

**Bcl-2-homologe Proteine aus dem Schwamm *Geodia cydonium*:
Klonierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse
von Apoptose-Regulatoren der Porifera**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Matthias Wiens
geb. in Bad Dürkheim

Mainz, 2001

Dekan:

Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 4. März 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historische Entwicklung: die Geschichte des Zelltods	1
1.2	Morphologische und biochemische Determinanten der Apoptose und Nekrose	1
1.3	Kernelemente der Apoptose.....	4
1.4	Die TNF-Rezeptor Familie: Rezeptoren des Zelltods	6
1.5	Caspasen: Effektoren der Apoptose.....	8
1.6	Die Bcl-2 Familie: Regulatoren der Apoptose	11
1.6.1	Bcl-2: der Prototyp einer großen Familie.....	12
1.6.2	Die Bcl-2 Homologie Domänen.....	13
1.6.3	Strukturelle Grundlagen intrafamiliärer Interaktionen.....	14
1.6.4	Strukturelle Grundlagen der Porenbildung	14
1.6.5	Modell zur multifunktionalen Wirkungsweise der Bcl-2 Familie	15
1.6.6	Verknüpfung von Lokalisation und Funktion der Bcl-2 Familie	15
1.6.6.1	Regulation mitochondrialer Prozesse durch die Bcl-2 Familie im Verlauf der Apoptose.....	16
1.6.6.2	Regulation postmitochondrialer Prozesse durch die Bcl-2 Familie im Verlauf der Apoptose.....	18
1.6.7	Regulation der Bcl-2 Proteine	19
1.7	Porifera	20
1.7.1	Biologie der Schwämme	20
1.7.2	Schwämme: Modell-Organismen für Untersuchungen der Apoptose.....	22
2	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Chemikalien.....	25
3.1.2	Enzyme.....	28
3.1.3	Kits	28
3.1.4	Geräte	28
3.1.5	Weiteres Laborzubehör und Verbrauchsmaterialien.....	30
3.1.6	Antikörper	31
3.1.7	Phagen, Bakterienstämme, Zelllinien und Schwämme	31

3.1.8	cDNA-Bibliothek und Vektoren.....	32
3.1.9	Primer.....	32
3.1.10	<i>Online</i> -Dienste und Computerprogramme	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Schwammkultur	35
3.2.1.1	Hälterung der Schwämme.....	35
3.2.1.2	Apoptose-Induktion.....	35
3.2.2	Zellkultur.....	36
3.2.2.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	36
3.2.2.2	Kryokonservierung.....	37
3.2.2.3	Apoptose-Induktion.....	37
3.2.2.4	Vitalitätstest	38
3.2.2.5	Apoptose-Nachweis und Quantifizierung	38
3.2.3	Bakterienkultur.....	39
3.2.3.1	Kultivierung von Bakterien in Suspension.....	39
3.2.3.2	Kryokonservierung	40
3.2.4	DNA-Plasmidpräparationen.....	40
3.2.4.1	Mini-Plasmidpräparation	40
3.2.4.2	Midi-Plasmidpräparation.....	41
3.2.5	RNA-Präparationen.....	41
3.2.5.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellkulturzellen.....	42
3.2.5.2	Präparation von Gesamt-RNA aus Schwammgewebe.....	42
3.2.6	Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	43
3.2.6.1	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	43
3.2.6.2	Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren	43
3.2.7	Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten mittels Gelelektrophorese	43
3.2.7.1	Analytische und präparative DNA-Agarosegele	44
3.2.7.2	Analytische RNA-Agarosegele	45
3.2.7.3	Detektion aufgetrennter DNA durch Ethidiumbromid und halbquantitative Konzentrationsbestimmung	46
3.2.7.4	Detektion aufgetrennter RNA durch Toluidinblau	46
3.2.8	Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	47
3.2.8.1	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
3.2.8.2	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	47
3.2.9	Homologiescreening der <i>G. cydonium</i> cDNA-Bibliothek.....	48
3.2.9.1	Kultivierung von Bakterien für die Infektion mit Phagen.....	48
3.2.9.2	Bestimmung des Phagentiters.....	48
3.2.9.3	Primärscreening.....	49

3.2.9.4	Sekundär- und Tertiärscreening	52
3.2.9.5	<i>In vivo</i> -Excision.....	52
3.2.10	Herstellung rekombinanter DNA.....	54
3.2.10.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	54
3.2.10.2	Ligation linearer DNA.....	54
3.2.11	Transformation kompetenter Bakterien	55
3.2.11.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli XL1-Blue MRF'</i>	55
3.2.11.2	Transformation kompetenter <i>E. coli XL1-Blue MRF'</i>	56
3.2.11.3	Blau/Weiß-Selektion rekombinanter Klone	56
3.2.12	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.....	57
3.2.12.1	Northern Blotting	57
3.2.12.2	Detektion aufgetrennter, immobilisierter Nukleinsäuren durch Methylenblau	59
3.2.13	Detektion aufgetrennter, immobilisierter Nukleinsäuren und Proteine durch Chemilumineszenz	59
3.2.14	Primerdesign	60
3.2.15	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	61
3.2.15.1	Standard-PCR.....	61
3.2.15.2	Subklonierung mittels PCR.....	62
3.2.15.3	Checking-PCR	63
3.2.15.4	Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten.....	63
3.2.15.5	Reverse Transkription von mRNA mit gekoppelter PCR (<i>RT-PCR</i>).....	64
3.2.16	DNA-Sequenzierung nach Sanger	64
3.2.16.1	DNA-Sequenzierreaktion.....	65
3.2.16.2	DNA-Sequenzierung mittels eines automatisierten Sequenzierers	66
3.2.16.3	Auswertung der DNA-Sequenzierung.....	66
3.2.17	Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten.....	67
3.2.17.1	Konstruktion eines Expressionsklons	67
3.2.17.2	Expression eines Fusionsproteins	68
3.2.17.3	Präparation eines Fusionsproteins	68
3.2.18	Expression von Fusionsproteinen in Eukaryoten	69
3.2.18.1	Konstruktion eines Expressionsklons	70
3.2.18.2	Transfektion und Selektion der Transfektanten.....	70
3.2.19	Immuncytochemische Färbung von Zellen	71
3.2.19.1	Vorbereitung und Fixierung der Zellen.....	71
3.2.19.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	72
3.2.20	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	73
3.2.20.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Geweben und Zellkulturzellen.....	73
3.2.20.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	74
3.2.20.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	75

3.2.20.4	Coomassie Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	76
3.2.21	Western Blotting	76
3.2.22	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	78
3.2.22.1	Immunisierung und Serumzubereitung.....	78
3.2.22.2	Bestimmung des Antikörpertiters	79
4	Ergebnisse.....	80
4.1	Klonierung und Charakterisierung der cDNA zweier Bcl-2-homologer Proteine aus dem marinen Schwamm <i>Geodia cydonium</i>.....	80
4.1.1	Klonierung des <i>GCBHP1</i> und des <i>GCBHP2</i>	80
4.1.2	Analysen der Basensequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des <i>GCBHP1</i>	82
4.1.3	Analysen der Basensequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des <i>GCBHP2</i>	83
4.1.4	Vergleiche der Basensequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des <i>GCBHP1</i> und des <i>GCBHP2</i>	85
4.2	Klonierung und Charakterisierung des molekularen Markers Septin (<i>GCSEPI</i>) aus <i>G. cydonium</i>.....	90
4.2.1	Klonierung des <i>GCSEPI</i>	90
4.2.2	Analysen der Basensequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des <i>GCSEPI</i>	91
4.3	Analyse der <i>GCBHP2</i>-Transkription nach Einwirkung verschiedener Stressoren auf <i>G. cydonium</i>.....	92
4.4	Analyse der <i>GCBHP2</i>-Translation nach Einwirkung verschiedener Stressoren auf <i>G. cydonium</i>.....	96
4.4.1	Expression eines rekombinanten BHP2-Fusionsproteins und Herstellung eines polyklonalen BHP2-Antikörpers.....	96
4.4.2	Einfluß von TBT und Hitze auf die <i>GCBHP2</i> -Proteinexpression.....	97
4.5	<i>GCBHP2</i>-Proteinexpression in Säugetierzellen.....	99
4.5.1	Herstellung eines Expressionskonstrukts und Transfektion von Säugetierzellen.....	99
4.5.2	Überprüfung der Transkription des transfizierten Expressionskonstrukts	100
4.5.3	Kontrolle der <i>GCBHP2</i> -Proteinexpression.....	101
4.5.3.1	Western Blot Analysen.....	101
4.5.3.2	Immuncytochemische Analysen.....	102
4.6	Funktionsanalyse des BHP2 in transfizierten Zellen.....	103
4.6.1	Überprüfung der <i>GCBHP2</i> -Proteinexpression im Verlauf der Apoptose-Induktion	104

4.6.2	Vitalitätstest: Einfluß selektiver Stressoren auf die Vitalität <i>GCBHP2</i> -transfizierter Zellen.....	105
4.6.3	Caspase-Assay: Einfluß selektiver Stressoren auf die Caspase-Aktivität <i>GCBHP2</i> -transfizierter Zellen.....	107
4.7	Subzelluläre Lokalisation des BHP2 in <i>GCBHP2</i>-transfizierten Zellen.....	109
5	Diskussion	111
5.1	Erste Indizien für die Existenz apoptotischer Mechanismen in den Porifera	111
5.2	Strukturelle Analysen Bcl-2-homologer Proteine aus <i>G. cydonium</i>.....	114
5.2.1	BHP1 und BHP2: Mitglieder der Bcl-2 Familie	114
5.2.2	Die BH-Domänen des BHP1 und des BHP2	116
5.3	Phylogenetische Aspekte Bcl-2-homologer Proteine der Porifera	119
5.4	Stressinduzierte Expression des BHP2	121
5.5	Funktionale Analysen des BHP2.....	125
5.5.1	BHP2-Expression in einem heterologen System.....	125
5.5.2	Antiapoptotische Effekte der BHP2-Expression.....	126
5.6	Modelle der Apoptose-Regulation durch BHP2, einem Mitglied der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie	128
5.6.1	Potentielle Wirkungsmechanismen des BHP2.....	129
5.6.2	Analogien der BHP2- und der HSP70-Expression.....	133
5.7	Perspektiven für die weitere Erforschung der Apoptose der Porifera	136
6	Zusammenfassung	137
7	Literaturverzeichnis	139
8	Abkürzungsverzeichnis	168
8.1	Abkürzungen, Akronyme und Summenformeln.....	168
8.2	Abkürzungs-codes für Aminosäuren und Basen.....	171

1 Einleitung

1.1 Historische Entwicklung: die Geschichte des Zelltods

Einer der ersten dokumentierten Berichte über den natürlich auftretenden Zelltod stammt von Carl Vogt, der 1842 u. a. den Tod von Knorpelzellen im Verlauf der Entwicklung von Amphibien beschrieb (CLARKE und CLARKE, 1995; CLARKE und CLARKE, 1996). 1885 wurden die mit dem Zelltod verbundenen morphologischen Ereignisse durch Flemming geschildert, welcher jenen zusammenfassend den Namen "Chromatolyse" gab. Dieser Name sollte die nächsten 30 Jahre hauptsächlich verwendet werden. Das schwindende Interesse an der Aufklärung des Zelltods um die Jahrhundertwende wird hauptsächlich auf eine Sprachbarriere zurückgeführt, da die meisten frühen Studien in deutsch geschrieben wurden, einer Sprache, die damals immer weniger Forscher beherrschten (LINCZ, 1998). Erst 1964 prägten Lockshin und Williams den Begriff "programmierter Zelltod" zur Beschreibung der im Verlauf der Transformation einer Mottenlarve zur Adultform auftretenden Eliminierung spezifischer Zellen (LOCKSHIN und WILLIAMS, 1964).

Der Begriff "Apoptose" (griechisch für das Fallen der Blätter von einem Baum im Herbst) wurde schließlich 1972 von Kerr, Currie und Wyllie eingeführt, welche damit die allgemeinen, im Verlauf der zellulären Selbstzerstörung auftretenden, morphologischen Veränderungen zusammenfaßten (KERR *et al.*, 1972). Diese morphologischen Vorgänge hatten nicht unbedingt die *de novo*-Expression bestimmter Gene zur Voraussetzung. Der Ausdruck "programmierter Zelltod" wurde dagegen ursprünglich eingesetzt, um eine von der Expression bestimmter Gene abhängige, entwicklungsbiologisch bedingte Vernichtung von Zellen zu charakterisieren, die durch definierte physiologische Stimuli induziert worden war. Obwohl die Begriffe "Apoptose" und "programmierter Zelltod" ursprünglich nicht zwangsläufig den gleichen Prozeß beschrieben, haben beide über die Jahre hinweg ihre spezifische Bedeutung verloren und werden heute synonym angewandt (BAUMGARTNER-PARZER, 1996). Unabhängig von dem auslösenden Stimulus oder der Expression neuer Gene beschreiben sie heute den Vorgang des von der betroffenen Zelle dirigierten Zelltods, welcher sich von dem "zufälligen" Zelltod, der Nekrose, unterscheidet (s. 1.2).

1.2 Morphologische und biochemische Determinanten der Apoptose und Nekrose

Apoptose bzw. programmierter Zelltod ist eine morphologisch distinkte Form des Zelltods, welche durch eine Vielfalt an physiologischen und pathologischen Stimuli ausgelöst wird (RAFF, 1992; RAFF *et al.*, 1993; STELLER und GREYER, 1994). So sorgt diese natürliche Form des Zelltods bei multizellulären Organismen während der Embryogenese, der Seneszenz, der Gewebshomöostase, der Abwehr von Pathogenen und nach Schädigung durch exogene oder endogene Faktoren für eine Entfernung nicht mehr benötigter und unerwünschter Zellen, ohne umgebendes Gewebe zu schädigen oder eine Immunantwort hervorzurufen (SAUNDERS, 1966; GOLSTEIN *et al.*, 1991; WILLIAMS,

1991; RAFF, 1992; VAUX *et al.*, 1994). Zusätzlich zu den nützlichen Effekten der Apoptose kann eine deplacierte Aktivierung des programmierten Zelltods auch bestimmte Krankheitsformen fördern bzw. initiieren. Zu erwähnen sind hierbei vor allem Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Störungen (THOMPSON, 1995; YANG und KORSMEYER, 1996).

Der Prozeß des Zelltods läßt sich in mehrere Phasen gliedern, beginnend mit dem apoptotischen Stimulus (Induktionsphase). Dieser Stimulus kann ein externes Signal sein (z. B. Tumor-Nekrose-Faktoren), welches über Rezeptoren der Zelle in das Zellinnere geleitet wird (s. 1.4). Er kann aber auch seinen Ursprung direkt in der Zelle als Folge der Einwirkung von Toxinen, Oxidantien, Produkten des zellulären Metabolismus' usw. haben (s. Tab. 1.1). Die nächste Phase beinhaltet die Detektion des Signals oder des metabolischen Zustands und die Signaltransduktion. Die Signalweiterleitung erfolgt über unterschiedliche, intrazelluläre Wege, die zelltypspezifisch und wenig aufgeklärt sind. In der Effektorphase münden diese jedoch in einen allgemeingültigen Mechanismus, welcher für alle Gewebe identisch sein dürfte (VAUX und STRASSER, 1996). Mit der Aktivierung dieser exekutiven Mechanismen setzt die dritte Phase, die Effektorphase, ein. Diese Phase umfaßt hauptsächlich Proteasen, welche zu diesem Zeitpunkt aktiviert werden, sowie deren positive und negative Regulatoren (s. 1.5). Die letzte Phase wird als Post-Mortem-Phase bezeichnet. Hier erfolgt die Chromatin-Kondensierung, der DNA-Abbau und schließlich die Phagocytose durch benachbarte Zellen oder Makrophagen (VAUX und STRASSER, 1996).

Die Apoptose stellt einen energieabhängigen, streng regulierten Prozeß dar, welcher enzymatisch katalysierte Schritte involviert. Sie betrifft meist nur einzelne Zellen und weist ein breites Spektrum charakteristischer morphologischer Veränderungen auf (SEARLE *et al.*, 1975). In frühen Stadien ist eine Abrundung der betroffenen Zelle und eine Kondensierung des Chromatins entlang der inneren Membran des Zellkerns zu beobachten. Der Rückgang des Cytoplasmas bewirkt ein Zusammendrängen der Organellen und die Lösung von Kontakten zu benachbarten Zellen. Parallel zur Zerlegung des Zellkerns in kleinere Fragmente löst sich die Zelle in membranumhüllte Bruchstücke (*apoptotic bodies*) auf, welche ein breites Spektrum zellulärer Elemente enthalten, bis hin zu intakten Organellen und nukleären Fragmenten. Diese *apoptotic bodies* werden im Interzellularraum verstreut und schnell durch benachbarte Zellen und Makrophagen phagozytiert und abgebaut. Dabei wird keine Entzündungsreaktion hervorgerufen (KERR *et al.*, 1972).

Diese morphologischen Erscheinungen werden im Verlauf der Apoptose von einer Reihe biochemischer Veränderungen begleitet (SARRASTE und PULKKI, 2000). Dazu zählt die prälytische Fragmentierung des Genoms in Oligomere von 180 - 200 bp (WYLLIE, 1987). Der Abbau erfolgt in zwei Schritten, wobei zuerst recht große (50 - 300 kb) DNA-Fragmente gebildet werden, gefolgt von der Produktion kleinerer, internukleosomaler Fragmente (BROWN *et al.*, 1993). Dieser durch eine endogene Endonuklease, ein DNase I-artiges Enzym, katalysierte Vorgang ist typisch für die Apoptose, jedoch nicht obligat (COHEN *et al.*, 1992). Während des programmierten Zelltods erfolgt außerdem der Abbau bestimmter zellulärer Proteine und Enzyme, z. B. der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (KAUFMANN *et al.*, 1993). Dieses Enzym führt im Fall von DNA-Schäden zur

Synthese von Polymeren der Poly(ADP-Ribose), welche zwar keine direkte Funktion bei der DNA-Reparatur haben, aber das Chromatin im Bereich der DNA-Schäden reorganisieren (LINDAHL, 1995). Somit scheint aufgrund des Zusammenhangs zwischen dem Enzym und der DNA-Reparatur dessen Inaktivierung Voraussetzung für die DNA-Fragmentierung bei der Apoptose zu sein. Die Ansäuerung des Cytoplasmas ist ein weiteres biochemisches Kennzeichen der Apoptose, wodurch pH-abhängige Enzyme aktiviert werden (MEISENHOLDER *et al.*, 1996). In Verbindung damit treten Veränderungen in der Plasmamembran auf: In gesunden Zellen ist Phosphatidylserin ausschließlich an der Innenseite der Lipid-Doppelschicht von Zellmembranen positioniert. Im Fall des programmierten Zelltods wird Phosphatidylserin dagegen auf die Außenseite verlagert, wo es vermutlich mit anderen Molekülen Komplexe bildet, die von Rezeptoren erkannt werden können (FADOK *et al.*, 1992). Die Präsentation dieser Komplexe erlaubt die Phagocytose der markierten Zellen und verhindert dadurch die Entstehung von Entzündungsprozessen (SCHLEGEL *et al.*, 1993).

Physiologische Aktivatoren	Nichtphysiologische Induktoren	Sonstige Agenzien, Toxine usw.
TNF-Familie	Hitzeschock	Ethanol
Wachstumsfaktorentzug	Freie Radikale	Xenobiotika
Calcium	Oxidantien	β-Amyloid Peptid
Glucocorticoide	Cytolytische T-Zellen	Methotrexat
Verlust der Matrixadhäsion	Virale Infektionen	Natriumazid
Neurotransmitter	Strahlung	Phorbolester

Tab. 1.1: Auswahl apoptoseinduzierender Faktoren (nach THOMPSON, 1995 und KONOPLEVA *et al.*, 1999).

Nekrose oder passiver Zelltod ist im Vergleich zur Apoptose ein pathologischer, unkontrollierter Prozeß, der unter dem übermäßigen Einfluß physikalischer, chemischer oder viraler Faktoren eintritt (WYLLIE *et al.*, 1980; STELLER, 1995). Die dabei hervorgerufenen massiven Zellschädigungen führen zu einem Verlust der Plasmamembran-Integrität (THOMPSON, 1995). Der Vorgang der Nekrose beginnt mit dem Kollaps des Zellstoffwechsels und der Unfähigkeit der Zelle, ihre Homöostase aufrechtzuerhalten, woraufhin extrazelluläres Wasser und Ionen in das Zellinnere einströmen. Die Zelle und ihre Organellen, insbesondere die Mitochondrien, schwellen daher an, brechen auf und ergießen ihren Inhalt in den extrazellulären Raum (TRUMP *et al.*, 1965). Im Gegensatz zur Apoptose führt die Nekrose *in vivo* deshalb oft zu Gewebeschäden und Entzündungen (VAN-FURTH und VAN-ZWET, 1988). Sie ist außerdem ein energieunabhängiger Prozeß, der meist einen Zellverband betrifft und zu einem willkürlichen, postlytischen Abbau der DNA führt (JÄCKEL, 1998). Eine Expression neuer Gene findet während der Nekrose nicht statt (MCCONKEY, 1998).

1.3 Kernelemente der Apoptose

Aufgrund der Kenntnis seines Zellstammbaums und der neuerdings kompletten Sequenz seines Genoms (www.TheSangerCentreWebServer.ac.uk) stellt der Nematode *C. elegans* ein hervorragendes Modell-System dar, in welchem die Kernelemente der Apoptose-Maschinerie sowie die einzelnen Phasen des programmierten Zelltods während der Entwicklung des Organismus beobachtet werden können. Vor allem Untersuchungen von Horvitz und seinen Kollegen an *C. elegans* haben viel zum heutigen Verständnis der Kontrollmechanismen des programmierten Zelltods beigetragen. Von den 1090 somatischen Zellen des Nematoden, die während der Genese produziert werden, sterben genau 131 (DRISCOLL, 1992; HENGARTNER und HORVITZ, 1994a). Dabei handelt es sich immer um die gleichen Zellen, die stets zum gleichen Zeitpunkt der Entwicklung absterben. 1986 wiesen ELLIS und HORVITZ mit *ced-3*, *ced-4* und *ced-9* (*ced* steht für *cell death abnormal*) die wichtigsten von etwa 14 Genen nach, welche am programmierten Zelltod beteiligt sind. Mutationsexperimente belegten die Notwendigkeit der Gene *ced-3* und *ced-4* für den Tod der erwähnten 131 Zellen sowie die Erfordernis des *ced-9* für das Überleben der restlichen Zellen (ELLIS und HORVITZ, 1986; HENGARTNER *et al.*, 1992). Die meisten der restlichen *ced*-Gene (*ced-1*, *-2*, *-5*, *-6*, *-7*, *-8*, *-10*) werden für die Beseitigung der toten Zellkörper benötigt, die von benachbarten Zellen erkannt und phagozytiert werden (ELLIS *et al.*, 1991). So ist beispielsweise die Nuklease Nuc-1 zwar nicht essentiell für den Zelltod, wird aber für den Abbau der DNA toter Zellen gebraucht. Auch in Säugetierzellen werden die mit der Apoptose verbundenen Vorgänge im Nukleus nicht für die in anderen Teilen der Zelle ablaufenden Prozesse des Zelltods benötigt (JACOBSON *et al.*, 1994). Die Komponenten der am programmierten Zelltod beteiligten Mechanismen existieren im Cytoplasma, bereit aktiviert zu werden, ohne daß sie vorher erst synthetisiert werden müssen (VAUX und WEISSMAN, 1993).

Strukturelle und funktionale Analysen bildeten die Grundlage für die Identifizierung der Säugetier-Homologen der wesentlichen *ced*-Gene und lieferten wichtige Hinweise auf den programmierten Zelltod als ein im Verlauf der Evolution konserviertes Ereignis (HENGARTNER und HORVITZ, 1994b). Diese aufschlußreichen Experimente erbrachten dabei den Nachweis, daß eine Expression der Proteine CED-3 und CED-4 in Säugetierzellen zu deren Zelltod führt (NGUYEN *et al.*, 1993; MIURA *et al.*, 1993) und im Gegenzug die Expression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 der Säugetiere (s. u.) in *C. elegans* die antiapoptotische Funktion des CED-9 ersetzen kann (VAUX *et al.*, 1992b). CED-3 erwies sich im weiteren Verlauf als Homolog eines Säugetierenzym (der ICE-Protease), das einer Familie von Cysteinproteasen angehört (YUAN *et al.*, 1993; WALKER *et al.*, 1994). Diese auch als Caspasen bezeichneten Proteasen verkörpern die wichtigsten Effektoren der Apoptose. Sie sind in einer autokatalytischen Kaskade angeordnet und tragen entscheidend zum Zelltod durch den Abbau lebenswichtiger Proteine bei (s. 1.5; YUAN *et al.*, 1993; COHEN, 1997).

Bei dem Säugetier-Homolog des CED-4 handelt es sich um das erst kürzlich identifizierte Adapterprotein Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*; ZOU *et al.*, 1997). Dieses löst in

Folge einer Schädigung der Mitochondrien und ihrer Energieproduktion die Aktivierung der Caspase-Kaskade aus. Apaf-1 wird durch die Bindung an das Homolog des CED-9 in einem inaktiven Zustand gehalten. Bei diesem Homolog handelt es sich um Bcl-2, dem Prototyp einer großen Familie (HENGARTNER und HORVITZ, 1994b). Bcl-2 Proteine umfassen sowohl pro- als auch antiapoptische Mitglieder, die zu den wichtigsten Regulatoren der Apoptose gehören und deshalb eine Schlüsselposition einnehmen (s. 1.6). Sie entscheiden dabei nicht nur durch Bindung an Apaf-1 über dessen Aktivierungszustand, sondern können auch durch Insertion in Membranen die Homöostase von Organellen während der Apoptose beeinflussen.

In den folgenden Kapiteln wird die Rolle der Caspasen, des Apaf-1 und der Bcl-2 Familie als Hauptakteure im Verlauf der Apoptose näher erläutert und der Ablauf apoptotischer Prozesse an den Mitochondrien genauer erklärt werden. Ein erstes Kapitel ist den Rezeptoren des Zelltods gewidmet. Diese membranständigen Rezeptoren leiten apoptotische Stimuli, ausgelöst durch die Bindung von Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), in das Zellinnere und verursachen eine Caspase-Aktivierung weitgehend unabhängig des Apaf-1 und der Bcl-2 Homologen.

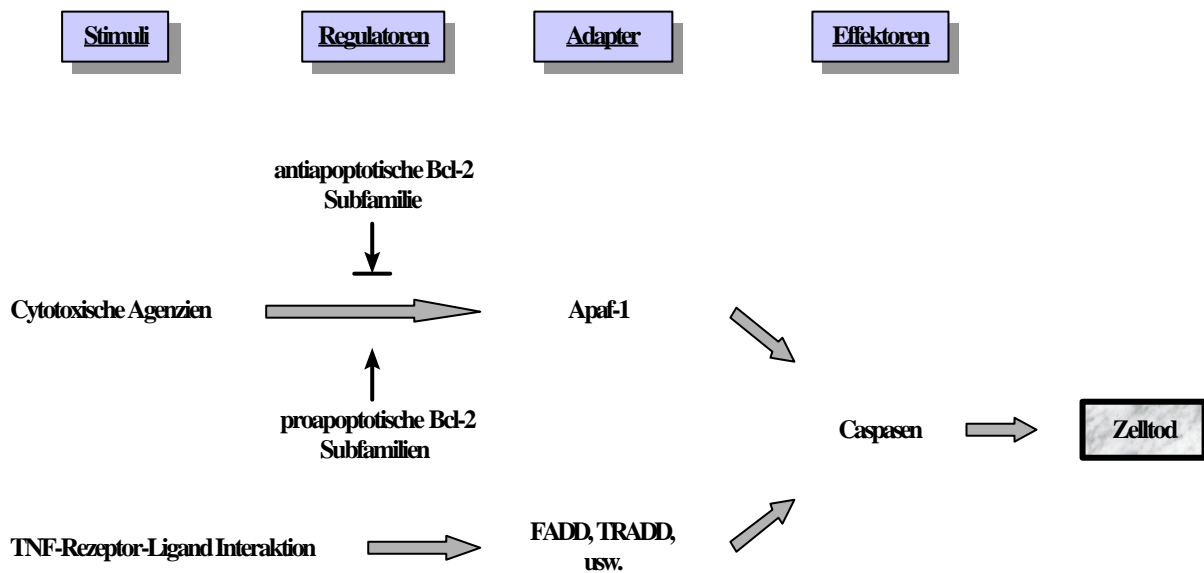


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der zur Apoptose führenden Signalwege inkl. beteiligter Hauptakteure: Mannigfaltige Stimuli (z. B. cytotoxische Agenzien oder TNF-Rezeptor-Liganden-Interaktionen) führen zu einer adaptervermittelten Aktivierung der wichtigsten Effektoren der Apoptose, der Caspasen. Diese Aktivierung wird in vielen Fällen durch Mitglieder der Bcl-2 Familie reguliert.

1.4 Die TNF-Rezeptor Familie: Rezeptoren des Zelltods

Überlebenssignale von benachbarten Zellen und interne Sensoren bewahren Zellen normalerweise vor Apoptose. Verlieren diese jedoch den Kontakt zu ihren Nachbarn, erleiden einen irreparablen internen Schaden oder empfangen simultan widersprüchliche Signale, welche die Zellteilung verzögern bzw. aktivieren, wird in diesen Zellen Apoptose initiiert (EVAN und LITTLEWOOD, 1998). Die Todesfaktorrezeptoren der Säugetiere sind eine weitere Möglichkeit, Zellen gezielt zu zerstören. Die Beteiligung der Rezeptoren an der Apoptose ist vor allem in Zusammenhang mit dem Immunsystem essentiell (OSBORNE, 1996). Die auf der Zelloberfläche exponierten Rezeptoren übertragen ein apoptotisches Signal, indem sie nach Bindung ihres Liganden in Sekundenschnelle intrazelluläre Proteasen, sog. Caspasen (s. 1.5), aktivieren. So führen sie innerhalb von Stunden zum Tod der Zelle. Die Todesfaktorrezeptoren gehören zur großen Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) -Rezeptoren. Diese Familie ist durch den Besitz ähnlicher, cysteinreicher extrazellulärer Domänen gekennzeichnet (SMITH *et al.*, 1994). Sie weisen zudem eine homologe cytoplasmatische Sequenz auf, die *Death Domain* (DD), welche meist, aber nicht immer, die Apoptose-Maschinerie der Zelle in Gang zu bringen vermag (TARTAGLIA *et al.*, 1993; NAGATA, 1997). Diese Region ist auch in anderen, an der Apoptose beteiligten Proteinen vorhanden, wie z. B. RIP, TRADD und FADD (s. u.; NAGATA, 1997). Die Liganden der Todesfaktorrezeptoren sind strukturell verwandte Moleküle, die zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren gehören (SMITH *et al.*, 1994). Sie sind sowohl auf den Zelloberflächen als auch, nach Abspaltung eines transmembranen Bereichs, extrazellulär in löslicher Form zu finden (GEARING *et al.*, 1994).

Der bisher am besten charakterisierte Rezeptor wird als CD95 bezeichnet (auch Fas oder Apo1 genannt; KRAMMER, 1999). Es handelt sich dabei um ein transmembranes Glykoprotein, das insbesondere an der peripheren Deletion aktivierter T-Zellen am Ende der Immunantwort beteiligt ist. Bei diesem Schutzmechanismus werden überschüssige Lymphozyten im Anschluß an eine Immunreaktion eliminiert. Zu Beginn der Immunantwort verursacht die antigenspezifische Erkennung infizierter Zellen durch T-Zellen die Vernichtung ersterer sowie die anhaltende Aktivierung letzterer. Mit stetiger Abnahme infizierter Zellen und kontinuierlicher Zunahme aktivierter T-Zellen steigt die Wahrscheinlichkeit der T/T-Zellen Interaktion mit dem Resultat der durch Rezeptor-Liganden-Interaktion ausgelösten Apoptose dieser Zellen (GREEN und WARE, 1997). Außerdem spielt CD95 eine Rolle bei der Vernichtung von Krebszellen und virusinfizierten Zellen durch cytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (OEHM *et al.*, 1992; NAGATA, 1997).

Wie andere Mitglieder der TNF-Familie ist auch der CD95-Ligand (CD95L) ein Homotrimer, der drei CD95-Moleküle bindet (SMITH *et al.*, 1994). Diese Oligomerisierung führt die *Death Domains* (DD) des Rezeptor-Clusters zusammen, an welche jeweils ein Adaptermolekül FADD (*Fas-Associated Death Domain*) mit seiner eigenen *Death Domain* bindet (CHINNAIYAN *et al.*, 1995). Über eine weitere Domäne der Adapter, die *Death Effector Domain* (DED), die sich in analoger Form im Zymogen der Caspase-8 befindet, binden sie jeweils ein Molekül dieser Protease. Die *Death Effector Domain* ist ein spezifisches Beispiel für eine mehr globale, homophile

Interaktions-Domäne, die auch als CARD (*Caspase-Recruitment Domain*) bezeichnet und in vielen Caspasen angetroffen wird (HOFMANN *et al.*, 1997). Procaspasen besitzen nur eine geringe Aktivität, die aber in Folge ihrer Oligomerisierung ausreichend für ihre autokatalytische Spaltung und Aktivierung ist (THORBERRY und LAZEBNIK, 1998). Caspase-8 führt darauf zur Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen und letztendlich zum Zelltod durch den Abbau zellulärer, lebenswichtiger Proteine (MUZIO *et al.*, 1998; s. Abb. 1.2).

TNFR1 und Apo3 stellen zwei weitere, gut charakterisierte Rezeptoren mit hoher Sequenzhomologie dar (KITSON *et al.*, 1996). Die Bindung ihrer Liganden, TNF an TNFR1 bzw. Apo3L an Apo3, führt zu einer Trimerisierung der jeweiligen Rezeptoren und zur Assoziierung ihrer *Death Domains* (SMITH *et al.*, 1994). Das Adaptermolekül TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*) bindet darauf über seine *Death Domain* an die DD der geclusterten TNFR1- bzw. Apo3-Moleküle und eröffnet damit zwei Möglichkeiten: Die Bindung von FADD an TRADD und von Caspase-8 an FADD führt zur Aktivierung der Apoptose, während durch die Assoziation des *Receptor-Interacting Proteins* (RIP) mit TRADD und dem TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) über mehrere Schritte eine Aktivierung von NF- κ B (und zusätzlich JNK im Fall des TNFR1) erreicht wird. NF- κ B und JNK fördern schließlich die Expression antiapoptotischer Gene (ROTHER *et al.*, 1995; HSU *et al.*, 1996; CHINNAIYAN *et al.*, 1996; ASHKENAZI und DIXIT, 1998). Unterschiede zwischen den Systemen TNFR1/TNF einerseits, und Apo3/Apo3L andererseits ergeben sich hauptsächlich in der Expression und Lokalisation von Liganden und Rezeptoren (TARTAGLIA und GOEDEL, 1992; CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997). Trotz überlappender Signalwege scheinen daher beide Rezeptorsysteme distinkte biologische Rollen einzunehmen.

An die in vielen Geweben vorkommenden Rezeptoren DR4 und DR5 bindet ein weiteres Mitglied der TNF-Familie, welches als Apo2L bezeichnet wird und die höchste Homologie zu CD95L aufweist (WILEY *et al.*, 1995). Die Wirkungsweise dieses Liganden ist bisher kaum aufgeklärt, jedoch führt dessen Bindung zu einer Aktivierung von Caspasen, evtl. unter Beteiligung von Adaptermolekülen (MARSTERS *et al.*, 1996). In vielen Geweben werden Apo2L und DR4 bzw. DR5 konstitutiv exprimiert (WILEY *et al.*, 1995). Daher verfügen diese Zellen über einen einmaligen Schutz vor willkürlicher Apoptose-Induktion: Scheinrezeptoren (DcR1 und DcR2) mit großer Ähnlichkeit zu DR4 und DR5, jedoch ohne Signaltransduktionsfunktion, konkurrieren mit diesen um die Bindung des Apo2L (GOLSTEIN, 1997). Die Aktivität des Apo2L scheint jene des CD95L in der Weise zu komplementieren, daß Zellen mit Resistenz gegen einen Liganden besonders empfindlich gegenüber dem anderen sind (MARIANI *et al.*, 1997).

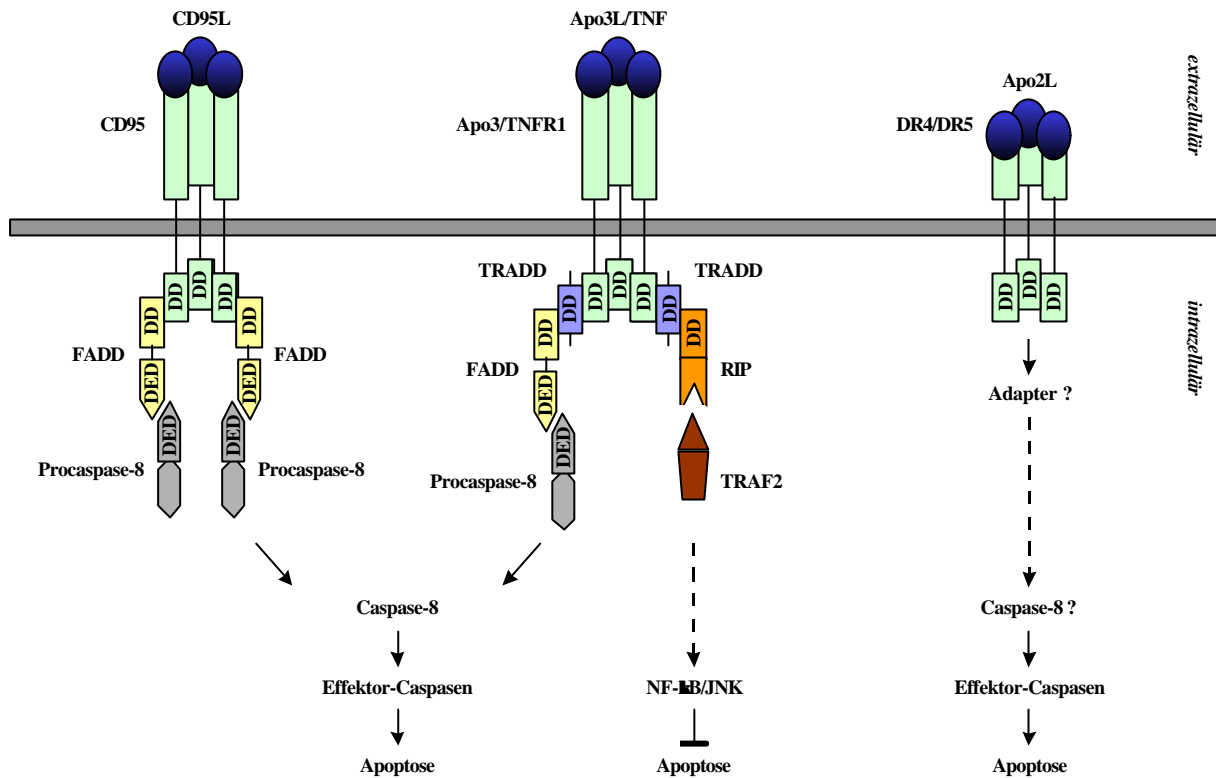


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der wichtigsten, über extrazelluläre Rezeptoren vermittelten, pro- und antiapoptotischen Signalwege (nach ASHKENAZI und DIXIT, 1998; modifiziert). Die durch Bindung der Liganden (dunkelblau) herbeigeführte Rezeptor-Oligomerisierung (hellgrün) erlaubt nach Kopplung entsprechender Adaptermoleküle (FADD [gelb], TRADD [blau]) über Death Domains (DD) die weitere Interaktion entweder über Death Effector Domains (DED) mit der Procaspase-8 (grau), welche daraufhin im oligomerisierten Zustand autokatalytisch aktiviert wird und Apoptose einleitet oder über Death Domains mit weiteren Adaptern (RIP [orange], TRAF2 [braun]), welche zur Aktivierung von NF- κ B/JNK führt, die die Expression antiapoptotischer Gene regulieren.

1.5 Caspasen: Effektoren der Apoptose

Vielfältige extra- oder intrazelluläre, den Tod auslösende Impulse laufen über verschiedene Wege in einer Kontrollstelle zusammen (s. 1.6) und führen schließlich zur Exekution der Zelle. An diesem Punkt setzt die Aktivierung der Caspasen ein, welche die typischen, die Apoptose begleitenden Veränderungen in der Zellstruktur hervorruft (s. 1.2). Durch den Nachweis der Verwandtschaft des am Zelltod von *C. elegans* beteiligten CED-3 (s. 1.3) mit dem *Interleukin-1 β -Converting Enzyme* (ICE, auch Caspase-1 genannt) der Säuger, wurden Caspasen mit der Apoptose in Verbindung gebracht (THORNBERRY *et al.*, 1992; YUAN *et al.*, 1993). Die ICE-Protease bewirkt durch Spaltung des IL-1 β Präkursors die Freisetzung von aktivem IL-1 β , welches am Entzündungsprozeß und anderen pathologischen Zuständen beteiligt ist (DINARELLO, 1991). Heute sind etwa 13 Mitglieder der Caspase-Familie bekannt, die sich aufgrund ihrer Spezifitäten in drei Subfamilien

einteilen lassen: Gruppe I (z. B. Caspase-1, -4 und -5), Gruppe II (z. B. Caspase-2, -3 und -7) sowie Gruppe III (z. B. Caspase-6, -8 und -10) (THORNBERRY *et al.*, 1997).

Alle Caspasen zeigen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität (NICHOLSON *et al.*, 1997). Sie werden als Proenzyme (Zymogene) exprimiert (30 – 50 kDa), welche über drei Domänen verfügen: eine N-terminale Prodomäne sowie zwei für eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine Untereinheit (ca. 10 kDa) kodierende Domänen. Bei einer Aktivierung der Enzyme werden die Domänen proteolytisch an Caspase-Konsensussequenzen voneinander getrennt. Diese Tatsache impliziert, daß die Aktivierung entweder in einem autokatalytischen Prozeß oder durch Caspasen mit ähnlicher Spezifität erfolgt. Im Anschluß an die Trennung vereinen sich die große und die kleine Untereinheit zu einem Heterodimer. Zwei Heterodimere bilden darauf einen aktiven Tetramer mit zwei unabhängigen katalytischen Zentren (WILSON *et al.*, 1994; ROTONDA *et al.*, 1996). An diesen Zentren sind Aminosäuren beider Untereinheiten in komplexer Weise beteiligt (WALKER *et al.*, 1994).

Die Länge der N-terminalen Prodomäne variiert von 23 AS (Caspase-6 und -7) bis 219 AS (Caspase-10). Caspasen mit großer Prodomäne (s. u.) werden als Initiator-Caspasen bezeichnet, da sie durch Aktivierung weiterer Caspasen die Effektorphase der Apoptose initiieren, während solche mit kleiner Domäne durch Initiator-Caspasen aktiviert und als Effektor-Caspasen tituliert werden (EARNSHAW *et al.*, 1999). Unterschiedliche proapoptotische Signale rufen eine Aktivierung spezifischer Initiator-Caspasen hervor. Dem Oligomerisierungs-Modell zufolge verursachen Adapterproteine eine räumliche Annäherung zweier oder mehrerer monomerer Procaspasen (s. **1.4** und **1.6.6.2**). Die geringe Protease-Aktivität der Procaspasen ist bei Ansammlung mehrerer Moleküle ausreichend, um eine intermolekulare, autokatalytische Aktivierung zu induzieren (GU *et al.*, 1995; MUZIO *et al.*, 1998). Aktivierte Initiator-Caspasen bewirken darauf in einer kaskadeartigen Reaktion die Aktivierung von Effektor-Caspasen und verursachen letztendlich den Tod der betroffenen Zelle (s. Abb. **1.3**).

Obwohl die Prodomänen der Initiator-Caspasen untereinander weniger Homologien zeigen als die katalytischen Segmente, können zwei Motive in dieser Region unterschieden werden: Die in den Caspasen-8 und -10 vertretene *Death Effector Domain* (DED), welche an der Interaktion mit DEDs der Adapterproteine FADD und TRADD (s. **1.4**) beteiligt ist, plaziert diese beiden Proteasen an die Spitze der Caspase-Kaskade (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 1996). Das gleiche gilt für die in den Caspasen-1, -2, -4 und -9 vorgefundene *Caspase-Recruitment Domain* (CARD; ALLEN *et al.*, 1998; KONOPLEVA *et al.*, 1999; s. **1.4**). Diese ist nachgewiesenermaßen im Fall der Procaspase-9 an einer Interaktion mit der CARD des Adapters Apaf-1 beteiligt (s. **1.3** und **1.6.6.2**), wodurch die Aktivierung der Protease induziert wird (LI *et al.*, 1997). Unter den Effektor-Caspasen nimmt vor allem die Caspase-3 eine zentrale Stellung innerhalb der Caspase-Kaskade ein, da sie direkt die Procaspasen-2, -6, und -7 prozessiert (SRINIVASULA *et al.*, 1996; FALEIRO *et al.*, 1997) und selbst von vielen Caspasen aktiviert wird, darunter Caspase-1, -8 und -10 (ENARI *et al.*, 1996).

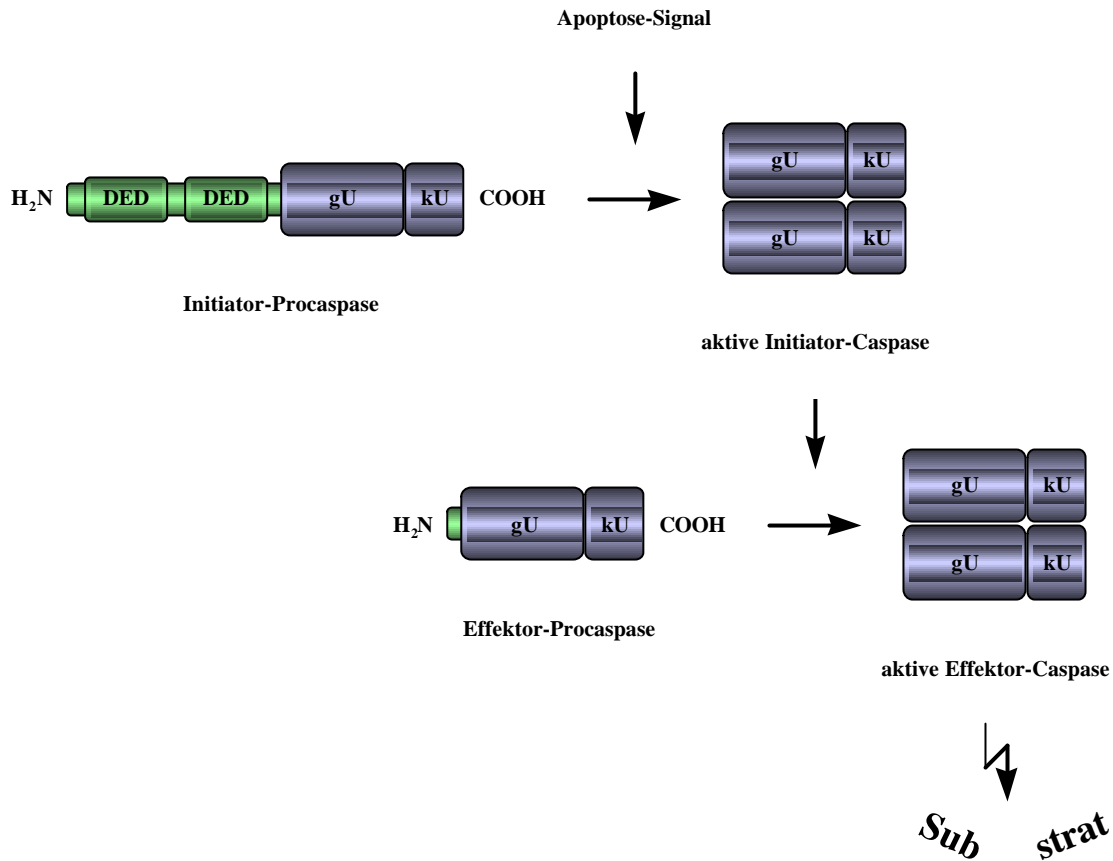


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Struktur von Initiator- und Effektor-Caspasen und der Aktivierung der Caspase-Kaskade. Prodomänen sind grün, große (gU) und kleine Untereinheiten (kU) blau gezeichnet. Anstelle der Death Effector Domain (DED) weisen andere Initiator-Caspasen eine Caspase-Recruitment Domain (CARD) auf.

