNA-Expression von ACER1 3 h nach einer *E. coli* oder *S. aureus* Infektion. Nach einer Infektion mit *S. Typhimurium* war die mRNA-Expression von ACER1 erniedrigt.

Die CHI3L1 mRNA-Expression war 3 h nach einer systemischen Infektion mit *P. aeruginosa* hochreguliert (Abbildung 8B). Nicht reguliert wurde CHI3L1 3 h nach einer *E. coli*, *S. aureus* oder *S. Typhimurium* Infektion.

Die MRC1 mRNA-Expression von *G. mellonella* wurde durch alle vier untersuchten Infektionen induziert (Abbildung 8C).

SERPINB1 wurde am stärksten reguliert, eine Hochregulation war dabei bei allen vier untersuchten bakteriellen Infektionen (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium*) messbar (Abbildung 8D). Die höchste mRNA-Expression wurde bei der Versuchsbedingung der *S. Typhimurium* Infektion gemessen.

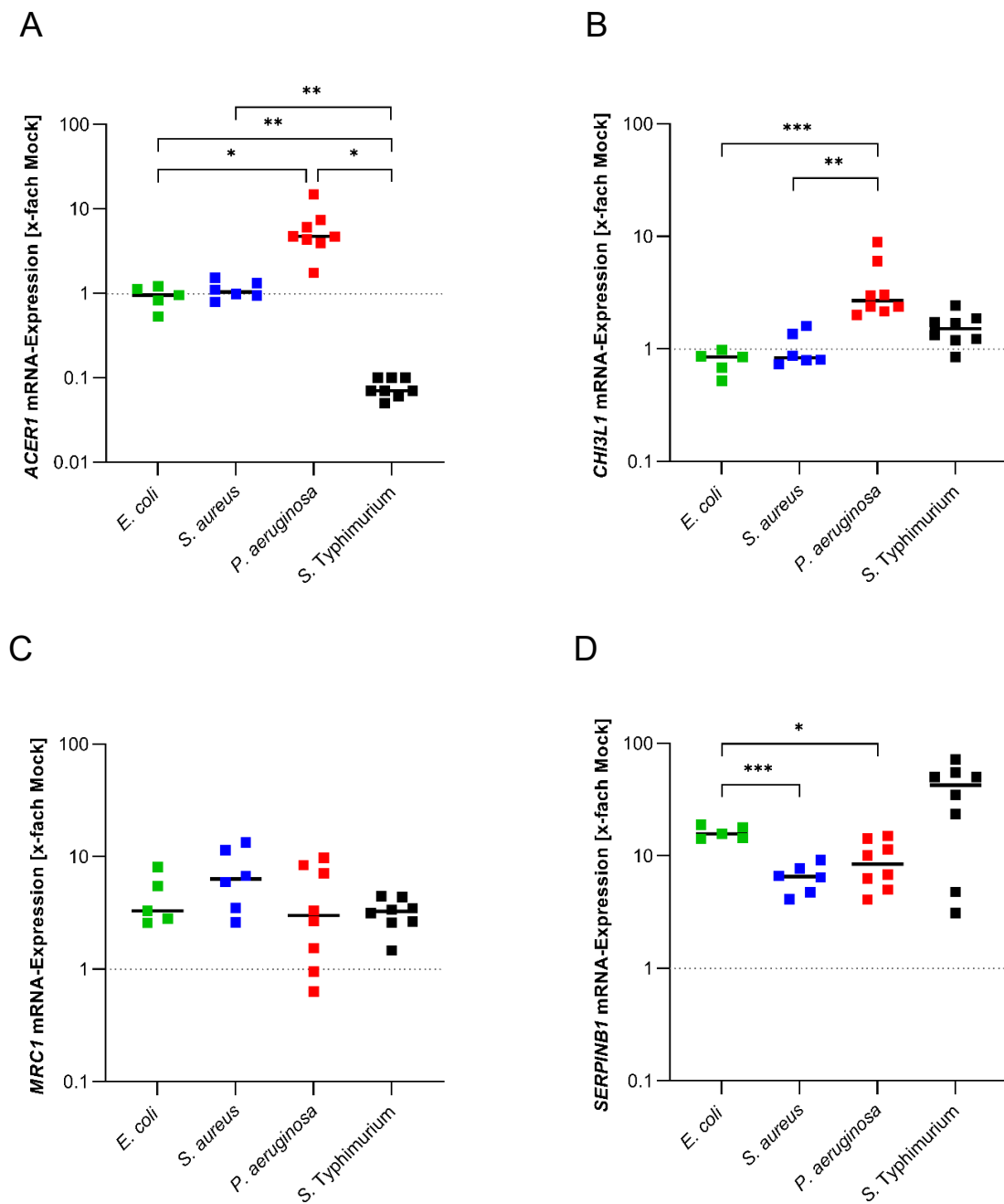


Abbildung 8: mRNA-Expression von ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1

Die Messung der mRNA-Expression via qRT-PCR erfolgte 3 h nach systemischer Infektion von *G. mellonella* Larven mit *E. coli* (n=5; 10⁵/ Larve), *S. aureus* (n=6; 10⁴/ Larve), *P. aeruginosa* (n=8; 5/ Larve) oder *S. Typhimurium* (n=8; 10³/ Larve). Die Ergebnisse wurden auf PBS-injizierte *G. mellonella* (Mock) normiert. **(A)** mRNA-Expression von Alkaline Ceramidase 1 (ACER1). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Brown-Forsythe ANOVA Test mit Wells Korrektur (**p*<0,05, ***p*<0,01). **(B)** mRNA-Expression von Chitinase-3-like-Protein 1 (CHI3L1). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Brown-Forsythe ANOVA Test mit Wells Korrektur (***p*<0,01, ****p*<0,001). **(C)** mRNA-Expression von Makrophagen-Mannose-Rezeptor 1 (MRC1). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Kruskal-Wallis Test, es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. **(D)** mRNA-Expression von Leukozyten-Elastase-Inhibitor (SERPINB1). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Brown-Forsythe ANOVA Test mit Wells Korrektur (**p*<0,05, ****p*<0,001).

3.3.3 *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* induzieren im Zeitverlauf ansteigende RNA-Expressionslevel von Cecropin und IMPI

Um den Verlauf der mRNA-Expression nach einer systemischen Infektion genauer beurteilen zu können, wurden die Messungen der schon in 3.3.1 bestimmten Gene durch Messungen an weiteren Zeitpunkten erweitert. Hierdurch können außerdem die Einflüsse der Infektionen mit *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* auf die Genexpression von *G. mellonella* besser miteinander verglichen werden. Die Bestimmung des mRNA-Gehalts der Proben erfolgte an vier Zeitpunkten in einem Zeitraum von insgesamt sechs Stunden nach einer systemischen Infektion mit *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium*.

In den mit *P. aeruginosa* bzw. mit *S. Typhimurium* infizierten *G. mellonella* war eine vermehrte mRNA-Expression von Cecropin und von IMPI messbar. Umso länger die Larve dem Stimulus ausgesetzt war (Inkubationszeit), desto stärker wurden Cecropin und IMPI exprimiert (Abbildung 9). Die Cecropin mRNA-Expression war bereits nach 2 h erhöht, stieg weiter bis zum Zeitpunkt 4 h und anschließend nur noch leicht bis zum Zeitpunkt 6 h (Abbildung 9A). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von Cecropin im Verlauf zwischen den beiden Infektionen.

Im Gegensatz zum Cecropin war zum Zeitpunkt 2 h nach Infektion noch keine Erhöhung des IMPI mRNA-Gehalts in den Proben messbar (Abbildung 9B). Ein Anstieg des IMPI mRNA-Gehalts begann bei der mit *S. Typhimurium* infizierten Gruppe nach 3 h und bei der mit *P. aeruginosa* infizierten Gruppe erst nach 4 h Inkubationszeit. Die mRNA-Expression von IMPI war bei den mit *S. Typhimurium* infizierten Larven nach 4 h und 6 h signifikant höher als bei den mit *P. aeruginosa* infizierten Larven.

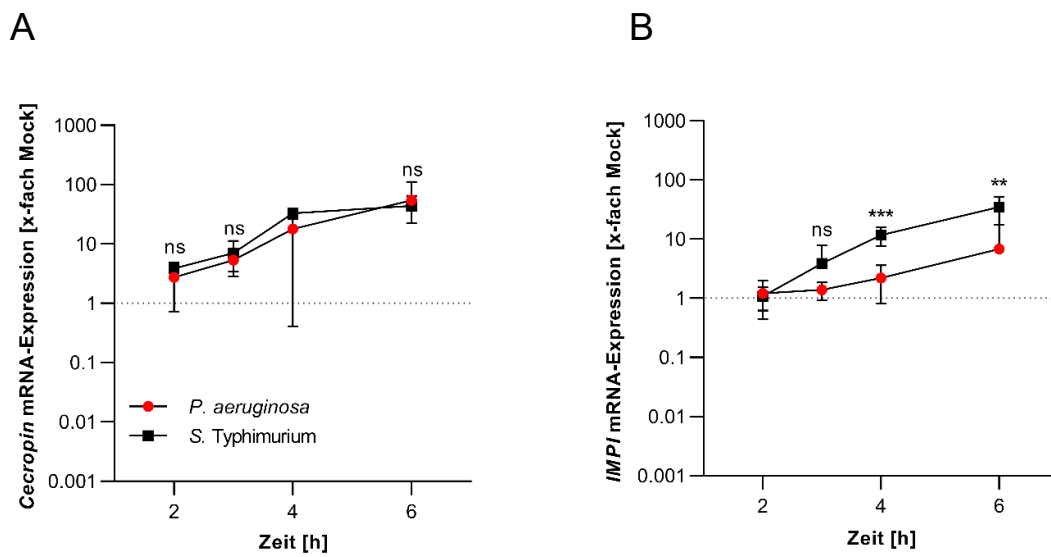


Abbildung 9: mRNA-Expression immunrelevanter Proteine von *G. mellonella* im Zeitverlauf

G. mellonella Larven wurden mit *P. aeruginosa* (n=8; 5/ Larve) oder *S. Typhimurium* (n=8; 10³/ Larve) infiziert. Der mRNA-Gehalt der Proben wurde mittels qRT-PCR bestimmt und die Ergebnisse auf PBS-stimulierte Larven (Mock) normiert. **(A)** qRT-PCR Messung der mRNA-Expression von Cecropin nach 2 h, 3 h, 4 h und 6 h. Die statistische Auswertung erfolgte an den Zeitpunkten 2 h, 3 h und 4 h durch einen Welch-t-Test und am Zeitpunkt 6 h durch einen Mann-Whitney-Test. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. **(B)** qRT-PCR Messung der mRNA-Expression von IMPI nach 2h, 3h, 4h und 6h. Die statistische Auswertung erfolgte an den Zeitpunkten 2 h, 3 h und 4 h durch einen Welch-t-Test und am Zeitpunkt 6 h durch einen Mann-Whitney-Test (***p*<0,01, ****p*<0,001).

GST war zum Zeitpunkt 2 h bei *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* Infektion leicht hochreguliert (Abbildung 10A). Anschließend verringerte sich die GST mRNA-Expression bei beiden Infektionsgruppen und blieb dann an den Zeitpunkten 3 h, 4 h, und 6 h auf einem gleichbleibenden, leicht gegenüber den Mock-Larven hochregulierten Niveau. Es gab zwischen den beiden Versuchsbedingungen über den gesamten Messzeitraum keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von GST.

Die mRNA-Expression von NOS veränderte sich im Zeitverlauf bei beiden Versuchsbedingungen kaum (Abbildung 10B). Bei den Larven, die mit *S. Typhimurium* infiziert wurden, war NOS an den Zeitpunkten 4 h und 6 h leicht hochreguliert. Die Larven, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, exprimierten signifikant weniger NOS mRNA als die Larven, die mit *S. Typhimurium* infiziert bzw. denen PBS injiziert wurde (Herabregulation).

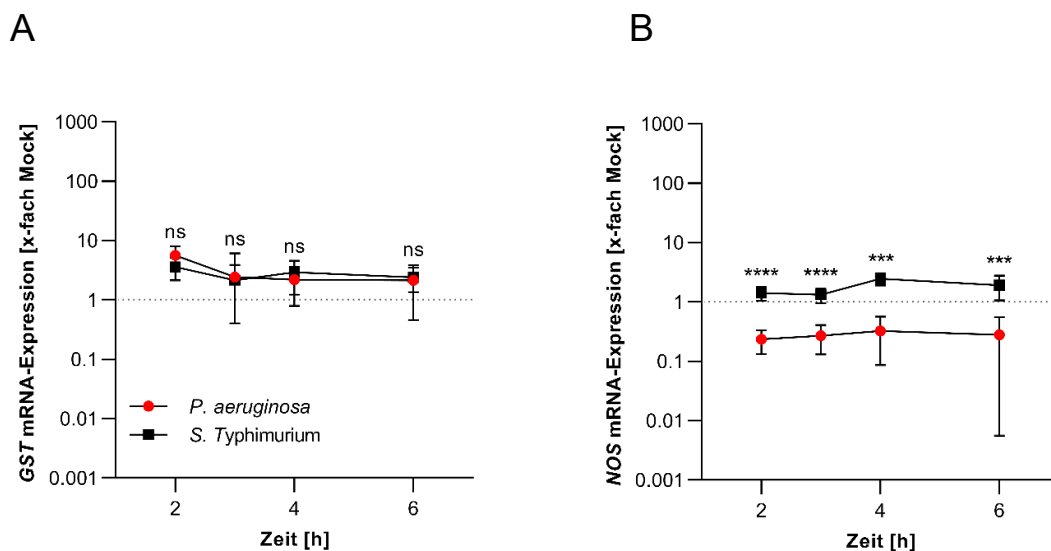


Abbildung 10: mRNA-Expression stressinduzierter Proteine von *G. mellonella* im Zeitverlauf

G. mellonella Larven wurden mit *P. aeruginosa* (n=8; 5/ Larve) oder *S. Typhimurium* (n=8; 10³/ Larve) infiziert. Der mRNA-Gehalt der Proben wurde mittels qRT-PCR bestimmt und die Ergebnisse auf PBS-stimulierte Larven (Mock) normiert. **(A)** mRNA-Expression von GST nach 2 h, 3 h, 4 h und 6 h. Die statistische Auswertung erfolgte an den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h durch einen Welch-t-Test und am Zeitpunkt 3 h durch einen Mann-Whitney-Test. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. **(B)** mRNA-Expression von NOS nach 2 h, 3 h, 4 h und 6 h. Die statistische Auswertung erfolgte an den Zeitpunkten 2 h und 3 h durch einen Welch-t-Test und an den Zeitpunkten 4 h und 6 h durch einen Mann-Whitney-Test (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

3.3.4 *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* induzieren einen starken

Anstieg der MRC1 und SERPINB1 mRNA-Expression im Zeitverlauf

Auch die mRNA-Expression der infektionsrelevanten *G. mellonella* Gene ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 (Tabelle 16) sollte im Zeitverlauf nach einer *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* Infektion beobachtet werden.

