

Untersuchungen zur Expression und Funktion von Hämocyanin in Hexapoda

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Sven Flachsbarth

Hamburg, 2015

Tag der Disputation: 30.03.2016

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Prof. Dr. Thorsten Burmester

Prof. Dr. Susanne Dobler

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Summary	3
Zusammenfassung	4
1. Einleitung	5
1.1 Sauerstoff und Respiration	5
1.2 Hämocyanin	6
1.2.1 Aufbau & Struktur	7
1.2.2 Vorkommen in den Arthropoda	9
1.2.3 Eigenschaften & Funktionen	11
1.3 Hämocyaninsuperfamilie	12
1.3.1 Phenoloxidasen	13
1.3.2 Pseudohämocyanin (Cryptocyanin)	14
1.3.3 Hexamerin & Hexamerinrezeptor	15
1.4 Hämocyanin der Hexapoden	16
1.5 Zielsetzung	20
2. Material & Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Versuchstiere	21
2.1.1.1 <i>Folsomia candida</i>	21
2.1.1.2 <i>Locusta migratoria</i>	22
2.1.1.3 <i>Hierodula membranacea</i>	23
2.1.2 Chemikalien	25
2.1.3 Medien & Agarplatten	25
2.1.4 Bakterien und Vektoren	25
2.1.5 Primer	26
2.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1 RNA-Extraktion	26
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	26
2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	27
2.2.3.1 RNA-Gelelektrophorese	27
2.2.3.2 DNA-Gelelektrophorese	28
2.2.4 cDNA-Erststrang-Synthese	29
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten	30
2.2.7 Klonierung	30
2.2.7.1 Ligation von PCR-Produkten	30

Inhaltsverzeichnis

2.2.7.2 Transformation kompetenter Zellen.....	31
2.2.7.3 Blau-Weiß-Selektion	31
2.2.7.4 Dauerkulturen	32
2.2.8 Plasmidpräparation.....	32
2.2.9 Restriktionsverdau.....	32
2.2.10 RNA-Interferenz.....	33
2.2.11 Sequenzierung	33
2.2.12 Quantitative real-time RT-PCR	34
2.2.12.1 Probenvorbereitung.....	34
2.2.12.2 Standardproben der quantitativen real-time-RT-PCR	34
2.2.12.3 Durchführung der quantitativen real-time-RT-PCR	35
2.2.12.4 Auswertung der quantitativen real-time-RT-PCR.....	37
2.3 Proteinbiochemische Methoden	39
2.3.1 Proteinisolation.....	39
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	39
2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.3.4 Westernblot	40
2.3.4.1 Elektrophoretischer Transfer der Proteine	40
2.3.4.2 Immunologische Detektion	41
2.3.5 Antikörperherstellung.....	43
2.3.5.1 Rekombinante Proteinexpression.....	43
2.3.5.2 Proteinaufreinigung	44
2.3.5.3 Dialyse	45
2.3.5.4 Immunisierung.....	45
2.4 Bioinformatische Methoden.....	45
2.4.1 Sequenzanalysen	45
2.4.2 Stammbaumanalysen	46
2.4.3. Transkriptomanalysen	46
3. Ergebnisse	47
3.1 Untersuchungen der Hypoxieantwort des Collembola <i>Folsomia candida</i>	47
3.1.1 Analyse der RNA-Expression in Reaktion auf Hypoxie mittels quantitativer real-time RT-PCR	47
3.1.2 dsRNA vermittelter Hämocyanin- <i>knockdown</i>	53
3.1.3 Nachweis von Hämocyanin auf Proteinebene in <i>Folsomia candida</i>	55
3.2 Verbreitung von Hämocyanin innerhalb der Collembola.....	57
3.2.1 Zuordnung der identifizierten Hämocyanine zu Untereinheitstyp 1 und 2.....	57
3.2.2 Phylogenetische Analyse der Collembola.....	59

Inhaltsverzeichnis

3.3 Hämocyanin in <i>Locusta migratoria</i>	61
3.4 Hämocyanin in <i>Hierodula membranacea</i>	65
3.5 Transkriptomanalysen.....	68
4. Diskussion	69
4.1 Hämocyanin in Collembola.....	69
4.1.1 Untersuchungen der Hypoxieantwort auf mRNA-Ebene in <i>Folsomia candida</i>	71
4.1.2 Proteinnachweis in hypoxisch gehaltenen Tieren	76
4.1.3 Hämocyanin- <i>knockdown</i> in <i>Folsomia candida</i> mittels RNA-Interferenz.....	77
4.1.4 Verbreitung von Hämocyanin in den Collembola	78
4.2 Hämocyanin in der Wanderheuschrecke <i>Locusta migratoria</i>	84
4.3 Hämocyanin in der Fangschrecke <i>Hierodula membranacea</i>	87
4.4 Hämocyanin in Hexapoda	89
4.4.1 Vorkommen von Hämocyanin in den Hexapoda	90
4.4.2 Mögliche Funktionen des Hämocyanins in den Hexapoda.....	91
4.5 Ausblick	93
5. Literatur	94
6. Anhang	109
6.1 IUPAC Codes für Nukleotide und Aminosäuren	109
6.2 DNA- und Proteinmarker	110
6.3 Vektorkarten.....	111
6.4 Primer	113
6.5 Phylogenetische Analysen	116
6.6 Transkriptomanalyse.....	119
Danksagung	123
Eidesstattliche Versicherung	124

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung	Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius	G	Gravitationskonstante
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
AP	alkalische Phosphatase	GST	Glutathione S-transferase
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>	h	Stunde
β-ME	β-Mercaptoethanol	Hb	Hämoglobin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	Hc1	Hämocyanin 1
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>	Hc2	Hämocyanin 2
bp	Basenpaare	HCl	Salzsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
cm	Zentimeter	Hsp70	<i>heat shock protein 70 kDa</i>
Ct	<i>cycle of threshold</i>	IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
Cu	Kupfer	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
Cu(I)	Kupfer(I)-oxid	kDa	Kilodalton
Cu(II)	Kupfer(II)-oxid	l	Liter
CuA	Kupferbindungstelle A	LB	<i>lysogeny broth</i>
CuB	Kupferbindungstelle B	LDH	Laktatdehydrogenase
Cyc	Cyclophilin	LPS	Lipopolysaccharid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	Molar
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>	mA	Milliampere
DTT	Dithiotreitol	MDH	Malatdehydrogenase
E	Effizienz	μl	Mikroliter
EF1a	<i>elongation factor 1 alpha</i>	μM	Mikromol
EHP	<i>embryonic hemolymph protein</i>	mg	Milligramm
EST	<i>expressed sequence tag</i>	min	Minute
g	Gramm	ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung	Abkürzung	Erklärung
mM	Mikromolar	qPCR	<i>quantitative real-time RT-PCR</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	R	Expressionsunterschied
mRNA	<i>messenger RNA</i>	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	RNA	Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid	RNAi	<i>RNA interference</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz	Rplp0	Ribosomale protein, large, P0
ng	Nanogram	rRNA	Ribosomale RNA
Ni	Nickel	RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
nm	Nanometer	S	Svedberg
NTC	<i>no template control</i>	s	Sekunde
O ₂	Sauerstoff	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
O ₂ ²⁻	Peroxidanion	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
p	Signifikanzwert	TBE	TRIS-Borat-EDTA
P ₅₀	Halbsättigungsdruck	TBS	<i>tris-buffered Saline</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>	Tub	β-Tubulin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	UV	Ultraviolett
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	V	Volt
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>	v/v	<i>volume / volume</i>
pri-miRNA	<i>primary miRNA</i>	w/v	<i>weight / volume</i>

Summary

Hemocyanin is the principal respiratory protein of the Arthropoda. The protein is composed of six identical or similar subunits, each carrying two copper ions by which they reversibly bind oxygen. While the transport of oxygen is the main function of hemocyanin, this protein is also involved in amino acid storage, hardening of the cuticle and immune response. The occurrence and properties of hemocyanins have been thoroughly studied in Crustacea and Chelicerata, but their presence in the Onychophora, Myriapoda and Hexapoda has only been recently discovered. In these subphyla, respiratory proteins had long been considered unnecessary, since these species possess an elaborate tracheal system for oxygen supply. Hemocyanin was first described in a Hexapoda in the stonefly *Perla marginata* in 2004. Since then, hemocyanin was shown to occur in a variety of hexapod orders, but still there is no clear correlation between the presence of hemocyanin and specific evolutionary events, ecological conditions, physiological properties or the species morphology.

Here I showed that the expression of hemocyanin dramatically increases in the collembolan *Folsomia candida* in response to hypoxia. This is the first time that a direct connection between hemocyanin expression and oxygen availability could be demonstrated in adult Hexapoda. In addition, hemocyanin was identified in an additional 21 collembolan species, which were phylogenetically assigned to the suborders Symphypleona, Tomoceroidea, and Entomobryomorpha. A comprehensive study of the migratory locust *Locusta migratoria* showed that hemocyanin expression is neither related to the age, phenotypic phase nor sex of the animals, nor is it involved in the hypoxia response or immune reaction. Rather hemocyanin expression is restricted to the embryonic stage, where it probably provides oxygen to the developing embryo across the diffusion barrier of the ootheca. In an additional study, hemocytes were identified as the site of hemocyanin synthesis in the mantis *Hierodula membranacea*. Further evidence suggests that hemocyanin might have an intracellular function in the hemocytes of *H. membranacea*, where it could act for example, as a phenoloxidase.

In summary and considering other studies, my findings suggest that hemocyanin originally had a general respiratory function in the Hexapoda. Hemocyanin still has this role in basal Hexapoda that are likely to encounter hypoxia in their habitats, for example Collembola or Plecoptera. In so-called "higher" Hexapoda, however, the tracheal system provides sufficient oxygen to the adult animals. Here hemocyanin developed a more specialized function and supplies oxygen only to the developing embryos or adopted other roles.

Zusammenfassung

Hämocyanin ist das am häufigsten vorkommende respiratorische Protein innerhalb der Arthropoda. Das aus sechs identischen oder ähnlichen Untereinheiten gebildete Protein ist durch zwei Kupferionen, welche jede Untereinheit im aktiven Zentrum trägt, dazu in der Lage reversibel Sauerstoff zu binden. Neben seiner eigentlichen Funktion im Sauerstofftransport ist Hämocyanin darüber hinaus in einigen Taxa auch an der Energiespeicherung, der Aushärtung der Cuticula, sowie der Immunantwort beteiligt. Während das Hämocyanin der Crustacea und Chelicerata umfassend untersucht wurde, galten respiratorische Proteine in den Onychophora, Myriapoda und Hexapoda aufgrund ihrer gut ausgebildeten Tracheensysteme lange als überflüssig. Erst nachdem Hämocyanin 2004 in der Steinfliege *Perla marginata* nachgewiesen werden konnte, zeigten weitere Untersuchungen, dass Hämocyanin in einer Vielzahl der Hexapoda-Ordnungen vertreten ist. Dennoch ist eine Korrelation des Vorkommens von Hämocyanin mit evolutiven Ereignissen, ökologischen Bedingungen, physiologischen Eigenschaften, oder der Morphologie der Tiere bisher nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Collembola *Folsomia candida* auf hypoxiebedingt niedrige Sauerstoffkonzentrationen mit einer starken Expressionssteigerung von Hämocyanin reagiert. Die dabei unter Hypoxie bis zu tausendfach gesteigerte Hämocyaninexpression zeigte deutlich, dass Hämocyanin in *F. candida* entsprechend der vorliegenden Sauerstoffkonzentration reguliert wird und das Protein so eine Rolle in der Sauerstoffversorgung der adulten Tiere übernimmt. Darüber hinaus konnte Hämocyanin in 21 weiteren Collembola-Spezies nachgewiesen und die Tiere phylogenetisch den Unterordnungen der Symphypleona, Tomoceroidea oder Entomobryomorpha zugeordnet werden. Umfassende Untersuchungen an der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* zeigten, dass kein Bezug der Hämocyaninexpression zu dem Geschlecht der Tiere, der verfügbaren Sauerstoffkonzentration, einer Immunantwort in Reaktion auf Bakterienbefall, oder dem Wechsel in die gregarine Schwarmphase steht. Stattdessen wurde die bereits bekannte spezifische Expression von Hämocyanin im Embryonalstadium bestätigt. Darüber hinaus konnte in der Fangschrecke *Hierodula membranacea* erstmalig in einem Hexapoda die Hämocyaninsynthese innerhalb der Hämocyten nachgewiesen werden. Zusammen mit den bereits bestehenden Untersuchungen deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass Hämocyanin ursprünglich eine allgemeine respiratorische Funktion in den Hexapoda besaß und diese Funktion in einigen Hexapoda, wie den Collembola oder Plecoptera, bis heute übernimmt. In höher entwickelten Hexapoda, wie den Orthoptera oder Blattodea, reicht hingegen das gut entwickelte Tracheensystem aus, um die Sauerstoffversorgung der adulten Tiere zu gewährleisten. Hier übernimmt Hämocyanin stattdessen die Sauerstoffversorgung der in Ootheken oder Eipaketen abgelegten Embryonen.

1. Einleitung

1.1 Sauerstoff und Respiration

Im Laufe der Erdgeschichte kam es zu mehreren Zeitpunkten zu, zum Teil drastischen, Veränderungen in der Zusammensetzung der Atmosphäre (Kasting & Siefert, 2002; Berner et al., 2007; Canfield et al., 2007). Der heute für das Leben auf der Erde wichtigste Bestandteil der Atmosphäre ist Sauerstoff. Dessen allmähliche Akkumulation, sowie das Auftreten anhaltender Episoden atmosphärischer Hypoxie und Hyperoxie, übten einen starken selektiven Druck auf molekularer und physiologischer Ebene aus und wurde so zu einer treibenden Kraft der Evolution (Kasting & Siefert, 2002; Berner et al., 2007; Canfield et al., 2007). Während der Entstehung der ersten Lebewesen vor etwa 3,5 bis 4 Milliarden Jahren besaß die Erde eine sauerstofffreie, reduzierende Atmosphäre, wodurch die Organismen dieser Zeit über eine fermentierende, obligat anaerobe Lebensweise verfügten (Barnabas et al., 1982; Kasting & Siefert, 2002; Canfield et al., 2007). Während anaerobe Photosynthese bereits deutlich früher entstanden ist, scheint das Vorkommen oxidativer Photosynthese stark mit dem Auftreten von Cyanobakterien zu korrelieren (Cloud, 1968). Cyanobakterien stellen die ersten Organismen dar, die nachweislich über ein zweites Photosystem verfügen und somit in der Lage sind Energie durch aerobe Photosynthese zu gewinnen (Cloud, 1968; Blankenship & Hartman, 1998). Dies erlaubte ihnen sich weltweit in nahezu allen Habitaten zu etablieren (Garcia-Pichel et al., 2003). Das verstärkte Vorkommen sauerstoffproduzierender Organismen führte im Proterozoikum vor circa 2,3 Milliarden Jahren dazu, dass erstmalig größere Mengen Sauerstoff in der Erdatmosphäre akkumulierten (Cloud, 1968; Farquhar et al., 2000; Kasting & Siefert, 2002; Canfield et al., 2007). Während es seitdem immer wieder zu ausgedehnten hypoxischen und hyperoxischen Perioden kam, hält sich der heutige Anteil atmosphärischen Sauerstoffs von 21% seit etwa 600 bis 700 Millionen Jahren weitgehend stabil (Ward et al., 2006; Berner et al., 2007). Dieser Anstieg des atmosphärischen Sauerstoffs zeigte enorme Auswirkungen auf die Komplexität, Spezialisierung und metabolischen Prozesse fast aller Lebewesen (Kasting & Siefert, 2002; Canfield et al., 2007; Ward et al., 2006). Betrachtet man die heutige, nahezu ubiquitäre Verbreitung von aerober Energiegewinnung in allen Organismenreichen, zeigt sich die Bedeutung von Sauerstoff für die Evolution des Lebens auf der Erde. So verfügen fast alle eukaryotischen Organismen über Mitochondrien und nutzen O_2 als Elektronenendakzeptor innerhalb der Atmungskette (Rogers et al., 1998). Dementsprechend gehört die ständige Versorgung mit Sauerstoff zu einem der grundlegendsten Bedürfnisse aller höheren Lebewesen. Während kleine Organismen aufgrund ihres günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses in der Lage sind, ihren Sauerstoffbedarf über Hautatmung zu decken, ist dies bei größeren Organismen nicht möglich. Fortschreitende Kompartimentierung und steigende Körpergröße führte zu

Diffusionsbarrieren und einem erhöhten Sauerstoffbedarf, während die zur Respiration genutzte Oberfläche nicht im gleichen Umfang wuchs wie die sauerstoffverbrauchenden Gewebe. Als Konsequenz entwickelten sich mehrere Anpassungen, die das Auftreten komplexerer Organismen, sowie das Erschließen sauerstoffärmerer Habitate erlaubten. Zunächst entstanden offene und geschlossene Kreislaufsysteme, welche die Voraussetzung zur O₂-Versorgung aller Gewebe des Organismus schufen. Respiratorische Oberflächen, wie Tracheen, Kiemen und Lungen bildeten sich aus und ermöglichten die Aufnahme von größeren Mengen O₂ in die Kreislaufsysteme (Reece et al., 2010). Neben diesen Anpassungen zur Aufnahme und Verteilung von Sauerstoff im Organismus, entstanden drei Klassen respiratorischer Proteine, welche den Transfer von Sauerstoff von der respiratorischen Oberfläche, über das Kreislaufsystem, hin zum sauerstoffbenötigenden Gewebe bewerkstelligen. Respiratorische Proteine sind Moleküle, die in ihrem aktiven Zentrum ein Metall-Ion tragen, über welches sie in der Lage sind, Sauerstoff reversibel zu binden. Dadurch spielen sie eine zentrale Rolle beim Transport und der Speicherung von Sauerstoff. Basierend auf ihrer Struktur und ihren aktiven Zentren, werden die respiratorischen Proteine in die drei Großgruppen der Globine, Hämerythrine und Hämocyanine eingeteilt (Kurtz, 1999; Terwilliger, 1998; Mangum, 1985; Vinogradov, 1985).

1.2 Hämocyanin

Hämocyanine sind kupferhaltige respiratorische Proteine, welche in der Hämolymphe vieler Arthropoda und Mollusca vorkommen (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995; Burmester, 2002). Sie gehören zu den Typ-3 Kupferproteinen und sind in der Lage Sauerstoff reversibel über zwei Cu-Ionen zu binden, welche in den Bindungsstellen (CuA und CuB) von jeweils drei Histidinen koordiniert werden (siehe Abbildung 1.1; Linzen et al., 1985; Volbeda & Hol, 1989; van Holde & Miller, 1995). Die Kupferionen der Bindungszentren liegen im deoxygeniertem Zustand als Cu(I) vor und wechseln bei Oxigenierung in die Cu(II)-Form, in der sie Sauerstoff als O₂²⁻ binden (van Holde et al., 2001).

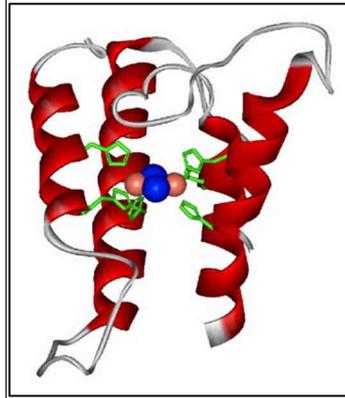


Abbildung 1.1: Aktives Zentrum einer Hämocyaninuntereinheit von *Limulus polyphemus*. Zu sehen sind die α -Helices (rot) 2.1 und 2.2 der CuA, sowie die 2.5 und 2.6 der CuB Bindungsstelle. Die sechs Histidine (grün) koordinieren die zwei Kupferionen (orange), welche ein Sauerstoffmolekül (blau) binden (aus Jaenicke, 2002).

1.2.1 Aufbau & Struktur

Während die Hämocyanine der Arthropoda und Mollusca abgesehen von ihren aktiven Zentren nur noch über geringe Ähnlichkeit verfügen, entstammen beide der Superfamilie der Typ-3 Kupferproteine, welche bereits vor der Aufspaltung der Domänen Archaea, Bacteria und Eukaryota existierte (Immesberger & Burmester, 2004; Aquilera et al., 2013). Während heute mit dem segregierten α -, dem cytosolischen β - und dem membran- gebundenen γ -Subtyp drei Formen von Typ-3 Kupferproteinen existieren, stellt der α -Subtyp die älteste Form dar (Aquilera et al., 2013). Das Hämocyanin der Mollusca entwickelte sich aus einer α -Subtyp Tyrosinase, welche in vielen Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren gefunden wird (Burmester, 2001; van Holde et al., 2001; Aquilera et al., 2013). Innerhalb der Arthropoda hingegen entstand Hämocyanin aus der für Arthropoda spezifischen β -Subtyp Phenoloxidase, welche keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu Phenoloxidasen anderer Tierstämme mehr aufweist (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995; Burmester, 2002; van Holde et al., 2001; Aquilera et al., 2013). Hämocyanine kommen immer frei gelöst in der Hämolymphe vor und erreichen dabei, mit bis zu 95% des in der Hämolymphe enthaltenen Proteins, teils extrem hohe Konzentrationen. Um den osmotischen Druck und die Viskosität der Hämolymphe gering zu halten, bilden sie stets multimere Proteinaggregate aus. (Mangum, 1985; Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995). Das Hämocyanin der Mollusca besteht aus riesigen, 350 bis 450 kDa großen Untereinheiten und liegt als Dekka-, Dideka- oder Multidekamer vor. Jede Hämocyaninuntereinheit ist dabei in der Lage, sieben bis acht aktive Zentren zu tragen, so dass ein Hämocyanin bis zu 160 Sauerstoffmoleküle transportieren kann (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995). Im Gegensatz dazu werden Hämocyanine der Arthropoda stets aus einem Hexamer von sechs identischen oder ähnlichen Untereinheiten gebildet

und verfügen über eine kubische Quartärstruktur. Je nach Spezies kann es dabei zur Ausbildung von Oligomeren kommen, welche aus bis zu acht Hexameren aufgebaut sind und molekulare Massen von bis zu 3600 kDa erreichen. Eine einzelne Hämocyaninuntereinheit besteht aus etwa 630 bis 660 Aminosäuren, verfügt über eine Molekulargewicht von circa 70 bis 80 kDa und besitzt ein aktives Zentrum (siehe Abbildung 1.2; Markl & Decker, 1992; van Holde et al., 2001). Da es sich bei den Hämocyaninen der Mollusca und Arthropoda um konvergent entstandene Proteine handelt, welche nicht näher miteinander verwandt sind, wird im Folgenden nur auf das Hämocyanin der Arthropoda eingegangen.

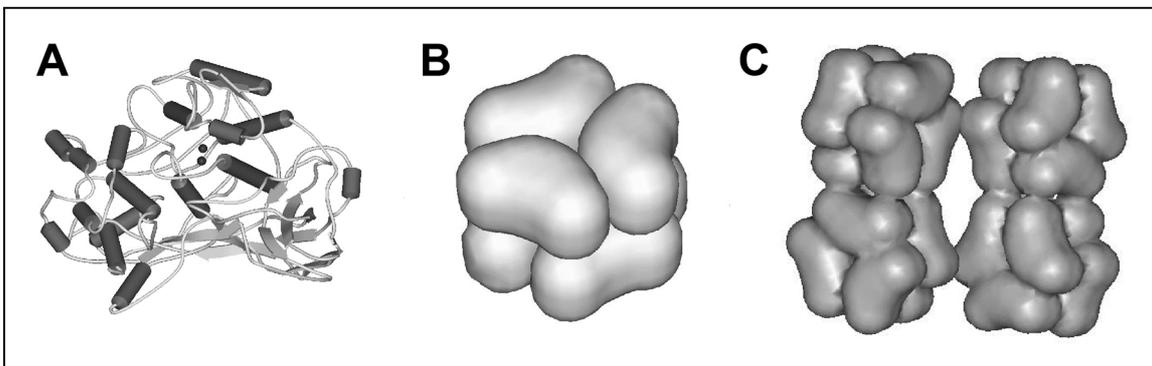


Abbildung 1.2: Struktur einer Arthropoda Hämocyaninuntereinheit (A) vereinfachte Darstellung eines Hämocyaninhexamers (B) vereinfachte Darstellung eines Arachnida Hämocyanins (*Aphonopelma hentzi*), bestehend aus vier Hexameren (C) (aus Burmester, 2002).

Eine Hämocyaninuntereinheit der Arthropoda lässt sich in drei strukturelle Bereiche unterteilen. Die erste Domäne, welche gleichzeitig die variabelste ist, umfasst den N-Terminus mit circa 150 bis 180 Aminosäuren (Linzen et al., 1985; Volbeda & Hol, 1989). Sie ist hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut und ist wichtig für die allosterische Regulation der Sauerstoffbindung (Magnus et al., 1994). Die zweite Domäne ist etwa 220 Aminosäuren groß und enthält die Kupferbindungsstellen CuA und CuB, die beide aus jeweils zwei α -Helices bestehen und die koordinierenden sechs Histidine tragen (Linzen et al., 1985; Volbeda & Hol, 1989; Hazes et al., 1993). Die dritte Domäne besteht aus circa 260 Aminosäuren, welche eine siebensträngige, antiparallele β -Faltblattstruktur (β -barrel) formen (Hazes et al., 1993; Volbeda & Hol, 1989). Darüber hinaus verfügen Hämocyanine über ein strikt konserviertes Phenylalanin in Domäne eins, welches eine wichtige Rolle bei der kooperativen Sauerstoffbindung spielt, sowie zwei weitere in Domäne drei, die der Stabilisierung der Sauerstoffbindung dienen (Hazes et al., 1993).

1.2.2 Vorkommen in den Arthropoda

Während die Struktur von Hämocyanin innerhalb der Arthropoda zwischen den Subphyla hoch konserviert ist, ist die Diversität in Bezug auf die Zusammensetzung der Hexamersubtypen sehr hoch. Die Hämocyaninsubtypen stellen dabei keine Orthologe dar, sondern evolvierten unabhängig von einander in den Subphyla (siehe Abbildung 1.3; Burmester, 2002).

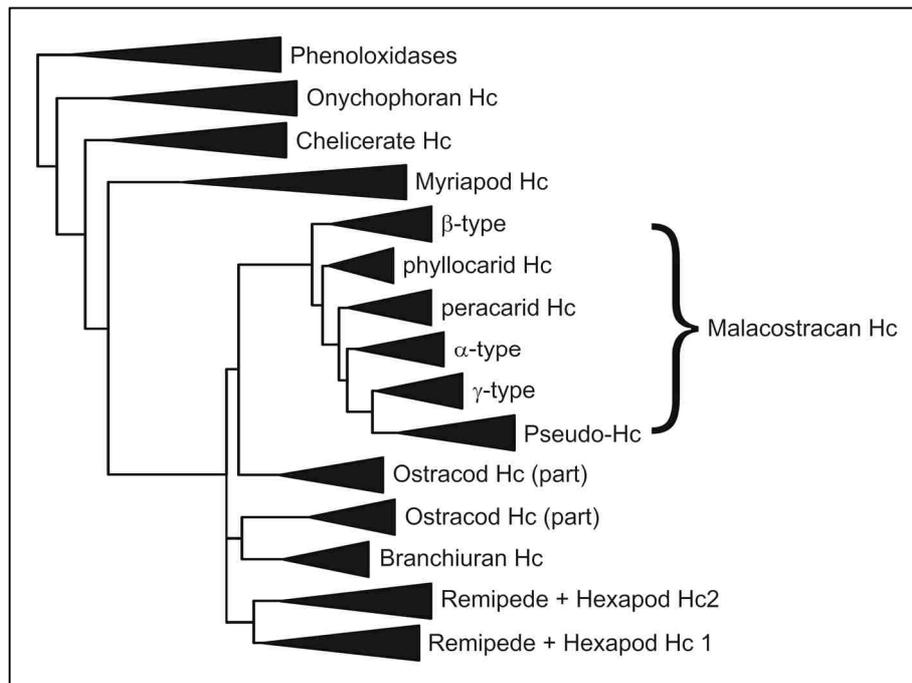


Abbildung 1.3: Phylogenetischer Stammbaum der Arthropodahämocyanine (aus Burmester, 2015).

Während die genaue phylogenetische Position der Onychophora noch nicht abschließend geklärt ist, werden sie als nahe Verwandte oder Teil der Arthropoda angesehen (Giribet et al., 2001). Dies wird durch den Fund von Hämocyanin in Angehörigen der beiden Familien der Peripatidae (Kusche et al., 2002) und der Peripatopsidae (Burmester, unveröffentlicht) unterstützt. Über das bloße Vorkommen innerhalb der Onychophora hinaus, ist kaum etwas über die Eigenschaften des Onychophora Hämocyanin bekannt.

In den Chelicerata ist Hämocyanin weit verbreitet und kommt in den Xiphosura (Pfeilschwanzkrebse), Scorpiones (Skorpione), Uropygi (Geißelskorpione), Amblypygi (Geißelspinnen), Aranea (Webspinnen), Pycnogonida (Asselspinnen), Palpigradi (Palpenläufer), und den Ricinulei (Kapuzenspinnen) vor. Hingegen fehlt es in den Opiliones (Weberknechte), Pseudoscorpiones (Pseudoskorpione), Solifugae (Walzenspinnen), und den Acari (Milben) vollständig (Markl, 1986; Markl et al., 1986; Rehm et al., 2012). Das Hämocyanin der Chelicerata besteht je nach Spezies aus bis zu acht Untereinheiten (Markl et al., 1986), von denen jeder Subtyp über distinkte physikalische und chemische

Eigenschaften verfügt. Die Sauerstoffbindungseigenschaften der Untereinheiten ähneln sich jedoch stark (Burmester, 2002). Das native Hämocyanin bildet ein Mono-, Di-, Tetra- oder Oktohexamer (Markl et al., 1986). Die Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten innerhalb des Hämocyanins ist dabei hoch konserviert und erfordert, dass jeder Subtyp eine spezielle Position im Protein einnimmt (Markl, 1986; Rehm et al., 2012).

Innerhalb der Myriapoda konnte Hämocyanin in den Chilopoda (Hundertfüßer), Diplopoda (Doppelfüßer) und Symphyla (Zwergfüßer) nachgewiesen werden (Mangum et al., 1985; Jaenicke et al., 1999; Kusche & Burmester, 2001; Pick et al., 2014). Zu den Pauropoda (Wenigfüßer) liegen bislang keine Untersuchungen vor. Das native Hämocyanin der Myriapoda setzt sich aus sechs Hexameren zusammen, einer Konfiguration die spezifisch für die Myriapoda ist. Dabei kann die Anzahl der verwendeten Untereinheitstypen zwischen einer und vier variieren (Mangum et al., 1985; Jaenicke et al., 1999; Pick et al., 2014).

Die Crustacea weisen die höchsten Variabilität im Aufbau ihres Hämocyanins auf und zeigen selbst zwischen eng verwandten Spezies sowohl in der Zusammensetzung der Untereinheiten, als auch deren Struktur große Unterschiede (Markl, 1986; Markl et al., 1986; Markl & Decker, 1992). Hämocyanin konnte in den Malacostraca (Höhere Krebse), den Remipedia, Branchiura (Fischläuse) und den Ostracoda (Muschelkrebse) nachgewiesen werden (Mangum, 1985; Markl & Decker, 1992; Ertas et al., 2009; Marxen et al., 2014; Pinnow et al., 2015). Innerhalb der Malacostraca besitzen alle Unterklassen Hämocyanin, welches sich zu Mono-, Di-, oder Tetrahexameren zusammensetzt (Markl, 1986; Markl et al., 1986; Markl & Decker, 1992). Manche Untereinheiten werden dabei in einigen Arten nur während gewisser Entwicklungsstadien oder unter spezifischen physiologischen Konditionen exprimiert (Markl & Decker, 1992). In den Decapoda (Zehnfüßkrebse), dem größten Taxon der Malacostraca, existieren drei Untereinheitstypen, die als α , β und γ bezeichnet werden (Markl, 1986; Markl et al., 1986). Darüber hinaus verfügen die Phyllocarida, sowie die Isopoda (Asseln) und Amphipoda (Flohkrebse) der Peracarida (Ranzenkrebse) über distinkte Untereinheitstypen (Mangum, 1983; Markl, 1986). Die β -Untereinheit stellt den ältesten Subtyp der Malacostraca dar. Die Untereinheiten der Phyllocarida und Peracarida divergierten vor der Aufspaltung der α und β Subtypen (Burmester, 1999; Burmester, 2002; Marxen et al., 2013). Außerhalb der Malacostraca konnte Hämocyanin in den Ostracoda (Marxen et al., 2014) den Branchiura (Pinnow et al., 2015), sowie den Remipedia (Ertas et al., 2009) identifiziert werden. Die Remipedia, welche die engsten Verwandten der Hexapoda sind, verfügen über die Hämocyaninuntereinheiten 1 und 2, bei denen es sich um Orthologe der Hexapoda Hämocyanine handelt (Ertas et al., 2009). Innerhalb der Hexapoda ist Hämocyaninuntereinheit 1 in fast allen Ordnungen vertreten, während es zu mehreren unabhängigen Verlusten von Untereinheit 2 gekommen ist (Pick et al., 2009a).

1.2.3 Eigenschaften & Funktionen

Die Synthese von Hämocyanin findet entweder im Hepatopankreas oder den Hämocyten statt. Bei letzterem variieren jedoch die Subpopulationen innerhalb derer die Synthese stattfindet zwischen den Spezies. Darüber hinaus ist für einige Arachnida bekannt, dass Hämocyanin in sessilen Hämocyten gebildet wird, welche sich an der inneren Herzwand befinden. Hämocyanine verfügen über ein N-terminales Signalpeptid, anhand dessen sie über das endoplasmatische Reticulum in die Hämolymphe sezerniert werden. Dem Hämocyanin der Arachnida, sowie dem Hämocyanin der Hexapoda *Thermobia domestica* und *Hierodula membranacea* fehlt dieses Signalpeptid jedoch (Kempter, 1983; Markl & Decker, 1992; Voit et al., 2000; Pick et al., 2009a). In den Arachnida erfolgt die Freisetzung des Proteins in die Hämolymphe durch Lyse der Hämocyanin-synthetisierenden Hämocyten (Kempter, 1983; Voit et al., 2000; Pick et al., 2009a). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch in *T. domestica* und *H. membranacea* vorliegen, ist aber bisher experimentell nicht nachgewiesen wurde (Pick et al., 2008). Die eigentliche Funktion von Hämocyanin ist der Transport von Sauerstoff innerhalb der Hämolymphe. Die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins schwankt stark zwischen verschiedenen Spezies. Alleine in den Malacostraca variieren die Halbsättigungswerte (P_{50}) zwischen 1,5 und 40 Torr (Mangum, 1983). Auch in den Myriapoda unterscheiden sich die Sauerstoffbindungseigenschaften der Hämocyanine trotz ihres ähnlichen Aufbaus teils signifikant. Während das Hämocyanin der Chilopoda über eine geringe O_2 -Affinität und hohe Kooperativität verfügt, zeigt das Hämocyanin der Diplopoda eine hohe Affinität und geringe Kooperativität (Kusche & Burmester, 2001; Damsgaard et al., 2013). Generell erreicht die Kooperativität der Hämocyanine sehr hohe Werte, mit Hill Koeffizienten von bis zu 9, dem höchsten bekannten Wert überhaupt. (Loewe, 1978; van Holde & Miller, 1995). Die Bindung des Sauerstoffs durch Hämocyanin ist außerdem durch verschiedene Effektoren beeinflussbar. Wichtige Faktoren sind hierbei die Konzentration von Stoffwechselprodukten wie Laktat, die Menge der in der Hämolymphe gelösten Ionen, sowie Veränderungen des pH-Werts und der Temperatur (Loewe, 1978; Mangum, 1985; Zeis et al., 1992; Bridges, 2001; van Holde et al., 2001). Neben seiner respiratorischen Funktion ist Hämocyanin auch an weiteren Prozessen beteiligt. Hierzu gehören die Energiespeicherung (Ugnow, 1969a; Ugnow, 1969b; Depledge & Bjerregaard, 1989), der Transport von Metallionen (Zatta, 1984), sowie eine Funktion als Phenoloxidase (Nagai & Kawabata 2000; Nagai et al., 2001; Decker et al., 2001; Lee et al., 2004). Des Weiteren spielt Hämocyanin eine Rolle bei der Aushärtung der Cuticula (Paul et al., 1994) und dem Transport von Ecdysteroiden (Jaenicke et al., 1999). Außerdem übernimmt es in einigen Crustacea eine Funktion im Immunsystem, indem durch limitierte Proteolyse des C-Terminus antimikrobielle und antifungizide Peptide gebildet werden (Destoumieux-Garzóm et al., 2001; Lee et al., 2003).

1.3 Hämocyaninsuperfamilie

In der Hämocyaninsuperfamilie wird eine Gruppe von Proteinen zusammengefasst, welche in Sequenz und Struktur allesamt den kupfertragenden Hämocyaninen der Arthropoden ähneln. Hierzu gehören neben dem namensgebenden Hämocyanin auch Pseudohämocyanin (Cryptocyanin), Phenoloxidasen, Hexamerine und Hexamerinrezeptoren (Burmester, 2001; Burmester, 2002). Neben den strukturellen Übereinstimmungen dieser fünf Proteine, ähneln sie sich auch in ihrer Funktion. So sind alle, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, an Häutungsprozessen oder dem Sauerstofftransport beteiligt (Destoumieux-Garzó et al., 2001). Die gesamte Hämocyaninsuperfamilie ist dabei auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen, der bereits vor der Aufspaltung der Arthropodasubphyla vor etwa 600 Millionen Jahren entstand (Burmester, 2001; Burmester, 2002). Höchstwahrscheinlich verfügte dieses Protein bereits über eine Phenoloxidaseaktivität, welche das Ausbilden des Arthropoda-Exoskeletts durch Melanisierung der Cuticula ermöglichte. Die durch das Exoskelett entstehende Diffusionsbarriere, sowie die etwa zu diesem Zeitpunkt stattfindende Größenzunahme der Tiere, führten wahrscheinlich dazu, dass der Sauerstoffbedarf der Tiere nicht mehr ausreichend durch Diffusion gedeckt werden konnte. Eine später stattfindende Genduplikation des Vorläuferproteins, welches als Phenoloxidase bereits über die Eigenschaft verfügte mit Sauerstoff zu interagieren, lieferte vermutlich die Grundlage für die Evolution des sauerstofftransportierenden Hämocyanins. Dies erklärt die ubiquitäre Verbreitung von Phenoloxidasen innerhalb der Arthropoda, sowie die Notwendigkeit für das Auftreten eines Sauerstofftransportproteins innerhalb des Phylums (Burmester, 2001; Burmester, 2002).

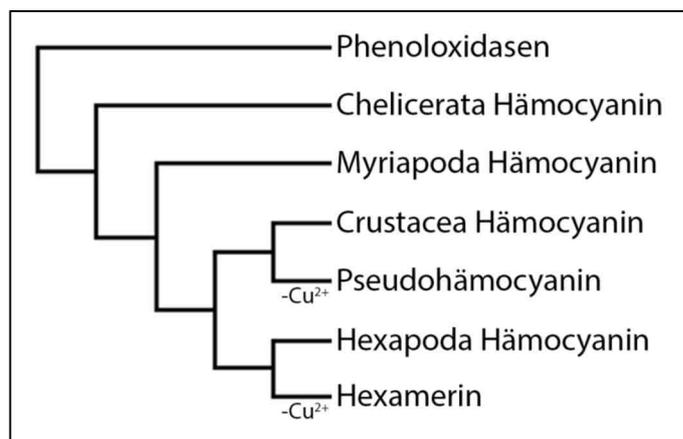


Abbildung 1.4: Vereinfachtes Kladogramm der Hämocyaninsuperfamilie der Arthropoda. Die Hämocyanine der Crustacea und der Hexapoda sind der Einfachheit halber in der vorliegenden Darstellung paraphyletisch zu den Pseudohämocyaninen, beziehungsweise den Hexamerinen dargestellt (abgewandelt aus Burmester, 2015).

Das in Abbildung 1.4 dargestellte vereinfachte Kladogramm verdeutlicht die Evolution der Hämocyaninsuperfamilie. Als Wurzel des Stammbaums dienen die Phenoloxidasen, aus denen sich die Hämocyanine der Arthropodata ableiten. Die Hämocyanine der Chelicerata, welche als erstes evolvierten, sowie die Hämocyanine der Myriapoda stehen basal zu den Proteinen der Crustacea und Hexapoda. Diese befinden sich in einem Schwestergruppenverhältnis, deren Aufspaltung vor etwa 400 Millionen Jahren stattfand. Im Laufe der Evolution kam es dann, sowohl in den Crustacea als auch den Hexapoda, unabhängig voneinander zu einer Genduplikation mit anschließendem Verlust des sauerstoffbindenden kupferhaltigen Zentrums. Dies führte in den Crustacea zur Entstehung der Pseudohämocyanine, während in den Hexapoda die Hexamerine evolvierten (Burmester et al., 2002).

1.3.1 Phenoloxidasen

Phenoloxidasen gelten als die ältesten Vertreter der Hämocyaninsuperfamilie (Burmester, 2002). Sie ähneln in ihrer Funktion stark den Tyrosinasen der Wirbeltiere und anderer Metazoa, unterscheiden sich von ihnen aber deutlich in Sequenz und Struktur. Phenoloxidasen verfügen über die gleichen Kupferbindungsstellen und die sechs streng konservierten Histidine, wie sie auch im Hämocyanin vorkommen (Fujimoto et al., 1995; Hall et al., 1995; Kawabata et al., 1995). Sie katalysieren die o-Hydroxylierung von Monophenolen zu o-Diphenolen, welche in einem weiteren Schritt zu o-Chinonen oxidiert werden. Je nachdem ob dabei beide oder nur die letzte Reaktion durchgeführt wird, unterscheidet man zwischen einer Tyrosinase- oder Catecholoxidaseaktivität. Die so gebildeten o-Chinone polymerisieren anschließend in einer nicht-enzymatischen Reaktion zu Melanin. Durch diese Herstellung von Melanin sind Phenoloxidasen an der Sklerotisierung der Cuticula, bei der Wundheilung, sowie der Bekämpfung von Mikroorganismen in der humoralen Immunantwort beteiligt (Ashida & Yoshida, 1988; Aspán & Söderhäll, 1991; Söderhäll & Cerenius, 1998). Phenoloxidasen werden zunächst als Zymogen, den so genannten Prophenoloxidasen, synthetisiert und erst durch die Abspaltung eines N-terminalen Peptids aktiviert (Aspán et al., 1995; Hall et al., 1995). Dies geschieht durch spezielle Serinproteasen, welche einen größeren Teil der ersten strukturellen Domäne des Proteins abspalten und so das aktive Zentrum für seine Substrate freilegen (Ashida & Yoshida, 1988; Aspán et al., 1995; Söderhäll & Cerenius, 1998). Die Synthese der Prophenoloxidase erfolgt in den Immunzellen der Invertebraten, den Hämocyten. Welcher Hämocytenstyp für die Synthese verantwortlich ist, kann speziesspezifisch variieren (Cerenius & Söderhäll, 2004). Da Prophenoloxidasen über kein Signalpeptid zur Sekretion durch das Endoplasmatische Reticulum verfügen, wird vermutet, dass sie durch Lyse der Hämocyten in die Hämolymphe gelangen (Kempter, 1983; Voit et

al., 2000; Cerenius & Söderhäll, 2004; González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Innerhalb der Arthropoda konnten Phenoloxidasen in den Crustacea (Aspán et al., 1995), Hexapoda (Fujimoto et al., 1995; Hall et al., 1995; Kawabata et al., 1995) und Myriapoda (Burmester, 2001; Pick et al., 2014) nachgewiesen werden. Innerhalb der Chelicerata fehlen sie vollständig. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Hämocyanin in einigen Chelicerata, nach Aktivierung durch limitierte Proteolyse oder durch ein Gerinnungsenzym, die Phenoloxidasefunktion übernehmen kann (Nagai & Kawabata 2000; Nagai et al., 2001; Decker et al., 2001).