Caspasen sind sehr spezifische Cysteinproteasen, welche immer C-terminal eines Aspartatrestes schneiden. Von den eukaryotischen Proteasen besitzt nur noch die Serinprotease Granzym B eine ähnlich hohe Spezifität (GREENBERG, 1996). Außerdem benötigen Caspasen zur proteolytischen Spaltung eine Erkennungssequenz N-terminal der Schnittstelle. Dieses Tetrapeptid-Motiv variiert zwischen den einzelnen Caspasen und erklärt die Diversität ihrer biologischen Funktion (THORNBERRY *et al.*, 1997). Aber nicht jedes Protein, welches diese Erkennungssequenz trägt, wird durch die jeweilige Caspase gespalten. Vielmehr scheint auch die Tertiärstruktur des Zielproteins in dem Erkennungsprozeß eine Rolle zu spielen. Diese Spezifität geht einher mit der Beobachtung, daß im Verlauf der Apoptose Proteine nicht wahllos verdaut werden, sondern nur bestimmte Proteine koordiniert, meist an nur einer Stelle, gespalten werden und dadurch ihre Funktion verlieren oder verändern (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998).

Die Auswirkungen der Caspasen sind mannigfaltig: Trennung von Zellkontakten, Reorganisation des Cytoskeletts, Hemmung von DNA-Reparatur und -Replikation sowie Freisetzung von Signalen, welche die Zelle für die Phagozytose markieren und damit letztendlich zur Bildung apoptotischer Körper führen. Um diese Effekte zu erzielen, verfolgen Caspasen daher mehrere

Strategien. Dazu gehört die Inaktivierung zellschützender Proteine, wie z. B. die Proteolyse des I^{CAD}, einem Inhibitor der Nuklease CAD (*Caspase Activated Deoxyribonuclease*), welche für die Fragmentierung von genomischer DNA verantwortlich ist (ENARI *et al.*, 1998). Auch Mitglieder der Bcl-2 Familie - Regulatoren der Apoptose (s. **1.6**) - werden durch Caspasen gespalten, wobei die resultierenden Fragmente wahrscheinlich proapoptotisch wirken (XUE und HORVITZ, 1997). Ebenso sind Caspasen an der Zerstörung zellulärer Strukturen beteiligt. Hierfür ist sowohl die Spaltung des am Aufbau der nukleären Lamina partizipierenden Lamins ein wichtiges Beispiel (ORTH *et al.*, 1996) als auch jene der an der Regulation des Cytoskeletts beteiligten Proteine (KOTHAKOTA *et al.*, 1997; WEN *et al.*, 1997; RUDEL und BOKOCH, 1997). Schließlich bewirken Caspasen die Inaktivierung bestimmter Enzyme, indem sie durch Proteolyse regulatorische und katalytische Domänen voneinander trennen. Ziele dieser Inaktivierung sind z. B. Enzyme für die DNA-Reparatur oder -Replikation (CRYNS und YUAN, 1998; RHEAUME *et al.*, 1997).

Eine Möglichkeit, die Caspase-Aktivität zu regulieren, stellen *FADD-Like ICE Inhibitory Proteins* (FLIPs) dar, welche ähnliche Sequenzen wie Caspasen aufweisen, jedoch kein funktionsfähiges katalytisches Zentrum besitzen. Sie kompetitieren mit den Caspasen um die Bindung von Adaptern und verhindern dadurch die Aktivierung der Proteasen (SHU *et al.*, 1997; IRMLER *et al.*, 1997). Neben der Kontrolle der Genexpression auf transkriptionaler Ebene ermöglichen auch die Kompartimentierung der Caspasen sowie der Bedarf von Adaptern eine gezielte Regulation der Caspase-Aktivität. Als inzwischen klassisches Beispiel wird hier die durch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (als Folge apoptotischer Stimuli) bewirkte Aktivierung der Caspase-9 angesehen (GREEN und REED, 1998; s. auch **1.6.6.2**). Schließlich sind auch Inhibitoren an der Kontrolle der Caspasen beteiligt. Ihre Wirkung erreichen diese, indem sie Schwellenwerte aktiver Caspasen festlegen. Erst bei deren Überschreiten wird Apoptose ausgelöst (RAY *et al.*, 1992; UREN *et al.*, 1998). Vor allem Vertreter, die apikal der Caspase-Kaskade sitzen, sind eher von Modifikationen durch endogene Regulator-Moleküle beeinflussbar als andere Vertreter, die den letzten und irreversiblen Schritt der Apoptose einleiten.

1.6 Die Bcl-2 Familie: Regulatoren der Apoptose

Die ständig wachsende Familie der Bcl-2 Proteine registriert diverse Formen intrazellulärer Schäden, erfaßt die von anderen Zellen gelieferten positiven oder negativen Stimuli und verarbeitet schließlich diese miteinander konkurrierenden Signale, um über das weitere Schicksal der Zelle zu entscheiden. Bestimmte Todessignale, wie z. B. manche der von den TNF-Rezeptoren in das Zellinnere geleiteten Signale, umgehen dabei die durch Bcl-2 Proteine kontrollierten Schritte (STRASSER *et al.*, 1995; s. auch **1.4**).

Mit Hilfe funktionaler und struktureller Analysen erwies sich Bcl-2, der Prototyp der großen Bcl-2 Familie, als Homolog des bei *C. elegans* antiapoptotisch wirkenden CED-9 (ELLIS und HORVITZ, 1986; VAUX *et al.*, 1992b; s. **1.3** und **1.6.1**). Im Hinblick auf den Nachweis der Homologen des

CED-3 und CED-4 bei Säugetieren war damit ein zusätzlicher Hinweis auf die Konservierung der Apoptose zwischen Nematode und Mensch geliefert, obwohl u. a. durch die Entdeckung weiterer Mitglieder der Bcl-2 Familie mit gegensätzlicher Wirkung deutlich wurde, daß dieser Prozeß im Verlauf der Evolution eine höhere Komplexität erreicht hatte. Diejenigen Proteine mit höchster Homologie zu Bcl-2 inhibieren Apoptose angesichts einer Vielfalt an cytotoxischen Einflüssen, entferntere Verwandte unterstützen dagegen den programmierten Zelltod (s. **1.6.2**). In der Tat beeinflußt das Verhältnis zwischen beiden die Anfälligkeit einer Zelle gegenüber einer Vielzahl von Todessignalen (OLTVAI *et al.*, 1993; s. **1.6.5**). Bcl-2 Proteine üben ihre Rolle als Regulatoren sowohl bezüglich der sich im Verlauf des programmierten Zelltods ergebenden Organell-Dysfunktionen als auch der Aktivierung vieler Caspasen aus (s. **1.6.6**). In beiden Fällen basiert die Funktion der Bcl-2 Proteine auf ihrer Fähigkeit sowohl zur Homo- als auch zur Heterodimerisierung sowie auf dem Potential vieler Familienangehöriger, in Membranen zu inserieren und Poren zu bilden (s. **1.6.3** und **1.6.4**). Eine Regulation der Bcl-2 Proteine erfolgt schließlich auf transkriptionaler Ebene, durch posttranslationale Modifikationen und durch die Bindung von Effektormolekülen (s. **1.6.7**).

1.6.1 Bcl-2: der Prototyp einer großen Familie

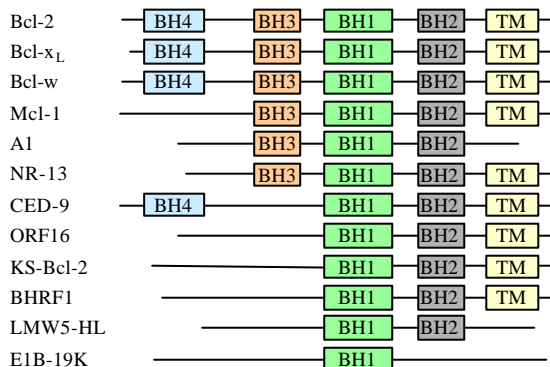
Das B-Zellen Lymphom/Leukämie Gen 2, besser bekannt als *bcl-2*, wurde ursprünglich aufgrund seiner Beteiligung an malignen Lymphomen der B-Zellreihe identifiziert (TSUJIMOTO *et al.*, 1985). Infolge einer t(14:18) chromosomalen Translokation wird hierbei das *bcl-2* Gen aus seiner üblichen Position neben den Locus der schweren Kette des Immunglobulins transloziert. Dadurch gerät es unter den Einfluß starker Enhancer-Elemente dieser Region, welche eine Überexpression des Bcl-2 verursachen (SETO *et al.*, 1988). *Bcl-2* repräsentiert daher eine neue Klasse der Onkogene, die neoplastisches Wachstum nicht durch Förderung der Zellproliferation, sondern durch Unterdrückung des Zelltods ermöglichen (MCDONNELL, 1993). Vaux *et al.* waren die ersten, die bei einer Bcl-2 Überexpression ein verlängertes Überleben der Zellen nachweisen konnten. Il-3-abhängige Zellen konnten *in vitro* auch ohne Zugabe von exogenem Il-3 überleben, sofern sie Bcl-2 exprimierten (VAUX *et al.*, 1988). Seitdem wurde für viele Zelllinien die Hemmung des von einer Vielzahl an Faktoren induzierten Zelltods durch Bcl-2 festgestellt (THOMPSON, 1995; MERRY und KORSMEYER, 1997). Jedoch nicht jeder derart eingeleitete Zelltod läßt sich von Bcl-2 inhibieren. Umgekehrt hat die Abwesenheit dieses Proteins nicht unweigerlich den Tod der Zelle zur Folge (VAUX *et al.*, 1992a; KITADA *et al.*, 1993). Dies impliziert die Beteiligung weiterer Proteine an der Aktivierung und Hemmung der Apoptose.

1.6.2 Die Bcl-2 Homologie Domänen

Wenigstens 15 Mitglieder der Bcl-2 Familie wurden bisher in Säugetierzellen nachgewiesen und mehrere andere in Viren (CORY, 1995; YANG und KORSMEYER, 1996; CHAO und KORSMEYER, 1998). Alle Mitglieder besitzen mindestens eines von vier konservierten Motiven, die auch als Bcl-2 Homologie Domänen (BH1 - BH4) bezeichnet werden (ADAMS und CORY, 1998; KELEKAR und THOMPSON, 1998). Die meisten pro-survival Mitglieder weisen mindestens die Domänen BH1 und BH2 auf, solche mit größter Ähnlichkeit zu Bcl-2 (26 kDa) verfügen über alle vier Domänen. Proapoptotische Mitglieder sind durch eine geringere Sequenzhomologie gekennzeichnet und werden in zwei Subfamilien eingeteilt: Die Mitglieder der ersten, der Bax Subfamilie, zeigen noch eine relativ hohe Ähnlichkeit zu Bcl-2 und sind mit den Domänen BH1 - BH3 versehen. Die Mitglieder der zweiten Subfamilie besitzen dagegen nur die Domäne BH3 (daher BH3-Domänen Subfamilie) und weisen sonst sowohl untereinander als auch bezüglich anderer Proteine kaum eine Verwandtschaft auf (ADAMS und CORY, 1998).

Antiapoptotisch

Bcl-2 Subfamilie



Proapoptotisch

Bax Subfamilie

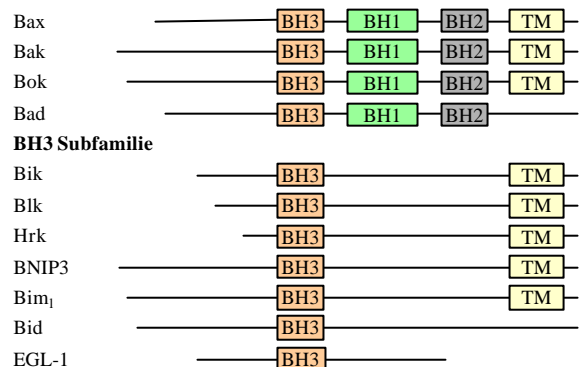


Abb. 1.4: Domänenstruktur der pro- und antiapoptotischen Vertreter der Bcl-2 Subfamilien. BH1 bis BH4 stellen konservierte Sequenzmotive und TM einen transmembranen Bereich dar. Mit Ausnahme von NR-13 (*Gallus gallus*), Ced-9, EGL-1 (*C. elegans*) und ORF16, KS-Bcl-2, BHRF1, LMW5-HL, E1B-19K (alle viral) handelt es sich um Säugetierproteine.

In Deletions- und Mutagenese-Studien wurde die Präsenz der amphipatischen, α -helikalen BH3-Domäne als unverzichtbare Voraussetzung für eine Apoptose-Induktion nachgewiesen. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß alle Bcl-2 Proteine, welche nur die BH3-Domäne besitzen, proapoptotisch sind (GROSS *et al.*, 1999). Die Größe der Domänen im Vergleich einzelner Vertreter ist variabel. Sind alle vier Domänen vorhanden, befindet sich BH4 dem N-Terminus am nächsten, in carboxyterminaler Richtung gefolgt von BH3, BH1 und schließlich BH2. Ein transmembraner, hydrophober Bereich, sofern existent, befindet sich am C-Terminus. Dieser ermöglicht die posttranslationale Verankerung der Proteine in Organellen-Membranen und bewirkt die Orientierung der Proteine zum Cytoplasma hin (TSUJIMOTO und CROCE, 1986; CHEN-LEVY und CLEARY, 1990).

1.6.3 Strukturelle Grundlagen intrafamiliärer Interaktionen

Eine herausragende Eigenschaft der Bcl-2 Proteine ist die Fähigkeit zur Hetero- und Homodimerisierung (OLTVAI *et al.*, 1993; SEDLAK *et al.*, 1995; ZHA *et al.*, 1996a). Die Aufklärung der 3D-Struktur des Bcl-x_l (ein dem Bcl-2 in Aminosäuresequenz und Funktion sehr nahestehendes Protein) durch NMR- und röntgenkristallographische Untersuchungen lieferte eine Erklärung, weshalb die Domänen BH1 bis BH3 Dimerisierungen entscheidend beeinflussen (YIN *et al.*, 1994; CHITTENDEN *et al.*, 1995a): Durch den Zusammenschluß der α -Helices dieser Domänen bildet sich ein hydrophober Spalt. In einer Reaktion, welche stark an eine Rezeptor-Liganden-Interaktion erinnert, bindet die amphipatische α -Helix der BH3-Domäne eines dimerisierenden Bcl-2 Proteins (z. B. des Bax, dem Prototyp der proapoptotischen Bax Subfamilie) an diesen Spalt (MUCHMORE *et al.*, 1996; DIAZ *et al.*, 1997). Damit ist die BH3-Domäne sowohl an der Taschenbildung des "Rezeptors" als auch an der in die Tasche inserierenden Helix des "Liganden" beteiligt. Die hydrophobe Seite der BH3-Domäne des Bax ist jedoch so tief im Molekül verborgen, daß eine Interaktion mit Bcl-x_l erst nach einer Konformationsänderung des Bax in Folge eines Todessignals möglich wird (SATTLER *et al.*, 1997). Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß Bcl-2 Proteine, insbesondere solche mit proapoptotischer Funktion wie die Mitglieder der Bax Subfamilie, alternative Konformationen eingehen können. Ein dimerisierender Partner spielt hierbei die Rolle des Liganden (mit nach außen gestülpter BH3-Domäne), der andere die des Rezeptors - ähnlich des Bcl-x_l - (REED, 1997). Somit können Bcl-2 Familienmitglieder in zwei konformationsabhängige Untergruppen eingeteilt werden: solche mit freiliegendem und solche mit verborgenem BH3 (MCDONNELL *et al.*, 1999). Möglicherweise sind alle Bcl-2 Proteine mit verborgener BH3-Domäne antiapoptotische oder inaktive proapoptotische Moleküle. Umgekehrt wären Moleküle mit freiliegender BH3-Domäne konstitutiv aktiv (proapoptotisch). Außerdem würden nach diesem Modell inaktive oder sogar proapoptotische Moleküle im Anschluß an ein Todessignal durch Freilegung der BH3-Domäne aktiv werden (GROSS *et al.*, 1999).

1.6.4 Strukturelle Grundlagen der Porenbildung

Die Wirkung vieler Mitglieder der Bcl-2 Familie läßt sich nicht alleine durch intrafamiliäre Interaktionen begründen: Zwar ist eine Heterodimerisierung für die proapoptotische Aktivität der Mitglieder der BH3-Domänen Gruppe unerlässlich (CHITTENDEN *et al.*, 1995a), für die Mitglieder der zweiten proapoptotischen Subfamilie, der Bax Subfamilie, ist sie dagegen nicht zwingend. Vielmehr können die Vertreter dieser Gruppe einen von antiapoptotischen Mitgliedern unabhängigen, cytotoxischen Effekt ausüben, z. B. die Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials (GREEN und REED, 1998; s. 1.6.6.2). Auch für antiapoptotische Bcl-2 Proteine ist eine Heterodimerisierung für die Ausübung der pro-survival Funktion nicht zwingend erforderlich (CHENG *et al.*, 1996).

Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene lieferten die Untersuchungen von MUCHMORE *et al.* (1996) an der räumlichen Struktur des Bcl-x₁. Hierbei wurden bei Bcl-x₁, in seiner membranständigen Konformation, sieben α -Helices in einer Anordnung nachgewiesen, welche an die transmembranen Domänen porenbildender bakterieller Toxine und des Diphtherie-Toxins erinnert. In Zusammenhang mit der Lokalisation des Bcl-2 an Stellen, an denen sich innere und äußere Mitochondrien-Membranen annähern, deutet dies auf eine Fähigkeit zur Ionenkanalbildung hin (REED, 1994). In der Tat sind Bcl-2, Bax und Bcl-x₁ in der Lage, in synthetischen Membranen Ionenkanäle zu formen, jedoch nicht, wenn zwei an der Porenbildung beteiligte und zentral liegende Helices (α 5 und α 6) deletiert wurden (SCHENDEL *et al.*, 1997). Über die Möglichkeit der Porenbildung wären die Bcl-2 Proteine somit in der Lage, die Homöostase einer Zelle durch Veränderung der Membran-Permeabilität zu beeinflussen (KROEMER, 1997a).

1.6.5 Modell zur multifunktionalen Wirkungsweise der Bcl-2 Familie

Anhand der in 1.6.3 und 1.6.4 erläuterten strukturellen und funktionalen Untersuchungen lassen sich für die Bcl-2 Homologen folgende Wirkungsmechanismen vermuten: Mitglieder der BH3-Domänen Subfamilie (z. B. EGL-1, Bik und Bid), denen die hydrophoben Kernhelices fehlen, agieren *upstream* als *Death Ligands*, indem sie antiapoptotische Bcl-2 Proteine binden und somit deren Funktion neutralisieren (BH3-Domänen Gruppe mit Ligandenfunktion). Im Gegensatz dazu besitzt der andere Teil der proapoptotischen Moleküle, die Bax Subfamilie, die konservierten Domänen BH1 und BH2 inklusive ihrer hydrophoben Kernhelices α 5 und α 6. Diese erlauben eine Integration in Membranen (insbesondere mitochondriale) und die Auslösung cytotoxischer Effekte, unabhängig von antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen. Die Bax Subfamilie arbeitet daher parallel oder *downstream* von Bcl-2/Bcl-x₁. Mittels der BH3-Domäne ist allerdings auch die Bindung und Inhibierung antiapoptotischer Proteine möglich (Poren- und Ligandenfunktion).

Mitglieder der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie übernehmen durch den Besitz der Domänen BH1, BH2 und BH3 sowohl die Funktion der Porenbildung als auch die des BH3-Akzeptors (Poren- und Rezeptorfunktion). Der antiapoptotische Effekt der Bcl-2 Subfamilie wird dabei einerseits durch Heterodimerisierung mit porenbildenden Mitgliedern der Bax Subfamilie erreicht, deren proapoptotische Wirkung durch diese Interaktion inhibiert wird, andererseits indem sie durch ihre Fähigkeit der Porenbildung an der Wiederherstellung der Homöostase geschädigter Organellen beteiligt sind.

1.6.6 Verknüpfung von Lokalisation und Funktion der Bcl-2 Familie

Viele proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie weisen im Vergleich zu antiapoptotischen Mitgliedern eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation auf. Erstere befinden sich meist vor

Eintreffen eines apoptotischen Signals im Cytosol bzw. am Cytoskelett (GROSS *et al.*, 1998; PUTHALAKATH *et al.*, 1999), während letztere überwiegend in den Membranen von Mitochondrien, aber auch von ER und Nukleus, anzutreffen sind (HOCKENBERY *et al.*, 1990; KRAJEWSKI *et al.*, 1993; ZHU *et al.*, 1996). Im Anschluß an ein Todessignal unterziehen sich die proapoptotischen Mitglieder einer Konformationsänderung, welche ihnen nicht nur die Interaktion mit ihren antiapoptotischen Gegenspielern erlaubt (s. **1.6.3**), sondern potentiell auch die Membran-Integration ermöglicht (s. **1.6.4**; DESAGHER *et al.*, 1999). Bereits unter **1.2** wurde gezeigt, daß sich der Prozeß der Apoptose aus einer Vielzahl komplexer Reaktionen zusammensetzt, welche nicht nur eine zeitliche, sondern auch eine räumliche Determinierung aufweisen. Die membranständige Lokalisation der Bcl-2 Proteine erlaubt ihnen den regulativen Eingriff in die fundamentalen Reaktionen, welche sich im Verlauf der Apoptose in den Zellorganellen abspielen. Dabei ist die Modifizierung des transmembranen Transports kleiner Moleküle und Proteine mit Signalfunktion von entscheidender Bedeutung (KROEMER, 1997a; GREEN und REED, 1998). Die Untersuchungen in diesem Zusammenhang stehen allerdings erst am Anfang und konzentrieren sich bisher meist auf den Einfluß der Bcl-2 Proteine auf mitochondriale und postmitochondriale Prozesse.

1.6.6.1 Regulation mitochondrialer Prozesse durch die Bcl-2 Familie im Verlauf der Apoptose

Apoptose manifestiert sich im Anschluß an ein Todessignal hauptsächlich durch die Vollstreckung zweier Mechanismen, welche den Tod der Zelle nach sich ziehen: die Aktivierung der Caspase-Kaskade (s. **1.5** und **1.6.6.2**) sowie Organell-Dysfunktionen, von welchen die mitochondriale Dysfunktion bisher am häufigsten beschrieben wurde (GREEN und REED, 1998). Der Zusammenbruch des transmembranen Potentials der inneren Mitochondrien-Membran stellt ein wichtiges Charakteristikum im Verlauf der Apoptose dar (KROEMER *et al.*, 1997). Dieser Vorgang läßt sich wahrscheinlich auf das Öffnen eines Membran-Kanals zurückführen, welcher als mitochondriale PT- (*Permeability Transition*) Pore bezeichnet wird und aus geclusterten Komponenten der inneren und äußeren Membran besteht (BERNARDI *et al.*, 1994; PETIT *et al.*, 1996).

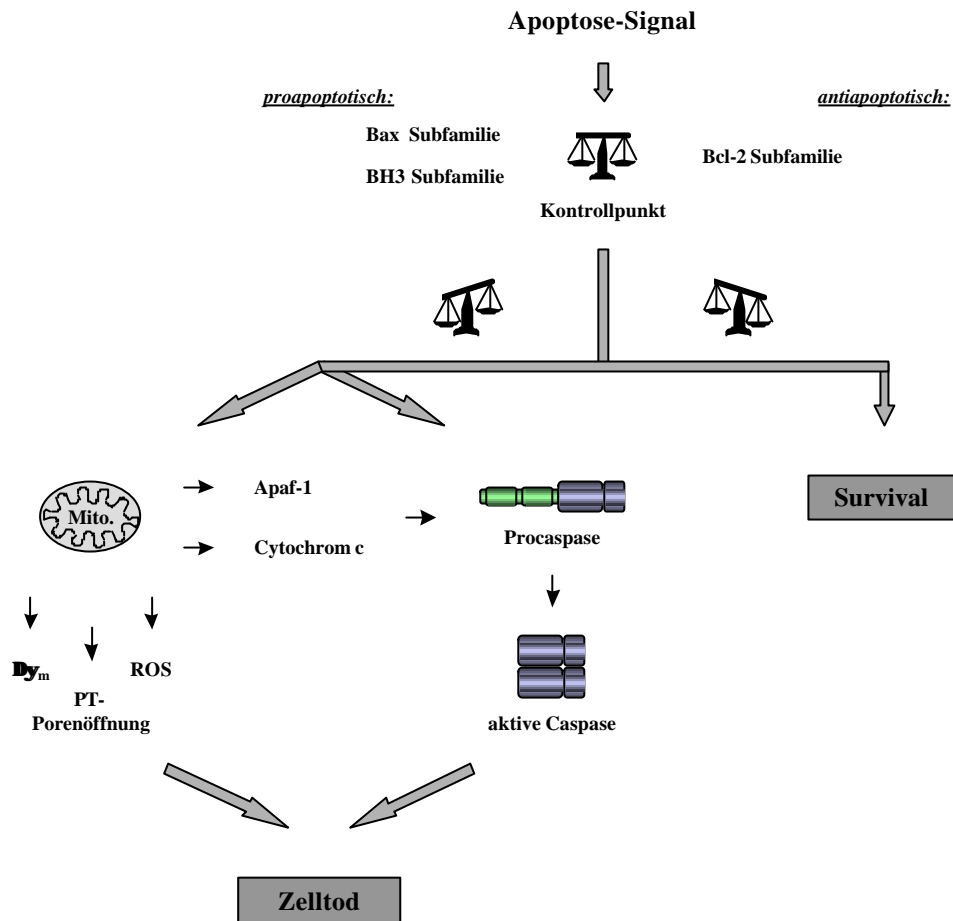


Abb. 1.5: Schematisches Modell zur Regulation mitochondrialer Vorgänge durch die Bcl-2 Familie im Verlauf der Apoptose. Apoptotische Stimuli passieren einen Kontrollpunkt, welcher sich aus Angehörigen der Bcl-2 Familie zusammensetzt. Das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen entscheidet über das weitere Schicksal der Zelle. Überwiegen antiapoptotische Mitglieder, ist das Überleben der Zelle gesichert. Ein Überwiegen proapoptotischer Mitglieder führt dagegen zur Apoptose durch Caspase-Aktivierung (s. 1.5) und mitochondriale Dysfunktionen. Letztere umfassen eine verstärkte ROS-Produktion, Verlust des Membranpotentials Δy_m , Öffnung der PT-Pore und Freisetzung von Apaf-1 und Cytochrom c, welche ebenfalls eine Caspase-Aktivierung induzieren.

Die Öffnung der PT-Pore - als ein nichtselektiver Kanal der inneren Membran - erlaubt den Austausch von Ionen zwischen Matrix und Intermembranraum, wodurch der H^+ -Gradient zusammenbricht und die Atmungskette entkoppelt wird. Gleichzeitig bewirkt der ungehinderte Einstrom von Wasser in den hyperosmolaren Matrixraum ein Anschwellen und schließlich ein Aufbrechen der Mitochondrien. Dadurch werden Caspasen, apoptoseinduzierende Faktoren und Cytochrom c in das Cytoplasma entlassen (LIU *et al.*, 1996; SUSIN *et al.*, 1999). In vielen Mitochondrien ist daraufhin noch immer genug Cytochrom c vorhanden, so daß der Elektronentransport aufrechterhalten und ATP produziert wird, während anderenorts in der Zelle Caspasen bereits ihre cytosolischen und nukleären Substrate umsetzen (GREEN und REED, 1998). Eine Freisetzung apoptoseinduzierender Faktoren aus dem Intermembranraum läßt sich auch mit dem Öffnen von entsprechend großen, in der äußeren Membran befindlichen Poren erklären und würde

damit der Tatsache Rechnung tragen, daß viele Mitochondrien im Verlauf der Apoptose nicht anschwellen, sondern intakt bleiben (WYLLIE *et al.*, 1980). Nicht zuletzt haben die während der Apoptose auftretenden Störungen der Atmungskette auch die Entstehung cytotoxischer ROS (*Reactive Oxygen Species*) zur Folge, da jeder Vorgang, der die Effektivität des Elektronentransports verringert, gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Sauerstoffradikalen erhöht (HOCKENBERY *et al.*, 1993; BREDESEN, 1995).

Die Beteiligung der Bcl-2 Homologen an den oben geschilderten mitochondrialen Ereignissen ist unbestritten (XIANG *et al.*, 1996; ZAMZAMI *et al.*, 1996). Die genauen Wirkungsmechanismen hierzu sind allerdings noch ungewiß, beruhen aber sowohl auf der Fähigkeit der Bcl-2 Proteine zur Dimerisierung als auch der Porenbildung. Außerdem ist die Möglichkeit der Regulation bereits bestehender Poren (z. B. der PT-Pore) nicht von der Hand zu weisen (VANDER-HEIDEN *et al.*, 1997). Damit ließe sich für proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie bei Eintreffen eines entsprechenden Signals eine Induktion der Porenöffnung bzw. die Bildung eigener Poren mit gleichem cytotoxischem Effekt vermuten (SUSIN *et al.*, 1997). Antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder würden dagegen die Porenöffnung blockieren bzw. eigene Poren bilden, um die Homöostase der Organellen wiederherzustellen und evtl. sogar entwichenes Cytochrom c in die Mitochondrien zurückzuführen (YANG *et al.*, 1997). In diesem Modell entscheidet also der relative Gehalt aktiver pro- und antiapoptotischer Bcl-2 Proteine über das weitere Schicksal der Zelle (s. Abb. 1.5).

1.6.6.2 Regulation postmitochondrialer Prozesse durch die Bcl-2 Familie im Verlauf der Apoptose

Bei dem Nematoden *C. elegans* liegen CED-9, CED-4 und proCED-3, der CED-3 Vorläufer, in einer gesunden Zelle als inaktiver Komplex vor (CHINNAIYAN *et al.*, 1997). Dieser trimolekulare Komplex wird durch einen proapoptotischen Stimulus auf bisher unbekannte Weise aufgelöst. Daraufhin geht CED-4 nicht nur eine Bindung mit proCED-3 ein, sondern ist auch in der Lage, ein weiteres CED-4 Molekül zu binden. Durch diese Oligomerisierung liegt eine Reihe von proCED-3 Molekülen in enger Nachbarschaft und schafft damit die Voraussetzung für deren autokatalytische Prozessierung und Aktivierung (s. 1.5). Die Bindung des CED-9 an CED-4 verhindert dagegen die Oligomerisierung des CED-4 und bewahrt CED-3 damit in seiner inaktiven, monomeren Form.

Bei Säugetieren scheinen die Homologen des CED-9, CED-4 und CED-3 (Bcl-2/Bcl-x₁, Apaf-1 und Caspase-9) den gleichen Regeln zu folgen, jedoch mit einer zusätzlichen Beteiligung des Cytochrom c: Durch die Bindung von Bcl-2 oder Bcl-x₁ an Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*, dem CED-4 Homolog der Säugetiere) wird die Interaktion zwischen den CARDS (*Caspase-Recruitment Domain*) des Apaf-1 und der Procaspase-9 verhindert. Somit wird die Aktivierung der Caspase unterbunden (VAUX, 1997). Ein Stimulus in Form von proapoptotischen Bcl-2 Homologen (insbesondere Mitglieder der BH3-Domänen Gruppe) und von aus den

Mitochondrien entlassenem Cytochrom c löst, bei Anwesenheit von ATP, Apaf-1 von seiner Bindung an den Apoptose-Inhibitor Bcl-2 oder Bcl-x₁ (PAN *et al.*, 1998; HU *et al.*, 1998). Cytochrom c gehört zu den wichtigsten apoptoseinduzierenden Faktoren, die im Anschluß an ein entsprechendes Signal aus den Mitochondrien ins Cytoplasma entlassen werden und bildet zusammen mit Apaf-1 und der Procaspase-9 einen als Apoptosom bezeichneten Komplex (LIU *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997). Die dadurch ermöglichte Oligomerisierung mehrerer Apaf-1/Procaspase-9 Moleküle bewirkt die autokatalytische Prozessierung der Caspase und die Aktivierung der Caspase-Kaskade (ZOU *et al.*, 1997).

Auch postmitochondrial entscheidet die relative Konzentration pro- und antiapoptotischer Bcl-2 Proteine über das weitere Schicksal der Zelle, da ein Überschuß an Bcl-2/Bcl-x₁ die durch Cytochrom c und proapoptotische Bcl-2 Proteine induzierte Freisetzung des Apaf-1 und die damit verbundene Aktivierung der Caspasen verhindert (CHINNAIYAN *et al.*, 1997). Ein Überschuß an Mitgliedern der BH3 Subfamilie bewirkt dagegen die Auflösung dieser chaperonähnlichen Verbindung (HU *et al.*, 1998).

1.6.7 Regulation der Bcl-2 Proteine

Die beschriebenen Wirkungsmechanismen und Interaktionen (s. **1.6.6**) verdeutlichen, daß die jeweiligen Konzentrationen der zur Verfügung stehenden, funktionsfähigen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteine die Reaktion einer Zelle auf einen apoptotischen Stimulus beeinflussen (OLTVAI *et al.*, 1993). An der Regulation der Aktivität dieser Apoptose-Regulatoren sind neben den vielfältigen Homo- und Heterodimerisierungszuständen der Bcl-2 Proteine (s. **1.6.3**) vor allem posttranslationale Modifikationen beteiligt (KONOPLEVA *et al.*, 1999). Hierbei hat insbesondere der Phosphorylierungszustand einen Einfluß auf die Aktivität der Bcl-2 Familienmitglieder: Viele proapoptotische Bcl-2 Homologe liegen vor einem apoptotischen Stimulus als phosphorylierte, inaktive Monomere im Cytosol vor oder sind mit dem Cytoskelett assoziiert. Die im Anschluß an einen Stimulus erfolgende, durch Dephosphorylierung induzierte Konformationsänderung dieser Proteine erlaubt ihre subzelluläre Translokation zu den Organellen-Membranen. Dabei gelangen die Bcl-2 Proteine in die Reichweite ihrer membranständigen, funktionalen Antagonisten, welche im Anschluß an eine Dimerisierung in ihrer Funktion inhibiert werden (GOPING *et al.*, 1998; PUTHALAKATH *et al.*, 1999). Eine besondere Bedeutung kommt hier dem Bad zu, einem BH3 Subfamilienmitglied, welches ursprünglich im Cytosol durch Bindung an ein 14-3-3 Protein zurückgehalten wird (ZHA *et al.*, 1996b). Als Folge eines Todessignals (z. B. IL-3 Entzug) wird Bad dephosphoryliert, worauf die dadurch induzierte Konformationsänderung eine Freilegung der BH3-Domäne, eine Translokation zu den Mitochondrien und die Interaktion mit Bcl-x₁/Bcl-2 ermöglicht (KELEKAR *et al.*, 1997; ZHA *et al.*, 1997). Durch die Assoziation von Bad mit Bcl-x₁ wird das von Bcl-x₁ gebundene Bax freigesetzt, welches daraufhin seine proapoptotische Wirkung ausüben kann (LINCZ, 1998). Bis heute wurde die Beteiligung mehrerer Kinasen/Phosphatasen an

der Phosphorylierung/Dephosphorylierung des Bid beschrieben (DATTA *et al.*, 1997; DEL-PESO *et al.*, 1997; BLUME-JENSEN *et al.*, 1998). Da diese Enzyme häufig selbst Bestandteil der unterschiedlichsten Signaltransduktionswege sind, die u. a. durch externe Stimuli aktiviert werden, scheint Bid ein Bindeglied zwischen diesen und der restlichen Bcl-2 Familie darzustellen. Nicht nur bei proapoptotischen, sondern auch bei antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen wurde eine durch Phosphorylierung induzierte Konformationsänderung beobachtet, welche diese Proteine ebenfalls in einen funktional inaktiven Zustand überführt (HALDAR *et al.*, 1995; CHANG *et al.*, 1997).

Eine alternative Möglichkeit posttranslationaler Modifikationen mit anschließender Aktivierung stellt die durch eine Caspase katalysierte proteolytische Abspaltung des N-Terminus einiger Bcl-2 Proteine dar (LI *et al.*, 1998). Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung des Restproteins erlaubt dessen Translokation zu den Mitochondrien und zu anderen Organellen. Im Fall des Bid, einem proapoptotischen BH3 Subfamilienmitglied, ist dessen gekappte Form potentiell an der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien beteiligt (MCDONNELL *et al.*, 1999).

Eine Regulierung der Aktivität vieler Familienmitglieder vollzieht sich ebenfalls durch die direkte Bindung signaltransduzierender Proteine - z. B. RAF-1 oder Prion-Protein PrP - an die BH4-Domäne (LINCZ, 1998).

Unabhängig von posttranslationalen Modifikationen und/oder Konformationsänderungen erfolgt schließlich eine Regulation der Bcl-2 Proteine auf transkriptionaler Ebene. Um Toxizität in gesunden Zellen zu verhindern, wird so die Transkription einiger konstitutiv aktiver, proapoptotischer Proteine erst bei Eintreffen eines apoptotischen Signals initiiert (INOHARA *et al.*, 1997). Aber auch die Expression vieler antiapoptotischer Proteine (z. B. Bcl-x_l, Bcl-2 und MCL-1) wird unter bestimmten Bedingungen transkriptional reguliert (BOISE *et al.*, 1995; KOZOPAS *et al.*, 1993).

1.7 Porifera

1.7.1 Biologie der Schwämme

Die Porifera (vom lateinischen *porus* = Pore und *ferre* = tragen) gehören zu den ältesten multi-zellulären Organismen (Metazoa). Fossile Funde weisen auf eine Existenz schon vor 550 Millionen Jahren hin (REITNER und MEHL, 1995), molekularbiologische Analysen lassen sogar auf ein Alter von etwa 800 Millionen Jahren schließen (WILLMER 1994; MÜLLER, 1995). Seit ihrem Erscheinen vor der "Kambrischen Explosion" (CONWAY-MORRIS, 1998) haben einige Taxa der Porifera, z. B. der Taxon Geodiidae, bis heute überdauert (GRUBER und REITNER, 1991).

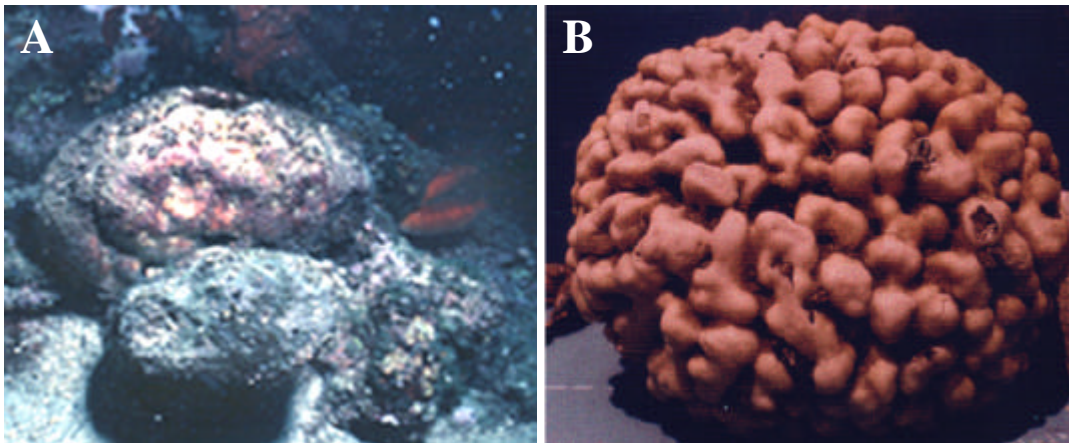


Abb. 1.6: Der marine Schwamm *Geodia cydonium* in seinem natürlichen Habitat auf für Demospongien typischem, felsigem Untergrund in ca. 25 m Tiefe (A) und in gereinigter Form (B). Durchmesser etwa 45 cm.

Bei den Schwämmen handelt es sich um sessile, aquatische Organismen von häufig unregelmäßiger Gestalt. Sie bilden einen der größten, im marinen Benthos auf harten Gründen angesiedelten Tierstämme, sowohl bezüglich der Biomasse als auch der Speziesvielfalt (SARÀ und VACELET, 1973). Mit Ausnahme der Süßwasserschwämme (etwa 120 Arten) besiedeln ca. 9000 bisher bekannte Schwammarten alle Weltmeere. Nach LAFAY *et al.* (1992) werden Schwämme in zwei Unterreiche eingeteilt. Das Unterreich der Symplasma beinhaltet lediglich die Klasse der Hexactinellida (Glasschwämme), während jenes der Cellularia die Klassen der Calcarea (Kalkschwämme) und der Demospongiae (Kieselschwämme) umfaßt. 80 - 90 % aller Arten werden dabei den Kieselschwämmen zugeordnet, die sowohl in den Gewässern der Küstenregion als auch in Tiefen bis zu 8600 m gefunden werden (GRUNER *et al.*, 1993). Die Klasse der Calcarea dagegen zieht ein Leben fast ausschließlich in flachen Zonen vor (bis zu 100 m Tiefe), indes Glasschwämme meistens in größeren Tiefen vorgefunden werden (KÄSTNER, 1993; BERGQUIST, 1978).

Häckel postulierte 1866 erstmals die Zugehörigkeit der Porifera zu den Metazoen, von welchen sie sich jedoch durch das Fehlen von Nervensystem, Muskulatur, Blutgefäßen und Organen unterscheiden. Als Filtrierer nehmen Schwämme Wasser durch ein System zahlreicher kleiner Einstromöffnungen (Ostien) auf und filtern Nahrungspartikel (Plankton, Algen und Bakterien) über Kanäle und Geißelkammern ab. Nahrung wird dabei endocytotisch aufgenommen und intrazellulär verdaut. Exkrete und Exkreme werden exocytotisch an das Wasser abgegeben, das schließlich den Organismus über größere Öffnungen (Oscula) wieder verläßt. Im Schwamm lebende Mikrosymbionten (Grünalgen, Bakterien und Cyanobakterien) tragen häufig zur Ernährung bei (WILKINSON *et al.*, 1980). Abhängig von der Größe des Schwamm-Organismus' kann die Filterkapazität mehrere tausend Liter pro Tag betragen (VOGEL, 1977), wobei die Wasseraufnahme sowohl passiv durch Wasserströmung als auch aktiv durch den koordinierten Geißelschlag spezialisierter Zellen, den Kragengeißelzellen (Choanocyten), erfolgen kann. Aufgrund der unterschiedlichen Komplexität des Kanalsystems werden bei Schwämmen drei Organisationstypen

unterschieden: Ascon-, Sycon- und Leucontyp. Die einfachsten Schwämme gehören dem Ascon-Typ an und bestehen lediglich aus einem poredurchbrochenen, mit Choanocyten besetzten Schlauch und einem distalen Osculum. Beim Sycon-Typ weist ein Zentralraum radiäre Ausbuchtungen auf, deren Wände mit Kragengeißelzellen besetzt sind. Schwämme, bei denen diese Geißelkammern nicht direkt, sondern über ein verzweigtes Kanalsystem in den Gastralraum münden, werden dem komplexen Leucon-Typ zugeordnet.

Das von dem Kanalsystem durchzogene Mesohyl des Körperinneren wird von einem Außenepithel (Pinacoderm) und einem alle Kanalwandungen umkleidenden Innenepithel (Choanoderm) begrenzt. Bei beiden handelt es sich nicht um echte Epithelien, sondern nur um epithelartige Gewebeschichten (WESTHEIDE und RIEGER, 1996). In die extrazelluläre Matrix des Mesohyls sind zahlreiche, meist amöboid bewegliche Zelltypen eingelagert. Zu diesen werden totipotente Archaeocyten gerechnet (aus welchen sich alle anderen Zelltypen entwickeln können), phagocytotisch tätige Amöbocyten und Geschlechtszellen. Weiterhin bilden Sclerocyten mit kontraktilen Collencyten eine Art Mesohylgerüst und sind durch die Sezernierung von Skelettnadeln (Skleriten) am Aufbau des Skeletts beteiligt. Dieses enthält entweder Kalk oder Kieselsäure und verhindert ein Kollabieren des Schwammkörpers. Ein Kalkgerüst besitzen nur die Calcarea, alle übrigen Schwämme weisen Kieselsklerite auf (GRUNER *et al.*, 1993). Durch die Ausbildung dicker Kollagenfibrillen übernehmen auch Lophocyten eine Stützfunktion bezüglich des Schwammkörpers. Pinacocyten (im Pinacoderm) begrenzen das Mesohyl nach außen, kleiden aber auch innere Kanalwandungen aus.

Die Fortpflanzung der Schwämme erfolgt sowohl sexuell als auch asexuell. Bei der sexuellen Reproduktion werden Geschlechtszellen aus Amöbocyten oder Choanocyten gebildet (HARRISON und COWDEN, 1976). Die weitere Entwicklung schließt eine Larvenbildung ein. Viele Schwammarten sind hermaphroditisch, jedoch ist bei Süßwasserschwämmen Getrenntgeschlechtlichkeit die Regel. Eine asexuelle Vermehrung erfolgt durch Fragmentierung oder durch Bildung spezieller Dauerknospen, den kapselförmigen Gemmulae, die sich hauptsächlich aus totipotenten Archaeocyten zusammensetzen. Die Gemmulaeentstehung erfolgt nicht nur zum Zweck der Fortpflanzung, sondern wird auch durch eine Verschlechterung der Lebensbedingungen induziert.

1.7.2 Schwämme: Modell-Organismen für Untersuchungen der Apoptose

Kein einzelliger Organismus kann über einen Mechanismus des programmierten Zelltods verfügen, da eine im Verlauf der Entwicklung obligate Ausführung dieses Programms unweigerlich zur Vernichtung des Organismus' führen würde. Zudem altern Einzeller vermutlich nicht auf die gleiche Weise wie Pflanzen und Tiere, die über eine vorbestimmte Lebensdauer verfügen. Konventionelles Altern und zelluläre Seneszenz entwickelten sich wahrscheinlich erst im Laufe der Evolution der Multizellularia mit separaten somatischen Zellen und Keimzellen (VAUX und STRASSER, 1996). Trotzdem verfügen manche einzellige Organismen über die Fähigkeit, sich in bedrohlichen

Situationen selbst zu vernichten, um - altruistisch oder defensiv - die Infektion oder das Verhungern benachbarter, verwandter Zellen zu verhindern (SHUB, 1994; YARMOLINSKY, 1995). Die Aktivierung dieses Mechanismus' ist nicht obligat und die Gene, auf welchen er beruht, sterben nicht mit dem Individuum, sondern leben in den verwandten Zellen weiter. Vielleicht fungierte der Zelltod in Einzellern ursprünglich als eine Abwehrstrategie, basierend auf Mechanismen, welche sich nach der Evolution der Multizellularia auch in Entwicklung und Homöostase manifestierten.

Das Phylum der Porifera stellt den phylogenetisch ältesten aller Metazoen-Tierstämme dar (MÜLLER, 1995). Seine Mitglieder haben charakteristische funktionale, strukturelle und regulatorische Proteine mit den restlichen Metazoen gemein und liefern damit einen deutlichen Hinweis auf den monophyletischen Ursprung der Metazoa (MÜLLER, 1997; MÜLLER, 1998). Zu den erwähnten Proteinen gehören insbesondere Proteine der extrazellulären Matrix, Zellmembran-Rezeptoren, immunmodulatorische und cytokinartige Moleküle, die bisher weder in Pflanzen noch Pilzen oder Protozoen nachgewiesen werden konnten (MÜLLER und SCHÄCKE, 1996; PANCER *et al.*, 1997; BLUMBACH *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 1999). Die Zellen der Schwämme lassen keine eindeutige Trennung von Keimzellen und somatischen Zellen zu. Jedoch weisen sie ein hohes Maß an Telomerase-Aktivität und eine scheinbar unbegrenzte Kapazität zur Proliferation auf (KOZIOL *et al.*, 1998). Diese Tatsachen verdeutlichen die Erfordernis eines regulativen Mechanismus', um den Körperbauplan des Organismus' zu erhalten (WAGNER *et al.*, 1998). Zudem verdeutlicht die durch die einzigartige Filterkapazität der Schwämme bedingte Exposition gegenüber einer Fülle potentiell toxischer Inhaltsstoffe des aquatischen Milieus den Bedarf nach einem entsprechend wirksamen Schutzmechanismus.

Bei Säugetieren, dem in diesem Zusammenhang wichtigsten Modell-System der Deuterostomia, ist die Apoptose entscheidend an der Embryo- und Morphogenese beteiligt, und ihre Hemmung stellt einen wesentlichen Vorgang im Rahmen der Karzinogenese dar. Zusätzlich hat sie Anteil am Abwehrmechanismus des Organismus' durch die Eliminierung infizierter und beschädigter Zellen (s. 1.2, 1.4 und 1.6.1). Auch beim Nematoden *C. elegans*, einem bedeutenden Modell-System der Protostomia, wurden bereits die elementaren Komponenten der Apoptose-Maschinerie identifiziert und deren Beteiligung an der Entwicklung des Organismus' nachgewiesen (s. 1.3). Somit scheint unter Berücksichtigung des monophyletischen Ursprungs der Metazoen (MÜLLER, 1995; BORCHIellini *et al.*, 1998) die Existenz gleicher oder ähnlicher apoptotischer Mechanismen, welche u. a. der kontrollierten Morphogenese und der Abwehr dienen, auch in Schwämmen wahrscheinlich. Die Porifera eröffnen somit als engste Verwandte der Urmetazoa, den potentiellen gemeinsamen Vorfahren aller Metazoen-Tierstämme (MÜLLER *et al.*, 1999), neue Möglichkeiten, die Grundlagen der Apoptose-Maschinerie zu erforschen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Apoptose ist eine streng regulierte Form des Zelltods, mit Hilfe dessen Organismen unerwünschte, beschädigte oder infizierte Zellen eliminieren. Diese apoptotischen Zellen sind durch charakteristische morphologische Veränderungen und biochemische Prozesse gekennzeichnet.