Die mRNA-Expression von ACER1 unterschied sich zwischen den beiden Versuchsbedingungen signifikant (Abbildung 11A). Die mRNA-Expression von ACER1 war bei der *P. aeruginosa* Infektionsgruppe um den Faktor 10 hochreguliert, während die Expression von ACER1 bei der *S. Typhimurium* Infektionsgruppe um rund den Faktor 10 herabreguliert war. Die ACER1 mRNA-Expression veränderte sich im Zeitverlauf bei beiden Infektionen kaum.

Die mRNA-Expression von CHI3L1 war bei der *P. aeruginosa* Infektionsgruppe nach 2 h leicht und bei der *S. Typhimurium* Infektionsgruppe kaum erhöht (Abbildung 11B). Im Zeitverlauf nahm der CHI3L1-mRNA Gehalt bei beiden Infektionsgruppen ab und näherte sich der Expression von Mock-Larven an. Die CHI3L1 mRNA-Expression der mit *P. aeruginosa* infizierten Larven war über den gesamten Messzeitraum signifikant höher als die CHI3L1-Expression der mit *S. Typhimurium* infizierten Larven.

Die mRNA-Expression von MRC1 verlief bei beiden Infektionsgruppen im Zeitverlauf ansteigend (Abbildung 11C). Nach 6 h war MRC1 bei beiden Infektionen rund 10-fach stärker exprimiert als bei Mock-Larven, denen PBS injiziert wurde. Ähnlich wie bei dem Verlauf von IMPI (Abbildung 9B) begann auch bei MRC1 der Anstieg der mRNA-Expression bei den mit *S. Typhimurium* infizierten Larven früher als bei den mit *P. aeruginosa* infizierten Larven. Zwischen den beiden Infektionsgruppen bestand ein signifikanter Unterschied in der MRC1 mRNA-Expression 2 h und 4 h nach der Infektion, jedoch nicht nach 3 h und 6 h.

Die mRNA-Expression von SERPINB1 war bereits nach 2 h hochreguliert und stieg bei beiden Versuchsbedingungen im Verlauf weiter an (Abbildung 11D). Die mit *S. Typhimurium* infizierten Larven exprimierten an allen Zeitpunkten signifikant mehr SERPINB1 mRNA als die mit *P. aeruginosa* infizierten Proben. Die Larven, die mit *S. Typhimurium* infiziert wurden, wiesen nach 6 h SERPINB1 mRNA-Level, die bis zu 100-fach über denen der Mock-Larven lagen, auf. Die Larven, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, erreichten rund 10-fach hochregulierte SERPINB1 mRNA-Level.

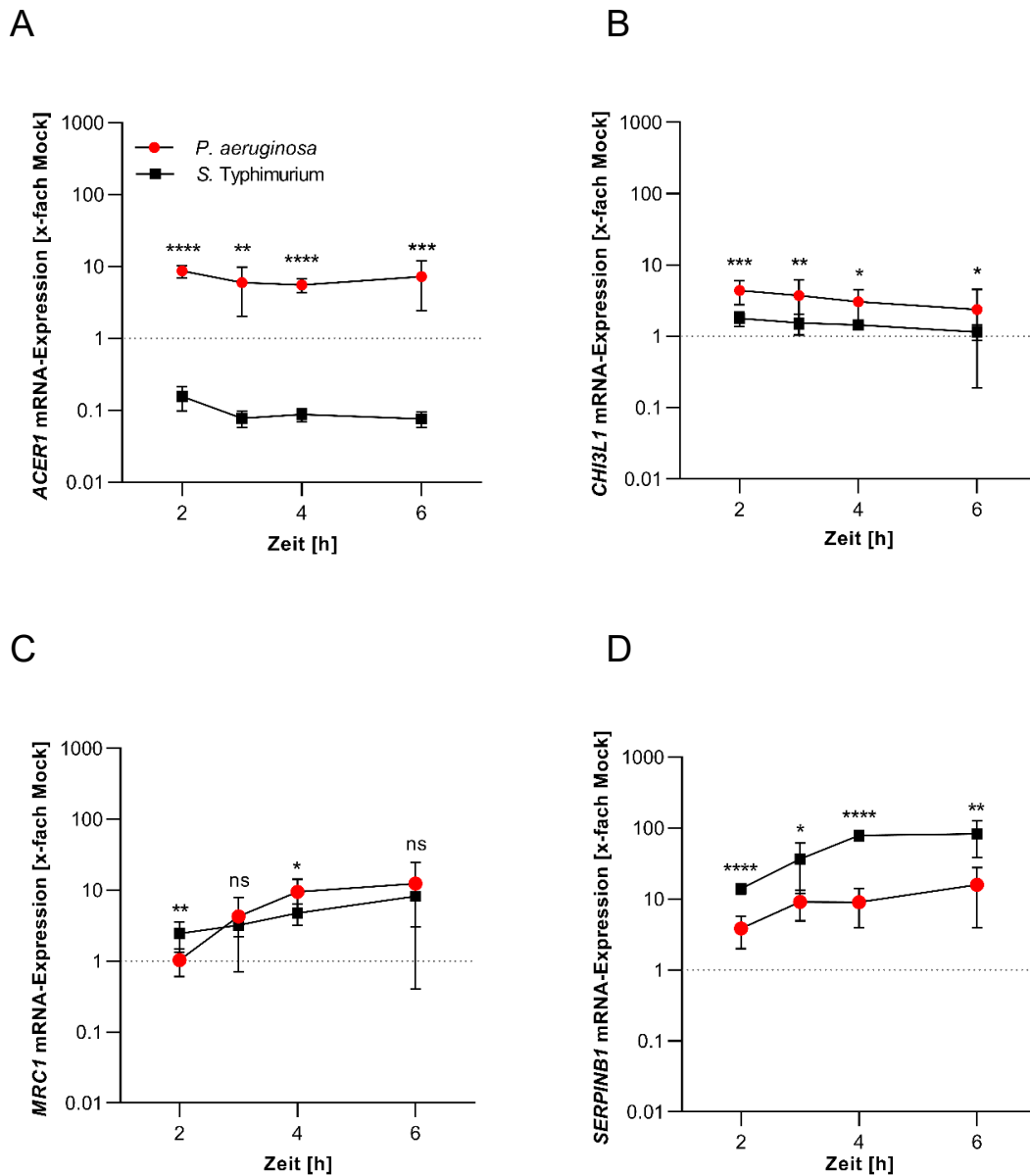


Abbildung 11: mRNA-Expression ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 von *G. mellonella* im Zeitverlauf

G. mellonella Larven wurden mit *P. aeruginosa* (n=8; 5/ Larve) oder *S. Typhimurium* (n=8; 10³/ Larve) infiziert. Der mRNA-Gehalt der Proben wurde an den Zeitpunkten 2 h, 3 h, 4 h und 6 h mittels qRT-PCR bestimmt und die Ergebnisse auf PBS-stimulierte Larven (Mock) normiert. **(A)** mRNA-Expression von Alkaline Ceramidase 1 (ACER1). Die statistische Auswertung erfolgte an den Zeitpunkten 2 h, 3 h und 4 h durch einen Welch-t-Test und am Zeitpunkt 6 h durch einen Mann-Whitney-Test. **(B)** mRNA-Expression von Chitinase-3-like-Protein 1 (CHI3L1). Die statistische Auswertung erfolgte am Zeitpunkt 4 h durch einen Welch-t-Test und an den Zeitpunkten 2 h, 3 h und 6 h durch einen Mann-Whitney-Test. **(C)** mRNA-Expression von Makrophagen-Mannose-Rezeptor 1 (MRC1). Die statistische Auswertung erfolgte an den Zeitpunkten 2 h, 3 h und 4 h durch einen Welch-t-Test und am Zeitpunkt 6 h durch einen Mann-Whitney-Test (ns=nicht signifikant). **(D)** mRNA-Expression von Leukozyten-Elastase-Inhibitor (SERPINB1). Die statistische Auswertung erfolgte an allen Zeitpunkten durch einen Welch-t-Test. Für **(A)-(D)** gilt als Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

3.3.5 Mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* infizierte Raw 264.7 Zellen sezernieren TNF α

Nachdem die Wirkung einer *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* Infektion auf die mRNA-Expression der vier Gene ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 von *G. mellonella* Larven untersucht wurde, sollten im nächsten Schritt die Ergebnisse in eine Zellkultur muriner Zellen übertragen werden, um die Immunreaktionen auf die Infektionen verschiedener Spezies besser vergleichen zu können.

Um sicherzustellen, dass eine regelrechte Infektion der Zellen stattgefunden hat, wurde zunächst ein ELISA für das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF α) durchgeführt. TNF α ist ein Zytokin der TNF-Superfamilie, das bei akuter oder chronischer Inflammation von aktivierten Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten ausgeschüttet wird und als multifunktionales Signalmolekül im Immunsystem wirkt (Hehlhans und Pfeffer, 2005; Rahman und McFadden, 2006). Gemessen wurde die von den Zellen in den Zellkulturüberstand sezernierte Zytokin-Menge an verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation (Abbildung 12). Verwendet wurden Raw 264.7 Zellen der Maus, die mit *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* im Verhältnis MOI 1 infiziert wurden. MOI bedeutet Multiplizität der Infektion und beschreibt das Verhältnis von Zellen zu Bakterien in einem Versuchsansatz.

Die Zellen, die lediglich mit PBS versetzt wurden (Mock), sezernierten zu keinem Zeitpunkt TNF α (Abbildung 12). Im Überstand der Zellen, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, wurden im Zeitverlauf ansteigende TNF α Mengen gemessen. Eine Messung nach 24 h konnte bei ihnen nicht durchgeführt werden, da die Zellen die Infektion mit *P. aeruginosa* nicht überlebt haben. Die TNF α -Konzentration im Überstand der Zellen, die mit *S. Typhimurium* infiziert wurden, stieg ebenfalls im Zeitverlauf. Im Überstand der mit *P. aeruginosa* infizierten Zellen wurde im Vergleich zu den mit *S. Typhimurium* infizierten Zellen nach 6 h rund die doppelte Menge TNF α gemessen. Die Zellen zeigten durch die steigende TNF α Konzentration im Überstand eine Reaktion auf die bakterielle Infektion, welche im folgenden Abschnitt nun genauer charakterisiert wurde.

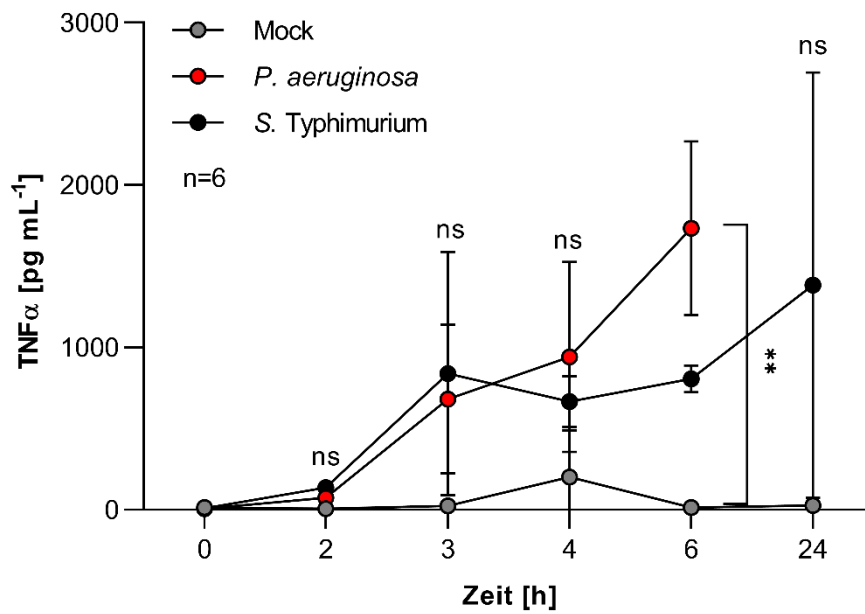


Abbildung 12: TNF α -Sekretion nach Infektion

Raw 264.7 Zellen wurden mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* infiziert (n=6, MOI=1). Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden Zellkulturüberstände abgenommen. In den Zellkulturüberständen wurde die sezernierte TNF α Menge mittels ELISA gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test (ns=nicht signifikant, **= $p < 0,01$).

3.3.6 Anstieg der CHI3L1-Sekretion von mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* infizierten Raw 264.7 Zellen

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob Raw 264.7 Zellen der Maus nach einer Infektion mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* eine erhöhte Sekretion des Proteins CHI3L1 bzw. Gehalt des Proteins MRC1 aufweisen (Abbildung 13). Als Kontrollgruppe (Mock) wurde zu Zellen reines PBS gegeben.

Die Menge des in die Zellkulturüberstände sezernierten Proteins CHI3L1 wurde mittels ELISA gemessen (Abbildung 13A).

Bei der Kontrollgruppe war zu keinem Zeitpunkt eine Sekretion von CHI3L1 nachzuweisen. In zwei Proben der Zellen, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, war sekretiertes CHI3L1 nach 6 h Inkubationszeit mittels ELISA nachweisbar. Eine Messung nach 24 h Inkubationszeit war nicht möglich, da die Zellen die *P. aeruginosa* Infektion über diesen Zeitraum nicht überlebt haben. In allen Zellkulturüberständen der mit *S. Typhimurium* infizierten Zellen konnte das Protein CHI3L1 zum Zeitpunkt 24 h nachgewiesen werden.

Das Protein MRC1 wurde zunächst als Membranrezeptor beschrieben, konnte aber als auch als lösliche Form in humanem Serum detektiert werden (Martinez-Pomares, 2012; Kjærgaard et al., 2014). Um das membrangebundene Protein zu messen, wurden die Raw 264.7 Zellen lysiert und daraus ELISA-Messungen durchgeführt (Abbildung 13B).