1.3.2 Pseudohämocyanin (Cryptocyanin)

Pseudohämocyanin, auch Cryptocyanin genannt, ist ein Speicherprotein, welches ausschließlich in der Hämolymphe einiger dekapoder Krebse vorkommt (Burmester, 1999; Terwilliger et al., 1999). Wie fast alle Vertreter der Hämocyaninsuperfamilie liegt auch Pseudohämocyanin als Hexamer vor und ähnelt sowohl in Sequenz und Struktur, als auch der Größe stark Hämocyanin. Im Gegensatz zu Hämocyanin fehlt Pseudohämocyanin jedoch mindestens eines der hochkonservierten Histidine, sowie das kupferenthaltende, sauerstoffbindende Zentrum. Pseudohämocyanin spielt eine zentrale Rolle in der Ecdysis, wo es als Speicherprotein Verwendung findet und zum Aufbau des neu entstehenden Exoskeletts genutzt wird (Terwilliger et al., 2005; Terwilliger, 2012). Die Expression ist dabei extrem an das Häutungsstadium gekoppelt. Während sich Pseudohämocyanin zwischen Häutungen kaum nachweisen lässt, macht es kurz vor Beginn der Häutung den Hauptanteil des innerhalb der Hämolymphe enthaltenen Proteins aus (Terwilliger et al., 1999). Neben der Funktion in der Ecdysis, wird spekuliert, dass Pseudohämocyanin eine Rolle beim Transport von Ecdyson spielen, an der Calciumspeicherung, sowie der osmotischen Regulation während der Häutung beteiligt sein könnte (Terwilliger et al., 2005; Terwilliger, 2012). Aussagen über den Syntheseort von Pseudohämocyanin variieren zwischen den Ovarien und dem Herzgewebe in *Homarus americanus* (Burmester, 1999) und den R-Zellen des Hepatopankreas in *Cancer magister* (Terwilliger et al., 1999; Terwilliger et al., 2005). Phylogenetische Analysen zeigten, dass Pseudohämocyanin innerhalb der Malacostraca aus einer Genduplikation des Hämocyanins entstanden ist und es aufgrund fehlenden Selektionsdrucks zum Verlust der Kupferbindung kam, wodurch Pseudohämocyanin andere Funktionen im Organismus übernehmen konnte (Burmester, 1999).

1.3.3 Hexamerin & Hexamerinrezeptor

Ein weiterer Vertreter der Hämocyaninsuperfamilie sind die Hexamerine der Hexapoda. Hexamerine bestehen mit wenigen Ausnahmen (Markl et al., 1992; Danty et al., 1998) aus sechs identischen oder sehr ähnlichen 75 bis 85 kDa großen Untereinheiten, die sich zu einer dem Protein namensgebenden hexameren Quartärstruktur zusammensetzen (Telfer & Kunkel, 1991). Sowohl Sequenz als auch Struktur der Hexamerine ähneln stark denen von Hämocyanin. Allerdings fehlen Hexamerin die Kupfer-kordinierenden Histidine, welche Hämocyanin die Bindung von Sauerstoff ermöglichen (Fujii et al., 1989; Willot et al., 1989). Traditionell werden Hexamerine, basierend auf ihrer Aminosäurezusammensetzung, in verschiedene Gruppen unterteilt. Hexamerine mit einem Anteil von Tyrosin und Phenylalanin von über 15% werden zu den Arylphorinen gezählt, während methioninreiche Hexamerine mindestens 4% Methionin in ihrer Aminosäurezusammensetzung aufweisen (Telfer & Kunkel, 1991). Funktionell dienen Hexamerine vor allem als Speicherproteine, die Energie und Aminosäuren zum Aufbau adulter Strukturen bereitstellen (Levenbook & Bauer, 1984). Diese Funktion spiegelt sich besonders deutlich in der Expression der Hexamerine wieder, welche vor allem in der Hämolymphe von Larven und Nymphen sehr hohen Konzentrationen aufweisen und bis zu 50% des in der Hämolymphe gelösten Proteins ausmachen können (Scheller et al., 1990; Telfer & Kunkel, 1991). Neben dieser Speicherfunktion erfüllen Hexamerine noch weitere Aufgaben. So konnte gezeigt werden, dass sie direkt in die Cuticula (Peter & Scheller, 1991) und die sich entwickelnden Antennen mancher Insekten eingebaut werden (Danty et al., 1998). Darüber hinaus agieren Hexamerine als Transportproteine für kleine organische Verbindungen wie Steroidhormone (Enderle et al., 1983), Riboflavin (Magee et al., 1994) und Juvenilhormon (Braun & Wyatt, 1996). Außerdem übernehmen sie in einigen Fällen eine Funktion in der humoralen Immunantwort (Hayakaway, 1994; Beresford et al., 1997) und sind entscheidend an der Ausprägung der Kastenzugehörigkeit einiger Termitenarten beteiligt (Zhou et al., 2006). Phylogenetisch bilden Hexamerine eine stabile monophyletische Gruppe, welche in Schwestergruppenbeziehung zu dem Typ 1 der Hexapodahämocyaninen steht (Burmester, 2001). Untersuchungen deuten darauf hin, dass Hexamerin vor etwa 400 Millionen Jahren innerhalb der Hexapodastammlinie evolvierte, was mit dem Alter der ersten Fossilfunde von Hexapoda korreliert (Kukalová-Peck, 1991). Darüber hinaus folgte die Diversifikation der Hexamerine der Evolution der Hexapodataxa, mit der Ausnahme der Riboflavin-bindenden Hexamerine der Lepidoptera, welche vermutlich in den restlichen Holometabola verloren gingen.

Um das in der Hämolymphe befindliche Hexamerin zum Aufbau adulter Strukturen nutzen zu können, muss Hexamerin zunächst in die Zellen des Fettkörpers eingelagert werden (Ueno & Natori, 1982; Burmester & Scheller, 1992). Dies geschieht durch Endocytose, während der späten Larval- oder Nymphalstadien. Die Endocytose von Hexamerin wird dabei über das Häutungshormon 20-Hydroxyecdysol gesteuert und erfolgt über einen speziellen auf der Zelloberfläche befindlichen Hexamerinrezeptor (Ueno et al., 1983; Ueno & Natori, 1984; Burmester & Scheller, 1995a; Burmester & Scheller, 1997; Burmester, 1999). Dieser, bisher ausschließlich bei den Dipteren *Calliphora vicina* (Burmester & Scheller, 1995b), *Sarcophaga peregrina* (Chung et al., 1995) und *Drosophila melanogaster* (Maschat et al., 1990) nachgewiesene Rezeptor, zeigt große Ähnlichkeit zu seinem Substrat Hexamerin, sowie anderen Mitgliedern der Hämocyanin-Superfamilie (Burmester & Scheller, 1995b). Im Gegensatz zu anderen Vertretern dieser Gruppe sind jedoch nur circa 150 Aminosäuren im N- und etwa 230 Aminosäuren im C-terminalen Bereich hoch konserviert, während der Rest des Proteins eine sehr hohe Variabilität aufweist (Burmester & Scheller, 1996).

1.4 Hämocyanin der Hexapoden

Die weitgehend impermeable Cuticula der Arthropoda macht die Aufnahme von Sauerstoff durch Diffusion über die Körperoberfläche schwierig und ineffizient. In den aquatisch lebenden Crustacea und Chelicerata wird dieses Problem durch die, mit dem Außenmedium in Verbindung stehenden, Kiemen gelöst. Innerhalb der terrestrisch lebenden Arthropoda entwickelten sich verschiedene Anpassungen, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Während es in seltenen Fällen bei sehr kleinen Organismen mit dünner Cuticula zu Hautatmung kommt, erfolgt die Respiration bei vielen Chelicerata über Buchlungen. Der Großteil der terrestrischen Arthropoda bewerkstelligt die Sauerstoffaufnahme jedoch über ein Tracheensystem, welches in den Hexapoda und Myriapoda weit verbreitet ist, aber auch in einigen Chelicerata vorkommt. Das Tracheensystem besteht aus einem hochgradig verzweigten Komplex luftgefüllter, aus Chitin bestehender Röhren, welche die inneren Gewebe über Öffnungen, den sogenannten Stigmen, mit der Atmosphäre verbinden (Krogh, 1920; Burmester & Hankeln, 2007). Die Aufnahme von Sauerstoff in die Zellen erfolgt hauptsächlich an den Enden der sich immer weiter verjüngenden Tracheen, den sogenannten Tracheolen. Diese können in hochaktiven Organen mit hohem Sauerstoffbedarf, wie zum Beispiel der Flugmuskulatur, in die Zellen eindringen und eine direkte Verbindung mit den Mitochondrien herstellen. Der eigentliche Sauerstofftransport in den Tracheen erfolgt hauptsächlich durch passive Diffusion (Krogh, 1920; Burmester & Hankeln, 2007), wobei auch in seltenen Fällen aktive Atmung stattfindet (Komai, 1998; Westneat et al., 2003). Der Transport von O₂ erfolgt aufgrund der hohen

Diffusionsrate in den luftgefüllten Tracheen etwa 200.000 bis 300.000 Mal schneller als in flüssigen Medien wie Hämolymphe oder Blut, und ist somit hoch effizient (Krogh, 1920; Burmester & Hankeln, 2007). Dies führte zu der Annahme, dass das Tracheensystem zur Deckung des Sauerstoffbedarfs auch der größten heute bekannten Insekten ausreicht und Hexapoda über keinen Bedarf an spezialisierten respiratorischen Proteinen verfügen (Mangum, 1985; Law & Wells, 1989; Willmer et al., 2005). Als Ausnahmen hierzu galten die Larven der Dassel­fliege *Gastrophilus intestinalis*, die aquatischen Larven von Zuckmücken (Chironomidae), sowie einige Arten von Rückenschwimmern, die alle über Hämoglobin verfügen (Weber & Vinogradov, 2001). Ein Vorkommen von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda hingegen war nicht bekannt. Dies änderte sich erst, als Sánchez et al. (1998) Hämocyanin zufällig in der Heuschrecke *Schistocerca americana* während einer Affinitätschromatographie aufreinigten. Allerdings wurde es aufgrund der spezifischen Expression im Embryonalstadium zunächst als *embryonic hemolymph protein* (EHP) bezeichnet und als ein naher Verwandter von Hämocyanin eingestuft.

Der führenden phylogenetischen Hypothese (Pancrustacea-Hypothese) nach evolvierten Hexapoda und Crustacea, welche in einem Schwestergruppenverhältnis zueinander stehen, aus einem gemeinsamen Vorfahren (Giribet et al., 2001; Hwang et al., 2001). Hierbei müssen eine Reihe von teils drastischen Anpassungen stattgefunden haben, welche die Respiration fundamental veränderten und den heutigen Insekten den Übergang von aquatischen zu terrestrischen Habitaten erlaubten. Basierend hierauf und unter der Annahme, dass Steinfliegen (Plecoptera) bezüglich ihrer Morphologie und ihrem Verhalten sehr ursprüngliche Merkmale aufweisen, gingen Hagner-Holler et al. (2004) davon aus, dass auch der Gasaustausch innerhalb der Plecoptera, ähnlich wie bei ihren Vorfahren, mittels Hämocyanin bewerkstelligt werden könnte. In ihren Untersuchungen an der Steinfliege *Perla marginata* konnten zwei Hämocyaninuntereinheiten (PmaHc1 & PmaHc2) nachgewiesen werden, welche trotz des Tracheensystems während des gesamten Lebenszyklus exprimiert werden. Die Expression findet dabei in so hohen Konzentrationen statt, dass Hämocyanin bis zu 25% des in der Hämolymphe gelösten Proteins ausmacht. Darüber hinaus wurde sowohl in Nymphen als auch adulten Tieren gezeigt, dass das Hämocyanin Sauerstoff reversibel bindet. Es verfügt dabei über Kooperativität (Hill Koeffizienz von 2) und bindet O₂ mit einem Halbsättigungsdruck (P₅₀) von 8 Torr. Des Weiteren konnte eine enge Verwandtschaft der Hämocyaninuntereinheit 1 von *P. marginata* zum EHP von *S. americana* nachgewiesen werden, wodurch EHP erstmals als Hämocyanin identifiziert wurde (Hagner-Holler et al., 2004). Angeregt durch diese Entdeckung wurden eine Reihe weiterer Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda durchgeführt. So konnten Fochetti et al. (2006) Hämocyanin zunächst in *Perla grandis* nachweisen, gefolgt von Untersuchungen an fünfzehn weiteren

Plecoptera durch Amore & Fochetti (2009), welche Hämocyaninuntereinheit 1 und 2 in vier weiteren Arten fanden. Wieso manche Arten über Hämocyanin verfügen, während es bei anderen Arten abwesend ist, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden, da weder das Habitat, der Lebenszyklus, die Größe, noch das Jagdverhalten der Tiere mit dem Vorkommen von Hc korreliert werden konnten (Amore & Fochetti, 2009).

Im Folgenden konnte das Vorkommen von Hämocyanin in Collembola (*Folsomia candida*, *Sinella curviseta*), Archeognatha (*Machilis germanica*), Zygentoma (*Lepisma saccharina*), Dermaptera (*Chelidurella acanthopygia*), Mantophasmatodea (*Tanzaniophasma spec*), Orthoptera (*Locusta migratoria*), Phasmatodea (*Carausius morosus*), Mantodea (*Hierodula membranacea*), Isoptera (*Cryptotermes secundus*), und Blattodea (*Blaptica dubia*, *Periplaneta americana*, *Shelfordella lateralis*) gezeigt werden. Während für die Embioptera, Zoraptera, sowie die Grylloblattodea keine Untersuchungen vorliegen, konnte Hämocyanin innerhalb der Protura, Diplura, Ephemeroptera, Odonata, sowie sämtlichen Eumetabola (Hemiptera + Holometabola) nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1.5; Pick et al., 2008; Pick et al., 2009a; Burmester, 2015).

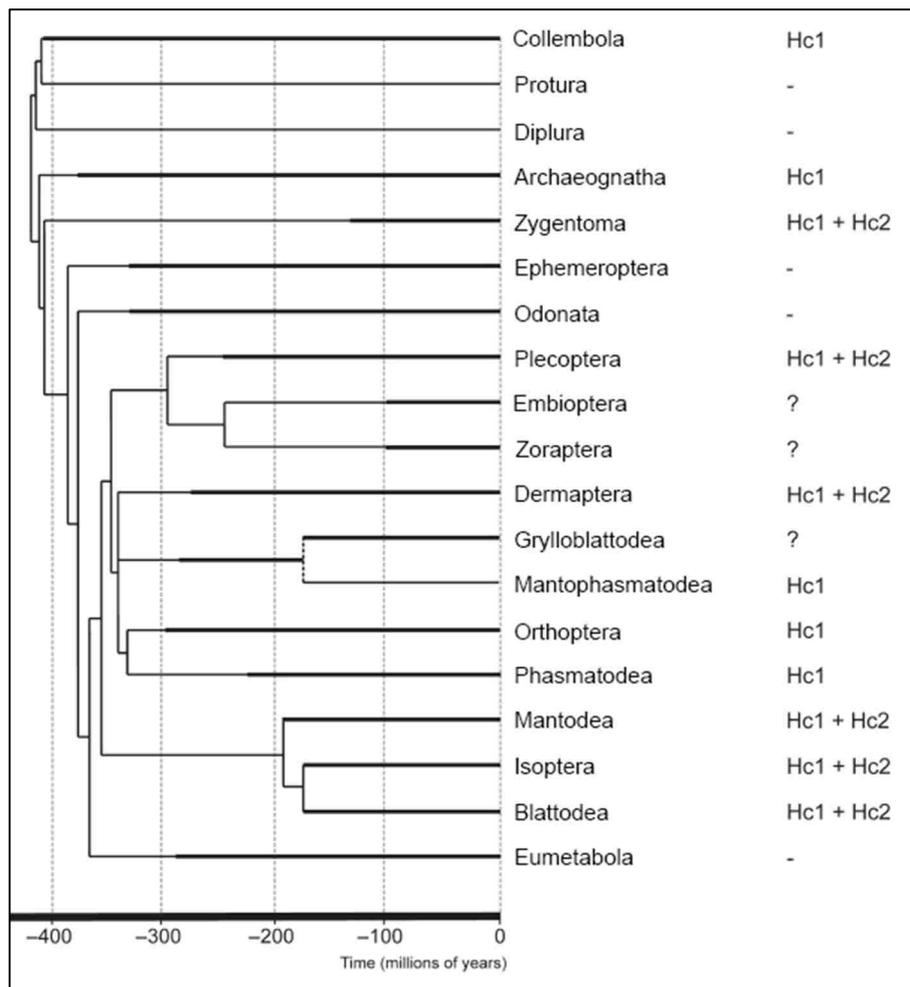


Abbildung 1.5: Verbreitung von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda (abgewandelt aus Pick et al., 2009a).

Auffällig ist die Abwesenheit des zum Transport über das endoplasmatische Reticulum dienende Signalpeptid der Untereinheiten 1 und 2 der Mantodea *H. membranacea*, sowie der Untereinheit 2 des Zygentoma *Thermobia domestica*. Da Hämocyanin, wie bei den übrigen Hexapoda, innerhalb der Hämolymphe nachgewiesen werden konnte, scheint ein alternativer vom Signalpeptid unabhängiger Exportweg zu existieren. Vermutet wird ein ähnlicher Prozess wie bei den Chelicerata, bei denen Hämocyanin aus den Hämocyten durch Zelllyse freigesetzt wird. Wie es zu dem unabhängigen Verlust des Signalpeptids in diesen Spezies kam und welche physiologische Relevanz sie spielen, ist bisher nicht geklärt (Pick et al., 2008; Pick et al., 2009a). Umfassende Expressionsstudien an der argentinischen Waldschabe *Blaptica dubia* konnten zeigen, dass Hämocyanin auf Proteinebene ausschließlich im Embryonalstadium der Tiere exprimiert wird (Pick et al., 2009b). Dies bedeutet, dass das Tracheensystem Nymphen, wie auch adulte Tiere mit ausreichend Sauerstoff versorgen kann. Erst die Embryonen, welche in einer Oothek verpackt sind und bis zum Schlüpfen im Körper der Mutter getragen werden, benötigen, bedingt durch die zusätzliche Diffusionsbarriere, ein respiratorisches Protein. Hämocyanin übernimmt somit in *B. dubia* eine Funktion ähnlich der von embryonalem Hämoglobin in Säugetieren. Ob dabei ein direkter Gasaustausch zwischen den Embryonen und dem Muttertier stattfindet oder die Embryonen den Sauerstoff direkt aufnehmen, ist nicht bekannt. Neben der Ähnlichkeit dieses embryospezifischen Vorkommens von Hämocyanin in *B. dubia* zu der Expression von EHP in den Embryonen von *S. americana*, konnte ein ähnliches Expressionsprofil auch in der Wanderheuschrecke *L. migratoria* gezeigt werden (Yin et al., 2011; Chen et al., 2015). Auch hier erfolgt die Expression von Hämocyanin auf Proteinebene ausschließlich in den Embryonen, in denen es hauptsächlich in der Epidermis exprimiert wird (Chen et al., 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein RNA-Interferenz basierter Hämocyanin-*knockdown* zu signifikanten Verzögerungen und Auffälligkeiten in der Embryonalentwicklung, sowie einer reduzierten Schlupfrate führten (Chen et al., 2015). Zusammen betrachtet, deutet dies auf einen funktionellen Wandel von Hämocyanin im Laufe der Evolution hin. Während es eine generelle Rolle innerhalb der Sauerstoffversorgung basaler Hexapoda übernimmt, dient es höher entwickelten hemimetabolen Insekten zur Versorgung von Embryonen (Pick et al., 2009b). Warum Hämocyanin in den Protura, Diplura, Ephemeroptera, Odonata und allen Eumetabola verloren ging, ist bisher nicht geklärt. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass unbekannte physiologische oder morphologische Modifikationen in der Evolution dieser Taxa ein respiratorisches Protein überflüssig machten. Erst mit der Erschließung hypoxischer Habitate zeigte sich, dass der Verlust von Hämocyanin eine Lücke im Genrepertoire der Eumetabola hinterließ, welche durch Hämoglobin geschlossen wurde (Weber & Vinogradov, 2001; Burmester & Hankeln, 2007).

1.5 Zielsetzung

Während die Verbreitung von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda mittlerweile gut dokumentiert ist, wurden bis heute nur wenige funktionelle Studien durchgeführt. Darüber hinaus lässt sich das Vorkommen von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda bisher weder mit evolutiven Ereignissen (Landgang; aquatische/subterrestische Lebensabschnitte), ökologischen Bedingungen (hypoxische Perioden), physiologischen Eigenschaften (Stoffwechselrate), oder der Morphologie der Tiere (Tracheenaufbau) korrelieren.

Ziel der Arbeit war es, die Präsenz von Hämocyanin parallel zum Tracheensystem zu erklären und die Bedeutung von Hämocyanin für die Sauerstoffversorgung zu untersuchen. Hierfür sollten verschiedene funktionelle Untersuchungen an verschiedenen Hexapoda durchgeführt werden:

Folsomia candida

Mit dem Collembola *Folsomia candida* sollten Hypoxieversuche durchgeführt und die Expression von Hämocyanin auf RNA- und Proteinebene untersucht werden. Anschließend sollte mittels RNA Interferenz ein Hämocyanin-*knockdown* induziert werden, um eventuelle Effekte auf die Hypoxietoleranz untersuchen zu können. Zusätzlich sollte das Vorkommen von Hämocyanin in weiteren Collembola untersucht und diese in einen phylogenetischen Stammbaum eingefügt werden, um eine mögliche Korrelation der Hämocyaninexpression mit den ökologischen Bedingungen des Habitats der Tiere aufzuzeigen.

Locusta migratoria

Die Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* sollte in gregariner und solitärer Phase gezüchtet und vergleichende Untersuchung zwischen den Phasen durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte die Hämocyaninexpression der gregarinen Tiere über alle Entwicklungsstadien, unter Hypoxie, sowie im Anschluss an die Induzierung des Immunsystems analysiert werden, um mögliche weitere Funktionen von Hämocyanin in *L. migratoria* zu identifizieren.

Hierodula membranacea

Da beide Hämocyaninuntereinheiten von *Hierodula membranacea* über kein Signalpeptid verfügen, ist nicht bekannt ob ein Export des Proteins aus der Zelle stattfindet. Eine Analyse der Hämocyaninexpression auf RNA- und Proteinebene sollte zunächst klären wo Hämocyanin in *H. membranacea* synthetisiert wird. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Hämocyanin an seinem Synthesort verbleibt und dort eine intrazelluläre Funktion übernimmt oder ob ein alternativer Exportweg existiert, durch den es an seinen Wirkungsort gelangt.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Im Rahmen der Arbeit wurden drei Arten von Arthropoda im Labor unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet. Die Taxonomie der Versuchstiere ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Taxonomische Übersicht der verwendeten Versuchstiere.

Stamm	Arthropoda		
Klasse	Hexapoda		
Ordnung	Collembola	Orthoptera	Mantodea
Familie	Isotomidae	Acrididae	Mantidae
Gattung	Folsomia	Locusta	Hierodula
Art	<i>Folsomia candida</i>	<i>Locusta migratoria</i>	<i>Hierodula membranacea</i>

2.1.1.1 *Folsomia candida*

Etwa 100 Exemplare des Collembolen *Folsomia candida* (Willem, 1902) wurden zu Zuchtzwecken von der AG Filser der Universität Bremen zur Verfügung gestellt. Die Haltung der Tiere erfolgte in 15x20x7 cm großen Plastikgefäßen, deren Deckel zur ausreichenden Durchlüftung mit Gaze abgedichtete Löcher enthielt. Um ein Austrocknen der Tiere zu vermeiden, wurde der Boden der Gefäße mit einem feuchtigkeitsspeichernden Aktivkohle-Gips-Gemisch (Verhältnis 9:1) ausgegossen. Nachdem der Gips über Nacht aushärten konnte, wurden die Platten mit Wasser gesättigt. Anschließend konnten die Versuchstiere in die Zuchtgefäße eingesetzt werden. Als Futter stand den Tieren Trockenhefe *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem Klimaschrank bei konstant 20 °C und einem Tag-Nacht-Zyklus von 8 / 16 Stunden.

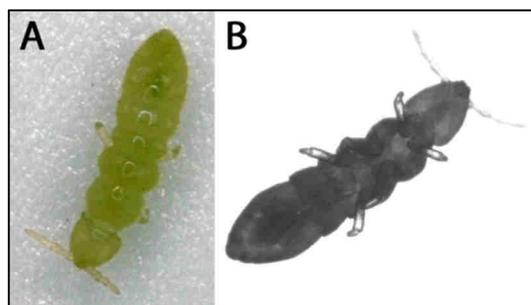


Abbildung 2.1: *Folsomia candida*. Adultes Tier in ventraler (A) und dorsaler Ansicht (B).

Damit für die Versuche nur Tiere des gleichen Alters und Entwicklungsstadiums verwendet wurden, wurde zunächst eine Synchronisationszucht eingerichtet. Hierfür wurden Petrischalen mit dem zuvor beschriebenen Aktivkohle-Gips-Gemisch ausgegossen und jeweils 15 adulte Tiere in eine Schale überführt. Die sich parthenogenetisch vermehrenden Tiere wurden für drei Tage in der Schale gehalten, wo es vermehrt zur Eiablage kam. Anschließend wurden die adulten Tiere mittels Exhaustor aus den Schalen entfernt und die Entwicklung der Eier täglich verfolgt. Nach circa zehn Tagen schlüpfen die ersten Jungtiere, wonach die restlichen Eier von der Platte entfernt wurden. So konnte gewährleistet werden, dass in den Versuchen nur Tiere des gleichen Alters verwendet wurden. Die Jungtiere verblieben für weitere 21 Tage in ihren Schalen, zu welchem Zeitpunkt sie das Adultstadium erreicht hatten und für die Versuche verwendet werden konnten.

2.1.1.2 *Locusta migratoria*

Zum Aufbau einer Zucht wurden 300 Wanderheuschrecken der Art *Locusta migratoria* (Linneaus, 1758) von einem kommerziellen Züchter bezogen. Die Haltung der Heuschrecken erfolgte in 50x50x50 cm großen Metallkäfigen, bei einem Tag-Nacht-Zyklus von 8 / 16 Stunden und Temperaturen zwischen 26 °C nachts und 36 °C tagsüber. Die Tiere wurden mit frischen Weizenkeimlingen, Äpfeln und Möhren gefüttert. Zur Eiablage stand ein mit einem Erde-Sand-Gemisch befülltes Gefäß zur Verfügung.



Abbildung 2.2: Juvenilstadien 1 bis 5 von *Locusta migratoria* (von rechts nach links).

Um den Einfluss der Populationsdichte auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt. Gregarine Tiere lebten in Käfigen mit hoher Bevölkerungsdichte von mehr als 200 Tieren, während solitäre Tiere in Käfigen mit einer Bevölkerung von weniger als zehn Tieren gehalten wurden. Alle Versuchstiere entstammten mindestens der fünften Generation in diesen Haltungsbedingungen, bevor sie für die Versuche verwendet wurden.

2.1.1.3 *Hierodula membranacea*

Zu Zuchtzwecken wurden 20 subadulte Fangschrecke der Art *Hierodula membranacea* (Burmeister, 1838) bei einem kommerziellen Züchter erworben und bis zum Erreichen des Adultstadiums einzeln in 20x20x10 cm großen Boxen, bei Raumtemperatur gehalten. Die adulten Tiere wurden verpaart und die daraus resultierende Generation nach Erreichen des Adultstadiums für die Probenentnahme verwendet. Die Tiere wurden ihrer Größe entsprechend *ad libitum* mit Fruchtfliegen, Grillen oder Heuschrecken gefüttert.

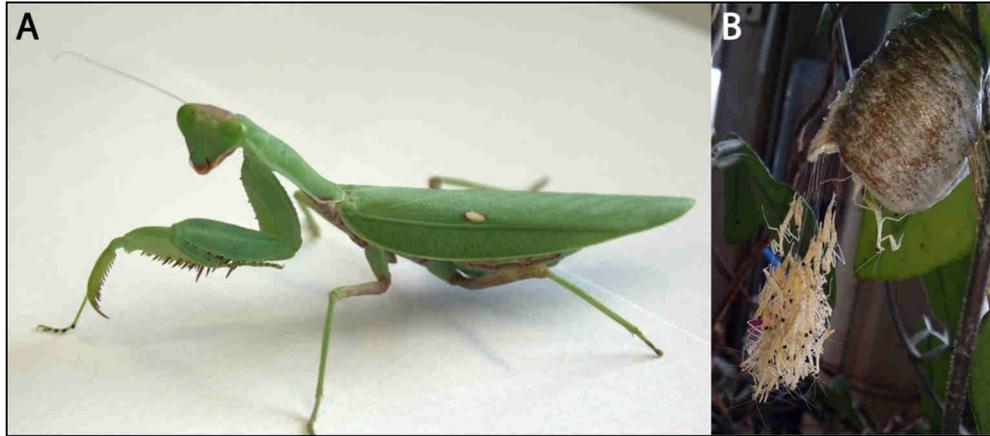


Abbildung 2.3: *Hierodula membranacea*. Adultes Weibchen (A). Jungtiere beim Schlupf aus der Oothek (B).

2.2.1 Geräte

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Geräte verwendet

Autoklaven	3850 ELV (Tuttnauer, Breda Niederlande) Dampfsterilisator Modell B (Webeco GmbH, Bad Schwartau)
Brutschränke	Innova 4200 und 4230 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Blotkammer	Semi-Dry Transferblot-Kammer Typ SDS2 (A.Hartenstein, Würzburg)
Elektrophoresekammer	Mini Protean® 3 Elektrophoresesystem (BioRad, München) Horizontal-Elektrophoresekammer (A. Hartenstein, Würzburg)
Geldokumentation	Fusion Fx7 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
Heizblock	Bio TDB-100 (A. Hartenstein, Würzburg)
pH-Meter	InoLab pH 720 (WTW, Weilheim)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Bonn) Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Darmstadt)
Ultraschallgerät	SonoPlus Ultraschall-Homogenisator HD 2070 (Bandelin, Berlin)
Spannungsgeber	Consort EV 243 (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Thermocycler	Labcycler (Sensoquest, Göttingen) 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt)
Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York) REAX 2000 (Heidolph Instruments, Schwabach)
Rotator	Intelli-Mixer RM-2S (Elmi Ltd., Riga)
Waagen	BP210S (Sartorius, Göttingen) SPO 51 (Scaltec, Göttingen)
Zentrifugen	Sigma 1-14 Mikrozentrifuge (Sigma, Osterode am Harz) Speed Vac® SC110 (Savant, Dreieich) Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Heraeus Labofuge 400R (Heraeus, Hanau)

2.1.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden mit dem auf Ruby basierendem Programm Primerlyze (Borner, unveröffentlicht) anhand bereits bekannter Gensequenzen oder Sequenzen naher verwandter Arten entworfen. Zusätzlich wurden die Bindungseigenschaften aller Primer mittels OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) untersucht. Die Primersynthese wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) vorgenommen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Um RNA aus Geweben oder ganzen Tieren zu isolieren, wurden die Proben zunächst unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsernt. Anschließend erfolgte, basierend auf der 1986 von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Einschnitt-Flüssigphasen-Separation, die Trennung der RNA von DNA und Protein mittels peqGOLD TrifastTM (Peqlab Biotechnologie, Erlangen). In einem weiteren Aufreinigungsschritt wurde die RNA über eine Silicamembran mittels des Crystal RNA Mini Kits (Biolab Products, Beverly) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die gereinigte RNA wurde in Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren fand mittels photometrischer Messung am Nandrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Schwerte) bei 260 nm statt. Der so gemessene Absorptionswert entspricht, bei einer optischen Dichte (OD) von 1, einer Konzentration von 50 ng/µl bei DNA-Lösungen und, aufgrund der Hyperchromazität, einem Wert von 40 ng/µl bei einzelsträngigen RNA-Lösungen. Durch den gleichzeitig bei 280 nm gemessenen Wert, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ermöglicht die photometrische Messung eine qualitative Aussage über die Reinheit der gemessenen Probe und gibt Hinweise auf eine eventuelle Kontamination durch Protein oder Lösungsmittel.

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren ist eine Methode zur Separation und Analyse von DNA und RNA, basierend auf deren Größe und Ladung. Hierbei werden Nukleinsäuren in ein elektrisches Feld gebracht, in dem sie aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats zur Anode wandern. Da die Nukleinsäurefragmente dabei die Matrix eines Agarosegels durchlaufen müssen, erfolgt eine Auftrennung basierend auf ihrer Größe. Zur Visualisierung der Fragmente im Gel wird der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren, wodurch es zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums kommt. Dadurch kann Ethidiumbromid mittels einer UV-Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 312 nm zur Fluoreszenz angeregt und die Nukleinsäuren so detektiert werden.

2.2.3.1 RNA-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende, formaldehydhaltige Gele verwendet. Die RNA-Proben wurden vor der Beladung des Agarosegels in 2x RNA Loading Dye Solution (Thermo Scientific, Schwerte) aufgenommen und für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Da der verwendete RNA-Ladepuffer Ethidiumbromid in einer Konzentration von 10 mg/ml enthielt, konnte die Geldokumentation im Anschluss an die Elektrophorese durchgeführt werden.

10x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure))
 50 mM Natriumacetat
 10 mM Na₂EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure
 Dinatriumsalz Dihydrat)
 pH 7,0

Formaldehydgel: 0,3 g Agarose gelöst in 22,5 ml Aqua dest.
 3 ml 10x MOPS-Puffer
 4,5 ml 37% Formaldehyd

2.2.3.2 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Proben erfolgte in nativen Agarosegelen. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 1 bis 2% verwendet. Die DNA-Proben wurden in DNA-Ladepuffer aufgenommen und zusammen mit dem DNA-Standard GeneRuler DNA Ladder Mix (100 -10.000 bp; Thermo Scientific, Schwerte) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 5 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/l) inkubiert. Nach anschließendem Spülen mit Aqua dest. konnte das Gel unter UV-Licht dokumentiert werden.

DNA Ladepuffer:	50% (w/v) Saccharose 0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1 M Na ₂ EDTA 4 M Harnstoff
10x TBE-Puffer:	0,89 M Tris 0.89 M Borsäure 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0
Agarosegel:	1 - 2% (w/v) Agarose 30 ml TBE-Puffer
E-Puffer:	0,36 M Tris 0,3 M Natriumdihydrogenphosphat 0,1 M Na ₂ EDTA
Ethidiumbromidlösung:	1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) auf 1 l E-Puffer

2.2.4 cDNA-Erststrang-Synthese

Um für weitere Anwendungen intron-freie DNA zu gewinnen, wurde die zuvor isolierte mRNA (englisch: *messenger RNA*) mittels reverser Transkriptase in cDNA (englisch: *complementary DNA*) umgeschrieben. Bei der Reversen Transkriptase handelt es sich um eine aus Retroviren stammende RNA-abhängige DNA-Polymerase (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970), die in der Lage ist, basierend auf einer RNA-Matrize, einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Als Startpunkt der cDNA-Synthese dient ein Oligo(dT)-Primer, welcher mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisiert und die Verlängerung durch die Reverse Transkriptase ermöglicht. Die Erststrangsynthese erfolgte mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die auf den Arbeiten von Mullis und Faloona (1987), sowie Saiki et al. (1988) basierende Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; englisch: *polymerase chain reaction*) dient der *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Das Verfahren beruht zum einen auf der Verwendung von kurzen synthetisch hergestellten Primern, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt sowohl am 3', als auch am 5'-Strang flankieren. Zum anderen auf dem Einsatz der hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Die PCR besteht aus den drei sich zyklisch wiederholenden Phasen der Denaturierung, der Anlagerung und der Elongation. Im ersten Schritt wird der PCR-Ansatz erhitzt bis die DNA-Matrize denaturiert und in zwei Einzelstränge gespalten wird. Während der Anlagerung wird die Temperatur gesenkt bis die spezifische Hybridisierungstemperatur der Primer, welche zur amplifizierenden DNA-Sequenz basenkomplementär sind, erreicht wird und die Primer an die einzelsträngigen DNA binden. Die so angelagerten Primer werden im letzten Schritt von der *Taq*-DNA-Polymerase als Startpunkte der Elongation genutzt. Dieser Reaktionszyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation wird etwa 30 bis 35 Mal wiederholt. Da jedes hergestellte Amplifikat im nächsten Zyklus als Matrize dient, kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments. Im Rahmen der Versuche wurde die Moltaq DNA-Polymerase (Molzym, Bremen) nach Herstellerangaben verwendet. Die in den PCR-Reaktionen verwendeten Primer sind in Tabelle 6.3 des Anhangs aufgeführt.

2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um Kontaminationen, wie Puffer und Primer, von PCR-Produkten zu trennen, wurden Ethanol-Fällungen oder Gelaufreinigungen durchgeführt. Entstanden in einer PCR neben dem gesuchten Produkt auch unspezifische Amplifikate, wurde die Probe zunächst über ein Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das DNA-Fragment der gesuchten Größe unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Crystal Gel-Extraction Kit (Biolab Products, Beverly, MA), über eine Silicamembran nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Enthielt die aufzureinigende Lösung nur ein einzelnes DNA-Fragment wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde die aufzureinigende Lösung in 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, sowie 2,5 Volumen kaltem Ethanol aufgenommen und über Nacht bei -80 °C gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das erhaltene Pellet zwei Mal mit 75%igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.7 Klonierung

Das Verfahren der Klonierung ermöglicht es, DNA im großen Maßstab zu vervielfältigen. Hierzu wird die Zielsequenz zunächst in extrachromosomale DNA (Plasmid) und diese anschließend in Bakterien eingebracht. Bei den verwendeten Plasmiden handelt es sich meist um *high copy number* Plasmide, welche in der Wirtszelle in hoher Stückzahl exprimiert werden, so dass es bei jeder Zellteilung zu einer starken Vermehrung der Zielsequenz kommt.

2.2.7.1 Ligation von PCR-Produkten

Für die Ligation wurde der für TA-Klonierungen geeignete pGEM[®]-T Vektor (Promega, Mannheim) verwendet. Dieser verfügt über 3'-terminale Thymidin-Überhänge, welche, zusammen mit der terminalen Transferaseaktivität der verwendeten *Taq*-Polymerasen, ein leichtes einbauen der Zielsequenzen in den Vektor ermöglichten. Für die Ligationsreaktion wurden 1 µl pGEM[®]-T Vektor (50 ng/µl) mit 3 µl PCR-Produkt, 5 µl 2x Ligase-Puffer, sowie 1 µl T4 DNA-Ligase versetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

2.2.7.2 Transformation kompetenter Zellen

Bei der Transformation handelt es sich um eine Technik zur nicht-viralen Aufnahme von DNA in kompetente Bakterienzellen. Eine der am häufigsten genutzten Transformationsmethoden ist die Hitzeschock-Transformation. Hierbei werden die zu transformierenden Bakterien mit Calciumchlorid behandelt, um die Abstoßung zwischen Zellmembran und einzubringender DNA zu verringern. Durch einen anschließenden kurzen Hitzeschock werden die Membranen der Bakterienzellen kurzzeitig porös, wodurch die Aufnahme der Vektoren ermöglicht wird.

Zur Transformation wurden 25 µl JM109 Bakterienzellen (Promega, Mannheim) mit 4 µl Ligationsansatz vermischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten ein 50 Sekunden andauernder Hitzeschock bei 42 °C und eine erneute 2 minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die kompetenten Zellen mit 500 µl LB-Medium gemischt und bei 37 °C im Brutschrank unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach 1,5 Stunden wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-haltigen Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.7.3 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion ist eine Methode zur schnellen Identifikation positiv transformierter Bakterienklone. Das Selektionssystem basiert auf der Hydrolyse des synthetischen Substrates X-Gal durch das Enzym β -Galactosidase, welches X-Gal zu Allolactose und 5-Brom-4-chlorindoxy umsetzt (Winnacker, 1987). In Verbindung mit Sauerstoff reagiert 5-Brom-4-chlorindoxy zu einem intensiven blauen Farbstoff. Für die Blau-Weiß-Selektion geeignete Bakterienstämme tragen den für den N-terminalen Abschnitt codierenden Teil der β -Galactosidase in ihrem Genom, während der C-terminale Abschnitt erst durch einen geeigneten Vektor in die Wirtszelle eingebracht werden muss. Wird die Expression der β -Galactosidase durch Induktion mit dem Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) ausgelöst, kommt es zur α -Komplementation. Da sich bei dem verwendeten pGEM[®]-T Vektor die Klonierungsstelle innerhalb der für die β -Galactosidase codierenden Sequenz befindet, wird die Expression der C-terminalen Domäne durch den Einbau eines Inserts verhindert und eine Blaufärbung bleibt aus.

Positive weiße Bakterienklone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Selektionsplatte in 5 ml LB-Medium überführt, welches zuvor mit 10 µg/ml Ampicillin versetzt wurde. Die Bakterien wurden anschließend über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

2.2.7.4 Dauerkulturen

Nachdem die Bakterienkulturen über Nacht wachsen konnten, wurde vor Beginn der Plasmidpräparation (2.2.8) zunächst eine Dauerkultur angelegt. Hierzu wurden 700 µl der Bakterienkultur mit 300 µl Glycerin gemischt und bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.8 Plasmidpräparation

Um die in Bakterienzellen eingebrachten Plasmide nach ihrer Amplifikation durch das bakterielle Wachstum zu isolieren, wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab Biotechnologie, Erlangen), welches auf dem Funktionsprinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979) basiert, nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierten Plasmide wurden in 50 µl Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob ein Plasmid ein Insert der gesuchten Größe trägt, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dieser wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Restriktionsansatz:	5 µl Plasmidlösung
	3 µl Aqua dest.
	1 µl 10x Restriktionspuffer
	1 µl Restriktionsenzym

2.2.10 RNA-Interferenz

Bei der 1998 von Fire et al. entdeckten RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus, der zum spezifischen Abbau von mRNA führt. Dabei werden so genannte pri-miRNA (englisch: *primary miRNA*), welche vermutlich von einer Typ II Polymerase synthetisiert werden, von der RNase III Endonuclease Drosha geschnitten und als pre-miRNA (englisch: *precursor miRNA*) aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert. Im Cytoplasma wird die pre-miRNA von der RNase III Endonuclease Dicer geschnitten und die fertige miRNA (englisch: *micro RNA*) im Folgenden in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut. Der RISC bindet abschließend, geführt von der komplementären miRNA, an die Ziel-mRNA und degradiert diese (Bartel, 2004). Diese endogenen Prozesse können genutzt werden, um gezielt die Expression eines Gens zu senken (englisch: *knockdown*). Hierzu werden synthetisch hergestellte doppelsträngige RNAs (dsRNA; englisch: *double stranded RNA*) in den Organismus eingebracht und durch Dicer zu siRNAs (englisch: *small interfering RNA*) verarbeitet. Diese binden anschließend an die mRNA des Zielgens und führen zum gewünschten *knockdown*. Die dsRNA-Synthese erfolgte mit dem MEGAScript® T7 Transcription Kit (Life Technologies, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Als Ausgangspunkt der RNA-Synthese dient cDNA, welche mit Primern (siehe Tabelle 6.5) hergestellt wurde, die über einen T7-Promoter verfügten.

2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Ermittlung der genauen Basenabfolge eines DNA-Fragments. Die im Rahmen der Arbeit verwendete Sequenzierungsmethode beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese nach Sanger et al. (1977). Alle Sequenzierungsreaktionen dieser Arbeit wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) mit dem ABI 3730xl Sequenziersystem durchgeführt.

2.2.12 Quantitative real-time RT-PCR

Die quantitative real-time RT-PCR (qPCR) ist eine auf dem Prinzip der RT-PCR basierende Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in Geweben (Heid et al., 1996). Anders als bei Endpunktbestimmungen von Nukleinsäuren, ist es durch die qPCR möglich, die Produktzunahme in jedem PCR-Zyklus in Echtzeit (englisch: *real-time*) zu messen und dadurch die ursprünglich eingesetzte Kopienzahl des untersuchten Gens zu bestimmen. Dies ermöglicht Vergleiche der transkriptionellen Expression der untersuchten Gene zwischen verschiedenen Geweben und physiologischen Zuständen. Die Quantifizierung in der qPCR erfolgt durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Green, welcher in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert. Dies führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz des SYBR[®]-Green, wodurch eine spezifische Detektion bereits bei geringsten DNA-Mengen ermöglicht wird.