Bisherige Untersuchungen bestätigen eine Konservierung des dem Zelltod zugrunde liegenden Instrumentariums (Regulatoren, Adapter und Effektoren) vom Nematoden zum Menschen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Porifera, der phylogenetisch älteste Tierstamm aller rezenten Metazoen-Phyla, auf die Existenz eines der Kernelemente der Apoptose untersucht werden, welches einen Hinweis auf die Konservierung der Apoptose in allen Metazoen liefern würde. Hierzu sollten Mitglieder einer sich aus pro- und antiapoptotischen Regulatoren zusammensetzenden Familie, der Bcl-2 Familie, unter Verwendung molekularbiologischer Methoden in dem marinen Schwamm *G. cydonium* identifiziert werden. Im Anschluß an ihre Klonierung sollten ausgiebige Analysen eine eindeutige Zugehörigkeit zu der Bcl-2 Familie belegen. Hierfür sollten die Bcl-2-homologen Proteine mittels Sequenz- und Strukturanalysen charakterisiert und auf das Vorkommen der die Bcl-2 Familie kennzeichnenden Merkmale untersucht werden. Im Anschluß an die Auswahl eines der Bcl-2-homologen Proteine sollte die gleichfalls charakteristische streßinduzierte Expression überprüft werden. Untersuchungen der Transkription beinhalteten in diesem Zusammenhang den Vergleich mit einem bereits etablierten Streßmarker (Hitzeschockprotein HSP70) sowie mit einem Vitalitätsmarker (Septin SEP1), welcher zuvor kloniert werden mußte. Die sich auf die Translation beziehenden Untersuchungen erforderten zusätzlich die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers, der als essentielles Werkzeug auch Verwendung in nachfolgenden immunologischen Untersuchungen fand.

Mit dem Ziel der Funktionsanalyse sollten Säugetierzellen zum bisher ersten Mal mit der für ein Schwammprotein kodierenden genetischen Information (hier mit jener eines Bcl-2-homologen Schwammproteins) stabil transfiziert und die Expression des Proteins kontrolliert werden. Da antiapoptotische Bcl-2 Proteine mit Mitochondrien assoziiert sind, sollten zusätzliche immunocytochemische Untersuchungen transfizierter Zellen die subzelluläre Lokalisation des Schwammproteins aufdecken. Anschließend sollte dessen Wirkung auf die Vitalität der Zellen, im Vergleich zu jener *mock*-transfizierter Zellen, unter dem Einfluß zweier Modell-Stressoren untersucht werden. Eine Überprüfung des Aktivierungszustands der Caspase-Kaskade sollte zudem die potentielle Einflußnahme des Bcl-2-homologen Proteins auf den Prozeß der durch die gewählten Stressoren induzierten Apoptose verdeutlichen.

In einer Kombination der im Zuge dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und bisheriger Erkenntnisse apoptotischer Mechanismen sollte schließlich ein Modell zur Funktionsweise des Bcl-2-homologen Proteins der Schwämme und der zugrunde liegenden Signaltransduktion erstellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agar	Life Technologies, Karlsruhe
Agarose	Eurobio, Raunheim
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Amidoschwarz 10 B extra	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Blocking-Reagenz	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caseinhydrolysat	Life Technologies, Karlsruhe
Caspase-3 Substrat Ac-DEVD-AMC	Peptide Institute, Osaka; J
CDP-Star	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant-Blue R250	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
DMEM (<i>high glucose</i>)	PAA, Cölbe
DNA-Leiter GeneRuler	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
DNA-Leiter 1 kb Plus	Life Technologies, Karlsruhe
DNA-Leiter <i>Low Mass</i>	Life Technologies, Karlsruhe
dNTP-Set	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	Roth, Karlsruhe

Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat	Sigma, Deisenhofen
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Boehringer, Mannheim
Freud'sches Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
FuGENE6	Boehringer, Mannheim
G418	Invitrogen, Groningen; NL
Gelatine	Serva, Heidelberg
Glucose D(+) - wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Life Technologies, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Maltose	Merck, Darmstadt
Meeressalz "Tropic Marine"	Dr. Binder GmbH, Wartenberg
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
4-Morpholinopropansulfonsäure	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Roth, Karlsruhe

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Nitrotetrazoliumblausulfat	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Merck, Darmstadt
OptiMem	Life Technologies, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Phytoplankton "Marin Niedere Tiere Futter"	Amtra Aquaristik, Rodgau
Polyethylenglycerol 7500	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail <i>Complete-Mini</i>	Roche, Mannheim
Protein-Längenstandard SDS-PAGE <i>Broad Range</i>	Bio-Rad, München
Resin AG 501-X8	Bio-Rad, München
RNA Längenstandard I Digoxigenin gelabelt	Boehringer, Mannheim
RNA Längenstandard II Digoxigenin gelabelt	Boehringer, Mannheim
RNA Längenstandard III Digoxigenin gelabelt	Boehringer, Mannheim
Röntgenfilmentwickler LX24	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilmfixierer AL4	Kodak, Stuttgart
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Life Technologies, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Merck, Darmstadt
Toluidinblau	Sigma, Deisenhofen
Tributylzinnchlorid	Sigma, Deisenhofen
Trichlormethan	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n)	Roth, Karlsruhe
TRIZOL Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20 (Poly(oxyethylen) _n -sorbitan-monolaurat)	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Enzyme

<i>BamH I</i>	Pharmacia, Freiburg
<i>Kpn I</i>	Pharmacia, Freiburg
RNase A	Qiagen, Hilden
<i>Sal I</i>	Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
<i>Xba I</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

3.1.3 Kits

Chemiluminescence Blotting Substrate Kit	Boehringer, Mannheim
NucleoSpin Extract 2 in 1: DNA extraction from agarose gels/Purification of PCR products	Macherey/Nagel, Düren
NucleoSpin System: Purification of plasmide DNA	Macherey/Nagel, Düren
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Boehringer, Mannheim
pGEM-T Vector System I	Promega, Mannheim
QIAexpress Expression System	Qiagen, Hilden
Qiagen Blood & Cell Culture DNA Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
SequaGel XR	Biozym, Hess. Oldendorf
Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis	Life Technologies, Karlsruhe
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham, Braunschweig

3.1.4 Geräte

Brutschränke:

Queue Modell QWJ 500	Nunc, Wiesbaden
Typ BK 2/56	Ehret, Emmendingen
ELISA-Reader Titertek Multiskan Plus MK II	Bartolomey, Rheinbach
Fluoreszenzmikroskop AH3	Olympus, Planegg
Fluorometer Fluoroskan II	Labsystems, Helsinki; FIN
Folien-Schweißgerät	Petra-electric, Burgau
Gefrierschrank Modell Basic, -85°C	Nunc, Wiesbaden

Gelformen für die Horizontalelektrophorese	techn. Werkstatt des Instituts
Heizblock für Reaktionsgefäße Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Kammern und diverse Kämme für die Horizontalelektrophorese	techn. Werkstatt des Instituts
Laminar Flow Sterilbank	Slee, Mainz
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
PhosphoImager	Bio-Rad, München
Powersupply für Gelelektrophorese und Western Blot:	
Modell 1000/500	Bio-Rad, München
Modell PowerPac 200	Bio-Rad, München
Proteinelektrophoreseeinheit Mini-Protean II	Bio-Rad, München
Rotoren GSA und HB 6	DuPont, Bad Homburg
Schüttelinkubator mit Heizhaube Certomat H/R	Braun, Melsungen
Schüttler Modell Kühner	Braun, Melsungen
SemiDry-Blottingkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Sequenzierer <i>LI-COR 4000 S</i>	MWG Biotech, Ebersberg
Sonifier Branson B-12	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Spectrophotometer:	
DU 64	Beckmann, München
Genequant II	Pharmacia, Freiburg
Sterilisator	WTB Binder, Tuttlingen
ThermoBlock Unitek HB-130	Salmon Electronics, Luton; UK
Thermocycler:	
Hybaid Touchdown	MWG Biotech, Ebersberg
Perkin Elmer Geneamp 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
Transilluminator mit Geldokumentationssystem	UVP Limited, Cambridge; UK
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla; USA
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Waage PT 120	Sartorius, Göttingen
Waage R6	Mettler, Gießen
Wasserbad mit Thermostat und Schüttler	Köttermann, Hänigsen
Zentrifugen:	
gekühlte Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Haemofuge	Heraeus, Hanau
Sorvall RC-5B	Du Pont, Bad Nauheim
Vaccum Zentrifuge SVC 100	Savant, Farmingdale; USA

3.1.5 Weiteres Laborzubehör und Verbrauchsmaterialien

Cellophanfolie	Insula, Mannheim
Deckgläser, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Drigalsky-Spatel	Roth, Karlsruhe
Filmcassette Hypercassette RPN 1643	Amersham, Braunschweig
Filterpapier für Western Blot	Pharmacia, Freiburg
Kolbenhubpipetten:	
100 - 1000 µl	Brand, Wertheim
20 - 200 µl	Eppendorf, Hamburg
2 - 20 µl	Eppendorf, Hamburg
0,5 - 10 µl	Eppendorf, Hamburg
0,5 - 2 µl	Gilson, Villiers-Le-Bel; F
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Membranfilter BA83, 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schüll, Dassel
Mörser	Haldenwanger, Berlin
Multiwellplatten:	
96-wells	Nunc, Wiesbaden
24-wells	Nunc, Wiesbaden
12-wells	Falcon, New Jersey; USA
6-wells	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel
Nylon-Blottingmembran, positiv geladen	Boehringer, Mannheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße:	
0,2 ml	Dianova, Hamburg
0,3 ml	MWG Biotech, Ebersberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen ART mit Filtereinsatz	Biozym, Hess. Oldendorf
Pistill	Haldenwanger, Berlin
Plastikbeutel Plastibrand	Brand, Wertheim
Polyvinylidendifluorid-Blottingmembran, Immobilon	Millipore, Neu-Isenburg
Reaktionsgefäße:	
1,5 ml	Brand, Wertheim
2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Fuji RX New	Bechthold, Kelkheim
Screeningplatten	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm	Sartorius, Göttingen

Whatman-Papier DE 81	Whatman, Göttingen
Zählkammer Neubauer	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen:	
50 ml	Falcon, New Jersey; USA
250 ml	Falcon, New Jersey; USA
Zellkulturpetrischalen:	
Ø 35 mm	Nunc, Wiesbaden
Ø 90 mm	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen:	
10 ml	Greiner, Nürtingen
15 ml	Falcon, New Jersey; USA
50 ml	Falcon, New Jersey; USA

3.1.6 Antikörper

Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (Schaf)	Boehringer, Mannheim
Anti-His (C-terminal)-IgG (Maus)	Invitrogen, Groningen; NL
Anti-Mouse-IgG-Cy3 (Ziege)	Dianova, Hamburg
Anti-p33/gC1qR (Kaninchen)	Dr. J. Dedio, Mainz
Anti-Rabbit-IgG-Alkalische-Phosphatase (Ziege)	Sigma, Deisenhofen
Anti-Rabbit-IgG-Cy3 (Ziege)	Dianova, Hamburg
Anti-Rabbit-IgG-FITC (Ziege)	Dianova, Hamburg
Anti-Rabbit-IgG-Peroxidase (Ziege)	NEB, Schwalbach

3.1.7 Phagen, Bakterienstämme, Zelllinien und Schwämme

ExAssist-Helferphagen	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> XLI-Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	
XL0LR	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] Su ⁻ , λ^+	

<i>HEK-293</i> (ATCC CRL 1573)	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville; USA
<i>NIH/3T3</i> (ATCC CRL 1658)	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville; USA
<i>Geodia cydonium</i> (Demospongiae, Geodiidae)	Rovinj; HR

3.1.8 cDNA-Bibliothek und Vektoren

<i>Geodia cydonium</i> cDNA-Bibliothek (λ -ZapExpress)	Dr. M. Kruse, Mainz
pcDNA3	Invitrogen, Groningen; NL
pGEM-T	Promega, Heidelberg
pQE 32	Qiagen, Hilden
λ -ZapExpress/pBK-CMV	Stratagene, Heidelberg

3.1.9 Primer

Unmarkierte und IR-markierte Vektorprimer für pGEM-T:

M13(-20)	5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT G - 3'	$T_m = 58^\circ\text{C}$
SP6	5' - TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C - 3'	$T_m = 60^\circ\text{C}$
T7	5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG - 3'	$T_m = 56^\circ\text{C}$

Unmarkierte und IR-markierte Vektorprimer für pQE 32:

pQE.F	5' - GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA T - 3'	$T_m = 56^\circ\text{C}$
pQE.R	5' - CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G - 3'	$T_m = 62^\circ\text{C}$

Unmarkierte und IR-markierte Vektorprimer für pcDNA3:

SP6	5' - GCA TTT AGG TGA CAC TAT AG - 3'	$T_m = 56^\circ\text{C}$
T7	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	$T_m = 56^\circ\text{C}$

Unmarkierte und IR-markierte Vektorprimer für λ -ZapExpress/pBK-CMV:

BK	5' - ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G - 3'	$T_m = 64^\circ\text{C}$
CMVF	5' - CTT GAT TAC GCC AAG CTC - 3'	$T_m = 54^\circ\text{C}$
CMVR	5' - TAG GGC GAA TTG GGT ACA C - 3'	$T_m = 58^\circ\text{C}$
M13(-20)	5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT G - 3'	$T_m = 58^\circ\text{C}$
T3	5' - CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG - 3'	$T_m = 60^\circ\text{C}$
T7	5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C - 3'	$T_m = 64^\circ\text{C}$

Spezifische Primer für die Klonierung des *GCHSP70* aus *Geodia cydonium* (KOZIOL *et al.*, 1996):

HSP F1	5' - ACC AAG GGT CCG TGT CGA GTA - 3'	T _m = 64°C
HSP R1	5' - AAG TCC TGG AGA AGT TTC TGA - 3'	T _m = 60°C

Degenerierte und spezifische Primer für die Klonierung des *GCSEP1* aus *Geodia cydonium*:

Septin _{deg} R1	5' - TTI CCI AGI CCI GAY TCI CCI ACI ACC AT - 3'	T _m = 68°C
Septin F1	5' - AAG ATG AGC GAC CAG CTA G - 3'	T _m = 58°C
Septin R2	5' - TGA TAA GCA TCG TCC GCA ACT - 3'	T _m = 62°C

Degenerierte und spezifische Primer für die Klonierung des *GCBHP1* und des *GCBHP2* aus *Geodia cydonium* und für die DNA-Sondenherstellung:

BHP _{deg} R1	5' - AAA IAG ACI IAC TAA ICG ICC CCA - 3'	T _m = 56°C
BHP1 F1	5' - ACT TGT TAC TCC TTC ACC CA - 3'	T _m = 58°C
BHP1 R2	5' - ATC CGA TGA CGC TGT CAA TCT - 3'	T _m = 62°C
BHP2 F1	5' - TGA TGG AGG AGC TCT ACA G - 3'	T _m = 58°C
BHP2 R1	5' - CCA ACA CCA ATG ACA CCA ATA - 3'	T _m = 60°C

Spezifische Primer für die eukaryotische Expression des *GCBHP2*:

BHP2 _{euEX} F1	5' - <i>G</i> GT AAC TCA CGA CGG TCG GCG TAT TA - 3'	T _m = 62°C
BHP2 _{euEX} R1	5' - <i>TCT</i> AGA TCA <u>GTG ATG GTG ATG GTG ATG</u> TTG TCT CAT TCC AAG AGC CAG - 3'	T _m = 62°C

Spezifische Primer für die prokaryotische Expression des *GCBHP2*:

BHP2 _{proEX} F1	5' - <i>GGA TCC</i> TGA TGG AGG AGC TCT ACA GAA - 3'	T _m = 62°C
BHP2 _{proEX} R1	5' - <i>GTC GAC</i> ATG ACA CCA ATA CCG GCT ACT - 3'	T _m = 62°C

Spezifische Primer des *GCBHP2* und der *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) für die RT-PCR:

BHP2 RTPCR F1	5' - AGT ATT GTT GAT GGC AGC TCG - 3'	T _m = 62°C
BHP2 RTPCR R1	5' - GTG TGT CTG CGT AGA CAA TGA - 3'	T _m = 62°C
GAPDHF	5' - AAT GCC TCC TGC ACC ACC AA - 3'	T _m = 62°C
GAPDHR	5' - GTC GTT GAG GGC AAT GCC AGC - 3'	T _m = 70°C

Sämtliche Primer wurden von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) bezogen, welche auch die Markierung vornahm (IRD800, 5'-Ende). Die kursiven Basensequenzen stellen die Erkennungspalindrome der Restriktionsenzyme dar, Stopp-Codons sind **fett-gedruckt** und der 6× His-Tag unterstrichen. Bei der Berechnung der Schmelztemperaturen wurden diese markierten Nukleotide nicht berücksichtigt.

3.1.10 *Online-Dienste und Computerprogramme*Densitometrische Analysen

Molecular Analyst Ver. 1.4.1 Bio-Rad, München

Grafische Umsetzung von SequenzvergleichenGeneDoc (NICHOLAS und NICHOLAS, 1998) Freeware: [ftp.uam.ed/pub/mirror/molbio/ibmpc](ftp://ftp.uam.ed/pub/mirror/molbio/ibmpc)Sequenzvergleiche mittels Nukleotid- und Protein-DatenbankenBLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) <http://genome.eerie.fr/blast/blast-query.html>BLITZ (SMITH und WATERMAN, 1981) http://www.ebi.ac.uk/searches/blitz_input.htmlFASTA (PEARSON und LIPMAN, 1988) <http://www.ebi.ac.uk/htbin/fasta.py?request>Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen (*neighbour joining*)CLUSTALW V1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994) Freeware: [ftp.ebi.ac.uk](ftp://ftp.ebi.ac.uk)Softwarepaket für PhylogenievergleichePHYLIP (FELSENSTEIN, 1993) Freeware: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/html/>Softwarepaket zur automatischen DNA-Sequenzierung mit dem Sequenzierer *LI-COR 4000 S*

BaseImagIR/Data Collection V02.31 MWG Biotech, Ebersberg

BaseImagIR/Image Analysis V4 MWG Biotech, Ebersberg

Translation von Nukleotidsequenzen, Sequenz- und Sekundärstrukturanalysen, Identifizierung von Proteindomänen und Strukturmotiven

DNASIS V5 Hitachi Software Engineering, Yokohama; J

NPSA <http://npsa-pbil.ibcp.fr>

PC/Gene (PC/GENE, 1995) IntelliGenetics Inc., Mountain View; USA

Prosite (BAIROCH, 1988) <http://www.ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html>PSORT II <http://psort.nibb.ac.jp>Zugriff auf Nukleotid- und Aminosäure-DatenbankenENTREZ <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

3.2 Methoden

3.2.1 Schwammkultur

3.2.1.1 Hälterung der Schwämme

Die Schwämme der Spezies *Geodia cydonium* (Demospongiae, Geodiidae) wurden in der nördlichen Adria in der Nähe von Rovinj (Kroatien) durch Tauchen oder Dredgen aus Tiefen von 10 - 30 Metern eingesammelt. Ein Teil der Exemplare wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, der Rest wurde in gefiltertem, artifiziellem Meerwasser (hergestellt aus dem Meeressalz "Tropic Marine") bei 16°C unter Belüftung bis zur weiteren Verwendung gehalten. Zweimal pro Woche wurde das Wasser mit Phytoplankton ("Marin - Niedere Tiere Futter", 30 µl/l) versetzt.

3.2.1.2 Apoptose-Induktion

Die Hälterung von Schwämmen unter streßinduzierenden und apoptoseauslösenden Bedingungen liefert Material sowohl für eine RNA-Isolation als auch für eine Herstellung von Proteinextrakten (s. **3.2.5.2** und **3.2.20.1**). Damit werden die Voraussetzungen für Untersuchungen einer differentiellen Genexpression geschaffen.

Lebende, gereinigte Schwämme wurden in äquale Stücke geschnitten, wobei für jedes Experiment (Streßeinwirkung und Kontrolle) Teile desselben Individuums eingesetzt wurden. Die Inkubationen wurden in Behältern mit gefiltertem, belüftetem Meerwasser durchgeführt, welches zuvor auf die entsprechenden Schockbedingungen eingestellt worden war. Falls nicht anders angegeben, betrug die Wassertemperatur 16°C. Sollte das Schwammgewebe zwecks RNA-Präparation verarbeitet werden, wurde es nach der Schockeinwirkung vom Cortex befreit, in 0,5 - 1 cm³ große Stücke geschnitten und in fl. Stickstoff eingefroren. War dagegen die Proteinexpression des Schwammgewebes Gegenstand der Untersuchung, wurde das Gewebe nach der Schockeinwirkung und vor der weiteren Verarbeitung für 18 h (bei 16°C) in ein Regenerationsbecken überführt. Dieser Schritt diente der Regeneration der Schwämme und ließ ihnen Zeit, auf die vorherigen Streßeinflüsse zu reagieren und damit ihren Stoffwechsel den veränderten Bedingungen anzupassen. Im selben Becken befanden sich während der gesamten Versuchsdauer auch die Schwammstücke der Kontrolle. Als absolute Negativkontrolle dienten Schwammstücke, die sofort nach der Entnahme aus dem Meer in fl. Stickstoff gegeben worden waren. Die Lagerung aller Proben erfolgte bei -80°C. Folgende Streßmodalitäten wurden gewählt:

Hitzeschock:

Inkubation der Schwammstücke für 1, 2, 3, 4 oder 5 h bei 26°C.

Tributylzinn (TBT) -Schock:

Inkubation der Schwammstücke für 1, 2, 3, 4, 6 oder 8h mit 1 μ M TBT. Da TBT in einer ethanolhaltigen Stammlösung vorlag, wurde den Kontrollschwämmen die gleiche Menge an Ethanol zugesetzt (Endkonzentration: 0,1 % [v/v]).

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten. Für *HEK-293* Zellen wurde als Medium RPMI 1640-Hepes (25 mM) und für *NIH/3T3* Zellen DMEM (*high glucose*) gewählt, welches jeweils mit 10 % fötalem Kälberserum (v/v) angereichert worden war. Das in den Medien enthaltene Puffersystem diente der Konstanthaltung des pH-Wertes im Bereich von 7,2 - 7,4. Dieser Wert wurde durch den sich ebenfalls im Medium befindlichen Indikator Phenolrot kontrolliert. Ein Wechsel des Mediums war erforderlich, sobald der pH-Wert 7,0 unterschritt. Zur Selektion und Kultivierung stabil transfizierter Zellen mit Neomycin-Resistenz wurde dem Medium zusätzlich noch das Neomycin-Analogon G418 zugesetzt (500 μ g/ml für *HEK-293*, 400 μ g/ml für *NIH/3T3* Zellen).

Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, war ein Passagieren der Zellen notwendig. Dazu wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % [w/v]) pro 75 cm² bewachsener Fläche trypsiniert. Nach Zugabe von Medium zum Trypsinat und einer anschließenden Zentrifugation (10 min, 300 \times g, RT) konnte das Pellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1/10 passagiert werden. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Zusammensetzung des verwendeten PBS-Puffers:

- 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 8,1 mM NaH₂PO₄
 - 1,8 mM KH₂PO₄
- auf pH 7,2 einstellen.

3.2.2.2 Kryokonservierung

Zum Zweck einer Langzeit-Lagerung wurden trypsinierte und pelletierte Zellen (s. **3.2.2.1**) in ihrem jeweiligen Medium aufgenommen, welches zusätzlich 20 % FCS (v/v) und 10 % Dimethylsulfoxid (v/v) enthält. Diese Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt und 12 h bei -80°C verwahrt, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnte.

3.2.2.3 Apoptose-Induktion

Apoptose wird unter dem Einfluß vielfältiger Faktoren induziert, zu welchen u. a. Toxine, Hitze, Zellschädigungen und der Entzug von Wachstumsfaktoren gerechnet werden (THOMPSON, 1995). Viele antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie hemmen bzw. vermindern den durch diese Faktoren ausgelösten apoptotischen Stimulus.

Nach der stabilen Transfektion von *HEK-293* Zellen (s. **3.2.18**) mit einem pcDNA3-*GCBHP2*-Konstrukt bzw. mit dem "leeren" Expressionsvektor pcDNA3 (*mock*-Transfektion) sollten Wirkung und Funktion des konstitutiv exprimierten BHP2-Proteins unter dem Einfluß apoptoseauslösender Faktoren überprüft werden. Dazu wurden jeweils $1,5 \times 10^4$ transfizierte bzw. *mock*-transfizierte *HEK-293* Zellen in 1 ml Medium/10 % FCS (v/v) in die Vertiefungen einer 24-*well* Platte ausgesät. Bei Verwendung von 6-*well* Platten wurde eine entsprechend höhere Zellzahl in 3 ml Medium pro Vertiefung eingesetzt. Nach 24 - 48 h und einem Eintritt der Zellen in die logarithmische Wachstumsphase wurde den Zellen neues Medium zugeführt und anschließend mit der Apoptose-Induktion begonnen. Hierbei blieben in parallelen Kontrollexperimenten transfizierte, *mock*-transfizierte und nichttransfizierte Zellen unbehandelt. Folgende Streßmodalitäten wurden gewählt:

Serumentzug

GCBHP2- und *mock*-transfizierte *HEK-293* Zellen wurden über den gesamten Zeitraum des Experiments in Medium ohne Zusatz fötalen Kälberserums gehalten.

TBT-Inkubation

GCBHP2- und *mock*-transfizierte *HEK-293* Zellen wurden über den gesamten Zeitraum des Experiments in Medium gehalten, welches TBT in einer Endkonzentration von $0,25 \mu\text{M}$ in 0,1 % Ethanol (v/v) enthält. Kontrollen wurden in Medium mit einem Zusatz von Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) gehalten.

3.2.2.4 Vitalitätstest

Die Verwendung des Farbstoffs Trypanblau erlaubt eine lichtmikroskopische Unterscheidung lebender von toten Zellen. Dieser Farbstoff dringt durch geschädigte Zellmembranen, wie sie bei Zellen *in vitro* im Endstadium der Apoptose vorkommen (SARASTE und PULKKI, 2000), in das Zellinnere. Die dadurch blau gefärbten Zellen können leicht von ungefärbten, vitalen Zellen differenziert und quantitativ erfaßt werden (PHILLIPS, 1973).

Wie unter **3.2.2.3** beschrieben, wurde in transfizierten und *mock*-transfizierten *HEK-293* Zellen Apoptose induziert. 0, 20, 45, 68 und 92 h nach Induktions-Beginn wurde die Zahl der lebenden Zellen festgestellt. Dazu wurden behandelte Zellen und unbehandelte Kontrollen im Triplikot trypsiniert (100 µl Trypsin/EDTA pro cm²) und anschließend mit 2 Volumen Trypanblau (0,3 % [w/v]) versetzt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ließ sich dann lichtmikroskopisch die Zahl vitaler, ungefärbter Zellen ermitteln. Nachfolgend wurde die Zahl überlebender transfizierter bzw. *mock*-transfizierten Zellen in Verhältnis zu jener der jeweils unbehandelten Kontrollen gebracht.

3.2.2.5 Apoptose-Nachweis und Quantifizierung

Caspasen stellen die wohl wichtigsten Effektormoleküle im Verlauf der Apoptose dar. Einmal aktiviert, bauen sie zahlreiche Substrate - für die Zellen lebensnotwendige Proteine - proteolytisch ab und führen irreversibel zum Zelltod. Die Spaltung der Substrate erfolgt dabei immer C-terminal eines Aspartatrestes, welcher Teil einer für nahezu jede Caspase spezifischen Erkennungssequenz ist. Die Überprüfung der Caspase-Aktivitäten in Zellextrakten ermöglicht somit eine frühe Detektion der Apoptose. Hierzu werden Zellextrakte mit modifizierten, caspasespezifischen Substraten inkubiert, welche nach proteolytischer Spaltung durch die jeweilige Caspase einen fluoreszierenden Farbstoff (AMC) freisetzen. Die Spaltung dieser Peptide erfolgt proportional der Konzentration aktivierter Caspasen. Nach entsprechender Exzitation kann die emittierte Strahlung des AMC im Fluorometer erfaßt werden und erlaubt daher eine quantitative Bestimmung der Caspase-Aktivität.

Im Anschluß an eine Apoptose-Induktion (s. **3.2.2.3**) wurde die Caspase-Aktivität in behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen 0, 20, 45, 68 und 92 h nach Versuchsbeginn im Triplikot festgestellt. Dazu wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums in 500 µl Lysispuffer lysiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Zelldebris abzentrifugiert (5 min, 14000 × g, RT). In einem *well* einer 96-*well* Platte (FluoroNunc) wurden darauf 50 µl des Überstands mit 50 µl 2 × Reaktionspuffer versetzt, welcher 40 µM des Caspase-3-Substrats enthielt (Ac-DEVD-AMC). Für Negativkontrollen wurde anstelle des Überstands Lysispuffer verwendet. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Fluorometer (Exzitations-Wellenlänge: 355 nm, Emissions-Wellenlänge: 460 nm). Bei der Auswertung der Meßwerte wurden diese auf die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration bezogen, welche vom restlichen Überstand jeder Probe bestimmt worden war (s. **3.2.20.2**). Die

Fluoreszenzwerte der unbehandelten Kontrollen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung gleich 100 % gesetzt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösung:

PMSF-Lösung:

- 0,1 M PMSF in Isopropanol

Lysispuffer:

- 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4
- 4,2 mM EDTA
- 0,1 % CHAPS (v/v)
- 1 mM PMSF
- 5 mM DTT

2 × Reaktionspuffer:

- 40 mM Hepes-KOH, pH 7,4
- 20 % Glycerol (v/v)
- 1 mM PMSF
- 4 mM DTT

3.2.3 Bakterienkultur

3.2.3.1 Kultivierung von Bakterien in Suspension

Zum Animpfen von Flüssig-Medium mit *E. coli XLI-Blue MRF'* wurde dieses entweder mit Bakteriensuspension aus einem Glycerolstock oder mit einer von einer Agarplatte gepickten Kolonie inokuliert (s. **3.2.3.2** und **3.2.11.3**). Waren die Bakterien bereits mit einem Plasmid transformiert, welches eine Ampicillin-Resistenz vermittelte (z. B. pGEM-T oder pQE), wurde dem Medium das entsprechende, selektierende Agens zugefügt (100 µg/ml). Bereits mit dem Plasmid pBK-CMV transformierte Zellen wurden dagegen in kanamycinhaltigem und plasmidfreie *E. coli XLI-Blue MRF'* in tetracyclinhaltigem Medium vermehrt (50 µg/ml bzw. 10 µg/ml; SAMBROOK *et al.*, 1989). Anschließend wurde die Kultur ü. N. bei 37°C, 250 rpm und unter ausreichender Sauerstoffzufuhr inkubiert

Zusammensetzung des verwendeten Mediums:

LB-Medium:

- 1 % NaCl (w/v)
 - 1 % Caseinhydrolysat (w/v)
 - 0,5 % Hefeextrakt (w/v)
- auf pH 7,0 einstellen.

3.2.3.2 Kryokonservierung

Das Einfrieren von Bakterienstocks in einem glycerolhaltigen Puffer ermöglicht eine Langzeit-Lagerung der Bakterien bei -80°C . Der Glycerolanteil schützt die Zellen dabei vor einer eventuellen Schädigung.

Zwecks Kryokonservierung wurde die jeweilige Bakteriensuspension mit 15 % sterilfiltriertem Einfriermedium (v/v) versetzt und auf Trockeneis schockgefroren.

Zusammensetzung des verwendeten Einfriermediums:

- 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 100 mM MgSO_4
- 65 % Glycerol (v/v)

3.2.4 DNA-Plasmidpräparationen

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der *NucleoSpin*-Kit eingesetzt, der für eine Aufreinigung von bis zu 20 μg DNA über Säulenchromatographie aus 1 - 8 ml Kultur in LB-Medium (s. **3.2.3.1**) verwendet werden kann. Sollten größere und hochgereinigte Mengen an Plasmid-DNA isoliert werden (z. B. für Transfektionen, s. **3.2.18.2**), fand der *Qiagen Plasmid Midi*-Kit seine Verwendung. In beiden Fällen entstehen durch eine zeitlich begrenzte, unvollständige Lyse der Bakterien Löcher in der Zellwand, durch welche Plasmide freigesetzt werden. Mit Hilfe einer folgenden Zentrifugation und der Bindung an ein Anionenaustauscher-Resin werden diese von dem bakteriellen Genom und sonstigen Zellinhaltsstoffen getrennt. Alle benötigten Materialien und Puffer sind Bestandteile der Kits.

3.2.4.1 Mini-Plasmidpräparation

Die Bakterien wurden aus 2 ml Suspension durch Zentrifugation pelletiert (5 min, $1500 \times g$, 4°C) und anschließend in 250 μl RNase-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Die Zugabe von 250 μl Puffer

A2 und eine folgende 5-minütige Inkubation bei RT führte durch das im Puffer enthaltene NaOH/SDS zu einer Proteindenaturierung und zum Aufbrechen der Zellmembranen. Durch die Zugabe von 300 µl eiskaltem A3 und der darauffolgenden Inkubation (5 min, 4°C) wurde das Lysat neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration eingestellt, welche später die Voraussetzung für das Binden der DNA an die Silikagelmembran der Säulen war (BIRNBOIM und DOLY, 1979). Mit Hilfe einer anschließenden Zentrifugation (12 min, 12000 × g, 4°C) ließen sich die Zelltrümmer abtrennen, woraufhin der klare Überstand auf die Säule gegeben werden konnte. Nach einer Zentrifugation (1 min, 12000 × g, 4°C) wurde der Durchfluß verworfen, die Säule mit 750 µl A4 gewaschen (zum Entfernen störender Salze) und zweimal bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, um ethanolhaltigen A4 quantitativ zu entfernen. Die an die Matrix gebundene und gereinigte DNA wurde dann mit 50 µl *Aq. bidest.* eluiert.

3.2.4.2 Midi-Plasmidpräparation

Die Zellen aus 25 ml Bakterienzellsuspension wurden durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 6000 × g, 4°C) und anschließend in 4 ml RNase-haltigem P1 resuspendiert. Nach Zusatz von 4 ml P2 und 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 4 ml gekühlter Puffer P3 zugegeben. Im Anschluß an eine Inkubation von 15 min auf Eis wurde der Zelldebris abzentrifugiert (30 min, 20000 × g, 4°C) und der Überstand auf eine mit QBT äquilibrierte *Qiagen-tip 100*-Säule appliziert. Diese Säule wurde mit 20 ml QC gewaschen und die DNA mit 5 ml QF, einem Puffer mit hoher Salzkonzentration, eluiert. Bei der anschließenden Fällung wurde das Eluat mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, die gefällte DNA abzentrifugiert (45 min, 20000 × g, 4°C) und darauf mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 20000 × g, 4°C) wurde die DNA schließlich, nach einem kurzen Trocknungsschritt bei RT, in Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) aufgenommen.

3.2.5 RNA-Präparationen

Der Vorgang der RNA-Isolation aus Zellen und Geweben involviert drei Schritte: Inhibierung endogener Nukleasen, Deproteinierung der RNA und Separation der RNA von anderen Komponenten des Homogenisats. Die Verwendung proteindenaturierender Agenzien kombiniert dabei die ersten beiden Schritte. Nach der 1987 von CHOMCZYNSKI und SACCHI entwickelten Methode (s. **3.2.5.1**) wird hierfür Guanidinthiocyanat angewandt, dessen denaturierende Wirkung durch eine zusätzliche Zugabe von β-Mercaptoethanol unterstützt wird, da jenes intramolekulare Disulfidbrücken löst. Für die RNA-Isolation aus Gewebe mit einem potentiell hohen Gehalt an Nukleasen ist dagegen der Einsatz von TRIzol zu empfehlen (s. **3.2.5.2**). Dieses monophasige, gebrauchsfertige Gemisch zweier proteindenaturierender Agenzien (Guanidinthiocyanat und Phenol)

inaktiviert RNasen noch effizienter und schützt die RNA während des gesamten Zellaufschlusses. Der letzte Schritt der RNA-Isolation, die Trennung von anderen Komponenten des Homogenisats, erfolgt schließlich mittels Fällung der RNA durch Isopropanol.

Für die Arbeit mit RNA müssen RNase-freie Bedingungen geschaffen werden. Dazu wurden Glasgefäße, Mörser, Pistill und Spatel durch Sterilisation bei 180°C über Nacht von RNasen befreit. Für Lösungen und Puffer wurde der RNase-Inhibitor DMPC eingesetzt, der kovalent an Tyrosin- bzw. Histidinreste der RNasen bindet. Die dadurch verursachte Strukturänderung der Enzyme bewirkt deren Funktionsverlust: Puffer wurden in RNase-freiem *Aq. bidest.* angesetzt, welches durch ein 30-minütiges Mischen mit 0,1 % DMPC (v/v) und einer anschließenden Inkubation über Nacht bei RT erhalten wurde. Reaktionsgefäße wurden ebenfalls über Nacht in 0,1 % DMPC (v/v) inkubiert. Zur Inaktivierung des RNase-Inhibitors am folgenden Tag wurden alle Puffer, Lösungen und Materialien für eine Stunde autoklaviert. Sonstige Gebrauchsgegenstände wurden über Nacht in einer SDS-Lösung (1 % [w/v]) eingelegt.

3.2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellkulturzellen

Ca. 10^7 im Monolayer gewachsene Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 400 μ l GSCN-Lösung überschichtet, welche sowohl eine Lyse der Zellen als auch eine Inaktivierung von RNasen bewirkte. Die lysierten Zellen wurden danach abgeschabt und mit 50 μ l Natriumacetat (2 M, pH 4,0) vermischt. Nach Zugabe von 500 μ l Phenol/Trichlormethan, einer Inkubation auf Eis (15 min) und einer Zentrifugation (30 min, $12000 \times g$, 4°C) wurde eine organische untere Phase (DNA und Proteine), eine Interphase (DNA) und eine obere wäßrige Phase (RNA) erhalten. Letztere konnte abgenommen werden. Durch Hinzufügen von 700 μ l kaltem Isopropanol wurde die RNA für 1 h bei -70°C gefällt und im Anschluß daran durch eine Zentrifugation (15 min, $12000 \times g$, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde danach mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und nochmals abzentrifugiert (10 min, $7500 \times g$, 4°C), bevor es kurz bei RT getrocknet und in 50 μ l RNase-freiem *Aq. bidest.* aufgenommen werden konnte.

Zusammensetzung der verwendeten GSCN-Lösung:

- 0,2 M Guanidinthiocyanat
- 15 mM Natriumcitrat
- 0,7 % β -Mercaptoethanol (v/v)
- 0,85 mM N-Lauroylsarcosin

3.2.5.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Schwammgewebe

1 g tiefgefrorenes Schwammgewebe wurde mehrmals in Alufolie gewickelt, durch Hämmern grob zerkleinert, in einen durch fl. Stickstoff gekühlten Mörser überführt und dort mit einem Pistill

vollständig unter kontinuierlicher Kühlung homogenisiert. Das pulverisierte Material wurde sodann mit einem Spatel in 6 ml TRIzol überführt, gemischt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, $12000 \times g$, 4°C) befanden sich Zelltrümmer und Schwammnadeln im Pellet. Der abgenommene Überstand wurde mit 200 μl Trichlormethan versetzt, 15 sec gevortext und dann für 3 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, $12000 \times g$, 4°C) wurde die obere, RNA-haltige Phase abpipettiert. Alle weiteren Schritte der RNA-Fällung waren identisch mit jenen unter **3.2.5.1** beschriebenen.

3.2.6 Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

3.2.6.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren basiert auf der Tatsache, daß diese ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. So kann nach entsprechender Verdünnung der Nukleinsäurelösung deren Absorption ermittelt und die Konzentration von DNA bzw. RNA in der Lösung nach AUSUBEL *et al.* (1987) errechnet werden.

Konzentration doppelsträngiger DNA	($\mu\text{g/ml}$):	$50 \times \text{OD}_{260}$
Konzentration einzelsträngiger DNA	($\mu\text{g/ml}$):	$37 \times \text{OD}_{260}$
Konzentration einzelsträngiger RNA	($\mu\text{g/ml}$):	$40 \times \text{OD}_{260}$

Konzentrationsmessungen wurden u. a. nach einer Mini- oder Midi-Präparation von Plasmid-DNA sowie nach der Isolation von RNA durchgeführt (s. **3.2.4** und **3.2.5**).

3.2.6.2 Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren wird der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm errechnet. Dabei gilt für reine DNA bzw. RNA ein Verhältnis von A_{260}/A_{280} mit ca. 1,8 - 2,0 bzw. 1,9 - 2,0 (BROWN, 1993). Nicht vollständig entfernte Phenolreste und Proteine, die unter anderem aus aromatischen Aminosäuren aufgebaut sind, absorbieren ebenfalls bei 280 nm und stellen so Kontaminationen dar, die obigen Quotienten verringern.

3.2.7 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten mittels Gelelektrophorese

Bei der Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten im elektrischen Feld wandern diese Moleküle aufgrund ihrer negativ-geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Als Trägermaterial wird dabei ein

inertes, elektrisch neutrales Gel aus Agarose verwendet. Agarose ist ein komplex vernetztes, gelierfähiges Polysaccharid, welches aus Meeresalgen gewonnen wird. Die Vernetzung erzeugt einen Molekularsiebeffekt der Gelporen, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäurefragmente reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist (HELLING *et al.*, 1974; MCDONELL und STUDIER, 1977). Gleichzeitig beeinflusst eine Änderung der Agarosekonzentration den Siebeffekt des Gels.

3.2.7.1 Analytische und präparative DNA-Agarosegele

Abhängig von der Größe der zu separierenden DNA-Moleküle wurde eine entsprechende Agarosekonzentration gewählt. Meist wurden 1%ige Gele mit einer Dicke von ca. 0,4 cm hergestellt, die sich zu einer Trennung von Fragmenten zwischen 500 und 10000 bp eignen. Für diese Gele wurde Agarose in TBE-Puffer zum Kochen gebracht, nach einer folgenden Abkühlung auf ca. 60°C in eine Form ausgegossen (10 cm × 7,2 cm) und ein Kamm zum Formen der Taschen eingesetzt. Die Wahl des Kammes war abhängig von der Zahl und Größe der gewünschten Aussparungen des jeweiligen Gels. Dieses wurde nach dem Erstarren in eine mit TBE als Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt. Dann wurden die mit 6 × Probenpuffer im Verhältnis 1:6 gemischten DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Der Probenpuffer enthielt Saccharose und Bromphenolblau, wobei erstere ein schnelles Absinken der DNA in die Taschen bewirkte und letzteres eine Farbfront während des Gellaufes erzeugte. Diese Farbfront bewegte sich auf gleicher Höhe mit ca. 300 bp-großen DNA-Molekülen. Bei einer angelegten Spannung von 4 - 5 V/cm² Gelfläche wurde die Elektrophorese gestoppt, sobald die Bromphenolblaufront etwa zwei Drittel des Gels passiert hatte. Für analytische Gele zur Extraktion von DNA-Banden wurden breitere Taschen und dickere Gele (ca. 0,8 cm) verwendet, um mehr Probenvolumen auftragen zu können.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

TBE-Laufpuffer:

- 90 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 90 mM Borsäure
- 2 mM EDTA

6 × Probenpuffer:

- 0,25 % Bromphenolblau (w/v)
- 40 % Saccharose (w/v)

3.2.7.2 Analytische RNA-Agarosegele

Zur Überprüfung einer RNA-Präparation und zur Separierung von RNA-Molekülen für einen Northern Blot wurden 1 %ige Agarosegele mit einer Dicke von ca. 0,8 cm verwendet. Diese enthielten Formaldehyd, welches durch Denaturierung und Entfernung von Sekundärstrukturen eine Auftrennung einzelsträngiger RNA ermöglichte (LEHRACH *et al.*, 1977). Um Elektrophoresekammer und Kamm von RNasen zu befreien, wurden diese über Nacht in eine 1 %ige SDS-Lösung (w/v) eingelegt und am nächsten Tag mit DMPC-behandeltem Wasser und Isopropanol gespült. 0,5 g Agarose wurde in 5 ml 10× MOPS und 42,3 ml DMPC-Wasser aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 50°C wurden 2,7 ml deionisiertes Formaldehyd zugegeben, gemischt und in die Gelform ausgegossen. 5 µg der zu analysierenden RNA bzw. 100 ng der Marker-RNA wurden im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer versetzt, 15 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 3 V/cm² Gelfläche mit 1× MOPS als Laufpuffer durchgeführt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

10 × MOPS:

- 0,2 M MOPS
 - 0,05 M Natriumacetat
 - 0,01 M EDTA
- mit DMPC-H₂O ansetzen, auf pH 7,0 einstellen.

deionisiertes Formaldehyd:

Formaldehyd 30 min mit 5 % Ionenaustauscher (w/v) rühren, abfiltrieren.

deionisiertes Formamid:

Formamid 30 min mit 5 % Ionenaustauscher (w/v) rühren, abfiltrieren.

Probenpuffer:

- 45,5 % deionisiertes Formamid (v/v)
- 15 % deionisiertes Formaldehyd (v/v)
- 10 % 10 × MOPS (v/v)
- 10 % Glycerol (v/v)
- 0,1 % Bromphenolblau (w/v)

3.2.7.3 Detektion aufgetrennter DNA durch Ethidiumbromid und halbquantitative Konzentrationsbestimmung

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente können mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Dieser Farbstoff lagert sich als Interkalator zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls. Bei einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 - 300 nm erfolgt eine Lichtemission durch den DNA-Ethidiumbromidkomplex im sichtbaren Bereich bei 590 nm (CRAWFORD und WARING, 1967).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA in einem Agarosegel wurde dieses mehrere Minuten in TBE-Puffer mit Zusatz von Ethidiumbromid gelegt (0,02 % [w/v]). Für die Dokumentation wurde das digitale Bildverarbeitungssystem Imagestore 5000 der Firma UVP, Cambridge (UK), bestehend aus Transilluminator, Videokamera, Stativ, Computer und Thermoprinter, eingesetzt: Die durch die UV-Strahlung des Transilluminators fluoreszierenden Banden wurden durch den Gelbfilter der Kamera aufgenommen und Schärfe und Kontrast am Computer nachjustiert. Häufig wurde mit sehr geringen DNA-Konzentrationen gearbeitet, die eine spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung nicht zuließen. Daher wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard, welcher DNA-Fragmente in unterschiedlicher, definierter Konzentration enthielt, parallel zu den DNA-Proben auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Da die Fluoreszenzintensität proportional der DNA-Konzentration ist, ermöglichte ein Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Probe mit jener der Markerbanden ein Abschätzen der Probenkonzentration.

3.2.7.4 Detektion aufgetrennter RNA durch Toluidinblau

Der Nachweis ribosomaler RNA-Banden im Anschluß an eine elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen liefert einen Hinweis auf die Unversehrtheit der RNA nach ihrer Präparation.

Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese (s. **3.2.7.2**) für 10 min in eine Toluidinblaulösung überführt. Die anschließende Entfärbung der Gele über Nacht in DMPC-Wasser erlaubte die Detektion der blau gefärbten ribosomalen RNA-Banden am folgenden Tag.

Zusammensetzung der verwendeten Toluidinblaulösung:

- 1 % Toluidinblau (w/v) in DMPC-Wasser
- 40 % Methanol (v/v)

3.2.8 Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten

3.2.8.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die durch eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden, können aus der Gelmatrix isoliert und für verschiedene, weitere Anwendungen eingesetzt werden (z. B. Subklonierung). Dazu wird die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel geschnitten und die Gelmatrix verflüssigt. Gelöste DNA und flüssige Matrix werden dann mit Hilfe einer Säulenchromatographie voneinander getrennt, wobei sphärische Silikagelpartikel als Säulenmaterial verwendet werden. Aufgrund hoher Konzentrationen chaotrophischer Salze ändert sich die Wasserstruktur und die darin gelösten DNA-Fragmente können an die Silikagelsäule binden (HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962; VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Anschließend wird die DNA eluiert und steht für folgende Anwendungen zur Verfügung. Für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde der *NucleoSpin Extract 2 in 1: DNA extraction from agarose gels*-Kit eingesetzt. Benötigte Puffer und Materialien waren Bestandteile des Kits.