Bei der Kontrollgruppe sank die MRC1-Menge zwischen den Zeitpunkten 0 h und 3 h auf rund die Hälfte ab und stieg dann innerhalb von 24 h wieder bis auf über das Ausgangsniveau zurück an. Bei den Zellen, die mit *P. aeruginosa* infiziert wurden, waren an den Zeitpunkten 0 h und 3 h niedrigere MRC1-Mengen als bei der Kontrollgruppe messbar. Die Verläufe der Kontrollgruppe und der *P. aeruginosa* Infektion sind sich ähnlich, bei beiden sank die gemessene Proteinmenge zunächst ab, um dann nach 6 h wieder anzusteigen. Die Zell-Lysate der mit *S. Typhimurium* infizierten Zellen enthielten zum Zeitpunkt 0 h vergleichbar viel MRC1 wie die Zellen der Kontrollgruppe. Innerhalb des Messzeitraums von 24 h fiel die Proteinkonzentration stark ab. Am Zeitpunkt 24 h war in den Mock-Proben ein im Mittel dreifach höherer MRC1-Gehalt im Vergleich zu den *S. Typhimurium* infizierten Proben vorhanden.

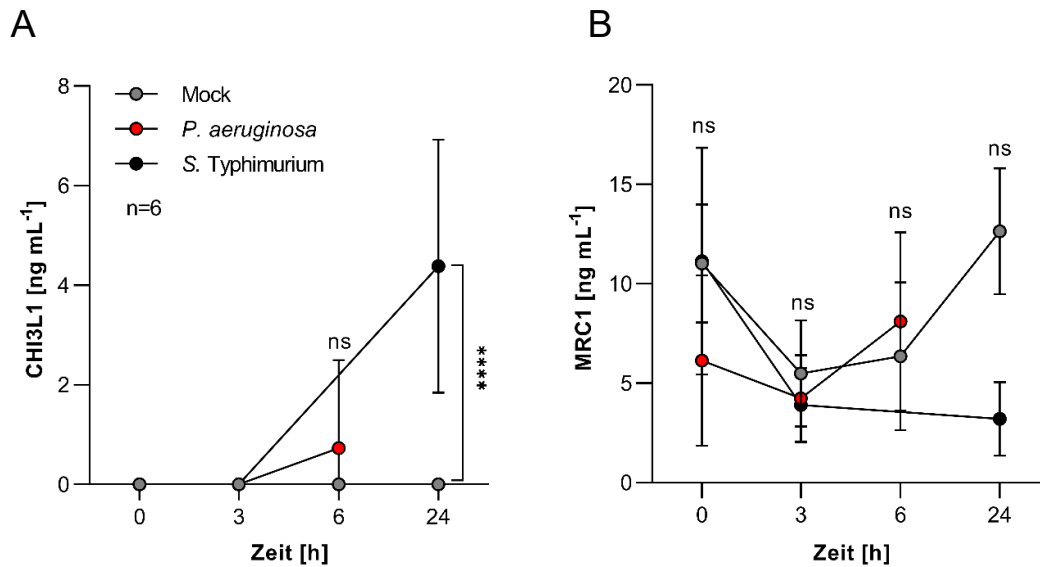


Abbildung 13: CHI3L1 und MRC1 ELISA nach Infektion von Raw 264.7 Zellen

Raw 264.7 Zellen wurden mit *P. aeruginosa* oder *S. Typhimurium* infiziert (n=6, MOI1). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Zellkulturüberstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die ELISA-Messung erfolgte bei der *P. aeruginosa* Versuchsbedingung an den Zeitpunkten 0, 3 und 6 h und bei der *S. Typhimurium* Versuchsbedingung an den Zeitpunkten 0, 3 und 24 h. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test (ns=nicht signifikant, ****= $p < 0,0001$). **(A)** In den Zellkulturüberständen wurde die Konzentration von CHI3L1 mittels ELISA gemessen. Die CHI3L1-Konzentration der Mock-Proben lag unter der Nachweisgrenze. Zum Zeitpunkt 6 h konnte in 2 Proben der *P. aeruginosa* Versuchsbedingung CHI3L1 gemessen werden. Zum Zeitpunkt 24 h konnte in allen Proben der *S. Typhimurium* Versuchsbedingung CHI3L1 gemessen werden. **(B)** Aus Zelllysaten wurde die Menge an MRC1 mittels ELISA gemessen. In allen Proben lag die Menge des Proteins MRC1 über der Nachweisgrenze.

4 Diskussion

4.1 Veränderung der Genexpression nach Infektion

Einleitend wurden bereits der weit verbreitete Einsatz von *G. mellonella* in der Infektionsforschung sowie einige Vorteile des Modells dargestellt. Auch Vogel *et. al* (2011) stellten fest, dass *G. mellonella* Larven vor allem durch ihre handliche Größe einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen etablierten Modellen wie beispielsweise *D. melanogaster* oder *C. elegans* bieten. Sie sahen jedoch einen entscheidenden Nachteil des Modells in erheblichen Wissenslücken in Genom und Transkriptom gegenüber anderen Insektenmodellen. Durch die Durchführung und Analyse eines Transkriptoms von *G. mellonella* unterschiedlicher Entwicklungsstadien sowie von Larven, die mit LPS stimuliert wurden, konnten Vogel *et. al* (2011) grundlegende Daten über das Modell *G. mellonella* bereitstellen. Nachdem Lange *et. al* (2018) schließlich das Genom von *G. mellonella* veröffentlichten, war eine gute Basis für weitere Untersuchungen im Modell *G. mellonella* gegeben. Die Durchführung einer Transkriptom-Sequenzierung (RNA-Seq) von *G. mellonella* nach spezifischen bakteriellen Infektionen und der Vergleich der Auswirkungen dieser Infektionen auf den Organismus von *G. mellonella* in dieser Arbeit stellt ein weiterer wichtiger Schritt in der Weiterentwicklung des Modells *G. mellonella* dar.

Es konnte gezeigt werden, dass ein mittels RNA-Seq messbarer Zusammenhang zwischen einer bakteriellen Infektion mit *E. coli* bzw. *S. aureus* und der Regulation von *G. mellonella* Transkripten besteht. Besonders stark waren nach der Infektion Peptidoglykan-Erkennungs-Proteine exprimiert. In der Gruppe der AMPs war Gloverin sehr stark nach der Infektion hochreguliert. Unklar ist, weshalb von den 18 in der Literatur beschriebenen AMPs lediglich Gloverin und Lysozym sequenziert werden konnten (Brown *et al.*, 2009). Wie in Abbildung 1 dargestellt, wurden einige Transkripte sequenziert, die in stimulierten Larven im Vergleich zu PBS-infizierten Larven deutlich hochreguliert sind, die aber nicht einem bereits bekannten Gen zugeordnet werden konnten. Möglicherweise konnten einige AMP-Transkripte nicht bestimmt werden und befinden sich unter den Sequenzen mit unbekannter Funktion. Ein weiterer wichtiger Schritt stellt

also die Bestimmung der Funktion dieser unbekanntem Transkripte im *G. mellonella* Organismus dar. Über die dargestellten Ergebnisse hinaus konnten durch die Sequenzierung große Datenmengen gewonnen werden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vollumfänglich analysiert werden konnten. Beispielsweise erfolgte keine Analyse der herabregulierten Gene.

Für eine perspektivische klinische Anwendung ist es interessant, ob es Proteine im Organismus von *G. mellonella* gibt, die im menschlichen Organismus die gleichen oder ähnliche Funktionen einnehmen. Hierzu wurden nach Infektion hochregulierte *G. mellonella* Transkripte mit Proteinsequenzen aus *M. musculus* und *H. sapiens* verglichen. Es konnten hierbei zu den *G. mellonella* Sequenzen von ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 homologe Sequenzen in *M. musculus* und *H. sapiens* bestimmt werden (Tabelle 17). Für diese vier Gene ist auch eine immunrelevante Funktion im murinen oder humanen Organismus bereits in der Literatur beschrieben worden (Coant et al., 2017; Di Rosa et al., 2016; Martinez-Pomares, 2012; Torriglia et al., 2017).

Zwei Sequenzen werden in der Regel als homolog bezeichnet, wenn die beiden Sequenzen mehr Ähnlichkeiten zueinander aufweisen, als es durch Zufall zu erwarten wäre. In diesem Fall erscheint ein gemeinsamer Vorfahre dieser Sequenzen sehr wahrscheinlich. Diese gemeinsame Vergangenheit ist jedoch nicht zu überschätzen – selbst Sequenzen mit sehr hoher Übereinstimmung können im jeweiligen Organismus und unter den dort vorherrschenden Bedingungen unterschiedliche Funktionen einnehmen (Pearson, 2013). Obwohl für die vier Transkripte von *G. mellonella* homologe Sequenzen in *M. musculus* bzw. *H. sapiens* gefunden werden konnten, sind also weitergehende Analysen notwendig, um auf eine vergleichbare Funktion schließen zu können und es genügt nicht, alleinig die Sequenzen zueinander zu betrachten. Aus diesem Grund war der nächste, auf die rein theoretischen Vergleiche zwischen dem Organismus *G. mellonella* und *M. musculus*/*H. sapiens* folgende Schritt, der Versuch die in *G. mellonella* produzierten Daten in murinen Zellen zu reproduzieren. Hierzu wurde eine Zellkultur mit murinen Raw 264.7 Zellen verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden unter der Überschrift 4.3 näher erläutert. Auch wenn homologe Proteinsequenzen nicht zwangsläufig

eine Übereinstimmung in ihrer Funktion in unterschiedlichen Spezies bedeuten, können grundlegende Pathomechanismen von bakteriellen Infektionen sowie des angeborenen Immunsystems in Modellorganismen nachvollzogen werden.

4.2 Charakterisierung von *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* Infektionen in *G. mellonella*

Es konnten deutliche Unterschiede in der Virulenz von *S. Typhimurium* und *P. aeruginosa* für *G. mellonella* gezeigt werden. Während die letale Dosis 50 (LD50) für *P. aeruginosa* PAO1 in *G. mellonella* bei < 5 injizierten Bakterien pro Larve lag, lag die LD50 für *S. Typhimurium* SB300 in *G. mellonella* zwischen 10^4 und 10^5 injizierten Bakterien pro Larve (Abbildung 3).

Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von Jander et al. (2000) und Bismuth et al. (2021) in Einklang zu bringen. Sie stellten fest, dass die LD50 einer *P. aeruginosa* Infektion bei rund 10 Bakterien pro Larve (Jander et al., 2000) und die LD50 für eine *S. Typhimurium* Infektion bei rund 10^4 Bakterien pro Larve liegt (Bismuth et al., 2021). Um unter anderem diese deutlichen Unterschiede zwischen den Bakterien zu erklären, wurden zwei weitere Versuche zur Immunität von *G. mellonella* gegen *P. aeruginosa* PAO1 und *S. Typhimurium* SB300 durchgeführt. Zum einen wurde durch eine Zählung von KbE aus *G. mellonella*-Hämolymphe bestimmt, ob sich *P. aeruginosa* PAO1 bzw. *S. Typhimurium* SB300 in *G. mellonella* weiter vermehren können oder ob sie von den Immunreaktionen der Larve abgetötet werden (Abbildung 4). Zum anderen wurde der Einfluss von *P. aeruginosa* PAO1 bzw. *S. Typhimurium* SB300 auf die Anzahl der Hämozyten in der Hämolymphe von *G. mellonella* gemessen (Abbildung 5).

Beim Betrachten der Abbildung 4 wird ersichtlich, dass *P. aeruginosa* PAO1 mit einer initialen Dosis von 5 Bakterien pro Larve von *G. mellonella* in der überwiegenden Anzahl der Fälle nicht aus der Hämolymphe entfernt werden kann. Es stellt sich die Frage, warum am Zeitpunkt 6 h bei rund ein Viertel der Larven weniger als 3 KbE pro $10\mu\text{L}$ Hämolymphe messbar waren, während die restlichen Larven einen starken Anstieg der Bakterien in ihrem Organismus auf über 200 KbE pro $10\mu\text{L}$ Hämolymphe bis hin zu ihrem Tod erlebten. Bis zum

Zeitpunkt 24 h überlebte lediglich ein Viertel der Larven die Infektion. Die Larven, die die Infektion über 24 h überlebt haben, wiesen keine KbE in der Hämolymphe auf.

Jander *et al.* (2000) konnten ähnliche Ergebnisse mit dem *P. aeruginosa* Stamm PA14 zeigen. Auch in ihren Untersuchungen wiesen die Larven, die eine Infektion überlebt haben, keine Anzeichen von PA14 in der Hämolymphe auf. Ferner konnten sie einen Zusammenhang zwischen starker Melanisierung und dem Tod der Larven feststellen. So wiesen die toten Larven eine starke Melanisierung auf, die Larven, die die Infektion überlebt haben, im Vergleich dazu jedoch kaum.

Die Larven, die der vorliegenden Arbeit beobachtet und mit 5 KbE PAO1/ Larve infiziert wurden, zeigten jedoch, wenn sie die Infektion überlebt haben und sich keine KbE mehr nachweisen ließen, eindeutige Melanisierungs-Reaktionen sowie weitere Krankheitsanzeichen wie eine reduzierte Beweglichkeit. Diese Beobachtungen könnten auf eine starke Abwehrreaktion dieser Larven hinweisen, die vermutlich erfolgreich die Pathogene bekämpft, aber auch den Organismus der Larve stark geschädigt hat. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Phenoloxidase-Reaktion, die neben der Melanisierung auch zur Bildung von Radikalen führt, stark aktiviert wird (s. Einleitung).

Jander *et al.* (2000) stellten außerdem fest, dass bei einer initialen Infektionsdosis von 25 PA14 die Larven nach etwa 48 h und einer dann im Organismus vorliegenden Bakterienkonzentration von 10^9 sterben. In der vorliegenden Arbeit konnte vergleichend dazu gezeigt werden, dass PAO1 bereits nach 24 h und einer initialen Dosis von 10 KbE PAO1 bei rund 80% der Tiere zum Tod führt. Eine aus der verstärkten Melanisierungs-Reaktion sowie der höheren Letalität folgende Vermutung ist, dass der Stamm PAO1 für *G. mellonella* virulenter ist als der von Jander *et al.* untersuchte Stamm PA14.

Vergleicht man die *S. Typhimurium* SB300 Infektion mit der *P. aeruginosa* PAO1 Infektion in Bezug auf die Vermehrung in der Larve nach Infektion fällt auf, dass bei der Infektion mit *S. Typhimurium* trotz der deutlich höheren initialen Dosis von 10^3 Bakterien pro Larve die Pathogene vollständig aus der Hämolymphe entfernt werden konnten. Die Larven müssen also erfolgreiche Abwehrmechanismen

gegenüber *S. Typhimurium* besitzen. Interessanterweise wiesen die Larven nach der *S. Typhimurium* Infektion zu keinem Zeitpunkt makroskopisch sichtbare Krankheitsanzeichen auf, außerdem erlag keine Larve der Infektion.