2.2.12.1 Probenvorbereitung

Die RNA-Extraktion der qPCR-Proben erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Kit (Qiagen, Hilden) auf der Silicamembran durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde das Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Darmstadt) mit dem RNA High Sensitivity Kit nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend erfolgte eine RNA-Gelelektrophorese, um die RNA auf eventuelle Degradation hin zu untersuchen. Die cDNA-Synthese wurde mit 1 µg RNA und dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kits for RT-qPCR (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.12.2 Standardproben der quantitativen real-time-RT-PCR

Um über vergleichende Aussagen hinaus die exakte Expression eines Gens bestimmen zu können, muss die Effizienz, mit der die Amplifikation in der qPCR abläuft, ermittelt werden. Hierfür wird eine Standardgerade anhand von Standardplasmiden erstellt, deren genaue Kopienzahl bekannt sein muss. Die exakte Anzahl an Plasmiden berechnet sich durch die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration in der Plasmidlösung, sowie der Größen des Plasmids und des Integrats (siehe Abbildung 2.4).

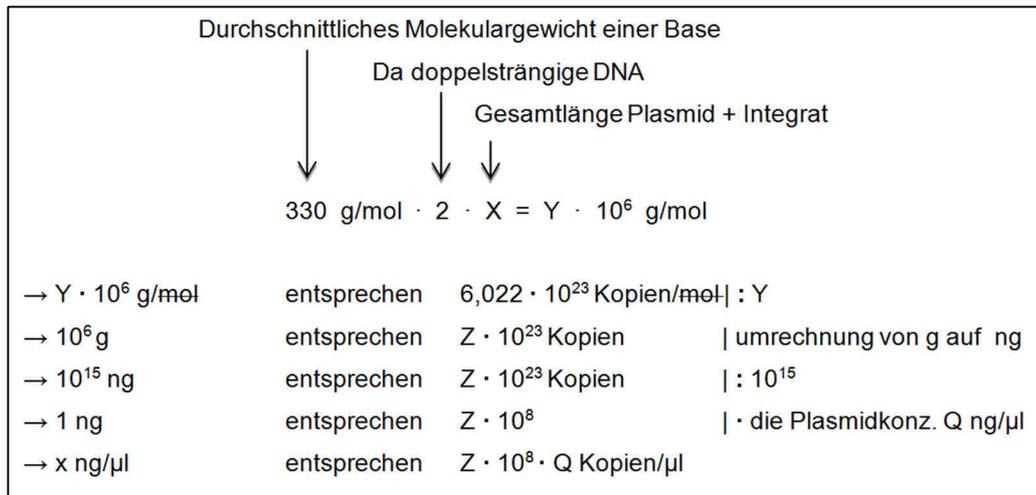


Abbildung 2.4: Berechnung der Kopienzahl von Standardplasmiden.

Mit der errechneten Kopienzahl/μl kann anschließend eine Verdünnungsreihe einer Plasmidlösung mit einer definierten Kopienzahl von $X \cdot 10^2$ bis $X \cdot 10^7$ angesetzt und diese zur Erstellung einer Eichgeraden genutzt werden. Über die aus der Standardgeraden ermittelten Steigung (englisch: *slope*) kann abschließend durch die Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ (Rasmussen, 2001) die Effizienz der PCR-Reaktion bestimmt werden. Dabei nimmt die Steigung im Idealfall Werte im Bereich von -3,3 bis -3,4 an, was etwa einer Verdopplung der vorliegenden DNA und somit einer Effizienz von 100% entspricht.

2.2.12.3 Durchführung der quantitativen real-time-RT-PCR

Um die Gleichmäßigkeit der qPCR zu gewährleisten und eventuell auftretende Schwankungen in den Proben zu identifizieren, wurde jede Probe in Triplets und die zur Erstellung der Eichgeraden verwendeten Standardplasmide in Dupletts angesetzt. Außerdem wurden während jedes Laufs Negativkontrollen (NTC; englisch: *no template control*) verwendet, um die Reagenzien auf Kontaminationen hin zu überprüfen. Zur Minimierung von Pipettierfehler wurden darüber hinaus die Reagenzien für jeden Versuch zunächst in einem Mastermix angesetzt und erst dann mit der cDNA vermischt.

qPCR-Ansatz pro Well:

- 11 μl Power SYBR[®]-Green PCR Master Mix
- 0,55 μl forward-Primer (10 μM)
- 0,55 μl reverse-Primer (10 μM)
- 1 μl cDNA
- 8,8 μl Aqua dest.

Die Proben wurden auf eine 96er CRYSTAL PCR Platte (Biolab Products, Bebensee) aufgetragen, diese mit CRYSTAL qPCR-Folie (Biolab Products, Bebensee) versiegelt und die Platte kurz abzentrifugiert. Die qPCR wurde, nach dem in Tabelle 2.2. beschriebenen Reaktionsprotokoll, mit einem ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass trotz der hohen Sensitivität der qPCR keine unspezifischen Produkte oder Primer-Dimere detektiert werden, wurde dem Reaktionsprotokoll eine Schmelzkurvenanalyse angefügt. Die in der qPCR verwendeten Primer sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Reaktionsprotokoll der real-time RT-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
Primäre Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	35 Zyklen
Hybridisierung	60 °C	15 s	
Elongation	72 °C	30 s	
	95 °C	15 s	
Schmelzpunktanalyse	60 °C	30 s	
	95 °C	15 s	

2.2.12.4 Auswertung der quantitativen real-time-RT-PCR

Nach Abschluss einer qPCR wurden zunächst die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse überprüft. Da jedes PCR-Produkt über eine spezifische Dissoziationstemperatur verfügt, sollte die Schmelzpunktanalyse nur einen einzelnen *peak* zeigen, da weitere *peaks* Kontaminationen mit unspezifischen DNA-Amplifikaten oder Primer-Dimere darstellen (siehe Abbildung 2.5).

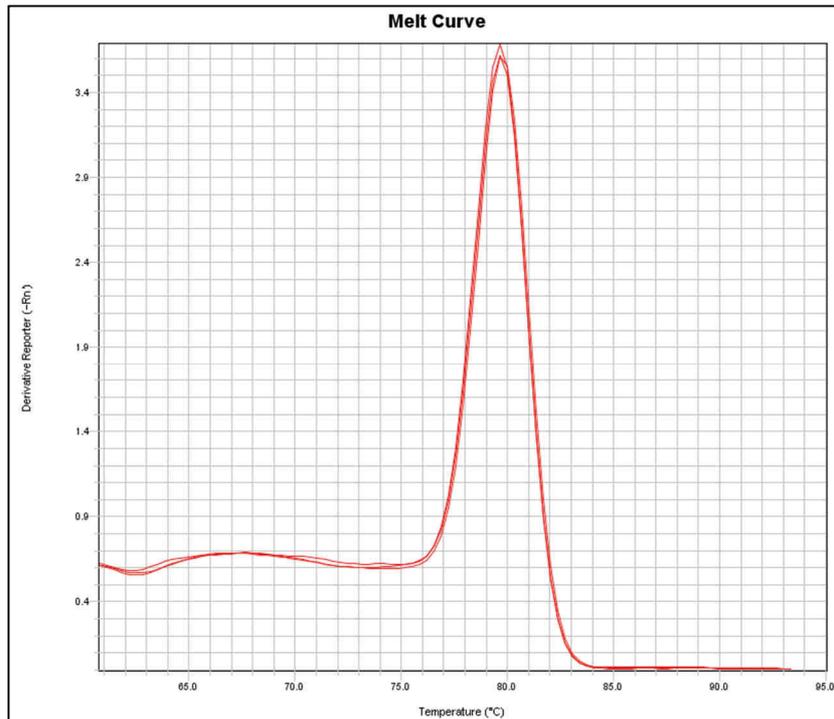


Abbildung 2.5: Beispielhafte Darstellung einer Schmelzpunktanalyse. Die untersuchten Proben zeigen ausschließlich einen *peak* und enthalten somit ein einzelnes, spezifisches Amplifikat.

Um die Messungen verschiedener Proben untereinander vergleichen zu können, muss ein Schwellenwert (englisch: *threshold*) innerhalb der Amplifikationskurve festgelegt werden, an dem die Fluoreszenz in allen Proben gemessen werden soll. Der Amplifikationszyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz einer Probe den *threshold* überschreitet, wird als Ct-Wert (englisch: *cycle of threshold*) bezeichnet (siehe Abbildung 2.6). Da sich der Ct-Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an DNA verhält, kann über ihn die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge bestimmt werden.

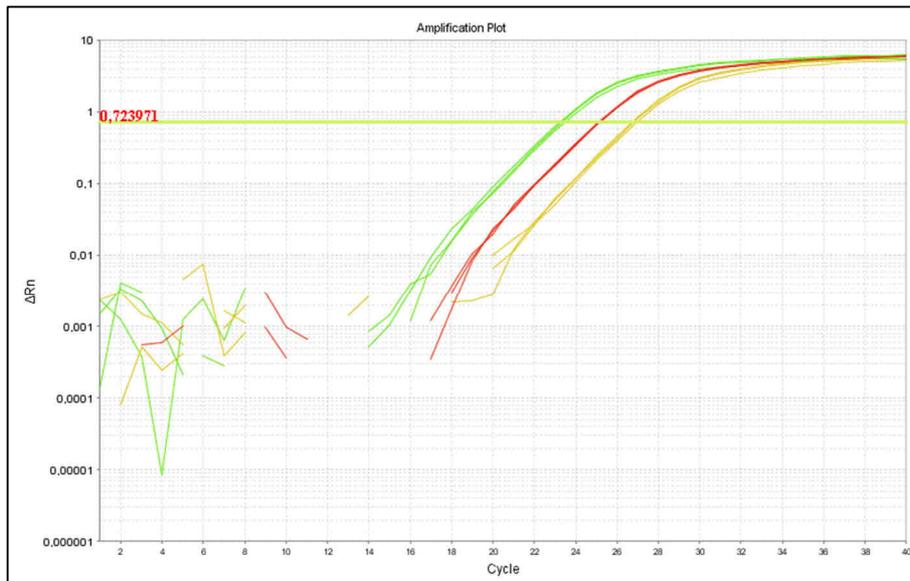


Abbildung 2.6: Beispielhafte Darstellung eines Amplifikationsplots. Die farbigen Linien repräsentieren die Tripletts-Ansätze der untersuchten Proben. Der *cycle of threshold* befindet sich am Schnittpunkt der Amplifikationskurven mit dem *threshold*.

Um eventuelle Expressionsschwankungen zwischen biologischen Replikaten zu minimieren, wurden alle Proben auf nicht regulierte Referenzgene normalisiert. Dies geschah durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode, welche den Expressionsunterschied zwischen einem Kalibrator und einer Probe berechnet und dabei gleichzeitig die Normalisierung auf ein Referenzgen vollzieht (siehe Abbildung 2.7).

$$R = \frac{(E_{Zielgen})^{Ct_{Zielgen(Kalibrator)} - Ct_{Zielgen(Proben)}}}{(E_{Referenzgen})^{Ct_{Referenzgen(Kalibrator)} - Ct_{Referenzgen(Probe)}}$$

Abbildung 2.7: Berechnung des Expressionsunterschieds (R) zwischen Kalibrator und Probe, normalisiert auf ein Referenzgen. E = Effizienz der PCR-Reaktion; Ct = *cycle of threshold*.

Um absolute Kopienzahlen für die einzelnen Proben zu erhalten, wurden im Anschluss die errechneten Regulationsfaktoren mit der Kopienzahl des Kalibrators multipliziert. Ständen mehrere Referenzgene zur Normalisierung der Proben zur Verfügung, wurde das Referenzgen mit der stabilsten Expression durch Normfinder v.0953 (Andersen et al., 2004) ermittelt und zur Normalisierung verwendet.

Material & Methoden

4x Laemmli-Puffer:	1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 2 ml 10% SDS 1 ml Glycerin 0,25 ml Aqua dest. eine Spatelspitze Bromphenolblau vor Gebrauch 10% (v/v) β -ME frisch zusetzen
1x SDS Laufpuffer:	23 mM Tris 190 mM Glycin 0,2% (v/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	2 g Coomassie Brilliant Blue R 250 400 ml Methanol 175 ml 60% (v/v) Essigsäure 425 ml Aqua dest. vor Gebrauch sterilfiltrieren
Entfärbelösung:	10% (v/v) Eisessig 25% (v/v) Isopropanol in Aqua dest.

2.3.4 Westernblot

Damit Proteine durch eine immunologische Detektion visualisiert werden können, müssen zunächst die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden.

2.3.4.1 Elektrophoretischer Transfer der Proteine

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine wurde das Semi-Dry Westernblot Verfahren verwendet (Renart et al., 1979; Burnette, 1981). Das Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgt hierbei durch das senkrechte Anlegen einer Spannung zwischen Gel und Membran.

Vor Beginn des elektrophoretischen Transfers wurden die porablott NCP Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 μ m; Macherey-Nagel, Düren), das SDS-Gel, sowie das Blottingpapier (A. Hartenstein, Würzburg) für einige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Dies diente der Benetzung der Membran und der Lockerung der Bindung des SDS an die Proteine. Anschließend wurden Gel und Membran in der Blotkammer vorsichtig übereinander gelegt und mit Blottingpapier über- und unterschichtet. Der elektrophoretische

Transfer erfolgte bei 120 V und 35 mA für 1,5 Stunden. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde die Nitrocellulosemembran anschließend mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S ist ein Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet und nach Abschluss der Visualisierung durch Spülen mit Aqua dest. wieder entfernt werden kann.

Transferpuffer:

- 2,9 g Glycin
- 5,8 g Tris
- 0,37 g SDS
- 200 ml Methanol
- 800 ml Aqua dest.
- pH 8,3 - 8,7

Ponceau S-Lösung:

- 5% Essigsäure
- 0,02% Ponceau S

2.3.4.2 Immunologische Detektion

Die immunologische Detektion dient dem spezifischen Nachweis von zuvor auf eine Membran transferierten Proteinen. Die Visualisierung erfolgt hierbei durch eine indirekte Färbung. Hierfür wird ein spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper verwendet, welcher von einem, mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten, Sekundärantikörper gebunden wird. Die alkalische Phosphatase katalysiert dabei den Umsatz der Substrate 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT), was dazu führt das beide Farbstoffe in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle ausfallen und so spezifisch das gesuchte Protein anfärben. Um die Spezifität der Antikörperbindung zu erhöhen, wurden freie Proteinbindungsstellen zunächst durch eine Inkubation der Nitrocellulosemembran in unspezifisch bindender Blocklösung abgesättigt. Die verwendeten Antikörper und Detektionsprotokolle sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Material & Methoden

5x TBS-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 750 mM NaCl
Blocklösung:	2% (v/v) Milchpulver 0,02% (v/v) Tween-20 in 1x TBS-Puffer
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl
BCIP:	50 mg/ml in 100% Methylformamid
NBT:	75 mg/ml in 70% Methylformamid

Tabelle 2.3: Verwendete Protokolle der immunologischen Detektionen von Hämocyanin in *Folsomia candida*, *Hierodula membranacea* und *Locusta migratoria*.

	<i>Folsomia candida</i>	<i>Hierodula membranacea</i>	<i>Locusta migratoria</i>
Blocken	5% Milchpulver + 0,5% Tween-20 in 1x TBS für 1 Stunde		
Primärantikörper	Fca-Hc2 (Rabbit) 1:10.000 in Blocklösung über Nacht bei 4 °C	Bdu-Hc1+Bdu-Hc2 (Rabbit) 1:10.000 in Blocklösung über Nacht bei 4 °C	Bdu-Hc1+Bdu-Hc2 (Rabbit) 1:10.000 in Blocklösung über Nacht bei 4 °C
Waschen	3x für 5 Minuten in 1x TBS		
Sekundärantikörper	Anti-Rabbit (Goat) 1:10.000 in Blockinglösung für 1 Stunde		
Waschen	3x für 5 Minuten in 1x TBS		
Equilibrierung	10 Minuten in AP-Puffer		
Detektion	BCIP + NBT in AP-Puffer		

2.3.5 Antikörperherstellung

Für die immunologische Detektion werden zwei Antikörper benötigt. Neben dem spezifisch gegen ein Wirtstier gerichteten Sekundärantikörper wird außerdem ein Primärantikörper benötigt, welcher das gesuchte Protein bindet. Da im Falle von *Folsomia candida* Hämocyanin 2 (Fca-Hc2) kein Primärantikörper verfügbar war, musste zunächst ein geeigneter Antikörper hergestellt werden. Hierfür erfolgte die rekombinante Expression und Aufreinigung eines Hc2-Teilfragments, welches anschließend zur Immunisierung eines New Zealand White Rabbits verwendet wurde.

2.3.5.1 Rekombinante Proteinexpression

Zur rekombinanten Expression von *Folsomia candida* Hämocyanin 2, wurde zunächst ein Teilfragment der Hc2-Sequenz amplifiziert (siehe Tabelle 6.6) und in den Expressionsvektor pet-41a (Novagen, Schwalbach) kloniert. Daraufhin erfolgte die Ligation in Rosetta 2 Zellen (Novagen, Schwalbach) nach Herstellerangaben. Im Anschluss an die Plasmidpräparation und Sequenzierung wurde ein für die rekombinante Expression geeigneter Klon identifiziert und dieser in einer 10 ml Vorkultur unter Chloramphenicol (34 mg/ml) und Kanamycin (10 mg/ml) Selektion über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Im Weiteren wurde die Vorkultur in 1 l frisches LB-Medium überführt und die Zelldichte regelmäßig bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Nach Erreichen einer OD zwischen 0,4 und 0,8, wurde eine 1 ml Induktionskontrolle abgenommen und die Bakterien mit 1 ml IPTG induziert. Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend, nach Abnahme einer 1 ml Expressionskontrolle, bei 4000 g und 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet der Expressionskultur wurde in 12 ml Lysispuffer aufgenommen, kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach für 60 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die resuspendierte Lösung wurde im Anschluss auf Eis 5x für 30 Sekunden sonifiziert. Nach Abnahme einer 1 ml *Inclusion-Body*-Probe, wurde das Lysat bei 10.000 g bei 4 °C für 30 Minuten pelletiert. Der Überstand enthielt das gesuchte Fusionsprotein, welches mittels Sterilfiltration (45 µm Porengröße) in ein neues Falcon überführt wurde.

Lysepuffer: 50 ml 1x PBS, pH 7,3
 2 mM DTT (Dithiotreitol)
 1 mg/ml Lysozym
 1 Tablette Complete
 1 mM Pefabloc
 80 µl DNase
 Eine kleine Spatelspitze RNase

2.3.5.2 Proteinaufreinigung

Zur Aufreinigung des exprimierten Hc2-Fusions-Proteins wurde eine His60 Ni Superflow Resin (Clontech, Heidelberg) Nickelsäule verwendet. Diese bindet reversibel das, an das gesuchte Protein gekoppelte, His-Tag, während andere Proteine die Matrix der Säule ungehindert passieren. Erst durch absenken des pH-Wertes löst sich das Fusionsprotein von der Säule und lässt sich fraktionieren. Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Matrix der His60 Säule zunächst mit 10 ml Äquilibriumspuffer gewaschen, 4 ml der Probe auf die Säule gegeben und diese bei 4 °C für 1 Stunde im Rotator inkubiert. Anschließend wurde der Durchfluss der Säule verworfen und in zwei Wiederholungen die restliche Probe aufgetragen. Nachdem das gesuchte Protein so an die Säule gebunden wurde, erfolgten zwei 10 minütige Inkubationen mit 5 ml Äquilibriumspuffer im Rotator, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Daraufhin wurde die Säule in zwei Waschschritten mit jeweils 5 ml Waschpuffer ebenfalls für 10 Minuten im Rotator inkubiert und der Durchfluss verworfen. Abschließend erfolgte die Elution des Zielproteins durch Zugabe von 10 ml Elutionspuffer auf die Säule, wobei der Durchfluss in 1 ml Fraktionen gesammelt wurde. Nach einer photometrischen Messung bei 280 nm, wurden die proteinenthaltenden Fraktionen vereint und in der Dialyse weiterverwendet.

Waschpuffer: 50 mM Natriumhydrogenphosphat
 8 M Harnstoff
 300 mM Natriumchlorid
 40 mM Imidazole
 pH 7,4

Elutionspuffer: 50 mM Natriumhydrogenphosphat
 8 M Harnstoff
 300 mM Natriumchlorid
 300 mM Imidazole
 pH 7,4

Äquilibriumspuffer : 50 mM Natriumhydrogenphosphat
 8 M Harnstoff
 300 mM Natriumchlorid
 20 mM Imidazole
 pH 7,4

2.3.5.3 Dialyse

Um das Hc2-Protein von den in der Säulenaufreinigung genutzten Pufferbestandteilen zu trennen, erfolgte eine Dialyse. Hierzu wurden die proteinenthaltenden Fraktionen in einem Dialyseschlauch vereint und bei 4 °C unter ständigem Rühren die Konzentration des Harnstoffs im Dialysemedium schrittweise abgesenkt. Nach drei Tagen war sämtlicher Harnstoff entfernt und das Hc2-Protein konnte abschließend mittels Amicon® Ultra-15 Zentrifugenfilter (Merck Millipore, Schwalbach) mit einem *molecular weight cutoff* von 10.000 auf ein Volumen von 2 ml eingeengt werden.

2.3.5.4 Immunisierung

Die Immunisierung eines New Zealand White Rabbits wurde bei Charles River (L'Arbresle, Frankreich) nach einem 72 Tage Standardprotokoll durchgeführt. Das Serum der finalen Blutung konnte anschließend für die Detektion von Hämocyaninuntereinheit 2 aus *Folsomia candida* verwendet werden.

2.4 Bioinformatische Methoden

2.4.1 Sequenzanalysen

Die Auswertung der, in der Sequenzierung erstellten, Chromatogramme erfolgte mittels FinchTV V. 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). Zur Verifizierung der erhaltenen Gensequenzen wurden diese gegen Datenbanken mittels BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen. Alignments verschiedener Sequenzen wurden mittels MAFFT V. 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>) erstellt und die so erhaltenen Sequenzalignments in Genedoc v. 2.7.000 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc>) übertragen.

2.4.2 Stammbaumanalysen

Um die im Rahmen der Arbeit gesammelten Collembola taxonomisch zuzuordnen, wurde eine phylogenetische Stammbaumanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die 18S rRNA sequenziert und, insofern vorhanden, durch bereits verfügbare Teilfragmente der 28S rRNA ergänzt (siehe Tabelle 6.8). Die so gewonnenen Sequenzen wurden anschließend wie unter 2.2.10 aligniert. Bevor jedoch ein phylogenetischer Stammbaum berechnet werden konnte, musste zunächst das für den Datensatz am besten geeigneten Substitutionsmodells statistisch bestimmt werden. Hierfür wurden die vorliegenden Sequenzen mittels jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) unter Verwendung von Akaikes Informationskriteriums untersucht. Basierend auf dieser Untersuchung wurde der Datensatz mittels Mr.Bayes v.3.2.3 (Huelstenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) unter Verwendung des GTR Modells (Tavaré, 1986) und der Annahme invarianter Substitutionspositionen, sowie einer Gammeverteilung der Substitutionsraten berechnet. Die Analyse erfolgte dabei über eine Million Generationen. Nach jeder hundertsten Generationen wurde eine Stichprobe genommen und die posterioren Wahrscheinlichkeiten ermittelt. Die ersten 2500 Stammbäume wurden verworfen und abschließend die erhaltenen Stammbäume in einem Konsensusbaum vereint. Ein Stammbaum zur Einordnung der analysierten Sequenzen (siehe Tabelle 6.7) der Hämocyaninuntereinheiten wurde mittels Bayes'scher Analyse unter Annahme des WAG-Modells und einer Gammaverteilung der Substitutionsraten über 5 Millionen Generationen berechnet. Jede hundertste Generation wurde eine Stichprobe genommen und die posterioren Wahrscheinlichkeiten ermittelt. Die ersten 12500 Stammbäume wurden verworfen und abschließend die erhaltenen Stammbäume in einem Konsensusbaum vereint.

2.4.3. Transkriptomanalysen

Um ein breites Spektrum an Taxa verschiedener Hexapoda-Ordnungen auf das Vorhandensein von Hämocyanin hin zu untersuchen, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt. Hierzu erfolgte ein *mapping* der in Tabelle 6.10 aufgeführten Transkriptomdaten mittels der CLC Genomics Workbench 7.5.1. (Qiagen, Hilden, Germany) gegen die Referenzsequenzen der Hämocyanine von *Blaptica dubia*, *Thermobia domestica*, *Locusta migratoria* und *Folsomia candida*. Zur Vermeidung eines falsch positiven *mappings* von Hexamerinsequenzen gegen die Hämocyaninreferenzen, wurden darüber hinaus sechs verschiedene Hexamerinsequenzen als zusätzliche Referenzen verwendet (siehe Tabelle 6.9). Als Parameter des *mappings* wurden *length fraction* = 0,75 und *similarity fraction* = 0,75 festgelegt. Als Positivkontrolle, zur Überprüfung der für das *mapping* gewählten Parameter, dienten β -Actin Sequenzen von *F. candida*, *L. migratoria* und *Apis mellifera*.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der Hypoxieantwort des *Collembola Folsomia candida*

Um zu überprüfen, ob Hämocyanin eine Rolle in der Respiration des *Collembola F. candida* einnimmt, wurden Hypoxieversuche durchgeführt. Hierzu wurde *F. candida* in vier Versuchsreihen unterschiedlich starken Hypoxiebedingungen ausgesetzt.

- schwache Kurzzeithypoxie (10% O₂ für 1 h)
- starke Kurzzeithypoxie (1,5% O₂ für 1 h)
- schwache Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h)
- starke Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h)

Als Kontrolle dienten unter Normoxie (21% O₂) gehaltene Tiere. Pro Behandlung wurden sieben biologische Replikate verwendet, bestehend aus jeweils zweihundert synchrongezüchteten Tieren. Die Extraktion von RNA und Protein erfolgte in direktem Anschluss an die Hypoxiebehandlungen.

3.1.1 Analyse der RNA-Expression in Reaktion auf Hypoxie mittels quantitativer real-time RT-PCR

Für die Untersuchung der Hypoxieantwort auf mRNA-Ebene sollte neben dem sauerstofftransportierenden Hämocyanin (Hc) auch die Expression weiterer möglicherweise mit Hypoxie oder dem O₂-Metabolismus assoziierter Gene analysiert werden. Hierzu gehörten der oxidative Stressmarker *heat shock protein 70* kDa (Hsp70), die in der Glykolyse beteiligten Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Laktatdehydrogenase (LDH), sowie die im Citratzyklus involvierten Enzyme Isocitratdehydrogenase (IDH) und Malatdehydrogenase (MDH). Als Referenzgene dienten Cyclophilin (Cyc), β -Tubulin (Tub) und das *ribosomale protein, large, P0* (Rplp0). Eine Analyse mittels NormFinder zeigte, dass Rplp0 (Normfinder *stability value* = 0,167) den geringsten Schwankungen unterworfen war und somit das am besten zur Normalisierung geeignete Referenzgen darstellte. Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA.

Hämocyanin

Die Untersuchung der Hämocyaninexpression (Hc; siehe Abbildung 3.1) zeigte, dass in *Folsomia candida* unter normoxischen Bedingungen etwa 2×10^3 Kopien/ μg Gesamt-RNA des Gens vorlagen. In Reaktion auf starke und schwache Kurzzeithypoxie, sowie auf schwache Langzeithypoxie stieg die Kopienzahl von Hc auf Werte im Bereich zwischen 5×10^4 bis $1,3 \times 10^5$ Kopien/ μg , was jedoch keine signifikante Steigerung im Vergleich zur Normoxie darstellt. Starke Langzeithypoxie hingegen führte zu einem signifikanten ($p \leq 0,001$) Anstieg auf circa 1×10^7 Kopien/ μg , was einer etwa 4000-fachen Steigerung im Vergleich zur Normoxie entspricht.

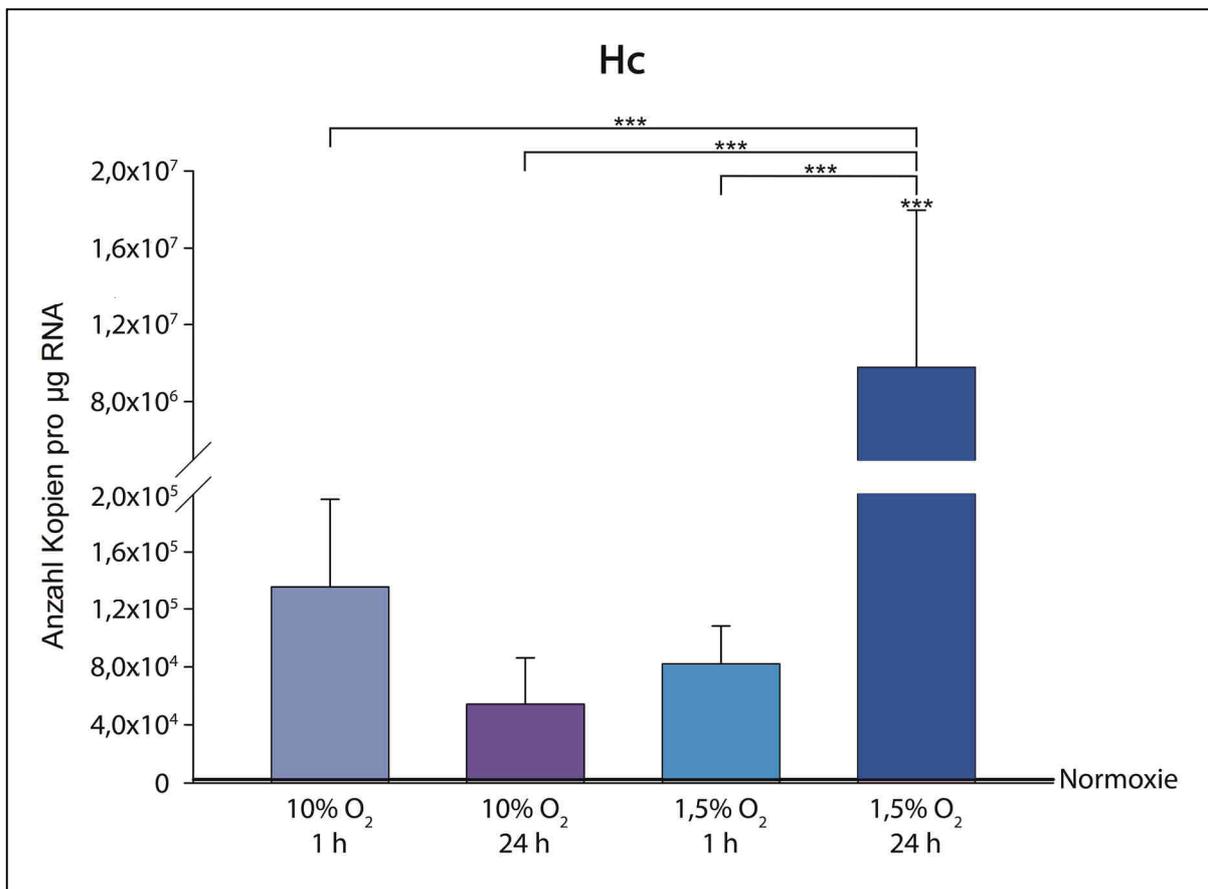


Abbildung 3.1: Expression von Hämocyanin mRNA in *Folsomia candida* in Reaktion auf Hypoxie-Exposition unterschiedlicher Länge und Intensität. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA (***) ($p \leq 0,001$).

Heat shock protein 70

Abbildung 3.2 stellt die Expression von Heat shock protein 70 (Hsp70) in *Folsomia candida* in Reaktion auf verschiedene Hypoxie-Expositionen dar. Zwar unterschieden sich die gemessenen Mengen an Hsp70 mRNA zwischen den Hypoxiebehandlungen zum Teil stark, jedoch sind diese Unterschiede aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant. So enthielt die Normoxiekontrolle circa 5×10^7 Kopien/ μg Gesamt-RNA des Hsp70 Gens. Auch die schwache Langzeithypoxie (10% O_2 für 24 h) und starke Langzeithypoxie (1,5% O_2 für 24 h) führten zu ähnlichen Kopienzahlen. Der Minimalwert von etwa 2×10^7 Kopien/ μg wurde erreicht, nachdem die Versuchstiere starker Kurzzeithypoxie (1,5% O_2 für 1 h) ausgesetzt waren. Der Maximalwert von 1×10^8 Kopien/ μg hingegen wurde unter schwacher Kurzzeithypoxie erreicht (10% O_2 für 1 h).

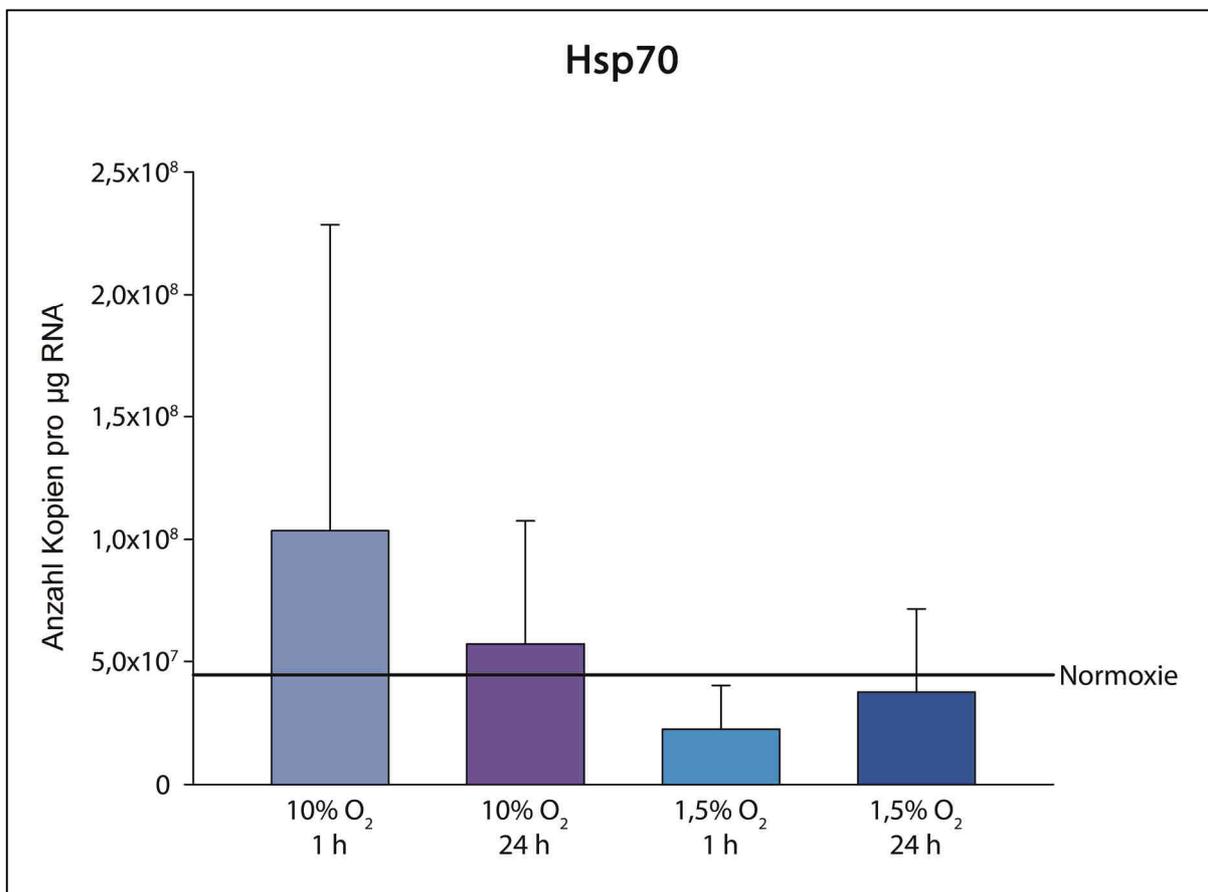


Abbildung 3.2: Expression von Hsp70 mRNA in *Folsomia candida* in Reaktion auf Hypoxie-Exposition unterschiedlicher Länge und Intensität. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase & Laktatdehydrogenase

Die in der Glykolyse involvierten Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Laktatdehydrogenase (LDH) zeigten spezifische Reaktionen in Antwort auf die Hypoxiebehandlungen unterschiedlicher Länge und Intensität. Während die Anzahl gemessener Kopien des GAPDH Gens (siehe Abbildung 3.3) unter Normoxie und schwacher Kurzzeithypoxie (10% O₂ für 1 h) bei circa $1,4 \times 10^8$ Kopien/ μg Gesamt-RNA lag, wurden während schwacher Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h) und starker Kurzzeithypoxie (1,5% O₂ für 1 h) nur etwa 9×10^7 Kopien/ μg gemessen. Starke Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h) hingegen führte zu einem signifikanten ($p \leq 0,001$) Anstieg der Kopienzahl auf 4×10^8 Kopien/ μg . Dies entspricht einem etwa 3-fachen Anstieg der Kopienzahl im Vergleich zu der Normoxiekontrolle, sowie den übrigen Hypoxiebehandlungen.

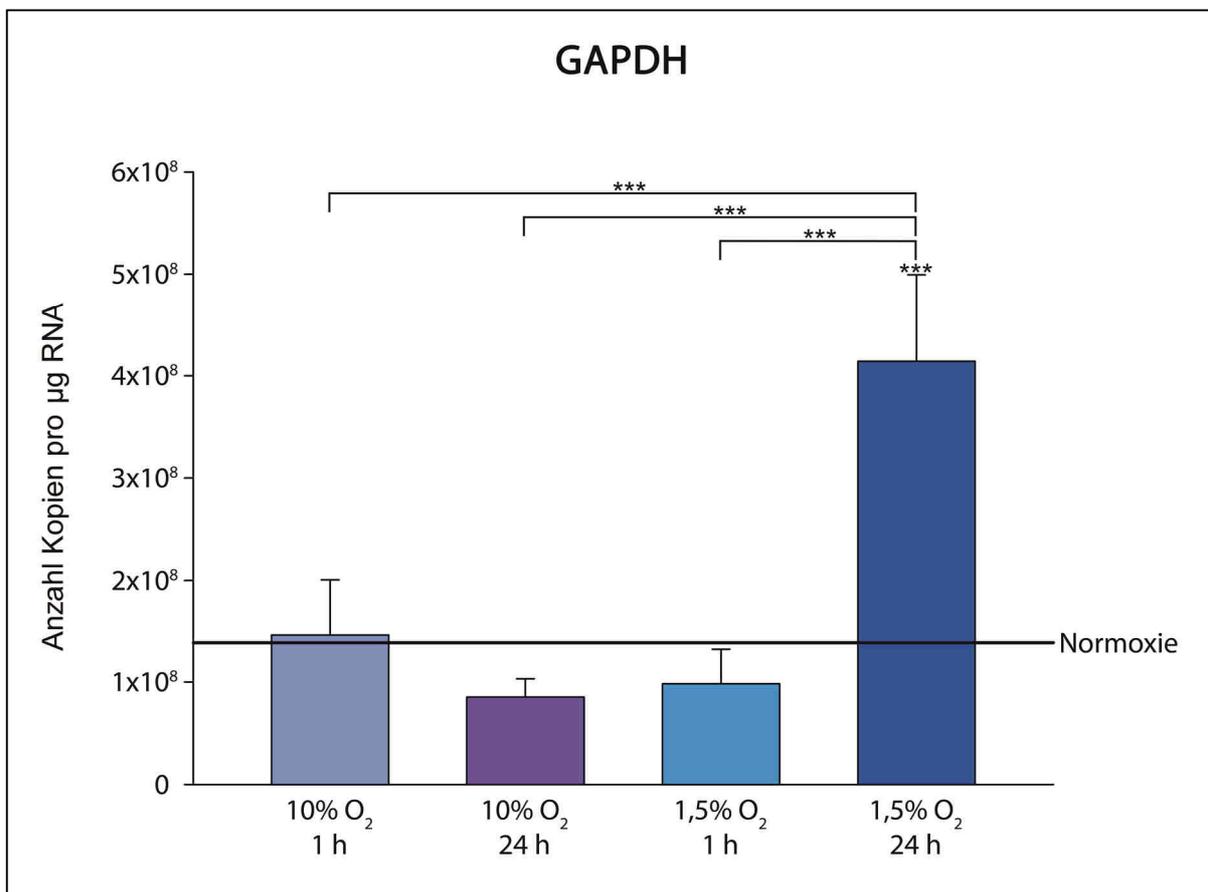


Abbildung 3.3: Expression von GAPDH mRNA in *Folsomia candida* in Reaktion auf Hypoxie-Exposition unterschiedlicher Länge und Intensität. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA (***) ($p \leq 0,001$).

Die Analyse von LDH (Abbildung 3.4) zeigte, dass normoxisch gehaltene Tiere über etwa $1,3 \times 10^6$ Kopien/ μg Gesamt-RNA des LDH Gens verfügten. Eine Ähnlich Kopienzahl wurde unter schwacher Kurzzeithypoxie (10% O_2 für 1 h) vorgefunden. Im Vergleich zu diesen Behandlungen wurden unter schwacher Langzeithypoxie (10% O_2 für 24 h), mit etwa $4,5 \times 10^6$ Kopien/ μg , eine signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Kopienzahl gemessen. Unter starker Kurzzeithypoxie (1,5% O_2 für 1 h) und starker Langzeithypoxie (1,5% O_2 für 24 h) stieg die Kopienzahl auf etwa 2 bis $2,5 \times 10^6$ Kopien/ μg an, was jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der Normoxiekontrolle oder anderen Hypoxiebehandlungen darstellte.

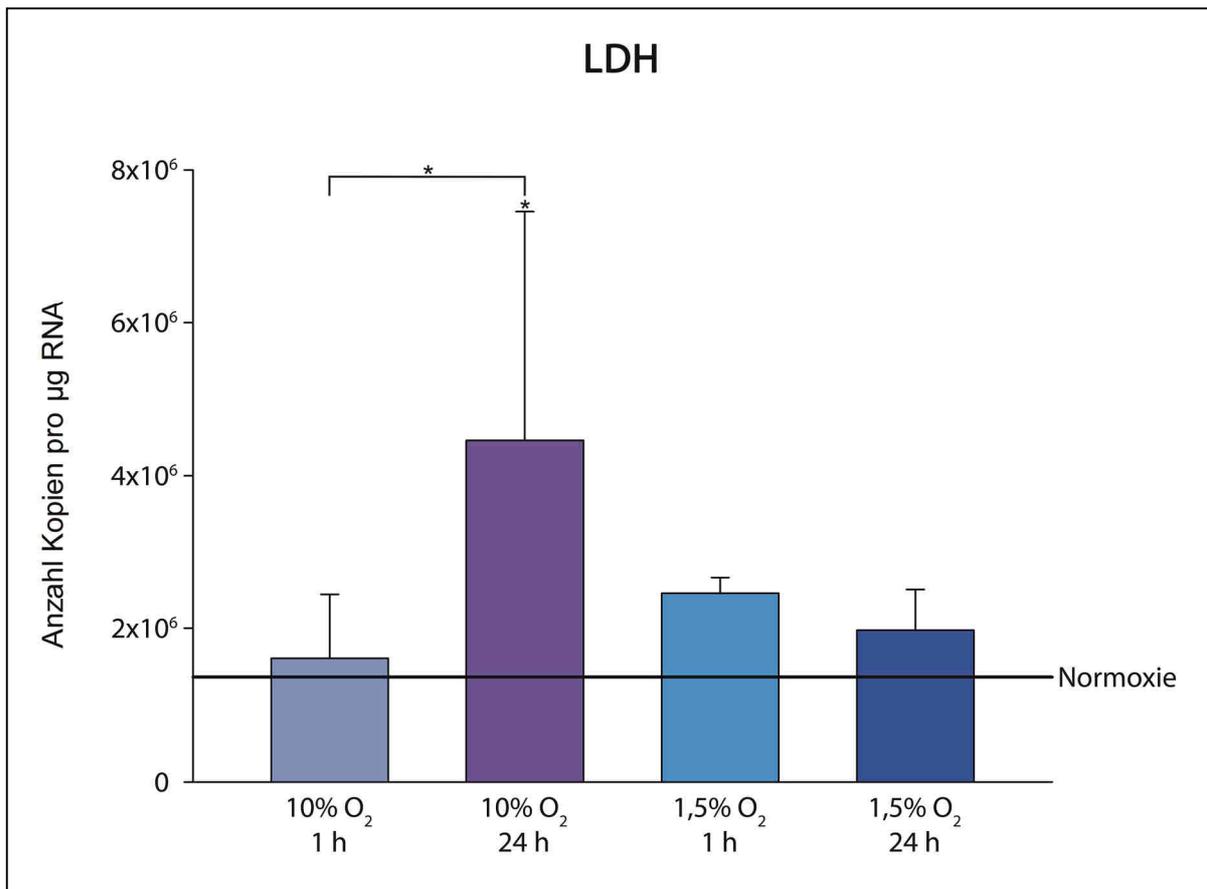


Abbildung 3.4: Expression von LDH mRNA in *Folsomia candida* in Reaktion auf Hypoxie-Exposition unterschiedlicher Länge und Intensität. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA (***) = $p \leq 0,05$).