Nach Gellauf und Färbung mit Ethidiumbromid wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV detektiert und mittels eines Skalpells ausgeschnitten. Da UV-Strahlung zu DNA-Schäden führen kann, wurde auf eine möglichst kurze Expositionszeit geachtet. Nach Zugabe des Puffers NT1 (300 µl/100 mg Gel) folgte eine Inkubation bei 50°C für 10 min. Dabei lösten sich unter regelmäßigem Vortexen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckern des Polymers. Daraufhin wurde die Mischung auf die Säule gegeben. Im Anschluß an eine Zentrifugation (1 min, 6000 × g, 4°C) wurde der Durchfluß verworfen und die Säule zweimal mit je 700 µl NT3 gewaschen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt mit maximaler Geschwindigkeit sicherte die quantitative Entfernung des ethanolhaltigen Puffers. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl NE (5 mM Tris-HCL, pH 8,5) durch einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.8.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Abhängig von ihrer weiteren Verwendung muß DNA (Plasmide, PCR-Produkte usw.) häufig von störenden Verunreinigungen (Primer, Nukleotide, Enzyme etc.) befreit werden. Dazu wurde der *NuceoSpin Extract 2 in 1: Purification of PCR products*-Kit eingesetzt, der alle benötigten Puffer und Materialien beinhaltet. Die Reinigung der DNA-Fragmente durch Bindung an die Silikagelpartikel einer Säule verläuft dabei nach dem selben Prinzip wie die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (s. **3.2.8.1**). Hierbei mußte das Volumen des Ansatzes jedoch erst mit *Aq. bidest.* auf 100 µl ergänzt und mit NT2 auf 500 µl aufgefüllt werden. Im Anschluß an die Applikation auf die Säule waren jedoch alle weiteren Schritte identisch.

3.2.9 Homologiescreening der *G. cydonium* cDNA-Bibliothek

Eine cDNA-Bibliothek besteht aus den mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in DNA-Kopien umgeschriebenen Sequenzen aller in einer Zelle vorkommenden mRNA-Moleküle. Diese DNA-Fragmente befinden sich in Klonierungsvektoren, welche verpackt in Phagenköpfen vorliegen. Das Durchmustern einer cDNA-Bank, auf der Suche nach einer bestimmten DNA-Sequenz, wird als Screening bezeichnet (BENTON und DAVIS, 1977). Hierbei werden sowohl homologe als auch heterologe markierte Sonden eingesetzt. Homologe Sonden besitzen eine zum gesuchten DNA-Fragment identische Sequenz. Heterologe Sonden bestehen dagegen aus einer bereits bekannten DNA-Sequenz des gleichen Gens anderer Organismen, von der angenommen wird, daß sie zumindest partiell komplementär zum gesuchten Klon ist. Nach dem Ausplattieren der cDNA-Bibliothek wird ein Teil jedes Phagenplaques auf eine Membran transferiert. Die markierte und zum Einzelstrang denaturierte Sonde hybridisiert anschließend unter geeigneten Bedingungen mit den Plaques dieser Replika, welche die gesuchte DNA enthalten. In einer Farbstoffreaktion läßt sich schließlich der gesuchte Klon visualisieren.

3.2.9.1 Kultivierung von Bakterien für die Infektion mit Phagen

Für ein Screening der *Geodia cydonium* cDNA-Bibliothek wurden als Wirtszellen der rekombinanten Phagen *E. coli* XLI-Blue MRF' verwendet. Die Bakterien wurden ü. N. bei 37°C und 250 rpm in 5 ml LB-Medium kultiviert (s. 3.2.3.1), welches als Zusatz 10 µg/ml Tetracyclin, 0,2 % Maltose (w/v) und 10 mM MgSO₄ enthielt. Maltose unterstützte hierbei die Ausbildung der zur Phagenadsorption benötigten Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Bakterien. Durch Magnesiumionen wurde zudem das Anheften der Phagen erleichtert (SAMBROOK *et al.*, 1989). Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien (5 min, 4000 × g, 4°C) wurde das Pellet in 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von eins resuspendiert.

Zusammensetzung der verwendeten Tetracyclin-Stammlösung:

- 0,5 % Tetracyclin (w/v) in Ethanol

3.2.9.2 Bestimmung des Phagentiters

Die Infektion eines Bakteriums mit einem Phagen führt zur Lyse des Bakteriums. Die Nachkommen des Phagen infizieren ihrerseits benachbarte Bakterien, welche ebenfalls lysiert werden. Dieser Prozeß wird durch die Bildung von "Löchern" im Bakterienrasen sichtbar. Das Auszählen dieser sog. *Plaques* ermöglicht die Bestimmung des Titers einer Phagensuspension.

Im Anschluß an die Herstellung einer seriellen Verdünnungsreihe der Phagensuspension in SM-Puffer (100 µl Endvolumen) wurden 10 µl jeder Verdünnung mit 100 µl Bakteriensuspension (s. **3.2.9.1**) versetzt und zur Anheftung der Phagen an die Bakterien für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Suspension in 3,5 ml *Top*-Agarose gegeben (auf 50°C vorgewärmt) und das Gemisch auf gleichfalls vorgewärmte *Bottom*-Agarplatten gegossen. Nach einer Inkubation ü. N. bei 37°C konnten die Plaques gezählt und die *plaque forming units* (pfu) pro Milliliter der Ursprungssuspension errechnet werden.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien:

SM-Puffer:

- 100 mM NaCl
- 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 10 mM MgSO₄
- 0,01 % Gelatine (w/v)

Bottom-Agar:

- 1,5 % Agar (w/v)
 - 1 % NaCl (w/v)
 - 0,5 % Hefeextrakt (w/v)
 - 1 % Caseinhydrolysat (w/v)
- auf pH 7,5 mit 1 N NaOH einstellen und autoklavieren.

Top-Agarose:

- 0,7 % Agarose (w/v)
 - 1 % NaCl (w/v)
 - 0,5 % Hefeextrakt (w/v)
 - 1 % Caseinhydrolysat (w/v)
- auf pH 7,5 mit 1 N NaOH einstellen, autoklavieren, abkühlen auf 50°C, dann Zugabe von MgSO₄ und Maltose (Endkonzentrationen: 10 mM bzw. 0,2 % [w/v]).

3.2.9.3 Primärscreening

Vor dem ersten Screening war es notwendig, die Anzahl der auszuplattierenden, voneinander unabhängigen Klone zu errechnen, um mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit das gesuchte Gen zu finden. Dabei wurde die folgende, auf der Poissonverteilung beruhende Formel zu Hilfe genommen (CLARKE und CARBON, 1976):

$$N = \ln(1 - P) / \ln[1 - (F / G)]$$

- N : Anzahl zu screenender, unabhängiger Klone.
- P : Wahrscheinlichkeit, mit der die gesuchte Sequenz in der Anzahl von Klonen enthalten ist (hier 99 % = 0,99).
- F : Durchschnittsgröße der im verwendeten Klonierungsvektor eingebauten DNA-Fragmente in bp.
- G : Gesamtgröße des Genoms in bp.

Die ursprünglich für das Screening einer genomischen DNA-Bibliothek entwickelte Formel wurde entsprechend den spezifischen Bedürfnissen für das Screening einer cDNA-Bank modifiziert. Anstelle der Größe des Gesamtgenoms G flossen Schätzungen über die Anzahl und durchschnittliche Größe der Gene in die Gleichung ein. Bei angenommenen Werten von 1×10^4 Schwammgenen, mit einer durchschnittlichen Größe von 3 kb sowie einer mittleren Länge der klonierten Fragmente von 1,5 kb, betrug die Zahl zu überprüfender Klone ca. $9,2 \times 10^4$. Zur Berücksichtigung evtl. Schätzfehler wurden dem errechneten Wert weitere 50 % aufgeschlagen, so daß insgesamt $1,5 \times 10^5$ Klone getestet werden mußten.

Für das Primärscreening wurden $1,5 \times 10^5$ Phagen mit 1 ml Bakteriensuspension (s. **3.2.9.1**; $OD_{600} = 1$) 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 35 ml warmer (50°C) *Top*-Agarose gemischt und auf vorgewärmte *Bottom*-Agarplatten (24 cm × 24 cm) gegeben. Im Anschluß an eine Inkubation über Nacht (37°C) hatten die Phagen den Bakterienrasen fast vollständig lysiert und die Plaques eine Größe von ca. 1 mm² erreicht. Daraufhin wurde die Platte für eine Stunde auf 4°C abgekühlt, um ein Ablösen der *Top*-Agarose während der folgenden Prozedur zu vermeiden. Dabei wurde eine Nitrocellulosemembran auf die Platte appliziert und die Position durch asymmetrische Nadeleinstiche markiert. Nach 10 min wurde die Membran wieder entfernt. In dieser Zeit hatte ein Teil der Phagen an die Membran gebunden, welche somit ein Abbild des Plaquemusters trug. Nach einem 10-minütigen Trocknungsschritt bei RT wurde sie hintereinander für je 5 min auf mit drei verschiedenen Lösungen getränktes Whatman-Papier plaziert. Dabei wurde in einem ersten Schritt die Phagen-DNA denaturiert, im zweiten Schritt ein neutraler pH-Wert eingestellt und im dritten Schritt schließlich die erforderliche Salzkonzentration mittels eines Äquilibrierungspuffers (2 × SSC) eingestellt. Anschließend wurde die nunmehr einzelsträngige Phagen-DNA durch zweistündiges Backen bei 80°C irreversibel so an der Membran fixiert, daß ihre Basen frei zur Bindung an komplementäre Nukleinsäuremoleküle blieben (BROWN, 1993). Ein folgendes, zweistündiges Prähybridisieren der Filter bei 42°C in Hybridisierungslösung sättigte unspezifische Bindungstellen ab, welche gegebenenfalls zu einem hohen Hintergrund geführt hätten. Danach wurde die mit Digoxigenin markierte Sonde (s. **3.2.15.4**), die vorher für 10 min in kochendem Wasser denaturiert worden war, zur Hybridisierungslösung gegeben (Endkonzentration: 5 - 25 ng/ml). Die DNA-DNA-Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurde die Membran zwecks Entfernung nichtgebundener

Sonde 2×5 min bei RT in $2 \times$ SSC/0,1 % SDS (w/v) und 2×15 min in $0,1 \times$ SSC/0,1 % SDS (w/v) bei 42°C gewaschen. Bei Verwendung homologer Sonden wurde unter stringenteren Bedingungen (68°C) gewaschen. Nach Äquilibrierung der Membran in P1 und 30-minütigem Blockieren in P2, wurde diese für 1 h mit einem Anti-DIG-Antikörper inkubiert, welcher mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt und in P2 1:10000 verdünnt worden war. Nichtgebundener Antikörper wurde darauf durch zweimaliges Waschen über 15 min mit P1/0,1 % Tween 20 (v/v) entfernt. Im Anschluß an eine Äquilibrierung der Membran für 2 min in P3 wurde diese zur Detektionsreaktion in P3 überführt, welcher 45 $\mu\text{l/ml}$ NBT und 35 $\mu\text{l/ml}$ X-Phosphat enthielt. Die Alkalische Phosphatase des an die Sonde gebundenen Antikörpers setzte in der Folgezeit das Substrat zu einem violetten Farbstoff um (BLAKE *et al.*, 1984). Binnen 2 - 12 h konnten Phagenplaques, welche die gesuchte DNA enthielten, anhand der Farbsignale auf der Membran identifiziert werden. Nach Vergleich der Signale mit der ursprünglichen Platte wurden die entsprechenden Plauebereiche mit der Rückseite einer Pasteurpipette ausgestochen und in eine Mischung aus 250 μl SM-Puffer und 10 μl Chloroform überführt. Innerhalb weniger Stunden waren die Phagen aus dem Agar in den Puffer diffundiert und standen für eine erneute Bestimmung des Titors zur Verfügung (s. **3.2.9.2**).

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

Denaturierungslösung:

- 200 mM NaOH
- 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:

- 400 mM Tris-HCl, pH 7,6
- 1,5 M NaCl

$20 \times$ SSC:

- 3 M NaCl
 - 300 mM Natriumcitrat
- auf pH 7,0 einstellen.

deionisiertes Formamid:

- Formamid 30 min mit 5 % Ionenaustauscher (w/v) rühren, abfiltrieren.

Hybridisierungspuffer:

- 50 % deionisiertes Formamid (v/v)
- $5 \times$ SSC
- 0,1 % N-Lauroylsarcosin (w/v)
- 0,02 % SDS (w/v)
- 2 % Blocking-Reagenz (v/v)

P1:

- 100 mM Maleinsäure
 - 150 mM NaCl
- auf pH 7,5 mit NaOH einstellen.

P2:

- 1 % Blocking-Reagenz (w/v) in P1
- zum Lösen unter Rühren erwärmen.

P3:

- 100 mM Tris-HCl, pH 9,5
- 100 mM NaCl

NBT-Stammlösung:

- 75 mg/ml NBT in 70 % N,N-Dimethylformamid (v/v)

X-Phosphat-Stammlösung:

- 50 mg/ml X-Phosphat in 100 % N,N-Dimethylformamid

SM-Puffer:

- 0,1 M NaCl
- 80 mM MgSO₄
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 0,1 % Gelatine (w/v)

3.2.9.4 Sekundär- und Tertiärscreening

Die nach dem Primärscreening isolierten Agarstücke enthielten aufgrund der hohen Plaquedichte unerwünschte Phagen benachbarter Plaques, welche in weiteren Screeningrunden eliminiert werden mußten. Daher wurden 400 - 500 Phagen jeder Phagensuspension des ersten Screenings mit 100 µl Bakteriensuspension (s. **3.2.9.1**; OD₆₀₀ = 1) inkubiert, anschließend zu 3 ml *Top*-Agarose gegeben und auf Petrischalen (Ø = 90 mm) ausplattiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der des Primärscreenings. Einzige Ausnahme bildete die Aufbereitung der schon einmal benutzten Sonde. Sie mußte wegen ihres Formamidgehaltes für 10 min bei 68°C denaturiert und dann sofort, zur Vermeidung einer Renaturierung, abgekühlt werden. Zur Isolierung separater Plaques war meist ein Tertiärscreening vonnöten, für welches je 50 Phagen des Sekundärscreenings herangezogen wurden.

3.2.9.5 *In vivo*-Excision

Die *In vivo*-Excision erlaubt ein rasches Ausschneiden einer durch Homologiescreening identifizierten cDNA-Sequenz aus dem Phagenvektor ZapExpress einer cDNA-Bibliothek (SHORT *et al.*, 1988). Dabei rezirkularisiert die ausgeschnittene Insert-DNA zusammen mit Teilen des Vektors

zu einem Phagemid. Dieser Vorgang ist abhängig von speziellen Initiations- und Terminationssequenzen, welche in ZapExpress die einklonierte cDNA flankieren und vom Helferphagen *M13* (ExAssist) erkannt werden. Bei einer gleichzeitigen Infektion von *E. coli XL1-Blue MRF'* mit dem Phagen *M13* und den durch Screening gewonnenen Phagen, welche das gewünschte cDNA-Insert tragen, erkennen Hilfsproteine des *M13* die Initiationsstelle. An dieser wird zunächst einer der beiden DNA-Stränge geschnitten und ein neues einzelsträngiges DNA-Stück bis zur Terminationssequenz synthetisiert. Dieses bildet, nach Zirkularisierung, den Phagemid-Vektor pBK-CMV, der die zur Verpackung notwendigen Signalsequenzen aufweist. Entstandene Phagenpartikel werden in das Medium sezerniert und zur Infektion des *E. coli*-Stamms XLOLR eingesetzt. Diese Bakterien, mit einer *M13*- und Lamda-Phagen-Resistenz, erhalten somit eine Kanamycin-Resistenz, welche die Selektion auf LB-Kanamycin-Platten gestattet.

0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli XL1-Blue MRF'* (in LB/Tetracyclin [10 µg/ml]) wurden in 50 ml LB-Medium überführt (mit 0,2 % Maltose [w/v] und 10 mM MgSO₄ supplementiert) und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 wurden die Bakterien pelletiert (5 min, 1000 × g, RT) und anschließend in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, bis eine OD₆₀₀ von eins vorlag. Folgende Komponenten wurden in einem sog. Koinfektionsansatz zusammengegeben und 15 min bei 37°C präinkubiert:

200 µl XL1-Blue-MRF' (OD₆₀₀ = 1)

250 µl ZapExpress-Phagensuspension (ca. 10⁵ pfu)

1 µl ExAssist Helferphagen (ca. 10⁶ pfu/µl)

Nach der Zugabe von 3 ml LB-Medium und einer weiteren Inkubation (2 h, 37°C) wurde der gesamte Ansatz für 20 min auf 70°C erhitzt, um alle Bakterien abzutöten. Durch eine anschließende Zentrifugation (15 min, 4000 × g, RT) konnten Helferphagen und filamentöse Phagenpartikel mit einzelsträngigem pBK-CMV im erhaltenen Überstand isoliert werden. 10 µl dieser Phagensuspension wurden benutzt, um 200 µl einer XLOLR-Übernachtskultur (OD₆₀₀ = 1) zu infizieren. Im Anschluß an eine kurze Präinkubation (15 min, 37°C) wurden 300 µl LB-Medium zugegeben. Nach ca. 45 min bei gleicher Temperatur hatten die Zellen das aufgenommene Phagemid exprimiert, eine Kanamycin-Resistenz entwickelt und konnten auf kanamycinhaltigen LB-Platten (50 µg/ml) ausplattiert werden. Bei 37°C ü. N. gewachsene Kolonien wurden schließlich gepickt und in einer Checking-PCR überprüft (s. **3.2.15.3**).

Zusammensetzung der verwendeten Kanamycin-Stammlösung:

- 10 mg/ml in *Aq. bidest.*, sterilfiltrieren.

3.2.10 Herstellung rekombinanter DNA

3.2.10.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche durch das Lösen der Phosphodiesterbindungen doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen schneiden. Bei diesen Stellen handelt es sich um für jedes Enzym spezifische, meist palindromartige Erkennungssequenzen aus etwa vier bis acht Basenpaaren (NATHANS und SMITH, 1975). Viele derartige Enzyme schneiden die DNA in der Mitte der Sequenz, so daß glatte Enden entstehen (*blunt ends*). Andere Enzyme schneiden den DNA-Doppelstrang dagegen versetzt, so daß die entstehenden Fragmente an ihren Enden kurze, überstehende Einzelstrangabschnitte besitzen (*sticky ends*). Viele Vektoren verfügen über *multiple cloning sites*, Bereiche mit einer hohen Dichte an Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Häufig wird der Vektor mit zwei Enzymen an einer solchen Stelle geschnitten. Die dabei erzeugten *sticky ends* ermöglichen dessen Ligation mit einem DNA-Fragment, welches die gleichen kohäsiven Enden aufweist (s. **3.2.10.2**).

5 - 6 µg DNA wurden 1 µl eines enzymespezifischen 10× Puffers (bzw. eines 10× Universalpuffers, *One Phor all buffer plus*) zugesetzt, um die optimale Salzkonzentration einzustellen. Nach Zugabe von 3 - 5 U jedes Enzyms wurde der Ansatz mit *Aq. bidest.* auf 10 µl aufgefüllt. Nach 2 h Inkubation (in der Regel bei 37°C) folgte eine Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65°C sowie die Aufreinigung der geschnittenen DNA (s. **3.2.8.2**). Für einen präparativen Verdau erhöhten sich die Anteile der Komponenten im Verhältnis, und die Inkubationszeit stieg auf mehrere Stunden an.

3.2.10.2 Ligation linearer DNA

Die Ligation eines linearen DNA-Fragments mit einem linearisierten Vektor beruht auf der Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen den überhängenden Enden beider Moleküle. Dieser Vorgang wird durch eine DNA-Ligase unter Verbrauch von ATP katalysiert (WEISS *et al.*, 1968).

Für die Ligation wurden äquimolare Mengen der Reaktionspartner eingesetzt, um eine Selbstligation des Vektors bzw. des zu klonierenden Fragments zu vermeiden. Die Wahl des Vektors hing von der weiteren Verwendung ab: Handelte es sich um den linear gelieferten Vektor pGEM-T mit seinen 5'-Thymidin-Überhängen, so besaß das zu ligierende Fragment 3'-Adenosin-Überhänge (s. **3.2.15.1**). In diesem Fall wurde der im pGEM-T-Kit vorhandene Ligationspuffer mit dazugehöriger Ligase benutzt. Bei der Verwendung zirkularisierter Vektoren wurden diese mit Restriktionsenzymen so geschnitten, daß die daraus resultierenden kohäsiven Enden kompatibel mit jenen der zu klonierenden Fragmente waren. Zur Ligation wurde dabei eine *T4*-DNA-Ligase mit zugehörigem Puffer eingesetzt.

Ein Ligationsansatz von 10 µl enthielt 1 U Ligase, 1 µl Ligationspuffer und jeweils 10 - 50 ng Vektor und DNA-Fragment. Mit *Aq. bidest.* wurde dann das Volumen auf 10 µl aufgefüllt und die Reaktion ü. N. bei 4°C bzw. 1 h bei 22°C inkubiert. Ein folgendes Erhitzen des Ansatzes für 10 min auf 65°C diente der Inaktivierung des Enzyms.

3.2.11 Transformation kompetenter Bakterien

3.2.11.1 Herstellung kompetenter *E. coli XL1-Blue MRF'*

Damit Fremd-DNA durch die mechanische Barriere der bakteriellen Zellwand in das Innere einer Zelle gelangen kann, muß die Permeabilität der Zellwand erhöht werden. Die Fähigkeit zur Aufnahme von DNA, die sogenannte Kompetenz, wird hierbei durch einen Prozeß erhöht, dessen Mechanismus bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Sicher ist jedoch, daß Mg^{2+} -Ionen in einem kohlenstoffreichen Medium bei Bakterien in Suspensionskultur eine Steigerung der Transformationseffizienz hervorrufen. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgt in einem Medium, das Polyethylenglycol, Glycerol und Mg^{2+} -Ionen beinhaltet (NISHIMURA *et al.*, 1990).

Mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli XL1-Blue MRF'* (in LB/Tetracyclin, 50 µg/ml; s. **3.2.3.1**) wurden 500 ml Medium A inokuliert und bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Phase (OD_{600} von ca. 0,4 als Maß für die Zelldichte) bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und dann durch eine Zentrifugation (10 min, $1500 \times g$, 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die Bakterien in 5 ml kaltem Medium A resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 25 ml Medium B gemischt, aliquotiert, in fl. Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zusammensetzung der verwendeten Medien:

Medium A:

- 10 mM $MgSO_4$
 - 0,2 % Glucose (w/v)
- mit sterilem LB-Medium auffüllen und sterilfiltrieren.

Medium B:

- 36 % Glycerol (v/v)
 - 12 % Polyethylenglycol 7500 (w/v)
 - 12 mM $MgSO_4$
- mit sterilem LB-Medium auffüllen und sterilfiltrieren.

3.2.11.2 Transformation kompetenter *E. coli XL1-Blue MRF'*

Als Transformation wird das Einschleusen von DNA in kompetente Bakterien bezeichnet (HANAHAN, 1983). Nach der Anheftung der DNA-Moleküle an die Zellwand der Wirtszellen wird die eigentliche Aufnahme in die Bakterien durch einen Hitzeschock initiiert. Handelt es sich bei dem DNA-Molekül um ein Plasmid, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt wird, so kann es in dieser Zelle repliziert werden.

80 µl einer Suspension kompetenter Bakterien (s. **3.2.11.1**) wurden 5 min auf Eis aufgetaut und darauf mit dem Ligationsansatz (s. **3.2.10.2**) bzw. 1 ng Plasmid für 30 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C wurde die Suspension für 2 min auf Eis gehalten und dann mit 350 µl LB-Medium versetzt. Zur Expression des auf dem aufgenommenen Plasmid liegenden Resistenzgens folgte eine Inkubation von 90 min bei 37°C und 200 rpm. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (5 min, 4500 × g, RT) und in 50 µl Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels auf LB/Antibiotikum-Platten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten wurden eingesetzt, wenn das verwendete Plasmid eine Blau/Weiß-Selektion der Transformanten erlaubte (s. **3.2.11.3**).

Zusammensetzung des verwendeten Mediums und der Stammlösung:

X-Gal-Stammlösung:

- 50 % X-Gal (w/v) in N,N'-Dimethylformamid

LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten (pro Platte):

- 20 ml LB

- 1,5 % Agar (w/v)

- 0,01 % Ampicillin (w/v)

- 0,5 mM IPTG

- 0,02 % X-Gal (v/v)

LB-Agar aufkochen, auf 50°C abkühlen, mit den restlichen Komponenten versetzen und in eine Petrischale gießen.

3.2.11.3 Blau/Weiß-Selektion rekombinanter Klone

Die Verwendung spezieller Vektoren (z. B. pBluescript, pGEM-T) erlaubt eine Identifizierung rekombinanter Bakterienkolonien aufgrund ihrer Farbe. Diese Plasmide tragen neben einem Ampicillin-Resistenzgen das *lacZ'*-Gen, welches einen funktionalen Teil der β-Galactosidase kodiert. Die β-Galactosidase ist für den Abbau von Lactose zu Glucose und Galactose verantwortlich (ULLMANN *et al.*, 1967). Durch die Ligation von Fremd-DNA mit einem entsprechenden Vektor wird die Genstruktur dieses Enzyms zerstört. Bei Verwendung von ampicillinhaltigen Agarplatten, die das Lactoseanalogon X-Gal und IPTG als Induktor des Enzyms enthalten, zeichnen sich Kolonien,

welche den Vektor ohne Insert beinhalten, durch eine blaue Färbung aus. X-Gal wurde hier durch die Galactosidase zu einem blauen Produkt umgesetzt. Rekombinante, bei denen das *lacZ'*-Gen durch den Einbau von Fremd-DNA zerstört ist und die so keine funktionale β -Galactosidase mehr herstellen können, sind dagegen weiß gefärbt.

3.2.12 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Als Blotting wird der Transfer von Nukleinsäuren oder Proteinen, nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung in einer Gelmatrix, auf eine immobilisierende Membran bezeichnet. Die transferierten Moleküle liegen dann auf der Membran als exakte Kopie ihres durch die Elektrophorese erhaltenen Auftrennungsmusters vor. Dies ermöglicht die Detektion und Identifikation bestimmter Nukleinsäure- bzw. Proteinfragmente im Nanogrammbereich (LI *et al.*, 1987).

3.2.12.1 Northern Blotting

Beim Northern Blotting wird gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA (s. **3.2.7.2**) auf ein geeignetes Trägermaterial überführt und immobilisiert (ALWINE *et al.*, 1977). Diese Technik dient in Verbindung mit der Hybridisierung einer DNA-Sonde zur Identifikation und Größenbestimmung von Transkripten.

Wie auch bei der RNA-Isolation mußten zuerst RNase-freie Bedingungen geschaffen werden (s. **3.2.5**). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde das Gel in eine Laufkammer auf ein Whatman-Filterpapier gelegt, welches auf beiden Seiten in die Tanks der Kammer reichte. Das Gel wurde dabei so plaziert, daß seine Taschenöffnungen nach unten wiesen. Anschließend wurde eine positiv geladene Nylonmembran in der Größe des Gels auf selbiges aufgebracht, mit 2 Streifen Whatman-Filterpapier überdeckt und mit einem vorher auf Gelgröße zurechtgeschnittenen 8 - 10 cm hohen Stapel Laborpapier überschichtet. Nach dem Auffüllen der Puffertanks mit $20 \times$ SSC wurde der Stapel mit einem Gewicht beschwert und mittels einer Wasserwaage austariert. Der Kapillartransfer fand ü. N. statt. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz getrocknet und die RNA anschließend durch UV-Strahlung mit 90 mJ an der Membran fixiert. Es folgte eine Inkubation selbiger mit vorgewärmter Prähybridisierungslösung ($1 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$, 2 h, 42°C). Die zu verwendende DIG-markierte DNA-Sonde (s. **3.2.15.4**) wurde 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und dann zu der sich in Prähybridisierungslösung befindenden Membran gegeben ($2 \mu\text{l}$ Sonde/ml). Nach einem weiteren Inkubationsschritt ü. N. (42°C) wurde die Membran 2×5 min in $2 \times$ SSC/0,1 % SDS (w/v) und 2×15 min bei 42°C in $0,1 \times$ SSC/0,1 % SDS (w/v) gewaschen. Nach einer kurzen Äquilibrierung in P1 folgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt in P2 und eine Inkubation von 30 min mit in P2 1:10000 verdünntem Anti-Digoxigenin-Antikörper, welcher mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Zwei Waschschrte von je 15 min in P1/0,1 % Tween 20 (v/v) sorgten für die

Entfernung nichtgebundenen Antikörpers und nach einer Äquilibrierung in P3 konnte mit der Detektion begonnen werden (s. **3.2.13**).

Um die mittels eines Northern Blots immobilisierte RNA nach der Detektion nochmals mit einer anderen DNA-Sonde hybridisieren zu können, mußte die bereits gebundene Sonde entfernt werden (WINKLER *et al.*, 1994). Dazu wurde die noch feuchte Nylonmembran mit kochender 0,1 %iger SDS-Lösung (w/v) übergossen und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran für 5 min mit P1/0,1 % Tween 20 (v/v) gewaschen, kurz in P1 überführt und stand dann für eine folgende Prähybridisierung zur Verfügung.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

20 × SSC:

- 3 M NaCl
 - 300 mM Natriumcitrat
- auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren.

High-SDS-(Prä-)Hybridisierungspuffer:

- 7 % SDS (w/v)
- 50 % deionisiertes Formamid (v/v)
- 5 × SSC
- 0,1 % N-Lauroylsarcosin (w/v)
- 50 mM Na₃PO₄, pH 7,0
- 2 % Blocking-Reagenz (v/v)

deionisiertes Formamid:

- Formamid 30 min mit 5 % Ionenaustauscher (w/v) rühren, abfiltrieren.

P1:

- 100 mM Maleinsäure
 - 150 mM NaCl
- auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

P2:

- 10 % Blocking-Reagenz (w/v) in P1

P3:

- 100 mM Tris-HCl, pH 9,5
- 100 mM NaCl

3.2.12.2 Detektion aufgetrennter, immobilisierter Nukleinsäuren durch Methylenblau

Zur Überprüfung von RNA/DNA nach deren Bindung an eine immobilisierende Membran durch Blotting und zum Visualisieren von nichtgelabelten Markerbanden ist eine Färbung mit Methylenblau erforderlich.

Für diesen Vorgang wurde die Nukleinsäure durch UV-Bestrahlung (90 mJ) an der Membran fixiert. Nach dem Anfeuchten der Membran mit $1 \times$ SSPE wurde diese für 10 min in eine Methylenblaulösung überführt und danach für 15 min in $1 \times$ SSPE entfärbt. Die so sichtbar gemachten Banden ließen sich dann durch Photographie dokumentieren (DUPONT, 1993).

Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen:

20 \times SSPE-Puffer:

- 3 M NaCl
 - 0,2 M NaH_2PO_4
 - 0,02 M EDTA
- mit DMPC- H_2O ansetzen und auf pH 7,4 einstellen.

Methylenblaulösung:

- 0,02 % Methylenblau (w/v)
- 0,05 M Natriumacetat, pH 5,2

3.2.13 Detektion aufgetrennter, immobilisierter Nukleinsäuren und Proteine durch Chemilumineszenz

Bei der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Immundetektion wird eine markierte und hybridisierte Sonde bzw. ein Protein-Antigen durch einen primären Antikörper erkannt, welcher entweder selbst mit einem Enzym gekoppelt ist oder im Fall eines indirekten Nachweises in einer zweiten Reaktion von einem speziesspezifischen, enzymgekoppelten Sekundärantikörper gebunden wird. In beiden Fällen erzeugt das Enzym beim Umsatz eines entsprechenden Substrats ein Signal (s. Tab. 3.1).

CDP-Star ist ein 1,2-Dioxethan-Chemilumineszenz-Enzymsubstrat für die Detektion von Konjugaten der Alkalischen Phosphatase, wie sie im Northern Blot Verfahren eingesetzt werden (BECK und KOESTER, 1990). Durch enzymatische Dephosphorylierung entsteht dabei ein metastabiles Dioxethan Phenolat-Anion, welches bei seinem Zerfall Licht emittiert. Dieses Licht ist mittels Belichtung von Röntgenfilmen detektierbar.

Chemiluminescence Blotting Substrate (CBS) ist ein luminolhaltiges Chemilumineszenz-Enzymsubstrat, das die Detektion von Konjugaten der Peroxidase erlaubt, welche im Western Blot Verfahren verwendet werden. In Anwesenheit des Enzyms und Wasserstoffperoxids entsteht durch Oxidation ein aktiviertes Zwischenprodukt, das beim Übergang zum energiearmen Grundzustand Licht emittiert, welches auf Röntgenfilmen ein Signal hinterläßt.

Northern Blot	Western Blot
Immobilisierung der RNA auf einer Membran	Immobilisierung der Proteine auf einer Membran
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
Inkubation mit DIG-markierter Sonde	Inkubation mit Primärantikörper
Inkubation mit Anti-DIG-AP Antikörper	Inkubation mit Sekundärantikörper-POD
Detektion mittels CDP-Star	Detektion mittels CBS

Tab. 3.1: Zusammenfassung der im Rahmen dieser Arbeit relevanten Vorgänge, die zur Detektion spezifischer DNA-Moleküle oder Proteine unter Verwendung immunologischer Methoden führten.

Vor der Inkubation mit dem Substrat wurde der Northern Blot (bzw. Western Blot) 5 min mit P3 (bzw. TBS) äquilibriert. Anschließend wurde CDP-Star 1:100 in P3 verdünnt bzw. im Fall des CBS die Starterlösung B 1:100 in Substratlösung A. Nachdem die jeweiligen Substrate mit 50 µl/cm² auf die Membranen appliziert und diese für 5 min inkubiert worden waren, konnten letztere in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Die Expositionszeit richtete sich dabei nach der Stärke des Signals und betrug wenige Sekunden bis mehrere Minuten. Detektierte Signale konnten durch ein Dokumentationssystem (s. 3.2.7.3) mit angeschlossener Software (Molecular Analyst) verarbeitet und quantifiziert werden.

3.2.14 Primerdesign

Für die Amplifikation einer bestimmten DNA mit Hilfe der PCR-Technik sind Primer eine grundlegende Voraussetzung. Es handelt sich dabei um kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, die mit bestimmten DNA-Abschnitten hybridisieren können, eines an jedem Strang der Doppelhelix. Der Bereich, der von beiden Primern umschlossen wird, ist auch der Bereich, der durch die DNA-Polymerase amplifiziert wird. Für das Design der Primer sind einige Richtlinien zu beachten:

- bevorzugte Primerlängen zwischen 20 und 26 bp
- bevorzugter G/C-Gehalt der Primer = 60 %
- Bevorzugung eines A oder T am 3'-Ende
- Vermeidung großer Schmelztemperaturunterschiede eines Primerpaares
- Vermeidung sich wiederholender Nukleotidbereiche
- Vermeidung inter- oder intramolekular-komplementärer 3'-Enden
- Vermeidung von Sequenzen, die potentiell Haarnadelschleifen bilden

Zur Berechnung der Schmelztemperatur wurde die Formel nach THEIN *et al.* (1986) angewandt:

$$T_m = (\text{Anzahl von A} + \text{T}) \times 2 + (\text{Anzahl von G} + \text{C}) \times 4$$

Für das Design normaler Primer mußte zumindest der Teil der DNA bekannt sein, mit welchem die Primer hybridisieren sollten. War eine bestimmte, unbekannt Sequenz aus einem Pool an DNA-Fragmenten (z. B. cDNA-Bank) Ziel der Amplifikation, mußten degenerierte Primer eingesetzt werden. Dazu wurden die in Datenbanken (s. **3.1.10**) verfügbaren, verwandten Sequenzen anderer Organismen align und homologe Bereiche identifiziert. Für diese Bereiche wurden dann Primer designt. Stimmt einzelne Nukleotide der verschiedenen Organismen nicht überein, wurde an ihrer Stelle entweder ein Inosin in den Primer eingefügt oder aber alle angegebenen Basen, so daß letztendlich ein Primergemisch entstand. Die Schmelztemperaturen für jede Kombination des Gemisches wurden nach obiger Formel errechnet, der Mittelwert aller Ergebnisse diente als "Arbeitstemperatur".

3.2.15 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch Anwendung dieser Technik ist es möglich, definierte DNA-Sequenzen *in vitro* enzymatisch zu synthetisieren (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS *et al.*, 1986). Dabei werden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die mit jeweils einem Strang der DNA-Doppelhelix hybridisieren und den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die Elongation der Primer wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Verbrauch freier Desoxyribonukleosidtriphosphate katalysiert; es entstehen komplementäre DNA-Stränge. Ein sich wiederholender Zyklus, der aus drei Schritten besteht, resultiert in einem exponentiellen Anstieg der Konzentration des spezifischen DNA-Fragments. Im einzelnen handelt es sich dabei in einem ersten Schritt um eine Denaturierung der Nukleinsäuren bei 95°C. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer (welche komplementär zu den Enden des gewählten DNA-Abschnitts sind) an das einzelsträngige Template (*annealing*). In einem dritten Schritt schließlich findet die Synthese des zur Ausgangs-DNA komplementären DNA-Stranges statt (*elongation*).

3.2.15.1 Standard-PCR

Im allgemeinen sind die Konzentrationen der Komponenten einer PCR variabel, jedoch setzte sich ein Standardansatz (50 µl) folgendermaßen zusammen:

10 × PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	10 nmol
Vorwärts-Primer	10 pmol
Rückwärts-Primer	10 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
DNA	1 ng
<i>Aq. bidest.</i>	ad 50 µl

Auch Dauer und Temperatur von Denaturierung, Annealing und Elongation können sehr unterschiedlich gestaltet werden:

Zyklus 1	: 2-5 min	95°C	Initialdenaturierung der Ausgangs-DNA
Zyklus 2-36	: 30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	T _m	Primer-Annealing (abh. von Primern)
	1-3 min	74°C	Elongation (abh. von Fragmentgröße)
Zyklus 37	: 10 min	74°C	Konstruktion von 3'-A-Enden

Der Nachweis der auf diese Weise amplifizierte Fragmente erfolgte über Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung (s. **3.2.7**).

Bei Verwendung spezieller DNA-Polymerasen (z. B. *Taq*-Polymerase) ist es möglich, durch PCR amplifizierte Fragmente an ihren 3'-Enden mit einem überhängenden Adenosinrest zu versehen. Dieser Prozeß erfolgt in Zyklus 37. Der Überhang wird zum Einbau der Fragmente in linearisierte Vektoren benötigt, welche an ihren 5'-Enden einen Thymidinüberhang aufweisen (s. **3.2.10.2**). Der 10 × PCR-Puffer für das entsprechende Enzym wurde von der jeweiligen Firma mitgeliefert.

3.2.15.2 Subklonierung mittels PCR

Meist handelte es sich bei der DNA, die mit Hilfe der PCR aus einer cDNA-Bank amplifiziert wurde, nur um ein Fragment der gesuchten Sequenz (i. e. nur ein Teil eines Transkripts). Deshalb wurden nach der Ligation des Fragments in einen Vektor (s. **3.2.10.2**), der folgenden Transformation von *E. coli* mit diesem Konstrukt (s. **3.2.11.2**), der anschließenden Plasmidisolierung (s. **3.2.4.1**) und letztendlich der Sequenzierung des Inserts (s. **3.2.16**) neue Primer komplementär zu den Enden der analysierten Sequenz designt, um die noch unbekannt Bereiche über das sog. *primer-walking* aus der cDNA zu erhalten. Hierfür wurde ein genspezifischer Primer zusammen mit einem universellen Primer, der sich von der Vektorsequenz in der Nähe der Klonierungsstelle ableitet, eingesetzt.

3.2.15.3 Checking-PCR

Diese Methode diente der Überprüfung einer Ligation und Transformation (s. **3.2.10.2**, **3.2.11**). Dazu wurden rekombinante Klone nach der Transformation von ihren Agarplatten gepickt und in je 10 µl LB-Medium überführt (waren die Kolonien mit einem Vektor transformiert, der eine Blau/Weiß-Selektion erlaubte, wurden weiße Kolonien ausgewählt; s. **3.2.11.3**). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde 1 µl der Bakteriensuspension zu 10 µl eines Standard-PCR-Reaktionsmixes (s. **3.2.15.1**) gegeben. Dieser enthielt die vektorspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer, deren Bindungsstellen jeweils die *multiple cloning site* des Vektors flankierten. Nach der PCR wurde der gesamte Ansatz per Gelelektrophorese analysiert (s. **3.2.7**) und so die transformierten Klone mit korrekter Insert-Länge identifiziert.

3.2.15.4 Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten

Die Verwendung des *PCR DIG Probe Synthesis*-Kits erlaubt die Konstruktion hochsensitiver, DIG-markierter Sonden mittels der Polymerasekettenreaktion (KESSLER, 1991). Die Markierung der Fragmente erfolgt dabei durch den Einbau von DIG-11-dUTP während der PCR; als Template kann sowohl cDNA als auch ein Vektorinsert verwendet werden. Die hergestellten Sonden finden beispielsweise im Northern Blot Verfahren Verwendung (s. **3.2.13**).

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen, welche bis auf das Template, die Primer und das Wasser Bestandteile des Kits waren:

10 × PCR-Puffer/MgCl ₂	5 µl
DIG-Mix	2,5 µl
dNTP-Lösung	2,5 µl
Vorwärts-Primer	25 pmol
Rückwärts-Primer	25 pmol
Enzym-Mix	2,6 U
DNA-Template	0,1 - 1 ng
<i>Aq. bidest.</i>	ad 50 µl

Die Zyklen der PCR-Reaktion wurden nach dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

Zyklus 1	: 3 min	95°C	Initialdenaturierung der Ausgangs-DNA
Zyklus 2-36	: 30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	T _m	Primer-Annealing (abh. von Primern)
	4 min	74°C	Elongation
Zyklus 37	: 20 min	74°C	Konstruktion von 3'-A-Enden

Im Anschluß an die PCR wurde das Produkt über eine Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 3.2.7) und dann unter Verwendung des *Purification of PCR products*-Kits aufgereinigt (s. 3.2.8.2). Die Konzentration der sich in einem Volumen von 50 µl befindlichen Sonde konnte danach spektrophotometrisch bestimmt werden (s. 3.2.6.1).

3.2.15.5 Reverse Transkription von mRNA mit gekoppelter PCR (RT-PCR)

Durch Reverse Transkription und unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers ist eine Konversion eukaryotischer Poly(A)-mRNA in einzelsträngige cDNA möglich. Diese cDNA läßt sich daraufhin durch PCR amplifizieren. Der erste Schritt, die Synthese des zur RNA komplementären ersten cDNA-Stranges, wird dabei durch eine Reverse Transkriptase katalysiert (alle benötigten Reagenzien sind Bestandteile des *Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*-Kits). In einem zweiten Schritt wird die Amplifikation des gewünschten DNA-Bereiches, unter Einsatz eines genspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primers und einer *Taq*-Polymerase, durch eine Standard-PCR erreicht. Beide Schritte zusammengefaßt werden auch als RT-PCR bezeichnet.

5 µg Total-RNA wurden mit 0,5 µg Oligo(dT)-Primer versetzt und der Ansatz mit DMPC-H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 72°C wurde die Mischung auf Eis abgekühlt und ein Reaktionsgemisch zugegeben, welches in einem Volumen von 7 µl 2 µl 10 × PCR-Puffer, 50 nmol MgCl₂, 0,2 µmol DTT sowie 10 nmol dNTP-Mix enthielt. Im Anschluß an eine Inkubation von 5 min bei 42°C wurden 200 U Reverse Transkriptase zugesetzt und der Ansatz für 50 min bei 42°C inkubiert. Anschließend konnte dann die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (15 min, 72°C) beendet werden.

Zur Amplifikation eines bestimmten Transkriptes aus diesem Gemisch an Total-cDNA wurde eine Standard-PCR unter Einsatz genspezifischer Primer durchgeführt (s. 3.2.15.1). Dazu wurden je 10 pmol der Primer, 10 nmol dNTP-Mix, 5 µl 10 × PCR-Puffer, 75 nmol MgCl₂ und 1 U *Taq*-Polymerase mit 2 µl der Total-cDNA versetzt und das Volumen auf 50 µl mit *Aq. bidest.* aufgefüllt. Annealing/Elongations-Zeiten und -Temperaturen waren abhängig von den verwendeten Primern und der Größe des gewünschten Transkriptes, welches sich im Anschluß an die PCR auf einem Agarosegel nachweisen ließ (s. 3.2.7).

3.2.16 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung läßt sich die Reihenfolge der Nukleotide in einem bestimmten DNA-Fragment ermitteln. Bei dem hier verwendeten Sanger-Verfahren (Dideoxy-Sequenzierung nach SANGER *et al.*, 1977) hybridisiert ein markierter Primer mit einzelsträngiger DNA und dient als Ausgangspunkt zur Synthese des komplementären Stranges. In vier parallelen Reaktionsansätzen

wird die Strangsynthese durch Zugabe der vier Desoxynukleotide und einer geeigneten Polymerase zu der DNA-Matrize und dem Primer in Gang gesetzt. Jeder Ansatz enthält zudem ein Didesoxynukleotid (ddNTP), das in den wachsenden Polynukleotidstrang ebenso wirksam eingebaut wird wie das normale Desoxynukleotid, aber die weitere Strangsynthese verhindert, da die Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Zuckeranteils fehlt. So ist eine Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung nicht möglich. Als Ergebnis dieser Kettenabbruchreaktion sind in jedem Ansatz Fragmente zu finden, die das jeweils verwendete Didesoxynukleotid am 3'-Ende besitzen. Die synthetisierten DNA-Doppelstränge in den vier Ansätzen werden dann durch Hitzedenaturierung getrennt, nebeneinander auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese unter Hochspannung aufgetrennt.

Bei der Analyse der Sequenzierung wird festgestellt, welche Bande am weitesten gewandert ist. Sie stellt das kürzeste DNA-Stück dar, die folgende das nächst-längere etc. Da bekannt ist, welcher ddNTP-Ansatz in welcher Spur aufgetragen wurde, läßt sich die Basenfolge direkt ablesen.

3.2.16.1 DNA-Sequenzierreaktion

Für die Synthese der 4 Ansätze markierter DNA-Fragmente durch eine einseitige PCR (*cycle sequencing*) wurde der *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing with 7-deaza-dGTP*-Kit verwendet. Dieser beinhaltet (im Terminationsmix) alle zur Kettenabbruchreaktion benötigten Komponenten, bis auf die DNA-Matrize und den gelabelten Primer. Das im Mix zusätzlich verwendete 7-deaza-dGTP vermeidet Kompressionen, die während der Gelelektrophorese auftreten können. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

DNA-Template	1,5 µg
IR-markierter Primer	2 pmol
<i>Aq. bidest.</i>	add 18,75 µl

In vier separaten Reaktionsgefäßen wurden anschließend 4,5 µl des obigen Gemisches mit je 1,5 µl eines Terminationsmixes vermischt. Die zyklische Sequenzierreaktion wurde ähnlich einer Standard-PCR unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zyklus 1	: 5 min	95°C	Denaturierung der Ausgangs-DNA
Zyklus 2-31	: 30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	T _m	Primer-Annealing
	45 sec	70°C	Elongation
Zyklus 32	: 3 min	95°C	Terminale Denaturierung

Nach Beendigung des letzten Zyklus' wurden zum Abstoppen der Reaktion 3 µl Stoppuffer zu jedem Ansatz gegeben.

Zusammensetzung des verwendeten Stoppuffers:

- 95 % Formamid (v/v)
- 10 mM EDTA
- 0,1 % Xylencyanol (w/v)
- 0,1 % Bromphenolblau (w/v)

3.2.16.2 DNA-Sequenzierung mittels eines automatisierten Sequenzierers

Der eingesetzte Sequenzierer *LI-COR 4000 S* ist mit einem Laser ausgestattet, welcher während des Gellaufes konstant die gesamte Gelbreite abfährt. Dabei wird der IR-Farbstoff (IRD800), der an den 5'-Enden der Primer und damit mit jedem DNA-Fragment gekoppelt ist, zur Emission von Licht angeregt, welches durch einen Scanner des Sequenzierers detektiert und als Information abgespeichert wird.

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels (41 cm × 66 cm × 0,25 mm) wurde ein Zwei-komponenten-System verwendet (SequaGel XR). Dazu wurden 6 ml SequaGel Puffer und 175 µl 10 %iges APS (w/v) zu 24 ml SequaGel Monomer Konzentrat gegeben. Diese Mischung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch einen randständigen Abstandshalter voneinander getrennt waren. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Vorkamm, welcher der Aussparung der Proben tasche diente, gezogen, das Gel in den Sequenzierer gestellt und der Probenkamm eingepaßt. Während eines 30-minütigen Vorlaufs wurde das Gel äquilibriert und aufgewärmt (auf 50°C), bevor je 1,5 µl des abgestoppten Reaktionsmixes (s. o.) pro Tasche aufgetragen wurden. Die Elektrophorese wurde dann bei 1500 V 6 - 7 Stunden in TBE-Puffer unter Kontrolle des Programms *BaseImagIR/Data Collection V02.31* durchgeführt.

Zusammensetzung des verwendeten TBE-Laufpuffers:

- 90 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 90 mM Borsäure
- 2 mM EDTA

3.2.16.3 Auswertung der DNA-Sequenzierung

Die während des Gellaufes gespeicherte Bildinformation wurde nach dessen Beendigung durch eine geeignete Software (*BaseImagIR/Image Analysis V4*) automatisch verarbeitet. Die auf diese Weise ermittelte Nukleotidabfolge im FASTA-Format konnte anschließend mit weiteren Programmen, z. B. DNASIS V5.00, CLUSTALW V1.6 und GeneDoc V2.0 (s. **3.1.10**), bearbeitet werden. Vergleiche mit anderen Sequenzen aus Nukleotid- und Protein-Datenbanken waren z. B. durch die Server des Bioinformatischen Institutes (Hinxton Hall, UK) und des nationalen Zentrums für

Biotechnologische Information (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA) möglich (s. **3.1.10**).