Cerenius *et al.* (2008) kamen in ihrer Übersichtsarbeit zur Phenoloxidasereaktion zu dem Schluss, dass die Aktivität der Melanisierungs-Reaktion eine bedeutende Rolle bei der Frage spielt, ob die Larven eine Infektion überleben oder ob die Infektion zum Tod der Larve führt. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Melanisierung vor allem eine frühe, effiziente Reaktion gegenüber wenigen, hoch-pathogenen Organismen ist. Dies würde erklären, warum eine Melanisierungs-Reaktion bei den *P. aeruginosa* infizierten Larven deutlich sichtbar, bei den *S. Typhimurium* infizierten Larven jedoch nicht zu beobachten ist. Vermutlich kann die *S. Typhimurium* Infektion durch effiziente und die Larve weniger schädigende Abwehrmechanismen wie beispielsweise AMPs bekämpft werden, die *P. aeruginosa* Infektion hingegen nicht. Bei einer *P. aeruginosa* Infektion scheint eine exzessive Melanisierungs-Reaktion notwendig zu sein, die dann durch die reaktiven Produkte allerdings auch bei vielen Larven zum Tod führt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass *G. mellonella* Abwehrmechanismen besitzen muss, die erfolgreich eine systemische *S. Typhimurium* SB300 Infektion kontrollieren und bekämpfen können. Im Vergleich dazu ist die Immunantwort von *G. mellonella* auf systemische *P. aeruginosa* PAO1 Infektionen weniger erfolgreich und mit Schäden des Organismus verbunden.

Arteaga Blanco *et al.* (2017) untersuchten in Infektionsstudien mit verschiedenen Stämmen des Bakteriums *Actinobacillus pleuropneumoniae* den Einfluss der Virulenz eines Pathogens auf die Entwicklung der Zellzahl in der Hämolymphe von *G. mellonella* nach einer Infektion. Sie stellten fest, dass eine Injektion mit PBS genauso wie eine Infektion mit einem wenig virulenten *A. pleuropneumoniae* Stamm zu einem Anstieg der Hämozytenzahl in der Hämolymphe führt, während aus einer Infektion mit einem hochvirulenten Stamm eine geringere Hämozytenzahl in der Hämolymphe resultiert. Als proliferierenden Zelltyp, der den Hämozyten-Anstieg in den Larven mit PBS-Injektion bzw. einer niedrig virulenten Infektion erklärt, beschrieben sie Prohämozyten. Die absoluten

Zellzahlen der Arbeit von Arteaga Blanco *et al.* (2017) können nicht direkt mit den absoluten Zellzahlen aus der vorliegenden Arbeit verglichen werden, da hier eine in Teilen abweichende Methode in der Probengewinnung zum Einsatz kam. Ein Vergleich der jeweiligen Verläufe ist dagegen möglich.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2-8 h nach einer Infektion mit *P. aeruginosa* eine Erhöhung der Zellzahl in der *G. mellonella* Hämolymphe messbar ist (Abbildung 5). Die Zellzahl nach 24 h Inkubationszeit ist jedoch stark abgesunken. Der 24 h Wert liegt dabei auch deutlich unter der Zellzahl der nativen Larven und signifikant unter der Zellzahl der Larven, denen PBS injiziert wurde. Anzumerken ist, dass lediglich 3 Larven die Infektion über 24 h überlebt haben und somit gemessen werden konnten.

Arteaga Blanco *et al.* (2017) erklärten den Hämocyten-Abfall bei Infektion mit hochvirulenten Bakterien durch ein Entkommen der Pathogene aus der zellulären Immunität. Hierdurch können sie sich im Organismus vermehren, während die Hämocyten durch Apoptose zugrunde gehen. Für diesen Mechanismus spricht auch die Auszählung der KbE (Abbildung 4), in der deutlich wurde, dass sich *P. aeruginosa* in der überwiegenden Zahl der Larven stark vermehren kann.

Auch bei der Infektion mit *S. Typhimurium* ist die Hämocytenzahl deutlich gegenüber der Hämocytenzahl der nativen Larven erhöht. Sie bleibt jedoch im Gegensatz zur *P. aeruginosa* Infektion über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem konstanten, hohen Niveau. Es ist weder eine Normalisierung der Hämocytenzahl, wie sie bei der PBS-Injektion zu beobachten ist, noch ein starker Abfall der Hämocytenzahl messbar. Monack *et al.* (1996) zeigten, dass invasive *S. Typhimurium* Stämme in der Lage sind, in Mausmakrophagen einzudringen und diese zur Apoptose zu bringen. Aeissen (2018) konnte im Rahmen ihrer Masterarbeit in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der Stamm *S. Typhimurium* SB300, der auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, in der Lage ist, in einem *in vitro* Modell in Mausmakrophagen einzudringen und die Zellen abzutöten. Wenn *S. Typhimurium* SB300 in der Lage wäre, auch in Hämocytenzellen von *G. mellonella in vivo* einzudringen und diese zur Apoptose zu bringen, wäre vermutlich ein Absinken der Hämocytenzahl nach systemischer *S. Typhimurium* Infektion die Folge. Dies scheint jedoch nicht der

Fall zu sein, da die gemessene Zellzahl gleichbleibend hoch war und kein Abfall beobachtet werden konnte. Es stellt sich die Frage, ob *S. Typhimurium* grundsätzlich invasiv und zytotoxisch für Hämozytenzellen von *G. mellonella* ist. Die Tatsache, dass im zuvor beschriebenen Versuch gezeigt werden konnte, dass *G. mellonella* in der Lage ist *S. Typhimurium* aus der Hämolymphe zu eliminieren (Abbildung 4), spricht für eine erfolgreiche Immunantwort von *G. mellonella* gegen eine systemische *S. Typhimurium* Infektion. Ein Absinken der Hämozytenzahl zu einem späteren Zeitpunkt kann auf dieser Datengrundlage allerdings nicht ausgeschlossen werden. Um diese Frage vollständig zu klären, sollte die Untersuchung mit Inkubationszeiträumen, die über 24 h hinausgehen, sowie mit höheren Infektionsdosen erweitert werden. Außerdem sollte näher untersucht werden, ob *S. Typhimurium* invasiv und cytotoxisch für *G. mellonella* Hämozyten ist.

4.3 Genexpression infektionsrelevanter Proteine in *G. mellonella*, *M. musculus* und *H. sapiens*

In den qRT-PCR Messungen konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des AMPs Cecropin von *G. mellonella* durch alle vier untersuchten Bakterien, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium*, induziert wird (Abbildung 6). Es waren dabei signifikante Unterschiede im Ausmaß der Induktion feststellbar. Die Cecropin mRNA-Expression war 3 h nach Infektion mit *E. coli* rund 100-fach erhöht, im Gegensatz dazu war die Cecropin mRNA-Expression 3 h nach der Infektion mit *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* lediglich 10-fach erhöht. Betrachtet man die mRNA-Expression des Cecropins im Zeitverlauf (Abbildung 9) wird ersichtlich, dass die mRNA-Expression innerhalb des Zeitraums von 6 h auch bei *P. aeruginosa* sowie *S. Typhimurium* Infektion auf rund eine 100-fach erhöhte Expression ansteigt. Unklar ist, wie sich die mRNA-Expression nach Infektion mit *S. aureus* bzw. *E. coli* im Zeitverlauf über die 3 h hinaus verhält, was im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Andrejko *et al.* (2009) stellten in ihren Messungen fest, dass die antimikrobielle Aktivität des Cecropins nach *P. aeruginosa* sowie nach *E. coli* Infektion von *G. mellonella* ansteigt. Die Aktivität war jedoch nach der Infektion mit einem nicht-pathogenen *E. coli* Stamm höher und länger anhaltend als nach der

P. aeruginosa Infektion. Diese höhere Cecropin-Aktivität nach *E. coli* Infektion im Vergleich zur Aktivität bei Infektion mit *P. aeruginosa* lässt sich mit der Höhe der mRNA-Expression des Cecropins nach diesen beiden Infektionen in Einklang bringen (Abbildung 6, Abbildung 9).

Wenn tatsächlich Hämozyten im Rahmen einer Infektion mit hochvirulenten Bakterien zugrunde gehen, wie es von Arteaga Blanco *et al.* (2017) beschrieben wird und worauf die Hämozytenzählung in Abbildung 5 ebenfalls hinweist, dann können diese apoptotischen Hämozyten in diesem Moment auch nicht mehr die Bildung von AMPs induzieren (Dziarski und Gupta, 2006). Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum die Cecropin mRNA-Expression bei Infektion mit *P. aeruginosa* nicht so stark induziert wird wie beispielsweise bei *E. coli* Infektion. Es lässt sich hierdurch allerdings nicht erklären, warum *S. Typhimurium* eine signifikant schwächere Regulation als *E. coli* auslöst. Dies wiederum führt zu der Hypothese, dass das Cecropin vermutlich nicht für die effektive Abwehr von *S. Typhimurium*, wie sie in Abbildung 4 dargestellt ist, hauptverantwortlich ist.

Brady *et al.* (2019) fassten zusammen, was bisher zur therapeutischen Anwendung von Cecropin bekannt ist. Sie konnten darlegen, dass Cecropin ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antiinfektöser Therapeutika auch gegen hoch-virulente und multiresistente Bakterien darstellt. Auch ein prophylaktischer Einsatz beispielsweise als Beschichtung von Medizinprodukten gegen fremdmaterialassoziierte Infektionen und Biofilmbildung wurde diskutiert. Ein Ansatz stellt dabei die Veränderung von Wildtyp-AMPs zu effektiver wirksamen synthetischen AMPs dar. Oñate-Garzón *et al.* (2017) synthetisierten zwei Varianten des *G. mellonella* Cecropins, die eine signifikant stärkere antimikrobielle Wirkung gegen *E. coli*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* im Vergleich zu WT-Cecropin aufwiesen. Durch Veränderung der NH₂-terminalen Region tragen diese synthetisierten Cecropin-Varianten eine positive Ladung, das Wildtyp-Cecropin ist im Gegensatz dazu in dieser Region nicht geladen. Durch die positive Ladung wird eine stärkere Interaktion des Moleküls mit der anionischen mikrobiellen Oberfläche und damit eine stärkere antimikrobielle Aktivität erreicht. Die Arbeit von Oñate-Garzón *et al.* (2017) unterstreicht die

Bedeutung des Cecropins für *G. mellonella* und den Menschen sowie die Notwendigkeit, weitere Untersuchungen auch in *in vivo* Modellen durchzuführen.

Der Insekten-Metalloproteinase-Inhibitor (IMPI) wurde 1998 erstmals durch Wedde *et al.* aus *G. mellonella* isoliert und stellt ein einzigartiges Protein dar, das bei Aktivierung des angeborenen Immunsystems von *G. mellonella* gemeinsam mit AMPs in die Hämolymphe ausgeschüttet wird. Es konnten bisher keine Sequenzähnlichkeiten mit bereits bekannten Proteinen von Wirbeltieren oder Invertebraten gefunden werden (Wedde *et al.*, 1998; Vilcinskas und Wedde, 2002; Wojda *et al.*, 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von IMPI in Folge einer systemischen Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* induziert, bei *P. aeruginosa* sowie *S. Typhimurium* Infektion dagegen kaum verändert wird. Diese Beobachtung deckt sich mit der bereits beschriebenen Regulation der mRNA-Expression des Cecropins. Dies könnte darauf hinweisen, dass *G. mellonella* ihre Abwehrmechanismen spezifisch auf die Art des Pathogens ausrichtet. Es muss also bakterielle Faktoren geben, von denen das Ausmaß der Expression von Abwehrmolekülen wie IMPI und AMPs abhängt.

Es ist bereits bekannt, dass der *P. aeruginosa* Virulenzfaktor Elastase B (LasB oder auch Pseudolysin) antimikrobielle Peptide von *G. mellonella* wie das Cecropin B, das apoLP-III sowie weitere Abwehrmoleküle degradiert (Andrejko *et al.*, 2009; Andrejko und Mizerska-Dudka, 2012). *Pseudomonas* Elastase B ist eine Zink-abhängige Metallopeptidase, die zur M4-Familie zählt (Andrejko und Mizerska-Dudka, 2012). Da IMPI *in vivo* eine starke neutralisierende Wirkung gegen toxische mikrobielle Metalloproteinase aufweist, gibt es Bestrebungen, die Wirkungsweise von IMPI für Therapeutika gegen bakterielle Infektionen des Menschen zu nutzen (Vilcinskas, 2011). Eisenhardt *et al.* (2018) konnten erst kürzlich zeigen, dass das von ihnen fusionierte Protein IMPI-GST *in vitro* die Elastase B von *P. aeruginosa* PAO1 inhibiert. In ihren Untersuchungen kam dabei der gleiche *P. aeruginosa* PAO1 Referenzstamm (DSM 19880) zum Einsatz wie in der vorliegenden Arbeit. Diese Vergleichbarkeit ist bedeutsam, da es bei dem Bakterium *P. aeruginosa* große Unterschiede in Virulenz und

Resistenz zwischen verschiedenen Stämmen gibt (Huber et al., 2016). Die Fusion von IMPI mit GST ist laut Eisenhardt *et al.* (2018) notwendig, um ein stabiles, chargen-unabhängiges Molekül bereitstellen zu können. Das GST beeinträchtigt dabei die Funktion des IMPI nicht. Neben der Inhibition der Elastase B wurde in *in vitro* Untersuchungen mit Hautzellen sowie in *ex vivo* Schweine-Wundmodellen die Wirksamkeit von IMPI-GST gegen *P. aeruginosa* auf zellulärer, molekularer und morphologischer Ebene nachgewiesen. IMPI-GST hat also das Potential, auch bei *Pseudomonas* Infektionen, die über Wundinfektionen hinausgehen, wirksam zu sein (Eisenhardt et al., 2018). Dies wirft wiederum die Frage auf, warum in der vorliegenden Arbeit IMPI bei *P. aeruginosa* Infektion von *G. mellonella* auf mRNA-Ebene nicht stärker hochreguliert wurde (Abbildung 6, Abbildung 9). Um dieser Fragestellung nachzugehen wäre es interessant, in zukünftigen Studien das Molekül IMPI-GST bei einer *P. aeruginosa* Infektion von *G. mellonella* in einem *in vivo* Modell zu untersuchen.