Isocitratdehydrogenase & Malatdehydrogenase

Die im Citratzyklus beteiligten Enzyme Isocitratdehydrogenase (IDH) und Malatdehydrogenase (MDH) zeigten keine signifikante hypoxie-spezifische Regulation. Die in der Normoxie und den Hypoxiebehandlungen gemessene Kopienzahlen von IDH (siehe Abbildung 3.5) erreichten Werte von circa 7×10^6 bis 9×10^6 Kopien/ μg Gesamt-RNA, zeigten darüber hinaus aber keine statistisch signifikanten Unterschiede.

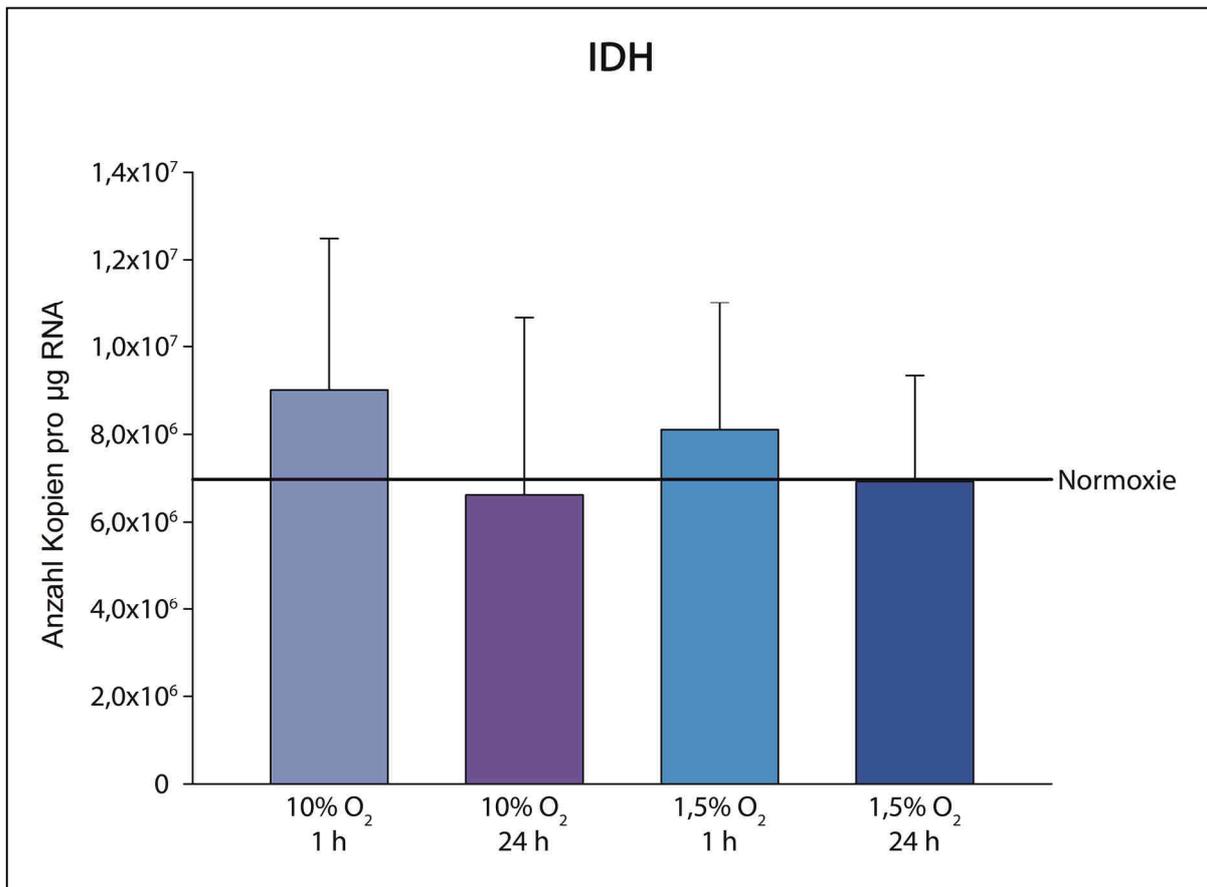


Abbildung 3.5: Expression von IDH mRNA in *Folsomia candida* in Reaktion auf Hypoxie-Exposition unterschiedlicher Länge und Intensität. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA.

Die vorliegende Menge an MDH mRNA (Abbildung 3.6) zeigte einen leicht abfallenden Trend, je länger und intensiver die Hypoxiebehandlung ausfiel. In den normoxisch gehaltenen Tieren wurden etwa $1,9 \times 10^5$ Kopien/ μg Gesamt-RNA gemessen. Während die Kopienzahl unter schwacher Kurzzeithypoxie (10% O₂ für 1 h) bei circa $2,3 \times 10^5$ Kopien/ μg Gesamt-RNA lag, fällt dieser Wert auf etwa $1,5 \times 10^5$ Kopien/ μg bei schwacher Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h) ab und erreicht ein Minimum von etwa 1×10^5 Kopien/ μg unter starker Kurzzeithypoxie (1,5 O₂ für 1 h) und starker Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h).

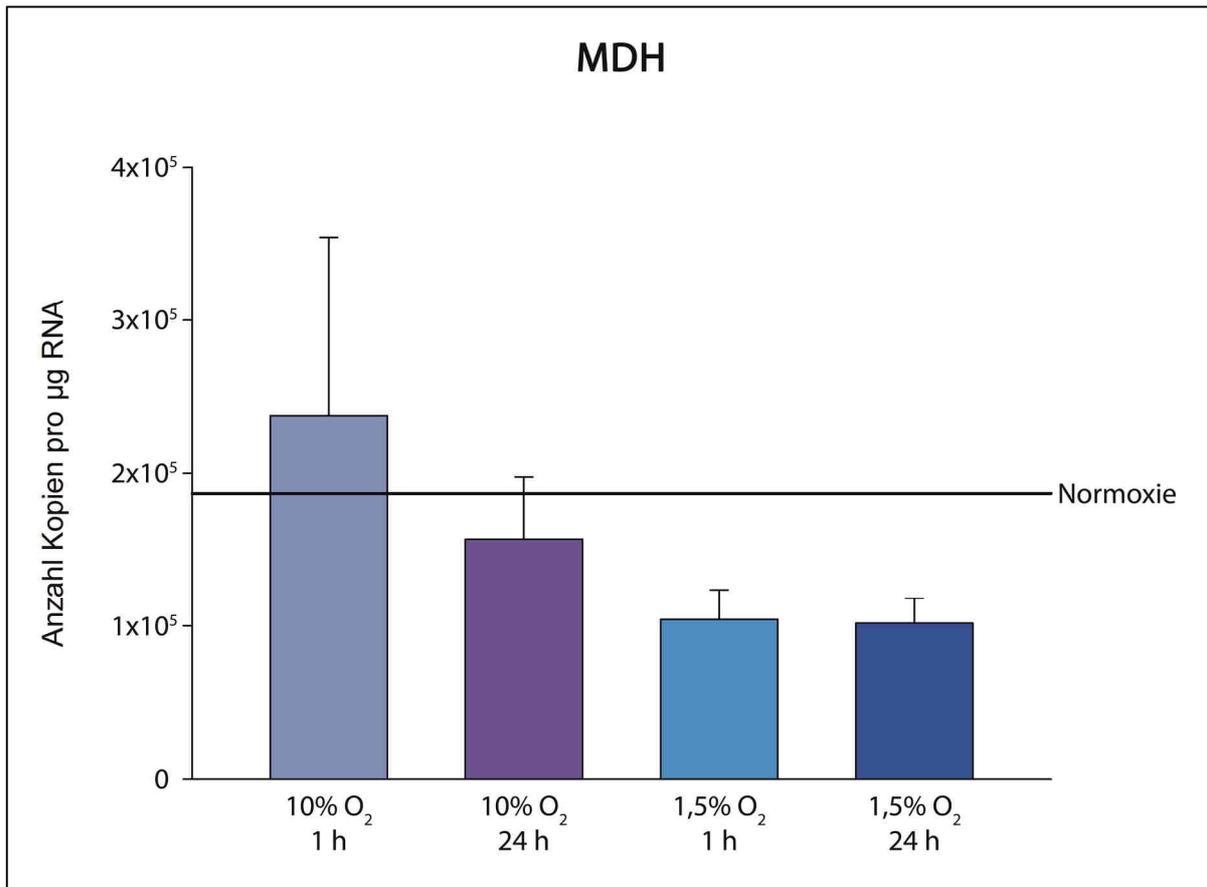


Abbildung 3.6: Expression von MDH mRNA in *Folsomia candida* in Reaktion auf Hypoxie-Exposition unterschiedlicher Länge und Intensität. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA.

3.1.2 dsRNA vermittelter Hämocyanin-knockdown

Nachdem gezeigt werden konnte, dass starke Langzeithypoxie in *Folsomia candida* zu einem erhöhten Vorkommen von Hämocyanin mRNA führt (siehe Abbildung 3.1), sollte im Folgenden untersucht werden welche Konsequenzen ein dsRNA induzierter Hämocyanin-knockdown unter Hypoxie nach sich zieht. Hierzu wurden den Versuchstieren über drei Tage jeweils 100 μg Trockenhefe verfüttert, welche mit je 200 ng dsRNA versetzt war. Im Anschluss wurden die Tiere für 24 Stunden unter 1,5% Sauerstoff gehalten und die Hämocyaninexpression mittels qPCR analysiert. Neben einer *non template control* (NTC), welche kein *template* zur Herstellung für die dsRNA enthielt, diente die Expression unbehandelter Tiere als Positivkontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Hoc-Test.

Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, lässt sich eine leichte Tendenz im Vorkommen von Hämocyanin zwischen den Behandlungen erkennen. Während die Hämocyaninkopienzahl des *knockdowns* bei etwa 5×10^6 Kopien/ μg Gesamt-RNA liegt, steigt die gemessene Kopienzahl auf etwa $7,5 \times 10^6$ Kopien/ μg in der NTC und auf circa $8,5 \times 10^6$ Kopien/ μg in den unbehandelten Kontrolltieren. Dennoch liegt zwischen den Behandlungen kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

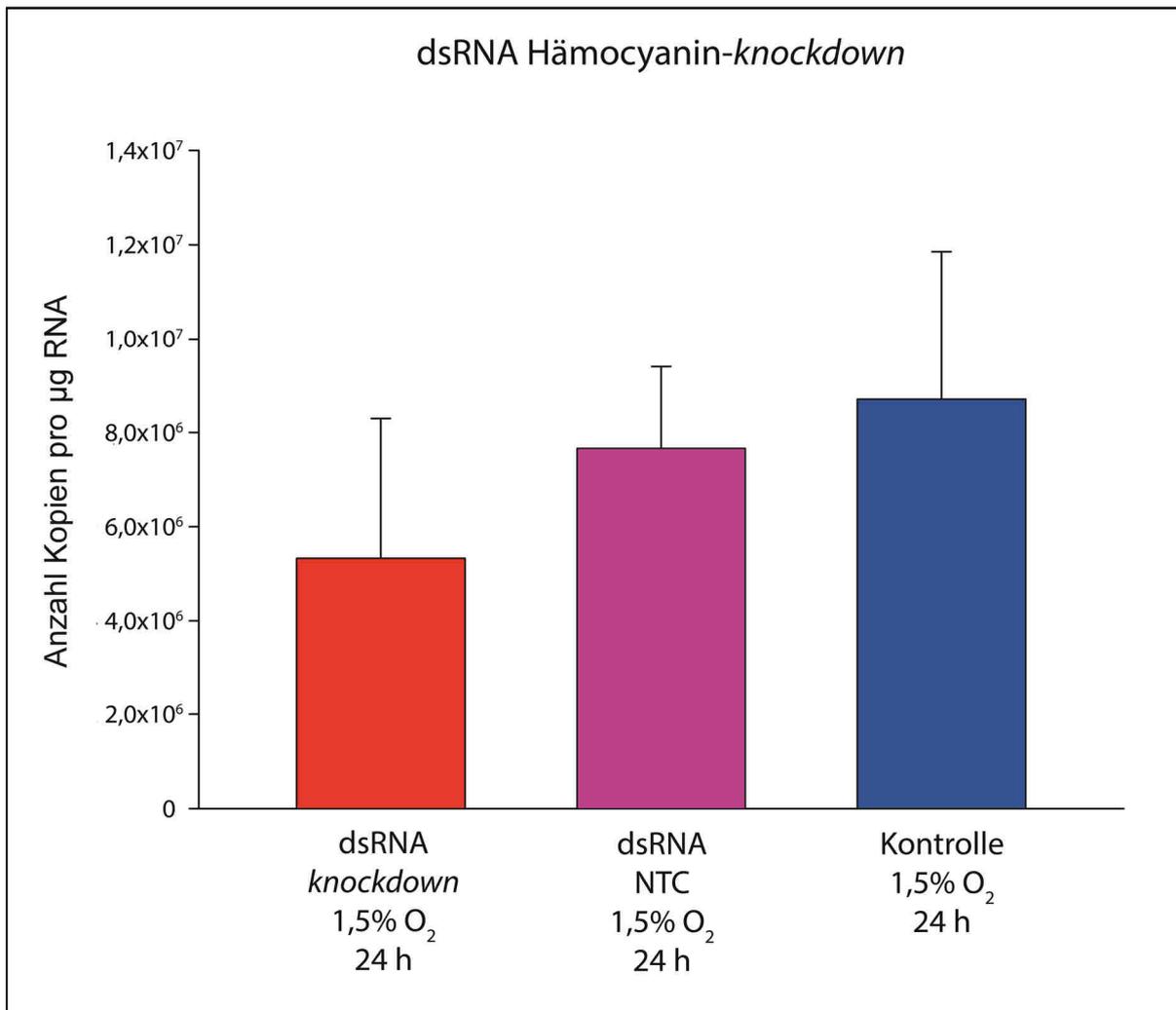


Abbildung 3.7: Expression von Hämocyanin mRNA in dsRNA induzierten *knockdown*-Tieren im Vergleich zu Tieren der *no template control* (NTC) und unbehandelten Kontrolltieren. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA.

3.1.3 Nachweis von Hämocyanin auf Proteinebene in *Folsomia candida*

Um zu überprüfen, ob der in *F. candida* mittels qPCR gezeigte spezifische Anstieg von Hämocyanin mRNA unter starker Langzeithypoxie (siehe Abbildung 3.1) ebenfalls ein Anstieg an Protein nach sich zieht, wurde eine immunologische Detektion mittels Westernblot durchgeführt. Hierzu wurden aus jeweils drei biologischen Replikaten, bestehend aus je 200 Versuchstieren, Proteine isoliert, nachdem die Tiere für 24 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 10%, beziehungsweise 1,5% ausgesetzt waren. Als Kontrolle dienten unter Normoxie gehalten Tiere. Nach Auftrennung durch eine SDS-PAGE zeigte sich, dass eine Isolation der Proben unter herkömmlichen Verfahren zur Degradation der Proteine führte. Aus diesem Grund erfolgte eine Wiederholung des Versuchs, bei dem die Versuchstiere zur Proteinisolation im Anschluss an die Hypoxiebehandlung direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen wurden. Aufgrund der Zusammensetzung des Puffers war eine genaue Proteinmengenbestimmung im Folgenden jedoch nicht mehr möglich. Stattdessen wurden 16 μ l jeder Probe in der SDS-PAGE eingesetzt (siehe Abbildung 3.8)

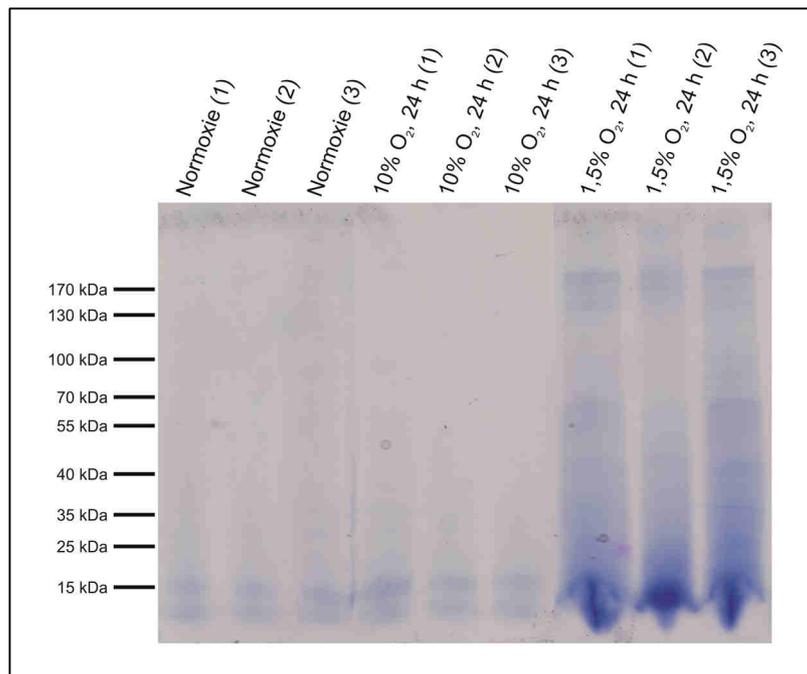


Abbildung 3.8: Coomassiefärbung des *Folsomia candida* Gesamtproteins. Für jedes der drei biologischen Replikate der Normoxie, schwacher Langzeithypoxie (10% O₂, 24 h) und starker Langzeithypoxie (1,5% O₂, 24 h) wurden jeweils 16 μ l des in Laemmli-Puffer isolierten Proteins aufgetragen.

Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, beinhalten die Proben der starken Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h) deutlich mehr Protein als die der schwachen Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h) und der Normoxie. Dabei zeigen alle Replikate der unterschiedlichen Behandlungen eine undeutliche Auftrennung, welche nur wenig distinkte Banden erkennen lassen. Darüber hinaus finden sich größere Mengen Protein im niedrigen kDa Bereich, was auf eine Degradation des Proteins schließen lässt. Die immunologische Detektion des Hämocyanins erfolgte mit zwei Primärantikörpern. Zum einen mit dem selbst hergestellten *F. candida* Hämocyaninuntereinheit 2 Antikörper (siehe 2.3.6), zum anderen mit einem gegen Hämocyaninuntereinheit 2 von *Blaptica dubia* gerichteten Antikörper.

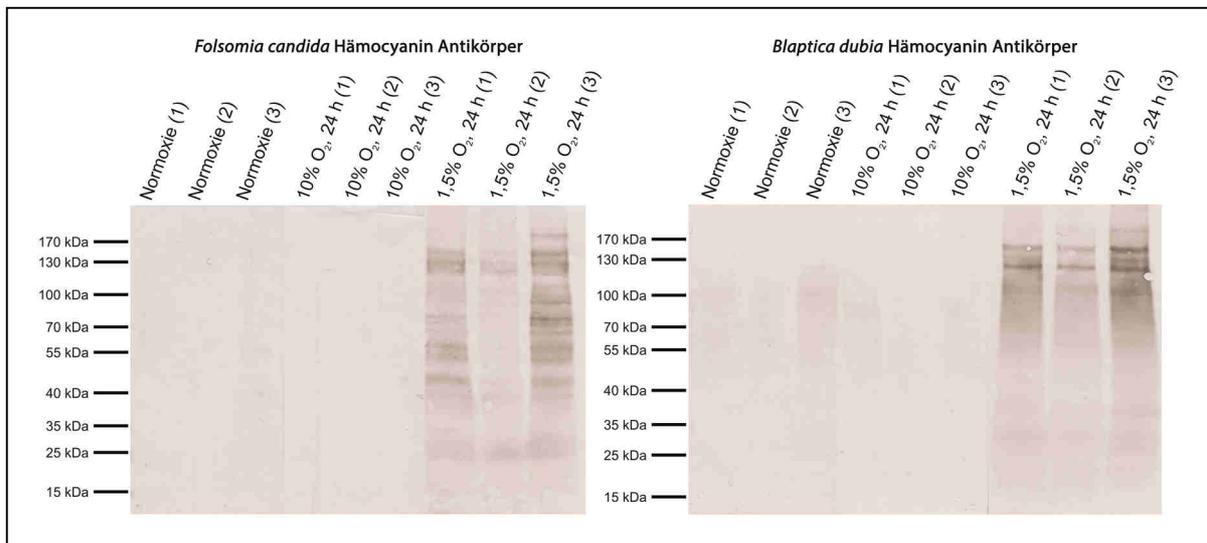


Abbildung 3.9: Immunologische Detektion von Hämocyanin in *Folsomia candida*. Die Färbungen erfolgten unter Verwendung der Hämocyaninuntereinheit 2 Primärantikörper aus *F. candida* und *Blaptica dubia*. Unabhängig des verwendeten Antikörpers kommt es zur unspezifischen Detektion von größeren Mengen Protein in den Proben der starken Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h).

Die in Abbildung 3.9 dargestellten Färbungen zeigen, sowohl unter Verwendung des *F. candida*, als auch des *B. dubia* Primärantikörpers, unspezifische Bindungen an Proteine verschiedenster Größen. Die erhaltenen Färbungen ähneln dabei stark der Coomassiefärbung und zeigen ebenfalls deutlich mehr markiertes Protein in den Proben der starken Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h). Hingegen zeigen die Proben der Normoxie, sowie der schwachen Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h) kaum oder keine distinkten Proteinbanden. Darüber hinaus werden im Bereich von 70 bis 80 kDa keine distinkten Banden detektiert, die Hämocyanin zugeordnet werden könnten.

3.2 Verbreitung von Hämocyanin innerhalb der Collembola

Nachdem Hämocyanin bereits in *Folsomia candida* und *Sinella curviseta* nachgewiesen werden konnte (Pick et al., 2009a), sollte eine breit angelegte Untersuchung Aufschluss darüber liefern wie weit verbreitet das Vorkommen von Hämocyanin innerhalb anderer Collembolataxa ist. Hierzu sollte versucht werden Hämocyanin in unterschiedlichen Collembola nachzuweisen und eine phylogenetische Einordnung anhand ihrer 18S rRNA Sequenzen in einen von Xiong et al. (2008) veröffentlichten Datensatz vorzunehmen. Für diese Analyse standen aus unterschiedlichen Quellen 9 auf Gattungs- oder Artniveau bestimmte, sowie 29 weitere distinkte, taxonomisch nicht näher bestimmte Collembolaspezies zur Verfügung. Im Folgenden wurde die 18S rRNA der 38 Tiere sequenziert und zur Berechnung der Position im phylogenetischen Stammbaum verwendet. Darüber hinaus sollte Hämocyanin mittels PCR in den Tieren nachgewiesen werden.

3.2.1 Zuordnung der identifizierten Hämocyanine zu Untereinheitstyp 1 und 2

Um die, in den untersuchten Collembola, gefundenen Hämocyanine Untereinheitstyp 1 oder 2 zuzuordnen, wurde aus den gewonnen Sequenzen, sowie den Sequenzen weiterer Hexapoda (siehe Tabelle 6.7), ein Stammbaum erstellt. Als Außengruppe, welche im Stammbaum nicht dargestellt ist, dienten dabei Hämocyaninsequenzen verschiedener Myriapoda. In dem Stammbaum (siehe Abbildung 3.10) bilden die Sequenzen vom Hämocyaninuntereinheitstyp 2 der Hexapoda, der Collembola *Folsomia candida*, sowie von *Heteromurus nitidus* und den nicht näher bestimmten Arten Symphypleona 1, Tomoceroidea 1, 4, 5 und 7, sowie Entomobryomorpha 4, 5, 6, 9 und 10 ein Monophylum. Die Hämocyanine der Collembola stehen dabei in einem Schwestergruppenverhältnis zu den übrigen Hämocyaninen des Untereinheitstyps 2. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für die Hämocyaninuntereinheit 1. Während das Hämocyanin von *Machilis germanica* (Archaeognatha) an der Basis der Hämocyanin 1 Untereinheiten steht, bilden die restlichen Sequenzen vom Untereinheitstyp 1 der Hexapoda zusammen mit den bereits bekannten Sequenzen von *F. candida*, *S. curviseta* und *Lepidocyrtus cyaneus* ein Monophylum. Dieses Monophylum umfasst außerdem die Hämocyaninsequenzen der nicht näher bestimmten Collembola Entomobryomorpha 1, 2, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17 und 18. Auch in diesem Fall bilden die Hämocyanine der Collembola eine Schwestergruppe zu den übrigen Hämocyaninen des Untereinheitstyps 1.

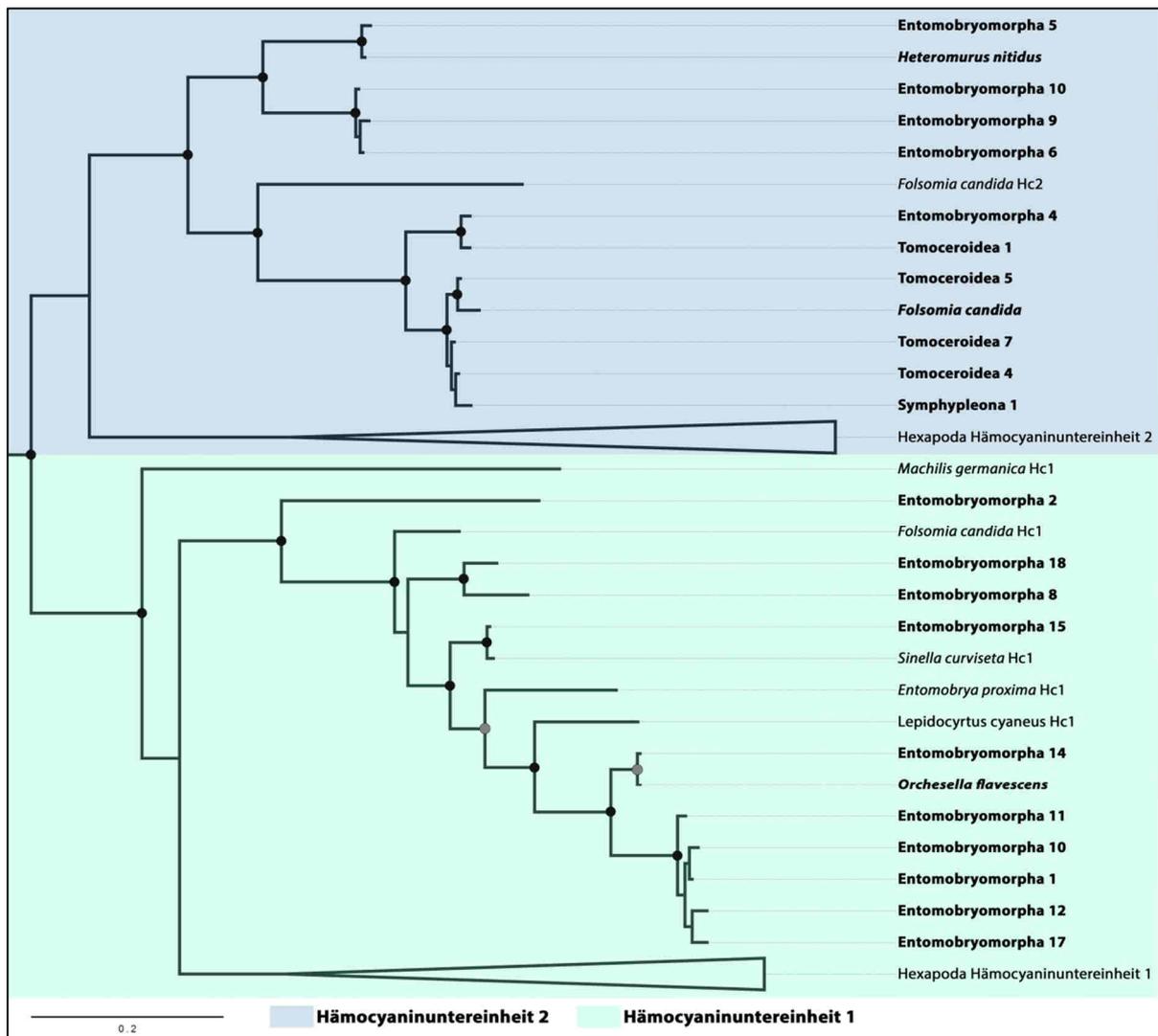


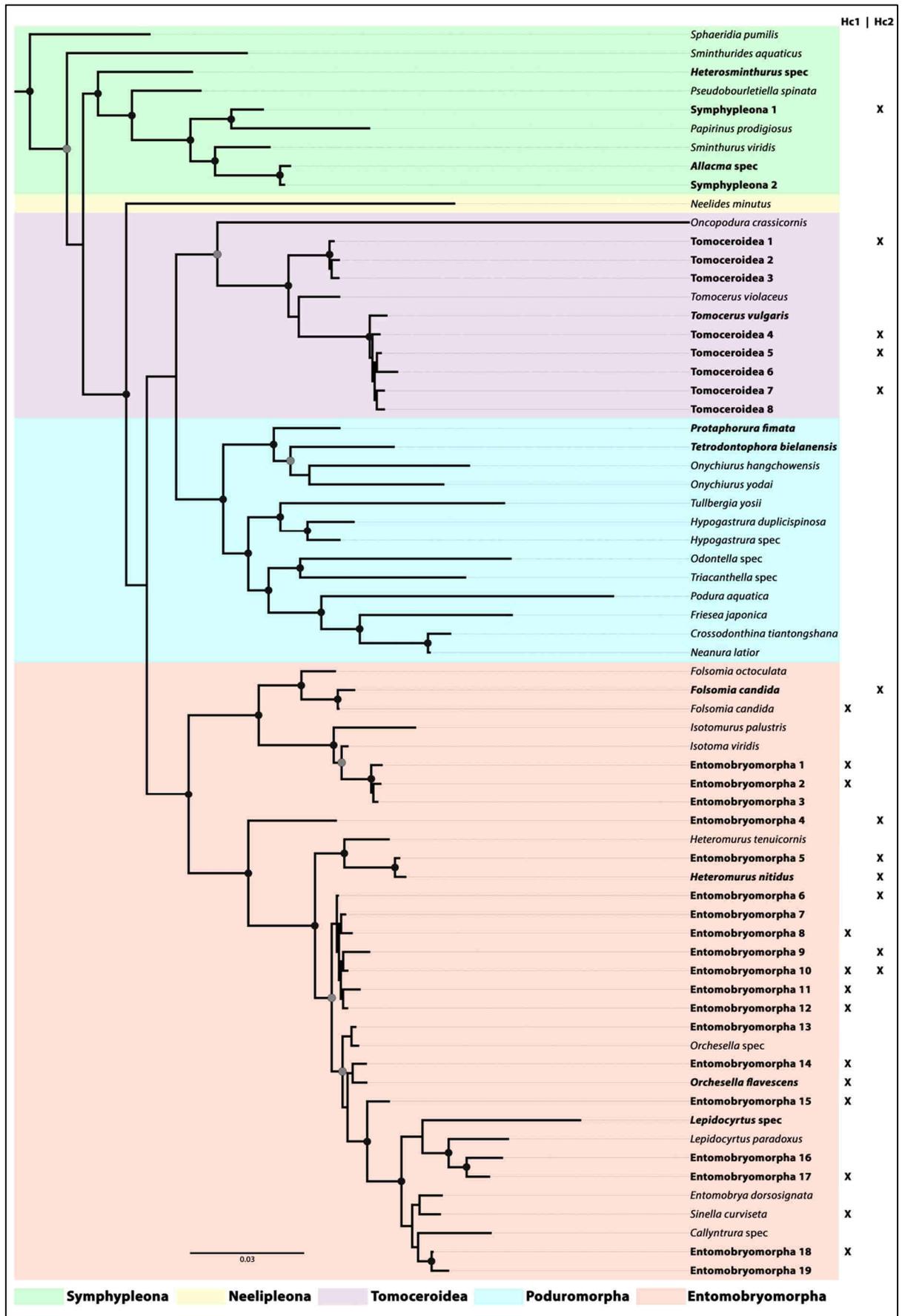
Abbildung 3.10: Phylogenetische Analyse der Hämocyaninuntereinheiten taxonomisch nicht näher bestimmter Collembola. Die in der Analyse verwendeten Sequenzen bilden zwei monophyletischen Schwestergruppen bestehend aus Hämocyaninuntereinheit 1 und 2. Die Berechnung des Stammbaums wurde mittels Bayes'scher Analyse unter Annahme des WAG-Modells und einer Gammaverteilung der Substitutionsraten durchgeführt. Als Außengruppe dienten Hämocyaninsequenzen verschiedener Myriapoda, welche nicht dargestellt sind. Bayes'sche posterior Wahrscheinlichkeit von 1,00 sind durch einen schwarzen Kreis markiert, von $\geq 0,95$ durch einen grauen Kreis. Im Rahmen der Arbeit ermittelte Sequenzen sind fett markiert. Der Balken repräsentiert 0,2 Substitutionen pro Aminosäureposition.

3.2.2 Phylogenetische Analyse der Collembola

Um die auf Hämocyaninvorkommen untersuchten Collembola phylogenetisch einzuordnen, wurden die 18S rRNA Sequenzen der Collembola zusammen mit den von Xiong et al. (2008) publizierten Sequenzen (siehe Tabelle 6.8) einer Bayes'schen Analyse unterzogen (siehe Abbildung 3.11). Als Außengruppe dienten die 18S rRNA Sequenzen von *Callibaetis ferrugineus* (Ephemeroptera) und *Ctenolepisma longicaudata* (Zygentoma), welche im Stammbaum jedoch nicht dargestellt sind. Die Einteilung der Großgruppen basiert auf der von Xiong et al. veröffentlichten Arbeit. Die Symphypleona (Im Stammbaum von Xiong et al. repräsentiert durch *Sphaeridia pumilis*, *Sminthurides aquaticus*, *Pseudobourletiella spinata*, *Papirinus pradiosus* und *Sminthurus viridis*) bilden im vorliegenden Stammbaum kein Monophylum, sondern, durch die an der Wurzel des Stammbaums stehenden *Sphaeridia pumilis* und *Sminthurides aquaticus*, ein Paraphylum. Die Neelipleona (*Neelides minutus*) stellen die nächsten Verwandten der Symphypleona dar und stehen im Schwestergruppenverhältnis zu den übrigen Collembola. Die Poduromorpha (*Onychiurus hangchowensis*, *Onychiurus yodai*, *Tullbergia yosii*, *Hypogastrura duplicispinoas*, *Hypogastrura spec*, *Odontella spec*, *Triacanthella spec*, *Podura aquatica*, *Friesea japonica*, *Crossodonthina tiantongshana* und *Neanura latior*) und Entomobryomorpha (*Folsomia candida*, *Isotomurus palustris*, *Isotoma viridis*, *Heteromurus tenuicornis*, *Orchesella spec*, *Lepidocyrtus paradoxus*, *Entomobrya dorsosignata*, *Sinella curviseta* und *Callyntrura spec*) bilden jeweils ein Monophylum. Jedoch beinhalten die Entomobryomorpha nicht die ebenfalls monophyletisch erhaltene Superfamilie der Tomoceroidea (*Oncopodura crassicornis* und *Tomocerus violaceus*), die in vielen Studien zu den Entomobryomorpha gezählt wird (siehe Diskussion). Die Entomobryomorpha stehen in einem Schwestergruppenverhältnis zu den Poduromorpha und Tomoceroidea, welche wiederum in einem Schwestergruppenverhältnis zueinander stehen.

► **Abbildung 3.11:** Phylogenetischer Stammbaum der Collembola. Der Stammbaum wurde anhand der 18S rRNA Sequenzen der untersuchten Collembola, sowie einem von Xiong et al. (2008) veröffentlichten Datensatz, bestehend aus Sequenzen der 18S und 28S rRNA verschiedener Collembola, berechnet. Die Bayes'sche Analyse lief unter Verwendung des GTR Modells, sowie der Annahme invarianter Substitutionspositionen und einer Gammaverteilung der Substitutionsraten. Als Außengruppe dienten 18S und 28S rRNA Sequenzen von *Callibaetis ferrugineus* und *Ctenolepisma longicaudata*. Die im Rahmen der Arbeit ermittelten Sequenzen sind fett markiert. Das Vorkommen von Hämocyanin wird für den jeweiligen Untereinheitstyp durch ein X angezeigt. Bayes'sche posteriore Wahrscheinlichkeiten von 1,00 sind durch einen schwarzen Kreis markiert, Wahrscheinlichkeiten von $\geq 0,95$ durch einen grauen Kreis. Der Balken repräsentiert 0,03 Substitutionen pro Nukleotidposition. Die farbliche Einteilung der Großgruppen der Collembola basiert auf dem von Xiong et al. publizierten Stammbaum.

Ergebnisse



3.3 Hämocyanin in *Locusta migratoria*

Die hemimetabole Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* stellt aufgrund ihres Auftretens in solitärer und gregariner Phase, und den damit einhergehenden physiologischen Unterschiede, ein interessantes Untersuchungsobjekt für die Expression und Funktion von Hämocyanin in Insekten dar. Während die solitäre Phase die übliche Vorkommensweise von *L. migratoria* verkörpert, führt eine hohe Populationsdichte zum Wechsel in die schwarmbildende und hoch mobile gregarine Phase. Im Folgenden wurden umfassende Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene an Männchen und Weibchen beider Phasen, den Embryonen und den fünf Nyphenstadien durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von Hypoxie, sowie von Injektionen mit dem Immunstimulanz Lipopolysaccharid (LPS) auf die Expression von Hämocyanin untersucht. Die solitären und gregarinen Tiere wurden unter den in 2.1.1.2 beschriebenen Bedingungen gezüchtet. Abgesehen vom Vergleichen zu den solitären Tieren, entstammten alle verwendeten Versuchstiere der gregarinen Zucht. Embryonen wurden aus drei Tage alten Gelegen entnommen, wobei jedes biologische Replikat aus 10 Embryonen bestand. Im Falle der Nyphenstadien wurden jeweils 5 Tiere einer Generation zu einem Replikat vereint. Für die Hypoxieversuche wurden Männchen für 24 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 10% ausgesetzt. Den LPS-Tieren wurden jeweils 200 µg Lipopolysaccharid injiziert und die Tiere nach 2 Tagen für die RNA-Isolation verwendet. LPS-Kontroll-Tiere erhielten Injektionen mit Insektenringerring ohne Lipopolysaccharid.

Neben den Genen für die Hämocyaninuntereinheiten 1 und 2 wurden auch die zur Normalisierung verwendeten Referenzgene β -Actin, Tubulin und Cyclophilin untersucht. Eine Analyse mittels NormFinder zeigte, dass β -Actin (Normfinder *stability value* = 0,291) das am besten geeignete Referenzgen zur Normalisierung darstellte. Die statistische Auswertung mit signifikanzanalyse erfolgte durch eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Hoc-Test.

Die in Abbildung 3.12 dargestellten mRNA Kopienzahlen von Hämocyaninuntereinheit 1 in *L. migratoria* schwanken um Werte von etwa 5×10^3 Kopien/µg Gesamt-RNA. Die einzige Ausnahme hiervon bilden die Embryonen, in denen Hämocyanin mit 1×10^8 Kopien/µg in deutlich größeren Mengen vorliegt. Dies stellt einen signifikanten ($p \leq 0,001$) Unterschied im Vergleich zu allen anderen untersuchten physiologischen Zuständen, sowie der Hypoxie- und LPS-Behandlung dar. Weder die Kopienzahl der Hämocyaninuntereinheit 1 in den Nyphenstadien, den adulten Tieren, noch in den Hypoxie- und LPS-Behandlungen unterscheiden sich auf signifikantem Niveau voneinander.

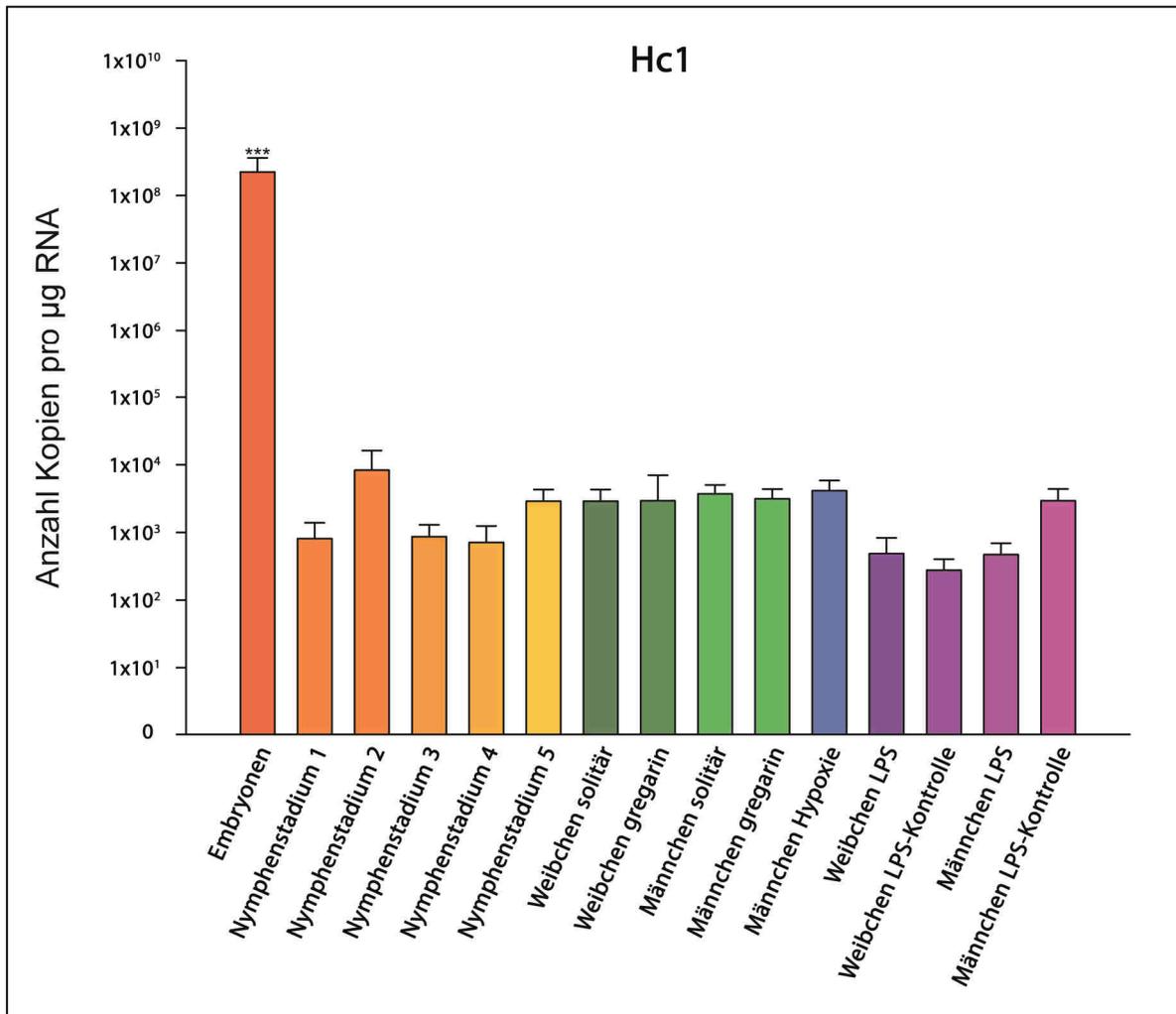


Abbildung 3.12: Expression der Hämocyaninuntereinheit 1 mRNA in sämtlichen Entwicklungsstadien von *Locusta migratoria*, sowie unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Die Analyse mittels zweiseitiger ANOVA ergab, dass die Hämocyaninuntereinheit 1 mRNA in den Embryonen signifikant höher ($p \leq 0,001$) exprimiert ist, als in den übrigen Proben. Embryonen (n=3), Nymphenstadium 1 (n=3), Nymphenstadium 2 (n=3), Nymphenstadium 3 (n=3), Nymphenstadium 4 (n=3), Nymphenstadium 5 (n=3), Weibchen solitär (n=6), Weibchen gregarin (n=6), Männchen solitär (n=3), Männchen gregarin (n=6), Männchen Hypoxie (n=3), Weibchen LPS (n=4), Weibchen LPS-Kontrolle (n=4), Männchen LPS (n=4), Männchen LPS-Kontrolle (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA.