3.2.17 Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten

Unter Verwendung des *QIAexpress*-Expressionssystems lassen sich Fusionsproteine in hohen Konzentrationen in Bakterienzellen *in vivo* synthetisieren und in einem weiteren Schritt durch Affinitätschromatographie aufreinigen. Diese Proteine stehen anschließend für vielfältige Anwendungen, wie z. B. die Antikörperherstellung (s. **3.2.22**), zur Verfügung. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wird dazu über angefügte Restriktionsschnittstellen in einen Expressionsvektor (Fusionsvektor) so *in frame* ligiert, daß sie am 3'-Ende eines starken Promotors und einer 6× His-kodierenden Sequenz (*His-Tag*) zu liegen kommt. Mit diesem Konstrukt wird ein geeigneter *E. coli*-Stamm transformiert, welcher nach Induktion mit IPTG das Fusionsprotein synthetisiert. Das Protein läßt sich anschließend aus lysierten Zellen mittels seiner Oligohistidinsequenz unter Verwendung einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie isolieren.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektor handelte es sich um pQE 32. Dieser besitzt am 5'-Ende des Polylinkers ein Start-ATG, gefolgt von einer Oligohistidinsequenz. Am 3'-Ende des Polylinkers befindet sich ein Stopp-Codon. Weitere Eigenschaften des Vektors sind: ein T5 Promotor, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, zwei *lac*-Operator-Sequenzen, die eine Bindung des *lac*-Repressors erhöhen, ein β -Lactamase-Gen, welches für die Ampicillin-Resistenz verantwortlich ist und ein *ColE1 ori* (BUJARD *et al.*, 1987).

Zur Transformation (s. **3.2.11**) wurde der *XL1-Blue MRF'*-Stamm von *E. coli* eingesetzt. Dieser produziert ausreichende Mengen des *lac*-Repressors, welcher die Transkription des ligierten Fragments verhindert. Die Expression des rekombinanten Proteins wird erst bei Zugabe von IPTG induziert, welches an das *lac*-Repressor-Protein bindet und dieses inaktiviert. Erst dann kann die RNA-Polymerase die Sequenz stromabwärts des Promotors transkribieren.

3.2.17.1 Konstruktion eines Expressionsklons

Das zur Ligation in den Expressionsvektor benötigte DNA-Fragment wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion (s. **3.2.15**) aus der *Geodia cydonium* cDNA-Bank isoliert. Um die für die Ligation in einen Fusionsvektor erforderlichen Restriktionsschnittstellen an das Fragment anzufügen, wurden Primer designt (s. **3.2.14**), welche diese spezifischen Erkennungspalindrome enthielten (hier *BamHI*, *Sall*; s. **3.1.9**). Die Restriktionsstellen durften ansonsten in der amplifizierten DNA-Sequenz nicht erscheinen. Das erzeugte Fragment wurde zuerst über T/A-Klonierung in den Vektor pGEM-T ligiert (s. **3.2.10.2**). Anschließend wurde der *E. coli*-Stamm mit diesem Konstrukt transformiert (s. **3.2.11**). Mittels Checking-PCR wurden die über Nacht gewachsenen weißen Kolonien auf ihre

korrekte Insert-Länge überprüft (s. **3.2.15.3**). Mit den positiven Klonen wurden dann je 3 ml LB-Medium, unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin, inokuliert. Nach einer Inkubation ü. N. konnte aus den Bakteriensuspensionen das Plasmid isoliert werden (s. **3.2.4**). Anschließend wurde das Expressionsinsert aus pGEM-T unter Verwendung jener Enzyme, welche die künstlichen Schnittstellen erkennen, herausgeschnitten (s. **3.2.10.1**). Mit den gleichen Restriktionsenzymen wurde auch der zirkuläre Expressionsvektor pQE 32 linearisiert. Nach einer Aufreinigung der Produkte des Verdau (s. **3.2.8.2**) und ihrer elektrophoretischen Auftrennung (s. **3.2.7.1**) wurden diese aus dem präparativen DNA-Agarosegel eluiert (s. **3.2.8.1**) und ihre Konzentration halbquantitativ bestimmt (s. **3.2.7.3**). Die Ligation des Vektors pQE mit dem Insert (DNA-Konzentration: 2 ng/µl in einem Volumen von 30 µl) erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (s. **3.2.10.2**). Mit diesem Konstrukt wurden erneut Bakterien transformiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert (s. **3.2.11**). Gewachsene Kolonien wurden am nächsten Tag durch eine Checking-PCR auf die korrekte Insert-Länge überprüft (s. **3.2.15.3**). Mit den positiven Klonen wurden dann je 3 ml LB-Medium inkl. Ampicillin (100 µg/ml) inokuliert (s. **3.2.3**). Am nächsten Tag konnte das Plasmid durch eine Mini-Plasmidpräparation isoliert werden (s. **3.2.4.1**). Es folgte eine Sequenzierung des Inserts unter Verwendung der IR-gelabelten Primer pQE.R/pQE.F, um die Fehlerfreiheit des Konstrukts zu kontrollieren (s. **3.2.16**).

3.2.17.2 Expression eines Fusionsproteins

Mit einer ü. N. inkubierten Starterkultur eines Klones, der das korrekte Konstrukt enthielt, wurden 200 ml LB/Amp (100 µg/ml) angeimpft und bei 37°C/200 rpm gehalten. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 (als Maß für die Zelldichte) wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert (4 h, 200 rpm, 37°C). Durch eine anschließende Zentrifugation (15 min, 3500 × g, RT) konnten die Bakterien pelletiert werden.

3.2.17.3 Präparation eines Fusionsproteins

Das Prinzip des *QIAexpress-Expression-System-Kits* beruht auf einer Bindung des *His-Tags* (einem Schwanz aus 6 Histidinresten) rekombinanter Proteine an immobilisierte Ni²⁺-Ionen, die zusammen mit NTA (*Nitrilotriaceticacid*) einen Chelatkomplex ausbilden (HOCHULI *et al.*, 1987). Dieser Komplex in Form von sphärischen Nickel-NTA-Partikeln, gekoppelt an Agarose, stellt das Säulenmaterial dar (PORATH *et al.*, 1975; SULKOWSKI, 1989). Gebundene *His-Tag*-Proteine können durch ein Herabsetzen des pH-Wertes von der Ni-NTA-Matrix freigesetzt werden, da sie durch die Protonierung der Histidinreste nicht mehr mit Ni²⁺ in Wechselwirkung treten können. Die für die Isolierung der Fusionsproteine notwendigen Materialien und Puffer entstammten dem

QIAexpress Type IV-Kit; bei letzteren mußte lediglich der entsprechende pH-Wert eingestellt werden.

Das Bakterienpellet wurde in 5 ml Puffer A (pH 8,0) pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und für 1 h bei RT gerührt, um die Lyse der Zellen herbeizuführen. Durch eine folgende Zentrifugation (30 min, 10000 × g, RT) wurde der Zelldebris von den löslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde dann für 1 h mit 1 ml Ni-NTA-Agarose pro 4 ml Lysat bei RT unter Rühren inkubiert. Der Zusatz von 0,02 M Imidazol verhinderte dabei die unspezifische Bindung endogener Proteine mit Histidinresten an die Matrix. Anschließend wurde die Suspension, die das an die Matrix gebundene rekombinante Protein enthielt, auf eine Säule gegeben und der Durchfluß verworfen. Dann wurde die Säule dreimal mit je 4 ml Puffer C (pH 6,3)/0,02 M Imidazol gewaschen, bevor das Protein mit je 2 ml Puffer D (pH 5,9) und Puffer E (pH 4,5) eluiert werden konnte. Nach Messung der Proteinkonzentration (s. 3.2.20.2) wurde eine Kontrolle der Expression des Fusionsproteins mittels eines 15 %igen SDS-Gels durchgeführt (s. 3.2.20).

3.2.18 Expression von Fusionsproteinen in Eukaryoten

Die Expression von Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen bietet - trotz geringerer Ausbeuten im Vergleich zu prokaryotischen Expressionssystemen - einen bedeutenden Vorteil. Da Bakterien keine posttranslationale Modifikationen durchführen, können viele Fusionsproteine eukaryotischen Ursprungs nur in eukaryotischen Wirtszellen korrekt exprimiert werden. Dies aber ist eine Voraussetzung für funktionale Analysen des betreffenden Proteins.

Der Prozeß des Einschleusens von Nukleinsäuren in erwähnte Zellen durch nichtvirale Methoden wird als Transfektion bezeichnet. In seltenen Fällen wird dabei Fremd-DNA in das Genom der Wirtszelle stabil integriert. Die Möglichkeit, eine Zellpopulation auf die Anwesenheit dieser Zellen zu screenen, wird durch die Kotransfektion mit einem Gen gegeben, welches eine Resistenz gegen ein letales Agens kodiert. Ein Beispiel dafür stellt die Kombination des Gens der Neomycin-Phosphotransferase mit Geneticin dar. Zellen, die eine Behandlung mit Geneticin überleben, bilden Klone, welche isoliert und individuell analysiert werden können.

Mit Hilfe des pcDNA3-Vektors lassen sich rekombinante Proteine in größeren Mengen in Säugetierzellen exprimieren. Dazu wird die cDNA des zu exprimierenden Proteins an ihrem 5'- und 3'-Ende mit artifiziellen Restriktionsschnittstellen versehen, welche auch in der *multiple cloning site* des Vektors zu finden sind. Durch Verwendung der entsprechenden Enzyme werden kohäsive Enden erzeugt, über welche sich das Fragment in den Vektor einfügen läßt. Nach der Transfektion einer geeigneten Zelllinie sorgt der vor dem Fragment sitzende CMV-Enhancer/Promotor für eine konstitutive Expression des rekombinanten Proteins. Weitere Kennzeichen des Vektors sind ein Polyadenylierungssignal und eine Transkriptionsterminierungs-Sequenz am 3'-Ende des Polylinkers. Eine Ampicillin-Resistenz sowie ein *ColE1 ori* ermöglichen die Selektion der mit diesem Vektor

transformierten *E. coli*-Klone. Das auf dem Vektor liegende Neomycin-Resistenzgen erlaubt zusätzlich eine Selektion der Säugertierzellen nach ihrer Transfektion.

3.2.18.1 Konstruktion eines Expressionsklons

Die Herstellung des Expressionsklons verlief analog des bei Prokaryoten angewandten Verfahrens (s. 3.2.17). Dazu wurde die gewünschte Sequenz mit zwei spezifischen Primern, welche über die obligaten, im Gen sonst nicht vorhandenen artifiziellen Erkennungsschnittstellen verfügten (hier *Xba I* und *KPN I*; s. 3.1.9), aus der cDNA-Bank amplifiziert. Außerdem wurden der amplifizierten cDNA durch den Rückwärts-Primer am 3'-Ende sechs für die Aminosäure Histidin kodierende Basen-Triplets angefügt. Dadurch erhielt das in transfizierten Zellen translatierte Protein eine C-terminale Histidinsequenz, welche von kommerziellen Anti-His-Antikörpern erkannt wird (diese ermöglichen letztendlich den Nachweis und die Lokalisation des Fusionsproteins mittels verschiedener Methoden (s. 3.2.19 und 3.2.21)). Im Anschluß an eine Ligation des Fragments in pGEM-T (s. 3.2.10.2), gefolgt von der Transformation von *E. coli* mit dem Konstrukt (s. 3.2.11) und der Präparation des amplifizierten Plasmids (s. 3.2.4), konnte das Fragment aus pGEM-T mittels der entsprechenden Enzyme wieder herausgeschnitten werden. Dieses Fragment wurde nach seiner Isolation aus einem präparativen Agarosegel mit dem Expressionsvektor pcDNA3 ligiert (s. 3.2.10.2), welcher zuvor unter Verwendung der gleichen Restriktionsenzyme linearisiert worden war (s. 3.2.10.1). Nach einer erneuten Transformation von *E. coli* und der Isolierung des Konstrukts wurde jenes durch eine Sequenzierung auf eventuelle Fehler überprüft (s. 3.2.16). Mit einem positiven Klon wurden daraufhin 50 ml LB/Amp angeimpft und über Nacht inkubiert, um am nächsten Tag das Konstrukt in großer und reiner Menge über eine Midi-Plasmidpräparation isolieren zu können (s. 3.2.4.2). Auf gleichem Weg wurde auch der leere Vektor pcDNA3 amplifiziert und isoliert.

3.2.18.2 Transfektion und Selektion der Transfektanten

Unter den Techniken für den Transfer von Nukleinsäuren in Wirtszellen existieren sowohl physikalische Verfahren (Elektroporation, Mikroinjektion) als auch chemische Methoden, bei denen die Zellen zur Aufnahme der DNA mit bestimmten Reagenzien (DEAE-Dextran, Calcium-Phosphat, Liposome usw.) behandelt werden. Die Mechanismen der Aufnahme sind jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Das hier verwendete, die Transfektion unterstützende Agens (FuGENE6) besteht zum größten Teil aus Lipiden, welche die Annäherung der DNA an die negativ-geladene Zellmembran erleichtern. Hierzu wird FuGENE6 im Verhältnis 2/1 (v/w) zur DNA eingesetzt.

4 µl FuGENE6 Reagenz wurden in 96 µl Transfektionsmedium OptiMem verdünnt und 15 min bei RT inkubiert. Diese Verdünnung wurde sodann zu 2 µg DNA (pcDNA3 mit bzw. ohne Insert) gegeben. Im Anschluß an eine weitere Inkubation von 15 min bei RT wurde das Gemisch

tropfenweise in eine 35 mm Zellkulturschale pipettiert, in welcher sich bereits 50 - 60 % konfluent gewachsene Zellen und 600 µl Medium (mit 10 % FCS [v/v] supplementiert) befanden. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

Im nächsten Schritt zur Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie wurde dem jeweiligen Medium das Neomycin-Analogon G418 zugegeben. Dies ermöglichte die Trennung transfizierter Zellen, welche die exogene DNA (inklusive dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen) aufgenommen hatten, von nichttransfizierten Zellen ohne Resistenz. Dazu wurden 48 - 60 h nach Beginn der Transfektion die Zellen trypsiniert (s. **3.2.2.1**) und in neues Medium transferiert, welches 500 µg G418/ml für *HEK-293* oder 400 µg G418/ml für *NIH/3T3* Zellen enthielt. Nach ca. 2 Wochen waren alle nichttransfizierten Zellen abgestorben. Überlebende Zellen wurden anschließend in Medium/G418 kultiviert. Zur Überprüfung der Transkription der transfizierten cDNA und der Proteinexpression wurden *RT-PCRs* (s. **3.2.15.5**), Northern und Western Blot Analysen (s. **3.2.12** und **3.2.21**) sowie immunocytochemische Färbungen (s. **3.2.19**) jeweils mit transfizierten, *mock*-transfizierten und nichttransfizierten Zellen durchgeführt.

3.2.19 Immunocytochemische Färbung von Zellen

Diese auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhende Methode wird zum Nachweis und zur Lokalisation von Antigenen in Zellen eingesetzt. Bei der indirekten Immunfluoreszenztechnik wird das Antigen durch einen Primärantikörper erkannt, welcher selbst durch einen speziesspezifischen, markierten Sekundärantikörper detektiert wird. Bei der Markierung handelt es sich z. B. um fluoreszierende Farbstoffe, die nach Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge Photonen emittieren. Diese Lichtemission kann mikroskopisch betrachtet werden. Das Prinzip dieser Methode findet auch im Zuge der Detektion von Nukleinsäuren und Proteinen im Northern und Western Blot Verfahren Anwendung (s. **3.2.13**), jedoch ist hier der Sekundärantikörper mit einem Enzym gekoppelt. Nach Zugabe eines entsprechenden Enzymsubstrats kann emittiertes Licht als Schwärzung eines Röntgenfilmes nachgewiesen werden.

3.2.19.1 Vorbereitung und Fixierung der Zellen

Trypsinierte Zellen (s. **3.2.2.1**) wurden in einer Dichte von ca. 3×10^4 Zellen/ml in ihrem jeweiligen Medium in die Vertiefungen einer *24-well* Platte ausgesät, welche je ein Deckglas enthielten. Nach etwa 2 Tagen wurden die 50 - 60 % konfluent bewachsenen Deckgläser dem Medium entnommen und für eine Stunde bei -20°C in eiskaltes Fixiermittel gelegt. Die dadurch verursachte Dehydratisierung, Denaturierung und Immobilisierung zellulärer Proteine sowie die Permeabilisierung der Zellmembranen ermöglichte in einem späteren Schritt das Eindringen von Antikörpern ins

Zellinnere. Diese schonende Fixierungsmethode verhinderte zudem die Zerstörung zellulärer Strukturen und die Maskierung bzw. Veränderung von Epitopen (HARLOW und LANE, 1988).

Zusammensetzung des verwendeten Fixiermittels:

- 0,002 % EGTA (w/v) in Methanol

3.2.19.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Auf Deckgläsern fixierte Zellen wurden zuerst für 30 min in PBS rehydratisiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation mit einem Primärantikörper, welcher - nach einem weiteren Waschschrift mit PBS - durch einen fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper (Fluorescein-Isothiocyanat- [FITC] oder Indocarbocyanin- [Cy3] gekoppelt) in einer weiteren, 30-minütigen Inkubation gebunden wurde. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Präparate in Glycerol/PBS (1:1 [v/v]) eingebettet. In parallelen Kontrollexperimenten wurden die Proben nur mit Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu erfassen. Zwecks Konservierung wurden die Präparate dann mit Nagellack umschlossen. Die Verwendung des AH3-Stereomikroskops erlaubte sowohl die lichtmikroskopische Betrachtung der Objekte im Hellfeld als auch die Anwendung der Epifluoreszenztechnik. Dabei wurde nach Anregung mit Licht definierter Wellenlänge die emittierte Fluoreszenz des an den Sekundärantikörper gekoppelten Farbstoffes detektiert. Eine an das Mikroskop angeschlossene Kamera ermöglichte die Dokumentation der Ergebnisse auf 35 mm Film.

Zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation His-markierter rekombinanter Proteine in transfizierten Zellen wurden Doppelfärbungsexperimente durchgeführt. Dazu folgte auf eine erste Inkubation mit einem Primärantikörper (Anti-His-Antikörper) eine Inkubation mit einem zweiten Primärantikörper (Anti-P33, 400 µg/ml; DEDIO *et al.*, 1998), welcher ein mitochondriales Markerprotein erkennt. In folgenden Inkubationen wurden die Primärantikörper durch ihre jeweiligen fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper detektiert, wobei deren Farbstoffe Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen emittierten. Beide Primärantikörper entstammten unterschiedlichen Organismen, so daß die Sekundärantikörper spezifisch binden konnten. Waschschriffe zwischen den Inkubationen sorgten für die Entfernung nichtgebundenen Antikörpers.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung	Exzitation (nm)	Emission (nm)
Anti-BHP2, polyklonal	1:1000	Anti-Kaninchen- IgG-Cy3	1:100	553	575
Anti-His, monoklonal	1:400	Anti-Maus- IgG-Cy3	1:200	553	575
Anti-P33, polyklonal	1:20	Anti-Kaninchen- IgG-FITC	1:200	492	520

Tab. 3.2: Angaben über die für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Kombinationen von Primär- und Sekundärantikörpern, deren Verdünnungen, die zur Anregung der Fluorochrome benötigten Wellenlängen (Exzitation) und die resultierenden Wellenlängen (Emission).

3.2.20 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.2.20.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Geweben und Zellkulturzellen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen setzt die Herstellung eines Proteinextraktes aus dem Probenmaterial voraus. Ein Arbeiten unter ständiger Kühlung und Zugabe von Protease-Inhibitoren und denaturierenden Agenzien verhindert dabei den Proteinabbau durch endogene Proteasen.

Zur Herstellung von Proteinrohextrakten aus Schwammgewebe wurde ca. 1 g schockgefrorenes Gewebe in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert und in einer äquivalenten Menge an PBS (versetzt mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail) homogenisiert. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurden Zelltrümmer durch eine Zentrifugation (20 min, $12000 \times g$, 4°C) vom Proteinextrakt abgetrennt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration dieses Überstands spektrophotometrisch nach Bradford bestimmt (s. **3.2.20.2**).

Zur Herstellung von Proteinrohextrakten aus Zellkulturzellen wurden konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, durch Zentrifugation pelletiert und in Medium resuspendiert (s. **3.2.2.1**). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen erneut pelletiert und in 200 μl Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die Zerkleinerung störender genomischer DNA erfolgte daraufhin durch eine kurze Sonifizierung mit 25 Watt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

PBS-Puffer:

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 8,1 mM NaH₂PO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄
- 1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail *Complete-Mini* pro 10 ml auf pH 7,2 einstellen.

2 × Laemmli-Probenpuffer:

- 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 20 % Glycerol (v/v)
- 4 % SDS (w/v)
- 0,2 % Bromphenolblau (w/v)
- 10 % β-Mercaptoethanol (v/v)
- 2 % Triton X 100 (v/v)

3.2.20.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Extraktes wurde die photometrische Methode nach Bradford eingesetzt (BRADFORD, 1976). Das dabei verwendete Roti-Quant enthält Coomassie Brilliant-Blue R250, welches in drei Zuständen vorkommt (kationisch, neutral, anionisch), die bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Durch Bindung eines Proteins, hauptsächlich mit seinen basischen Aminosäuren, wird der Farbstoff in den anionischen Zustand überführt. Dieser Übergang führt zu einer Absorptionsänderung, welche bei 595 nm gemessen werden kann.

150 µl eines Proteinextraktes bzw. 150 µl verschiedener BSA-Verdünnungen mit definierter Proteinkonzentration wurden in *wells* einer 96-*well* Platte mit je 150 µl Roti-Quant gemischt (Blindproben, bestehend aus Probenpuffer, wurden der gleichen Prozedur unterzogen). Danach konnte die Extinktion bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Readers bestimmt werden. Mit allen Reaktionsansätzen wurden dreifache Bestimmungen durchgeführt, aus denen später der Mittelwert berechnet wurde. Anhand der durch die BSA-Verdünnungsreihe ermittelten Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Extrakte dann bestimmt werden.

3.2.20.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt (LAEMMLI, 1970). Dabei verwendetes negativ-geladenes SDS (Natriumdodecylsulfat) bewirkt nicht nur eine Denaturierung der Proteine, sondern lagert sich auch in konstantem Gewichtsverhältnis an jene an. Die so entstandenen Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode; die negative Nettoladung der Komplexe ist dabei proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte (WEBER und OSBORN, 1969). Über Disulfidbrücken kovalent verknüpfte Proteinuntereinheiten werden durch Zugabe von β -Mercaptoethanol voneinander separiert.

Für die SDS-PAGE werden Polyacrylamidgele eingesetzt, die sich durch Polymerisation der Acrylamid-Monomere und anschließender Quervernetzung mit bifunktionalen Verbindungen (z. B. N,N'-Methylenbisacrylamid) ausbilden. Die Polymerisationsreaktion läuft in Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ab, wobei letzteres die Bildung freier Radikaler, welche die Kettenreaktion initiieren, aus APS katalysiert und so die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Zur Herstellung der Gele (7 cm \times 8 cm \times 0,75 mm) sowie zum anschließenden vertikalen Gellauf wurde vom Mini-Protean II-System Gebrauch gemacht. Da die Proteinauftrennung mittels eines diskontinuierlichen Verfahrens stattfinden sollte, wurde auf das polymerisierte Trenngel ein niederprozentiges Sammelgel gegossen. Der Einsatz eines Teflonkamms sorgte hierbei für die Aussparung der Probenaschen. Für die Zusammensetzung der Gele s. Tab. 3.3.

	Trenngel 15 %	Sammelgel 6 %
Rotiphorese Gel 30	5,0 ml	2,0 ml
1,0 M Tris -HCl, pH 6,8	—	2,5 ml
1,5 M Tris -HCl, pH 8,8	2,5 ml	—
SDS 10 % (w/v)	0,05 ml	0,05 ml
<i>Aq. bidest.</i>	2,3 ml	5,3 ml
APS 10 % (w/v)	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Tab. 3.3: Pipettierschema für die zur Proteinauftrennung eingesetzten SDS-Polyacrylamidgele.

Nachdem die mit 5 \times SDS-Probenpuffer 1:5 versetzten Schwammextrakte (10 - 12 μ g Protein) bzw. die sich bereits in Laemmli-Probenpuffer befindlichen Extrakte kultivierter Zellen und der Proteinmarker für 10 min bei 95°C denaturiert worden waren, konnten diese in die Gel-Taschen einpipettiert werden. Danach wurden die Laufkammern mit SDS-Laufpuffer gefüllt und eine Spannung von 120 - 140 V angelegt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

5 × SDS-Probenpuffer:

- 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 50 % Saccharose (w/v)
- 10 % SDS (w/v)
- 0,2 % Bromphenolblau (w/v)
- 12,5 % β -Mercaptoethanol (v/v)

SDS-Laufpuffer:

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS (w/v)

3.2.20.4 Coomassie Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant-Blue R250 wird zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen eingesetzt, da es unspezifisch an Proteine, nicht aber an die Gelmatrix bindet. Proteine erscheinen daher nach der Färbung des Gels als blaue Banden auf farblosem Hintergrund.

Nach dem Gellauf (s. **3.2.20.3**) wurde das Gel für 10 - 20 min in der Färbelösung inkubiert und danach so lange entfärbt, bis die Banden sich deutlich abzeichneten.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Coomassie-Färbelösung:

- 0,1 % Coomassie Brilliant-Blue R250 (w/v)
- 40 % Methanol (v/v)
- 10 % Essigsäure (v/v)

Coomassie-Entfärber:

- 30 % Methanol (v/v)
- 10 % Essigsäure (v/v)

3.2.21 Western Blotting

Beim Western Blotting werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (s. **3.2.20.3**) quantitativ aus dem Gel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran transferiert. Auf diese Weise werden die Proteine, deren Trennmuster erhalten bleibt, für den Nachweis mit immunologischen Methoden zugänglich (TOWBIN *et al.*, 1979).

Der Transfer wurde nach dem *Semi-Dry Blotting* Verfahren im "Sandwich-Aufbau" durchgeführt (WESTERMEIER *et al.*, 1989). Dazu wurde eine dem Gel in der Größe entsprechende

PVDF-Membran (nach einer kurzen Inkubation in Methanol) in Blottingpuffer äquilibriert. Die Membran wurde auf acht Lagen Filterpapier (mit Blottingpuffer getränkt und ebenfalls von gleicher Größe) plaziert, welche sich bereits auf der Anode befanden. Anschließend wurden das Gel und acht weitere Lagen Filterpapier auf die Membran gelegt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine wurde nach dem Aufsetzen der Kathode bei 1 mA/cm^2 für 75 min von Kathode zu Anode durchgeführt.

Zur Überprüfung des Transfers wurde das Gel nach beendeter Elektrophorese in eine Coomassie-Färbelösung überführt (s. **3.2.20.4**). Nach Abtrennen des Markerstreifens von der restlichen Membran wurden die Banden des Proteinstandards durch eine kurze Inkubation in einer Amidoschwarz-Färbelösung sichtbar gemacht. Der restliche Blot wurde ü. N. bei 4°C in einer Blockierungslösung inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Die Proteindetektion erfolgte auf indirektem Weg durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper, die der Erkennung proteinspezifischer Primärantikörper dienten. Dazu wurde am nächsten Tag die Membran fünfmal je 5 min mit TBST gewaschen und danach 75 min mit entsprechend verdünntem Primärantikörper unter Schütteln inkubiert. Zur Detektion unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an die aufgetrennten Proteine verblieb ein Streifen der Membran, ohne Behandlung mit dem primären Antikörper, im Verdünnungspuffer. Nach einem weiteren Waschschrift (5×5 min mit TBST) wurde dieser Streifen mit der restlichen Membran einer einstündigen Inkubation mit dem ebenfalls entsprechend verdünnten Sekundärantikörper unterzogen. Dieser war mit einer Peroxidase gekoppelt, so daß im Anschluß an einen letzten Waschschrift (5×5 min TBST, 1×5 min TBS) die Membran mit einem enzyspezifischen Substrat inkubiert ($50 \mu\text{l/cm}^2$, *Chemiluminescence Blotting Substrate*) und die Proteinbanden detektiert werden konnten (s. **3.2.13**).

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

Blottingpuffer:

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 20 % Methanol (v/v)

Blockierungslösung:

- 3 % Blocking-Reagenz in TBS (v/v)

TBS:

- 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 150 mM NaCl

TBST:

- 0,1 % Tween 20 in TBS (v/v)

Antikörper-Verdünnungspuffer:

- 0,3 % Blocking-Reagenz in TBST (v/v)

Amidoschwarz-Färbelösung:

- 0,1 % Amidoschwarz (w/v)
- 40 % Methanol (v/v)
- 10 % Essigsäure (v/v)

Amidoschwarz-Entfärber:

- 80 % Methanol (v/v)
- 5 % Essigsäure (v/v)

3.2.22 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper lassen sich durch mehrfache Immunisierung von z. B. Kaninchen erzeugen (AUSUBEL *et al.*, 1994). Damit steht ein wichtiges Werkzeug für den Nachweis des Antigens mittels immunologischer Methoden, beispielsweise immunocytochemische Färbung transfizierter Zellen oder Immundetektion im Rahmen eines Western Blots (s. **3.2.19** und **3.2.21**), zur Verfügung.

3.2.22.1 Immunisierung und Serumzubereitung

Zur Immunisierung weiblicher Kaninchen (Weiße Neuseeländer) wurde ein, in einem prokaryotischen System exprimiertes, rekombinantes Protein (s. **3.2.17**) als Antigen eingesetzt. Nach Abnahme von Blut - zur Herstellung des Präimmunsersums - erfolgte die Immunisierung insgesamt dreimal in einem Abstand von je vier Wochen. Die gleichzeitige Verabreichung des Antigens mit Freud'schem Adjuvans garantierte dabei einen besonders hohen Antikörpertiter, da letzteres sich für eine verlangsamte Freisetzung des Antigens und für eine verstärkte Immunantwort verantwortlich zeichnet (JOHNSTON *et al.*, 1991).

Vor der ersten Immunisierung wurden 0,5 ml Antigenlösung (20 ng/μl rekombinantes Protein) mit 0,5 ml Freud'schem Adjuvans (*complete*) emulgiert und anschließend an 8 Stellen subkutan injiziert. Für die beiden folgenden Immunisierungen wurde das Antigen mit Freud'schem Adjuvans (*incomplete*) versetzt und injiziert. Jeweils 10 - 12 Tage nach der zweiten bzw. dritten Immunisierung wurde dem Versuchstier Blut aus der Ohrvene, zur Überprüfung des Antikörpertiters, entnommen (s. **3.2.22.2**). Bei Vorlage eines ausreichenden Titers wurden dem Kaninchen 15 ml Blut abgenommen. Dieses Blut, wie auch das vor der Immunisierung entnommene, wurde zur Serumzubereitung 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an eine weitere einstündige Inkubation, diesmal auf Eis, wurde es dann 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachfolgend ließ sich das Serum von geronnenen Blutbestandteilen trennen und wurde bei -20°C gelagert.

3.2.22.2 Bestimmung des Antikörpertiters

Zur Überprüfung der Immunisierungseffizienz wurden ELISA-Platten mit dem entsprechenden Antigen beschichtet und mit Antiserum - bzw. Präimmenserum für eine Kontrollreaktion - inkubiert. Im Anschluß daran wurde gebundener Primärantikörper durch einen weiteren Antikörper detektiert und die gebildeten Komplexe durch eine Farbstoffreaktion des an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms sichtbar gemacht.

Zum Zweck der Beschichtung von ELISA-Platten wurden 100 µl Antigenlösung (1 µg/ml Carbonatpuffer) in die *wells* einer 96-*well* Platten pipettiert. Nach einem dreistündigen Trocknungsschritt bei RT wurden nichtgebundene Komponenten durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anlässlich der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die *wells* jeweils mit 150 µl 3 %igem BSA (w/v) in PBS ü. N. bei 4°C inkubiert. Im Anschluß an drei Waschschrte mit PBS wurden für die folgende Antikörperreaktion verschiedene Verdünnungen des Präimmun- und Antiserums in PBS eingesetzt (1:100 bis 1:2000; für Serum nach der dritten Immunisierung bis 1:500000). Dazu wurden pro *well* 100 µl der jeweiligen Verdünnung für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS wurden in jedes *well* 100 µl des mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-*Rabbit*-Sekundärantikörpers gegeben (1:2000 in PBS verdünnt). Im Anschluß an eine 30-minütige Inkubation bei RT und drei folgenden Waschschrten mit PBS wurden 100 µl einer gebrauchsfertigen Substratlösung in jedes *well* pipettiert. Die enzymatisch katalysierte Farbreaktion wurde nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln durch Zugabe von 25 µl H₂SO₄ (1 M) abgestoppt und bei 450 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers ausgewertet.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

PBS-Puffer:

- 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 9,6 mM Na₂HPO₄
 - 1,8 mM KH₂PO₄
- auf pH 7,2 einstellen.

Carbonatpuffer:

- 0,1 M NaHCO₃
- auf pH 9,6 einstellen.

Substratlösung:

- 1,25 mM Tetramethylbenzidin
- 2,2 mM H₂O₂

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Charakterisierung der cDNA zweier Bcl-2-homologer Proteine aus dem marinen Schwamm *Geodia cydonium*

Als Regulatoren gehören die Mitglieder der Bcl-2 Familie zu den wichtigsten Komponenten der Apoptose, die im Verlauf der Evolution von Nematoden zu Vertebraten konserviert wurden. Der Nachweis Bcl-2-homologer Proteine in Schwämmen läßt die Existenz apoptotischer Mechanismen schon in diesen, den einfachsten Metazoen, vermuten und eröffnet neue Möglichkeiten für die Apoptose-Forschung.

4.1.1 Klonierung des *GCBHP1* und des *GCBHP2*

Bcl-2 und seine Homologen sind durch den Besitz mindestens einer von vier Domänen gekennzeichnet, den sog. Bcl-2 Homologie Domänen (BH-Domänen; ADAMS und CORY, 1998). Zur Klonierung Bcl-2-homologer Proteine aus *G. cydonium*, im weiteren Verlauf als BHP bezeichnet, wurden daher die Aminosäuresequenzen diverser Bcl-2 Proteine verschiedener Spezies miteinander verglichen. Daraufhin wurde ein degenerierter Primer für eine Region mit hohem Anteil konservierter Aminosäuren, als BH1-Domäne bekannt, hergestellt (s. 3.2.14). Diese Domäne ist bei vielen Vertretern der Bcl-2 Familie anzutreffen. Mittels des degenerierten Rückwärts-Primers BHP_{deg} R1 (Nt₄₅₇ - Nt₄₈₀ der vollständigen *GCBHP1*-Sequenz) wurde anschließend, in Verbindung mit dem vektorspezifischen Vorwärts-Primer CMVF, ein ca. 580 bp großes Fragment aus der *G. cydonium* cDNA-Bibliothek durch PCR isoliert (s. 3.2.15.1). Nach seiner Ligation und Klonierung wurde dieses Fragment sequenziert (s. 3.2.16). Die Sequenz wurde nachfolgend einer Datenbankanalyse mittels des BLAST-Algorithmus' unterzogen (s. 3.1.10), woraufhin höchste Homologien zu antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen, u. a. zum murinen Bcl-x₁ und dem Bcl-2 Homolog aus *Xenopus laevis*, nachgewiesen werden konnten. Der Einsatz des fragmentspezifischen Vorwärts-Primers BHP1 F1 (Nt₁₉ - Nt₃₈ der *GCBHP1*-Sequenz) und des vektorspezifischen Rückwärts-Primers T7 lieferte schließlich durch eine erneute PCR den restlichen Teil der *GCBHP1*-cDNA (inkl. des Poly(A)-Schwanzes) als Fragment einer Größe von ca. 1100 bp. Zur Verifikation der kompletten, durch *primer-walking* erhaltenen *GCBHP1*-Sequenz wurde eine DIG-markierte Sonde mittels PCR - unter Verwendung des *GCBHP1*-spezifischen Rückwärts-Primers BHP1 R2 (Nt₅₃₉ - Nt₅₅₉) und des vektorspezifischen Vorwärts-Primers CMVF - hergestellt (s. 3.2.15.4). Mit Hilfe dieser Sonde (670 bp) wurde die *G. cydonium* cDNA-Bank nach Klonen des *GCBHP1* gescreent (s. 3.2.9). Ein Teil der durch das Homologiescreening erhaltenen unabhängigen Klone erwies sich nach seiner Sequenzierung als identisch mit jenen durch *primer-walking* gewonnenen Klonen.

GCBHP1:

M A T G S L T C Y S F T H S P R S V P K R H	22
ATTTTGC ATGGCCACTGGGTCACTGACTTGTACTCCTTCAACCCACTCGCCCCGCTCTGTGCCGAAACGCCAT	66
Q L H Q R A S P K Q Q R A V R G G G E K R M S D D	47
CAGCTACATCAGCGAGCGTCGCCATAAACACAGCGAGCAGTCCGCGGAGGAGAGAGAAGAGAATGAGCGACGAC	141
P A V V Q A E F L A K D V V E Y L L N K E G M S V	72
CCAGCCGTAGTCCAGGCGGAGTTCTCGCTAAGGACGTAGTGGAGTATCTACTAAACAAGGAGGGGATGTCCGGTG	216
N G Y T D V L P G H L R K V P R K E R Q C L H E P	97
AATGGGTACACGGACGTTCTCCCGGGCACCTTAGAAAAGTACCACGGAAAGAGAGACAATGTCTACACGAGCCA	291
S F E Q A R R Q I V C G C Q C I M H Q H G V E I E	122
TCTTTTGAACAAGCTCGGAGGCAAAATCGTCTGCGGGTGTCAATGCATTATGCATCAGCACGGCGTGGAAATAGAG	366
Q I C M K V D V G D E H L Y S N V K E A L A T I W	147
CAGATCTGCATGAAAGTGGACGTGGGAGACGACACCTTTACTCGAATGTGAAAGAAGCGCTAGCGACAATCTGG	441
E E P K N W G R L V S L F V A A Y Y L C K R I C D	172
GAAGAACCGAAAACTGGGGACGGTTAGTGTCCCTCTTCTGTCGGCGCTTACTACCTGTGCAAGAGAATTTGCGAC	516
E E G E G S E K I D S V I G W L A S F L K E N A V	197
GAGGAAGGAGAGGGGACGAGAAAGATTGACAGCGTCATCGGATGGCTGGCCAGTTTTCTGAAGGAAAACGCAGTC	591
P W V V E R G G F A G V L Y G T N I K P Q A A G A	222
CCGTGGGTGCTGGAACGTGGCGGCTTTGCTGGTGTGCTCTATGGCACTAACATAAAGCCACAGGCGGCAGGAGCT	666
A V E D C K S D Y T K A S L F V T A L G L G A A V	247
GCAGTCGAAGATTGTAATCTGACTACACAAAAGCCAGTCTATTTGTGACGGCTCTCGGGCTCGGCGCAGCGGTG	741
V V G T I I G R *	255
TTGTTGGGACCATCATAGGGAGA TAA CACATGGAGA ACTGTGCCGTTGAATTCACTATTACATTGGACTACATG	816
TGCCATCAGCCAGCATAATGTTACCCCAAGGACAATGGCATAGAGCAGGACTTGAAGATTGTGTGTGCCAT	891
TTGTCTTCTCTCACTGTCACCCCTCCCTCCTTCTCTACAAATGCTATACTTTCACCCTTATCACTTTATTTAAAA	966
ATTTCAGAAAATTATAATATGGATAATG (A)_n	993

GCBHP2:

CTTCAGACAGCAAGAAAACCCAAGTCGAGGTTGTGGAAGAAGACGGCGAGTAGCTGGATCACGTGATCACGA	-37
M A A R G S A A P G G R A	13
CGGTCCGGCTATTACCGGACGACTGAAGTATTGTTG ATGGCAGCTCGGGGATCGGCGGCCCCAGGAGGACGGGCC	39
N G R F H S R L Y L Q N T A V M E E L Y R R N L S	38
AACGGCAGATTCCACTCTCGTCTTATCTCCAAAACACGGCCGTGATGGAGGAGCTCTACAGAAGGAACCTCTCC	114
E D L V R D N G L S C G G R E Y W R E P A S T V G	63
GAGGATCTAGTTCCAGACAACCGCCTCTCCTGTGGAGGCCGGGAGTACTGGAGGGAGCCGGCGAGCACGGTTGGG	189
A A S D G L S E E E R R T A A D A A E R M T A V I	88
GCTGCCAGCGACGGCTGAGCGAGGAGGAGGCGGACGGCGGGGATGCGGCGGAGAGGATGACGGCAGTGATA	264
A G T P G I A V E R N V R D F R R G G W D V T P D	113
GCTGGAACCCCGGATAGCGGTGGAGAGAAATGTCAGAGATTTTCAGGCGGGCGGTTGGGACGTGACCCCTGAC	339
N V E S E F R E V E R R T F S D G V H W G R V I A	138
AATGTAGAGTCGGAGTTTAGGGAAGTGGAGAGACGGACGTTCTCAGACGGCGTTCACTGGGGTCCGGTGATAGCG	414
F L A F S S M S F A A Y V N S R G I D G G A Y S V F	163
TTCTCCGCTTCTCCATGTCATTCGCTGCGTATGCTCAACAGTTCGCGGATAGACGGTGGAGCCTACAGTGTCTTC	489
N W T L R V L N D S L A D F I Q R E N G W R G F I	188
AACTGGACGCTGAGGGTGCTGAATGACAGCCTTGCTGACTTCATCCAGAGAGAGAATGGATGGAGAGGATTTCATT	564
V Y A D T L L R A Q G S T P P Q H Q T R G V W D A	213
GTCTACGCAGACACTCCTAAGAGCGCAGGGCTCTACACCTCCGCAGCACCAGACAAGAGAGTGTGGGATGCA	639
V A G I G V I G V G T L L A L G M R Q A F S *	235
GTAGCCGGTATTGGTGTGCTATTGGTGTGGGACTCTTCTGGCTCTTGGAAATGAGACAAGCTTTTTTC TGAGACCCG	714
CTCCTTCCCACGGGACATCGTGTGAGTGTGTGTGAGAGGCTCAGCAGTTATTATTTTCATTGGAAACTGG	789
AATTAGGAGACATTTTGAATCATAATTATGAAAGTC (A)_n	825

Abb. 4.1: Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenzen des GCBHP1 und des GCBHP2. 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche sind **blau** bzw. **grün** eingefärbt, kodierende Bereiche sind in schwarzen Lettern dargestellt. Die Numerierung der Nukleotide der kodierenden Bereiche und der 3'-untranslatierten Regionen beginnt mit +1 am Start-Codon, jene der Nukleotide der 5'-untranslatierten Regionen beginnt direkt hinter dem Start-Codon mit -1. Start- und Stopp-Codons sind **fett** und letztere durch einen zusätzlichen Stern (*) markiert.

Aufgrund der niedrigen Hybridisierungstemperatur (42°C) führte der Einsatz der o. g. Sonde zusätzlich zur Detektion weiterer Klone. Diese zeigten im Anschluß an ihre Sequenzierung und eine Datenbankanalyse ebenfalls eine deutliche Homologie zum murinen Bcl-x₁ und dem Bcl-2 Homolog aus *X. laevis*. Die Sequenz wurden daher als *GCBHP2* tituiert (s. Abb. 4.1). Northern Blot Analysen lieferten eine zusätzliche Bestätigung bezüglich der Vollständigkeit beider cDNAs (s. 4.3).

4.1.2 Analysen der Basensequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *GCBHP1*

Die komplette cDNA des *GCBHP1* hat eine Länge von 1000 bp (exklusive des Poly(A)-Schwanzes) und beinhaltet einen offenen Leserahmen von 765 bp, der für ein potentiell Protein von 255 As kodiert. Die kodierende Sequenz ist von einer relativ kurzen 5'-nichtkodierenden Region aus 7 bp und einer 3'-nichtkodierenden Region aus 228 bp umgeben (letztere versteht sich inkl. des ersten Stopp-Codons bei Nt₇₆₆ - Nt₇₆₈ und exkl. des Poly(A)-Schwanzes).

Die das Start-ATG umgebende Sequenz entspricht nicht vollständig der für eine optimale Translationsinitiation bei Vertebraten verantwortlichen Sequenz (Konsensus: GCCA/GCC-ATGG; KOZAK, 1991). An Position -1 ist zwar die minder bedeutende Pyrimidinbase C und an Position +4 die überaus wichtige Purinbase G vorhanden, jedoch fehlt der Schwammsequenz die gleichermaßen wichtige Purinbase A/G an Position -3. Der 3'-nichtkodierende Bereich weist einen recht hohen Gehalt an A und T (27,0 % bzw. 38,7 %) innerhalb der letzten 111 bp vor dem Poly(A)-Schwanz auf, besitzt jedoch nicht das typische Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.*, 1986). Damit wird ein bei Schwämmen häufig beobachtetes Phänomen bestätigt (PFEIFER *et al.*, 1993). Statt der typischen Signalsequenz mag eine rudimentäre Form, AATA (Nt₉₈₁ - Nt₉₈₄), deren Funktion übernehmen. Weiterhin befindet sich in der 3'-untranslatierten Region ein ATTTA-Motiv (Nt₉₅₉ - Nt₉₆₃), welches als Indikator für eine kurze mRNA-Halbwertszeit angesehen wird (BOERBOOM und SIROIS, 1998).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *GCBHP1*, im folgenden als BHP1 bezeichnet, umfaßt 255 As mit einem errechneten Molekulargewicht von 28,164 kDa und einem isoelektrischen Punkt bei 7,53. Der errechnete Instabilitätsindex von 43,18 deutet auf ein instabiles Protein hin (PC/GENE, 1995). Prosite-Analysen haben folgende, allgemeine Motive als potentielle Ziele posttranslationaler Modifikationen erkannt:

- 1) Phosphorylierung eines Serinrestes durch eine cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinase (Konsensus: [RK](2)-x-[ST]; FERAMISCO *et al.*, 1980): As₄₂ - As₄₅.
- 2) Phosphorylierung eines Serinrestes durch eine Proteinkinase C (Konsensus: [ST]-x-[RK]; KISHIMOTO *et al.*, 1985): As₁₄ - As₁₆, As₂₉ - As₃₁, As₁₇₈ - As₁₈₀.
- 3) N-Myristoylierung eines Glycinrestes (Konsensus: G{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}; TOWLER *et al.*, 1988): As₄ - As₉, As₆₉ - As₇₄, As₂₀₄ - As₂₀₉, As₂₀₈ - As₂₁₃, As₂₄₂ - As₂₄₇, As₂₅₀ - As₂₅₅.

Der Nachweis folgender spezifischer Signaturen verdeutlicht die Zugehörigkeit des BHP1 zur Familie der Bcl-2 Proteine:

1) Die BH1-Domäne (Konsensus: [LVME]-[FT]-x-[GSD]-[GL]-x(1,2)-[NS]-[YW]-G-R-[LIV]-[LIVC]-[GAT]-[LIVMF](2)-x-F-[GSAE]-[GSARY]; Prosite *Acc. No.* PS01080): As₁₄₅ - As₁₆₄. Die Übereinstimmung mit diesem Motiv beträgt ca. 70 %.

2) Die BH2-Domäne (Konsensus: W-[LIM]-x(3)-[GR]-G-[WQ]-[DENSAV]-x-[FLGA]-[LIVFTC]; Prosite *Acc. No.* PS01258): As₁₉₉ - As₂₁₀. Die Übereinstimmung mit diesem Motiv beträgt 75 %.

Beide Domänen sind typisch für Vertreter der antiapoptischen Bcl-2 Subfamilie. Dagegen sind diese Domänen nur bei wenigen Mitgliedern der proapoptischen Fraktion der Bcl-2 Familie, der Bax Subfamilie, vorzufinden. BHP1 weist weder die für alle proapoptischen Bcl-2 Proteine charakteristische BH3-Domäne (Konsensus: [LIVAT]-x(3)-L-[KARQ]-x-[IVAL]-G-D-[DESG]-[LIMFV]-[DENSHQ]-[LVSHRQ]-[NSR]; Prosite *Acc. No.* PS01259) noch die BH4-Domäne (Konsensus: [DS]-[NT]-R-[AE]-[LI]-V-x-[KD]-[FY]-[LIV]-[GHS]-Y-K-L-[SR]-Q-[RK]-G-[HY]-x-[CW]; Prosite *Acc. No.* PS01260) auf.