Eisenhardt *et al.* (2018) wiesen darüber hinaus darauf hin, dass das Bakterium *S. aureus* mit Aureolysin eine M4-Metalloproteinase als Virulenzfaktor produziert, die ebenfalls eine mögliche Zielstruktur des Moleküls IMPI-GST darstellen könnte. Die in der vorliegenden Arbeit dargelegte starke Hochregulation von IMPI nach *E. coli* bzw. *S. aureus* Infektion (Abbildung 6) könnte auf eine möglicherweise gute Wirksamkeit eines Moleküls in der Art von IMPI-GST hinweisen. Daher sollten Moleküle wie IMPI-GST auch an *G. mellonella* getestet werden, die mit *E. coli* bzw. *S. aureus* infiziert wurden.

Während die antimikrobiellen Peptide in *G. mellonella* sowie in Insekten im Allgemeinen schon gut untersucht sind und wie bereits erläutert schon bald Therapieoptionen bestehen könnten, ist die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie die Entgiftung dieser noch nicht ausreichend verstanden. Das antioxidative *G. mellonella* Enzym GST wurde sowohl in der RNA-Seq sowie in der qRT-PCR nach Infektion untersucht. Im RNA-Seq Datensatz sind 17 verschiedene GST Transkripte zu finden, die 3 h nach der *E. coli* bzw. *S. aureus* Infektion jedoch kaum reguliert sind (Daten nicht gezeigt). Eine Tendenz zu einer Herabregulation ist bei manchen Isoformen zu erkennen, diese ist jedoch nur in

Einzelfällen signifikant. In der qRT-PCR war zum Zeitpunkt 3 h eine dezente Herabregulation der GST mRNA-Expression nach *E. coli* Infektion messbar, die anderen untersuchten Infektionen lösten keine Regulation aus (Abbildung 7). In den qRT-PCR Messungen der GST mRNA-Expression im Zeitverlauf nach *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* Infektion ist eine leichte Hochregulation, jedoch lediglich am Zeitpunkt 2 h, sichtbar (Abbildung 10).

Diese Ergebnisse sind überraschend, da GST als Entgiftungsenzym verstanden und somit die Hypothese einer Hochregulation bei Infektion aufgestellt wurde. Es konnte jedoch in den Versuchen keine deutliche Regulation der GST mRNA-Expression gemessen werden. Eine mögliche Erklärung stellt eine ungünstige Auswahl der Messzeitpunkte dar. Ein Anstieg der GST mRNA-Expression in den ersten zwei Stunden nach der Infektion sowie ein Anstieg zu einem Zeitpunkt später als 6 h kann somit nicht ausgeschlossen werden. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass das Enzym GST für *G. mellonella* im Rahmen von Infektionen nicht von großer Bedeutung ist, daher sollten stattdessen die Auswirkungen einer Infektion auf andere Entgiftungsenzyme untersucht werden. Möglicherweise setzt *G. mellonella* Entgiftungssysteme gegen reaktive Spezies ein, die bisher noch nicht bekannt oder verstanden sind.

Das *G. mellonella* Enzym NOS, welches die Bildung reaktiver Stickstoffspezies katalysiert, wurde ebenfalls in der RNA-Seq sowie in der qRT-PCR nach Infektion untersucht (Krishnan et al., 2006). Im RNA-Seq Datensatz sind drei verschiedene NOS Transkripte zu finden, die 3 h nach der *E. coli* bzw. *S. aureus* Infektion teilweise signifikant hochreguliert waren (Tabelle 15). In der qRT-PCR konnte dies bestätigt werden, die NOS mRNA-Expression von Larven 3 h nach *E. coli* bzw. *S. aureus* Infektion ist auch hier hochreguliert. Interessanterweise ist die NOS mRNA-Expression im Zeitraum von 2 h bis 6 h nach der *P. aeruginosa* Infektion herabreguliert. Die NOS mRNA-Expression nach *S. Typhimurium* Infektion ist nicht reguliert. Eine vorstellbare Erklärung der Herabregulation von NOS nach *Pseudomonas*-Infektion ist die durch diese Infektion sehr stark induzierte Phenoloxidase-Reaktion. Diese wurde beispielsweise im Rahmen der Versuche 3.2.2 und 3.2.3 in Form einer schnelleren und stärkeren Melanisierung

im Vergleich zu anderen systemischen Infektionen beobachtet. Die freien Radikale, die während einer NOS-Aktivität entstehen, können, wie auch die Radikale der Phenoloxidase-Reaktion auf den Organismus von *G. mellonella* zytotoxisch wirken (Krishnan et al., 2006; Wojda, 2017). Vermutlich wäre die gleichzeitige Induktion beider Abwehrmechanismen zu reaktiv und Organismus schädigend, sodass die NOS-Aktivität bei *P. aeruginosa* Infektion eher zurückgehalten wird. Um diese Hypothese zu stützen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Bei der Analyse des *G. mellonella* RNA-Seq Datensatzes fiel eine starke Hochregulation des Enzyms Alkalische-Ceramidase 1 (ACER1) in beiden Infektionsgruppen auf (Tabelle 16). Dies führte zu der Frage, welche Rolle ACER1 in der Immunantwort von *G. mellonella* spielt und ob es darüber hinaus auch Parallelen im menschlichen Organismus gibt.

Ceramide sind Sphingolipide und bestehen aus einem Sphingosinmolekül, das über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist. Für den humanen Organismus ist bekannt, dass Ceramidasen die Spaltung von Ceramiden in Sphingosin und eine freie Fettsäure katalysieren. Im Menschen sind fünf Ceramidasen beschrieben, deren Namen sich vom optimalen Umgebungs-pH ableiten: saure Ceramidase (AC), neutrale Ceramidase (NC) und drei Formen alkalischer Ceramidasen (ACER1, ACER2, ACER3). Die ACER Enzyme sind zueinander homolog, Unterschiede bestehen jedoch im Expressionsort. So wird ACER1 im Menschen vor allem in der Haut exprimiert und spielt dort eine Rolle bei der Keratinozyten-Differenzierung. ACER2 und ACER3 sind ubiquitär exprimiert sowie in der Plazenta besonders stark exprimiert (Mao und Obeid, 2008; Coant et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte dargelegt werden, dass auf Proteinebene hohe Übereinstimmungen zwischen den alkalischen Ceramidasen von Maus (Acer) und Mensch (ACER) im Vergleich zu ACER1 von *G. mellonella* bestehen (Tabelle 17, Abbildung 2). Das Enzym, das dabei dem *G. mellonella* Enzym ACER1 am Ähnlichsten ist, ist in Maus und Mensch die Alkalische Ceramidase 2 (Acer2/ACER2).

Wang *et al.* (2016) konnten zeigen, dass eine LPS-Stimulation verschiedener Maus-Zellen zu einer Herabregulation von Acer3 führt. Außerdem berichteten sie, dass Acer3-defiziente Mäuse stärker von Colitis und Colitis-assoziiierter Tumorgenese betroffen sind als Mäuse, die Acer3 regelhaft exprimieren. Zusätzlich zu den Ergebnissen zu Acer3 stellten sie darüber hinaus fest, dass eine LPS-Stimulation von Maus-Zellen (mononukleäre Zellen des Blutes sowie peritoneale Makrophagen) zu einer Hochregulation der mRNA von Acer2 führt. Unklar ist, inwieweit diese Erkenntnisse mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. *G. mellonella* ACER1 und *M. musculus* Acer2 weisen auf Proteinebene die höchsten Übereinstimmungen auf, jedoch lässt sich hieraus, wie bereits im Abschnitt 4.1 erläutert, noch keine identische Funktion für den jeweiligen Organismus ableiten. Die Hochregulation von ACER1 nach Stimulation in dieser Arbeit und die Hochregulation von Acer2 in der Arbeit von Wang *et al.* (2016) stellen also eine mögliche Gemeinsamkeit dar, die jedoch noch weiter untersucht werden muss.

Ebenso ist unklar, warum die deutliche Hochregulation von *G. mellonella* ACER1 in der mRNA-Seq mit $\log_{2}FC=7,07$ nach *E. coli* Infektion und $\log_{2}FC=5,57$ nach *S. aureus* Infektion nicht auch in den qRT-PCR Messungen sichtbar ist (Abbildung 8). Da die mit *E. coli* bzw. *S. aureus* stimulierten Proben für die RNA-Seq sowie für die qRT-PCR dieselben waren, kommt eigentlich nur eine technische Komplikation bei der qRT-PCR dieser Proben oder aber eine Ungenauigkeit der Sequenzierung in Betracht. Eine Hochregulation der *G. mellonella* ACER1 mRNA-Expression konnte in der qRT-PCR lediglich nach einer *P. aeruginosa* Infektion nachgewiesen werden, die *G. mellonella* ACER1 mRNA-Expression nach *S. Typhimurium* Infektion ist dagegen im Zeitraum von 2 h bis 6 h nach der Infektion herabreguliert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *G. mellonella* den Sphingolipid-Metabolismus in Abhängigkeit von der vorliegenden Infektion reguliert und zeigen, dass ACER1 kein allgemeiner Marker für Infektionen darstellen kann. Eine weitere Untersuchung des Sphingolipid-Metabolismus und speziell des ACER1 von *G. mellonella* bleibt auf Basis der hohen Expression in der mRNA-Seq weiterhin interessant.

Für den Sphingolipid-Metabolismus des Menschen wurden neben den Ceramidasen bereits weitere Enzyme und Reaktionsprodukte beschrieben. Ceramide werden durch Kinasen zu Ceramid-1-Phosphat (C1P) und Sphingosine zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert. Ceramide und S1P scheinen für die Immunität eine wichtige Rolle zu spielen (Maceyka und Spiegel, 2014). Erkenntnisse über den Sphingolipid-Metabolismus führten in der Vergangenheit bereits zur Entwicklung des Wirkstoffes Fingolimod (Gilenya®, Novartis). Dies ist ein S1P-Rezeptor-Modulator, der zur Behandlung der hochaktiven, schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt wird. Ein Subtyp des S1P-Rezeptors wird auf Lymphozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Auswanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten. Durch die Bindung des Wirkstoffes kommt es zu einem funktionellen Antagonismus, der die Migration von Lymphozyten in das ZNS inhibiert und somit die entzündliche Aktivität bei der Multiplen Sklerose positiv beeinflusst (Chaudhry et al., 2017). Dieses Beispiel aus der klinischen Medizin verdeutlicht das Potential, das im Sphingolipid-Metabolismus steckt und unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

Das Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1) ist ein Glykoprotein, das Heparine, Chitin sowie Kollagene binden kann, jedoch keine enzymatische Aktivität zur Spaltung von Chitin besitzt (Di Rosa et al., 2016). Chitin ist das nach der Cellulose zweithäufigste natürliche Kohlenhydratpolymer und ist ein Hauptbestandteil der Zellwände von Pilzen sowie des Exoskeletts von Wirbellosen. Durch die Fähigkeit Chitin zu binden liegt die Vermutung nahe, dass CHI3L1 eine Art Erkennungsprotein für Mikroben oder Pathogene sein könnte, die Chitin auf ihrer Oberfläche tragen (Adrangi und Faramarzi, 2013). Die Bildung von CHI3L1 erfolgt beim Menschen unter anderem in Neutrophilen, Monozyten und Osteoklasten und wird durch die Zytokine Interferon- γ (INF γ) sowie Interleukin-6 (IL-6) induziert (Di Rosa et al., 2016). Eine weitere Bezeichnung von CHI3L1 ist YKL-40, die sich auf die enthaltenen terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L) sowie die Größe von 40 kDa bezieht. Die Bedeutung des CHI3L1 für den Organismus wurde bereits im Menschen und im Mausmodell in

vielerlei Hinsicht untersucht. So wurden beispielsweise Zusammenhänge mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Mizoguchi, 2006), mit Asthmaerkrankungen (Specjalski und Jassem, 2011) oder mit Tumorerkrankungen (Johansen et al., 2006) hergestellt. Der im Kontext dieser Arbeit wichtigste Bezug ist jedoch der Bezug zur Immunität (Di Rosa et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte in mRNA-Seq Daten nun erstmals gezeigt werden, dass auch im Modellorganismus *G. mellonella* eine starke Hochregulation von CHI3L1 während einer Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* stattfindet (Tabelle 16). Diese Erkenntnisse aus der mRNA-Seq konnten jedoch nicht mit qRT-PCR Messungen bestätigt werden. Lediglich nach *P. aeruginosa* Infektion von *G. mellonella* sind in der qRT-PCR nennenswerte Hochregulationen von CHI3L1 nachzuweisen (Abbildung 8, Abbildung 11). Wie bereits für ACER1 beschrieben, kommen entweder eine technische Komplikation bei der qRT-PCR oder eine Ungenauigkeit bei der Sequenzierung als Erklärungsansätze in Betracht. Die qRT-PCR wurde an den Zeitpunkten 2, 3, 4 und 6 h durchgeführt. Di Rosa *et al.* (2013) untersuchten unter anderem die mRNA-Expression von CHI3L1 nach LPS- sowie nach IFN- γ -Stimulation von Makrophagen, die aus dem Blut gesunder Probanden isoliert wurden via qRT-PCR. Sie konnten zeigen, dass die Expression des CHI3L1 bei beiden Stimulationen nach 8 h sowie nach 24 h verstärkt ist und schlossen daraus auf eine wichtige Rolle der Chitinase während der frühen Phase der Immunantwort. Die Messungen von Di Rosa *et al.* fanden also nach einer längeren Inkubationszeit nach der Infektion statt. Dies lässt, ein zwischen dem Menschen und *G. mellonella* vergleichbarer Zeitabstand von einer Stimulation bis zur Hochregulation der CHI3L1 mRNA vorausgesetzt, auf eine zu frühe Messung der mRNA-Expression in der vorliegenden Arbeit schließen.

In ELISA-Messungen aus Zellkulturen mit *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* infizierten Raw 264.7 Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* infizierte Raw 264.7 Zellen das Protein CHI3L1 sezernieren (Abbildung 13). Eine Schwierigkeit der *P. aeruginosa* Infektion von Raw 264.7 Zellen war jedoch das Überleben der Zellen über 24 h. Die laut Resistenztestung für das Antibiotikum Gentamicin sensiblen Bakterien sollten 1 h nach der Infektion durch die Zugabe des Antibiotikums abgetötet

werden. Unter dem Mikroskop waren allerdings 3 h nach Infektion noch eindeutig bewegliche Bakterien im Medium zu erkennen. Eine Erklärung für das schnelle Absterben der Zellen ist also neben der hohen Virulenz von *P. aeruginosa* die unvollständige Abtötung der Bakterien im Zellkulturmedium und dadurch das vermutlich längere Einwirken der Infektion auf die Zellen.