Ergebnisse

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Betrachtung der Kopienzahlen der Hämocyaninuntereinheit 2 von *L. migratoria* (siehe Abbildung 3.13). Während in den solitären Weibchen etwa 1×10^3 Kopien/ μg Gesamt-RNA gemessen wurden, enthielten die übrigen Proben ungefähr $1,5 \times 10^4$ bis $1,5 \times 10^5$ Kopien/ μg . Die Ausnahme hierzu stellen, wie auch bei Hämocyaninuntereinheit 1, die Embryonen dar, in denen $1,5 \times 10^9$ Kopien/ μg gemessen wurden. Dies stellt, wie in der Untersuchung der Hämocyaninuntereinheit 1, eine signifikante ($p \leq 0,001$) Steigerung der embryonalen Hämocyaninexpression im Vergleich zu den übrigen Untersuchungsgruppen dar.

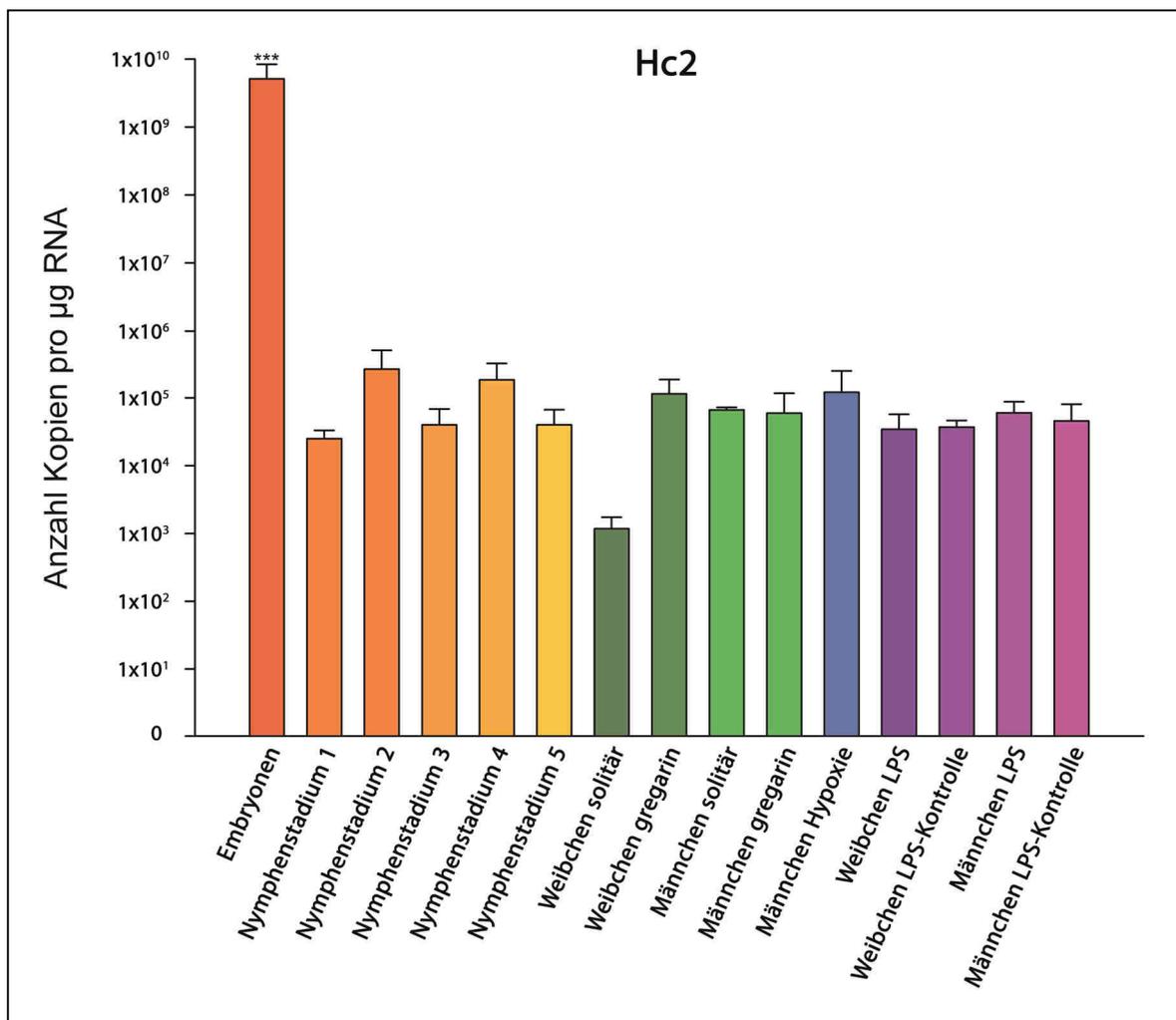


Abbildung 3.13: Expression der Hämocyaninuntereinheit 2 mRNA in sämtlichen Entwicklungsstadien von *Locusta migratoria*, sowie unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Die Analyse mittels zweiseitiger ANOVA ergab, dass die Hämocyaninuntereinheit 2 mRNA in den Embryonen signifikant höher ($p \leq 0,001$) exprimiert ist, als in den übrigen Proben. Embryonen (n=3), Nymphenstadium 1 (n=3), Nymphenstadium 2 (n=3), Nymphenstadium 3 (n=3), Nymphenstadium 4 (n=3), Nymphenstadium 5 (n=3), Weibchen solitär (n=6), Weibchen gregarin (n=6), Männchen solitär (n=3), Männchen gregarin (n=6), Männchen Hypoxie (n=3), Weibchen LPS (n=4), Weibchen LPS-Kontrolle (n=4), Männchen LPS (n=4), Männchen LPS-Kontrolle (n=3)

Ergebnisse

Die Coomassiefärbung des *L. migratoria* Gesamtproteins zeigt distinkte Expressionsprofile in den untersuchten Proben. Dabei hebt sich die Proteinzusammensetzung innerhalb der Embryonen, mit sehr starken Banden im Bereich von 55, 100 und 130 kDa, von denen der restlichen Proben ab (siehe Abbildung 3.14). Während Nyphenstadium 1, sowie die solitären Weibchen und Männchen nur sehr schwache Banden zeigen, ähneln sich die weiteren Proben sehr in ihren Expressionsprofilen.

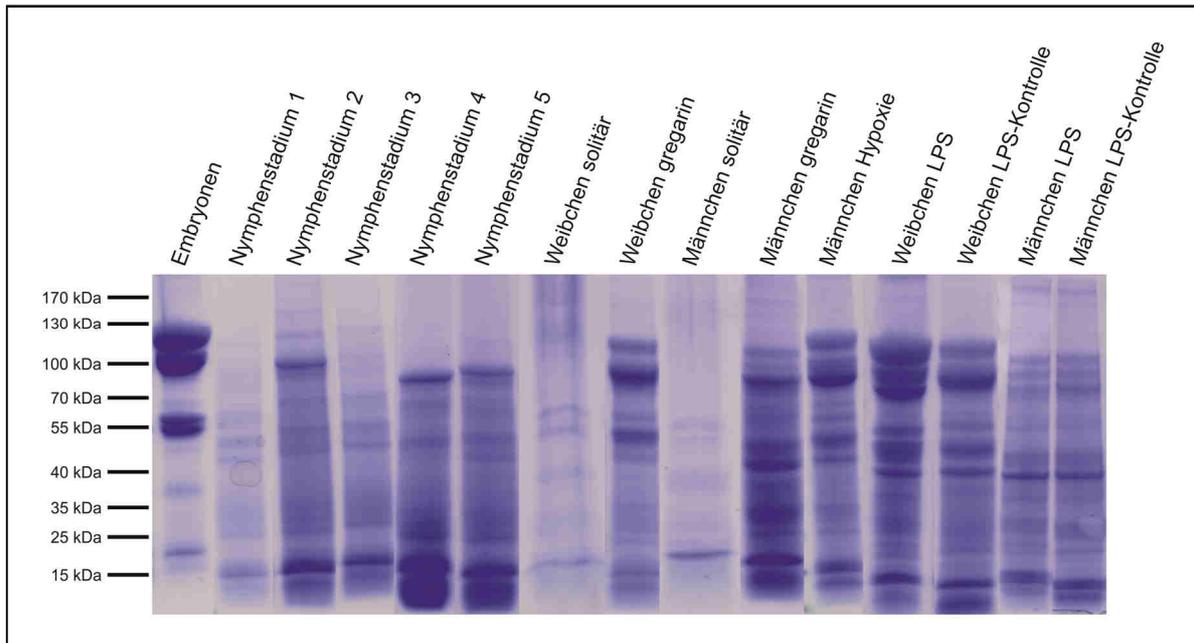


Abbildung 3.14: Coomassiefärbung des *Locusta migratoria* Gesamtproteins. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen.

Die immunologische Detektion mittels *Blaptica dubia* Hämocyanin 1 und 2 Antikörpers (siehe Abbildung 3.15) zeigt in den embryonalen Proben zwei distinkte Banden auf der Höhe von etwa 70 bis 75 kDa, welche der Größe von Hämocyanin entsprechen. Darüber hinaus zeigen die Proben des Nyphenstadium 1, der solitären Weibchen, sowie der Hypoxiebehandlung sehr schwache Banden auf der Höhe von circa 100 kDa, welche auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers hindeuten.

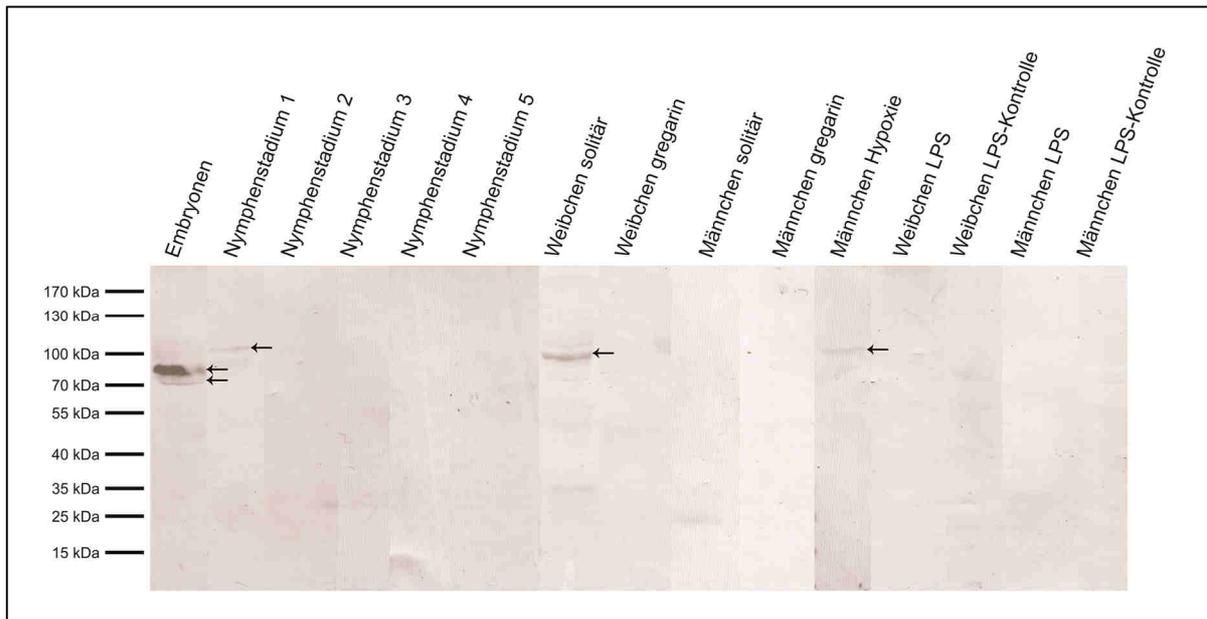


Abbildung 3.15: Immunologische Detektion von Hämocyaninuntereinheit 1 und 2 in *Locusta migratoria*. Die embryonale Probe zeigt zwei distinkte Banden auf Höhe von circa 70 bis 75 kDa, welche der Größe von Hämocyanin entsprechen. Die Proben des Nymphenstadium 1, sowie der solitären Weibchen und der Hypoxiebehandlung zeigen auf Höhe von 100 kDa ebenfalls jeweils eine Bande. Die immunologisch detektierten Proteine sind mit einem Pfeil (←) markiert. Hämocyaninuntereinheit 1 und 2 wurden parallel mittels des *B. dubia* Hämocyanin 1 und 2 Antikörpers detektiert.

3.4 Hämocyanin in *Hierodula membranacea*

Die Fangschrecke *Hierodula membranacea* verfügt über zwei Hämocyaninuntereinheiten, welche beide kein Signalpeptid für den Transport über das endoplasmatische Reticulum besitzen. Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um eine intrazellulär vorkommende Variante des Hämocyanins handelt, oder ob ein alternativer Transportmechanismus existiert, durch den das Protein aus der Zelle exportiert wird. Aus diesem Grund wurden Hämocyten, Fettkörper, Ovarien, sowie das Muskelgewebe der Fangarme mittels quantitativer real-time RT-PCR und Westernblot in adulten Weibchen untersucht. Hierzu wurden den Tieren jeweils 500 µl Insektenringer abdominal injiziert. Nach fünf Minuten wurden die Tiere getötet und das Ringer-Hämolymphe-Gemisch für die Aufreinigung der Hämocyten gesammelt. Alle weiteren Gewebe wurden in direktem Anschluss entnommen, mehrfach in Insektenringer gewaschen und für die RNA- und Protein-Extraktion verwendet. Zur Normalisierung der qPCR Daten wurde das Referenzgen *elongation factor 1 alpha* (EF1a) verwendet. Die Signifikanzanalyse erfolgte durch eine einfaktorische ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Hoc-Test.

Ergebnisse

Die gemessenen Kopienzahlen der Hämocyaninuntereinheit 1 in den unterschiedlichen Geweben sind in Abbildung 3.16 dargestellt. In der Muskulatur wurde mit circa 1×10^4 Kopien/ μg Gesamt-RNA die geringste Menge an Hämocyaninuntereinheit 1 mRNA gemessen. Die Werte des Fettkörpers und der Ovarien fallen mit jeweils circa 5×10^4 Kopien/ μg etwas höher aus. Hingegen wurde in den Hämocyten ein Wert von etwa 5×10^5 Kopien/ μg gemessen. Dieses um den Faktor 10 höhere Vorkommen von Hämocyaninuntereinheit 1 mRNA in den Hämocyten stellt einen statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zu den gemessenen mRNA Mengen des Muskelgewebes und der Ovarien dar.

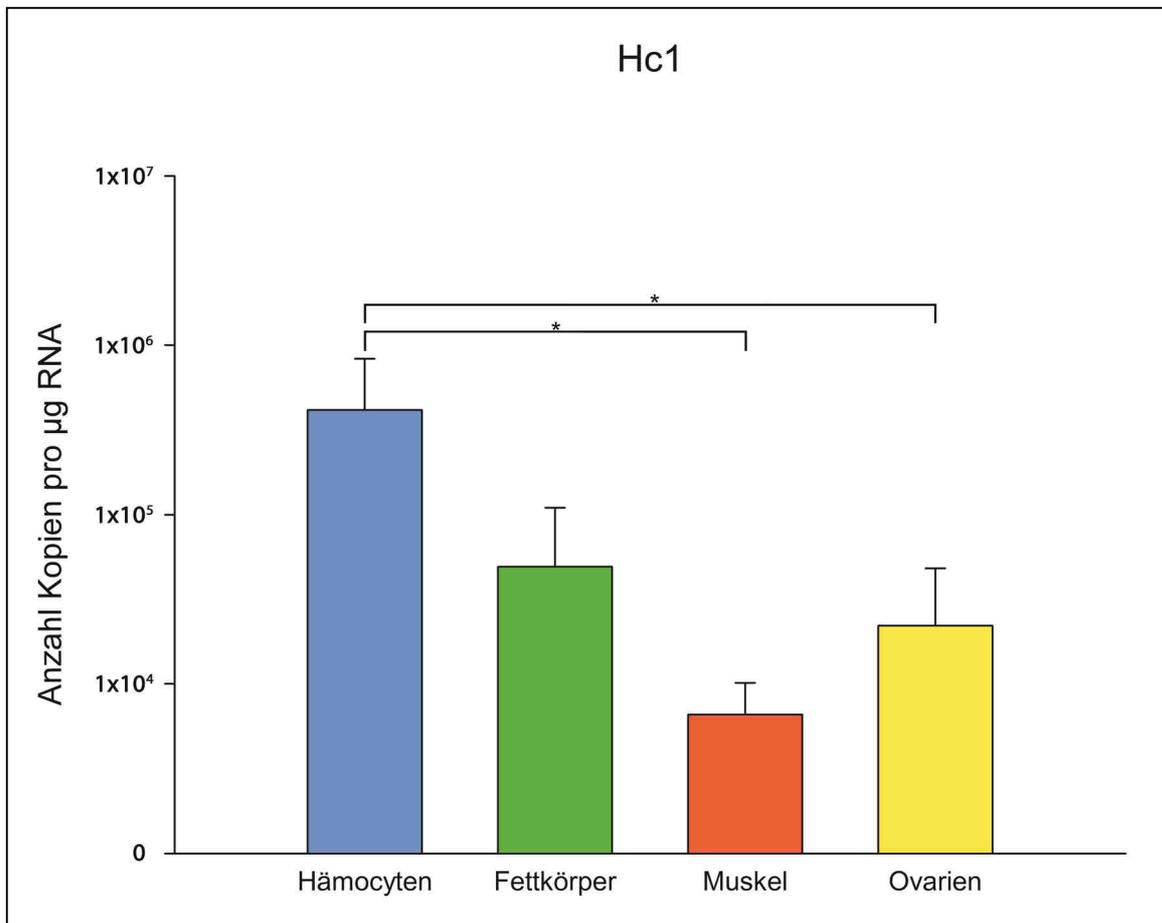


Abbildung 3.16: Expression von Hämocyaninuntereinheit 1 mRNA in unterschiedlichen Geweben der Fangschrecke *Hierodula membranacea*. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweiseitige ANOVA (* = $p \leq 0,05$). Muskel (n=6), Fettkörper (n=6), Ovarien (n=6), Hämocyten (n=4)

Die Analyse der Hämocyaninuntereinheit 2 zeigte, dass die mRNA des Gens nur in sehr geringen Mengen in den untersuchten Geweben vorliegt, wodurch es zu inkonsistenter Amplifikation innerhalb der qPCR Triplikate kam. Aus diesem Grund waren genauere Aussagen zum Vorkommen von Hämocyaninuntereinheit 2 auf mRNA-Ebene in *H. membranacea* nicht möglich.

Der in Abbildung 3.17 dargestellte Proteinnachweis mittels des *Blaptica dubia* Hämocyanin 1 Antikörper (Bdu Hc1) zeigt sehr schwache Banden in den Hämocyten auf der Höhe von circa 70 kDa. Darüber hinaus kommt es zu einer unspezifischen Färbung im Fettkörper bei etwa 40 kDa. Sowohl im Muskelgewebe, als auch den Ovarien wird kein Protein detektiert.

Die Färbung mit dem *B. dubia* Hämocyanin 2 Antikörper (Bdu Hc2) zeigt starke Banden auf Höhe von etwa 70 kDa in den Hämocyten, sowie dem Muskelgewebe der Fangarme. Darüber hinaus kommt es in beiden Geweben zu unspezifischen Färbungen von Protein über- und unterhalb dieses Bereichs. Auch im Fettkörper kommt es zur unspezifischen Detektion von Protein, welche auf Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen ist.

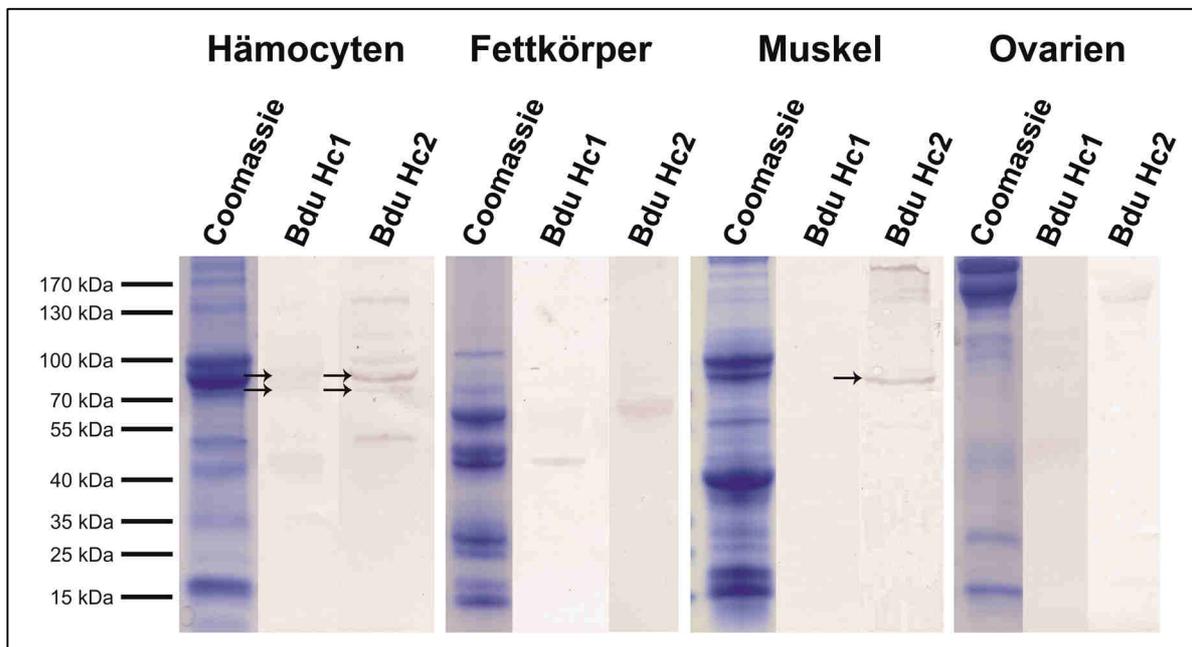


Abbildung 3.17: Coomassiefärbung und immunologische Detektion des Gesamtproteins von *Hierodula membranacea*. Die Färbung erfolgte mittels der *Blaptica dubia* Hämocyanin 1 und *B. dubia* Hämocyanin 2 Antikörper. Die Färbung mittels Bdu Hc1 Antikörper zeigt in den Hämocyten eine Bande auf Höhe von etwa 70 kDa. Die Färbung mittels Bdu Hc2 Antikörper zeigt Banden in den Hämocyten, sowie den Muskeln auf Höhe von 70 kDa. Proteibandenn im Bereich von 70 kDa sind mit einem Pfeil (→) markiert. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen.

3.5 Transkriptomanalysen

Im Rahmen der Transkriptomanalyse wurden die Transkriptome von 103 Hexapoda (siehe Tabelle 6.10) auf das Vorkommen von Hämocyanin hin untersucht. Die untersuchten Spezies umfassten dabei Mitglieder sämtlicher Hexapoda-Ordnungen. Im Rahmen der Analyse konnten in 14 dieser 103 Spezies Hämocyanin-ähnliche Sequenzen identifiziert werden (siehe Tabelle 3.1), die spezifisch gegen die als Referenzen dienenden Hämocyaninsequenzen (siehe Tabelle 6.9) *gemapped* wurden.

Tabelle 3.1: Übersicht der im Rahmen der Transkriptomanalyse untersuchten Hexapoda-Arten, in denen Hinweise auf ein Hämocyaninvorkommen gefunden wurden.

Art	Ordnung
<i>Apachyus charteceus</i>	Dermaptera
<i>Aretaon asperrimus</i>	Phasmatodea
<i>Atelura formicaria</i>	Zygentoma
<i>Ceuthophilus spec</i>	Orthoptera
<i>Cosmioperla kuna</i>	Plecoptera
<i>Cryptocercus wrighti</i>	Blattodea
<i>Folsomia candida</i>	Collembola
<i>Machilis hrabei</i>	Archaeognatha
<i>Mantis religiosa</i>	Mantodea
<i>Perla marginata</i>	Plecoptera
<i>Peruphasma schultei</i>	Phasmatodea
<i>Stenobothrus lineatus</i>	Orthoptera
<i>Tanzaniophasma spec</i>	Mantophasmatodea
<i>Thermobia domestica</i>	Zygentoma

4. Diskussion

Einer der ältesten Verweise auf die Existenz von Hämocyanin ist die Beschreibung des blauen Blutes einer Schnecke durch den niederländischen Naturforscher Swammerdam im Jahre 1669 (Bonaventura & Bonaventura, 1980). Im Laufe der folgenden 200 Jahre häuften sich Beobachtungen blauen Blutes in verschiedenen Mollusca und Crustacea Taxa (Kobert, 1903), welche schließlich auf das kupfertragende respiratorische Protein Hämocyanin zurückgeführt wurden. Heute gehört Hämocyanin zu den am besten untersuchten Proteinen in Invertebraten. Dennoch wurde Hämocyanin in einem Hexapoda erst 2004 eindeutig nachgewiesen (Hagner-Holler et al., 2004). Mit Ausnahme der Eumetabola, in denen es vermutlich verloren ging, konnten seitdem Hämocyaninvorkommen in den meisten Hexapoda gezeigt werden. Trotzdem existieren bis heute nur wenige funktionelle Untersuchungen zum Hämocyanin der Hexapoda. Darüber hinaus lässt sich das Vorkommen von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda bisher weder mit evolutiven Ereignissen (Landgang; aquatische/subterrestische Lebensabschnitte), ökologischen Bedingungen (hypoxische Perioden), physiologischen Eigenschaften (Stoffwechselrate), oder der Morphologie der Tiere (Tracheenaufbau) korrelieren. Ziel dieser Arbeit war es, an ausgewählten Hexapoda mittels funktioneller Analysen die Bedeutung von Hämocyanin für die Sauerstoffversorgung zu untersuchen und neue Erkenntnisse über die Präsenz von Hämocyanin parallel zum Tracheensystem zu gewinnen.

4.1 Hämocyanin in Collembola

Die Collembola gehören stammesgeschichtlich zu den ältesten Hexapoda und stellen eine monophyletische Ordnung dar (Hopkin, 1997). Basierend auf der Morphologie ihrer Mundwerkzeuge werden die Hexapoda in Entognatha (Sackkiefler) und Ectognatha (Freikiefler) gegliedert. Die Ectognatha werden dabei von den Collembola, Protura und Diplura gebildet, bei denen die Mundwerkzeuge in einer Mundtasche liegen, welche durch Faltungen der Kopfkapsel gebildet wird, während die Mundwerkzeuge der Ectognatha frei an der Kopfunterseite vorkommen (Grimaldi & Engel, 2005; Gullan & Cranston, 2010). Während die Entognatha vermutlich nicht monophyletisch sind und ihre genaue Position innerhalb der Hexapoda nicht einstimmig geklärt ist, werden sie in den meisten Fällen als basale Ordnungen innerhalb der Hexapoda, oder als Schwestergruppe der Ectognatha angesehen (Grimaldi & Engel, 2005; Gullan & Cranston, 2010; Meusemann et al., 2010; Misof et al., 2014). Als sicher gilt hingegen, dass die Entognatha und somit auch die Collembola evolutiv sehr alt sind (Hopkin, 1997; Meusemann et al., 2010; Misof et al., 2014). Dabei wird die ancestrale Position der Collembola neben phylogenetischen Analysen auch durch Fossilfunde gestützt. So stammt das Fossil des Collembola *Rhyniella*

praecursor aus dem Devon und ist mit etwa 400 Millionen Jahre das älteste bekannte Fossil der Hexapoda (Engel & Grimaldi, 2004). Bis heute wurden etwa 6500 bis 8000 Collembola-Spezies beschrieben (Hopkin, 1997; Schneider et al., 2011), wobei Schätzungen davon ausgehen, dass darüber hinaus noch bis zu 40.000 unbekannte Spezies existieren könnten (Hopkin, 1997). Während der Artenreichtum der Collembola weitaus kleiner ausfällt als in anderen Hexapoda-Ordnungen, wie den Coleoptera mit circa 350.000 Arten, gehören die Collembola dennoch zu den individuenreichsten Arthropoda und sind weltweit in nahezu allen Habitaten anzutreffen (Hopkin, 1997). Die seit Jahren in der Ökotoxikologie als Modellorganismus verwendete Art *Folsomia candida*, stellt vermutlich den am umfangreichsten erforschten Collembola dar, welcher in einer Vielzahl thematisch diverser Studien untersucht wurde (für Review siehe Fountain & Hopkin, 2005). *F. candida* gilt als so genannte *trampspecies*, welche durch menschlichen Einfluss weltweit verschleppt wurde und deren genauer biogeographischer Ursprung kaum noch nachzuvollziehen ist. Als Habitat nutzt *F. candida* Böden und Streuschichten, welche häufig Schwankungen in Temperatur, Feuchtigkeit und der Sauerstoffverfügbarkeit aufweisen. Gerade während Überflutungen kommt es innerhalb dieser Habitate zu wechselnder Verfügbarkeit von Sauerstoff, sowie teils erhöhten Konzentrationen an Kohlenstoffdioxid. Obwohl *F. candida* über kein Tracheensystem verfügt, sondern Sauerstoff über die gesamte Oberfläche der Cuticula aufnimmt, sind die Tiere an schwankende Sauerstoffverhältnisse gut adaptiert. Während hypoxischer Phasen zeigen die Tiere erhöhte Herzkontraktionsraten, welche helfen die Differenz der Partialdrücke zwischen dem Außenmedium, dem Blut und den inneren Geweben aufrecht zu erhalten (Paul et al., 1997). In einigen Fällen wurde berichtet, dass einzelne Tiere bis zu 18 Stunden unter anoxischen Bedingungen überleben können (Fountain & Hopkin, 2005). Während lange angenommen wurde, dass Collembola über keine respiratorischen Proteine verfügen, konnte 2009 Hämocyanin in *F. candida* nachgewiesen werden (Pick et al., 2009a). Aufgrund des bereits bekannten Hämocyaninvorkommens, der basalen Stellung innerhalb der Hexapoda, sowie der einfachen Haltungs- und Zuchtbedingungen stellte *F. candida* ein gut geeignetes Untersuchungsobjekt für Funktionsstudien von Hämocyanin in basalen Hexapoda dar. Nachdem Pick et al. (2009a) das Vorkommen von Hämocyaninuntereinheit 1 in *F. candida* beschrieb, gelang es Xie et al. (2013) darüber hinaus auch Untereinheit 2 in den Tieren nachzuweisen. Im Rahmen der Arbeit konnte jedoch trotz ausgiebiger Versuche Hämocyaninuntereinheit 1 in den verwendeten Tieren nicht amplifiziert werden. Auch in lokalen *F. candida* Stämmen aus Dänemark und Shanghai konnte Hc1 mittels PCR nicht nachgewiesen werden (Yun-Xia, persönliche Kommunikation). Darüber hinaus finden sich keine Sequenzübereinstimmungen mit der Hämocyaninuntereinheit 1 in den von von Faddeeva et al. (2015) veröffentlichten Transkriptomdaten (*Sequence Read Archive*:

SRR935329). Dies legt nahe, dass die Untereinheit 1 des *F. candida* Hämocyanins nur in bestimmten Populationen vorkommt oder in Reaktion auf bestimmte physiologische Bedingungen exprimiert wird, welche in den vorliegenden Versuchen nicht repliziert werden konnten. Aus diesem Grund wird im Folgenden ausschließlich auf die Expression der Hämocyaninuntereinheit 2 von *F. candida* eingegangen.

4.1.1 Untersuchungen der Hypoxieantwort auf mRNA-Ebene in *Folsomia candida*

Um zu überprüfen, ob Hämocyanin tatsächlich eine Rolle in der Respiration von *Folsomia candida* übernimmt, erfolgte die kontrollierte Exposition der Tiere gegenüber Hypoxie unterschiedlicher Länge und Intensität. Neben dem respiratorischen Protein Hämocyanin (Hc), wurde bei dieser Untersuchung die Expression verschiedener durch die Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusster Proteine analysiert. Hierzu gehörten der Stressmarker Heat shock protein 70 (Hsp70), die in der Glykolyse beteiligten Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), sowie die innerhalb des Citratzyklus involvierten Enzyme Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) und Malatdehydrogenase (MDH). Bei den verwendeten Hypoxiestufen handelte es sich um schwache Kurzzeithypoxie (10% O₂ für 1 h), starke Kurzzeithypoxie (1,5% O₂ für 1 h), schwache Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h), sowie starke Langzeithypoxie (1,5% O₂ für 24 h).

Während die Gene GAPDH, LDH und Hc, eine spezifische Expressionsregulationen zeigen und im Folgenden diskutiert werden, soll zunächst auf die nicht regulierten Gene IDH, MDH und Hsp70 eingegangen werden. Zhou et al. (2008) selektierten *Drosophila melanogaster* über mehrere Generationen auf ihre Toleranz gegenüber Hypoxie und fanden, dass die so gezüchteten Tiere eine deutlich geringere Expression der Gene des Citratzyklus aufweisen als ihre unter Normoxie gehaltenen Artgenossen (Zhou et al., 2008b; Zhou et al., 2009). Während eine solche generationsübergreifende Anpassung im vorliegenden Versuch in *F. candida* nicht untersucht wurde, könnte der ohne Sauerstoff funktionsunfähige Citratzyklus ein großes Einsparungspotential in der Proteinbiosynthese bieten. Aus diesem Grund wurde die Expression der im Citratzyklus involvierten MDH, welche Malat zu Oxalacetat umwandelt (Musrati et al., 1998; Minárik et al., 2002), und der IDH, welche Isocitrat zu α -Ketoglutarat umsetzt (Barnes et al., 1971; Gálvez & Gadal, 1994), untersucht. Beide Proteine zeigen jedoch in keiner der verwendeten Hypoxiebehandlungen eine Regulation auf mRNA-Ebene. Somit deuten die gefundenen Expressionsprofile darauf hin, dass andere Mechanismen in *F. candida* greifen, die auch unter Hypoxie einen uneingeschränkten Ablauf des Citratzyklus ermöglichen. Dies wird ebenfalls durch das Markergen der molekularen Stressantwort deutlich. Änderungen der

physiologischen Umweltbedingungen, wie ein Anstieg der Temperatur oder sinkende Sauerstoff-verfügbarkeit, führen zu einer spezifischen molekularen Stressantwort (Pelham, 1986; Lindquist & Craig, 1988). Hauptaufgabe dieser Stressantwort sind vor allem der Erhalt der Zellhomöostase, sowie die Aufrechterhaltung der Integrität von Makromolekülen. Dies geschieht durch DNA reparierende Proteine und molekulare Chaperone. Letzere sorgen für die korrekte Faltung von Proteinen, sowie der Beseitigung fehlerhaft gefalteter oder beschädigter Proteine durch das Proteasom (Kültz, 2003; Fuchs et al., 1998). Eine der wichtigsten in diesen Prozessen involvierten Proteinklassen sind die Hitzeschockproteine (Hsp; englisch: *heat shock protein*), deren Name sich von ihrer Beteiligung in der Antwort auf Hitzestress ableitet (Ritossa, 1962; Lindquist & Craig, 1988). Neben Hitzeschocks führt auch eine Vielzahl anderer Stressoren zu einer gesteigerten Expression von Hsps, sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen. Eines der am häufigsten vorkommenden Hsps ist das zwischen den Taxa hoch konservierte Hsp70 (Pelham, 1986; Lindquist & Craig, 1988). Hsp70 reguliert die korrekte Faltung von Proteinen während der Synthese, die Neufaltung beschädigter oder aggregierte Proteine, sowie deren Abbau in Kooperation mit dem Proteasom (Williams & Nelsen, 1997; Song et al., 2001). Neben weiteren Funktionen ist Hsp70 am transmembranen Proteintransport (Pelham, 1986), sowie vermutlich innerhalb der Apoptoseprävention durch Bindung des Cytochrom C und durch die Inhibition der Aktivierung der Caspase 3 beteiligt (Beere et al., 2000; Mosser et al., 2000). Proteine der Hsp70-Familie gehören zu den am besten untersuchten Stressproteinen und werden aufgrund der Art ihrer Induktion häufig als Bioindikatoren für Stressmessungen auf molekularer Ebene genutzt (Köhler et al., 1998). Die Funktion von Hsp70 bei der intrazellulären Proteinbindung und dem transmembranen Proteintransport basiert auf der Fähigkeit ungefaltete Polypeptidketten zu binden. Die Bindung eines solchen Polypeptids durch Hsp70 führt zur Freisetzung des *Hsp70-associated heat shock factor*, welcher DNA an so genannten *cis-acting heat shock element sequences* bindet und im Folgenden die Transkription von Hsp70 fördert (Gething & Sambrook, 1992). Basierend auf der *abnormal protein hypothesis* führt das Auftreten eines Stressors zu einem Anstieg an denaturierten oder falsch gefalteten Proteinen in der Zelle. Die damit einhergehende Steigerung ungefalteter Polypeptidketten, welche von Hsp70 gebunden werden können, induziert die Hsp70-Transkriptionskaskade, was zu einer erhöhten Expression von Hsp70 führt (Edington et al., 1989; Craig & Gross, 1991). Diese Regulation von Hsp70 unter Hypoxie wurde in den Hexapoda besonders gut in *Drosophila melanogaster* dokumentiert. Hier konnte nicht nur gezeigt werden, dass es zu einer steigenden Expression von Hsp70 unter Hypoxie kommt, sondern auch, dass eine Überexpression von Hsp70 in Hirn oder Herz zu einer gesteigerten Hypoxietoleranz der Tiere führt (Azad et al., 2011; Zhao & Haddad, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte keine erhöhte Expression von Hsp70 in

F. candida in Reaktion auf die Hypoxiebehandlung festgestellt werden. In Anbetracht der spezifischen und graduellen Antwort von GAPDH, LDH und Hc auf die steigenden Längen und Intensitäten der verwendeten Hypoxiebehandlungen, muss davon ausgegangen werden, dass es in *F. candida* unter den vorliegenden physiologischen Bedingungen zu keiner durch oxidativem Stress bedingten gesteigerten Fehlfaltung von Proteinen kommt, oder andere Mechanismen an deren Beseitigung beteiligt sind.

Regulation der Genexpression in Reaktion auf Kurzeithypoxie

Die untersuchten Gene zeigen in *Folsoma candida* während der einstündigen Hypoxiebehandlungen keine signifikanten Regulationsunterschiede zur Normoxiekontrolle. Da die Versuchstiere über mehrere Generationen bei Normoxie (21% O₂) gehalten wurden, kann eine Präadaptation durch vorangegangene Hypoxiephasen ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich sorgt ein Wechsel zu anaerober Energiegewinnung dafür, dass die Tiere kurzfristige hypoxische Phasen überdauern können. Allerdings wäre der Energiebedarf des Organismus allein durch anaerobe Energiegewinnung nur vorübergehend zu decken, da es schnell zum Verbrauch fermentierbarer Substrate, sowie zur vermehrten Produktion unerwünschter Stoffwechselendprodukte kommt. Aufgrund der geringeren energetischen Effizienz des anaeroben Metabolismus ist der ATP-Bedarf des Organismus längerfristig nur aufrecht zu erhalten, wenn es zu einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs kommt (Herreid II, 1980; Hochachka, 1986). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Tiere der gesenkten Sauerstoffverfügbarkeit, neben dem Wechsel zur anaeroben Energiegewinnung, durch eine Verringerung der metabolischen Aktivität entgegenwirken. Dieses Absenken aller nicht unmittelbar lebensnotwendigen Prozesse, auch als metabolischer Arrest bezeichnet, führt unter anderem zu einem Rückgang der Proteinbiosynthese von bis zu 90% (Hochachka, 1986; Hochachka et al., 1996). Als Resultat wird die Natrium-Kalium-Pumpe in metabolisch arretierten Zellen zum Hauptenergieverbraucher, welche unter Anoxie bis zu 75% des gesamten ATP-Verbrauchs der Zelle ausmachen kann (Hochachka et al., 1996). Somit ist es möglich, den Hauptgrund der Zellapoptose, den Zusammenbruch des Membranpotentials aufgrund mangelnder ATP-Versorgung der Natrium-Kalium-Pumpe, hinaus zu zögern und so die hypoxische Phase zu überstehen.

Die aus dem metabolischen Arrest resultierende gesenkte Aktivität, steht im Einklang mit dem beobachteten Verhalten von *F. candida* während der Hypoxieversuche: Die Tiere reagierten bereits früh auf das Absenken der Sauerstoffkonzentration mit dem weitgehenden Einstellen ihrer Aktivität und nahmen diese erst im Zuge der Reoxygenierung wieder auf. Erst die längerfristige Exposition von geringen Sauerstoffkonzentrationen führte in *F. candida* zu einer spezifischen Hypoxieantwort auf mRNA-Ebene.

Regulation der Genexpression in Reaktion auf schwache Langzeithypoxie

Die Versuchstiere reagierten auf schwache Langzeithypoxie (10% O₂ für 24 h) mit einer gesteigerten Expression der Laktatdehydrogenase, deren mRNA etwa drei Mal stärker exprimiert wurde als unter Normoxie. Die LDH katalysiert die Umsetzung von Pyruvat und NADH zu Laktat und NAD⁺ durch den Verbrauch von Glukose, welche durch die Glykolyse bereitgestellt wird (Everse & Kaplan, 1973; Markert, 1984). Während das so gewonnene Laktat für die Energiegewinnung selbst keine Rolle spielt, kann das regenerierte NAD⁺ erneut in der Glykolyse als Oxidationsmittel verwendet werden. Die LDH ermöglicht somit, wenn auch im Vergleich zur Glykolyse sehr viel ineffizienter, die Aufrechterhaltung der Energiegewinnung unter Sauerstoffmangel (Everse & Kaplan, 1973; Markert, 1984). Diesem Prozess sind jedoch enge zeitliche Grenzen gesetzt, da das so gebildete Laktat im Organismus akkumuliert und es dadurch zu einem Absinken des pH-Werts kommt, der so genannten Laktatazidose (Philip & Oliva, 1970; Taylor, 1982). Erst unter aeroben Bedingungen kann Laktat unter Sauerstoffverbrauch erneut zu Pyruvat umgewandelt werden und in den Citratzyklus einfließen.

Die vorliegende erhöhte Expression der LDH unter schwacher Langzeithypoxie könnte *Folsomia candida* eine gesteigerte anaerobe Stoffwechselkapazität vermitteln, die es den Tieren erlaubt, auf die gesunkenen Sauerstoffkonzentrationen zu reagieren. So wären sie in der Lage, den Energiehaushalt durch anaerobe ATP-Synthese auszugleichen und die Kosten dieser ineffizienten ATP-Gewinnung, in Form des in der Hämolymphe akkumulierenden Laktats, erst begleichen zu müssen, wenn wieder genügend O₂ zur Verfügung steht. Darüber hinaus könnte die gesteigerte LDH-Expression noch einen weiteren Vorteil im Umgang mit fallenden Sauerstoffkonzentrationen bieten. Während die Akkumulation von Laktat zumeist einen negativen Nebeneffekt der anaeroben Energiegewinnung darstellt, fungiert Laktat in einer Vielzahl von Crustacea als positiver Effektor von Hämocyanin, durch dessen Bindung es zu einer Steigerung der Sauerstoffaffinität des Hämocyanins kommt (Truchot, 1980; Booth et al., 1982; Graham et al., 1983; Johnson et al., 1984; Bouchet & Truchot, 1985; Johnson et al., 1987; Sanders & Childress, 1992; Zeis et al., 1992). Die so gesteigerte Sauerstoffaffinität erlaubt es den Tieren, selbst bei geringeren Sauerstoffpartialdrücken ausreichend O₂ aus dem sie umgebenden Medium aufzunehmen und den Effekt der Laktatazidose vorübergehend oder gänzlich zu vermeiden. Während in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Laktat auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins von *F. candida* nicht untersucht wurde, würde dies dennoch erklären, wieso die Tiere auf schwache Langzeithypoxie ausschließlich mit einer erhöhten Expression der LDH reagieren.