Nach der von HARTMANN *et al.* (1998) entwickelten Methode wird zudem für BHP1 eine, für die meisten Bcl-2 Proteine charakteristische Membrantopologie vorhergesagt: As₂₃₄ - As₂₅₄ bilden einen transmembranen Bereich, das Gros des Proteins (As₁ - As₂₃₃), inkl. seines N-Terminus, verbleibt dagegen im Cytoplasma (PSORT II, s. **3.1.10**). Kennzeichnend für den Membrananker ist die Flankierung von je einer geladenen As (K₂₃₃, R₂₅₅; BOISE *et al.*, 1993). Die durchschnittliche Hydrophobizität dieses transmembranen Segments beträgt 2,07 (KYTE und DOOLITTLE, 1982).

Mittels NPSA-Algorithmen (s. **3.1.10**) wurden sieben α -helikale Segmente vorhergesagt, deren Existenz und relative Position gleichfalls ein markantes Kennzeichen der Bcl-2 Familie darstellt (INOHARA *et al.*, 1998): As₃₀ - As₃₅, As₄₈ - As₆₄, As₈₇ - As₉₂, As₉₈ - As₁₀₄, As₁₃₅ - As₁₄₇, As₁₅₄ - As₁₇₁, As₁₇₉ - As₁₉₂.

4.1.3 Analysen der Basensequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *GCBHP2*

Die komplette cDNA des *GCBHP2* besitzt eine Länge von 934 bp (exklusive des Poly(A)-Schwanzes) und beinhaltet einen offenen Leserahmen von 705 bp, der für ein mutmaßliches Protein von 235 As kodiert. Der kodierende Bereich wird von einer 5'-nichtkodierenden Region mit einer Länge von 109 bp und einer 3'-nichtkodierenden Region mit einer Länge von 120 bp (inkl. des ersten Stopp-Codons bei Nt₇₀₆ - Nt₇₀₈, exkl. des Poly(A)-Schwanzes) umschlossen.

Wie auch im Fall des *GCBHP1* entspricht die das Start-ATG umgebende Sequenz nicht vollständig der für eine optimale Translationsinitiation bei Vertebraten verantwortlichen Konsensussequenz (GCCA/GCCATGG; KOZAK, 1991). Wieder ist an Position +4 die überaus wichtige Purinbase G vorhanden und wieder fehlt an Position -3 die gleichermaßen wichtige

Purinbase A/G. Statt dessen tritt sowohl bei *GCBHP1* als auch bei *GCBHP2* an Position -3 ein T auf. Diese unvollständige Übereinstimmung mit der Vertebraten-Konsensussequenz findet sich häufig bei Schwammsequenzen (s. z. B. 4.2) und verdeutlicht den Bedarf nach einer modifizierten, an niedere Metazoen angepaßten Konsensussequenz. Dies gilt gleichermaßen für das Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.*, 1986), welches häufig der cDNA von Schwammgenen abgängig ist (s. 4.1.2 und 4.2 sowie z. B. PFEIFER *et al.*, 1993; WIENS *et al.*, 1998). Wie auch *GCBHP1* ist die *GCBHP2*-mRNA nahe des Poly(A)-Schwanzes durch einen hohen Gehalt an A/T gekennzeichnet (im Fall des *GCBHP2* 28 % A und 33 % T der letzten 100 bp der 3'-nichtkodierenden Region). Zudem lassen sich in diesen Bereichen häufig Variationen bzw. Rudimente des Polyadenylierungssignals nachweisen (*GCBHP2*: AATA [N_t790 - N_t794], *GCBHP1* (s. 4.1.2): AATA [N_t981 - N_t984], *GCSEPI* (s. 4.2): ATTA [N_t1207 - N_t1210]), welche möglicherweise dessen Funktion übernehmen (WEMPE *et al.*, 1992).

BHP2, das potentielle *GCBHP2*-Translationsprodukt, besteht aus 235 As mit einem errechneten Molekulargewicht von 25,783 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,38. Mit einem kalkulierten Instabilitätsindex von 33,57 läßt sich BHP2 den stabilen Proteinen zuordnen (PC/GENE, 1995). Prosite-Analysen des BHP2 haben folgende Sequenzbereiche erkannt, die eine Möglichkeit für posttranslationale Modifikationen bieten:

1) N-Glykosylierung eines Asparaginrestes (Konsensus: N-{P}-[ST]-{P}; MARSHALL, 1972): AS₃₆ - AS₃₉, AS₁₆₄ - AS₁₆₇, AS₁₇₁ - AS₁₇₄.

2) Phosphorylierung eines Threoninrestes durch eine Proteinkinase C (Konsensus: [ST]-x-[RK]; KISHIMOTO *et al.*, 1985): AS₁₆₆ - AS₁₆₈.

3) Phosphorylierung eines Tyrosinrestes durch eine Tyrosinproteinkinase (Konsensus: [RK]-x(2,3)-[DE]-x(3)-Y; HUNTER, 1982): AS₁₅₃ - AS₁₆₀.

4) N-Myristoylierung eines Glycinrestes (Konsensus: G{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}; TOWLER *et al.*, 1988): AS₁₀ - AS₁₅, AS₄₆ - AS₅₁, AS₁₃₀ - AS₁₃₅, AS₁₅₄ - AS₁₅₉, AS₁₅₇ - AS₁₆₂, AS₂₀₉ - AS₂₁₄, AS₂₂₃ - AS₂₂₈, AS₂₂₉ - AS₂₃₄.

Weitere Prosite-Analysen offenbarten auch für BHP2, analog zum BHP1, zwei der wichtigsten Proteinsignaturen, welche die Bcl-2 Familie kennzeichnen:

1) Die BH1-Domäne (Konsensus: [LVME]-[FT]-x-[GSD]-[GL]-x(1,2)-[NS]-[YW]-G-R-[LIV]-[LIVC]-[GAT]-[LIVMF](2)-x-F-[GSAE]-[GSARY]; Prosite *Acc. No.* PS01080): AS₁₂₆ - AS₁₄₄. Die Übereinstimmung mit diesem Motiv beträgt ca. 84 %.

2) Die BH2-Domäne (Konsensus: W-[LIM]-x(3)-[GR]-G-[WQ]-[DENSAV]-x-[FLGA]-[LIVFTC]; Prosite *Acc. No.* PS01258): AS₁₇₇ - AS₁₈₈. Die Übereinstimmung mit diesem Motiv beträgt 75 %.

BHP2 weist außerdem weder die für proapoptotische Bcl-2 Proteine charakteristische BH3-Domäne noch die insgesamt selten in Erscheinung tretende BH4-Domäne auf. Auch für das BHP2 wird nach HARTMANN *et al.* (1998) die für viele Bcl-2 Proteine markante Membrantopologie vorhergesagt: Der größte Teil des BHP2 (As₁ - As₂₁₂) verbleibt im Cytoplasma. Der restliche Abschnitt (As₂₁₃ - As₂₃₄) stellt einen potentiellen transmembranen Bereich dar, der N-terminal von einer geladenen (D₂₁₂) und C-terminal von einer polaren (S₂₃₅) Aminosäure flankiert wird (PSORT II, s. **3.1.10**). Die durchschnittliche Hydrophobizität dieses Membranankers beträgt 1,55 (KYTE und DOOLITTLE, 1982). Laut NPSA (s. **3.1.10**) werden für BHP2 gleichfalls die für Bcl-2 Proteine charakteristischen sieben α -helikalen Regionen vorhergesagt (INOHARA *et al.*, 1998): As₂₅ - As₃₅, As₇₀ - As₈₆, As₉₆ - As₁₀₃, As₁₁₅ - As₁₂₄, As₁₃₇ - As₁₄₇, As₁₇₂ - As₁₈₀, As₁₉₀ - As₁₉₆.

4.1.4 Vergleiche der Basensequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *GCBHP1* und des *GCBHP2*

GCBHP1 und *GCBHP2* weisen im Vergleich zu Vertebraten modifizierte Signalsequenzen sowohl bezüglich einer optimalen Translationsinitiation als auch bezüglich der Polyadenylierung der mRNA auf. Mit einer Größe von 235 As unterscheidet sich das potentielle Translationsprodukt des *GCBHP2*, BHP2, lediglich um ca. 2,4 kDa von jenem des *GCBHP1* (255 As). Die Sequenzhomologie beider Proteine beläuft sich auf 14 % identische und 31 % ähnliche (bezüglich ihrer physikalischen/chemischen Eigenschaften) Aminosäuren. BHP1 und BHP2 verfügen über zwei charakteristische Signaturen vieler antiapoptotischer Bcl-2 Proteine: die BH1- und BH2-Domänen, welche jedoch in leicht modifizierter Form vorliegen. Auch der Besitz eines transmembranen Segments und sieben α -helikaler Bereiche ist ebenfalls kennzeichnend für die Familie der Apoptose-Regulatoren. Zusätzlich zu diesen Bcl-2-spezifischen Merkmalen sind beide Proteine mit vielfältige Signalsequenzen für posttranslationale Modifikationen versehen. Diese Modifikationen sind potentiell an der Regulation der Aktivität von Bcl-2 Proteinen beteiligt (KONOPLEVA *et al.*, 1999). Insbesondere die Phosphorylierung eines Serins (As₇₀ des humanen Bcl-2, As₇₁ des BHP1 und As₇₀ des BHP2) scheint an der Aktivierung zu partizipieren (ITO *et al.*, 1997).

BHP1_GC	:	MATGSLTCYSFTHSPRSVPKRHQLHQRASPKQQRAVRGGGKERMSDDPAVVQAEFLAKDVVEYLLN	:	66
BHP2_GC	:	-----MAARGSAAPGGRANGRFHSRLYLQNTAVMEELYRNLSEDLVR	:	43
BHP1_GC	:	KEGMSVNGYTDVLPGHLRKYPRKERQCLHEPSEFQARRQIVCGCQCTMHQHGVEETEQICMKV----	:	128
BHP2_GC	:	DNGLSCGGR-EYWREPASTVG-AASDGLSEEEERTTAADAAERMTAVIAGTPEGIAVERNVRDFRRGG	:	107
BHP1_GC	:	-DVGDEHLYSNVKEALATIWEEPKNWGRLVSLFVAAYYLCKRVCDEEGEGSEKIDSVIGWLASFLK	:	193
BHP2_GC	:	WDVTPDNVSESEFREVERRTESDGVHWGRVIAFLAFSMSFAAYVNSRGIDGG--AYSVFNWTLRVLN	:	171
BH1-Domäne				
BHP1_GC	:	ENAVPWWVERGGFAGVLYGTNIKPOAAGAAVEDCKSD-YTKASLFTALGLGAAVVGTIIG-R	:	255
BHP2_GC	:	DSLADFIQRENGWRGFTVYADTLLRAGGSTPPQHQRGVWDVAVAGTGVIGVGTLLALGMRQAFS	:	235
BH2-Domäne		TM		

Abb. 4.2: Aminosäuresequenzvergleich der BH-Proteine aus *G. cydonium*, BHP1_GC und BHP2_GC. Identische bzw. ähnliche (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren wurden schwarz unterlegt (BLOSUM 62 Matrix; HENIKOFF und HENIKOFF, 1992). Die für Bcl-2 Proteine charakteristischen BH-Domänen und transmembranen Bereiche (TM) wurden markiert.

Die Sequenzhomologie des BHP1 bzw. des BHP2 zu anderen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie beträgt durchschnittlich 9 % bzw. 10 % identische und 21 % bzw. 23 % ähnliche Aminosäuren. In separaten Ansätzen wurden die Sequenzen der funktional bedeutsamen BH1- und BH2-Domänen sowie des transmembranen Bereichs verschiedener Bcl-2 Proteine diverser Spezies mit den entsprechenden Regionen des BHP1 und des BHP2 verglichen. Hierfür wurden die Aminosäuresequenzen der BH1-Domänen von BHP1 (As₁₄₄ - As₁₆₅) und BHP2 (As₁₂₄ - As₁₄₅) aus *G. cydonium* mit den korrespondierenden Domänen antiapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *C. elegans* (CED9_CAEEL: As₁₅₈ - As₁₈₀, Acc. No. P41958), *X. laevis* (AR11_XENLA: As₁₀₀ - As₁₂₁, Acc. No. Q91828), *M. musculus* (BCLX_MOUSE: As₁₂₈ - As₁₄₉, Acc. No. AAC53459), *H. sapiens* (BCL2_HUMAN: As₁₃₅ - As₁₅₆, Acc. No. P10415; BCLW_HUMAN: As₈₄ - As₁₀₅, Acc. No. Q92843; MCL1_HUMAN: As₂₅₁ - As₂₇₃, Acc. No. Q07820; BFL1_HUMAN: As₇₆ - As₉₈, Acc. No. Q16548), *C. coturnix* (NR13_COTJA: As₇₃ - As₉₅, Acc. No. Q90343) und proapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *H. sapiens* (BAK_HUMAN: As₁₁₆ - As₁₃₇, Acc. No. 1096082; HRK_HUMAN: As₁ - As₂₀, Acc. No. AAC34931), *M. musculus* (MTD_MOUSE: As₁₁₂ - As₁₃₃, Acc. No. AAC53582; BAXA_MOUSE: As₉₇ - As₁₁₉, Acc. No. Q07813; BAD_MOUSE: As₁₃₇ - As₁₅₉, Acc. No. A55671) und *R. rattus* (BOK_RAT: As₆₉ - As₉₀, Acc. No. AAC61928) align (s. Abb. 4.3).

Für einen Vergleich der BH2-Domänen (s. Abb. 4.4) wurden die entsprechenden Domänen des BHP1 (As₁₉₅ - As₂₁₆) und des BHP2 (As₁₇₃ - As₁₉₃) aus *G. cydonium* den Aminosäuresequenzen der korrespondierenden Domänen antiapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *C. elegans* (CED9_CAEEL: As₂₁₀ - As₂₃₁), *X. laevis* (AR11_XENLA: As₁₄₉ - As₁₇₀), *M. musculus* (BCLX_MOUSE: As₁₇₇ - As₁₉₈), *H. sapiens* (BCL2_HUMAN: As₁₈₄ - As₂₀₅; BCLW_HUMAN: As₁₃₃ - As₁₅₄; MCL1_HUMAN: As₃₀₁ - As₃₂₂; BFL1_HUMAN: As₁₂₉ - As₁₅₀), *C. coturnix* (NR13_COTJA: As₁₂₃ - As₁₄₄) und proapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *H. sapiens*

(BAK_HUMAN: As₁₆₆ - As₁₈₆; BIK_HUMAN: As₁₁₈ - As₁₄₀, *Acc. No. Q13323*; NBK_HUMAN: As₁₁₈ - As₁₄₀, *Acc. No. AAC79124*), *M. musculus* (MTD_MOUSE: As₁₆₁ - As₁₈₂; BAXA_MOUSE: As₁₄₇ - As₁₆₇; BAD_MOUSE: As₁₇₂ - As₁₉₃) und *R. rattus* (BOK_RAT: As₁₁₈ - As₁₃₉) gegenübergestellt.

Schließlich wurden die Aminosäuresequenzen der potentiellen Membrananker des BHP1 (As₂₃₄ - As₂₅₅) und des BHP2 (As₂₁₃ - As₂₃₅) aus *G. cydonium* mit jenen antiapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *C. elegans* (CED9_CAEEL: As₂₆₀ - As₂₈₀), *X. laevis* (AR11_XENLA: As₁₈₂ - As₂₀₂), *M. musculus* (BCLX_MOUSE: As₂₁₁ - As₂₃₃), *H. sapiens* (BCL2_HUMAN: As₂₁₇ - As₂₃₉; BCLW_HUMAN: As₁₇₀ - As₁₉₃; MCL1_HUMAN: As₃₂₉ - As₃₅₀; BFL1_HUMAN: As₁₅₂ - As₁₇₅), *C. coturnix* (NR13_COTJA: As₁₅₆ - As₁₇₇) und proapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *H. sapiens* (BAK_HUMAN: As₁₉₁ - As₂₁₁; BIK_HUMAN: As₁₃₈ - As₁₆₀; HRK_HUMAN: As₆₉ - As₉₁), *M. musculus* (MTD_MOUSE: As₁₈₈ - As₂₁₃; BAXA_MOUSE: As₁₇₁ - As₁₉₂) und *R. rattus* (BOK_RAT: As₁₄₆ - As₁₇₀) verglichen (s. Abb. 4.4).

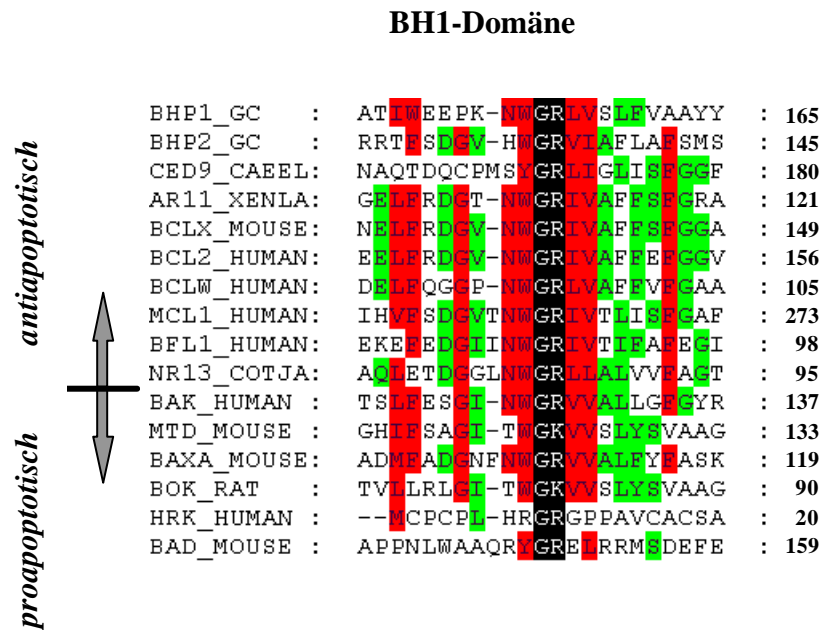


Abb. 4.3: Aminosäuresequenzvergleich der BH1-Domäne des BHP1_GC und des BHP2_GC aus *G. cydonium* mit der jeweils entsprechenden Domäne antiapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *C. elegans* (CED9_CAEEL), *X. laevis* (AR11_XENLA), *M. musculus* (BCLX_MOUSE), *H. sapiens* (BCL2_HUMAN; BCLW_HUMAN; MCL1_HUMAN; BFL1_HUMAN), *C. coturnix* (NR13_COTJA) und proapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *H. sapiens* (BAK_HUMAN; HRK_HUMAN), *M. musculus* (MTD_MOUSE; BAXA_MOUSE; BAD_MOUSE) und *R. rattus* (BOK_RAT). Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (Schwarz = 100 %, Rot ≈ 60 %, Grün ≈ 30 % konservierte Aminosäuren).

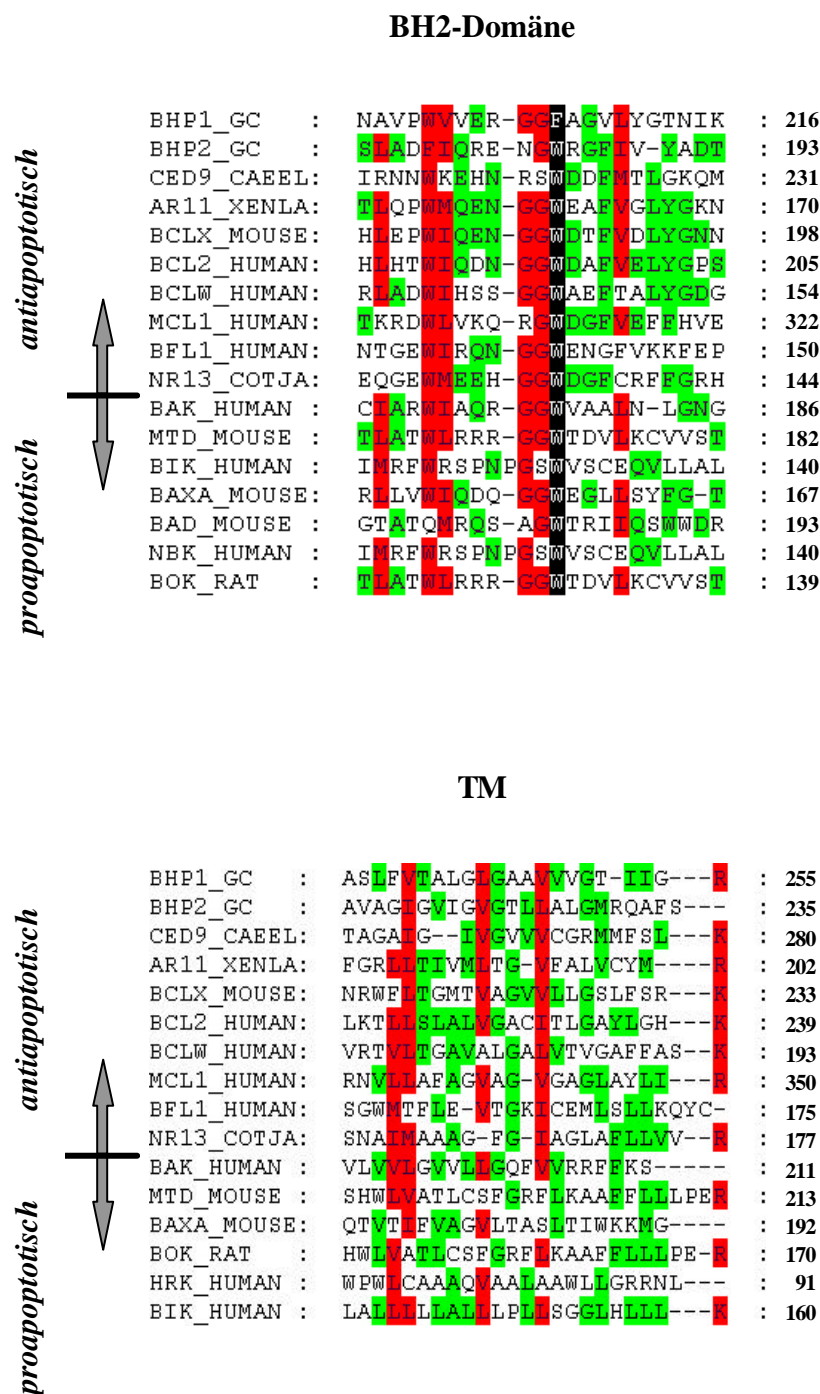


Abb. 4.4: Aminosäuresequenzvergleich der BH2-Domäne und des transmembranen Bereichs des BHP1_GC und des BHP2_GC aus *G. cydonium* mit den entsprechenden Regionen antiapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *C. elegans* (CED9_CAEEL), *X. laevis* (AR11_XENLA), *M. musculus* (BCLX_MOUSE), *H. sapiens* (BCL2_HUMAN; BCLW_HUMAN; MCL1_HUMAN; BFL1_HUMAN), *C. coturnix* (NR13_COTJA) und proapoptotischer Bcl-2 Proteine aus *H. sapiens* (BAK_HUMAN; BIK_HUMAN; HRK_HUMAN; NBK_HUMAN), *M. musculus* (MTD_MOUSE; BAXA_MOUSE; BAD_MOUSE) und *R. rattus* (BOK_RAT). Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (Schwarz = 100 %, Rot 360 %, Grün 330 % konservierte Aminosäuren).

In o. a. Ansätzen erwiesen sich die BH-Domänen der Bcl-2 Homologen des Schwammes (und anderer Spezies) als bedeutend konservierter als im Vergleich der kompletten Sequenzen. Gleichmaßen enthüllte die Analyse der transmembranen Bereiche eine Konservierung, die sich jedoch weniger auf das Vorkommen bestimmter Aminosäuren an spezifischen Positionen bezieht. Vielmehr sind diese Membrananker durch einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren gekennzeichnet und werden zusätzlich an ihrem 3'-Ende häufig von einer geladenen Aminosäure flankiert. In folgenden Analysen wurden die Vergleiche der gesamten BHP1- und BHP2-Sequenz (bzw. jene ihrer Domänen und Membrananker) mit den funktional untergliederten Bcl-2 Proteinen (bzw. mit deren Domänen und Membranankern) statistisch ausgewertet (s. Tab. 4.1). Sowohl im Vergleich der einzelnen BH-Domänen als auch bei der Analyse der kompletten Sequenzen zeigten beide Schwammproteine eine geringfügig höhere Homologie zu der antiapoptotischen Subfamilie. Dieses Ergebnis lieferte zwar einen ersten Hinweis hinsichtlich der antiapoptotischen Funktion beider Proteine, reichte jedoch für eine gesicherte funktionale Klassifizierung nicht aus. Eine Sequenzanalyse bisher bekannter Bcl-2 Proteine unterschiedlicher Spezies, unabhängig von den Schwammproteinen, bestätigte diese Erkenntnis: Im allgemeinen sind weder die Mitglieder der pro- noch der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilien untereinander durch einen wesentlich höheren Gehalt identischer/ähnlicher Aminosäuren gekennzeichnet als im Vergleich zu den jeweiligen funktionalen Antagonisten (s. auch ADAMS und COREY, 1998).

	antiapoptotische Bcl-2 Proteine		proapoptotische Bcl-2 Proteine	
	identische As (%)	ähnliche As (%)	identische As (%)	ähnliche As (%)
Gesamt:				
BHP1	10	25	7	17
BHP2	12	24	9	21
BH1:				
BHP1	29	53	27	45
BHP2	36	62	24	48
BH2:				
BHP1	17	34	17	31
BHP2	25	44	19	37
TM:				
BHP1	12	35	13	31
BHP2	11	26	11	29

Tab. 4.1: Durchschnittlicher Anteil identischer bzw. ähnlicher (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren der gesamten Sequenz, der BH-Domänen und des transmembranen Ankers (TM) des BHP1 und des BHP2 aus G. cydonium. Für den Vergleich wurden die in Abb. 4.3 und 4.4 aufgeführten, funktional untergliederten Bcl-2 Proteine herangezogen.

4.2 Klonierung und Charakterisierung des molekularen Markers Septin (*GCSEPI*) aus *G. cydonium*

Septine bilden eine Familie konservierter Proteine, die bereits in einer Vielfalt eukaryotischer Organismen (Vertebraten und Invertebraten) identifiziert werden konnten (XIONG *et al.*, 1999). Ihre Beteiligung an Zellteilung und Cytokinese hat der Familie zu ihrem Namen verholfen (LONGTINE *et al.*, 1996; FIELD und KELLOGG, 1999). Die Klonierung des Septin-Homologs aus *G. cydonium* im Rahmen dieser Arbeit lieferte ein wichtiges Werkzeug zur Kontrolle der Proliferation und der Vitalität von Schwammzellen. Hierbei wurde insbesondere die Expression der Septin-mRNA unter Streßbedingungen der selektiven Expression bestimmter Streßmarker gegenübergestellt (s. 4.3).

4.2.1 Klonierung des *GCSEPI*

Bisher bekannte Homologe des Septins weisen in N-terminaler Nähe ein ATP/GTP-Bindestellenmotiv auf, welches als *P-Loop* bezeichnet wird (SARASTE *et al.*, 1990). Der Aminosäuresequenzvergleich der Septine unterschiedlicher Spezies bestätigte den konservierten Charakter dieses Motivs und rechtfertigte die Platzierung eines degenerierten Rückwärts-Primers in dieser Region (s. 3.2.14; Septin_{deg} R1, Nt₈₂ - Nt₁₁₀ der vollständigen Sequenz). In Verbindung mit dem vektorspezifischen Vorwärts-Primer T3 konnte ein Fragment mit der Größe von ca. 280 bp aus der *Geodia cydonium* cDNA-Bibliothek durch PCR amplifiziert werden (s. 3.2.15.1). Dieses Fragment wurde, nach seiner Klonierung in den Vektor pGEM-T, sequenziert (s. 3.2.10.2, 3.2.11 und 3.2.16). Die ermittelte Sequenz wurde über Similaritätssuchprogramme mit den in verschiedenen Datenbanken (s. 3.1.10) gespeicherten Gensequenzen verglichen. Hierbei wurde das Fragment als Teil eines humanen und eines *D. melanogaster* Septin-Homologen identifiziert. Unter Verwendung eines fragmentspezifischen Vorwärts-Primers (Septin F1, Nt₃ - Nt₁₆), in Verbindung mit dem bankspezifischen Rückwärts-Primer CMVR, wurde schließlich durch PCR die restliche cDNA des *G. cydonium* Septins bis zu ihrem Poly(A)-Schwanz aus der cDNA-Bank isoliert und sequenziert (s. 3.2.15 und 3.2.16). Der Primer Septin F1 wurde weiterhin in Verbindung mit dem Rückwärts-Primer Septin R2 (Nt₇₇₆ - Nt₇₉₆) zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde mittels PCR eingesetzt (s. 3.2.15.4). Mit Hilfe dieser Sonde (799 bp) wurde die *G. cydonium* cDNA-Bank nach kompletten Klonen des Septins gescreent, um die bisherige Sequenz von *G. cydonium*, im weiteren Verlauf als *GCSEPI* bezeichnet, zu verifizieren (s. 3.2.9). Die durch das Homologiescreening gewonnenen unabhängigen Klone erwiesen sich dabei als in ihrer Sequenz identisch mit jenen der durch *primer-walking* erhaltenen. Mittels Northern Blot Analysen wurde die Vollständigkeit der isolierten *GCSEPI*-cDNA überprüft (s. 4.3).

GCSEPI:

CTCGCGCCGTGTA	CTAGGTGTGTCTCCTTTGGTTGTGGAGGAGAGCGGAGCTTGT	TTGCACACCTTGTGA	13
	M S D Q L G F H N L P F L A H R K S V K R		21
CTGAGCAGCAAGATG	AGCGACCAGCTAGGATTCACAACCTCCCCTTTCTGGCCACAGAAAGTCTGTGAAGCGC		63
G F E F T L M V V G E S G L G K S T L I Q S L F L			46
GGATTTCGAGTTCACGCTCATGGTTGTGGCGAGTCAAGTCTCGAAAGTCCACGCTCATCCAGTCCCTTTTCCTG			138
T N F F G N K T S P P A G E R I A Q T V S I D A T			71
ACCAACTTCTTTGGCAACAAAACGTCGCCTCCAGCCGGCGAGCGGATAGCTCAGACTGTGAGTATTGATGCTACC			213
T V D I E E K G V K L R L T V V D T P G F G D A V			96
ACTGTGGACATAGAGGAGAAAGGAGTCAAGCTGAGACTGACTGTAGTGGACACACCCGGTTTTGGAGACGCTGTC			288
N N E L C W Q P V I D Y C N E K Y D Q Y L R D E S			121
AACAACGAACTGTGCTGGCAGCCAGTGATAGACTACTGCAATGAAAAGTACGACCAGTACCTGAGAGACGAGTCA			363
G L N R R N I E D H R V H C C L Y F I N P L G H G			146
GGCCTCAACCGAAGAAACATTGAAGATCATCGCTCCACTGTTGCCTCTACTTCATCAACCCTCTGGGTCACGGA			438
L K P L D I E F M K Q L H N L V N I I P V I A K A			171
CTGAAGCCGCTGGACATAGAGTTCATGAAGCAGCTCCATAACCTGGTCAACATCATTCCTGTTCATAGCCAAGCGC			513
D T L T P K E I K A L K I K I M N E I Q E N G I K			196
GACACCCTCACACCAAGGAAATCAAGGCCCTGAAGATAAAGATAATGAACGAGATCCAGGAGAATGGGATCAAG			588
I Y T G E T D D D E D D N P D I K E L K E I I P F			221
ATCTACTGAGAGACAGACGATGATGAAGATGACAACCTGACATCAAGGAGCTCAAGGAGATAATACCGTTT			663
A V V G S N T L L E V N G K R V R G R L Y P W G V			246
GCGGTGGTGGGGAGTAATACACTGCTGGAGGTGAACGGGAAGAGAGTGAAGGGAGACTCTACCCCTGGGGAGTG			738
V E V E N K D H C D F V K L R T M L I R T H M Q D			271
GTGGAAGTTGAGAATAAGGATCACTGTGACTTTGTCAAGTTGCGGACGATGCTTATCAGGACCCACATGCAAGAC			813
L K D Y T Q D V H Y E N F R K K K L M Q G S P G R			296
CTGAAAGACTACACTCAAGACGTCCTACTACGAGAAGTTCAGGAAAAAGAACTCATGCAGGGCTCTCTGGGCGC			888
K V S E Y T D Y N V G G T P D E A A K A A A L Q A			321
AAGGTCTCAGAGTACACAGACTACAATGTTGGTGGGACACCTGATGAAGCGGCAAAGGCAGCTGCTCTCCAGGCC			963
K E K E L E E M R R Q M A L L Q A Q L R G A Q Q S			346
AAAGAGAAAGAGCTGGAAGAGATGCGACGACAAATGGCTCTACTACAGGCTCAACTCCGCGGGCACAGCAGAGT			1038
D A V *			349
GACGCAGTCTGATGTTTCAAAATTTCCCTGGAACCTCACTACTATATATATATTTCTATTAGTACATTACCTATTG			1113
ACGTAGCCTCGACACAGCACTTGCCTTGCTCTGTGAATGATCATTGCATTGCGTGACTGTTTACAACACAAGTTAT			1188
TTCACAGAATTCTAGGATATTATTGATATTGATTTTCACTACATGCATGTAGCAGTCACTCAACTTTTATAGAT			1263
GTA(A) _n			1266

Abb. 4.5: Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des GCSEPI. 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche sind blau bzw. grün eingefärbt, der kodierende Bereich ist in schwarzen Lettern dargestellt. Die Nummerierung der Nukleotide des kodierenden Bereichs und der 3'-untranslatierten Regionen beginnt mit +1 am Start-Codon, jene der Nukleotide der 5'-untranslatierten Region beginnt direkt hinter dem Start-Codon mit -1. Start- und Stopp-Codon sind fett und letzteres durch einen zusätzlichen Stern (*) markiert.

4.2.2 Analysen der Basensequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des GCSEPI

Die komplette cDNA des GCSEPI hat eine Länge von 1349 bp (exklusive des Poly(A)-Schwanzes) und beinhaltet einen potentiellen offenen Leserahmen von 1047 bp, der für ein mutmaßliches Protein von 349 As kodiert. Vor diesem Abschnitt liegt ein 5'-nichtkodierender Bereich von 83 bp; hinter dem ersten Stopp-Codon bei Nt₁₀₄₈ - Nt₁₀₅₀ befindet sich ein 3'-nichtkodierender Bereich mit zusätzlich 216 bp, gefolgt von dem Poly(A)-Schwanz. Wie bereits in **4.1.2**

und **4.1.3** dargestellt, entspricht auch hier die Sequenz, welche das Start-ATG umgibt, nicht vollständig der von KOZAK (1991) ermittelten Konsensussequenz. Zwar folgt *GCSEPI* in Position -4 (C) und in der wichtigen Position -3 (A) der Konsensussequenz - Untersuchungen der Translationsstartpunkte primitiver Eukaryoten haben vielfach eine Konservierung des A an Position -3 belegt (YAMAUCHI, 1991) - jedoch fehlt der Schwammsequenz an Position +4 die gleichermaßen wichtige Purinbase G. Anstelle dieser befindet sich hier die Purinbase A. Analog dem *GCBHP1* und *GCBHP2* läßt die *GCSEPI*-Sequenz das typische Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.*, 1986) vermissen. Stellvertretend übernimmt evtl. eine Variation der Sequenz, z. B. ATTA (Nt₁₂₀₇ - Nt₁₂₁₀), die Signalfunktion. Zudem zeichnet sich der 3'-nichtkodierende Bereich wiederum durch einen hohen Gehalt an A und T (28,6 % bzw. 37,6 %) innerhalb der letzten 210 bp vor dem Poly(A)-Schwanz aus.

SEP1_GC, das mutmaßliche Translationsprodukt des *GCSEPI*, umfaßt 349 As mit einem Molekulargewicht von 39,6 kDa. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei 5,86. Der errechnete Instabilitätsindex von 37,32 deutet auf ein stabiles Protein hin (PC/GENE, 1995). Die Sequenz des SEP1_GC besitzt vielfältige Möglichkeiten für posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung und Myristoylierung), die im Zusammenhang mit der Identifizierung des *GCSEPI* jedoch eine weniger wichtige Rolle spielen. Wesentlicher ist dagegen das Vorkommen und die Lokalisation einer als *P-Loop* bezeichneten ATP/GTP-Bindestelle (As₃₁ - As₃₈, Konsensussequenz: [AG]-x(4)-G-K-[ST]; SARASTE *et al.*, 1990) sowie einer *coiled-coil* Region (As₃₁₁ - As₃₄₉, Algorithmus nach LUPAS *et al.* [1991]). Beide Strukturen sind charakteristisch für Septine (NEUFELD und RUBIN, 1994), wenn auch nicht einzigartig. Ihre Existenz und Positionierung innerhalb des SEP1_GC, in Zusammenhang mit der deutlichen Sequenzhomologie zu anderen Septinen (durchschnittlich 57 % identische bzw. 72 % ähnliche Aminosäuren), lieferte jedoch einen untrüglichen Hinweis auf die Zugehörigkeit des *GCSEPI* zu dieser Familie.

4.3 Analyse der *GCBHP2*-Transkription nach Einwirkung verschiedener Stressoren auf *G. cydonium*

Als filtrierende Organismen sind Schwämme einer Vielfalt an cytotoxischen Substanzen ausgesetzt, zu welchen u. a. auch Tributyltin (TBT), ein organisches Derivat des Zinns, gehört. Diese Toxine und weitere extreme Einflüsse aus der Umwelt (z. B. Temperaturänderungen) lösen bei Schwämmen und vielen anderen Organismen Streßreaktionen aus und induzieren Apoptose (BATEL *et al.*, 1993; STRIDH *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß von TBT und Hitzeschock, eines chemischen und eines physikalischen Stressors, auf die Expression der *GCBHP2*-mRNA untersucht. Zur Überprüfung der Streßantwort wurde parallel die Transkription eines etablierten Streßmarkers, des *GCHSP-70* aus *G. cydonium* (KOZIOL *et al.*, 1997) sowie eines Markers der Zellproliferation und -vitalität (FIELD und KELLOGG, 1999), des Septin-Homologs *GCSEPI* aus *G. cydonium* (s. **4.2**), verfolgt.

Für die o. a. Untersuchungen wurde Schwammgewebe bis zu 8 h TBT (1 μ M) bzw. bis zu 5 h einer Temperatur von 26°C ausgesetzt (s. 3.2.1.2). Die anschließend aus den Proben isolierte RNA (s. 3.2.5.2) wurde in jeweils gleicher Konzentration (5 μ g) auf Agarosegelen aufgetrennt (s. 3.2.6 und 3.2.7.2) und auf Membranen geblottet (s. 3.2.12). Mit markierten Sonden (s. Tab. 4.2) hybridisierte mRNA konnte daraufhin, nach Verwendung eines enzymgekoppelten Anti-DIG-Antikörpers und Substratzugabe, durch Chemilumineszenz detektiert werden (s. 3.2.13). Die auf Röntgenfilmen sichtbar gemachten Banden wiesen die für jedes Transkript spezifischen Größen auf: *GCBHP2* (ca. 1,2 kb), *GCHSP-70* (ca. 2,1 kb) und *GCSEPI* (ca. 1,4 kb). Anschließend erfolgte die quantitative Erfassung der Bandenstärken mittels densitometrischer Analysen. Zur Überprüfung sowohl der aufgetragenen Konzentrationen als auch der Unversehrtheit der RNA wurde ribosomale RNA im Anschluß an ihre gelelektrophoretische Auftrennung mit Toluidinblau gefärbt (s. 3.2.7.4). Neben der 28 S- und 18 S-rRNA des Schwammes wurde auch 23 S- und 16 S-rRNA identifiziert. Bei diesen handelte es sich um kontaminierende RNA prokaryotischer Kommensalen und Symbionten der Schwämme (WILKINSON *et al.*, 1980; ALTHOFF *et al.*, 1998).

Sonde	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Größe (bp)
<i>GCBHP2</i>	BHP2 F1 (Nt ₈₃ - Nt ₁₀₁)	BHP2 R1 (Nt ₆₄₈ - Nt ₆₆₈)	586
<i>GCHSP-70</i>	HSP F1 (Nt ₃₀₃ - Nt ₃₂₃)	HSP R1 (Nt ₁₀₄₄ - Nt ₁₀₆₄)	762
<i>GCSEPI</i>	Septin F1 (Nt ₃ - Nt ₁₆)	Septin R2 (Nt ₇₇₆ - Nt ₇₉₆)	799

Tab. 4.2: Verwendete Primerkombinationen zur Sondenherstellung und Größe der durch PCR gewonnenen DIG-markierten Fragmente.

Nachdem zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 0) keine *GCBHP2*- und *GCHSP70*-Expression detektiert wurde, war innerhalb von 6 h, als Antwort auf den Streßfaktor TBT, eine relativ gleichmäßige Steigerung der *GCBHP2*-Transkription auf ca. 40 % zu verzeichnen. Erst im Verlauf der nächsten 2 h erfolgte ein sprunghafter Anstieg auf 100 %. *GCHSP-70* zeigte im Gegensatz dazu bereits nach 1 h eine Erhöhung der Transkriptionsrate von 0 % auf ca. 30 %, die nach 4 - 6 h ca. 80 % und letztendlich nach 8 h 100 % erreichte.

Unter Hitzeeinwirkung schnellte dagegen die Transkriptionsrate des *GCBHP2* innerhalb einer Stunde von 0 % auf 70 % und erreichte schließlich binnen der nächsten 4 h 100 %. Im gleichen Zug stieg die Transkriptionsrate des *GCHSP-70* während der ersten Stunde an, jedoch von 0 % auf "nur" 30 % und kletterte schließlich gegen Ende der Inkubationszeit auf 100 %.

Im Kontrast zu diesen deutlichen Streßreaktionen veränderte sich der *steady-state level* der Transkription des Referenzgens *GCSEPI* unter dem Einfluß beider Stressoren innerhalb der Versuchsdauer kaum (durchschnittlich nur 6%). Dies zeugte von einer - trotz Streßeinwirkung - intakten Zellproliferation und ungehemmten Expression des Haushaltsgens.

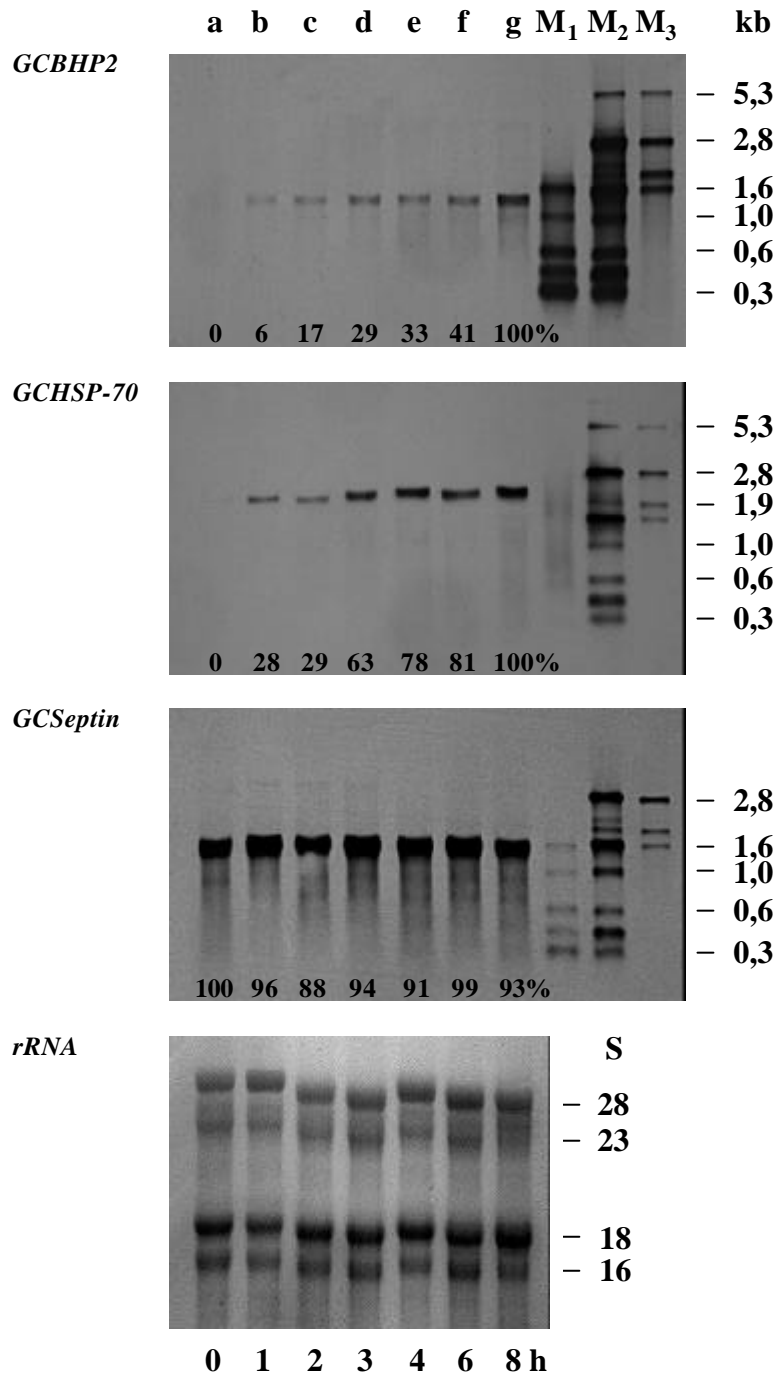


Abb. 4.6: Nachweis und quantitative Erfassung der Transkripte des GCBHP2, GCHSP-70 und GCSeptin nach Einwirkung von TBT auf *G. cydonium*. Im Zuge des Northern Blottings wurden die Transkripte durch spezifische, markierte Sonden detektiert und auf Röntgenfilm visualisiert. Die Intensitäten wurden jeweils mit dem stärksten Signal korreliert, welches den höchsten Level der Expression reflektierte und gleich 100 % gesetzt wurde. Eine parallele Anfärbung ribosomaler RNA garantierte den Einsatz intakter RNA und gleicher Konzentrationen. Die rRNA-Sedimentationskoeffizienten sowie die Bandengrößen der eingesetzten RNA-Marker (Bahn M₁ - M₃) sind rechts außen angegeben. Bahn a: RNA aus *G. cydonium*-Kontrolle. Bahn b - g: RNA aus *G. cydonium* nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 8 h TBT-Inkubation.

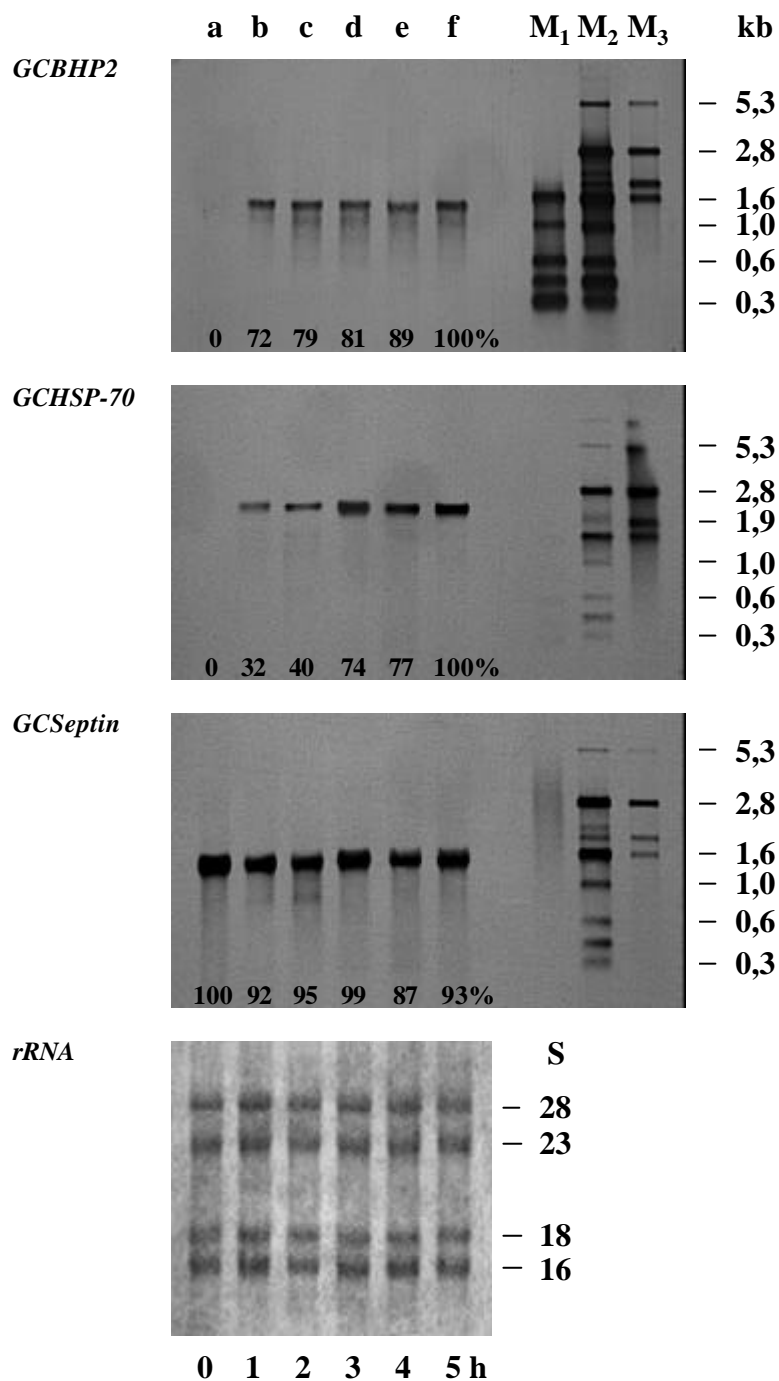


Abb. 4.7: Nachweis und quantitative Erfassung der Transkripte des GCBHP2, GCHSP-70 und GCSeptin nach Einwirkung von Hitze auf *G. cydonium*. Im Zuge des Northern Blottings wurden die Transkripte durch spezifische, markierte Sonden detektiert und auf Röntgenfilm visualisiert. Die Intensitäten wurden jeweils mit dem stärksten Signal korreliert, welches den höchsten Level der Expression reflektierte und gleich 100 % gesetzt wurde. Eine parallele rRNA-Färbung ermöglichte die Überprüfung der RNA-Integrität sowie der eingesetzten Konzentrationen. Die rRNA-Sedimentationskoeffizienten sowie die Bandengrößen der verwendeten Marker-RNA (Bahn M₁ - M₃) sind rechts außen angegeben. Bahn a: RNA aus *G. cydonium*-Kontrolle. Bahn b - f: RNA aus *G. cydonium* nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h Hitzeschock.