Nordenbaek *et al.* (1999) zeigten, dass mit *S. pneumoniae* Bakteriämie hospitalisierte Patienten signifikant höhere Serumspiegel von YKL-40/CHI3L1 aufwiesen als gesunde Probanden. Die höchsten YKL-40/CHI3L1 Serumkonzentrationen wurden an Tag 1 gemessen, anschließend sank die Konzentration wieder ab. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen hohen YKL-40/CHI3L1 Serumkonzentrationen und einer schlechteren Prognose hergestellt werden. Marion *et al.* (2016) untersuchten die Veränderung der Sekretion von CHI3L1 während einer *P. aeruginosa* Infektion der Maus in aus dem Knochenmark gewonnenen Makrophagen via ELISA. Sie stimulierten zunächst für 2 h mit LPS und anschließend mit *P. aeruginosa*, dabei wurde jedoch im Vergleich zur vorliegenden Arbeit eine deutlich höhere Infektionsdosis (MOI=20) ausgewählt, außerdem erfolgte die Messung des CHI3L1 zu früheren Zeitpunkten (15, 45, 75 min). Die höchste CHI3L1-Sekretion wurde dabei bereits 15 min nach *P. aeruginosa* Infektion gemessen. Daraus schlossen sie, dass das Protein CHI3L1 vermutlich präformiert zur direkten Freisetzung in den Zellen gespeichert ist.

Aus diesen Arbeiten kann geschlussfolgert werden, dass die Zeitpunkte zur Messung der CHI3L1-Expression sowie der CHI3L1-Sekretion in der vorliegenden Arbeit ungünstig gewählt wurden. Die Bestimmung der CHI3L1 mRNA-Expression von *G. mellonella* sollte erneut zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion wiederholt werden, um längerfristige Auswirkungen einer Infektion erfassen zu können. Möglicherweise wird von den Makrophagen sezerniertes CHI3L1 im Medium schnell abgebaut oder gebunden und konnte aus diesem Grund zum Zeitpunkt 3 h nicht mehr gemessen werden. Um dies zu beantworten, sollten weitere ELISA-Messungen von CHI3L1 bereits in der ersten Stunde nach Infektion erfolgen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Protein CHI3L1 nun mittlerweile seit drei Jahrzehnten im Maus- und Humanorganismus untersucht wird. Wie bereits beschrieben, wurden vielerlei Zusammenhänge gefunden, eine genaue Funktion des Proteins ist jedoch noch immer unklar. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die Immunität von *G. mellonella* im Zusammenhang mit CHI3L1 steht. Die weitere Forschung zu CHI3L1 im Modellorganismus *G. mellonella* ist auch aufgrund der Abwesenheit einer adaptiven Immunität und der hierdurch möglichen isolierten Betrachtung des angeborenen Immunsystems vielversprechend und sollte für weitere Erkenntnisse fortgesetzt werden.

Ein weiteres Protein, das in *G. mellonella* nach Infektion mit *E. coli* bzw. *S. aureus* stark hochreguliert war, ist der Makrophagen-Mannose-Rezeptor 1 (MRC1), der in der Literatur auch oftmals als Makrophagen-Rezeptor (MR) oder als CD206 benannt wird. MRC1 wird für den menschlichen Organismus neben drei weiteren Rezeptoren zur Mannose-Rezeptor-Familie gezählt, die wiederum der C-typ Lektin Superfamilie, einer großen Gruppe an transmembran- sowie löslichen Rezeptoren, angehört (East und Isacke, 2002). Rødgaard-Hansen *et al.* (2014) konnten erstmals zeigen, dass MRC1 neben der Expression als Transmembranrezeptor auch als löslicher Rezeptor im Serum (sMR) gemessen werden kann. Die höchsten sMR-Konzentrationen wurden bei Patienten mit Sepsis, Organversagen oder Lebererkrankung gemessen. Auch Kjærgaard *et al.* (2014) berichteten über höhere sMR-Werte bei septischen Patienten im Vergleich zu kritisch kranken, nicht-septischen Patienten und bezeichneten sMR als vielversprechenden Biomarker der Sepsis.

Welche Rolle spielt MRC1 aber in der Immunität von *G. mellonella*?

MRC1 war sowohl in der mRNA-Seq als auch in der qRT-PCR bei allen vier untersuchten Infektionen hochreguliert (Tabelle 16, Abbildung 8). Im Zeitverlauf nach *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* Infektion wird deutlich, dass der Anstieg der mRNA-Expression von MRC1 rund 3 h nach der Infektion beginnt und sich ab hier weiter fortsetzt (Abbildung 11). Rødgaard-Hansen *et al.* (2014) und Kjærgaard *et al.* (2014) vermuteten bereits, dass MRC1 bei kritischen Infektionen unabhängig von der Art des Pathogens erhöht ist. Die vorliegenden

Ergebnisse sind also mit diesen Untersuchungen in Einklang zu bringen. Sie bestätigen darüber hinaus die Hypothese, dass MRC1 nicht nur im Menschen sondern auch in *G. mellonella* eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunität einnimmt. Allerdings sind noch Fragen ungeklärt, zum Beispiel ob es in *G. mellonella* ebenfalls eine lösliche Form des MRC1 gibt und inwieweit sich die Ergebnisse aus *G. mellonella* mit den Ergebnissen aus den klinischen Untersuchungen am Menschen vergleichen lassen. Unklar ist ebenfalls die Bedeutung der Ergebnisse der MRC1 ELISA-Messungen aus *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* infizierten Raw 264.7 Zellen (Abbildung 13). Während die Kurven der Mock-Gruppe und der *P. aeruginosa* Infektion einen ähnlichen Verlauf zeigen, sinkt die MRC1 Konzentration in den mit *S. Typhimurium* infizierten Zellen stetig ab. Es kann in diesem Versuchsaufbau nicht differenziert werden, ob der lösliche oder der gebundene Rezeptor detektiert wurde, durch die Lyse der Zellen ist allerdings davon auszugehen, dass vorrangig der gebundene Rezeptor gemessen wurde. Um weitere Erkenntnisse zu MRC1 im *G. mellonella* Modellorganismus zu erlangen ist es notwendig in Erfahrung zu bringen, ob *G. mellonella* ebenfalls eine lösliche Form des Rezeptors exprimiert und inwieweit sich nach einer Infektion die Expression des gebundenen und des löslichen Rezeptors unterscheiden.

Das vierte Protein, das durch die mRNA-Seq nach *E. coli* bzw. *S. aureus* Infektion in den Fokus gerückt ist, ist der *G. mellonella* Leukozyten-Elastase-Inhibitor 1, der in der Literatur meist als SERPINB1 bezeichnet wird. Serpine stellen eine Superfamilie stark konservierter Proteine dar, die in allen Eukaryoten vorkommen und nach ihrer Fähigkeit Serin-Proteasen zu Inhibieren benannt wurden. Es werden jedoch darüber hinaus viele weitere Funktionen vermutet, wie beispielsweise eine Rolle in der embryologischen Entwicklung, in der Entwicklung von Immunzellen oder der Modulation der Apoptose (Gatto et al., 2013; Torriglia et al., 2017). Mangan *et al.* (2008) beschäftigten sich vorrangig mit der Klasse der B Serpine und verdeutlichten die Rolle vor allem von SERPINB1, SERPINB6 und SERPINB9 für die Immunität. Die meisten Serpin-Formen werden nach extrazellulär sezerniert. Für SERPINB1 des Menschen ist

jedoch eine intrazelluläre Lokalisation, vorrangig in Granulozyten und Makrophagen, beschrieben. Hier kann es seiner Funktion nachgehen, dem Schutz der Zelle vor der neutrophilen Elastase, eine Protease, die in Neutrophilen und Makrophagen exprimiert wird und bei Stressreaktionen oder zur Phagozytose im Zytoplasma wirkt. Proteasen sind wichtige Effektoren des Immunsystems, sie degradieren eingedrungene Erreger sowie infizierte, abnorme oder fremde Zellen (Mangan et al., 2008; Torriglia et al., 2017).

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass SERPINB1 auch für *G. mellonella* ein wichtiger Baustein des Immunsystems darstellt. SERPINB1 ist in der RNA-Seq nach *E. coli* sowie nach *S. aureus* Infektion deutlich hochreguliert. In der qRT-PCR konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Außerdem ist SERPINB1 in *G. mellonella* auch nach *P. aeruginosa* und nach *S. Typhimurium* Infektion deutlich hochreguliert. Die Regulation nach allen vier untersuchten Infektionen weist auf eine Funktion in der Pathogenabwehr hin, die unabhängig von der Art des Pathogens in einem großen Ausmaß stattfindet.

Eindrückliche Ergebnisse zur Funktion von SERPINB1 konnten auch Benarafa et al. (2007) in einem Modell SerpinB1-defizienter Mäuse zeigen. Wildtyp (WT) sowie SerpinB1-defiziente Mäuse wurden intranasal mit *P. aeruginosa* infiziert, hierbei kamen ein nicht-mukoider Stamm PAO1 sowie ein mukoider Stamm PA M57-15, der aus einem Patienten mit cystischer Fibrose isoliert wurde, zum Einsatz. Die PAO1-infizierten Serpin-defizienten Mäuse zeigten eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit und ein kürzeres medianes Überleben im Vergleich zu den WT Mäusen. Außerdem konnte eine Ausbreitung von der Atemwegsinfektion hin zu einer systemischen Infektion bei den SerpinB1-defizienten Mäusen, nicht jedoch bei den WT Mäusen gezeigt werden. Die WT Mäuse waren in der Lage, den Stamm PA M57-15 zu beseitigen, wohingegen SerpinB1-defiziente Mäuse dazu nicht in der Lage waren. In mehreren *in vitro* Studien konnten Benarafa et al. (2007) jedoch keine direkte antibakterielle Aktivität von SERPINB1 nachweisen. Daraus schlussfolgerten sie, dass die positive Wirkung von SerpinB1 auf den Verlauf von *P. aeruginosa* Infektionen in der Inhibition der den Organismus schädigenden neutrophilen Serinproteasen begründet liegt. Dies würde erklären, warum SERPINB1 in *G. mellonella*

unabhängig von der Art der Infektion hochreguliert ist. SERPINB1 stellt also auch in *G. mellonella* einen potenziellen Marker für systemische bakterielle Infektionen dar.

4.4 Grenzen des *G. mellonella* Alternativmodells und Ausblick

Abschließend ist zum Einsatz von *G. mellonella* als Infektionsmodell anzumerken, dass es sich trotz aller standardisierten Laborbedingungen und Präzisionsinstrumenten noch immer um ein Modell lebendiger Organismen handelt. Es wurde die Erfahrung gemacht, dass die Tiere anfällig sind für Stressreaktionen, wie sie beispielsweise bei einem Transport entstehen. Daher wurden die Larven in der vorliegenden Arbeit immer zunächst eine Woche in den Zuchtboxen im Inkubator akklimatisiert sowie die Umgebungsbedingungen wie beispielsweise Temperatur, Umgebung oder das Substrat standardisiert. Trotz dieser standardisierten Bedingungen können individuelle Stressreaktionen der Tiere nie vollständig ausgeschlossen werden. Außerdem sind Versuche, die mit sehr geringen Infektionsdosen, wie beispielsweise 5 PAO1 pro Larve, arbeiten, besonders anfällig für Schwankungen der Ergebnisse. Trotz sorgfältigstem Arbeiten ist eine geringe Abweichung von der gewünschten Infektionsdosis nie komplett auszuschließen. In der Titration verschiedener Infektionsdosen von *P. aeruginosa* (Abbildung 3) wurde jedoch gezeigt, dass gerade hier eine kleine Änderung der Infektionsdosis von einzelnen Bakterien pro Larve zu stark abweichenden Resultaten führen kann. Diese Besonderheiten treten jedoch zumindest zum Teil auch beim Einsatz anderer *in vivo* Modelle auf und können durch eine ausreichende Anzahl an Untersuchungen, Replikate und Kontrollgruppen minimiert werden.

Unter standardisierten Bedingungen gezüchtete *G. mellonella* Larven können derzeit lediglich von einem Hersteller bezogen werden (TruLarv™, BioSystems Technology). Diese Larven sind vergleichsweise teuer und es besteht ein langer Anlieferungsweg, was einen großen Vorteil des Modells wieder zunichtemacht. Derzeit noch deutlich weiter verbreitet sind daher Larven, die nicht standardisiert als Tierfuttermittel gezüchtet wurden. Bei diesen Larven ist es jedoch nicht auszuschließen, dass ein unterschiedlicher Genotyp zwischen den Tieren verschiedener Züchter vorliegt. Bei nicht standardisierter Aufzucht der Larven ist

es außerdem möglich, dass unterschiedliche Umgebungen und Futtermittel beispielsweise eine veränderte bakterielle Flora bewirken, die dann wiederum die Empfänglichkeit für und die Reaktionen auf Infektionen beeinflusst (Cook und McArthur, 2013).