Regulation der Genexpression in Reaktion auf starke Langzeithypoxie

Das Expressionsprofil der Hypoxieantwort unter starker Langzeithypoxie (1,5% für 24 h) unterscheidet sich deutlich von dem der schwachen Langzeithypoxie. Während sich unter starker Langzeithypoxie keine Regulation der LDH-Expression nachweisen lässt, ist die Expression des GAPDH Gens pro μg Gesamt-RNA drei Mal höher als in Tieren der übrigen Behandlungen. GAPDH spielt eine zentrale Rolle in der Glykolyse, wo es die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat, in Anwesenheit von NAD^+ und anorganischem Phosphat, zu 1,3-Bisphosphoglycerat, sowie NADH und ATP katalysiert (Tristan et al., 2011; Seidler, 2013). Außerdem ist GAPDH in die Prävention der apoptotischen Permeabilisierung der mitochondrialen Membran involviert (Colell et al., 2007). Hierbei handelt es sich um ein durch physiologischen Stress bedingtes Absinken des mitochondrialen Membranpotentials, durch das es zum Caspase-unabhängigem Zelltod kommt. Durch die glykolytische Bereitstellung von genügend ATP kann GAPDH das Voranschreiten dieses Prozesses unterbinden und begünstigt durch die Initiation von Autophagie den Abbau bereits permeabilisierter Mitochondrien (Colell et al., 2007; Seidler, 2013). Des Weiteren kann GAPDH den Wechsel von der glykolytischen Energiegewinnung zum Pentose-Phosphat-Weg einleiten. Dabei wird das Reduktionsäquivalent NADPH gebildet, wodurch der Organismus unabhängig vom Sauerstoff Reduktionsmittel regenerieren und sich so vor den Auswirkungen von oxidativem Stress schützen kann (Ravichandran et al., 1994; Tristan et al., 2011; Seidler, 2013). Die vorliegende gesteigerte Konzentration an GAPDH mRNA impliziert eine erhöhte glykolytische Aktivität in *Folsomia candida*, welche es erlaubt auf anaerobem Weg größere Mengen ATP bereit zu stellen. Dieses Sauerstoff-unabhängig synthetisierte ATP würde es *F. candida* erlauben unter Hypoxie der Apoptose, durch den Verlust des Membranpotentials, entgegenzuwirken und würde, anders als die Energiegewinnung durch die Laktatdehydrogenase, nicht zur Akkumulation von toxischen Endprodukten in der Hämolymphe führen. Ob ein Wechsel zum Pentose-Phosphat-Weg tatsächlich stattfindet, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Die größte Regulation in Reaktion auf starke Langzeithypoxie erfährt die Expression der Hämocyaninuntereinheit 2. In der vorliegenden Untersuchung wurden in Tieren, die starker Langzeithypoxie ausgesetzt waren, etwa 1×10^7 Kopien des Gens pro μg Gesamt-RNA gefunden. Im Gegensatz dazu wurden nur circa 2×10^3 Kopien des Gens in normoxisch gehaltenen Tieren gemessen. Dies entspricht einer etwa 4000-fachen Steigerung der Hc2 Expression. Die daraus resultierende gesteigerte Sauerstoffbindungskapazität verleiht *F. candida* vermutlich die Fähigkeit auch bei geringen Sauerstoffkonzentrationen, wie sie natürlicherweise im Erdreich vorkommen, ausreichend O_2 zum Erhalt der Zellhomöostase aufzunehmen. Diese Sauerstoff-abhängige Expression ist unseres Wissens nach der erste

direkte Nachweis für eine respiratorische Funktion von Hämocyanin in adulten Tieren der Hexapoda.

4.1.2 Proteinnachweis in hypoxisch gehaltenen Tieren

Um zu überprüfen, ob das auf mRNA-Ebene gemessene stark erhöhte Vorkommen der Hämocyaninuntereinheit 2 zu einem ebenfalls in diesem Maße gesteigerten Proteinvorkommen führt, wurde ein Westernblot mit anschließender immunologischer Detektion durchgeführt. Erste Versuche der Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE zeigten, dass es während der Versuchsdurchführung zur Degradation des Proteins kam, was zu irregulären Proteinkonzentrationsbestimmungen und Proteinprofilen in der Coomassiefärbung führte (nicht gezeigt). Die darauf folgende immunologische Detektion mittels der *Blaptica dubia* Hc2 und der *Folsomia candida* Hc2 Antikörper markierten eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Größe, welche auf unspezifische Antikörperbindungen oder das denaturierte Protein zurückgeführt werden könnten. Diese Banden traten jedoch ausschließlich in den Proben der starken Langzeithypoxie (1,5% für 24 h) auf, während unter schwacher Langzeithypoxie (10% für 24 h) und Normoxie (21% O₂) kein Protein detektiert wurde. Im Folgenden wurden die Proteinisolation, sowie die Handhabung der Proben unter stringenteren Bedingungen durchgeführt, was jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung in der Coomassiefärbung oder der immunologischen Detektion führte. Der einzige Hinweis auf einen schnellen Proteinabbau, beziehungsweise dessen Degradation in *F. candida* in der bestehenden Literatur bezieht sich auf die Instabilität von Hsp 70 (Staempfli et al. 2002). Staempfli et al. konnten zeigen, dass Hsp 70 in *F. candida* schnell degradiert und in zwei etwa 48 kDa große Fragmente zerfällt. Dies führten die Autoren allerdings nicht auf eine allgemeine Proteaseaktivität zurück, sondern darauf, dass es unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE zu einer Neuordnung der Polypeptidkette des Proteins kommt, welches so eine autoproteolytisch Aktivität erlangt und sich selbst schneidet. Staempfli et al. gelang es schließlich Hsp 70 aus *F. candida* durch direkte Homogenisation der Versuchstiere in flüssigem Stickstoff und anschließender Aufnahme des Proteins in Laemmli-Puffer zu stabilisieren, welcher zusätzlich mit Proteaseinhibitoren versetzt wurde. Auch unter der Verwendung des von Staempfli et al. etablierten Protokolls konnte jedoch keine Verbesserung im Erscheinungsbild des Westernblot verzeichnet werden. Wie es trotz der verwendeten Proteaseinhibitoren zu einem schnellen und umfangreichen Proteinabbau kommt, konnte im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden. Ebenso unklar ist, wie es zur ausschließlichen Detektion von Protein in den Proben der starken Langzeithypoxie kommt. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers sollte in sämtlichen Proben gleichermaßen auftreten. Dennoch kam es in mehreren Versuchswiederholungen mit voneinander unabhängigen gewonnenen Proteinproben stets zur

Detektion größerer Proteinmengen in den Proben der starken Langzeithypoxie, während Proben der schwache Langzeithypoxie und Normoxie kein Signal zeigen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es zu einer Aggregation der degradierten Proteine kommt. Wenn die Proben der starken Langzeithypoxie, wie durch die qPCR-Daten impliziert, mehr Hämocyanin enthalten, könnte so ein ganzes Spektrum an Proteinaggregaten unterschiedlichster Größen entstehen, die Hämocyaninepitope exponieren. Dies würde zum einen erklären, wieso es nur unter starker Langzeithypoxie zu einer Detektion kommt, zum anderen, wieso ein Großteil des enthaltenen Proteins gefärbt wird.

4.1.3 Hämocyanin-*knockdown* in *Folsomia candida* mittels RNA-Interferenz

Während die mittels quantitativer real-time RT-PCR bestimmte Hämocyanin mRNA-Menge eindeutig darauf hinweist, dass Hämocyanin in der Respiration von *Folsomia candida* unter starker Langzeithypoxie involviert ist, lässt der fehlende Proteinnachweis offen, ob die ermittelte mRNA-Menge tatsächlich in eine entsprechende Proteinmenge umgesetzt wird. Um die Beteiligung von Hämocyanin bei der Sauerstoffversorgung von *F. candida* unter Hypoxie unabhängig zu den vorangegangenen Versuchen zu belegen, sollte mittels dsRNA ein Hämocyanin-*knockdown* durchgeführt werden. Insofern Hämocyanin essentiell für das Überleben der Versuchstiere unter starker Langzeithypoxie ist, würde das Absenken der Hämocyanin mRNA im Organismus durch die externe Zufuhr von dsRNA eine differenzielle Genantwort nach sich ziehen müssen oder, im extremsten Fall, zu einem letalen Phänotyp führen.

Das präziseste Applikationssystem für dsRNA stellt die subcuticuläre Injektion der RNA mittels eines Mikroinjektors dar. Aufgrund der direkten Applikation kann die Aufnahme einer definierten dsRNA-Menge garantiert und der genaue Beginn der Inokulation bestimmt werden. Darüber hinaus ist die subcuticuläre Injektion bereits in verschiedenen Organismen wie *Caenorhabditis elegans*, *Ixodes scapularis* (Hirschzecke), *Locusta migratoria* (Wanderheuschrecke), *Blattella germanica* (Deutsche Schabe) oder *Reticulitermes flavipes* (Gelbfüßige Bodentermite) mehrfach zur Induktion eines Gen-*knockdowns* erfolgreich verwendet worden (Maestro & Bellés, 2006; Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2008a; Karim et al., 2008; Luo et al., 2013). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich jedoch, dass es aufgrund der Stabilität und Elastizität der Cuticula von *F. candida* während der Applikation zu letalen Verletzungen der Versuchstiere kommt (98% Mortalität innerhalb von 1 Stunde; 100% Mortalität innerhalb von 24 Stunden). Aus diesem Grund musste eine alternative, weniger invasive Applikationsmethode verwendet werden. Hierfür bot sich die Aufnahme der zu applizierenden dsRNA mit dem Futter an, welche unter anderem in *Caenorhabditis elegans*, *Nilaparvata lugens*, *Bactrocera dorsalis* (Fruchtfliege) oder *Glossina morsitans morsitans* (Tsetse Fliege) zu stark reduzierten Expressionsniveaus der jeweiligen Zielgene

führte (Timmons & Fire, 1998; Walshe et al., 2009; Chen et al., 2010; Min et al., 2010; Huvenne & Smaghe, 2010; Li et al., 2011). Nachdem in Vorversuchen festgestellt wurde, dass es innerhalb von 24 Stunden bei 20 °C zu keiner Degradation der dsRNA kam (nicht gezeigt), wurde die zu applizierende dsRNA den Versuchstieren mit ihrem Futter verabreicht. Die anschließende Untersuchung mittels quantitativer real-time RT-PCR zeigt jedoch, dass die mit dsRNA behandelten Versuchstiere zwar über weniger Kopien des Hämocyaningens verfügten, dies aber keine signifikante Reduktion der Hämocyanin mRNA im Vergleich zu den Kontrolltieren darstellt.

Ob das Ausbleiben des Hämocyanin-*knockdowns* auf die verwendete dsRNA oder die Applikationsmethode zurückzuführen ist, lässt sich im Folgenden nicht klären. Da die applizierte dsRNA erst im Organismus durch das Enzym DICER zu physiologisch aktiver siRNA geschnitten wird, ist es nicht möglich, Aussagen über die spezifische Inhibition von Hämocyanin durch die einzelnen, aus der dsRNA entstehenden, siRNAs zu treffen. Darüber hinaus kann die aufgenommene Menge an dsRNA durch das Verfüttern nicht genau bestimmt werden und schwankt wahrscheinlich zwischen den Tieren eines Replikats, wodurch es zu Abweichungen im Grad der Inhibition kommen dürfte. Des Weiteren könnte auch der Syntheseort von Hämocyanin, welcher in *F. candida* nicht näher bestimmt ist, ausschlaggebenden Einfluss auf den Erfolg der RNA-Interferenz nehmen. Wie Walshe et al. (2009) in der Tsetse Fliege *Glossina morsitans morsitans* feststellten, sind Gene die im Fettkörper exprimiert werden schlechter oder gar nicht von einem *knockdown* durch gefütterte dsRNA betroffen, als Gene die im Mitteldarm exprimiert werden.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Hämocyanin-*knockdown* induziert werden konnte, stellt die RNA Interferenz eine geeignete Methode dar, um die respiratorische Funktion von Hämocyanin in *F. candida* zu belegen. Um unabhängig des Applikationssystems den *knockdown*-Effekt zu verstärken, sollte in weiteren Versuchen anstelle von dsRNA auf kommerziell synthetisierte siRNA-Oligomere zurückgegriffen werden. Gegenüber der verwendeten dsRNA verfügen siRNA-Oligomere über eine höhere Bindungsspezifität an die mRNA des Zielgens und führen, wie verschiedene Untersuchungen zeigten, zu einem stärkeren *knockdown*-Effekt (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Reynolds et al., 2004).

4.1.4 Verbreitung von Hämocyanin in den Collembola

Die Phylogenie der Collembola ist mittlerweile seit mehr als 100 Jahren Gegenstand der Forschung. Während neuere molekulare Studien die basale Stellung der Collembola innerhalb der Hexapoda weiter bestätigen (Gao et al., 2008; Timmermans et al., 2008; von Reumont et al., 2009), sind die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Collembola bis heute nicht geklärt (Deharveng, 2004; Schneider et al., 2011). Die erste Einteilung der

Collembola in einen phylogenetischen Stammbaum erfolgte durch Börner (1906), der die Tiere in die Unterordnungen Arthropleona und Symphypleona unterteilte. Folgende Arbeiten ließen jedoch erkennen, dass die von Börner vorgeschlagene Systematik nicht differenziert genug war und gliederten die Collembola detaillierter auf (Salmon, 1964; Yosii, 1977; Christiansen & Bellinger, 1980-1981). Von diesen erhielt jedoch nur die von Cassagnau (1971) postulierte Aufspaltung der Arthropleona in die Unterordnungen Poduromorpha und Entomobryomorpha allgemeine Zustimmung. Darüber hinaus gliederte Massoud (1976) die Familie der Neelidae aus den Symphypleona aus und stellte sie in die Unterordnung der Neelipleona. Die dadurch entstehende Phylogenie der Collembola umfasst die vier Unterordnungen Symphypleona, Entomobryomorpha, Poduromorpha und Neelipleona und ist heute sowohl aus morphologischer, wie auch molekularbiologischer Sicht gut unterstützt und weitgehend akzeptiert (Deharveng, 2004). In welchen Verwandtschaftsverhältnissen diese Ordnungen zueinander stehen, ist jedoch immer noch umstritten (Deharveng, 2004; Schneider et al., 2011).

Wie divers die vorgeschlagenen Phylogenien ausfallen, wird klar, sobald man die in den letzten Jahren veröffentlichten Stammbäume vergleicht. In der, auf morphologischen Daten basierenden Analyse, durch D'Haese (2003) wurden die Collembola in Poduromorpha + (Entomobryomorpha + (Neelipleona + Symphypleona)) unterteilt. Hingegen zeigten molekularbiologische Untersuchungen ein anderes Bild. So erbrachte die Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse der Hexapoda von Gao et al. (2008) die Neelipleona + (Symphypleona + (Entomobryomorpha + Poduromorpha)), während von Reumont et al. (2009) in ihrer Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse der Arthropoda Neelipleona + (Entomobryomorpha + (Symphypleona + Poduromorpha)) erhielten. Im Fall der von Dell'Ampio et al. (2009) veröffentlichten Phylogenie kam es zu einer nicht näher aufgetrennten Trichomie bestehend aus Neelidpleona + Entomobryomorpha + (Symphypleona + Poduromorpha). Schneider et al. (2011) erhielten die Symphypleona + (Neelipleona + (Poduromorpha + Entomobryomorpha)). In der Arbeit von Xiong et al. (2008) erwiesen sich die Entomobryomorpha als nicht monophyletisch, da die Tomoceroidea mit den Poduromorpha gruppierten. Dabei ergaben sich bei der Analyse (Symphypleona + Neelipleona) + (Entomobryomorpha + (Tomoceroidea + Poduromorpha)). Das Schwestergruppenverhältnis der Symphypleona und Neelipleona, welches in dieser Arbeit gefunden wurde, spiegelt gut die enge Beziehung beider Unterordnungen wieder, die durch morphologische Ähnlichkeiten mehrfach vorausgesagt wurden (Bretfeld, 1986; D'Haese, 2003).

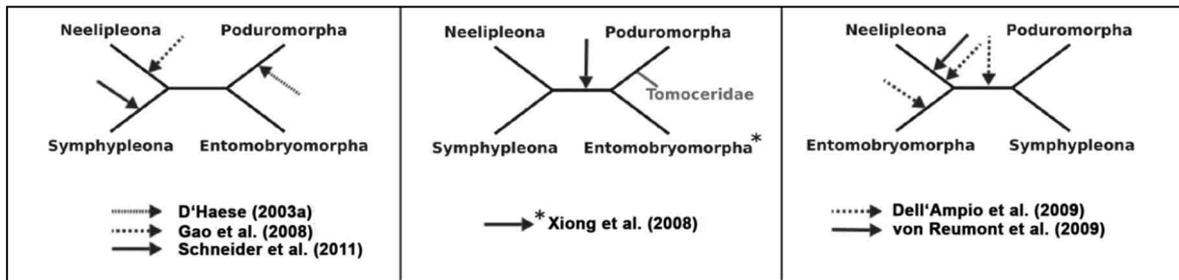


Abbildung 4.1: Phylogenetische Verwandtschaft der Collembola-Unterordnungen aus unterschiedlichen Publikationen. Pfeile deuten die Position der Wurzel für die jeweilige Publikation an. Mehrere Pfeile weisen auf Ambiguität der Wurzel hin. Ein * hinter einem Taxonnamen und vor einer Publikation kennzeichnet nicht monophyletische Taxa in der Publikation (abgewandelt aus Schneider et al., 2011).

Eines der größten Probleme bei der Stammbaumerstellung ist die Auswahl einer geeigneten Außengruppe. Da die Collembola eine große phylogenetische Distanz zu ihren nächsten Verwandten, den übrigen Hexapoda, aufweisen, kommt es bedingt durch die Auswahl möglicher Außengruppentaxa zu so genannten *random outgroup effects* (Lanyon, 1988; Wheeler, 1990). Hierbei werden, basierend auf den verwendeten Außengruppen, jeweils unterschiedliche Collembola basal an der Wurzel positioniert. Dies geschieht, da die Collembola sich genetisch zu stark von den übrigen Hexapoda unterscheiden und keine distinkte Art als die den Hexapoda am nächsten stehende ausgemacht werden kann. Welche Auswirkung dies auf die resultierende Phylogenie hat, verdeutlicht ein Vergleich der Arbeiten von D'Haese (2003), Gao et al. (2008) und Xiong et al. (2008). Während die ungewurzelten Stammbäume dieser Arbeiten auf Unterordnungsniveau vollständig miteinander kompatibel sind, führen die gewurzelten Stammbäume zu völlig verschiedenen Topologien (Abbildung 4.1; Schneider et al., 2011).

Im vorliegenden, unter Verwendung des von Xiong et al. (2008) publizierten Datensatzes, aus 18S rRNA Sequenzen erstellten Stammbaum sind die Symphypleona paraphyletisch. Die nur durch *Neelides minutus* vertretenen Neelipleona stehen in einem Schwestergruppenverhältnis zu den Entomobryomorpha, Poduromorpha und Tomoceroidea, während die nicht monophyletischen Entomobryomorpha in einem Schwestergruppenverhältnis zu den Tomoceroidea und Poduromorpha stehen. Letztere wiederum befinden sich ebenfalls in einem Schwestergruppenverhältnis zueinander. Damit ähnelt die Topologie des Stammbaumes der von Xiong et al. (2008) beschriebenen Phylogenie, mit Abweichungen in den Verwandtschaftsverhältnissen der Symphypleona und Neelipleona. Während die Symphypleona im vorliegenden Stammbaum nicht gut aufgelöst und paraphyletisch sind, wird die Position der Neelipleona gut unterstützt. Darüber hinaus findet sich eine eher basale Position der Neelipleona auch in den Arbeiten

von Gao et al. (2008) und von Reumont et al. (2009), während die engere Verwandtschaft der Neelipleona und Symphypleona bereits von Gao et al. (2008), D'Haese (2003) und Xiong et al. (2008) beschrieben wurde. Die nicht monophyletischen Entomobryomorpha und die mit den Poduromorpha assoziierten Tomoceroidea, wie sie von Xiong et al. (2008) beschrieben wurden, sind in der vorliegenden Analyse ebenfalls erhalten. Während die Position der Tomoceroidea nicht gut unterstützt ist, wurden die Tomoceroidea bereits 1945 anhand morphologischer Merkmale als monophyletisch beschrieben (Bonet, 1945). Diese Interpretation gewinnt aufgrund der molekularen Untersuchungen von Xiong et al. (2008) wieder an Bedeutung. Es ist allerdings zu betonen, dass die vorliegende Arbeit keinen Anspruch daran stellt, die grundlegenden Fragen der Phylogenie der Collembola zu beantworten. Vielmehr soll das Vorkommen von Hämocyanin in den bereits etablierten und, in Hinblick auf die jüngsten phylogenetischen Analysen, gut unterstützten Unterordnungen untersucht werden.

Wie zu erkennen ist, gibt es eine starke Tendenz in der Verteilung welcher Unterordnung die untersuchten Collembola angehören. Mit 22 der 37 untersuchten Arten gehören bereits etwa 60% der zur Analyse verfügbaren Collembola zu den Entomobryomorpha. Die Tomoceroidea sind mit neun untersuchten Arten ebenfalls gut repräsentiert. Im Gegensatz dazu sind die mit vier und zwei Arten vertretenen Symphypleona, beziehungsweise Poduromorpha stark unterrepräsentiert. Darüber hinaus standen für die Untersuchung keine Neelipleona zur Verfügung. Trotz dieses Ungleichgewichts in der Verteilung der Versuchstiere gelang es Hämocyanin in den Unterordnungen der Symphypleona und Entomobryomorpha, sowie der Superfamilie der Tomoceroidea nachzuweisen. Während das Vorkommen der Hämocyaninuntereinheit 1 auf die Entomobryomorpha beschränkt ist, ließ sich Hämocyaninuntereinheit 2 in den Symphypleona, Entomobryomorpha und Tomoceroidea nachweisen. Eine Ausnahme unter den untersuchten Collembola stellt Entomobryomorpha 10 dar, welches das einzige Versuchstier ist, in dem zeitgleich die Expression beider Hämocyaninunterheiten gezeigt werden konnte. In den zwei verfügbaren Arten der Poduromorpha konnte kein Hämocyaninvorkommen gezeigt werden. Aufgrund der verwendeten PCR-basierten Nachweismethode kann ein fehlender Nachweis von Hämocyanin jedoch nicht mit dessen Abwesenheit in den jeweiligen Taxa gleichgesetzt werden. So wären bereits geringe Sequenzunterschiede in den Primerbindungsstellen zwischen den Spezies ausreichend, um eine Amplifikation zu verhindern. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Hypoxieversuche deutlich in welchem unterschiedlichen Maß die Expression von Hämocyanin, je nach physiologischem Zustand, stattfinden kann. Dadurch könnte der Nachweis von Hämocyanin in Tieren, die kurz zuvor Hypoxie ausgesetzt waren, deutlich einfacher ausfallen, als in Tieren, die über längere Zeit unter Normoxie gelebt haben. Außerdem kann eine spezifische Expression in unterschiedlichen Entwicklungs-

stadien nicht ausgeschlossen werden, da diese bisher in den Collembola nicht untersucht wurde. Da trotz dieser Schwierigkeiten das Vorkommen von Hämocyanin in 62% der untersuchten Tiere bestätigt werden konnte, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die tatsächliche Verbreitung von Hämocyanin innerhalb der Collembola höher ist, als im vorliegenden Stammbaum dargestellt. Angesichts dessen, wären Rückschlüsse auf einen eventuellen Verlust von Hämocyanin in den Poduromorpha unter der bisherigen Datenlage, bedingt durch die geringe Abdeckung der Poduromorpha in den vorhandenen Versuchstieren, sehr verfrüht. Gleiches gilt für einen eventuell evolutiv bedingten Verlust der Hämocyaninuntereinheit 1 in den Symphypleona und Tomoceroidea. Auch hier wird eine breitere Abdeckung der Unterordnung, beziehungsweise Superfamilie, durch weitere Versuchstiere benötigt, bevor konkrete Schlüsse gezogen werden können. Allerdings erscheint ein Verlust von Hämocyaninuntereinheit 1 als sehr unwahrscheinlich, da Hc1 bisher in allen Hexapoda die über Hämocyanin verfügen nachgewiesen werden konnte, während Untereinheitstyp 2 in verschiedenen Ordnungen nicht vorhanden ist (Pick et al., 2009a). Pick et al. (2009a) vermuteten daraufhin, dass Hc1 den zentralen Baustein des Hämocyaninhexamers in Hexapoda darstellt, während Hc2 eine Modifizierung des Hexamers zulässt, die unter anderem differenziertere Bindungseigenschaften oder gänzlich andere Funktionen des Hämocyanins ermöglicht.

In Anbetracht des vornehmlich innerhalb der Entomobryomorpha nachgewiesenen Hämocyanins, sollte versucht werden, das Vorkommen von Hämocyanin mit dem Habitat, beziehungsweise der Lebensweise der jeweiligen Tiere zu korrelieren. Collembola besiedeln eine Vielzahl unterschiedlicher Habitate, die vom Litoral und Neuston über arktisches Eis hin zu tropischen Baumkronen reichen. Während diese extremeren Lebensräume jedoch meist nur von einigen wenigen Arten bevölkert wird, leben die meisten Collembola Spezies im Boden oder damit assoziierten Habitaten (Christiansen, 1964; Wise, 1965; Ponge, 1993; Rusek, 1998; Rodgers & Kitching, 1998). Die genaue Charakterisierung von Böden erfordert jedoch die Erfassung einer größeren Anzahl verschiedenster Faktoren, wie horizontale und vertikale Stratifikation, pH-Wert, Feuchtigkeit, Temperatur, Verfügbarkeit von Nahrungsquellen, sowie das Vorkommen von Predatoren, die bei der Abgrenzung eines Habitats berücksichtigt werden müssen (Ponge, 1993; Rusek, 1998). Aus diesem Grund wird häufig ein stark vereinfachtes Klassifikationssystem verwendet, welches die Collembola in epedaphische (auf dem Boden oder in dessen Vegetation), hemiedaphische (in den groben Strukturen der Bodenoberfläche, wie Moos oder der Streuschicht) und euedaphische (tief im Boden) lebende Arten unterteilt (Ponge, 1993; Rusek, 1998). Fast alle Entomobryomorpha gehören zur Gruppe der epedaphisch lebenden Collembola. Die Ausnahme hiervon stellen die Angehörigen der Familie der Isotomidae dar, die zu den hemiedaphischen Arten zählen. Umgekehrt verfügen die Symphypleona

überwiegend über hemiedaphische Lebensweisen, während nur einige wenige Arten epedaphisch sind (Christiansen, 1964; Nickerl et al., 2013). Die Poduromorpha gehören gleichermaßen zu den hemi- wie euedaphische Arten, während die Neelipleona, von denen jedoch nur wenige Arten untersucht sind, überwiegend zu den euedaphischen lebenden Tieren gehören (siehe Tabelle 4.1; Rodgers & Kitching, 1998; Nickerl et al., 2013).

Tabelle 4.1: Übersicht der Lebensweisen innerhalb der Collembola-Unterordnungen

Unterordnung	Lebensweise	Hämocyanin
Symphyleona	überwiegend hemiedaphisch (wenige epedaphische Arten)	Ja
Neelipleona	überwiegend euedaphisch	Nein
Entomobryomorpha	überwiegend epedaphisch (Isotomidae: hemiedaphisch)	Ja
Poduromorpha	hemiedaphisch / euedaphisch	Nein

Betrachtet man die Verteilung des Hämocyaninvorkommens im Stammbaum, zeigt sich, dass Hämocyanin ausschließlich in epedaphischen und hemiedaphischen, jedoch nicht in euedaphischen Arten nachgewiesen werden konnte. In Anbetracht der verhältnismäßig besseren Sauerstoffverfügbarkeit innerhalb der Streu- und oberen Bodenschichten, im Vergleich zum tieferen Erdreich, erscheint dies zunächst widersprüchlich. Hierbei könnte es sich um ein Artefakt handeln, welches durch die geringe Abdeckung euedaphisch lebender Arten zu erklären ist. Dies erscheint umso wahrscheinlicher, da in der vorliegenden Arbeit klar gezeigt werden konnte, dass *Folsomia candida* auf sinkende Sauerstoffkonzentrationen mit einer Steigerung der Hämocyaninexpression reagiert. Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der Untersuchung von Nickerl et al. (2013), die das Vorkommen von cuticulären Sekundärstrukturen verschiedener Collembola untersuchten. Diese Sekundärstrukturen finden sich ausschließlich bei hemi- und euedaphisch lebenden Arten, welche zumindest zum Teil im Erdreich leben, und dienen vermutlich dem Schutz, der für die Hautatmung wichtigen cuticulären Strukturen gegen Abrieb durch Bodenpartikel. Nickerl et al. (2013) stellten darüber hinaus die Theorie auf, dass die Sekundärstrukturen die Bildung von physikalischen Kiemen (Plastron) begünstigen, wie sie sonst auf Blättern einiger in Überschwemmungszonen beheimateter Pflanzen vorkommen. Diese Plastrons könnten den Austausch von O₂ und CO₂ mit der Umgebung begünstigen und so einen weiteren Faktor darstellen, der den Collembola das Überleben in Böden mit geringer Sauerstoffverfügbarkeit ermöglicht (Nickerl et al., 2013). Weitere Untersuchungen an Symphyleona, Poduromorpha und Neelipleona könnten Aufschluss darüber geben, ob Hämocyanin auch in tiefer im Boden lebenden Arten vorkommt oder ob dessen Vorkommen eine spezifische Anpassung der epedaphisch und hemiedaphischen Arten darstellt.

4.2 Hämocyanin in der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*

Die Entdeckung des *embryonic hemolymph proteins* (EHP) in *Schistocerca americana* 1998 stellt die erste Beschreibung eines Hämocyanins in Hexapoda dar (Sánchez et al., 1998). Dennoch sind seit dieser Zeit nur wenige Untersuchungen zum Hämocyanin der Orthoptera durchgeführt worden. Sánchez et al. (1998) gingen davon aus, dass Hämocyanin aufgrund der spezifischen Expression von EHP in den Embryonen von *S. americana* eine Rolle in der Sauerstoffversorgung während der embryonalen Entwicklung spielt. Eine solche Funktion konnte später anhand des Expressionsmusters von Hämocyanin in der argentinischen Waldschabe *Blaptica dubia* gezeigt werden (Pick et al., 2009b). Innerhalb der Orthoptera konnte Hämocyanin neben *S. americana* auch in der europäischen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* nachgewiesen werden (Pick et al., 2009a), wo ebenfalls eine hohe Expression in den sich entwickelnden Embryonen festgestellt wurde (Yin et al., 2011). Über die Hämocyaninexpression in den Nymphenstadien und adulten Tieren existieren gegensätzliche Ergebnisse. Während Yin et al. (2011) Hämocyanin in sämtlichen Entwicklungsstadien nachweisen konnten, fanden Chen et al. (2015), dass Hämocyanin ausschließlich in den sich entwickelnden Embryonen exprimiert wird. Darüber hinaus vermuteten sie, dass es sich bei dem von Yin et al. (2011) gefundenem Hämocyanin in Nymphen und Adulten um falsch positive Ergebnisse handelte, welche auf die Amplifikationen des Gens mittels degenerierter Primer zurückgeführt wurden (Chen et al., 2015). Weiter konnten Chen et al. (2015) zeigen, dass Hämocyanin hauptsächlich in der Epidermis der Embryonen exprimiert wird und ein RNA-induzierter *knockdown* des Gens zu signifikant verzögerter Embryonalentwicklung und geringeren Schlupfraten führt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Hämocyanin in den Orthoptera tatsächlich funktionell auf die Sauerstoffversorgung der Embryonen begrenzt ist, oder ob weitere, zum teil nicht-respiratorische Funktionen vorliegen. Hierzu wurde das Vorkommen von Hämocyanin unter verschiedenen physiologischen Zuständen, sowie in sämtlichen Entwicklungsstadien von *L. migratoria* untersucht. Da *L. migratoria* Phasenpolymorphismus zeigt und in solitärer und gregariner Phase auftreten kann (Uvarov, 1921), sollte zusätzlich die Hämocyaninexpression beider Phasen verglichen werden. Die von Uvarov (1921) postulierte Phasentheorie besagt, dass Wanderheuschrecken, welche normalerweise in solitärer (einzeln lebender) Phase vorkommen, aufgrund gewisser Reizen in die gregarine (schwarmbildende) Phase wechseln, in der sie in extrem hoher Populationsdichte auftreten (Uvarov, 1921; Ellis, 1959; Ellis & Pearce, 1962; Pener et al., 1997). Darüber hinaus ändert sich auch das Flugverhalten der Tiere zwischen den Phasen. Während solitäre Tiere sehr große Strecken an einem Stück zurücklegen, werden die Flugphasen der gregarinen Tiere häufig durch Fraßphasen unterbrochen. Trotz dieser normalerweise kürzeren Flüge, wurde die längste, an einem Stück zurückgelegte, Strecke bei gregarinen Tieren gemessen, die

auf ihrem Weg keine geeigneten Futterquellen finden konnten (Pener et al., 1997). Solitäre Heuschrecken hingegen legen auf ihren Flügeln regelmäßig Strecken von mehr als 20 Kilometer an einem Stück zurück. Da die aktive Flugmuskulatur über den höchsten bekannten massenspezifischen Sauerstoffverbrauch aller an der Lokomotion beteiligten Gewebe verfügt (Weis-Fogh, 1964; Dudley, 1999), könnten die Tiere durch ihre Flugmuskulatur einen gesteigerten Sauerstoffbedarf zeigen, der durch den Hämocyanin-bedingten Sauerstofftransport gedeckt werden könnte. Des Weiteren ist bekannt, dass Hämocyanin in einigen Crustacea an der Immunantwort beteiligt ist (Destoumieux-Garzóm et al., 2001; Lee et al., 2003). Da das Auftreten der gregarinen Tiere in großen Schwärmen die Verbreitung von Krankheiten und Parasiten begünstigt, wäre eine ähnliche Funktion auch in *L. migratoria* denkbar. Somit stellt die Populationsdichte und eine damit einhergehende mögliche Verbreitung von Krankheiten einen Ansatzpunkt dar, in dem ein gesteigertes Hämocyaninvorkommen von Vorteil für gregarine Exemplare von *L. migratoria* sein könnte, während das Flugverhalten ein höheres Hämocyaninvorkommen in den solitären Tieren begünstigen könnte.

Da neben den solitären und gregarinen Phasen, welche sich unter anderem in Morphologie, Physiologie, Ökologie und Verhalten voneinander unterscheiden, auch Mischformen existieren, ist eine klare Abgrenzung der Phasen extrem schwer (Uvarov, 1921; Dirsh, 1953; Hardie & Lees, 1985; Pener & Yerushalmi, 1998). Die klare Abgrenzung der Phasen wird dabei weiter durch das voneinander unabhängige auftreten einiger Merkmale erschwert, welche stärker oder schwächer ausgeprägt sein können (Uvarov, 1921; Hardie & Lees, 1985). Außerdem sind bisher keine Genmarker bekannt, welche auf molekularbiologischem Weg eine Zuordnung zu einer der Phasen erlauben. Stattdessen werden Quotienten der Flügellänge zur Femurlänge (E/F-Quotient), sowie der Femurlänge zur Kopfbreite (F/C-Quotient) verwendet, um eine grobe Abschätzung der vorliegenden Phase zu ermöglichen (Dirsh, 1953; Deng et al., 1996). Des Weiteren wird die Zuordnung zu einer Phase weiter durch die Tatsache erschwert, dass Wanderheuschrecken dazu neigen in Gefangenschaft gregarine Merkmale auszubilden, so dass selbst solitäre Tiere morphologisch nie ganz ihren freilebenden Artgenossen ähneln (Hardie & Lees, 1985). Viele Details darüber, wie der Wandel von der solitären zur gregarinen Phase stattfindet und welche Faktoren daran beteiligt sind, sind noch immer nicht bekannt. Der wichtigste Auslöser des Phasenwechsels ist das Erreichen einer bestimmten Populationsdichte. Hierbei führt vermutlich häufiger Kontakt der Tiere untereinander zur Induktion des Phasenwechsels. Außerdem sind vermutlich visuelle Reize, sowie eine Reihe von Hormonen, wie Ecdysteroid oder Juvenilhormon, beteiligt (Ellis, 1959; Rahman et al., 2002). Die fehlenden Phasenmarker und noch großen Unsicherheiten bei der Induktion des Phasenwechsels machen es allerdings schwierig eine Aussage darüber zu treffen, in

welcher Phase sich die verwendeten Versuchstiere tatsächlich befanden. Aus diesem Grund entstammten alle in Rahmen der Arbeit verwendeten Versuchstiere der fünften Generationen unter solitären oder gregarinen Haltungsbedingungen.

Um unabhängig von der Phase eine Beteiligung von Hämocyanin an der Immunantwort zu überprüfen, wurden adulte Tiere mit Lipopolysaccharid injiziert, welches eine Immunantwort auslöst. Außerdem sollte ein von der Phase unabhängiger Hypoxieversuch zeigen, in dem die Tiere für 24 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 10% ausgesetzt waren, ob Hämocyanin an der Respiration beteiligt ist.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass sowohl Hämocyaninuntereinheit 1, wie auch 2 in *L. migratoria* in allen Entwicklungsstadien, mit Ausnahme der Embryonen, konstant in relativ geringen Mengen exprimiert werden. Während der Embryogenese hingegen wird Hämocyanin um den Faktor 100.000 für Untereinheit 1 und 50.000 für Untereinheit 2 höher exprimiert. Damit entspricht das vorgefundene Expressionsmuster dem von Yin et al. (2011) beschriebenen, die ebenfalls ein Vorkommen von Hämocyanin auf mRNA-Ebene innerhalb sämtlicher Entwicklungsstadien fanden. Da die Amplifikation innerhalb der quantitativen real-time RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt wurde, kann eine wie von Chen et al. (2015) vermutete unspezifische Amplifikation ausgeschlossen werden. Darüber hinaus liegt die Hämocyaninexpression auf mRNA-Ebene in der vorliegenden Untersuchung deutlich über den von Chen et al. (2015) publizierten Werten. Allerdings lässt sich Hämocyanin auf Proteinebene ausschließlich in den Embryonen nachweisen, was darauf hindeutet das es in den anderen Entwicklungsstadien zu keiner oder einer nur sehr geringen Translation der mRNA kommt. Der Vergleich zwischen Tieren der solitären und gregarinen Phase zeigte keine Unterschiede in der Hämocyaninexpression. Ob sich die Tiere tatsächlich in unterschiedlichen Phasen befanden und wenn ja, wie ausgeprägt die jeweilige Phase war, kann im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden. Eine Beteiligung von Hämocyanin an der Immunantwort in Reaktion auf Bakterienbefall kann durch die vorgenommenen LPS Injektionen, welche keine gesteigerte Hämocyaninexpression nach sich zogen, weitgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus deutet das Ausbleiben der Expressionsregulation unter Hypoxie stark darauf hin, dass Hämocyanin nicht in der Respiration der adulten Tiere involviert ist. Damit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die bereits von Sánchez et al. (1998) aufgestellte Theorie, dass Hämocyanin seine generelle Funktion in der Respiration der Orthoptera verloren hat und der Sauerstoffversorgung der Embryonen dient.

4.3 Hämocyanin in der Fangschrecke *Hierodula membranacea*

Das Hämocyanin der Arthropoda verfügt im Regelfall über ein Signalpeptid, welches für den Transport über das endoplasmatische Reticulum zuständig ist. Ein fehlen dieser Signalsequenz war lange Zeit nur aus einigen Arachnida bekannt, konnte aber durch die Sequenzierung der Hämocyanine des Zygentoma *Thermobia domestica* und der Mantodea *Hierodula membranacea* auch in zwei Hexapoda gezeigt werden (Kempter, 1983; Markl & Decker, 1992; Voit et al., 2000; Pick et al., 2008; Pick et al., 2009a). Während die Hämocyaninuntereinheit 2 von *T. domestica* über kein Signalpeptid verfügt, ist dieses jedoch in Untereinheit 1 vorhanden. Hingegen fehlt der Fangschrecke *H. membranacea* als einzigem Hexapoda die zum Export aus der Zelle benötigte Sequenz in beiden Hämocyaninuntereinheiten (Pick et al., 2008; Pick et al., 2009a). Dies wirft die Fragen auf, ob ein alternativer Transportweg existiert über den das Hämocyanin aus der Zelle befördert wird, oder ob Hämocyanin in *H. membranacea* über eine intrazelluläre Funktion verfügt. Um diese Fragen zu beantworten, sollte der Syntheseort von Hämocyanin identifiziert und Gewebe, in denen Hämocyanin funktionell eine Rolle spielen könnte, untersucht werden. Hierfür wurden im Rahmen der Arbeit Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene in Hämocyten, Fettkörper, Ovarien und Muskelgewebe der Tiere durchgeführt.

Die Untersuchung der vier ausgewählten Gewebe auf mRNA-Ebene zeigte zunächst, dass Hämocyaninuntereinheit 2 in den verwendeten Versuchstieren nicht oder in nur so geringen Mengen exprimiert wurde, dass eine Quantifikation mittels qPCR nicht möglich war. Dies deutet darauf hin, dass Hämocyaninuntereinheit 2 nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder in gewissen Entwicklungsstadien in *H. membranacea* exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Hämocyaninuntereinheit 1 mRNA in deutlich höherem Maße in den Hämocyten exprimiert wird, als im Fettkörper, den Ovarien oder der Muskulatur. Während auch in diesen Geweben Hämocyanin mRNA gemessen wurde, ist dies vermutlich auf eine Kontamination der übrigen Gewebe mit Hämocyten zurückzuführen. Aufgrund des offenen Gefäßsystems der Tiere werden sämtliche Gewebe mit Hämolymphe und somit auch mit den frei in der Hämolymphe flottierenden Hämocyten umspült. Vermutlich konnten die isolierten Gewebe nicht ausreichend von den Hämocyten getrennt werden, so dass es auch hier zu einer positiven Detektion von Hämocyanin mRNA kam. Wie in den Plecoptera gezeigt werden konnte erfolgt in den Hexapoda die Hämocyaninsynthese im Fettkörper (T. Burmester, persönliche Kommunikation), der eine analoge Funktion zum Hepatopankreas der Crustacea besitzt, welcher der Syntheseort von Hämocyanin in den meisten Crustacea darstellt (Markl & Decker, 1992). Damit stellt dies den ersten bekannten Nachweis für eine Hämocyaninsynthese in Hämocyten innerhalb der Hexapoda dar.

Während somit geklärt werden konnte in welchem Gewebe die Hämocyaninsynthese stattfindet, sollte der Proteinnachweis Aufschluss darüber geben, ob das Hämocyanin trotz mangelndem Signalpeptids aus den Hämocyten in andere Gewebe transportiert wird. Allerdings ist eine endgültige Aussage darüber, aufgrund der bereits beschriebenen Kontamination der Gewebe mit Hämocyten, schwierig. So zeigt der Proteinnachweis eine starke Detektion von Hämocyanin in den Hämocyten und dem Muskelgewebe der Fangarme, während außerdem ein sehr schwaches Signal im Fettkörper vorhanden ist. Letzteres lässt sich dabei jedoch vermutlich, aufgrund der geringen Intensität des Signals, auf eine Kontamination zurückführen. Während das gezeigte Hämocyaninvorkommen in den Hämocyten diese als Syntheseort bekräftigt, könnte das ebenso starke Hämocyaninsignal im Muskelgewebe auf eine Kontamination oder eine muskelspezifische Funktion zurückzuführen sein. Schreibt man die Detektion von Hämocyanin im Muskelgewebe einer Hämocyten-bedingten Kontamination zu, wäre das Vorkommen von Hämocyanin in *H. membranacea* auf die Hämocyten beschränkt. Hämocyten sind für die zelluläre Immunantwort der Hexapoda zuständig und bewerkstelligen unter anderem die Phagozytose, sowie die Einkapselung und Melanisierung von Fremdkörpern und Mikroorganismen (Cerenius & Söderhäll, 2004). Die hierfür notwendigen chemischen Reaktionen werden durch Phenoloxidasen katalysiert, welche jedoch bisher weder in *H. membranacea*, noch anderen Mantodea nachgewiesen wurden. Wie aber aus einigen Chelicerata bekannt ist, kann Hämocyanin nach Aktivierung durch eine limitierte Proteolyse eine Phenoloxidasefunktion ausüben (Nagai & Kawabata 2000; Nagai et al., 2001; Decker et al., 2001). Ein ähnlicher Prozess, der es Hämocyanin erlaubt eine Rolle in der Immunantwort zu übernehmen, wäre auch in *H. membranacea* denkbar. Darüber hinaus würde die Abwesenheit des Signalpeptids in der Hämocyaninsequenz durch eine intrazelluläre Funktion plausibel erklärt werden.