Nach einer Verlängerung der TBT- bzw. Hitzeinkubationsdauer (> 12 h bzw. >8 h) oder einer Erhöhung der TBT-Konzentration (> 10 μ M) bzw. der Hitzeschocktemperatur (> 30°C) konnten keine Transkripte mehr detektiert werden.

4.4 Analyse der *GCBHP2*-Translation nach Einwirkung verschiedener Stressoren auf *G. cydonium*

Der Nachweis eines spezifischen Proteins aus Schwammextrakten mittels immunologischer Methoden hatte die Entwicklung eines Antikörpers zur Voraussetzung. Die Grundlage für die Herstellung eines solchen Antikörpers stellte die Expression eines rekombinanten Proteins dar, welches als immunisierendes Antigen eingesetzt werden konnte.

4.4.1 Expression eines rekombinanten BHP2-Fusionsproteins und Herstellung eines polyclonalen BHP2-Antikörpers

Unter Verwendung der beiden Primer BHP2_{proEX} F1 (Nt₈₃ - Nt₁₀₃) und BHP2_{proEX} R1 (Nt₆₃₉ - Nt₆₅₉), welche durch Überhänge die zur Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pQE32 benötigten Restriktionsschnittstellen besaßen, wurde ein *GCBHP2*-Fragment aus der cDNA-Bibliothek amplifiziert (s. 3.2.15). Dieses beinhaltete den zentralen Bereich der *GCBHP2*-cDNA (Nt₈₃ - Nt₆₅₉) und umfaßte somit auch die konservierten Domänen BH1 und BH2 (s. 4.1.4). Der transmembrane Bereich des BHP2 wurde dagegen nicht einbezogen, da solche stark hydrophoben Abschnitte einerseits häufig mit Membrankomponenten der Bakterienzelle interagieren und toxische Effekte hervorrufen (QIAGEN, 1998). Andererseits beeinflussen die Membrananker die Löslichkeit rekombinanter Bcl-2 Proteine (SCHENDEL *et al.*, 1997). Nach erfolgter Ligation über die Schnittstellen *Bam*HI/*Sal*I in den Expressionsvektor und Transformation kompetenter *E. coli* XLI-Blue Zellen mit dem resultierenden Konstrukt wurde die Expression des Fusionsproteins durch IPTG-Zugabe induziert. Im Anschluß an eine Lyse der Bakterien in guanidinhaltigem Puffer konnte dieses Fusionsprotein mit Hilfe seines, vom Vektor kodierten, N-terminalen Oligohistidinschwanzes (*His-Tag*) über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus den Bakterien präpariert werden (s. 3.2.17). Der Nachweis des Proteins erfolgte über SDS-Page (Trenngel: 15 % Polyacrylamid, Sammelgel: 6 % Polyacrylamid; s. 3.2.20 und Abb. 4.8A) als Bande auf der Höhe seines errechneten Molekulargewichts von 23,5 kDa (PC/GENE, 1995). Eine zusätzliche Bestätigung der Authentizität der Bande ermöglichte ein gegen den N-terminalen *His-Tag* gerichteter Antikörper. Dazu wurde die Proteinbande auf eine PVDF-Membran im *Semi-Dry Blotting* Verfahren transferiert. Die durch eine folgende Inkubation der Membran mit dem Anti-*His*-Antikörper (1:10000 verdünnt) erzeugten Antigen-Antikörper-Komplexe ließen sich daraufhin mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers und durch Zugabe eines entsprechenden

Chemilumineszenz-Substrats detektieren (s. 3.2.21 und 3.2.13). Auch auf diese Weise wurde das rekombinante Protein wieder als Bande auf der Höhe seines errechneten Molekulargewichts nachgewiesen (s. Abb. 4.8B).

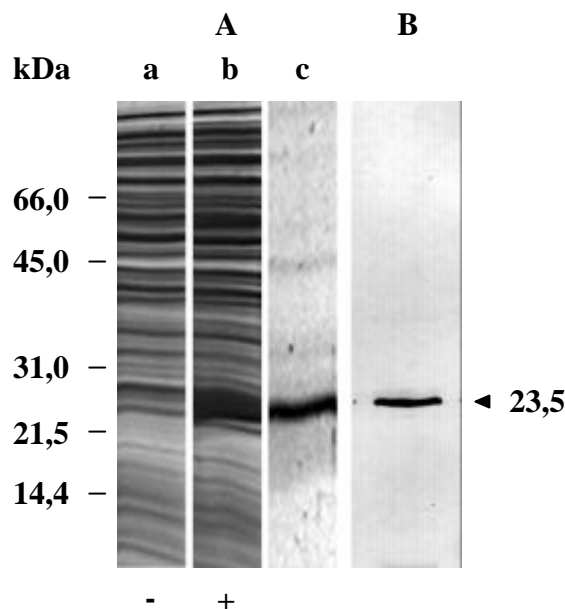


Abb. 4.8: Nachweis des oligohistidinmarkierten BHP2-Fusionsproteins. A: bakterielles Lysat vor der Induktion mit IPTG (-, Bahn a), nach der Induktion mit IPTG (+, Bahn b) und durch Affinitätschromatographie aufgereinigtes Fusionsprotein (Bahn c) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant-Blue detektiert. B: gelelektrophoretisch aufgetrenntes und auf eine Membran geblottetes rekombinantes BHP2 wurde durch ein System aus Anti-His-Ak, POD-gekoppeltem Sekundärantikörper und Chemilumineszenz-Substrat detektiert. Die Größen der Broad Range Marker-Banden sind angegeben; der Pfeil deutet auf die das Fusionsprotein repräsentierende Bande.

Die anschließende Gewinnung des polyklonalen Antiserums wurde durch dreimalige Immunisierung eines Kaninchens mit je 10 µg rekombinanten BHP2 im Abstand von jeweils 4 Wochen in die Wege geleitet (s. 3.2.22.1). Ein ELISA-Verfahren mit antigenbeschichteten Multiwell-Platten ermöglichte die Überprüfung der Immunisierungseffizienz eine Woche nach jeder Injektion (s. 3.2.22.2). Dabei wurden die nach Zugabe des Antiserums gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Aktivität eines mit einem Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms detektiert und die Spezifität des BHP2-Antikörpers bestätigt.

4.4.2 Einfluß von TBT und Hitze auf die GCBHP2-Proteinexpression

Für die Untersuchungen der BHP2-Expression unter Streß wurde Schwammgewebe den gleichen, bereits unter 4.3. zur Analyse der GCBHP2-Transkription erläuterten Bedingungen ausgesetzt.

Allerdings wurden die Schwämme im Anschluß an die jeweilige Streßinduktion nicht sofort verarbeitet, sondern für 18 h in ein Regenerationsbecken überführt. Dieser Schritt sollte den Schwämmen genügend Zeit für eine veränderte Proteinexpression gewähren. Die anschließend hergestellten Proteinextrakte wurden in gleicher Konzentration in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Trenngel: 15 % Polyacrylamid, Sammelgel: 6 % Polyacrylamid) und auf eine PVDF-Membran im *Semi-Dry Blotting* Verfahren transferiert (s. 3.2.20 und 3.2.21). Im Anschluß an eine Inkubation der Membran mit dem BHP2-Antiserum wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe eines POD-gekoppelten Sekundärantikörpers und durch Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrats dokumentiert (s. 3.2.13). Die dabei detektierten Banden auf der Höhe des errechneten BHP2-Molekulargewichts lieferten hierbei einen zusätzlichen Beweis der Spezifität des Antiserums.

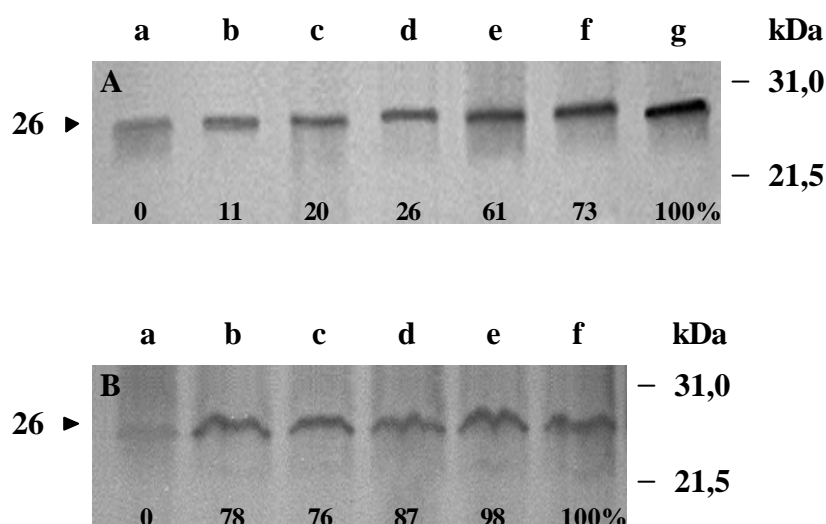


Abb. 4.9: GCBHP2-Proteinexpression von *G. cydonium* nach Streßeinwirkung. Proteinextrakte aus TBT- (A) und hitzegeschocktem (B) Schwammgewebe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde im Zuge des Western Blotting Verfahrens BHP2 (Pfeil) mit einem System aus polyklonalem BHP2-AK und POD-gekoppeltem Sekundärantikörper nach Substratzugabe mittels Chemilumineszenz detektiert. Die Größen der relevanten Broad Range Marker-Banden sind angegeben. Die Intensitäten wurden jeweils mit dem stärksten Signal korreliert, welches den höchsten Level der Expression reflektierte und gleich 100 % gesetzt wurde.

A: Bahn a: *G. cydonium*-Kontrolle, Bahn b - g: *G. cydonium* nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 8 h TBT-Inkubation.

B: Bahn a: *G. cydonium*-Kontrolle, Bahn b - f: *G. cydonium* nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h Hitzeschock.

Analog den Northern Blot Studien konnte auch auf Translationsebene eine durch Hitzeschock und TBT-Inkubation induzierte Expression des *GCBHP2* festgestellt werden. Die quantitative Analyse der Ergebnisse mittels densitometrischer Methoden offenbarte einen durch Hitze verursachten Sprung der *GCBHP2*-Translation innerhalb von nur einer Stunde auf 78 %. Dieser Wert erfuhr in den folgenden 4 h eine lediglich leichte Steigerung auf 100 %. Im Gegensatz dazu löste TBT eine

anfangs nur zögerliche BHP2-Expression aus, die 3 h nach Versuchsbeginn 30 % nicht überschritt, innerhalb der nächsten Stunde jedoch 61 % und nach 8 h 100 % erreichte.

4.5 *GCBHP2*-Proteinexpression in Säugetierzellen

Die Transfektion von Säugetierzellen mit einem *GCBHP2*-Expressionskonstrukt bildete im Rahmen dieser Arbeit die Grundlage anschließender Funktionsanalysen des BHP2. Im Hinblick auf derartige Analysen umging die Expression des Schwammproteins in einem heterologen System - den Säugetierzellen - dabei die häufig bei der Überexpression eines endogenen Proteins in einem homologen System auftretenden Schwierigkeiten. Zudem konnten Rückschlüsse bezüglich der Konservierung der apoptotischen Mechanismen getroffen werden, die eine Beteiligung des BHP2 involvieren. Zusätzlich garantierte der Einsatz einer stabil transfizierten Zelllinie standardisierte Bedingungen und Reproduzierbarkeit.

4.5.1 Herstellung eines Expressionskonstrukts und Transfektion von Säugetierzellen

Unter Verwendung der beiden genspezifischen Primer BHP2_{euEX} F1 (Nt₄₂ - Nt₂₃) und BHP2_{euEX} R1 (Nt₆₇₆ - Nt₆₉₆), welche durch Überhänge die zur Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 benötigten Restriktionsschnittstellen besaßen, wurde ein *GCBHP2*-Fragment aus der cDNA-Bibliothek amplifiziert (s. 3.2.15). Dieses erstreckte sich von Nt₄₂ - Nt₆₉₆ über den kompletten *open reading frame* (inkl. Start-Methionin) des *GCBHP2*. Der Rückwärts-Primer verfügte zudem zwischen der *GCBHP2*-spezifischen Sequenz und der C-terminalen Restriktionsschnittstelle über einen für sechs Histidinreste kodierenden Abschnitt (*His-Tag*), gefolgt von einem artifiziellen Stopp-Codon. Ersteres ermöglichte eine Identifizierung des exprimierten Proteins unter Verwendung kommerzieller Anti-His-Antikörper, während letzteres zum Abbruch der Translation nach der Oligohistidinsequenz führte und somit ein Anfügen zusätzlicher, unerwünschter Aminosäuren am C-Terminus vermied. Nach erfolgter Ligation über die Schnittstellen *Kpn I/Xba I* in den Expressionsvektor wurden humane und murine Zellen (*HEK-293*, *NIH/3T3*) mit dem resultierenden Konstrukt transfiziert bzw. mit dem leeren Vektor *mock*-transfiziert (s. 3.2.18). Da der Expressionsvektor transfizierten Zellen eine Neomycin-Resistenz vermittelte, konnten diese durch Zugabe des Neomycin-Analogons G418 selektiert werden. Nach etwa zwei Wochen überlebten nur stabil transfizierte Zellen. Dabei zeichneten sich insbesondere *GCBHP2*-transfizierte *HEK-293* Zellen, unabhängig vom Untergrundmaterial, durch ein geclustertes Wachstum und die Bildung fociartiger Strukturen aus. *Mock*-transfizierte Zellen, welche den Expressionsvektor ohne Insert enthielten, wiesen dagegen keine Veränderung im Wachstumsverhalten auf und breiteten sich homogen auf ihrer Unterlage aus.

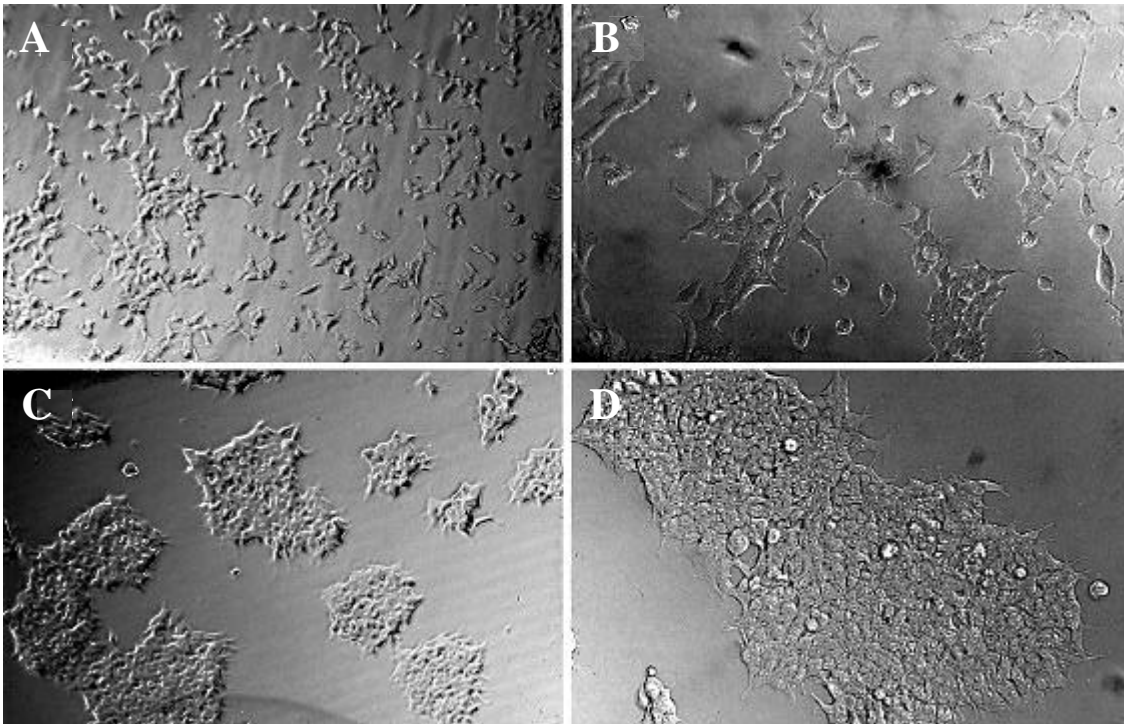


Abb. 4.10: Wachstumsmuster stabil transfizierter HEK-293 Zellen. Zellen wurden mit dem Expressionsvektor ohne Insert (mock-Transfektion; Bild A, B) bzw. mit dem GCBHP2-Expressionskonstrukt (Bild C, D) stabil transfiziert. Erstere zeigten dabei die für HEK-293 Zellen typische, gleichmäßige Verteilung auf der Unterlage, letztere wiesen ein lokal geballtes Wachstum auf. Vergrößerungen: A/C: 40fach, B/D: 100fach.

4.5.2 Überprüfung der Transkription des transfizierten Expressionskonstrukts

Zur Kontrolle der *GCBHP2*-Expression wurde aus *GCBHP2*-transfizierten und *mock*-transfizierten Zellen Gesamt-RNA isoliert (s. 3.2.5.1). Diese wurde in einem zweiten Schritt unter Zuhilfenahme einer Reversen Transkriptase und eines Oligo(dT)-Primers in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (s. 3.2.15.5) und stand anschließend für den Nachweis der Transkription des *GCBHP2*-Vektorinserts zur Verfügung. Dazu wurden in einer Standard-PCR (s. 3.2.15.1) die *GCBHP2*-spezifischen Primer BHP2 RTPCR F1 (Nt₁₀ - Nt₁₁) und BHP2 RTPCR R1 (Nt₅₆₀ - Nt₅₈₀) eingesetzt, um ein 590 bp-Fragment aus der cDNA *GCBHP2*-transfizierter Zellen zu amplifizieren, welches die Transkription des *GCBHP2* reflektierte. Dieses Fragment ließ sich dagegen in der cDNA *mock*-transfizierter Zellen nicht nachweisen. Als Kontrolle wurde in einer parallelen Reaktion die Transkription eines Haushaltgens, jenes der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*; Acc. No. NM002046), überprüft. Hierbei wiesen die beiden spezifischen Primer GAPDHF (Nt₄₄₅ - Nt₄₆₄) und GAPDHR (Nt₈₉₅ - Nt₉₁₅) das erwartete Fragment von 471 bp sowohl in der cDNA *GCBHP2*- als auch *mock*-transfizierter Zellen nach (s. Abb. 4.11).

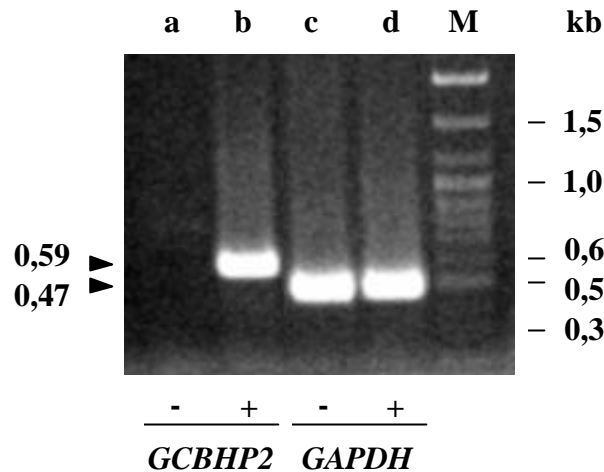


Abb. 4.11: Überprüfung der GCBHP2-Transkription in HEK-293 Zellen mittels Ethidiumbromidfärbung gelelektrophoretisch aufgetrennter RT-PCR-Produkte. Im Anschluß an eine RNA-Isolation aus mock-transfizierten (-, Bahn a und c) und GCBHP2-transfizierten (+, Bahn b und d) HEK-293 Zellen wurde durch RT-PCR, mit Hilfe zweier spezifischer Primer, nur in GCBHP2-transfizierten Zellen das 590 bp große Fragment des GCBHP2-Transkripts nachgewiesen (Bahn b). In einer Kontrollreaktion wurde sowohl aus GCBHP2- als auch aus mock-transfizierten Zellen ein 471 bp großes Fragment des GAPDH-Transkripts durch GAPDH-spezifische Primer amplifiziert (Bahn c und d). In Bahn M sind die Banden der DNA-Leiter GeneRuler dargestellt.

4.5.3 Kontrolle der GCBHP2-Proteinexpression

Im Anschluß an die Überprüfung der GCBHP2-Transkription in transfizierten Zellen mußte gleichfalls die Expression des Konstrukts auf Proteinebene kontrolliert werden. Dazu wurde sich zweier Methoden bedient, welche auf dem Prinzip der indirekten Immundetektion beruhten und sich des BHP2-Antikörpers bedienten.

4.5.3.1 Western Blot Analysen

Für Untersuchungen der GCBHP2-Proteinexpression wurden Proteinextrakte aus $2,5 \times 10^6$ GCBHP2-transfizierten bzw. mock-transfizierten HEK-293 Zellen in Laemmli-Puffer hergestellt (s. 3.2.20.1). Im Anschluß an eine Auftrennung der Extrakte durch SDS-PAGE (Trenngel: 15 % Polyacrylamid, Sammelgel: 6 % Polyacrylamid) wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran im *Semi-Dry Blotting* Verfahren geblottet (s. 3.2.20 und 3.2.21). Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen konnte der Nachweis der GCBHP2-Proteinexpression durch eine indirekte Immundetektion geführt werden. Hierfür wurden im Anschluß an eine Inkubation mit dem polyklonalen BHP2-Antikörper (1:10000 verdünnt) die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen POD-gekoppelten Sekundäntikörper und durch Zugabe eines entsprechenden

Chemilumineszenz-Substrats detektiert (s. **3.2.13**). Dabei wurde in den Extrakten *GCBHP2*-transfizierter Zellen eine Bande auf der erwarteten Höhe von 26 kDa nachgewiesen, welche das translatierte Produkt des *GCBHP2* widerspiegelte (errechnetes Molekulargewicht: 26,3 kDa; PC/GENE, 1995). In Extrakten *mock*-transfizierter Zellen konnte dagegen diese Proteinbande nicht detektiert werden.

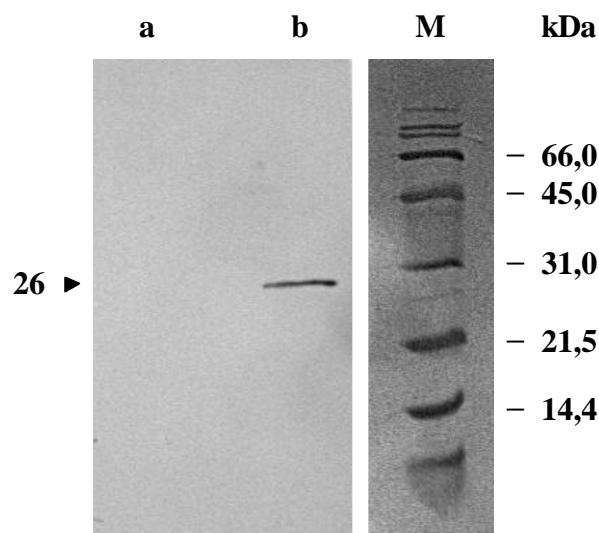


Abb. 4.12: Überprüfung der GCBHP2-Proteinexpression in HEK-293 Zellen durch Western Blot Analysen. Extrakte mock-transfizierter (Bahn a) und GCBHP2-transfizierter (Bahn b) HEK-293 Zellen gleichen Proteingehalts wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Membranen geblottet. Anschließend wurde das rekombinante BHP2 auf der Höhe seines errechneten Molekulargewichts durch ein System aus polyklonalem BHP2-Ak, POD-gekoppeltem Sekundärantikörper und Chemilumineszenz-Substrat in Extrakten GCBHP2-transfizierter Zellen detektiert (Pfeil). Rechts sind die Größen der wichtigsten Broad Range Marker-Banden angegeben.

4.5.3.2 Immuncytochemische Analysen

Auch für Untersuchungen der BHP2-Proteinexpression durch immuncytochemische Analysen wurde der polyklonale BHP2-Antikörper genutzt. Dazu wurden stabil transfizierte Zellen (*GCBHP2*- bzw. *mock*-transfiziert) nach Erreichen einer 50 %igen Konfluenz auf Deckgläsern fixiert und permeabilisiert (s. **3.2.19**). Im Anschluß an eine Inkubation mit dem BHP2-Antikörper (1:1000 verdünnt) - oder wahlweise mit einem Anti-His-Antikörper (1:400) - wurden gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe eines Sekundärantikörpers detektiert, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin (Cy3) gekoppelt war. Nach entsprechender Exzitation (553 nm) emittierte dieser Farbstoff Licht (575 nm), das die mikroskopische Identifizierung exprimierender Zellen erlaubte. *GCBHP2*-transfizierte Zellen zeigten hierbei im Gegensatz zu *mock*-transfizierten Zellen eine deutliche Färbung (s. Abb. **4.13**).

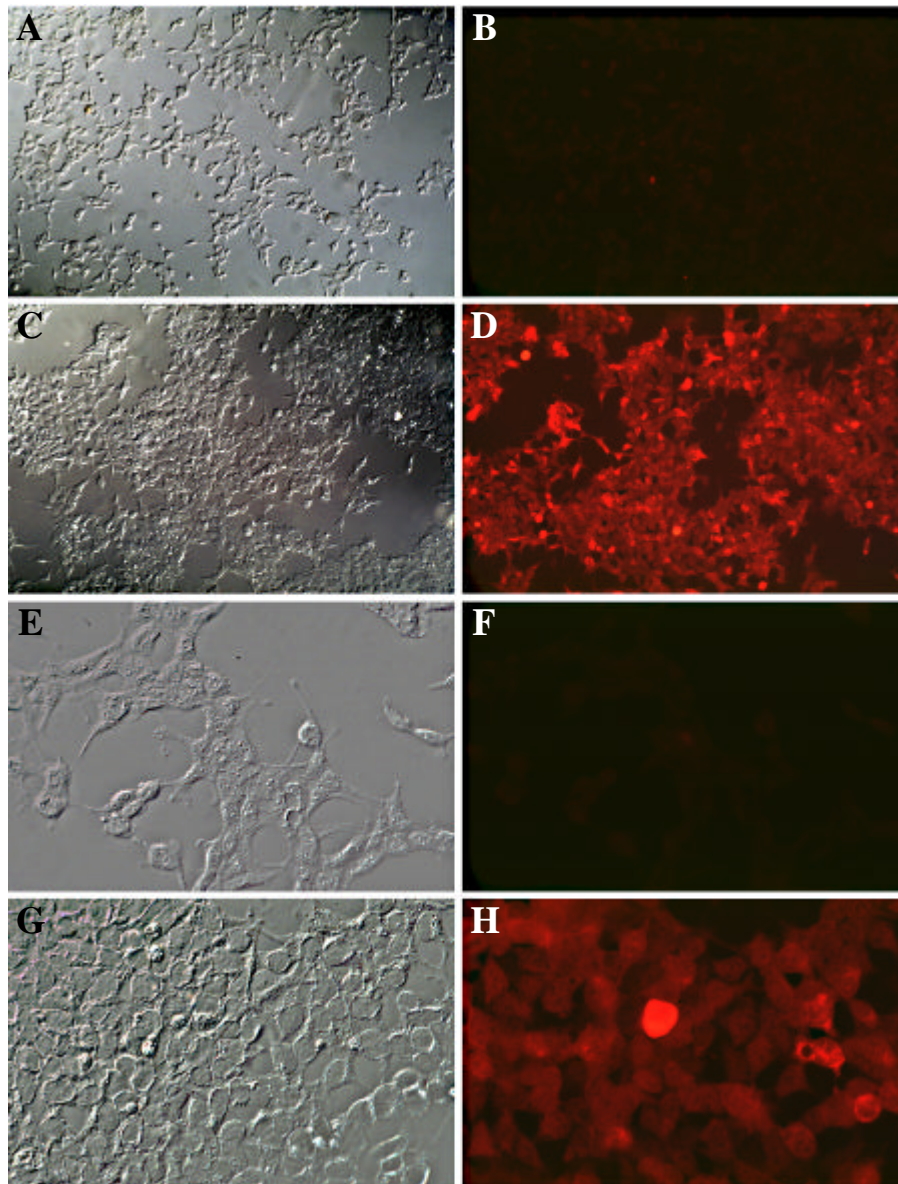


Abb. 4.13: Mikroskopische Analyse der GCBHP2-Proteinexpression in HEK-293 Zellen mittels Immunfluoreszenz. Stabil mock-transfizierte Zellen (Bild A, B, E, F) bzw. GCBHP2-transfizierte Zellen (Bild C, D, G, H) wurden auf Deckgläsern fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellen durch ein System aus polyklonalem BHP2-Antikörper und fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper bei entsprechender Lichtanregung. Bild A, C, E, G: Nomarsky-Lichtmikroskopie. Bild B, D, F, H: Fluoreszenzmikroskopie. Vergrößerungen: A - D: 40fach, E - H: 200fach.

4.6 Funktionsanalyse des BHP2 in transfizierten Zellen

Bcl-2 Proteine sind durch den Besitz wenigstens einer von vier konservierten Domänen gekennzeichnet. Mit der Ausnahme eines viralen Proteins verfügen alle Mitglieder der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie wenigstens über die Domänen BH1 und BH2, jene der proapoptotischen Subfamilien weisen dagegen zumindest die BH3-Domäne auf (ADAMS und CORY, 1998).

GCBHP2, das Bcl-2 Homolog aus *G. cydonium*, verfügt zwar über BH1 und BH2 und läßt BH3 vermissen (s. 4.1.3). Trotzdem läßt sich die Präsenz/Absenz einzelner Domänen nicht unbedingt mit der spezifischen Funktion (pro- oder antiapoptotisch) eines Bcl-2 Proteins korrelieren (s. 4.1.4). Unabhängig der strukturellen Analysen verschaffen daher erst Funktionsassays Aufklärung. Üblicherweise werden dafür Zellen eingesetzt, die das zu untersuchende Protein mittels Transfektion überexprimieren bzw. - wie im Fall des BHP2 - *de novo* produzieren. Hierfür wird im Anschluß an eine Apoptose-Induktion die Zahl überlebender Zellen in Relation zu jener *mock*-transfizierter Zellen gebracht. Eine erhöhte Vitalität unter Streßeinwirkung gilt bereits als erstes Zeichen einer antiapoptotischen Wirkung des zu analysierenden Proteins. Zur Spezifizierung seiner Wirkung wird sich in einem weiteren Assay der Caspasen bedient, welche als wichtigste Effektoren der Apoptose von Bcl-2 Proteinen reguliert werden (YUAN *et al.*, 1993; VAUX, 1997). Die Korrelation von erhöhter Zellvitalität und verminderter Caspase-Aktivierung unter apoptoseinduzierenden Bedingungen läßt auf den Einfluß eines antiapoptotischen Proteins schließen.

4.6.1 Überprüfung der *GCBHP2*-Proteinexpression im Verlauf der Apoptose-Induktion

Die Durchführung der o. a. Funktionsassays wurde erst im Anschluß an eine Kontrolle der *GCBHP2*-Expression - sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene - in transfizierten *HEK-293* Zellen ermöglicht (s. 4.5.2 und 4.5.3). Zudem mußte die *GCBHP2*-Proteinexpression unter den gewählten Streßmodalitäten die gesamte Versuchsdauer garantiert sein. Hierfür wurden *GCBHP2*-transfizierte *HEK-293* Zellen den gleichen apoptoseinduzierenden Bedingungen ausgesetzt, welche auch in späteren Funktionsanalysen angewandt werden sollten (s. 3.2.2.3). Nach einer Inkubation von bis zu 92 h unter dem Einfluß von 0,25 µM TBT bzw. unter Serumentzug wurden aus je 6×10^4 Zellen Proteinextrakte in Laemmli-Puffer hergestellt (s. 3.2.20.1). Die Extrakte wurden anschließend einer SDS-PAGE unterzogen (Trenngel: 15 % Polyacrylamid, Sammelgel: 6 % Polyacrylamid), woraufhin die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran im *Semi-Dry Blotting* Verfahren transferiert werden konnten (s. 3.2.20 und 3.2.21). Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die durch Inkubation mit dem BHP2-Antikörper (1:10000) gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe mittels eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Diese Komplexe ließen sich im Anschluß an die Zugabe eines entsprechenden Substrats als Banden auf einem Röntgenfilm visualisieren (s. 3.2.13). Hierdurch konnte schließlich der Nachweis einer gleichmäßigen *GCBHP2*-Proteinexpression während der gesamten Versuchsdauer (bis zu 92 h) sowohl unter dem Einfluß des einen als auch des anderen Apoptose-Induktors geführt werden (s. Abb. 4.14).

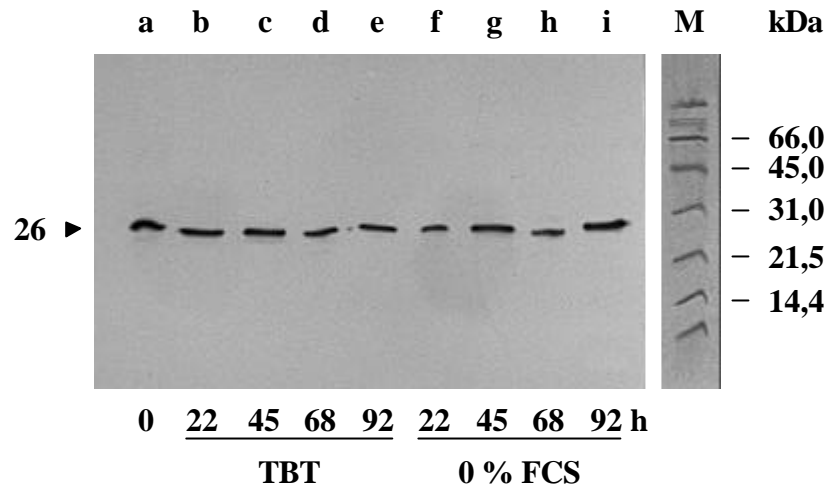


Abb. 4.14: Überprüfung der GCBHP2-Proteinexpression transfizierter HEK-293 Zellen unter dem Einfluß apoptoseinduzierender Bedingungen. Extrakte gleichen Proteingehalts aus Zellen, die bis zu 92 h TBT-haltigem bzw. serumfreiem Medium (0 % FCS) ausgesetzt worden waren, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des rekombinanten BHP2 erfolgte durch indirekte Immundetektion auf Western Blots als Bande bei ca. 26 kDa in allen Extrakten (Pfeil). Die gleichmäßige Bandenstärke verdeutlichte die konstante GCBHP2-Expression während der gesamten Versuchsdauer sowohl unter dem Einfluß von TBT (Bahn b - e) als auch unter Serumentzug (Bahn f - i). Bahn a enthält den Proteinextrakt nichtinduzierter Zellen. Die Größen der wichtigsten Broad Range Marker-Banden (Bahn M) sind angegeben.

4.6.2 Vitalitätstest: Einfluß selektiver Stressoren auf die Vitalität GCBHP2-transfizierter Zellen

In einer ersten Testreihe sollten potentielle Effekte der GCBHP2-Expression auf transfizierte Zellen untersucht werden. Hierfür wurde die Zellvitalität GCBHP2-transfizierter und *mock*-transfizierter HEK-293 Zellen unter dem Einfluß spezifischer Stressoren untersucht und verglichen. Für diese Funktionsanalysen des GCBHP2 wurden $1,5 \times 10^4$ stabil GCBHP2-transfizierte bzw. *mock*-transfizierte HEK-293 Zellen (s. 3.2.18) in die Vertiefungen einer 24-well Platte ausgesät. Nach 24 - 48 h wurden die Zellen zwecks Apoptose-Induktion serumfreiem Medium bzw. 0,25 μ M TBT ausgesetzt und verblieben bis zu 92 h unter dem Einfluß beider Stressoren (s. 3.2.2.3). In parallelen Ansätzen blieben jeweilige Kontrollzellen unbehandelt. Die Probenentnahme erfolgte in definierten Zeitabständen, woraufhin die Zahl lebender Zellen quantifiziert und auf jene der Kontrollen bezogen wurde (s. 3.2.2.4). Das eingesetzte Trypanblau gestattete hierbei die mikroskopische Unterscheidung unbeschädigter, vitaler Zellen (farblos) von toten/sterbenden Zellen mit geschädigter Zellmembran/apoptotischer Morphologie (blau) sowie deren quantitative Erfassung mittels einer Zählkammer.

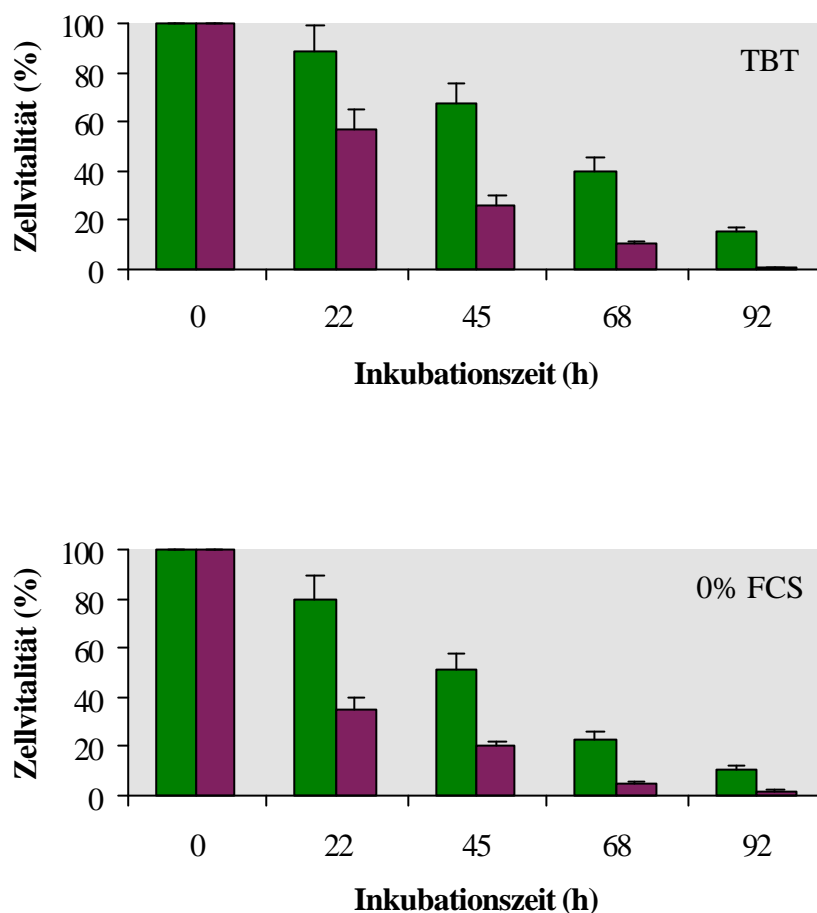


Abb. 4.15: Vitalität stabil GCBHP2-transfizierter und mock-transfizierter HEK-293 Zellen unter dem Einfluß apoptoseauslösender Bedingungen. Die Zellen wurden bis zu 92 h in TBT-haltigem Medium ($0,25 \mu\text{M}$ TBT) bzw. unter Serumentzug inkubiert. Nach den jeweils angegebenen Zeiträumen wurde die Zahl vitaler Zellen mit Hilfe von Trypanblau mikroskopisch festgestellt. Die Zahl überlebender GCBHP2- bzw. mock-transfizierter Zellen wurde anschließend auf jene der Kontrollen (ebenfalls GCBHP2- bzw. mock-transfiziert) prozentual bezogen. Grüne Säulen geben die Vitalität GCBHP2-transfizierter und rote Säulen die Vitalität mock-transfizierter Zellen an. Die Resultate repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten.

Zu allen Zeitpunkten demonstrierten GCBHP2-transfizierte HEK-293 Zellen, unter dem Einfluß der Stressoren TBT und Serumentzug, eine deutlich erhöhte Resistenz im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen. So überlebten nur 1,93 % der mock-transfizierten Zellen 92 h Serumentzug und sogar nur 1,15 % 92 h TBT-Inkubation. Unter den gleichen Bedingungen verschaffte BHP2 GCBHP2-transfizierten Zellen einen Vorteil, der sich in Überlebensraten von 11 % und 15,7 % äußerte. Damit bewiesen diese Zellen eine maximal sechs- bzw. vierzehnmal höhere Vitalität als die nichtexprimierenden Zellen (s. Tab. 4.3). Somit wurde ein Hinweis auf eine mögliche antiapoptotische Wirkung des GCBHP2 geliefert.

Inkubationsdauer (h)	Ratio vitaler Zellen: <i>GCBHP2</i> -transfiziert / <i>mock</i> -transfiziert (×-fach)	
	TBT	Serumentzug
0	1,0	1,0
22	1,5	2,3
45	2,6	2,6
68	3,8	5,0
92	13,7	5,7

Tab. 4.3: Vitalitätsvergleich *GCBHP2*- und *mock*-transfizierter Zellen unter dem Einfluß von TBT bzw. unter Serumentzug nach ausgewählten Zeitpunkten.

4.6.3 Caspase-Assay: Einfluß selektiver Stressoren auf die Caspase-Aktivität *GCBHP2*-transfizierter Zellen

Durch die Proteolyse einer Vielfalt zellulärer Proteine führen Caspasen irreversibel zum Zelltod und zählen in dieser Funktion zu den wichtigsten Effektoren der Apoptose. Aktivierte Initiator-Caspasen (z. B. Caspase-1, -4 und -9) lösen in einer kaskadeartigen Reaktion die Aktivierung von Effektor-Caspasen aus (z. B. Caspase-3 und -6), welche wiederum ihre spezifischen Substrate proteolysieren. Eine Messung der Caspase-Aktivitäten erlaubt daher die quantitative Erfassung der Apoptose. Unter den Caspasen eignet sich hierfür insbesondere die Caspase-3, die eine zentrale Position innerhalb der Caspase-Kaskade einnimmt. Sie prozessiert diverse Procaspasen und wird selbst von vielen Caspasen aktiviert (FALEIRO *et al.*, 1997; ENARI *et al.*, 1996). Für die Untersuchungen wird sich eines modifizierten Substrats der Caspase bedient, welches nach seiner Spaltung ein Fluorochrom freisetzt. Im Anschluß an eine entsprechende Exzitation (355 nm) führt das Fluorochrom zur Lichtemission (460 nm) proportional seiner freigesetzten Konzentration.

$1,5 \times 10^5$ *GCBHP2*- bzw. *mock*-transfizierte *HEK-293* Zellen wurden in die Vertiefungen einer 6-well Platte ausgesät. Nach 24 - 48 h erfolgte durch Serumentzug bzw. durch Zugabe von $0,25 \mu\text{M}$ TBT die Apoptose-Induktion (s. 3.2.2.3). Anschließend verblieben die Zellen bis zu 92 h unter dem Einfluß des jeweiligen Induktors. Kontrollzellen blieben in parallelen Ansätzen unbehandelt. In definierten Zeitabständen wurden Proben entnommen, die Zellen lysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Aliquots wurden mit dem modifizierten Peptid Ac-DEVD-AMC inkubiert, welches die Zielsequenz der Caspase-3 imitiert (NICHOLSON *et al.*, 1995). Die nach der Spaltung des Substrats emittierte Fluoreszenz wurde schließlich mittels eines Fluorometers gemessen und bezüglich der Proteinkonzentrationen relativiert (s. 3.2.2.5).

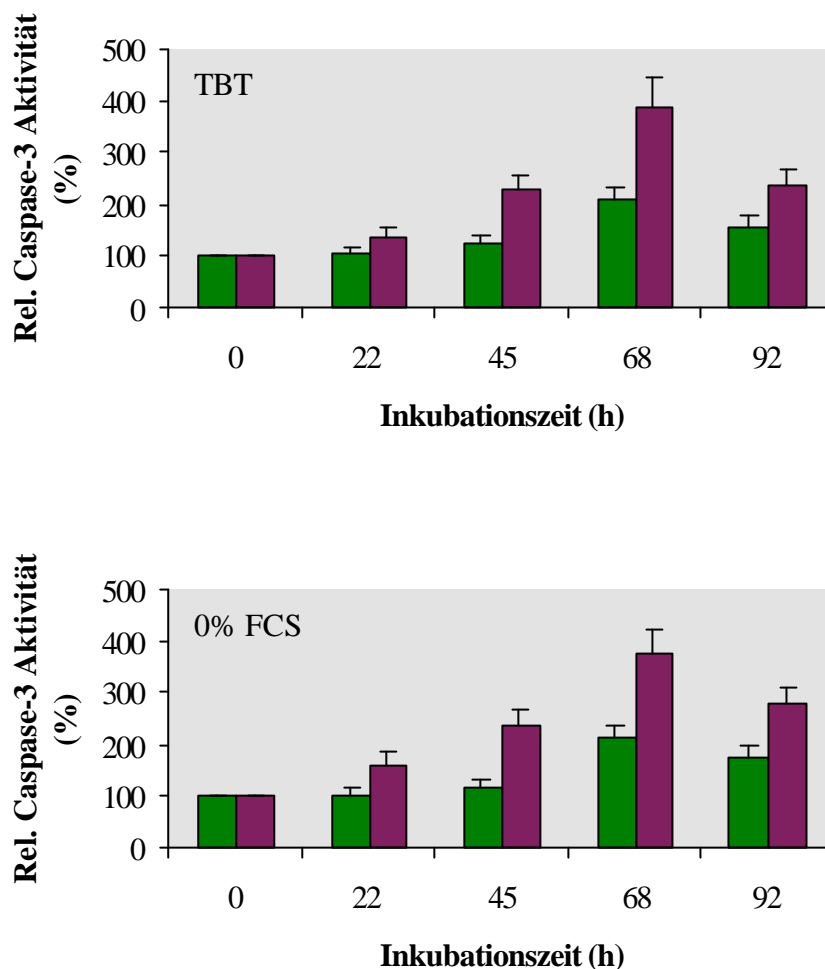


Abb. 4.16: Caspase-3-Aktivität in GCBHP2- und mock-transfizierten HEK-293 Zellen bei TBT-Behandlung bzw. unter Serumentzug. Die durch die katalytische Aktivität der Caspasen erzeugte Fluoreszenz wurde nach bis zu 92 h gemessen. Die erhaltenen Werte wurden anschließend in Relation zu jenen der unbehandelten Kontrollen gebracht, welche gleich 100 % gesetzt worden waren. Grüne Säulen reflektieren die relative Caspase-Aktivität GCBHP2-transfizierter und rote Säulen jene der mock-transfizierten HEK-293 Zellen.

Unter dem Einfluß beider Apoptose-Induktoren (Serumentzug und TBT) konnte ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität sowohl bei *mock*- als auch bei *GCBHP2*-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.16). Dieser Anstieg vollzog sich bei *mock*-transfizierten Zellen allerdings weitaus dramatischer als bei *BHP2*-exprimierenden Zellen: Innerhalb von 68 h nach Serumentzug bzw. TBT-Zugabe konnte bei ersteren eine Zunahme auf 372 % bzw. 390 % verzeichnet werden, bei letzteren dagegen nur auf 212 % bzw. 210 %. In den nachfolgenden Stunden fiel die Enzymaktivität in beiden Fällen wieder ab (*GCBHP2*-transfizierte Zellen: 176 % bzw. 156 %, *mock*-transfizierte Zellen: 279 % bzw. 240 %). Zu jedem Zeitpunkt bewiesen *mock*-transfizierte Zellen jedoch einen signifikant höheren Grad der Caspase-3-Aktivierung als im Vergleich zu *BHP2*-exprimierenden Zellen (s. Tab. 4.4).