Außerdem sind im Vergleich zum Beispiel zum Modell *D. melanogaster* noch keine genetisch veränderten Individuen erhältlich. Um das *G. mellonella* Infektionsmodell weiter zu etablieren, sollte an diesen Punkten gearbeitet werden. Diese Notwendigkeit wurde auch durch Cook und McArthur (2013) sowie durch Tsai *et al.* (2016) verdeutlicht. Ein bereits erwähnter großer Fortschritt im Modell *G. mellonella* war die Genomsequenzierung im Jahr 2018 (Lange *et al.*, 2018). Die vorliegende Arbeit konnte nun darauf aufbauend weitere Erkenntnisse zur Veränderung des Transkriptoms nach spezifischen Infektionen liefern.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Immunantwort von *G. mellonella* Larven auf die Bakterien *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* und *E. coli* untersucht. Durch die Analyse des Transkriptoms von *G. mellonella* nach einer systemischen Infektion sollten neue spezifische Infektionsmarker oder therapeutische Ansatzpunkte für den klinischen Einsatz gefunden werden. Außerdem sollten Differenzen in der Immunantwort der Larven auf die verschiedenen Pathogene bestimmt werden. Als methodische Grundlage kam eine Transkriptom-Sequenzierung (RNA-Seq) zum Einsatz. Diese wurde durch qRT-PCR- sowie ELISA-Messungen ergänzt, um ein umfassendes Bild zu generieren sowie auch einen Vergleich der Methoden und ihren Grenzen zu ermöglichen. Des Weiteren wurde über eine Auszählung der Zellen in der Hämolymphe die Immunreaktion von *G. mellonella* nach systemischer Applikation von Pathogenen untersucht und durch Bakterienanzucht aus *G. mellonella* Hämolymphe die Fähigkeit der Larven die Pathogene zu eliminieren bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Infektion eine Regulation vieler Transkripte durch RNA-Seq messbar ist. Einige Transkripte sind dabei stark reguliert, jedoch in ihrer Funktion noch unbekannt. Die Abwehrmechanismen von *G. mellonella* unterscheiden sich in Abhängigkeit vom injizierten Pathogen. *S. Typhimurium* konnte von *G. mellonella* bei systemischer Infektion eliminiert werden und die Infektion führte nicht zu einem Untergang der Zellen in der Hämolymphe. Bei einer systemischen Infektion mit *P. aeruginosa* war ein Eliminieren der Bakterien aus der Hämolymphe trotz geringer Infektionsdosis überwiegend nicht möglich und es kam zu einer starken Abnahme der Zellzahl sowie zu einem schnellen Versterben der Tiere. Das Protein SERPINB1 könnte einen universellen Marker für systemische Infektionen in *G. mellonella* darstellen und sollte daher weiter untersucht werden. Darüber hinaus konnten die Bedeutung der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten bei Infektionen sowie Beispiele für bereits bestehende, vielversprechende Ansätze dargelegt werden. Zusammenfassend ist der Einsatz von *G. mellonella* Larven ein für die grundlegende Infektionsforschung geeignetes und erfolgreiches Modell, an dem das angeborene Immunsystem isoliert und *in vivo* betrachtet werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- ADRANGI, S. & FARAMARZI, M. A. 2013. *From bacteria to human: A journey into the world of chitinases*. Biotechnology Advances, 31, 1786-1795.
- AEISSEN, V. 2018. *Galleria mellonella as an invertebrate model to study Salmonella Typhimurium infection and invasion*, Masterarbeit, Universität Tübingen.
- ALGHORIBI, M. F., GIBREEL, T. M., DODGSON, A. R., BEATSON, S. A. & UPTON, M. 2014. *Galleria mellonella infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic E. coli*. PloS one, 9, e101547-e101547.
- ANDREJKO, M. & MIZERSKA-DUDKA, M. 2012. *Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase B on level and activity of immune proteins/peptides of Galleria mellonella hemolymph*. Journal of insect science (Online), 12, 88-88.
- ANDREJKO, M., MIZERSKA-DUDKA, M. & JAKUBOWICZ, T. 2009. *Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of Galleria mellonella infected with Pseudomonas aeruginosa*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 152, 118-123.
- ARTEAGA BLANCO, L. A., CRISPIM, J. S., FERNANDES, K. M., DE OLIVEIRA, L. L., PEREIRA, M. F., BAZZOLLI, D. M. S. & MARTINS, G. F. 2017. *Differential cellular immune response of Galleria mellonella to Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cell Tissue Res, 370, 153-168.
- ASAI, M., SHEEHAN, G., LI, Y., ROBERTSON, B. D., KAVANAGH, K., LANGFORD, P. R. & NEWTON, S. M. 2021. *Innate Immune Responses of Galleria mellonella to Mycobacterium bovis BCG Challenge Identified Using Proteomic and Molecular Approaches*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11.
- BENARAFÁ, C., PRIEBE, G. P. & REMOLD-O'DONNELL, E. 2007. *The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in Pseudomonas aeruginosa infection*. The Journal of experimental medicine, 204, 1901-1909.
- BERGIN, D., REEVES, E. P., RENWICK, J., WIENTJES, F. B. & KAVANAGH, K. 2005. *Superoxide production in Galleria mellonella hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils*. Infection and immunity, 73, 4161-4170.
- BISMUTH, H. D., BRASSEUR, G., EZRATY, B. & AUSSEL, L. 2021. *Bacterial Genetic Approach to the Study of Reactive Oxygen Species Production in Galleria mellonella During Salmonella Infection*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11.
- BOMAN, H. G. & HULTMARK, D. 1987. *Cell-free immunity in insects*. Annu Rev Microbiol, 41, 103-26.
- BOTELHO, J., GROSSO, F. & PEIXE, L. 2019. *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa - Mechanisms, epidemiology and evolution*. Drug Resistance Updates, 44.

- BRADY, D., GRAPPUTO, A., ROMOLI, O. & SANDRELLI, F. 2019. *Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications*. International Journal of Molecular Sciences, 20, 5862.
- BROWN, S. E., HOWARD, A., KASPRZAK, A. B., GORDON, K. H. & EAST, P. D. 2009. *A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth Galleria mellonella*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39, 792-800.
- BURMESTER, T. & HANKELN, T. 2007. *The respiratory proteins of insects*. Journal of Insect Physiology, 53, 285-294.
- CERENIUS, L., LEE, B. L. & SÖDERHÄLL, K. 2008. *The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity*. Trends in Immunology, 29, 263-271.
- CHARRIÈRE, J.-D. & IMDORF, A. 1999. *Protection of honey combs from wax moth damage*. American Bee Journal, 139, 627-630.
- CHAUDHRY, B. Z., COHEN, J. A. & CONWAY, D. S. 2017. *Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Multiple Sclerosis*. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 14, 859-873.
- COANT, N., SAKAMOTO, W., MAO, C. & HANNUN, Y. A. 2017. *Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease*. Advances in biological regulation, 63, 122-131.
- COOK, S. M. & MCARTHUR, J. D. 2013. *Developing Galleria mellonella as a model host for human pathogens*. Virulence, 4, 350-353.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. Science, 284, 1318-1322.
- CRUMP, J. A., SJÖLUND-KARLSSON, M., GORDON, M. A. & PARRY, C. M. 2015. *Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections*. Clin Microbiol Rev, 28, 901-37.
- DESBOIS, A. P. & COOTE, P. J. 2011. *Wax moth larva (Galleria mellonella): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66, 1785-1790.
- DI ROSA, M., DISTEFANO, G., ZORENA, K. & MALAGUARNERA, L. 2016. *Chitinases and immunity: Ancestral molecules with new functions*. Immunobiology, 221, 399-411.
- DI ROSA, M., MALAGUARNERA, G., DE GREGORIO, C., DRAGO, F. & MALAGUARNERA, L. 2013. *Evaluation of CHI3L-1 and CHIT-1 Expression in Differentiated and Polarized Macrophages*. Inflammation, 36, 482-492.
- DICKMAN, A. 1933. *Studies on the waxmoth, Galleria mellonella, with particular reference to the digestion of wax by the larvae*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 3, 223-246.
- DZIARSKI, R. & GUPTA, D. 2006. *The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)*. Genome biology, 7, 232-232.
- EAST, L. & ISACKE, C. M. 2002. *The mannose receptor family*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1572, 364-386.

- EISENHARDT, M., SCHLUPP, P., HÖFER, F., SCHMIDTS, T., HOFFMANN, D., CZERMAK, P., PÖPPEL, A.-K., VILCINSKAS, A. & RUNKEL, F. 2018. *The therapeutic potential of the insect metalloproteinase inhibitor against infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71, 316-328.
- ENAYATI, A. A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. 2005. *Insect glutathione transferases and insecticide resistance*. Insect Mol Biol, 14, 3-8.
- ENGEL, C., BRUNKHORST, F. M., BONE, H.-G., BRUNKHORST, R., GERLACH, H., GROND, S., GRUENDLING, M., HUHLE, G., JASCHINSKI, U., JOHN, S., MAYER, K., OPPERT, M., OLTHOFF, D., QUINTEL, M., RAGALLER, M., ROSSAINT, R., STUBER, F., WEILER, N., WELTE, T., BOGATSCH, H., HARTOG, C., LOEFFLER, M. & REINHART, K. 2007. *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Medicine, 33, 606-618.
- ERDEM, M., KÜÇÜK, C., BÜYÜKGÜZEL, E. & BÜYÜKGÜZEL, K. 2016. *Ingestion of the anti-bacterial agent, gemifloxacin mesylate, leads to increased gst activity and peroxidation products in hemolymph of Galleria mellonella l. (Lepidoptera: pyralidae)*. Arch Insect Biochem Physiol, 93, 202-209.
- FLEISCHMANN-STRUZEK, C., SCHWARZKOPF, D. & REINHART, K. 2021. *Sepsis incidence in Germany and worldwide : Current knowledge and limitations of research using health claims data*. Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin, 1-5.
- FLEISCHMANN, C., THOMAS-RUEDDEL, D. O., HARTMANN, M., HARTOG, C. S., WELTE, T., HEUBLEIN, S., DENNLER, U. & REINHART, K. 2016. *Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus*. Dtsch Arztebl International, 113, 159-66.
- GATTO, M., IACCARINO, L., GHIRARDELLO, A., BASSI, N., PONTISSO, P., PUNZI, L., SHOENFELD, Y. & DORIA, A. 2013. *Serpins, Immunity and Autoimmunity: Old Molecules, New Functions*. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 45, 267-280.
- GORDON, M. A. 2008. *Salmonella infections in immunocompromised adults*. Journal of Infection, 56, 413-422.
- HARA, S. & YAMAKAWA, M. 1995. *Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, Bombyx mori*. J Biol Chem, 270, 29923-7.
- HEHLGANS, T. & PFEFFER, K. 2005. *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 115, 1-20.
- HOFFMANN, J. A. 1995. *Innate immunity of insects*. Current Opinion in Immunology, 7, 4-10.
- HUBER, P., BASSO, P., REBOUD, E. & ATTRÉE, I. 2016. *Pseudomonas aeruginosa renews its virulence factors*. Environmental Microbiology Reports, 8, 564-571.
- HULTMARK, D. 1993. *Immune reactions in Drosophila and other insects: a model for innate immunity*. Trends in Genetics, 9, 178-183.

- JANDER, G., RAHME, L. G. & AUSUBEL, F. M. 2000. *Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects*. Journal of bacteriology, 182, 3843-3845.
- JOHANSEN, J. S., JENSEN, B. V., ROSLIND, A., NIELSEN, D. & PRICE, P. A. 2006. *Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 15, 194-202.
- KIM, C., LEE, J., KIM, I., SEO, S., SON, S., LEE, K. & LEE, I. 2004. *Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, Galleria mellonella*. Molecules and cells, 17, 262-6.
- KIM, C. H., SHIN, Y. P., NOH, M. Y., JO, Y. H., HAN, Y. S., SEONG, Y. S. & LEE, I. H. 2010. *An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms*. The Journal of biological chemistry, 285, 25243-25250.
- KJÆRGAARD, A. G., RØDGAARD-HANSEN, S., DIGE, A., KROG, J., MØLLER, H. J. & TØNNESEN, E. 2014. *Monocyte expression and soluble levels of the haemoglobin receptor (CD163/sCD163) and the mannose receptor (MR/sMR) in septic and critically ill non-septic ICU patients*. PloS one, 9, e92331-e92331.
- KRISHNAN, N., HYRŠL, P. & ŠIMEK, V. 2006. *Nitric oxide production by hemocytes of larva and pharate prepupa of Galleria mellonella in response to bacterial lipopolysaccharide: Cytoprotective or cytotoxic?* Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 142, 103-110.
- LANGE, A., BEIER, S., HUSON, D. H., PARUSEL, R., IGLAUER, F. & FRICK, J.-S. 2018. *Genome Sequence of Galleria mellonella (Greater Wax Moth)*. Genome announcements, 6, e01220-17.
- LAVINE, M. D. & STRAND, M. R. 2002. *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochem Mol Biol, 32, 1295-309.
- LI, D., SCHERFER, C., KORAYEM, A. M., ZHAO, Z., SCHMIDT, O. & THEOPOLD, U. 2002. *Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 919-928.
- LI, J., HOU, R., NIU, X., LIU, R., WANG, Q., WANG, C., LI, X., HAO, Z., YIN, G. & ZHANG, K. 2016. *Comparison of microarray and RNA-Seq analysis of mRNA expression in dermal mesenchymal stem cells*. Biotechnology Letters, 38, 33-41.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method*. Methods, 25, 402-408.
- LOH, J. M. S., ADENWALLA, N., WILES, S. & PROFT, T. 2013. *Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus*. Virulence, 4, 419-428.
- LYCZAK, J. B., CANNON, C. L. & PIER, G. B. 2000. *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist*¹*Address for correspondence: Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. Microbes and Infection, 2, 1051-1060.

- MACEYKA, M. & SPIEGEL, S. 2014. *Sphingolipid metabolites in inflammatory disease*. *Nature*, 510, 58-67.
- MAJOWICZ, S. E., MUSTO, J., SCALLAN, E., ANGULO, F. J., KIRK, M., O'BRIEN, S. J., JONES, T. F., FAZIL, A., HOEKSTRA, R. M. & STUDIES, F. T. I. C. O. E. D. B. O. I. 2010. *The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis*. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 882-889.
- MANGAN, M. S. J., KAISERMAN, D. & BIRD, P. I. 2008. *The role of serpins in vertebrate immunity*. *Tissue Antigens*, 72, 1-10.
- MAO, C. & OBEID, L. M. 2008. *Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781, 424-434.
- MARION, C. R., WANG, J., SHARMA, L., LOSIER, A., LUI, W., ANDREWS, N., ELIAS, J. A., KAZMIERCZAK, B. I., ROY, C. R. & DELA CRUZ, C. S. 2016. *Chitinase 3-Like 1 (Chil1) Regulates Survival and Macrophage-Mediated Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor Alpha during Pseudomonas aeruginosa Pneumonia*. *Infection and immunity*, 84, 2094-2104.
- MARIONI, J. C., MASON, C. E., MANE, S. M., STEPHENS, M. & GILAD, Y. 2008. *RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays*. *Genome Res*, 18, 1509-17.
- MARTINEZ-POMARES, L. 2012. *The mannose receptor*. *Journal of Leukocyte Biology*, 92, 1177-1186.
- MIYOSHI, S.-I. & SHINODA, S. 2000. *Microbial metalloproteases and pathogenesis*. *Microbes and Infection*, 2, 91-98.
- MIZOGUCHI, E. 2006. *Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells*. *Gastroenterology*, 130, 398-411.
- MONACK, D. M., RAUPACH, B., HROMOCKYJ, A. E. & FALKOW, S. 1996. *Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 9833-9838.
- NORDENBAEK, C., JOHANSEN, J. S., JUNKER, P., BORREGAARD, N., SØRENSEN, O. & PRICE, P. A. 1999. *YKL-40, a Matrix Protein of Specific Granules in Neutrophils, Is Elevated in Serum of Patients with Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization*. *The Journal of Infectious Diseases*, 180, 1722-1726.
- NYS, K., CUYPERS, B., BERGHMANS, H., HAMMERSCHMID, D., MOENS, L., DEWILDE, S. & VAN DOORSLAER, S. 2020. *Surprising differences in the respiratory protein of insects: A spectroscopic study of haemoglobin from the European honeybee and the malaria mosquito*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868, 140413.
- OÑATE-GARZÓN, J., MANRIQUE-MORENO, M., TRIER, S., LEIDY, C., TORRES, R. & PATIÑO, E. 2017. *Antimicrobial activity and interactions of cationic peptides derived from Galleria mellonella cecropin D-like peptide with model membranes*. *The Journal of Antibiotics*, 70, 238-245.