Sollte sich hingegen das Vorkommen von Hämocyanin im Muskelgewebe bestätigen, müsste ein alternativer Transportweg innerhalb der Hämocyten dafür sorgen, dass es zum Export des Hämocyanins kommen kann. In den Arachnida wird Hämocyanin ebenfalls in Hämocyten synthetisiert und gelangt durch selektive Zellyse in die Hämolymphe (Kempton, 1983; Voit et al., 2000; Pick et al., 2009a). Ein solcher vom Signalpeptid unabhängiger Export wäre auch in *H. membranacea* denkbar. Innerhalb des Muskelgewebes könnte Hämocyanin eine Myoglobin-ähnlichen Funktion übernehmen und der Muskulatur Sauerstoff zur Verfügung stellen, welcher bei der extrem schnellen Bewegung der Fangarme beim Beutefang benötigt werden könnte. Während *H. membranacea*, wie die meisten Mantodea, ihrer Beute zunächst bewegungslos auflauern, erfolgt der Beuteschlag durch eine extrem schnelle Bewegung der Fangarme. Dabei erreichen die Tiere so hohe Geschwindigkeiten, dass es bis in die späten sechziger Jahre nicht möglich war diese

genaue zu messen (Maldonado et al., 1967). Sollte sich eine Funktion von Hämocyanin in der Sauerstoffspeicherung innerhalb des Muskelgewebes in *H. membranacea* bestätigen, wäre dies die erste Beschreibung eines „Myohämocyanins“.

Bedingt durch die verwendeten Methoden und die damit einhergehende Kontamination der untersuchten Gewebe durch Hämocyten, lässt sich bisher jedoch nur mit Sicherheit sagen, dass der Syntheseort von Hämocyanin in *H. membranacea* in den Hämocyten liegt. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um zu klären ob Hämocyanin tatsächlich eine Phenoloxidasefunktion ausübt, oder die Rolle eines „Myohämocyanins“ übernimmt. Darüber hinaus sollten zusätzliche Untersuchungen an den Embryonen und Nymphen von *H. membranacea* durchgeführt werden, da in den nahen Verwandten Blattodea und Orthoptera Hämocyanin eine Rolle in der Versorgung der Embryonen übernimmt (Pick et al., 2009b; Yin et al., 2011; Chen et al., 2015). Da die Mantodea ihre Eier ebenfalls in Ootheken verpacken, existiert auch hier eine weitere Diffusionsbarriere, bei deren Überwindung Hämocyanin eine Rolle spielen könnte.

4.4 Hämocyanin in Hexapoda

Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, stellt das Hämocyanin der Hexapoda ein bisher nur wenig untersuchtes Themengebiet dar. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen stets auf einigen wenigen Spezies, wie *Schistocerca americana*, *Perla marginata*, *Blaptica dubia* oder *Locusta migratoria*, in denen Hämocyanin nachgewiesen werden konnte und verschiedene Studien durchgeführt wurden (Sánchez et al., 1998; Hagner-Holler et al., 2004; Pick et al., 2009b; Yin et al., 2011; Chen et al., 2015). Den bisher umfangreichste Überblick des Vorkommens von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda lieferte die Arbeit von Pick et al. (2009a), welche in elf weiteren Spezies Hämocyanin nachwies. Seitdem sind nur wenige weitere Spezies untersucht und kaum neue Erkenntnisse darüber gewonnen worden, wieso Hämocyanin trotz des gut ausgebildeten Tracheensystems in verschiedensten Hexapoda vorkommt. Deswegen lässt sich bis heute die zentrale Frage, ob das Vorkommen von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda mit evolutiven Ereignissen, ökologischen Bedingungen, physiologischen Eigenschaften, oder der Morphologie der Tiere korreliert, nicht beantworten.

4.4.1 Vorkommen von Hämocyanin in den Hexapoda

Entgegen der damaligen Annahme, Hexapoda verfügten aufgrund ihres Tracheensystems über keine respiratorischen Proteine, wurde Hämocyanin mittlerweile in einer Vielzahl an Hexapoda-Ordnungen nachgewiesen (siehe Abbildung 4.2). So verfügen, mit Ausnahme der Protura, Diplura, Odonata, Ephemeroptera, Zoraptera, Grylloblattodea und Embioptera, alle ametabolen und hemimetabolen Hexapoda über Hämocyanin (Pick et al., 2009a; Burmester, 2015). Während die Abwesenheit von Hämocyanin in den Odonata und Ephemeroptera aufgrund von Genomanalysen bereits bestätigt werden konnte, erscheint ein Verlust von Hämocyanin in den Protura und Diplura durch die Auswertung von EST-, Transkriptomanalysen ebenfalls als sehr wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu liegen für die Zoraptera, Grylloblattodea und Embioptera bisher keine näheren Untersuchungen vor (Pick et al., 2009a; Burmester, 2015). Innerhalb der Stammlinie, die zu den Eumetabola führte, ging Hämocyanin hingegen vollständig verloren, was unter anderem durch Genomanalysen an *Drosophila melanogaster* (Diptera), *Bombyx mori* (Lepidoptera), *Apis mellifera* (Hymenoptera) und *Tribolium castaneum* (Coleoptera) belegt werden konnte. Stattdessen rekrutierten die Eumetabola, bei der Besiedelung hypoxischer Habitats, ein Hämoglobin aus einem intrazellulären Globin, welches vermutlich im Genom aller Insekten vorkommt (Burmester, 2015). Diese Verteilung des Hämocyaninvorkommens innerhalb der Hexapoda zeigte sich im Weiteren auch in der im Rahmen der Arbeit durchgeführten Analyse von 103 Transkriptomen (siehe Tabelle 3.1). Hierbei wurden Hinweise auf Hämocyanin in den Transkriptomen sämtlicher Hexapoda-Ordnungen gefunden, in denen ein Hämocyaninvorkommen bereits gezeigt werden konnte. Die einzige Ausnahme hierzu stellten die, in der Analyse mit zwei Arten vertreten, Isoptera dar, in denen kein Hämocyanin gefunden wurde. Darüber hinaus fanden sich auch in dieser Untersuchung in den Protura und Diplura keine Anzeichen für ein Vorkommen von Hämocyanin.

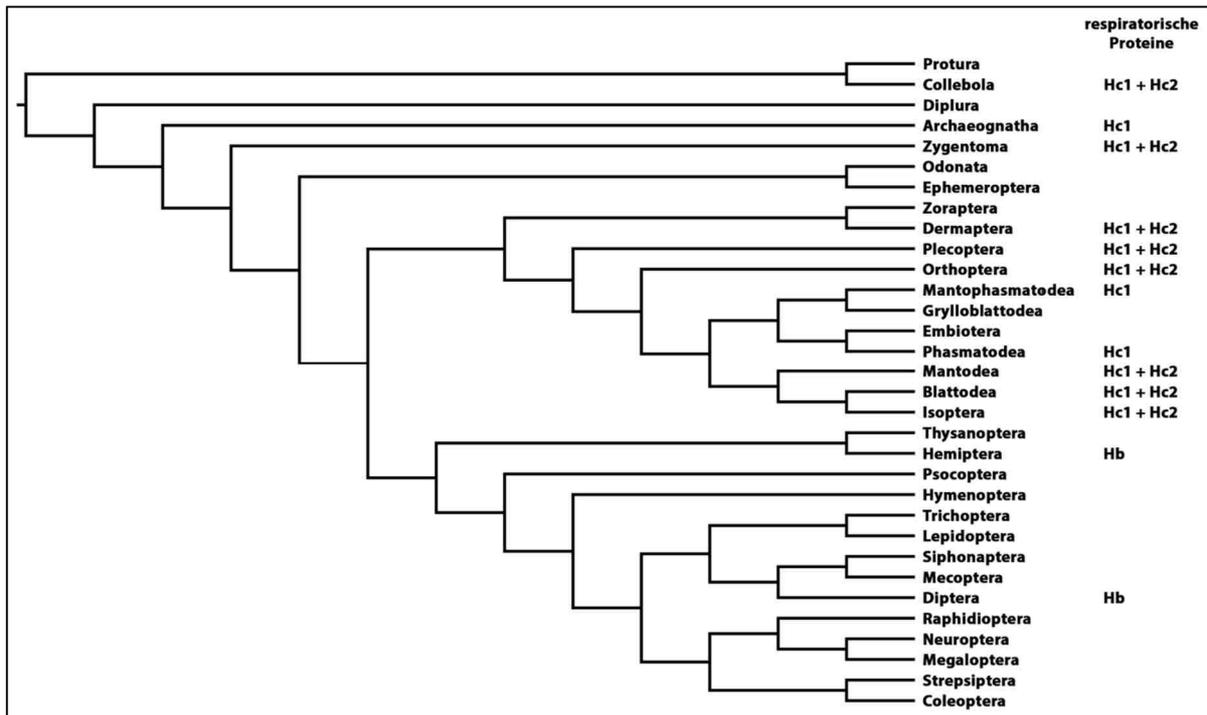


Abbildung 4.2: Verteilung respiratorischer Proteine in den Hexapoda. Angegeben sind jeweils Hämocyaninuntereinheit 1 und 2 (Hc1; Hc2), sowie Hämoglobin (Hb; nach Misof et al., 2014).

4.4.2 Mögliche Funktionen des Hämocyanins in den Hexapoda

Funktionelle Untersuchungen von Hämocyanin existierten in den Hexapoda bisher nur in den Plecoptera, Orthoptera und Blattodea (Hagner-Holler et al., 2004; Pick et al., 2009b; Yin et al., 2011; Chen et al., 2015). Durch die vorliegende Arbeit konnten diese Ordnungen durch Untersuchungen an den Collembola und Mantodea erweitert werden.

So konnte in dem Collembola *Folsomia candida* eindeutig gezeigt werden, dass Hämocyanin eine Funktion in der Sauerstoffversorgung adulter Tiere übernimmt, wie sie auch in den Crustacea vorkommt, den nächsten Verwandten der Hexapoda. Es scheint naheliegend, dass Hämocyanin diese Funktion in der Stammlinie der Hexapoda übernahm und es erst im Laufe der Evolution zu mehreren voneinander unabhängigen Verlusten von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda-Ordnungen kam. Aufgrund ihrer terrestrischen beziehungsweise subterrestrischen Lebensweisen und den mit dem Boden assoziierten schwankenden Sauerstoffverfügbarkeiten wäre es denkbar, dass Hämocyanin auch in den übrigen Apterygota (flügellose Insekten) eine generelle Rolle in der Sauerstoffversorgung der Tiere übernimmt.

Eine ähnliche Funktion liegt in den Plecoptera vor, deren aquatischen Larven, neben normalerweise sauerstoffreichen Fließgewässern, häufig in sauerstoffarmen stehenden Gewässern leben. Da die Larvalphase außerdem den Großteil der Lebensdauer der Tiere ausmacht, mit zum Teil nur wenigen Tagen bis Wochen andauernden adulten Phasen, ist

die Erschließung dieser Habitate vermutlich durch die Anwesenheit von Hämocyanin stark begünstigt worden. Neben der Expression im Larvenstadium konnte jedoch auch ein Hämocyaninvorkommen in adulten Tieren gezeigt werden (Hagner-Holler et al., 2004). Damit stellen die Plecoptera die bisher einzigen Hexapoda dar, in denen Hämocyanin sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene in größeren Mengen in sämtlichen Entwicklungsstadien nachgewiesen wurde.

Des Weiteren konnte durch die umfassenden Untersuchungen an der Waldschabe *Blaptica dubia* und der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* gezeigt werden, dass Hämocyanin eine zentrale Rolle bei der Sauerstoffversorgung der Embryonen spielt, während es in adulten Tieren kaum exprimiert wird (Sánchez et al., 1998; Pick et al., 2009a; Yin et al., 2011; Chen et al., 2015). So führt ein Hämocyanin-*knockdown* zu einer starken Verzögerung in der Embryonalentwicklung und einer geringeren Schlupfrate der Tiere (Chen et al., 2015). Durch die vorliegende Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass Hämocyanin zumindest in *L. migratoria* darüber hinaus keine seiner, aus anderen Tieren bekannten, Funktionen wahrnimmt und ausschließlich der Versorgung der Embryonen über die Diffusionsbarriere der Oothek, beziehungsweise dem Eipaket dient. Diese spezialisierte Versorgung der sich entwickelnden Embryonen erscheint auch in einer Reihe weiterer Orthopteroidea sinnvoll. So legen auch die Mantophasmatodea ihre Eier in Eipakete ab, während die Phasmatodea über hartschalige Eier verfügen und die Dermaptera ihre Eier häufig in unterirdischen Bauten deponieren.

In der Analyse des Hämocyanins der Fangschrecke *Hierodula membranacea* konnten Hinweise auf ein Hämocyaninvorkommen innerhalb der Hämocyten, wie auch dem Muskelgewebe gefunden werden. Während dies auf eine Phenoloxidasefunktion innerhalb der Hämocyten hindeutet, könnte es sich beim Hämocyanin von *H. membranacea* ebenso um ein „Myohämocyanin“ handeln, welches zur Sauerstoffspeicherung im Muskelgewebe dient. Während beide Fälle eine neuartige, bisher unbeschriebene Funktion in Hexapoda darstellen würden, kann jedoch keine der Funktionen bisher endgültig belegt werden.

4.5 Ausblick

Während neue Studien weitere Erkenntnisse liefern, die langsam ein besseres Bild des Vorkommens und der Funktionen von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda vermitteln, existieren noch immer viele unbeantworteten Fragen. Allen voran, womit das Vorkommen von Hämocyanin innerhalb der Hexapoda korreliert. Dies gilt besonders für Taxa die sich in ihrer Lebensweise und ihrer Habitatwahl sehr ähneln und dennoch nicht alle ein Vorkommen von Hämocyanin aufweisen. So würde in den Protura und Diplura ein Hämocyanin-vorkommen zunächst naheliegend erscheinen, da sie, wie die meisten Collembola, in oder auf dem Boden leben und, im Falle der Protura, viele Arten über kein Tracheensystem verfügen (Fountain & Hopkin, 2005; Nicker et al., 2013). Trotzdem deutet alles darauf hin, dass Hämocyanin in diesen Ordnungen verloren ging (Pick et al., 2009a; Burmester, 2015). Ähnliches gilt auch für die Ephemeroptera und Odonata, die wie die Plecoptera über einen überwiegend aquatischen Lebenszyklus und sehr lang andauernde Juvenilstadien verfügen. Basierend auf diesen Ähnlichen in der Physiologie und Ökologie der Tiere wäre zu vermuten, dass die Ephemeroptera und Odonata ebenfalls über Hämocyanin verfügen. Dennoch fehlt Hämocyanin in den Ephemeroptera und Odonata nachweislich, während die Plecoptera es in sämtlichen Entwicklungsstadien exprimieren (Hagner-Holler et al., 2004; Pick et al., 2009a; Burmester, 2015). Während somit klar ist, dass es zum mehrfachen, unabhängigen Verlust von Hämocyanin in den Hexapoda kam, stellt sich umso mehr die Frage worin sich die Spezies voneinander unterscheiden, so dass es zu diesem unterschiedlichen Bedarf für ein respiratorisches Protein kommt. Sicher ist, dass Hämocyanin in den Collembola eine respiratorische Funktion in adulten Tieren übernimmt. Erst später kam es in höher entwickelten Insekten zu einem Wandel der Funktion, hin zur Versorgung der Embryonen. Um den evolutiven Zeitpunkt dieses Funktionswechsels in etwa zu bestimmen, sollten funktionelle Untersuchungen an den Archaeognatha, Zygentoma und Dermaptera durchgeführt werden. Um darüber hinaus zu klären, ob die Funktion von Hämocyanin in höheren Insekten tatsächlich auf die Versorgung der Embryonen beschränkt ist, oder, wie im Falle von *Hierodula membranacea* angenommen, auch andere Funktionen erfüllt, sollten auch die Mantophasmatodea, Phasmatodea und Isoptera funktionell untersucht werden. Dabei erscheinen *knockdown*-Versuche, wie von Chen et al. (2015) durchgeführt, als das am besten geeignete Mittel, um diese Untersuchungen durchzuführen.

5. Literatur

- Amore, V. & Fochetti, R. (2009):** Present knowledge on the presence of hemocyanin in stoneflies (Insecta: Plecoptera). *Aquatic Insects* 31:577-583
- Andersen, C. L., Ledet-Jensen, J., Ørntoft, T. (2004):** Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder - and colon-cancer data-sets. *Cancer Research* 64:5245-5250
- Aquilera, F., McDougall, C., Degnan, B. M. (2013):** Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evolutionary Biology* 13:96
- Ashida, M. & Yoshida, H. (1988):** Limited proteolysis of prophenoloxidase during activation by microbial products in insect plasma and effect of phenoloxidase on electrophoretic mobilities of plasma proteins. *Insect Biochemistry* 18:11-19
- Aspán, A. & Söderhäll, K. (1991):** Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochemistry* 21:363-373
- Aspán, A., Huang, T.-S., Cerenius, L., Söderhäll, K. (1995):** cDNA cloning of prophenoloxdiase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:939-943
- Azad, P., Ryu, J., Haddad, G. G. (2011):** Distinct role of Hsp70 in *Drosophila* hemocytes during severe hypoxia. *Free Radical Biology & Medicine* 51:530-538
- Baltimore, D. (1970):** RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211
- Barnabas, J., Schwartz, R. M., Dayhoff, M. O. (1982):** Evolution of major metabolic innovations in the Precambrian. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 12:81-91
- Barnes, L. D., Kuehn, G. D., Atkinson, D. E. (1971):** Yeast diphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. Purification and some properties. *Biochemistry* 10:3939-3944
- Bartel, D. P. (2004):** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116:281-297
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mossert, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., Green, D. R. (2000):** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2:469-475
- Beresford, P. J., Basinski-Gray, J. M., Chiu, J., K., C., Chadwick, J. S., Aston, W. P. (1997):** Characterization of hemolytic and cytotoxic gallysins: a relationship with arylphorins. *Developmental & Comparative Immunology* 21:253-266
- Berner, R. A., VandenBrooks, J. M., Ward, P. D. (2007):** Oxygen and evolution. *Science* 316:557-558
- Bertani G. (1951):** Studies on lysogenesis - the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62:293-300
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 24:1513-1523

- Blankenship, R. E. & Hartman, H. (1998):** The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 23:94-97
- Bonaventura, J. & Bonaventura, C. (1980):** Hemocyanins: relationships in their structure, function and assembly. *American Zoologist* 20:7-17
- Börner, C. (1906):** Das System der Collembolen, nebst Beschreibung neuer Collembolen des Hamburger naturhistorischen Museums. *Mitteilungen aus dem Naturhistorischen Museum in Hamburg*, 23:147-188
- Bonet, F. (1945):** Sobre la clasificación de los Oncopoduridae (Collembola), con descripción de species nuevas. *Sobretiro de Los Anales De La Escuela Nacional De Ciencias Biologicas III*, 127-153
- Booth, C. E., McMahon, B. R., Pinder, A. W. (1982):** Oxygen uptake and the potentiating effects of increased hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Comparative Physiology B* 148:111-121
- Bouchet, J. Y. & Truchot, J. P. (1985):** Effects of hypoxia and L-lactate on the haemocyanin-oxygen affinity of the lobster, *Homarus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 80:69-73
- Braun, R. P. & Wyatt, G. R. (1996):** Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Journal of Biological Chemistry* 271:31756-31762
- Bretfeld, G. (1986):** Phylogenetic systematics of the higher taxa of Symphyleona Börner, 1901 (Insecta, Entognatha, Collembola). In: Dallai, R. (ed): *Second International Seminar on Apterygota*. University of Siena, Siena, pp. 307–311
- Bridges, C. R. (2001):** Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. *Journal of Experimental Biology* 204:1021-1032
- Burmester, T. (1999):** Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. *Journal of Biological Chemistry* 274:13217-13222
- Burmester, T. (2001):** Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Molecular Biology and Evolution* 18:184-195
- Burmester, T. (2002):** Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B* 172:95-107
- Burmester, T. (2015):** Evolution of respiratory proteins across the Pancrustacea. *Integrative and Comparative Biology* 1-10
- Burmester, T. & Scheller, K. (1992):** Identification of binding proteins involved in the stage-specific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22:211-220
- Burmester, T. & Scheller, K. (1995a):** Ecdysteroid-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25:799-806
- Burmester, T. & Scheller, K. (1995b):** Complete cDNA-sequence of the receptor responsible for arylphorin uptake by the larval fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25:981-989

- Burmester, T. & Scheller, K. (1996):** Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *Journal of Molecular Evolution* 42:713-728
- Burmester, T. & Scheller, K. (1997):** Developmentally controlled cleavage of the *Calliphora* arylphorin receptor and posttranslational action of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone. *FEBS Journal* 247:695-702
- Burmester, T. & Hankeln, T. (2007):** The respiratory proteins of insects. *Journal of Insect Physiology* 53:285-294
- Burnette, W. N. (1981):** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112:195-203
- Canfield, D. E., Poulton, S. W., Narbonne, G. M. (2007):** Late-neoproterozoic deep-ocean oxygenation and the rise of animal life. *Science* 315:92-95
- Cassagnau, P. (1971).** La phylogénie des Collemboles à la lumière des structures endocrines rétro-cérébrales. I Simposio Internacional Zoolofilogenia (pp. 333–349). Salamanca: Facultad de Ciencias, Universidad de Salamanca
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. (2004):** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198:116–126
- Chen, J., Zhang, D., Yao, Q., Zhang, J., Dong, X., Tian, H., Chen, J., Zhang, W. (2010):** Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology* 19:777-786
- Chen, B., Ma, R., Ma, G., Guo, X., Tong, X., Tang, G., Kang, L. (2015):** Haemocyanin is essential for embryonic development and survival in the migratory locust. *Insect Molecular Biology* 24:517–527
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159
- Christiansen, K. (1964):** Bionomics of Collembola. *Annual Review of Entomology* 9:147-178
- Christiansen, K. & Bellinger, P. (1980–1981):** The Collembola of North America, north of the Rio Grande. Grinnell College, Grinnell Iowa, pp. 1-1322
- Chung, S. O., Kubo, T., Natori, S. (1995):** Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of the *Sarcophaga* fat body. *Journal of Biological Chemistry* 270:4624-4631
- Cloud, P. E. (1968):** Atmospheric and hydrospheric evolution on the primitive earth. *Science* 160:729-736
- Colell, A., Ricci, J. E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D.D., Beere, H.M., Green, D.R. (2007):** GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129:983-997
- Craig, E. A. & Gross, C. A. (1991):** Is Hsp70 the cellular thermometer? *Trends in Biochemical Sciences* 16:135-140

- D'Haese, C. A. (2003):** Morphological appraisal of Collembola phylogeny with special emphasis on Poduromorpha and a test of the aquatic origin hypothesis. *Zoologica Scripta* 32:563-586
- Damsgaard, C., Fago, A., Hagner-Holler, S., Malte, H., Burmester, T., Weber, R. E. (2013):** Molecular and functional characterization of hemocyanin of the giant african millipede, *Archispirostreptus gigas*. *Journal of Experimental Biology* 216:1616-1623
- Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J.-C., Huet, D., Pernellet, J.-C., Masson, C. (1998):** Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28:387-397
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012):** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772
- Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E., Terwilliger, N. (2001):** SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *Journal of Biological Chemistry* 276:17796-17799
- Deharveng, L. (2004):** Recent advances in Collembola systematics. *Pedobiologia* 48:415-433
- Dell'Ampio, E., Szucsich, N. U., Carapelli, A., Frati, F., Steiner, G., Steinacher, A., Pass, G. (2008):** Testing for misleading effects in the phylogenetic reconstruction of ancient lineages of hexapods: influence of character dependence and character choice in analyses of 28S rRNA sequences. *Zoologica Scripta* 38:155–170
- Deng, A. L., Torto, B., Hassanali, A., Ali, E. E. (1996):** Effects of shifting to crowded or solitary conditions on pheromone release and morphometrics of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Physiology* 42:771- 776
- Depledge, M. H. & Bjerregaard. P. (1989):** Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 43:207-223
- Destoumieux-Garzóm D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachère, E. (2001):** Crustacean immunity – antifungal peptides are generated from the c-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry* 276:47070-47077
- Dirsh, V. M. (1953):** Morphometrical studies on phases of the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskal). *Anti-Locust Bulletin* 16:1–34
- Dudley, R. (1999):** The biomechanics of insect flight. Form, function, evolution. Princeton University Press, New Jersey, pp. 1-468
- Edington, B. V., Whelan, S. A., Hightower, L. E. (1989):** Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *Journal of Cellular Physiology* 139:219- 228
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001a):** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001b):** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal* 20:2877-6888
- Ellis, P. E. (1959):** Learning and social aggregation in locust hoppers. *Animal Behaviour* 7:91-106

- Ellis, P. E. & Pearce, A. (1962):** Innate and learned behaviour patterns that lead to group formation in locust hoppers. *Animal Behaviour* 10:305-318
- Enderle, U., Käuser, G., Renn, L., Scheller, K., Koolman, J. (1983):** Ecdysteroids in the hemolymph of blowfly are bound to calliphorin. In: Scheller, K. (ed) *The larval serum proteins of insects: function, biosynthesis, genetic*. Thieme, Stuttgart, pp 40-49
- Engel, M. S. & Grimaldi, D. A. (2004):** New light shed on the oldest insect. *Nature* 427:627-630
- Ertas, B., von Reumont, B. M., Wägele, J.-W., Misof, B., Burmester, T. (2009):** Hemocyanin suggests a close relationship of Remipedia and Hexapoda. *Molecular Biology and Evolution* 26:2711-2718
- Everse, J. & Kaplan, N. O. (1973):** Lactate dehydrogenases: structure and function. In: Meister, A. (ed) *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. Volume 37. Cornell University Medical College, New York, pp 61-134
- Faddeeva, A., Studer, R. A., Kraaijeveld, K., Sie, D., Ylstra, B., Mariën, J., op den Camp, H. J. M., Datema, E., den Dunnen, J. T., van Straalen, N. M., Roelofs, D. (2015):** Collembolan transcriptomes highlight molecular evolution of hexapods and provide clues on the adaptation to terrestrial life. *PLOS One* 10: e0130600
- Farquhar, J., Bao, H., Thiemens, M. (2000):** Atmospheric influence of earth's earliest sulfur cycle. *Science* 289:756-758
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998):** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
- Fochetti, R., Belardinelli, M., Guerra, L., Buonocore, F., Fausto, A.M., Caporale, C. (2006):** Cloning and structural analysis of a haemocyanin from the stonefly *Perla grandis*. *Protein Journal* 25:443-454
- Fountain, M. T. & Hopkin, S. P. (2005):** *Folsomia candida* (Collembola): a „standard“ soil Arthropod. *Annual Review of Entomology* 50:201-222
- Fuchs, S. Y., Fried, V. A., Ronai, Z. (1998):** Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene* 17:1483-1490
- Fujii, T., Sakurai, H., Izumi, S., Tomino, S. (1989):** Structure of the gene for the arylphorine-type storage protein SP 2 of *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* 264:11020-11025
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S.-I., Iwanaga, S., Ohnishi, E. (1995):** Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7769-7773
- Gálvez, S. & Gadal, P. (1994):** On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Science* 105:1-14
- Gao, Y. & Luan, Y.-X. (2008):** Phylogenetic relationships of basal Hexapods reconstructed from nearly complete 18S and 28S rRNA gene sequences. *Zoological Science* 25:1139-1145
- Garcia-Pichel, F., Belnap, J., Neuer, S., Schanz, F. (2003):** Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Algological Studies* 109:213-227
- Gething, M.-J. & Sambrook J. (1992):** Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45

- Giribet, G., Edgecombe, G. D. Wheeler, W. C. (2001):** Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413:157-160
- González-Santoyo, I. & Córdoba-Aguilar, A. (2012):** Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142:1-16
- Graham, R. A., Mangum, C. P., Terwilliger, R. C., Terwilliger, N. B. (1983):** The effect of organic acids on oxygen binding of hemocyanin from the crab *Cancer magister*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 74:45-50
- Grimaldi, D. & Engel, M. S. (2005):** Evolution of the insects. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 111-118
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2010):** The Insects. An outline of entomology. Fourth Edition. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 198-201
- Hagner-Holler, S., Schoen, A., Erker, W., Marden, J. H., Rupperecht, R., Decker, H., Burmester, T. (2004):** A respiratory hemocyanin from an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:871-874
- Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhäll, K., Law, J. H. (1995):** Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7764-7768
- Hardie, J. & Lees, A. D. (1985):** Endocrine control of polymorphism and polyphenism. In: Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (ed) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Volume 8 Endocrinology II. Pergamon Press, Oxford, pp. 442-490
- Hayakawa, Y. (1994):** Cellular immunosuppressive protein in the plasma of parasitized insect larvae. *Journal of Biological Chemistry* 269:14536-14540
- Hazes, B., Magnus, K. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. (1993):** Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Science* 2:597-619
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996):** Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994
- Herreid II, C. F. (1980):** Hypoxia in invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 67:311-320
- Hochachka, P. W. (1986):** Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231:234-241
- Hochachka, P. W., Buck, L. T., Doll, C. J., Land, S. C. (1996):** Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9493-9498
- Hopkin, S. P. (1997):** Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press, Oxford, pp. 1-344
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001):** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755
- Huvenne, H. & Smagghe, G. (2010):** Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology* 56:227-235

- Hwang, U. W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C. J., Kim, W. (2001):** Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 413:154-157
- Immesberger, A. & Burmester, T. (2004):** Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily. *Journal of Comparative Physiology B* 174:169-180
- Jaenicke, E., Decker, H., Gebauer, W., Marik, J., Burmester, T. (1999):** Identification, structure, and properties of hemocyanins from diplopod Myriapoda. *Journal of Biological Chemistry* 74:29071-29074
- Jaenicke, E. (2002):** Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen. Dissertation, Universität Mainz
- Johnson, B. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J. (1984):** Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-lactate. *Biochemistry* 23:872-878
- Johnson, B. A., Bonaventura, J., Bonaventura, C. (1987):** Determination of L-lactate binding stoichiometry and differences in allosteric interactions of structurally distinct homohexamers from *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* 916:376-380
- Karim, S., Kenny, B., Troiano, E., Mather, T. N. (2008):** RNAi-mediated gene silencing in tick synganglia: A proof of concept study. *BMC Biotechnology* 8:30
- Kasting, J. F. & Siefert, J. L. (2002):** Life and the evolution of earth's atmosphere. *Science* 296:1066-1068
- Kawabata, T., Yasuhara, Y., Ochiai, M., Matsuura, S., Ashida, M. (1995):** Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: A copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7774-7778
- Kempter, B. (1983):** Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*. *Naturwissenschaften* 70:255-256
- Kobert, R. (1903):** Ueber Hamocyanin nebst einigen Notizen über Hamerythrin. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 98: 411-433
- Köhler, H.-R., Belitz, B., Eckwert, H., Adam, R., Rahman, B., Trontelj, P. (1998):** Validation of Hsp70 stress gene expression as a marker of metal effects in *Derocheras reticulatum* (Pulmonata): Correlation with demographic parameters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:2246-2253
- Komai, Y. (1998):** Augmented respiration in a flying insect. *Journal of Experimental Biology* 201:2359-2366
- Krogh, A. (1920):** Studien über Tracheenrespiration. II. Über Gasdiffusion in den Tracheen. *Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 179:95-120
- Kukulová-Peck, J. (1991):** Fossil history and evolution of hexpod structures. In: Naumann, I. D. (ed) *The insects of Australia*. Melbourne University Press, Melbourne, pp 141-179
- Kurtz, D. M. Jr (1999):** Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. *Essays in Biochemistry* 34:85-100
- Kusche, K. & Burmester, T. (2001):** Diplopod hemocyanin sequence and the phylogenetic position of the Myriapoda. *Molecular Biology and Evolution* 18:1566-1573

- Kusche, K., Ruhberg, H., Burmester, T. (2002):** A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:10545–10548
- Kültz, D. (2003):** Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology* 206:3119-3124
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lanyon, S. M. (1988):** The stochastic mode of molecular evolution: what consequences for systematic investigations? *The Auk* 105:565–573
- Law, J. H. & Wells, M. A. (1989):** Insects as biochemical models. *Journal of Biological Chemistry* 264:16335-16338
- Lee, S. Y., Lee, B. L., Söderhäll, K. (2003):** Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry* 278:7927-7933
- Lee, S. Y., Lee, B. L., Söderhäll, K. (2004):** Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322:490-496
- Levenbook, L. & Bauer, A. C. (1984):** The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochemistry* 11:77-86
- Li, X., Zhang, M., Zhang, H. (2011):** RNA Interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS ONE* 6:e17788.
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988):** The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* 22:631-677.
- Linzen, B., Soeter, N. M., Riggs, A. F., Schneider, H.-J., Schartau, W., Moore, M. D., Yokota, E., Behrens, P. Q., Nakashima, H., Takagi, T., Nemoto, T., Vereijken, J. M., Bak, H. J., Beintema, J. J., Volbeda, A., Gaykema, W. P. J., Hol, W. G. J. (1985):** The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229:519-524
- Loewe, R. (1978):** Hemocyanin in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Journal of Comparative Physiology B* 128:161-168
- Luo, Y., Wang, X., Wang, X., Yu, D., Chen, B., Kang, L. (2013):** Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology* 22:574-583
- Maestro, J. L. & Bellés, X. (2006):** Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the german cockroach. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 62:73–79
- Magee, J., Kraynack, N., Massey, H. C., Telfer, W. H. (1994):** Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 25:137-157

- Magnus, K. A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Hol, W. G. J. (1994):** Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 19:302-309
- Maldonado, H., Levin, L., Barros Pita, J. C. (1967):** Hit distance and the predatory strike of the praying mantis. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 56:237-257
- Mangum, C. P. (1983):** Oxygen transport in blood. In: Mantel, L. H., Bliss, D. E. (ed) *The biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp. 373-429
- Mangum, C. P. (1985):** Oxygen transport in invertebrates. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 248:505-514
- Mangum, C. P., Scott, J. L., Black, R. E. L., Miller, K. I., van Holde, K. E. (1985):** Centipedal hemocyanin: its structure and its implications for arthropod phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:3721-3725
- Markert, C. L. (1984):** Lactate dehydrogenase. *Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. Cell Biochemistry and Function* 2:131-134
- Markl, J. (1986):** Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biological Bulletin* 171:90-115
- Markl, J., Stöcker, W., Runzler, R. und Precht, E. (1986):** Immunological correspondences between the hemocyanin subunits of 86 arthropods: evolution of a multigene protein family. In: Linzen, B. (ed) *Invertebrate oxygen carriers*. Springer, Heidelberg, pp. 281-292
- Markl, J., Burmester, T., Decker, H., Savel-Niemann, A., Harris, J. R., Süling, M., Naumann, U., Scheller, K. (1992):** Quaternary and subunit structure of *Calliphora* arylphorin as deduced from electron microscopy, electrophoresis, and sequence similarities with arthropod hemocyanin. *Journal of Comparative Physiology B* 162:665-680
- Markl, J. & Decker, H. (1992):** Molecular Structure of the arthropod hemocyanins. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 13:325-376
- Marxen, J. C., Pick, C., Kwiatkowski, M. K., Burmester, T. (2013):** Molecular characterization and evolution of haemocyanin from the two freshwater shrimps *Caridina multidentata* (Stimpson, 1860) and *Atyopsis moluccensis* (De Haan, 1849). *Journal of Comparative Physiology B* 183:613-624
- Marxen, J. C., Pick, C., Oakley, T. H., Burmester, T. (2014):** Occurrence of hemocyanin in ostracod crustaceans. *Journal of Molecular Evolution* 73:3-11
- Maschat, F., Dubertret, M.-L., Théron, P., Clavierie J.-M., Lepesant, J.-A. (1990):** Structure of the ecdysone-inducible P1 gene of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology* 214:359-372.
- Massoud, Z. (1976):** Essai de synthèse sur la phylogénie des Collemboles. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 13: 241–252.
- Meusemann, K., von Reumont, B. M., Simon, S., Roeding, F., Strauss, S., Kück, P., Ebersberger, I., Walz, M., Pass, G., Breuers, S., Achter, V., von Haeseler, A., Burmester, T., Hadrys, H., Wägele, J. W., Misof, B. (2010):** A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. *Molecular Biology and Evolution* 27:2451-2464

- Min, K., Kang, J., Lee, J. (2010):** A modified feeding RNAi method for simultaneous knock-down of more than one gene in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechniques* 48:229-232
- Minárik, P., Tomášková, N., Kollárová, M., Antalík, M. (2002):** Malate dehydrogenases - structure and function. *General Physiology and Biophysics* 21:257-265
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R. G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A. J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., Blanke, A., Berger, S., Böhm, A., Buckley, T. R., Calcott, B., Chen, J., Friedrich, F., Fukui, M., Fujita, M., Greve, C., Grobe, P., Gu, S., Huang, Y., Jermini, L. S., Kawahara, A. Y., Krogmann, L., Kubiak, M., Lanfear, R., Letsch, H., Li, Y., Li, Z., Li, J., Lu, H., Machida, R., Mashimo, Y., Kapli, P., McKenna, D. D., Meng, G., Nakagaki, Y., Navarrete-Heredia, J. L., Ott, M., Ou, Y., Pass, G., Podsiadlowski, L., Pohl, H., von Reumont, B. M., Schütte, K., Sekiya, K., Shimizu, S., Slipinski, A., Stamatakis, A., Song, W., Su, X., Szucsich, N. U., Tan, M., Tan, X., Tang, M., Tang, J., Timelthaler, G., Tomizuka, S., Trautwein, M., Tong, X., Uchifune, T., Walz, M. G., Wiegmann, B. M., Wilbrandt, J., Wipfler, B., Wong, T. K. F., Wu, Q., Wu, G., Xie, Y., Yang, S., Yang, Q., Yeates, D. K., Yoshizawa, K., Zhang, Q., Zhang, R., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, C., Zhou, L., Ziesmann, T., Zou, S., Li, Y., Xu, X., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Kjer, K. M., Zhou, X. (2014):** Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346:763-767
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I., Massie, B. (2000):** The Chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 20:7146-7159
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987):** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350
- Musrati, R. A., Kollárová, M., Mernik, N., Mikulášová, D. (1998):** Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General Physiology and Biophysics* 17:193-210
- Nagai, T. & Kawabata, S. (2000):** A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *Journal of Biological Chemistry* 275:29264-29267
- Nagai, T., Osaki, T., Kawabata, S. (2001):** Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 276:27168-27170
- Nickerl, J., Helbig, R., Schulz, H.-J., Werner, C., Neinhuis, C. (2013):** Diversity and potential correlations to the function of Collembola cuticle structures. *Zoomorphology* 132:183-195
- Paul, R. J., Bergner, B., Pfeffer-Seidl, A., Decker, H., Efinger, R., Storz, H. (1994):** Gas transport in the haemolymph of arachnids. I. Oxygen transport and the physiological role of haemocyanin. *Journal of Experimental Biology* 188:25-46
- Paul, R. J., Colmorgen, M., Hüller, S., Tyroller, F., Zinkler, D. (1997):** Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. *Journal of Comparative Physiology B* 167:399-408
- Pelham, H. R. B. (1986):** Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46:959-961

- Pener, M. P., Ayali, A., Golenser, E. (1997):** Adipokinetic hormone and flight fuel related characteristics of density-dependent locust phase polymorphism: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 117:513-524
- Pener, M. P. & Yerushalmi, Y. (1998):** The physiology of locust phase polymorphism: an update. *Journal of Insect Physiology* 44:365-377
- Peter, M. G. & Scheller, K. (1991):** Arylphorins and the integument. In: Retnakaran A., Binnington, K. (eds) *The physiology of insect epidermis*. Intaka, North Carolina, pp. 115-124
- Philip, B. & Oliva, M. D. (1970):** Lactic acidosis. *American Journal of Medicine* 48:209-225
- Pick, C., Hagner-Holler, S., Burmester, T. (2008):** Molecular characterization of hemocyanin and hexamerin from the firebrat *Thermobia domestica* (Zygentoma). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38:977-983
- Pick, C., Schneuer, M., Burmester, T. (2009a):** The occurrence of hemocyanin in Hexapoda. *FEBS Journal* 276:1930-1941
- Pick, C., Schneuer, M., Burmester, T. (2009b):** Ontogeny of hemocyanin in the ovoviviparous cockroach *Blattella germanica* suggests an embryo-specific role in oxygen supply. *Journal of Insect Physiology* 56:455-460
- Pick, C., Scherbaum, S., Hegedüs, E., Meyer, A., Saur, M., Neumann, R., Markl, J., Burmester, T. (2014):** Structure, diversity and evolution of myriapod hemocyanins. *FEBS Journal* 281:1818-1833
- Pinnow, P., Fabrizius, A., Pick, C., Burmester, T. (2015):** Identification and characterisation of hemocyanin of the fish louse *Argulus* (Crustacea: Branchiura). *Journal of Comparative Physiology B* 1-8
- Ponge, J.-F. (1993):** Biocenoses of Collembola in atlantic temperate grass-woodland ecosystems. *Pedobiologia* 37:223-244
- Rahman, M. M., Bosch, L. V., Baggerman, G., Clynen, E., Hens, K., Hoste, B., Meylaers, K., Vercammen, T., Schoofs, L., De Loof, A., Breuer, M. (2002):** Search for peptidic molecular markers in hemolymph of crowd-(gregarious) and isolated-reared (solitary) desert locusts, *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 23:1907-1914
- Rasmussen, R. (2001):** Quantification on the light cycler. In: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (eds). In: *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications*. Springer, Heidelberg, pp. 21-34
- Ravichandran, S., Seres, T., Moriguchi, T., Thomas, J. A., Johnston Jr., R. B. (1994):** S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 269:25010-25015
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. (2010):** *Campbell Biology*. Ninth Edition. Benjamin Cummings / Pearson, Boston, pp. 897-928
- Rehm, P., Pick, C., Borner, J., Markl, J., Burmester, T. (2012):** The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins. *BMC Evolutionary Biology* 12:19

- Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R. (1979):** Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:3116-3120
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., Khvorova, A. (2004):** Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22:326-330
- Ritossa, F. (1962):** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571–573
- Rodgers, D. J. & Kitching, R. L. (1998):** Vertical stratification of rainforest collembolan (Collembola: Insecta) assemblages: description of ecological patterns and hypotheses concerning their generation. *Ecography* 21:392-400.
- Rogers A. J., Svärd, S. G., Tovar, J., Clarks, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D., Sogin, M. L. (1998):** A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia* - evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:229-234
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003):** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- Rusek, J. (1998):** Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodiversity and Conservation* 7:1207-1219
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Salmon, J. T. (1964):** An index to the Collembola. *Royal Society of New Zealand Bulletin* 7:1–651
- Sánchez, D., Ganfornina, M. D., Gutiérrez, G., Bastiani, M. J. (1998):** Molecular Characterization and phylogenetic relationships of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects? *Molecular Biology and Evolution* 15:415-426
- Sanders, N. K. & Childress, J. J. (1992):** Specific effects of thiosulphate and L-lactate on hemocyanin-O₂ affinity in a brachyuran hydrothermal vent crab. *Marine Biology* 113:175-180
- Sanger, F., Nickeln, S., Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467
- Scheller, K., Fischer, B., Schenkel, H. (1990):** Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: Hagedorn, H. H. (ed) *Molecular insect science*. Plenum, New York, pp. 155-162
- Schneider, C., Cruaud, C., D'Haese, C. A. (2011):** Unexpected diversity in Neelipleona revealed by molecular phylogeny approach (Hexapoda, Collembola). *Soil Organisms* 83:383-398
- Seidler, N. W. (2013):** GAPDH: Biological Properties and Diversity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 985. Springer, Heidelberg, pp. 1-295
- Söderhäll, K. & Cerenius, L. (1998):** Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28

- Song, J., Takeda, M., Morimoto, R. I. (2001):** Bag1–Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nature Cell Biology* 3:276-282
- Staempfli, C., Becker-Van Slooten, K., Tarradellas, J. (2002):** Hsp70 instability and induction by a pesticide in *Folsomia candida*. *Biomarkers* 7:68-79
- Tavaré, S. (1986):** Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences 17:57-86
- Telfer, W. H. & Kunkel, J. G. (1991):** The function and evolution of insect storage hexamers. *Annual Review of Entomology* 36:205-228
- Temin, H. M. & Mizutani S. (1970):** RNA-dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213
- Terwilliger, N. B. (1998):** Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *Journal of Experimental Biology* 201:1085-1098
- Terwilliger, N. B. (2012):** Gene expression profile, protein production, and functions of cryptocyanin during the crustacean molt cycle. *Invertebrate Reproduction & Development* 56:229-235
- Terwilliger, N. B., Dangott, L., Ryan, M. (1999):** Cryptocyanin, a crustacean molting protein: evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2013-2018
- Terwilliger, N. B., Ryan M. C., Towle, D. (2005):** Evolution of novel functions: cryptocyanin helps build new exoskeleton in *Cancer magister*. *Journal of Experimental Biology* 208:2467- 2474
- Timmermans, M. J. T. N., Roelofs, D., Mariën, van Straalen, N. M. (2008):** Revealing pancrustacean relationships: Phylogenetic analysis of ribosomal protein genes places Collembola (springtails) in a monophyletic Hexapoda and reinforces the discrepancy between mitochondrial and nuclear DNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 8:83
- Timmons, L. & Fire, A. (1998):** Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., Sawa, A. (2011):** The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling* 23:317-323
- Truchot, J.-P. (1980):** Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. *The Journal of Experimental Zoology* 214:205-208
- Ueno, K. & Natori, S. (1982):** Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone fort he selective incorporation of storage protein in *Sarcophaga peregrina* larvae. *Insect Biochemistry* 12:185-191
- Ueno, K., Ohsawa, F., Natori, S. (1983):** Identification and activation of storage protein receptor of *Sarcophaga peregrina* fat body by 20-hydroxyecdysone. *Journal of Biological Chemistry* 258:12210-12214
- Ueno, K. & Natori, S. (1984):** Identification of storage protein receptor and its precursor in the fat body membrane of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biological Chemistry* 259:12107-12111.
- Uglow, R. F. (1969a):** Haemolymph protein concentrations in portunid crabs - I. Studies on adult *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 30:1083-1090
- Uglow, R. F. (1969b):** Haemolymph protein concentrations in portunid crabs - II. The effect of imposed fasting on *Carcinus Maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 31:959-967

- Uvarov, B. P. (1921):** A revision of the genus *Locusta*, L. (= *Pachytylus*, Fieb.) with a new theory as to the periodicity and migrations of locusts. *Bulletin of Entomological Research* 12:135–163.
- Van Holde, K. E. & Miller, K. I. (1995):** Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry* 47:1-81
- van Holde, K. E., Miller, K. I., Decker, H. (2001):** Hemocyanins and invertebrate evolution. *Journal of Biological Chemistry* 276:15563-15566
- Vinogradov, S. N. (1985):** The Structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocruorins). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 82:1-15
- Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Schweikardt, T., Decker, H., Burmester, T. (2000):** Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. *Journal of Biological Chemistry* 275:39339-39344
- Volbeda, A., Hol, W. G. J. (1989):** Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 209:249-279
- von Reumont, B. M., Meusemann, K., Szucsich, N. U., Dell'Ampio, E., Gowri-Shankar, V., Bartel, D., Simon, S., Letsch, H. O., Stocsits, R. R., Luan, Y.-X., Wägele, J. W., Pass, G., Hadrys, H., Misof, B. (2009):** Can comprehensive background knowledge be incorporated into substitution models to improve phylogenetic analyses? A case study on major arthropod relationships. *BMC Evolutionary Biology* 9:119
- Walshe, D. P., Lehane, S. M., Lehane, M. J., Haines, L. R. (2009):** Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology* 18:11-19
- Ward, P., Labandeira, C., Laurin, M., Berner, R. A. (2006):** Confirmation of Romer's Gap as a low oxygen interval constraining the timing of initial arthropod and vertebrate terrestrialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:16818-16822
- Weber, R. E. & Vinogradov, S. N. (2001):** Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiological Reviews* 81:569-628
- Weis-Fogh, T. (1964):** Diffusion in insect wing muscle, the most active tissue known. *Journal of Experimental Biology* 41:229-256
- Westneat, M. W., Betz, O., Blob, R. W., Fezzaa, K., Cooper, W. J., Lee, W.-K. (2003):** Tracheal respiration in insects visualized with synchrotron x-ray Imaging. *Science* 299:558-560
- Wheeler, W. C. (1990):** Nucleic acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics* 6:363–367
- Williams, N. E. & Nelsen, E. M. (1997):** HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of *Tetrahymena*. *Journal of Cell Science* 110:1665-1672
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. (2005):** *Environmental physiology of animals*. Second Edition. Blackwell, Oxford, pp. 1-768
- Willot, E., Wang, X.-Y., Wells, M. A. (1989):** cDNA and gene sequence of *Manduca sexta* Arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein. *Journal of Biological Chemistry* 264:19052-19059
- Winnacker, E. L. (1987):** Expression vectors in prokaryotes. From genes to clones. VCH, Weinheim pp. 263-265

- Wise, K. A. J. (1965):** Collembola (Springtails). In: Gressitt, J. L. (ed) Antarctic Research Series. Volume 10. Entomology of Antarctica. Horn-Shafer Company, Baltimore, pp 123-145
- Xie, W. & Luan Y.-X. (2014):** Evolutionary implications of dipluran hexamerins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 46:17-24
- Xiong, Y., Gao, Y., Yin, W.-y., Luan, Y.-X. (2008):** Molecular phylogeny of Collembola inferred from ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:728-735
- Yin, H., Guan, N., Dong, L., Yue, Q., Yin, X., Zhang, D. (2011):** Initial analysis of the hemocyanin subunit type 1 (Hc1 gene) from *Locusta migratoria manilensis*. *Molecular Biology Reports* 39:3305-3310
- Yosii, R. (1977):** Critical check list of the Japanese species of Collembola. *Contributions from the Biological Laboratory, Kyoto University* 25:141–170
- Zatta, P. (1984):** Zinc transport in the haemolymph of *Carcinus maenas* (crustacea: decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 64:801-807
- Zeis, B., Nies, A., Bridges, C. R., Grieshaber, M. K. (1992):** Allosteric modulation of haemocyanin oxygenaffinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Specific and additive effects on haemocyanin oxygenaffinity. *Journal of Experimental Biology* 168:93-110
- Zhao, H. W. & Haddad, G. G. (2011):** Review: hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Placenta* 32, Supplement B, *Trophoblast Research* 25:104-108
- Zhou, X., Oi, F. M., Scharf, M. E. (2006):** Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:4499-4504
- Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M., Scharf, M. E. (2008a):** RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38:805– 815
- Zhou, D., Xue, J., Lai, J. C. K., Schork, N. J., White, K. P., Haddad, G. G. (2008b):** Mechanisms Underlying Hypoxia Tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a Metabolic Switch. *PLoS Genet* 4: e1000221
- Zhou, D., Visk, D. W., Haddad, G. G. (2009):** *Drosophila*, a Golden Bug, for the Dissection of the Genetic Basis of Tolerance and Susceptibility to Hypoxia. *Pediatric Research* 66:239–247

6. Anhang

6.1 IUPAC Codes für Nukleotide und Aminosäuren

Tabelle 6.1: IUPAC Abkürzungscodes für Nukleotide

Abkürzung	Entsprechende Nukleotide
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Tabelle 6.2: IUPAC Abkürzungscodes für Aminosäuren

Abkürzung	Dreibuchstabencode	Entsprechende Aminosäuren
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

6.2 DNA- und Proteinmarker

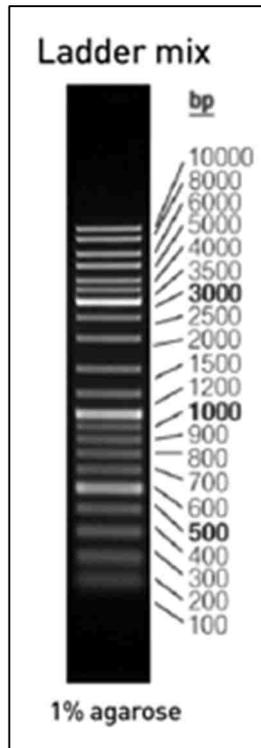


Abbildung 6.1: GeneRuler DNA Ladder Mix (100 -10.000 bp; Thermo Scientific, Schwerte)

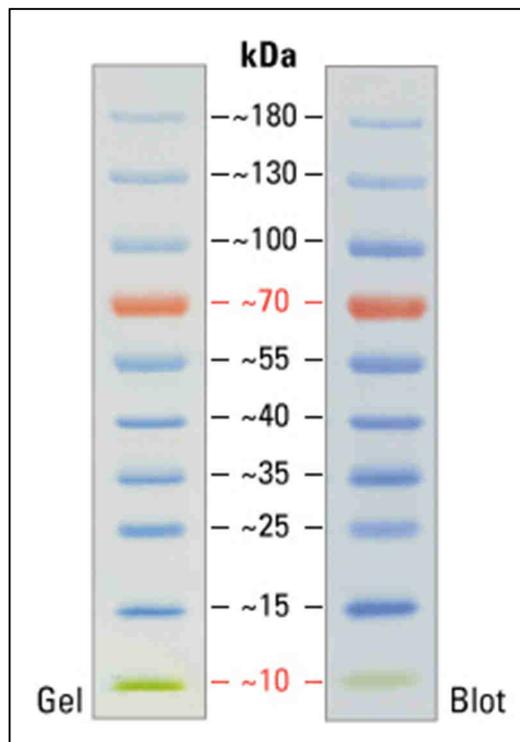


Abbildung 6.2: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Schwerte)

6.3 Vektorkarten

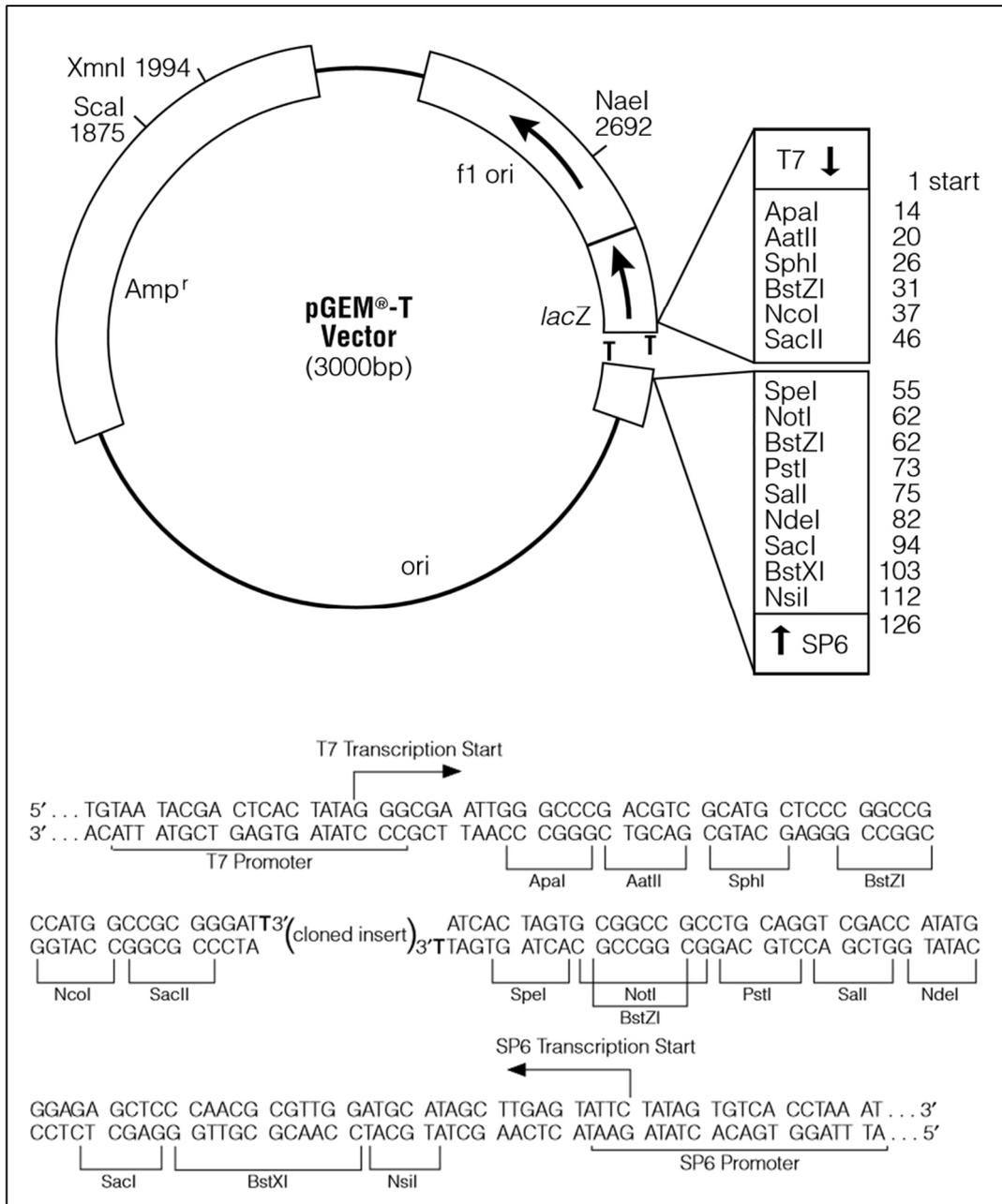


Abbildung 6.3: Vektorkarte und Sequenz des pGEM-T Vektors (Promega, Mannheim).

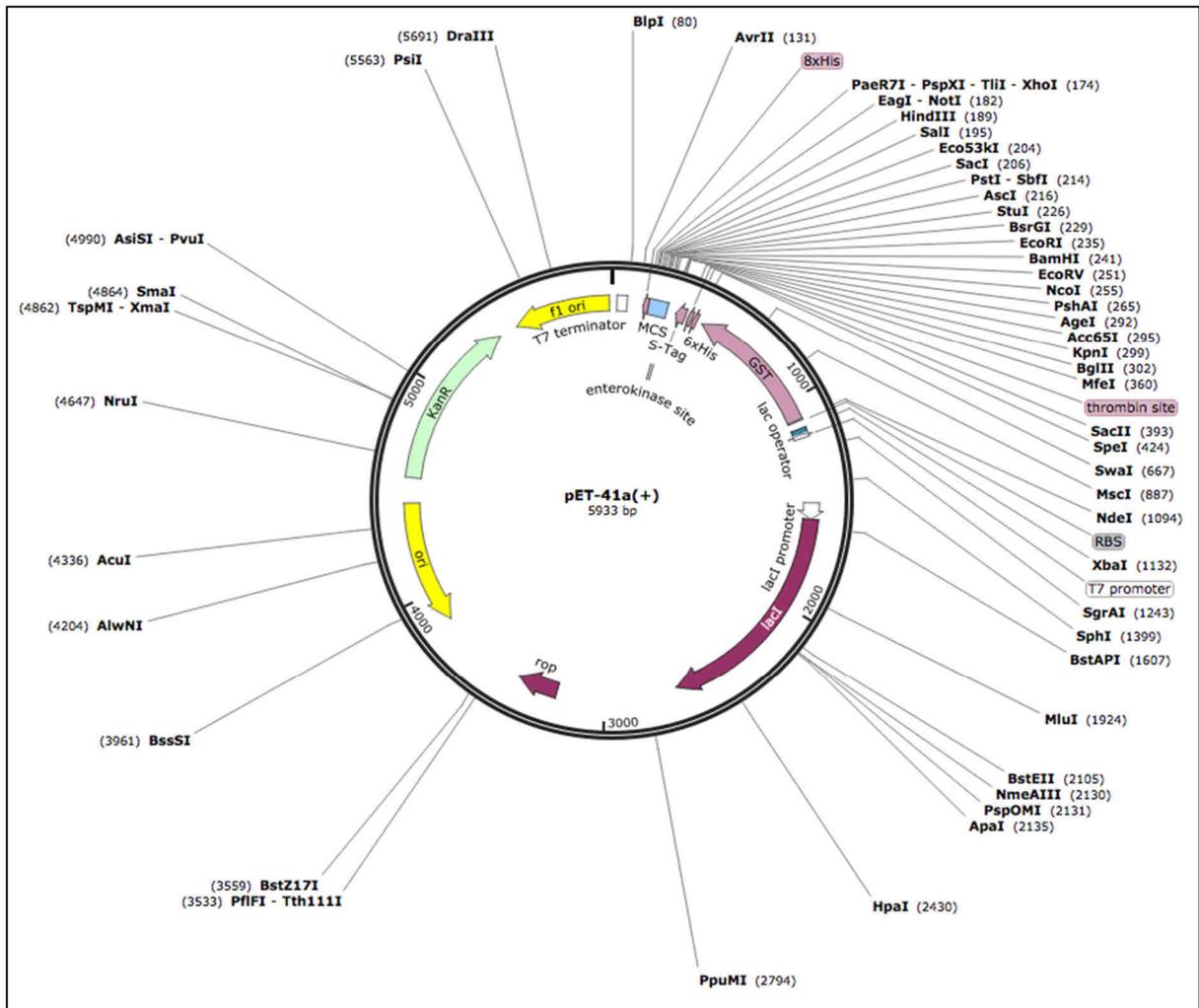


Abbildung 6.4: Vektorkarte des pet-41a(+) Vektors (Novagen, Schwalbach).

6.4 Primer

Tabelle 6.3: Übersicht der verwendete Standardprimer.

Bezeichnung	Gen	Organismus	Sequenz 5'-3'
Hc-D1-f	Hemocyanin	Arthropoda	GTNGCGGTYTCRAARTGYTCCAT
Hc-D1-r			ATGGAYTTYCCNTTYTGGTGGAA
Fca-COI-f	Cytochrom-C-Oxidase I	<i>Folsomia candida</i>	GGTCAACAAAATCATAAAGATATTGG
Fca-COI-r			TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
18S-L0001	18SRNA	<i>Folsomia candida</i>	TACCTGGTTGATCCCTGCCAGT
18S-R1100	(Nukleotid1–1100)	<i>Folsomia candida</i>	CGACGATCCAAGAAATTCAC
18S-L0922	18SRNA	<i>Folsomia candida</i>	AATTGGAGTGCTCAAAGCAGGC
18S-R2090	(Nukleotid922–2090)	<i>Folsomia candida</i>	CCTACGGAAAACCTTGTTACG
Fca-ActB-deg-f	β -Actin	<i>Folsomia candida</i>	TGGCAYCAYACNTTYTAYAA
Fca-ActB-deg-r			GCDATNCCNGGRTACATNGT
Fca-Tub-deg-f	β -Tubulin	<i>Folsomia candida</i>	TGGGCNAARGGNCAYTAYAC
Fca-Tub-deg-r			GGRTCRCANGCNGCCATCAT
Fca-Cyc-deg-f	Cyclophilin A	<i>Folsomia candida</i>	CCNMNGTNTTYTYGAYAT
Fca-Cyc-deg-r			GCNGTNGTDATRAARAAYTG
Fca-Rplp0-deg-f	Ribosomal protein, large, P0	<i>Folsomia candida</i>	ATGGGNAARAAYACNATG
Fca-Rplp0-deg-r			GCRAAYTTNSWNGGRTCYTT
Fca-LDH-f	Laktat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	TTGAATGTTTCTCCGTCATCTG
Fca-LDH-r			GAACCTTAACCCCTTCTGCACTGA
Fca-IDH-f	Isocitrat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	CCCGTCGTGGAGATGGAT
Fca-IDH-r			CCCCCTAGAATATTTCTCAACGTG
Fca-MDH-f	Malat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	TGGGGTAATCACAGCTTACACA
Fca-MDH-r			TGCTTCTTCGCGTTCTTCAA
Lmi-COI-deg-f	Cytochrom-C-Oxidase I	<i>Locusta migratoria</i>	GCWCCAGATATAGCWTTTCCACG
Lmi-COI-deg-r			GATATARAATTGGRTCACCYCCTCC
Lmi-Hc1-f	Hemocyanin 1	<i>Locusta migratoria</i>	TTACAGGAACGATCCGCAA
Lmi-Hc1-r			CCCAGCATGATGTGTCCGTA
Lmi-Cyc-deg-f	Cyclophilin A	<i>Locusta migratoria</i>	TTGTGATTGAGCTACGTGCC
Lmi-Cyc-deg-r			CATGCCCTCAACAACACTGACCC
Lmi-Actb-deg-f	β -Actin	<i>Locusta migratoria</i>	TGGCAYCAYACNTTYTAYAA
Lmi-Actb-deg-r			ACNATGTAYCCNGGNATGHGC
Hme-Hc1-f	Hemocyanin 1	<i>Hierodula membranacea</i>	CTTCCCTGGTCTGAAAGTCTGTA
Hme-Hc1-r			GTGAAGAAGTGGTCCCTCATCGA
Hme-Hc2-f	Hemocyanin 2	<i>Hierodula membranacea</i>	TCAGCAGAGACACGGTATTTCAG
Hme-Hc2-r			CTGTTCCATTCCAGAGGTTGCA

Tabelle 6.4: Übersicht der verwendeten qPCR-Primer.

Bezeichnung	Gen	Organismus	Sequenz5'-3'
qPCR-Fca-Hc-f	Hemocyanin 2	<i>Folsomia candida</i>	TGACATGAAGCACTACGAACTCCG
qPCR-Fca-Hc-r			TAGAATCCGCCGAAGACTCCAT
qPCR-Fca-ActB-f	β -Actin	<i>Folsomia candida</i>	CATGCCATCCTTCGTTTGGACTTG
qPCR-Fca-ActB-r			GCGACATAGCACAACCTTCTCCTTG
qPCR-Fca-Tub-f	β -Tubulin	<i>Folsomia candida</i>	AACCTACTGCATCGACAATGAGGC
qPCR-Fca-Tub-r			TTGACCAGGGAATCGGAGACAAGT
qPCR-Fca-Cyc-f	Cyclophilin A	<i>Folsomia candida</i>	GGTCTACGTTCCACCGAGTCATC
qPCR-Fca-Cyc-r			GGTCCAGCATTAGCCATTGACATG
qPCR-Fca-Rplp0-f	Ribosomal protein, large, P0	<i>Folsomia candida</i>	GGACCATCCGAAGCAACCTTGT
qPCR-Fca-Rplp0-r			AACGTTCCCTGACTCCAGCCATA
qPCR-Fca-LDH-f	Laktat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	CCGACTAAGCGAATTACACCCTGACA
qPCR-Fca-LDH-r			CGTAAGCACTGTCCATTACTTGACCA
qPCR-Fca-IDH-f	Isocitrat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	TCAAGTTACTTTTGATGCCGCTCA
qPCR-Fca-IDH-r			CCTCGTCAGGCGTTATTGTGCG
qPCR-Fca-MDH-f	Malat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	ACGGTGTGGTCAAGAAAGGAAACGAC
qPCR-Fca-MDH-r			TGCAGCAGACATTGCGGAAGACAT
qPCR-Fca-GAPDH-f	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	GCCATTAGCCAAAGTCATCAACGA
qPCR-Fca-GAPDH-r			GCAACACCACGACCATCTCG
qPCR-Fca-HSP70-f	Heat shock protein 70	<i>Folsomia candida</i>	CAAGCGAACTCTCTCCAGCTCTAC
qPCR-Fca-HSP70-r			AAGATCAGCATTAGCTCCTCGA
qPCR-Lmi-Hc1-f	Hemocyanin 1	<i>Locusta migratoria</i>	GCCTCAACCATAAGCCGTTCTGT
qPCR-Lmi-Hc1-r			CGATCTCGACGATGTAGTGCCTC
qPCR-Lmi-Hc2-f	Hemocyanin 2	<i>Locusta migratoria</i>	TTCACCACATCTCCGACACCTA
qPCR-Lmi-Hc2-r			GACGAATGTTGTCTGCCCACTTC
qPCR-Lmi-Cyc-f	Cyclophilin A	<i>Locusta migratoria</i>	TGGTTTGTAAAGTCACCACCTTGG
qPCR-Lmi-Cyc-r			TAAAACCTGCCGAGAATTTTAGAGCC
qPCR-Lmi-Actb-f	β -Actin	<i>Locusta migratoria</i>	CCATTGAACCCAAAGGCAAACAGG
qPCR-Lmi-Actb-r			CGACACACCATCACCAGAATCCAA
qPCR-Lmi-bTub-f	β -Tubulin	<i>Locusta migratoria</i>	TCGCCCCAAGGTATCAGACACTG
qPCR-Lmi-bTub-r			CGTGCGGAAGCAAATGTCGTA
qPCR-Hme-Hc1-f	Hemocyanin 1	<i>Hierodula membranacea</i>	CATTGACCTGCTGAACGCACTA
qPCR-Hme-Hc1-r			GTGAATGGCTGATGGTTGAGGC
qPCR-Hme-Hc2-f	Hemocyanin 2	<i>Hierodula membranacea</i>	TTCTGCATCGTCCAGATTGCCG
qPCR-Hme-Hc2-r			ATGCCTCCCTGACAACATCCGT
qPCR-Hme-EF1a-f	Elongation factor 1-alpha	<i>Hierodula membranacea</i>	GGAGCATTCCGACAAGATGAGCT
qPCR-Hme-EF1a-r			CCTGAAGAGGAAGACGTAGAGGC

Tabelle 6.5: Übersicht der verwendeten Primer zur Herstellung von dsRNA. Alle Primer tragen die T7-Adapter-Sequenz (TAATACGACTCACTATAGGG) am 5'-Ende.

Bezeichnung	Gen	Organismus	Sequenz 5'-3'
Fca-Hc1-T7-fwd	Hemocyanin 1	<i>Folsomia candida</i>	TGGTGGAAACCCCGACAAATACG
Fca-Hc1-T7-rev			TACTCAAGAAAACGTGCGCCAT
Fca-GAPDH-T7-fwd	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	<i>Folsomia candida</i>	GAAGGTGGAGCTAAGCGAGTTA
Fca-GAPDH-T7-rev			TGGGCATTCAACATGATTCCAGC
Mmu-Cybg-T7-fwd	Cytoglobin	<i>Mus musculus</i>	TGGTGGAAACCCCGACAAATACG
Mmu-Cybg-T7-rev			TACTCAAGAAAACGTGCGCCAT

Tabelle 6.6: Primer zur Herstellung des Konstrukts für die rekombinante Expression von *Folsomia candida* Hemocyanin 2. Die eingebaute Schnittstelle SpeI ist blau, die für XhoI rot markiert.

Bezeichnung	Gen	Organismus	Sequenz 5'-3'
FcaHc2-F1	Hemocyanin 2	<i>Folsomia candida</i>	CGGTA ACTAGT CCCGACAAATACGGTGGT
FcaHc2-R1			CGGTA CTCGAG TACACCGGGTGCGAG

6.5 Phylogenetische Analysen

Tabelle 6.7: Zur Berechnung des Hämocyaninstammbaums verwendete Sequenzen von Hämocyaninuntereinheitstyp 1 und 2 von verschiedener Arthropoda.

Artname	Klasse	Protein	Accession number
<i>Archispirostreptus gigas</i>	Diplopoda	Hämocyanin 1	GenBank: CCC55877.1
<i>Arcynopteryx compacta</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: ADU18536.1
<i>Besdolus ravizzarum</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: ADU18537.1
<i>Blaptica dubia</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85699.1
<i>Blaptica dubia</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAR85700.1
<i>Chelidurella acanthopygia</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85694.1
<i>Chelidurella acanthopygia</i>	Hexapoda	Hämocyanin Type 2	GenBank: CAR85707.1
<i>Cryptotermes secundus</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85697.1
<i>Cryptotermes secundus</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAR85698.1
<i>Dictyogenus alpinus</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: ADU18535.1
<i>Dictyogenus alpinus</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: ADU18538.1
<i>Dinocras cephalotes</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: ACO57622.1
<i>Dinocras cephalotes</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: ABQ28711.1
<i>Entomobrya proxima</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: AGR40410.1
<i>Folsomia candida</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85703.1
<i>Folsomia candida</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: AHI62557.1
<i>Guadalgenuus franzi</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: ACO38693.1
<i>Hanseniella audax</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type 1a	GenBank: CCC55878.1
<i>Hanseniella audax</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type 1b	GenBank: CCC55879.1
<i>Hierodula membranacea</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85695.1
<i>Hierodula membranacea</i>	Hexapoda	Hämocyanin Type 2	GenBank: CAR85696.1
<i>Isoperla acicularis</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: ADU18539.1
<i>Isoperla grammatica</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: ACH85955.1
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: AGR40409.1
<i>Lepisma saccharina</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAQ63324.1
<i>Lepisma saccharina</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAQ63325.1

Anhang

Artname	Klasse	Protein	Accession number
<i>Locusta migratoria</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85704.1
<i>Locusta migratoria</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: AIE39569.1
<i>Locusta migratoria</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: AIE39570.1
<i>Locusta migratoria manilensis</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: ADR82619.1
<i>Machilis germanica</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85692.1
<i>Periplaneta americana</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85701.1
<i>Periplaneta americana</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAR85702.1
<i>Perla grandis</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: AAZ99030.1
<i>Perla grandis</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: AAZ99031.1
<i>Perla marginata</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAD87762.1
<i>Perla marginata</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAD87763.1
<i>Polydesmus angustus</i>	Myriapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CCC55875.1
<i>Schistocerca americana</i>	Hexapoda	embryonic hemolymph protein	GenBank: AAC16760.1
<i>Scutigera coleoptrata</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type A	UniProtKB/Swiss- Prot: Q95P08.1
<i>Scutigera coleoptrata</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type B	UniProtKB/Swiss- Prot: Q8IFJ8.1
<i>Scutigera coleoptrata</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type C	UniProtKB/Swiss- Prot: Q8T115.1
<i>Scutigera coleoptrata</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type D	UniProtKB/Swiss- Prot: Q95P07.1
<i>Scutigera coleoptrata</i>	Myriapoda	Hämocyanin Type X	UniProtKB/Swiss- Prot: Q8T116.1
<i>Shelfordella lateralis</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85705.1
<i>Shelfordella lateralis</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAR85706.1
<i>Sinella curviseta</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAR85691.1
<i>Spirostreptus spec</i>	Diplopoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAC33894.1
<i>Thermobia domestica</i>	Hexapoda	Hämocyanin 2	GenBank: CAQ63321.1
<i>Thermobia domestica</i>	Hexapoda	Hämocyanin 1	GenBank: CAQ63322.1
<i>Zootermopsis nevadensis</i>	Hexapoda	Hämocyanin Type 1	GenBank: KDR21641.1
<i>Zootermopsis nevadensis</i>	Hexapoda	Hämocyanin Type 2	GenBank: KDR21642.1

Tabelle 6.8: Zur Berechnung des Collembolastammbaums verwendete 18S und 28S rRNA Sequenzen verschiedener Hexapoda.

Artname	Ordnung	Sequenz	Accession number
<i>Callibaetis ferrugineus</i>	Ephemeroptera	18S rRNA	GenBank: AF370791.1
<i>Callyntrura spec</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016566.1
<i>Callyntrura spec</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016585.1
<i>Crossodonthina tiantongshana</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016557.1
<i>Crossodonthina tiantongshana</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016574.1
<i>Ctenolepisma longicaudata</i>	Zygentoma	18S rRNA	GenBank: AY210811.1
<i>Entomobrya dorsosignata</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY596360.1
<i>Entomobrya dorsosignata</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016584.1
<i>Folsomia candida</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY555515.1
<i>Folsomia candida</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: JN981046.1
<i>Folsomia octoculata</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016561.1
<i>Folsomia octoculata</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016579.1
<i>Friesea japonica</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016558.1
<i>Friesea japonica</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016575.1
<i>Heteromurus tenuicornis</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016564.1
<i>Heteromurus tenuicornis</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016582.1
<i>Hypogastrura duplicispinosa</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016555.1
<i>Hypogastrura duplicispinosa</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016570.1
<i>Hypogastrura spec</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY596362.1
<i>Hypogastrura spec</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016571.1
<i>Isotoma viridis</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY596361.1
<i>Isotomurus palustris</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016578.1
<i>Isotomurus palustris</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016560.1
<i>Isotomurus palustris</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016577.1
<i>Lepidocyrtus paradoxus</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: U61301.1
<i>Lepidocyrtus paradoxus</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: JN981068.1
<i>Neanura latior</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY037172.1
<i>Neelides minutus</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016567.1
<i>Neelides minutus</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016586.1
<i>Odontella spec</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016559.1
<i>Odontella spec</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016576.1
<i>Oncopodura crassicornis</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016563.1
<i>Oncopodura crassicornis</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016581.1
<i>Onychiurus hangchowensis</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016554.1
<i>Onychiurus hangchowensis</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016572.1
<i>Onychiurus yodai</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY037171.1
<i>Onychiurus yodai</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: EF392703.1
<i>Orchesella spec</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY555514.1

Artname	Ordnung	Sequenz	Accession number
<i>Orchesella spec</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: EF392704.1
<i>Papirinus prodigiosus</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016569.1
<i>Papirinus prodigiosus</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016588.1
<i>Podura aquatica</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY596363.1
<i>Podura aquatica</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: AY210838.1
<i>Pseudobourletiella spinata</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016568.1
<i>Pseudobourletiella spinata</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016587.1
<i>Sinella curviseta</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016565.1
<i>Sinella curviseta</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016583.1
<i>Sminthurides aquaticus</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY596364.1
<i>Sminthurides aquaticus</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016590.1
<i>Sminthurus viridis</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY859604.1
<i>Sminthurus viridis</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: AY859603.1
<i>Sphaeridia pumilis</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY145140.1
<i>Sphaeridia pumilis</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016589.1
<i>Tomocerus violaceus</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016562.1
<i>Tomocerus violaceus</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: DQ016580.1
<i>Triacanthella spec</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: AY859610.1
<i>Triacanthella spec</i>	Collembola	28S rRNA	GenBank: AY859609.1
<i>Tullbergia yosii</i>	Collembola	18S rRNA	GenBank: DQ016556.1

6.6 Transkriptomanalyse

Tabelle 6.9: In der Transkriptomanalyse verwendete Referenzsequenzen.

Artname	Ordnung	Protein	Accession number
<i>Blaptica dubia</i>	Blattodea	Hemocyanin I	GenBank: FM242646.1
<i>Blaptica dubia</i>	Blattodea	Hemocyanin II	GenBank: FM242647.1
<i>Folsomia candida</i>	Collembola	Hemocyanin II	GenBank: KF670722.1
<i>Locusta migratoria</i>	Orthoptera	Hemocyanin I	GenBank: KJ713391.1
<i>Locusta migratoria</i>	Orthoptera	Hemocyanin II	GenBank: FM242647.1
<i>Thermobia domestica</i>	Zygentoma	Hemocyanin I	GenBank: FM165288.1
<i>Thermobia domestica</i>	Zygentoma	Hemocyanin II	GenBank: FM165289.1
<i>Locusta migratoria</i>	Orthoptera	Hexamerin I	GenBank: FJ609738.1
<i>Locusta migratoria</i>	Orthoptera	Hexamerin II	GenBank: FJ609739.1
<i>Locusta migratoria</i>	Orthoptera	Hexamerin IV	GenBank: FJ609741.1
<i>Occasjapyx japonicus</i>	Diplura	Hexamerin I	GenBank: JX867263.1
<i>Reticulitermes flavipes</i>	Isoptera	Hexamerin I	GenBank: AY572858.2
<i>Reticulitermes flavipes</i>	Isoptera	Hexamerin II	GenBank: AY572859.2

Tabelle 6.10: Übersicht der untersuchten Transkriptome.

Artname	Ordnung	SRA-Run
<i>Acanthocasuarina muellerianae</i>	Hemiptera	SRR921560
<i>Acanthosoma haemorrhoidale</i>	Hemiptera	SRR921561
<i>Acerentomon sp.</i>	Protura	SRR921562
<i>Aleochara curtula</i>	Coleoptera	SRR921563
<i>Anurida maritima</i>	Collembola	SRR921564
<i>Apachyus charteceus</i>	Dermaptera	SRR921565
<i>Aposthonia japonica</i>	Embioptera	SRR921566
<i>Aretaon asperrimus</i>	Phasmatodea	SRR921567
<i>Atelura formicaria</i>	Zygentoma	SRR921568
<i>Baetis sp.</i>	Ephemeroptera	SRR921569
<i>Bibio marci</i>	Diptera	SRR921570
<i>Bittacus pilicornis</i>	Mecoptera	SRR921571
<i>Blaberus atropos</i>	Blattodea	SRR921572
<i>Bombylius major</i>	Diptera	SRR921573
<i>Boreus hyemalis</i>	Mecoptera	SRR921574
<i>Calopteryx splendens</i>	Odonata	SRR921575
<i>Campodea augens</i>	Diplura	SRR921576
<i>Ceratophyllus gallinae</i>	Siphonaptera	SRR921577
<i>Cercopis vulnerata</i>	Hemiptera	SRR921578
<i>Ceuthophilus sp.</i>	Orthoptera	SRR921579
<i>Annulipalpia sp.</i>	Trichoptera	SRR921580
<i>Chrysis viridula</i>	Hymenoptera	SRR921581
<i>Conwentzia psociformis</i>	Neuroptera	SRR921582
<i>Cordulegaster boltonii</i>	Odonata	SRR921583
<i>Corydalus cornutus</i>	Neuroptera	SRR921584
<i>Cosmioperla kuna</i>	Plecoptera	SRR921585
<i>Cotesia vestalis</i>	Hymenoptera	SRR921586
<i>Cryptocercus wrighti</i>	Blattodea	SRR921587
<i>Ctenocephalides felis</i>	Siphonaptera	SRR921588
<i>Dichochrysa prasina</i>	Neuroptera	SRR921589
<i>Empusa pennata</i>	Mantodea	SRR921590
<i>Ephemera danica</i>	Ephemeroptera	SRR921591
<i>Epiophlebia superstes</i>	Odonata	SRR921592
<i>Dyseriocrania subpurpurella</i>	Lepidoptera	SRR921593
<i>Essigella californica</i>	Hemiptera	SRR921594
<i>Euroleon nostras</i>	Neuroptera	SRR921595
<i>Eurylophella sp.</i>	Ephemeroptera	SRR921596
<i>Folsomia candida</i>	Collembola	SRR921597
<i>Forficula auricularia</i>	Dermaptera	SRR921598

Anhang

Artname	Ordnung	SRA-Run
<i>Frankliniella cephalica</i>	Thysanoptera	SRR921599
<i>Galloisiana yuasai</i>	Grylloblattodea	SRR921600
<i>Grylloblatta bifratrilecta</i>	Grylloblattodea	SRR921601
<i>Gryllotalpa sp.</i>	Orthoptera	SRR921602
<i>Gynaikothrips ficorum</i>	Thysanoptera	SRR921603
<i>Gyrinus marinus</i>	Coleoptera	SRR921604
<i>Haploembia palaui</i>	Embioptera	SRR921605
<i>.Hydroptilidae sp.</i>	Trichoptera	SRR921606
<i>Inocellia crassicornis</i>	Neuroptera	SRR921607
<i>Isonychia bicolor</i>	Ephemeroptera	SRR921608
<i>Lepicerus sp.</i>	Coleoptera	SRR921609
<i>Leptopilina clavipes</i>	Hymenoptera	SRR921610
<i>Leuctra sp.</i>	Plecoptera	SRR921611
<i>Lipara lucens</i>	Diptera	SRR921612
<i>Liposcelis bostrychophila</i>	Psocoptera	SRR921613
<i>Machilis hrabei</i>	Archaeognatha	SRR921614
<i>Mantis religiosa</i>	Mantodea	SRR921615
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Isoptera	SRR921616
<i>Meinertellus cundinamarcensis</i>	Archaeognatha	SRR921617
<i>Meloe violaceus</i>	Coleoptera	SRR921618
<i>Menopon gallinae</i>	Phthiraptera	SRR921619
<i>Metallyticus splendidus</i>	Mantodea	SRR921620
<i>Nemophora degeerella</i>	Lepidoptera	SRR921621
<i>Nilaparvata lugens</i>	Hemiptera	SRR921622
<i>Notostira elongata</i>	Hemiptera	SRR921623
<i>Occasjapyx japonicus</i>	Diplura	SRR921624
<i>Okanagana villosa</i>	Hemiptera	SRR921625
<i>Orussus abietinus</i>	Hymenoptera	SRR921626
<i>Osmylus fulvicephalus</i>	Neuroptera	SRR921627
<i>Panorpa vulgaris</i>	Mecoptera	SRR921628
<i>Parides eurimedes</i>	Lepidoptera	SRR921629
<i>Periplaneta americana</i>	Blattodea	SRR921630
<i>Perla marginata</i>	Plecoptera	SRR921631
<i>Peruphasma schultei</i>	Phasmatodea	SRR921632
<i>Planococcus citri</i>	Hemiptera	SRR921633
<i>Platycentropus radiatus</i>	Trichoptera	SRR921634
<i>Pogonognathellus sp.</i>	Collembola	SRR921635
<i>Polyommatus icarus</i>	Lepidoptera	SRR921636
<i>Prorhinotermes simplex</i>	Isoptera	SRR921637
<i>Prosarthria teretrirostris</i>	Orthoptera	SRR921638

Anhang

Artname	Ordnung	SRA-Run
<i>Ranatra linearis</i>	Hemiptera	SRR921639
<i>Rhyacophila fasciata</i>	Trichoptera	SRR921640
<i>Sminthurus viridis</i>	Collembola	SRR921641
<i>Stenobothrus lineatus</i>	Orthoptera	SRR921642
<i>Stylops melittae</i>	Strepsiptera	SRR921643
<i>Tanzaniophasma sp.</i>	Mantophasmatodea	SRR921644
<i>Tenthredo koehleri</i>	Hymenoptera	SRR921645
<i>Tetrix subulata</i>	Orthoptera	SRR921646
<i>Tetrodontophora bielanensis</i>	Collembola	SRR921647
<i>Thermobia domestica</i>	Zygentoma	SRR921648
<i>Thrips palmi</i>	Thysanoptera	SRR921649
<i>Timema cristinae</i>	Phasmatodea	SRR921650
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Hemiptera	SRR921651
<i>Triarthria setipennis</i>	Diptera	SRR921652
<i>Trichocera saltator</i>	Diptera	SRR921653
<i>Tricholepidion gertschi</i>	Zygentoma	SRR921654
<i>Triodia sylvina</i>	Lepidoptera	SRR921655
<i>Velia caprai</i>	Hemiptera	SRR921656
<i>Xanthostigma xanthostigma</i>	Raphidioptera	SRR921657
<i>Xenophysella greensladeae</i>	Hemiptera	SRR921658
<i>Yponomeuta evonymella</i>	Lepidoptera	SRR921659
<i>Zorotypus caudelli</i>	Zoraptera	SRR921660
<i>Zygaena fausta</i>	Lepidoptera	SRR921661
<i>Ectopsocus briggsi</i>	Psocoptera	SRR645929

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thorsten Burmester für die Bereitstellung meines Themas und die Begutachtung meiner Doktorarbeit bedanken. Außerdem danke ich Prof. Dr. Susanne Dobler für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Christian Pick und Andrej Fabrizio möchte ich für das Beantworten zahlreicher fachlicher und weniger fachlicher Fragen, sowie dem ein oder anderen Feierabend-Bier bedanken. Auch bei Janus „dem Eichbörnchen“ Borner möchte ich danken: für die Erstellung unzähliger Primer, die lustigen Zeiten im Büro und dafür, dass tatsächlich noch jemand länger für seine Doktorarbeit gebraucht hat als ich :)

Für die tatkräftige Unterstützung bei unzähligen PCRs, Plasmidpreps, Westernblots und natürlich dem liebevollen versorgen meiner Collembolen möchte ich mich bei Michelle Kruse, Hanna Markowsky und Maria Machola bedanken. Ihr habt mir wirklich viel Arbeit abgenommen!

Außerdem möchte ich mich bei Marco Schneuer, Sammy Didier, Miriam Götting, Mariana Müller Hoff, Jonas Koch und all den anderen Doktoranden, Master- und Bachelorstudenten und natürlich den Mitgliedern der AGs Herwig und Lohr bedanken. Wenn die Zeit während der Promotion auch nicht immer einfach war, war sie wegen euch zumindest immer lustig!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden dafür bedanken, dass ihr mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt habt und auch ansonsten immer für mich da wart.

Zuletzt möchte ich Katha danken, die immer für mich da war und auch in schwereren Zeiten zu mir gehalten hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 2016

Sven Flachsbarth