- PEARSON, W. R. 2013. *An introduction to sequence similarity ("homology") searching*. Curr Protoc Bioinformatics, Chapter 3, Unit3 1.
- PELEG, A. Y., JARA, S., MONGA, D., ELIOPOULOS, G. M., MOELLERING, R. C., JR. & MYLONAKIS, E. 2009. *Galleria mellonella as a model system to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53, 2605-2609.
- PEREIRA, T. C., DE BARROS, P. P., FUGISAKI, L. R. D. O., ROSSONI, R. D., RIBEIRO, F. D. C., DE MENEZES, R. T., JUNQUEIRA, J. C. & SCORZONI, L. 2018. *Recent Advances in the Use of Galleria mellonella Model to Study Immune Responses against Human Pathogens*. Journal of fungi (Basel, Switzerland), 4, 128.
- PRICE, C. D. & RATCLIFFE, N. A. 1974. *A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders*. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 147, 537-549.
- RAHMAN, M. M. & MCFADDEN, G. 2006. *Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens*. PLOS Pathogens, 2, e4.
- RAMARAO, N., NIELSEN-LEROUX, C. & LERECLUS, D. 2012. *The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis*. Journal of visualized experiments : JoVE, e4392-e4392.
- RASCHKE, W. C., BAIRD, S., RALPH, P. & NAKOINZ, I. 1978. *Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus*. Cell, 15, 261-267.
- RATCLIFFE, N. A. & GAGEN, S. J. 1977. *Studies on the in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in Galleria mellonella*. Tissue and Cell, 9, 73-85.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2020. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019, Berlin 2020*.
- RØDGAARD-HANSEN, S., RAFIQUE, A., CHRISTENSEN, P. A., MANIECKI, M. B., SANDAHL, T. D., NEXØ, E. & MØLLER, H. J. 2014. *A soluble form of the macrophage-related mannose receptor (MR/CD206) is present in human serum and elevated in critical illness*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 52, 453-461.
- RUDD, K. E., JOHNSON, S. C., AGESA, K. M., SHACKELFORD, K. A., TSOI, D., KIEVLAN, D. R., COLOMBARA, D. V., IKUTA, K. S., KISSOON, N., FINFER, S., FLEISCHMANN-STRUZEK, C., MACHADO, F. R., REINHART, K. K., ROWAN, K., SEYMOUR, C. W., WATSON, R. S., WEST, T. E., MARINHO, F., HAY, S. I., LOZANO, R., LOPEZ, A. D., ANGUS, D. C., MURRAY, C. J. L. & NAGHAVI, M. 2020. *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. The Lancet, 395, 200-211.
- SCHMIT, A. R., ROWLEY, A. F. & RATCLIFFE, N. A. 1977. *The role of Galleria mellonella hemocytes in melanin formation*. Journal of Invertebrate Pathology, 29, 232-234.
- SCHUHMANN, B., SEITZ, V., VILCINSKAS, A. & PODSIADLOWSKI, L. 2003. *Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, Galleria mellonella*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 53, 125-133.

- SHEEHAN, G., GARVEY, A., CROKE, M. & KAVANAGH, K. 2018. *Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ?* *Virulence*, 9, 1625-1639.
- SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., SEYMOUR, C. W., SHANKAR-HARI, M., ANNANE, D., BAUER, M., BELLOMO, R., BERNARD, G. R., CHICHE, J.-D., COOPERSMITH, C. M., HOTCHKISS, R. S., LEVY, M. M., MARSHALL, J. C., MARTIN, G. S., OPAL, S. M., RUBENFELD, G. D., VAN DER POLL, T., VINCENT, J.-L. & ANGUS, D. C. 2016. *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *JAMA*, 315, 801-810.
- SÖDERHÄLL, K. & CERENIUS, L. 1998. *Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity*. *Current Opinion in Immunology*, 10, 23-28.
- SOWA-JASIŁEK, A., ZDYBICKA-BARABAS, A., STĄCZEK, S., WYDRYCH, J., MAK, P., JAKUBOWICZ, T. & CYTRYŃSKA, M. 2014. *Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: Galleria mellonella anionic peptide 2 and lysozyme*. *Peptides*, 53, 194-201.
- SPECJALSKI, K. & JASSEM, E. 2011. *YKL-40 Protein is a Marker of Asthma*. *Journal of Asthma*, 48, 767-772.
- STOLL, B. J., HANSEN, N. I., SÁNCHEZ, P. J., FAIX, R. G., POINDEXTER, B. B., VAN MEURS, K. P., BIZZARRO, M. J., GOLDBERG, R. N., FRANTZ, I. D., 3RD, HALE, E. C., SHANKARAN, S., KENNEDY, K., CARLO, W. A., WATTERBERG, K. L., BELL, E. F., WALSH, M. C., SCHIBLER, K., LAPTOOK, A. R., SHANE, A. L., SCHRAG, S. J., DAS, A., HIGGINS, R. D., EUNICE KENNEDY SHRIVER NATIONAL INSTITUTE OF CHILD, H. & HUMAN DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH, N. 2011. *Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues*. *Pediatrics*, 127, 817-826.
- TOJO, S., NAGANUMA, F., ARAKAWA, K. & YOKOO, S. 2000. *Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, Galleria mellonella*. *J Insect Physiol*, 46, 1129-1135.
- TORRIGLIA, A., MARTIN, E. & JAADANE, I. 2017. *The hidden side of SERPINB1/Leukocyte Elastase Inhibitor*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 62, 178-186.
- TSAI, C. J., LOH, J. M. & PROFT, T. 2016. *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. *Virulence*, 7, 214-29.
- VILCINSKAS, A. 2011. *ANTI-infective Therapeutics from the Lepidopteran Model Host Galleria mellonella*. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 1240-1245.
- VILCINSKAS, A. & WEDDE, M. 2002. *Insect inhibitors of metalloproteinases*. *IUBMB Life*, 54, 339-43.
- VOGEL, H., ALTINCICEK, B., GLÖCKNER, G. & VILCINSKAS, A. 2011. *A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host Galleria mellonella*. *BMC Genomics*, 12, 308.
- WAND, M. E., MCCOWEN, J. W. I., NUGENT, P. G. & SUTTON, J. M. 2013. *Complex interactions of Klebsiella pneumoniae with the host immune*

- system in a Galleria mellonella infection model*. Journal of Medical Microbiology, 62, 1790-1798.
- WANG, K., XU, R., SNIDER, A. J., SCHRANDT, J., LI, Y., BIALKOWSKA, A. B., LI, M., ZHOU, J., HANNUN, Y. A., OBEID, L. M., YANG, V. W. & MAO, C. 2016. *Alkaline ceramidase 3 deficiency aggravates colitis and colitis-associated tumorigenesis in mice by hyperactivating the innate immune system*. Cell Death Dis, 7, e2124.
- WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. 2009. *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nature reviews. Genetics, 10, 57-63.
- WEDDE, M., WEISE, C., KOPACEK, P., FRANKE, P. & VILCINSKAS, A. 1998. *Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, Galleria mellonella*. Eur J Biochem, 255, 535-43.
- WHO. 2020. *Sepsis: Key facts* [Online]. World Health Organisation. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis> [Accessed 11.04. 2021].
- WOJDA, I. 2017. *Immunity of the greater wax moth Galleria mellonella*. Insect Sci, 24, 342-357.
- WOJDA, I., STANIEC, B., SUŁEK, M. & KORDACZUK, J. 2020. *The greater wax moth Galleria mellonella: biology and use in immune studies*. Pathogens and disease, 78, ftaa057.
- WU, D. C., CHAN, W. W., METELITSA, A. I., FIORILLO, L. & LIN, A. N. 2011. *Pseudomonas Skin Infection*. American Journal of Clinical Dermatology, 12, 157-169.
- YU, X.-Q. & KANOST, M. R. 2002. *Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid*. European Journal of Biochemistry, 269, 1827-1834.
- ZASLOFF, M. 2002. *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 415, 389-395.
- ZDYBICKA-BARABAS, A., STĄCZEK, S., MAK, P., SKRZYPIEC, K., MENDYK, E. & CYTRYŃSKA, M. 2013. *Synergistic action of Galleria mellonella apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria*. Biochim Biophys Acta, 1828, 1449-56.
- ZIPPER, H., BRUNNER, H., BERNHAGEN, J. & VITZTHUM, F. 2004. *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. Nucleic acids research, 32, e103-e103.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Julia-Stefanie Frick durchgeführt.

Die Konzeption des Projektes erfolgte durch Dr. rer. nat. Anna Lange.

Die Probengewinnung für die RNA-Seq (3.1) erfolgte durch Dr. Anna Lange. Die Sequenzierung der Proben sowie die bioinformatische Aufarbeitung erfolgte durch c.ATG, Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universitätsklinikum Tübingen. Die Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte durch mich.

Die Versuche zur Charakterisierung von systemischen *P. aeruginosa* bzw. *S. Typhimurium* Infektionen (3.2) wurden, nach Einarbeitung durch Andrea Schäfer, von mir, mit Unterstützung durch Andrea Schäfer durchgeführt. Bei der Auszählung der Hämozyten aus *G. mellonella*-Hämolymphe (3.2.3) haben außerdem Ronja Dobritz, M.Sc. und Tinotenda Pesanai mitgewirkt.

Die Versuche zur Wirkung systemischer Infektionen auf die Expression infektionsspezifischer Gene (3.3) wurden, nach Einarbeitung durch Andrea Schäfer, von mir, mit Unterstützung durch Andrea Schäfer durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch Dr. Anna Lange, durch mich.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 06.12.2021

8 Anhang

Tabelle 21: *G. mellonella* Aminosäuresequenzen der zu untersuchenden Proteine

Es sind die Aminosäuresequenzen von ACER1, CHI3L1, MRC1 und SERPINB1 aus der RNA-Seq aufgelistet.

Name	Sequenzierte Aminosäuresequenz
ACER1 alkaline ceramidase isoform X1 [<i>Galleria mellonella</i>]	MVVGLSSAYFHATLSLVGQLLDELAIWVMTAFAMFFPKRYFPNFLGNNRRILAFYSSVFSVSTG FLVMHPAANAFALMTLALPAIGFLYKELNRVKCARVYRLGRCVAVCLLAMFCWIIDRLFCDAWLSI DFPYMHGVWHILFIASYTALVLFAYFNVSEERPEQKQLKYWPRNDFELGVPYTIKHPCKKDKGL AI
CHI3L1 chitinase-3-like protein 1 [<i>Galleria mellonella</i>]	MDKYDILLLLLGISANHVVFSEKILVCYGTWATYRNGLGLKFDVDDINTDLCTHLVYTFVGINNEGTV ISLDPWLDLGENYGRDNFRKFNALKLNPKLKTILAVGGWNEGSAKYSVMAANPIFRQNFIRESALK CQLIKELKEAFNKYGLLLTAAVASVEEMASISYDIPVISQYLDIISIMAYDMYGSWDAVTGHNSPLHK GEGDDGVARETLTYDMALEYMLRQGPCPEKLVGMPLYGRTFTLVNPNINSVRAPASGPGLAG PYATNGFIGYNELCIRFQSESWNRYDNLAKVPYAVRDRNWYLTYSIKHSFTTSSTPTTPTSTTP STPSTTPTSTLSTTASYSTTKVPETFVCGSEGAPDPESCTSFYICVRNVNGILVPRKFQCPDNL FWDQKNLHCNYKELVDCIV
1 MRC1 macrophage mannose receptor 1-like [<i>Galleria mellonella</i>]	MWTSEQAFEQVFIGISLLVKGAFITIDGVISDIYHKWSKGEPNNANGNEDCVVMIRRRNDGAFNDY NCAAKQPFICKKTLASLNGTLVIAVRYRLVYLVGNFRQMLQISFDA
2 MRC1 macrophage mannose receptor 1-like [<i>Galleria mellonella</i>]	MFPTILHVLLLEIILHCSYGQRDKKFFRKDYKYLEDETSFYKIHTISKWQDARKTASLKVLCVCFIL
3 MRC1 macrophage mannose receptor 1-like [<i>Galleria mellonella</i>]	MQRRAILSDNRKSSRGRLFVKLTQEAPKDLVRGNLYRGAVLLGFHNVDDEEGWISIKGTALEDVGY SKWGNQQPDGGDSEKCGSMFYNGKLNLDLGGCHHKCFICECDNLIDVTFDERFATL
SERPINB1 leukocyte elastase inhibitor-like [<i>Galleria mellonella</i>]	MFSKFILAVCGLMLTVKSQLYTTTPQEYKQVHLTDQDKIYLEDPLSVQPAADNRNVNQNGDSY YNTGVSQSGFVQNANTSPLEQYSPNINGGQALPISNRVPEEANRQLNQNTYYPGDRNGDGNF GNQHNVPYVNLKPVLPGPISHVTFNGLNLLKNIQQNGKMLMTSVASAAAAYKNITEDIQKRNSN NVLNANNIYVADDFIINPEFKKMAVKNFASEVTPIKFNNPGRAAQIINNVAASKTHNKITNLVPPDAI DENAQLILVNAVYFKGVWQIRFPDSTHQNVFNLSNGSSKTSFMRMRRYFRSGIDKTNDAVYLIL PFEQEYSLMLILPSLKSVPVSLATLTDKLLDYHQFTHKEIEVQLPKFTIRADTDLNLALRKMGGV DVFGAQSELSGLGMDTITSHIVCDTFRHALYR

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir diese Promotion ermöglicht haben.

Zunächst einmal ein großes Dankeschön an Frau Prof. Dr. Julia-Stefanie Frick für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und der Möglichkeit, mit großen Freiräumen arbeiten zu dürfen.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Anna Lange für die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Besonders danke ich auch Andrea Schäfer für die gute Einarbeitung und die schöne Zusammenarbeit im Labor, sowie Dr. Lena Michaelis, für viele hilfreiche Ratschläge und die Beratung im Schreibprozess dieser Arbeit.

Danke an die gesamte AG Frick; die herzliche Atmosphäre hat mir die Arbeit wirklich erleichtert!

Zum Abschluss möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden für ihre ausdauernde Unterstützung von ganzem Herzen danken.