Inkubationsdauer (h)	Ratio zellulärer Caspase-3-Aktivität: <i>mock</i> -transfiziert / <i>GCBHP2</i> -transfiziert (×-fach)	
	TBT	Serumentzug
0	1,0	1,0
22	1,3	1,6
45	1,9	2,1
68	1,9	1,8
92	1,5	1,6

Tab. 4.4: Vergleich der Caspase-3-Aktivität *GCBHP2*- und *mock*-transfizierter Zellen unter dem Einfluß von TBT bzw. bei Serumentzug nach ausgewählten Zeitpunkten.

4.7 Subzelluläre Lokalisation des BHP2 in *GCBHP2*-transfizierten Zellen

Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie residieren überwiegend in mitochondrialen Membranen und lassen damit im Vergleich zu proapoptotischen Mitgliedern, welche meistens im Cytoplasma vorzufinden sind, eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation erkennen (GROSS *et al.*, 1998; HOCKENBERY *et al.*, 1990).

Nachdem für BHP2-exprimierende Zellen unter apoptoseinduzierenden Bedingungen sowohl eine erhöhte Zellvitalität als auch eine verminderte Caspase-Aktivierung festgestellt werden konnte (s. 4.6), sollte die Korrelation dieser Effekte mit der für antiapoptotische Bcl-2 Proteine charakteristischen subzellulären Lokalisation überprüft werden. Für diese immunocytochemischen Untersuchungen wurden stabil transfizierte, *GCBHP2*-exprimierende *NIH/3T3* Zellen nach Erreichen einer 50 %igen Konfluenz auf Deckgläsern fixiert und permeabilisiert (s. 3.2.19). Im Anschluß daran wurde das rekombinante, His-markierte BHP2 durch einen Anti-His-Ak (1:400) und ein mitochondriales Markerprotein (p33/gC1qR; DEDIO *et al.*, 1998) durch einen Anti-p33/gC1qR-Ak (1:20) detektiert. Die daraufhin gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels fluorochromgekoppelter, speziesspezifischer Sekundärantikörper visualisiert (Anti-*Mouse*-Cy3 im Fall des BHP2, Anti-*Rabbit*-FITC im Fall des p33). Nach entsprechender Exzitation emittierten diese Farbstoffe Licht (s. 3.2.19.2), das eine Lokalisation der gebildeten Immunkomplexe erlaubte. Die zelluläre Verteilung der BHP2-Immunkomplexe erschien hierbei als nahezu identisch mit jener der p33/gC1qR-Immunkomplexe, welche die für Mitochondrien charakteristische Gewichtung cytoplasmatischer und perinukleärer Bereiche erkennen ließ (s. Abb. 4.17). Die dadurch verdeutlichte Kolo-kalisation des BHP2 mit dem mitochondrialen Marker gab daher Aufschluß über eine Assoziation des Schwammproteins mit den Mitochondrien transfizierter Zellen.

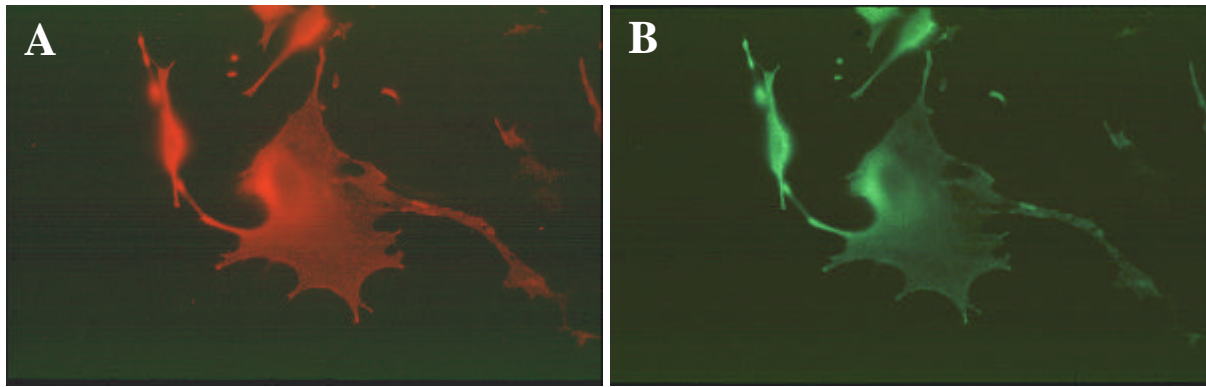


Abb. 4.17: Immunfluoreszenzanalysen der Lokalisation des GCBHP2-Proteins in stabil transfizierten NIH/3T3-Zellen. Auf Deckgläsern fixierte, BHP2-produzierende Zellen wurden mit einem System aus Anti-His- und Anti-p33/gC1qR-Antikörpern sowie zwei speziesspezifischen Sekundärantikörpern (Cy3- bzw. FITC-gekoppelt) behandelt. Nach entsprechender Lichtanregung erschienen BHP2-Antikörper-Komplexe rot (Bild A), Antikörper-Komplexe mit dem mitochondrialen Markerprotein p33/gC1qR erschienen grün (Bild B). Nahezu identische Färbemuster lassen eine Kolokalisation des BHP2 und des p33/gC1qR erkennen. Vergrößerung: 1000fach.

5 Diskussion

Der Begriff Apoptose umschreibt eine morphologisch distinkte Form des Zelltods, die in einem enzymatisch regulierten, energieaufwendigen Prozeß vollzogen wird (RAFF, 1992; STELLER, 1995). Ausgelöst durch eine Fülle physiologischer und pathologischer Stimuli (s. Tab. 1.1), sind apoptotische Mechanismen in die Entwicklung eines Organismus', die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, die Immunabwehr und die Entfernung beschädigter Zellen involviert (WYLLIE *et al.*, 1980; GÖLSTEIN *et al.*, 1991; VAUX *et al.*, 1994; ABASTADO, 1996). Die Teilnahme der Apoptose an einer derartigen Vielfalt von Vorgängen verdeutlicht die Erfordernis nach komplexen Signaltransduktionswegen, die allerdings häufig in einer zentralen Kontrollstelle zusammenlaufen (MCCONKEY und ORRENIUS, 1996). Dieser Kontrollpunkt setzt sich aus den verschiedenen Mitgliedern einer regulatorisch tätigen Familie, der Bcl-2 Familie, zusammen. Basierend auf strukturellen Besonderheiten ermöglicht die Multifunktionalität der zahlreichen Homologen des Bcl-2 die Wahrnehmung ihrer pro- und antiapoptotischen Aufgaben in vielfältigen Wirkungsbereichen (REED, 1997). Hierbei scheint das Verhältnis aktiver pro- und antiapoptotischer Familienmitglieder über das weitere Schicksal der Zelle zu entscheiden (OLTVAI *et al.*, 1993). Überwiegen erstere, wird die Exekution der Zelle, vermittelt durch einige wenige Adapterproteine, in die Wege geleitet (ADAMS und CORY, 1998). Diese Exekution umfaßt hauptsächlich die Aktivierung von Cysteinproteasen (Caspasen), die durch den Abbau zelleigener, lebenswichtiger Proteine irreversibel den Zelltod herbeiführen (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998). Aber auch die durch gleichzeitig hervorgerufene Organell-Dysfunktionen (insbesondere mitochondriale) verursachten Störungen des Zellmetabolismus' haben den Zelltod zur Folge (BRUCKHEIMER *et al.*, 1998; GREEN und REED, 1998). Ein Überwiegen antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie verhindert dagegen Caspase-Aktivierung und Organell-Fehlfunktion (KORSMEYER *et al.*, 1993).

Die Gemeinsamkeiten, welche sich beim Vergleich apoptotischer Mechanismen diverser Spezies offenbaren, sprechen für eine Konservierung des programmierten Zelltods im Verlauf der Evolution, zumindest vom Nematoden zum Menschen (THOMPSON, 1995; VAUX und STRASSER, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Erweiterung dieser Aussage angestrebt, nämlich die Konservierung der Apoptose von den Porifera zum Menschen. Hierfür sollten der Nachweis und die anschließenden Untersuchungen von Bcl-2 Homologen der Schwämme das Fundament legen.

5.1 Erste Indizien für die Existenz apoptotischer Mechanismen in den Porifera

Die Porifera stellen einen im marinen Benthos auf harten Böden vorherrschenden Tierstamm dar (SARA und VACELET, 1973), der nicht nur in der offenen See, sondern auch in von Menschen intensiv genutzten Gebieten, wie z. B. Häfen, Marinas etc., präsent ist. Die bisher ca. 9000 identifizierten Schwammarten sind als sessile Filtrierer dem aquatischen Milieu in einer beispiellosen

Weise ausgesetzt, die wahrscheinlich von keinem anderen Metazoen-Stamm übertroffen wird. So wurde für manche Schwämme ein Wasserdurchfluß von bis zu $2,4 \times 10^4$ Litern pro Tag und Kilogramm Körpergewicht berechnet (VOGEL, 1977). Diese enormen Wassermengen sichern allerdings durch das Einstrudeln von Nahrungspartikeln nicht nur die Ernährung des Organismus'. Sie erhöhen auch das Risiko, mit negativen Faktoren in Kontakt zu kommen (enthalten in Nahrung und anorganischem Material), die in der Folge aus dem Wasser gefiltert und im Schwammkörper angereichert werden (VERDENAL *et al.*, 1990). Insbesondere für Schwermetalle ist eine verblüffende Bioakkumulation festgestellt worden (HANSEN *et al.*, 1995). Aufgrund des vergleichsweise einfachen Körperbauplans, dem Mangel an echten Geweben und der fehlenden Spezialisierung der epithelartigen Zellschichten (SIMPSON, 1984) erfolgt die Reaktion auf derartige Einflüsse aus der Umwelt direkt auf zellulärer Ebene und verdeutlicht die Abhängigkeit von der Wasserqualität. Diese Reaktionen - physiologische und pathophysiologische Änderungen des Metabolismus' - können einerseits der Vermeidung von weiteren Schäden durch Streßfaktoren und der Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands dienen, andererseits aber auch an der Adaption an eine neue Situation beteiligt sein.

In diesem Zusammenhang verwundert nicht die Existenz metabolischer Strategien, welche die Komponenten eines generellen biologischen Abwehrsystems der Schwämme darstellen. Im Fall von Umweltstreß bieten diese eine Möglichkeit, ungünstigen Einflüssen Widerstand zu leisten bzw. bereits entstandene Schäden zu beheben. Gerade bei der Detoxifizierung endogener und anthropogener Substanzen nimmt der sog. multixenobiotische Resistenzmechanismus (MXR) der Schwämme eine entscheidende Rolle ein (KURELEC *et al.*, 1992; MÜLLER *et al.*, 1996). Der Phänotyp dieses Mechanismus' gleicht dem des bei vielen Tumorzelllinien beobachteten *multidrug resistance (mdr)* -Phänomens (WALDMAN *et al.*, 1994): *mdr*-positive Tumorzellen weisen eine verminderte Akkumulation cytotoxischer Agenzien auf (MORROW und COWAN, 1988). Dies beruht auf der Überexpression einer transmembranen Pumpe, die den Ausstrom schädlicher Stoffe fördert (ENDICOTT und LING, 1989). In vielfältigen Studien wurde der energieaufwendige Export von Toxinen, mittels einer vergleichbaren Pumpe, auch in Schwammzellen und Zellen anderer aquatischer Organismen festgestellt (WALDMAN *et al.*, 1994; MÜLLER *et al.*, 1996). Gleichfalls wurde die xenobiotikainduzierte Expression der an dieser Pumpe beteiligten Proteine demonstriert (KURELEC, 1994).

Der Einfluß schädigender Substanzen bewirkt allerdings nicht nur die Expression des MXR, sondern induziert gleichermaßen die Synthese des Hitzeschocksystems der Schwämme. Hitzeschockproteine stellen einen essentiellen Teil der primären zellulären Streßantwort dar. Sie werden von einem breiten Spektrum anthropogener und natürlicher Stressoren in einer Vielfalt von Organismen - von Bakterien bis hin zum Menschen - induziert (SCHLESINGER *et al.*, 1982; MORIMOTO *et al.*, 1994b). Als eines der wichtigsten Bestandteile des Hitzeschocksystems gilt die Familie der Hitzeschockproteine mit einem Molekulargewicht von 70 kDa. Sie setzt sich aus konstitutiv exprimierten und induzierbaren Mitgliedern zusammen, welche als Chaperone an der energieaufwendigen Faltung naszierender und denaturierter Proteine beteiligt sind (ROTHMAN,

1989). Auch aus Schwämmen wurde bereits ein Mitglied der HSP70-Familie kloniert und charakterisiert (KOZIOL *et al.*, 1996). Zudem wurde eine Induktion dieses Hitzeschockproteins unter dem Einfluß verschiedener physikalischer und chemischer Faktoren, anthropogenen und natürlichen Ursprungs, beobachtet: z. B. Änderungen des pH-Wertes und der Temperatur (KOZIOL *et al.*, 1997 und 1998), PCBs (WIENS *et al.*, 1998; SCHRÖDER *et al.*, 1999a), Methylquecksilber (BATEL *et al.*, 1993) und Cadmium (SCHRÖDER *et al.*, 1999b).

Welche Vorgänge werden aber eingeleitet, wenn diese und andere Schutzmechanismen nicht den gewünschten Erfolg zeigen? In diesem Fall müssen zum Schutz des gesamten Organismus' irreparabel beschädigte Zellen geopfert werden. Als Mittel der Wahl kann hierbei die Apoptose in einem streng regulierten Prozeß zu einer gezielten Eliminierung der betroffenen Zellen führen, ohne benachbartes Gewebe zu beschädigen. Diese Beseitigung der Zellen wird allerdings erst dann vollzogen, wenn in letzter Instanz die Kontrollstation der Bcl-2 Familie passiert wurde und die Aktivität der proapoptotischen Mitglieder jene der antiapoptotischen übertraf. Steht jedoch auch Schwämmen dieser komplexe Mechanismus zur Verfügung? Die Klonierung und Analyse vieler Schwammproteine, deren Homologe sich als charakteristisch für Metazoen erwiesen hatten (MÜLLER, 1997, 1998; MÜLLER *et al.*, 1999), etablierte bereits den monophyletischen Ursprung der Metazoa, inkl. der Porifera (MÜLLER, 1995; BORCHIELLINI *et al.*, 1998). Zudem belegten genetische Analysen von *C. elegans* und *D. melanogaster* die Existenz grundlegender, konservierter Elemente der Apoptose-Maschinerie in diesen Organismen, woraus auf deren Expression in allen Invertebratenzellen geschlossen wurde (STELLER, 1995; SHAHAM und HORVITZ, 1996). Auch unter morphologischen und entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten erscheint die Existenz der Apoptose in den Porifera wahrscheinlich: Der programmierte Zelltod ist nicht nur an der Eliminierung geschädigter und kranker Zellen beteiligt, sondern greift auch im Zuge der Entwicklung höherer Organismen in die Entfernung unerwünschter Zellen ein. So müssen z. B. im Vertebraten-Embryo Zellen beseitigt werden, die vorübergehend Stütz- oder sonstige Hilfsfunktionen ausgeübt hatten. Ohne den programmierten Zelltod könnten wahrscheinlich nur kugelförmige Organismen entstehen (HUG, 1998). Bei einigen Schwammarten bestimmt zwar das Außenmedium häufig den Habitus, der sich zudem auch in einer kugeligen Form präsentieren kann. Dem gegenüber steht jedoch die komplizierte und artspezifische Morphologie anderer Schwammarten, z. B. der Hexactinellida (WESTHEIDE und RIEGER, 1996). Vermutlich ist die Apoptose an vielen der komplexen Prozesse der Schwammentwicklung beteiligt, die sich von der Larvenbildung und Embryogenese bis hin zum Ausbau des Kanalsystems vollziehen. Zahlreiche dieser Vorgänge sind durch eine gezielte Eliminierung von Zellen charakterisiert (GRUNER *et al.*, 1993).

Somit war der theoretische Grundstein für den Nachweis von Apoptose in den Porifera, dem phylogenetisch ältesten aller rezenten Metazoen-Tierstämme, gelegt. Bisherige Untersuchungen der Schwämme bezüglich dieses Mechanismus' sind allerdings sehr spärlich und erstreckten sich hauptsächlich auf die in diesem Zusammenhang symptomatischen Erscheinungen: Bereits in einer frühen Studie bewiesen xenobiotische Umweltgifte (z. B. Methylquecksilber und Cadmium) für Metazoen im allgemeinen und für Schwämme im besonderen ihr apoptoseauslösendes Potential

(BATEL *et al.*, 1993; MÜLLER *et al.*, 1994; HAMADA *et al.*, 1996). 1994 dokumentierten OLESEN und WEEKS die Akkumulation des Schwermetalls Cadmium in Schwämmen, die zu der charakteristischen Fragmentierung genomischer DNA führen kann (WAGNER *et al.* 1998; WIENS *et al.* 1999a). Der Abbau genomischer DNA wurde bei den Porifera gleichfalls als Antwort auf physiologische Faktoren, Störungen des Metabolismus' und DNA-Schäden beobachtet (KOZIOL *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 1998; WIENS *et al.*, 1999b; KRASKO *et al.*, 1999). Nicht nur diese direkten Hinweise belegten die Existenz apoptotischer Mechanismen in Schwämmen. Vielmehr wurde unter dem Einfluß selektiver Stressoren die Induktion bestimmter Gene beobachtet, deren Säugetier-Homologe, neben vielfältigen Aufgaben, im Rahmen der Apoptose eine potentielle Funktion innehaben. Hierzu ist das 14-3-3 aus *G. cydonium* zu rechnen, dessen Transkription durch das Pestizid PCB induziert wird (WIENS *et al.*, 1998). 14-3-3 gehört zu einer speziellen Klasse ubiquitärer, multifunktionaler Chaperone, welche die Wirksamkeit bestimmter Proteine beeinflussen, indem sie diese in zellulären Kompartimenten zurückhalten. In dieser Funktion greift 14-3-3 auch in den Vorgang der Apoptose ein (LINCZ, 1998). Hierbei wird phosphoryliertes Bad (ein proapoptotischer Regulator aus der Bcl-2 Familie (s. 1.6)) durch Bindung an 14-3-3 im Cytosol zurückgehalten (MUSLIN, 1996). In dieser Form wird jegliche Interaktion mit antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie unterbunden. Erst das Eintreffen apoptotischer Stimuli induziert die Dephosphorylierung des Bad und bewirkt dessen Loslösen vom Chaperon (ZHA *et al.*, 1997). Bad vermag anschließend proapoptotisches Bax, welches durch Bindung an Bcl-2 oder Bcl-x_l inaktiviert wurde, freizusetzen und dadurch zu aktivieren (YANG *et al.*, 1995). Bedingt durch die Multifunktionalität des Säugetier-Homologs ließ sich allerdings von der Existenz eines 14-3-3 Proteins in Schwämmen nicht automatisch auf jene apoptotischer Mechanismen schließen. Erst die Entdeckung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie - einer Familie, deren bisher einzig bekannte Funktion sich auf die Regulation der Apoptose erstreckt - lieferte das entscheidende Indiz für das Vorkommen entsprechender Mechanismen auch in den Porifera.

5.2 Strukturelle Analysen Bcl-2-homologer Proteine aus *G. cydonium*

5.2.1 BHP1 und BHP2: Mitglieder der Bcl-2 Familie

Die Klonierung Bcl-2-homologer Proteine aus dem Schwamm *Geodia cydonium* wurde durch die Herstellung degenerierter Primer eingeleitet. Diese Oligonukleotide wurden hierfür komplementär zu einer konservierten Region gewählt, der BH1-Domäne (Bcl-2 Homologie Domäne-1), die bei allen antiapoptotischen und nur wenigen proapoptotischen Vertretern der Bcl-2 Familie anzutreffen ist. Die mittels PCR aus einer cDNA-Bibliothek isolierte cDNA (*GCBHP1*, s. 4.1.2) wies nach Datenbankanalysen ausschließlich Homologien zu Mitgliedern der Bcl-2 Familie auf. Die abgeleitete *GCBHP1*-Aminosäuresequenz zeigte höchste Übereinstimmungen zu den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen aus *M. musculus*, *X. laevis* und *H. sapiens* (durchschnittlich 12 % identische und 29 %

ähnliche Aminosäuren). Ein zusätzliches Screening der cDNA-Bibliothek, unter Verwendung eines *GCBHP1*-Fragments als Sonde, lieferte einen weiteren Klon (*GCBHP2*, s. **4.1.3**). Dessen abgeleitete Aminosäuresequenz wies erneut höchste Deckung zu den besagten antiapoptotischen Proteinen aus Maus, Frosch und Mensch auf (durchschnittlich 14 % identische und 28 % ähnliche Aminosäuren). Der anschließende Sequenzvergleich diverser antiapoptotischer Bcl-2 Proteine unterschiedlicher Spezies förderte eine ausgeprägte Heterologie zutage, die zwischen den einzelnen Mitgliedern der Bcl-2 Familie herrscht (s. Tab. **5.1**). Ein Anteil von nur 9- 14 % identischer und 20 - 30 % ähnlicher Aminosäuren ist durchaus üblich. In einzelnen Fällen können die Bcl-2 Proteine phylogenetisch nahestehender Spezies zwar durch eine erhöhte Sequenzhomologie charakterisiert sein. Stammesgeschichtliche Verwandtschaft ist jedoch keinesfalls ein Garant für ein hohes Maß an Sequenzidentität zwischen den Familienmitgliedern (s. *X. laevis* und *C. coturnix*).

	<i>G. cydonium</i> BHP1	<i>G. cydonium</i> BHP2	<i>C. elegans</i> CED-9	<i>X. laevis</i> AR11	<i>C. coturnix</i> NR13	<i>H. sapiens</i> Bcl-w
<i>G. cydonium</i> BHP1		14 %	8 %	10 %	10 %	12 %
<i>G. cydonium</i> BHP2	31 %		9 %	12 %	11 %	17 %
<i>C. elegans</i> CED-9	22 %	23 %		9 %	9 %	14 %
<i>X. laevis</i> AR11	29 %	27 %	24 %		13 %	35 %
<i>C. coturnix</i> NR13	21 %	23 %	20 %	29 %		13 %
<i>H. sapiens</i> Bcl-w	25 %	30 %	25 %	47 %	25 %	

Tab. 5.1: Aminosäuresequenzhomologie ausgewählter antiapoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder verschiedener Spezies. Die prozentualen Werte beziehen sich auf *identische* bzw. *ähnliche* (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren.

Die Gegenüberstellung der Sequenzen des BHP1 und BHP2 aus *G. cydonium* demonstrierte weiterhin eine kaum höhere Homologie beider Proteine zueinander als im Vergleich zu den Bcl-2 Homologen anderer Spezies (s. Tab. **5.1**). Eine derartige Heterologie offenbarte sich auch nach der Analyse diverser Bcl-2 Proteine gleicher Spezies (z. B. *H. sapiens*, s. Tab. **5.2**). Die maximale Übereinstimmung überschreitet nur selten 18 % (33 %) identische (ähnliche) Aminosäuren. Bei Berücksichtigung ihrer Funktion läßt sich außerdem zwischen den Mitgliedern der proapoptotischen BH3 Subfamilie (z. B. Hrk, Bik) eine besonders geringe Homologie feststellen. Die antiapoptotische Bcl-2 Subfamilie (z. B. Bcl-2, Bcl-w) ist dagegen durch eine höhere Übereinstimmung gekennzeichnet, jene der proapoptotischen Bax Subfamilie (z. B. Bax, Bak) liegt etwa zwischen beiden.

	Bcl-2	Bcl-w	Bax	Bak	Hrk	Bik
Bcl-2		31 %	16 %	17 %	4 %	10 %
Bcl-w	43 %		15 %	19 %	4 %	10 %
Bax	28 %	30 %		18 %	3 %	7 %
Bak	34 %	33 %	31 %		3 %	10 %
Hrk	7 %	9 %	7 %	8 %		5 %
Bik	20 %	23 %	19 %	24 %	9 %	

Tab. 5.2: Aminosäuresequenzhomologie ausgewählter, humaner antiapoptotischer (Bcl-2, Bcl-w) und proapoptotischer (Bax, Bak, Hrk, Bik) Bcl-2 Familienmitglieder. Die prozentualen Werte beziehen sich auf *identische* bzw. *ähnliche* (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren.

5.2.2 Die BH-Domänen des BHP1 und des BHP2

Ein Apoptose-Signal wird durch die unterschiedlichsten physiologischen und pathologischen Stimuli ausgelöst, welche die Exekution einer Zelle mittels diverser Signaltransduktionswege einleiten (THOMPSON, 1995; KONOPLEVA *et al.*, 1999). Daher erscheint die Existenz einer Fülle regulatorisch wirksamer pro- und antiapoptotischer Bcl-2 Proteine verständlich, die ihre Funktion mittels vielfältiger Mechanismen ausüben. Die beträchtliche Sequenzvariabilität, insbesondere der Bax und BH3 Subfamilie (s. o.), spiegelt dabei wahrscheinlich die Vielfalt der Mechanismen wider, mittels derer sie ihre proapoptotische Funktion ausüben: Die Mitglieder der BH3 Subfamilie sind durch die größte Diversität gekennzeichnet, lediglich der Besitz der namensgebenden Domäne ist ihnen gemein (ADAMS und CORY, 1998). Diese Domäne ist an der Bindung antiapoptotischer Bcl-2 Proteine beteiligt (REED, 1997). Die Heterodimerisierung zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen erinnert hierbei an eine Rezeptor-Liganden-Interaktion und zieht die Inaktivierung des antiapoptotischen Partners nach sich (CHITTENDEN *et al.*, 1995a; MUCHMORE *et al.*, 1996). Somit reflektieren die Strukturunterschiede der BH3-Proteine möglicherweise die Existenz eines für jedes antiapoptotische Molekül spezifischen Antagonisten (INOHARA *et al.*, 1997; ADAMS und CORY, 1998). Bisher wurden alleine beim Menschen jeweils ca. sechs pro- und antiapoptotische Bcl-2 Homologe identifiziert, die zusätzlich noch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Gewebespezifität demonstrieren (BRUCKHEIMER *et al.*, 1998).

Auch die proapoptotische Bax Subfamilie ist durch den Besitz der BH3-Domäne gekennzeichnet (GROSS *et al.*, 1999). Daher steht diesen Proteinen gleichfalls die Möglichkeit offen, durch Dimerisierung mit einem funktionalen Antagonisten diesen zu neutralisieren. Eine derartige Interaktion verhindert aber auch die Ausübung der zweiten Funktion der Bax Proteine, nämlich die der Apoptose-Induktion mittels Porenbildung: Infolge einer durch ein Signal ausgelösten Aktivierung wird Bax zu den Mitochondrien transloziert, wo es Störungen der Organell-Funktion sowie einen Ausstrom proapoptotischer Faktoren in das Cytoplasma herbeiführt (SUSIN *et al.*, 1997; GREEN

und REED, 1998). Strukturelle Grundlage dieses Phänomens sind die Domänen BH1 und BH2, welche den Mitgliedern der BH3 Subfamilie fehlen.

Der Besitz von BH1 und BH2 erlaubt auch den meisten antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen eine Porenbildung, wodurch sie die Organell-Homöostase wiederherstellen und der durch das Bax verursachten Zellschädigung entgegenwirken (YANG *et al.*, 1997; ZAMZAMI *et al.*, 1998). Manchen antiapoptotischen Bcl-2 Homologen ist auch eine inaktivierende Interaktion mit Mitgliedern der Bax oder der BH3 Subfamilie möglich. Hierfür benötigen sie jedoch neben BH1 und BH2 auch die Domäne BH3 (CHENG *et al.*, 1996). Schließlich sind einige dieser Proteine zudem durch einen N-terminalen Abschnitt charakterisiert, der an der Bindung regulierender und signaltransduzierender Moleküle beteiligt ist, welche nicht der Bcl-2 Familie angehören (SHIBASAKI, 1997). Dieser Bereich wird als BH4-Domäne bezeichnet (REED, 1997). Allerdings basiert der Begriff "Domäne" in diesem Zusammenhang lediglich auf funktionalen Untersuchungen; Sequenzvergleiche förderten dagegen keine nennenswerten Homologien zutage (GROSS *et al.*, 1999). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte auch die Analyse der hydrophoben C-Termini vieler pro- und antiapoptotischer Bcl-2 Proteine. Diese Bereiche gewährleisten den Transport der Proteine zu den entsprechenden Organellen und unterstützen dort eine Verankerung in den äußeren Membranen (NGUYEN *et al.*, 1993). Dadurch ist das Verbleiben der Proteine in einem räumlich begrenzten Wirkungsfeld unabhängig davon gesichert, ob sie ihre Funktion durch Porenbildung, Dimerisierung oder einer Kombination aus beiden ausüben.

Diese Beobachtungen veranschaulichen die Bedeutung, die den BH-Domänen beizumessen ist. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in weiteren Analysen diese wichtigen Domänen verschiedener Bcl-2 Proteine isoliert betrachtet: Unabhängig von der Funktion der Bcl-2 Proteine wurden für die BH-Domänen verschiedener Spezies Konsensussequenzen veröffentlicht (Prosite *Acc. No.* PS01080 und PS01258). Ein Vergleich mit diesen Sequenzen enthüllte für die BH1- und BH2-Domäne des BHP1 70 % und 75 % Übereinstimmung, für die Domänen des BHP2 84 % und 75 % (s. 4.1.2 und 4.1.3). Damit wurden also viel höhere Werte erzielt als im Vergleich der kompletten Proteinsequenzen (s. Tab. 5.1). Infolge der geringen Homologien existiert für den C-terminalen transmembranen Bereich zwar kein Konsensus. Die Anwendung eines Algorithmus nach HARTMAN *et al.* (1998) und Berechnungen der Hydrophobizität (KYTE und DOOLITTLE, 1982) ließen jedoch bei beiden Proteinen seine Präsenz erkennen. Dieser hydrophobe Membrananker wird - charakteristisch für viele Bcl-2 Proteine (BOISE *et al.*, 1993) - von je einer geladenen bzw. polaren Aminosäure flankiert (s. 4.1.2 und 4.1.3). Bereits die Kombination all dieser Merkmale erlaubte eine erste Zuordnung des BHP1 und des BHP2 zu der Familie der Bcl-2 Proteine.

In einem weiteren Ansatz wurde daher ein Versuch der funktionalen Klassifizierung beider Schwammproteine, basierend auf ihrer Aminosäuresequenz, unternommen. Hierbei offenbarten die Domänen der Schwämme durchschnittlich eine geringfügig höhere Homologie zu jenen der antiapoptotischen Subfamilie (s. Tab. 4.1). Eine detaillierte Analyse ausgewählter antiapoptotischer Proteine diverser Spezies enthüllt in diesem Zusammenhang interessanterweise höchste Homologie

zu den Domänen der Vertebratenproteine. Im Gegensatz dazu fiel die Homologie zum CED-9, dem antiapoptotischen Bcl-2 Homolog des Nematoden *C. elegans*, deutlich niedriger aus (s. Tab. 5.3).

BH1	<i>G. cydonium</i>	<i>G. cydonium</i>	<i>C. elegans</i>	<i>X. laevis</i>	<i>C. coturnix</i>	<i>H. sapiens</i>
	BHP1	BHP2	CED-9	AR11	NR13	Bcl-w
<i>G. cydonium</i> BHP1		14 %	17 %	27 %	39 %	36 %
<i>G. cydonium</i> BHP2	54 %		17 %	40 %	30 %	36 %
<i>C. elegans</i> CED-9	43 %	39 %		21 %	26 %	21 %
<i>X. laevis</i> AR11	54 %	68 %	43 %		39 %	77 %
<i>C. coturnix</i> NR13	56 %	69 %	47 %	56 %		43 %
<i>H. sapiens</i> Bcl-w	59 %	59 %	47 %	77 %	56 %	

BH2	<i>G. cydonium</i>	<i>G. cydonium</i>	<i>C. elegans</i>	<i>X. laevis</i>	<i>C. coturnix</i>	<i>H. sapiens</i>
	BHP1	BHP2	CED-9	AR11	NR13	Bcl-w
<i>G. cydonium</i> BHP1		9 %	4 %	22 %	22 %	18 %
<i>G. cydonium</i> BHP2	31 %		9 %	27 %	18 %	40 %
<i>C. elegans</i> CED-9	13 %	27 %		22 %	22 %	18 %
<i>X. laevis</i> AR11	36 %	45 %	40 %		36 %	40 %
<i>C. coturnix</i> NR13	31 %	40 %	40 %	68 %		27 %
<i>H. sapiens</i> Bcl-w	27 %	50 %	31 %	54 %	45 %	

Tab. 5.3: Aminosäuresequenzhomologie der BH1- und BH2-Domänen ausgewählter antiapoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder verschiedener Spezies. Die prozentualen Werte beziehen sich auf *identische* bzw. *ähnliche* (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren. BHP1 (BH1: $AS_{144} - AS_{165}$; BH2: $AS_{195} - AS_{216}$), BHP2 (BH1: $AS_{124} - AS_{145}$; BH2: $AS_{173} - AS_{193}$), CED-9 (BH1: $AS_{158} - AS_{180}$; BH2: $AS_{210} - AS_{231}$), AR11 (BH1: $AS_{100} - AS_{121}$; BH2: $AS_{149} - AS_{170}$), NR13 (BH1: $AS_{73} - AS_{95}$; BH2: $AS_{123} - AS_{144}$), Bcl-w (BH1: $AS_{84} - AS_{105}$; BH2: $AS_{133} - AS_{154}$).

Zusammenfassend ließen diese auf Sequenzanalysen beruhenden Beobachtungen erste Schlußfolgerungen zu: Aufgrund der Existenz zweier Motive mit hoher Homologie zu den BH-Domänen der Bcl-2 Proteine und eines potentiellen transmembranen Ankers können die Schwammproteine BHP1 und BHP2 der Bcl-2 Familie zugeordnet werden. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch den Mangel an Homologien zu anderen, nicht dieser Familie angehörenden Proteinen. Weiterhin ist eine funktionale Zugehörigkeit zu der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie wahrscheinlich, da mit einer Ausnahme (virales Protein) alle ihre Vertreter durch die Kombination der Domänen BH1 und BH2 gekennzeichnet sind. Allerdings ist diese Kombination auch bei einigen wenigen proapoptotischen Vertretern, den Mitgliedern der Bax Subfamilie, zu finden. Diese besitzen jedoch zusätzlich und ausnahmslos die sog. BH3-Domäne, die bei den Schwammproteinen nicht vorgefunden wurde. Diese Domäne ist charakteristisch für alle proapoptotischen Bcl-2 Proteine und für deren Funktion

unerlässlich (GROSS *et al.*, 1999). Das Vorkommen von BH1 und BH2 bei den Bcl-2 Homologen des Schwammes läßt weiterhin auf eine Ausübung ihrer Funktion durch Porenbildung schließen. Hierfür spricht gleichfalls die vorhergesagte Existenz sieben α -helikaler Bereiche (s. 4.1.2 und 4.1.3), welche porenbildende Bcl-2 Homologe auszeichnen (ADAMS und CORY, 1998; INOHARA *et al.*, 1998). Daher ist eine intrazelluläre Lokalisation im Bereich der Organellen-Membranen, insbesondere der Mitochondrien, anzunehmen. Durch das Fehlen von BH3 erscheint dagegen eine Interaktion mit anderen Bcl-2 Proteinen im Zuge der Wahrnehmung ihrer Funktion eher unwahrscheinlich. Ferner zeugen vielfältige Möglichkeiten posttranslationaler Modifikation (insbesondere die Phosphorylierung eines konservierten Serinrestes, s. 4.1.4) von einer für Bcl-2 Proteine charakteristischen Regulierbarkeit der Aktivität (CHANG *et al.*, 1997; KONOPLEVA *et al.*, 1999). Da Bcl-2 Proteine sich generell durch eine prägnante Sequenzdiversität auszeichnen, war jedoch ohne weitere Analysen eine gesicherte funktionale Klassifikation der Bcl-2 Homologen der Schwämme nicht möglich.

5.3 Phylogenetische Aspekte Bcl-2-homologer Proteine der Porifera

Der potentiell endosymbiontische Ursprung der Mitochondrien und die Evolution des aeroben Metabolismus' in Eukaryoten wurden bereits mehrfach als Grundlage für die Evolution der Apoptose diskutiert (FRADE und MICHAELIDIS, 1997; KROEMER, 1997b). Laut dieser Theorie traten die Zellen, welche später einmal die Vorläufer heutiger eukaryotischer Zellen werden sollten, in eine Partnerschaft mit den Vorfahren heutiger Purpurbakterien ein. Dieses Bündnis versprach die Nutzung der energetischen Möglichkeiten, die sich durch die entstehende, für die meisten Lebewesen toxische Sauerstoffatmosphäre boten. Das Resultat war eine protoeukaryotische Zelle mit endosymbiontischen Bakterien, aus denen sich später die Mitochondrien bilden sollten (MARGULIS, 1996). Diese Allianz war empfindlich, und katastrophale Konflikte in der Selektion zwischen beiden Genomen traten gewiß auf (BLACKSTONE *et al.*, 1995). Leben und Tod des neuen symbiontischen Organismus' wurden in der aeroben Welt durch die Protomitochondrien kontrolliert, die nicht nur Antioxidantien, sondern auch Sauerstoffradikale, als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung, lieferten. Diese Symbiose war so lange instabil, bis für den mitochondrialen Metabolismus essentielle Gene in das nukleäre Genom transferiert worden waren, mit dem Resultat einer obligaten Symbiose. Heute nehmen Mitochondrien eine zentrale Rolle nicht nur im Überleben der Zellen, sondern auch in der Orchestrierung der Apoptose ein (GREEN und REED, 1998). Sie entscheiden hierbei durch das Begehen mindestens dreier Wege über Leben und Tod der Zelle. Dazu gehören die Unterbrechung des Elektronentransports, der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Bildung, die Freisetzung von caspaseaktivierenden Faktoren und die Veränderungen im zellulären Oxidations-Reduktions-Potential (KROEMER *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1996; HOCKENBERY *et al.*, 1993). Bcl-2 Proteine sind an der Regulation dieser Phänomene, kraft ihrer Fähigkeit zur Porenbildung, in entscheidender Weise beteiligt. Untersuchungen von MUCHMORE *et al.* (1996) enthüllten die strukturellen Grundlagen

dieser Porenbildung. Hierbei wurden Gemeinsamkeiten zwischen der BH1- und BH2-Domäne und den transmembranen Domänen vieler porenbildender, bakterieller Toxine aufgezeigt. Besonders beeindruckend ist die strukturelle und funktionale Analogie zu den Colicinen (SCHENDEL *et al.*, 1997). Diese sind Bestandteil eines Systems, das einerseits sekretierte, kanalbildende Proteine als Waffe beinhaltet, um unliebsame Konkurrenten auszuschalten (GUIHARD *et al.*, 1994). Andererseits involviert es Proteine der Defensive, welche Colicine binden und damit eine Kanalbildung unterdrücken (CRAMER *et al.*, 1995). Dieses archaische System erinnert somit an die Verhältnisse, wie sie in Vertebratenzellen vorgefunden werden. Hier wird, infolge eines apoptotischen Stimulus, Bax zu den Mitochondrien-Membranen transloziert. Ohne ein Eingreifen des antagonistischen Bcl-2 leitet Bax sodann den Zelltod durch Porenbildung ein. Unter dem Gesichtspunkt der Endosymbiontentheorie bedeutet dies möglicherweise, daß vor ein paar hundert Millionen Jahren, im Zuge der Eingliederung der Protomitochondrien in tierische Zellen, auch eine Inkorporierung dieses bakteriellen Systems in die Mechanismen des Zelltods der Wirtszelle erfolgte. Hierbei mußten die Vorläufer der Bcl-2 Proteine, die ihren Ursprung im Genom des protomitochondrialen Symbionten hatten, zusammen mit anderen mitochondrialen Genen in das nukleäre Genom transferiert werden (GREEN und REED, 1998).

Das scheinbare Fehlen der Apoptose-Kernelemente in Hefen mag auf den ersten Blick gegen diese Theorie sprechen. Trotz aufwendiger Suche wurden bis heute keine Homologen des Bcl-2, der Caspasen oder des Apaf-1 in diesen rezenten einzelligen Eukaryoten detektiert (XIANG *et al.*, 1996; MIGNOTTE und VAYSSIERE, 1998). Jedoch haben Transfektionsstudien das pro- und antiapoptotische Potential der Bcl-2 Proteine der Vertebraten auch in Hefen bewiesen. In diesen Studien induzierte Bax mittels Porenbildung einen Zelltod, der durch einen Zusammenbruch der mitochondrialen Atmungskette, einen Cytochrom c-Ausstrom ins Cytosol und morphologischen Veränderungen der Zelle charakterisiert war (JÜRGENSMEIER *et al.*, 1997; TAO *et al.*, 1997). Andererseits konnten diese Vorgänge mittels Koexpression des Bcl-2 vermieden werden (MANON *et al.*, 1997). Somit legen diese Beobachtungen die Existenz struktureller und funktionaler Elemente des Zelltods der Vertebraten auch in Hefen nahe. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei möglicherweise die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ein (FRÖHLICH und MADEO, 2000), welche auch bei Säugetieren als Induktoren/Regulatoren der Apoptose agieren (s. u.).

Zusätzliche Unterstützung erfährt die Endosymbiontentheorie nun durch die Tatsache, daß bei Schwämmen bisher nur Bcl-2 Homologe mit den beiden, an der Porenbildung beteiligten Domänen nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise handelt es sich bei BH1 und BH2 um die phylogenetisch ältesten Domänen der Bcl-2 Proteine, die von allen BH-Domänen durch eine höchste Konservierung gekennzeichnet sind (ADAMS und COREY, 1998). Daher scheint es sich bei der Porenbildung gleichfalls um die ursprünglichste Funktion der Bcl-2 Proteine zu handeln. Wahrscheinlich entwickelten sich BH3 und BH4 erst später im Verlauf der Evolution. Im Zusammenspiel mit BH1 und BH2 ermöglichen diese Domänen, mittels intra- und interfamiliärer Dimerisierung, eine Regulation der Aktivität der Bcl-2 Familie (OLTVAI *et al.*, 1993; DIAZ *et al.*, 1997; LINCZ, 1998). Vermutlich entstand erst mit zunehmender Komplexität der Organismen ein

Bedarf nach solch spezifischen Regulationsmechanismen (VAUX und STRASSER, 1996), deren Vielfalt sich möglicherweise in der geringen Konservierung von BH3 und BH4 widerspiegelt. Da im Nematoden *C. elegans* - dem Modell-Organismus der Invertebraten, der bereits über alle Kernelemente der Apoptose verfügt - BH3 und BH4 schon detektiert wurden (HENGARTNER, 1998; GROSS *et al.*, 1999), erscheint die Suche nach diesen Domänen in primitiveren Organismen interessant. Insgesamt gesehen eignet sich *C. elegans* für Untersuchungen der molekularen Evolution (z. B. die der Apoptose) gegebenenfalls weniger als die Porifera, da Schwämme den phylogenetisch ältesten Tierstamm der Metazoen repräsentieren (MÜLLER, 1995; MÜLLER, 1998). Zudem stehen Nematoden stammesgeschichtlich zwar zwischen den Porifera und den Vertebraten, jedoch ist *C. elegans* häufig durch das Fehlen von Genen gekennzeichnet, die in Schwamm und Säugetier identifiziert werden konnten (WAGNER *et al.*, 1998; BLUMBACH *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurde bisher kein Schwammgen aufgespürt, das nicht ein Ortholog/Homolog in Säugetieren besitzt. Zwar verfügt *C. elegans* mit CED-9 über ein Mitglied der Bcl-2 Familie (ELLIS und HORVITZ, 1986), BHP1 und BHP2 weisen jedoch zu diesem eine weitaus geringere Sequenzhomologie auf als zu den Bcl-2 Proteinen der Vertebraten (s. Tab. 5.3). Als einfacher genetischer Modell-Organismus bietet sich daher der Schwamm für Studien an, die das Verständnis der Apoptose bei Säugetieren ergänzen können.

5.4 Streßinduzierte Expression des BHP2

Die infolge einer Streßeinwirkung in die Wege geleiteten Maßnahmen haben nicht unbedingt den schnellen Zelltod als ultimatives Ziel. Vielmehr wird im Kampf gegen den Stressor eine allgemeine Streßantwort (z. B. HSP-Induktion) stimuliert, die sich in ihrer Wirkung häufig als antiapoptotisch interpretieren läßt (JÄÄTTELÄ *et al.*, 1998). Erweist sich die Zelle als nicht endgültig verloren, wird vielfach auch die Expression antiapoptotischer Bcl-2 Proteine induziert (s. u.). Zu diesen gehören Bcl-2, Bcl-x_l und Bcl-w, deren Verwandtschaft zu BHP1 und BHP2 aus *G. cydonium* bereits dokumentiert wurde (s. 5.2). Die Transkription dieser Vertebratenproteine wird erst beim Eintreffen ausgewählter Stimuli, darunter auch Hitze und Toxine, aktiviert (BOISE *et al.*, 1995; POLLA *et al.*, 1996; VON-FREEDEN-JEFFRY *et al.*, 1997; GROSS *et al.*, 1999; SUSCHEK *et al.*, 1999). Zur Klärung der Frage, ob sich dieses Phänomen auch für die Bcl-2 Homologen aus dem Schwamm bewahrheitet, wurde die Transkription und Translation des *GCBHP2* (dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine höhere Homologie zu anderen Bcl-2 Familienmitgliedern aufweist als jene des *GCBHP1* (s. 4.1.4)) unter Streßbedingungen überprüft (s. 4.3). Hierfür wurden als Modell-Stressoren ein physikalischer (Hitze) und ein chemischer Faktor (Tributylzinn) gewählt. Damit wurde dem klassischen Stressor Hitze ein Streßfaktor gegenübergestellt, dessen cytotoxische und apoptoseauslösenden Eigenschaften im Rahmen der Verschmutzung der Weltmeere bereits vielfach dokumentiert wurden (RAFFRAY und COHEN 1993; NICOTERA und ROSSI, 1994; VIVIANI *et al.*, 1995).

Für diese Untersuchungen wurden Schwämme den Stressoren über einen definierten Zeitraum ausgesetzt und in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen. Mit den eingesetzten Bedingungen wurde auf TBT-Konzentrationen (1 μ M) und -Inkubationszeiten (\leq 8 h) Bezug genommen, welche sich bereits in *in vitro*-Experimenten an Vertebratenzellen als apoptoseinduzierend erwiesen hatten (MATSUOKA und IGISU, 1996; ZAUCKE *et al.*, 1998; STRIDH *et al.*, 1999). Gleichmaßen apoptoseauslösend hatte sich eine Erhöhung der Umgebungstemperatur um 8 - 10°C bei einer Inkubationszeit von \leq 5 h in verschiedenen Modell-Systemen bestätigt (TAKASU *et al.*, 1998; GORMAN *et al.*, 1999; KATSCHINSKI *et al.*, 2000). Aus dem Schwammgewebe wurde im Anschluß an die Streßeinwirkung RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Mit Hilfe markierter Sonden wurden dann die jeweils gesuchten Transkripte identifiziert und quantitativ miteinander verglichen. Zusätzlich zur Transkription des *GCBHP2* sollte hierfür jene des Streßmarkers *GCHSP70* (des HSP70-Homologs der Schwämme) überprüft werden. Die Induktion der *GCHSP70*-Expression unter den gewählten Bedingungen ermöglichte nicht nur eine Kontrolle der Streßreaktion, sondern stellte auch eine Referenz dar, mit welcher die streßinduzierte Expression anderer Gene verglichen werden konnte. Weiterhin wurde die Transkription des *GCSEPI* verfolgt, einem Homolog des Vitalitätsmarkers Septin.

Tatsächlich induzierten TBT und Hitze in *G. cydonium* die Expression von *GCBHP2* und *GCHSP70*. Waren die Transkripte beider Gene zum Zeitpunkt Null noch nicht detektierbar, so führten mehrstündige Inkubationen zu einem erheblichen Anstieg der Transkription in beiden Fällen. Bemerkenswert ist hierbei die rasche Steigerung der *GCBHP2*-Transkription innerhalb von nur einer Stunde Hitzeschock auf 70 % des Maximums. Unter dem Einfluß von TBT wurde dieser Wert dagegen erst zwischen 6h und 8h Inkubation erzielt. Verantwortlich für diesen Unterschied in der Reaktionskinetik ist möglicherweise die Natur des Stressors Hitze, welche ein schnelleres Erreichen des Wirkungsortes und damit eine im Vergleich zum Stressor TBT schnellere *GCBHP2*-Induktion bewirkte. Gegen diese Theorie sprechen allerdings die Ergebnisse der streßinduzierten *GCHSP70*-Transkription: Hitze verursachte hier nur einen unwesentlich schnelleren Anstieg als TBT. In beiden Fällen erreichte die *GCHSP70*-Expression nach 3- 4 h 70 % ihres Maximums. Sie erfolgt damit bedeutend langsamer als die durch Hitze und schneller als die durch TBT induzierte *GCBHP2*-Expression. Daher scheint die Induktion des *GCHSP70*, unabhängig von der Wahl des Stressors, in einer allgemeinen Streßreaktion zu erfolgen. Die Differenzen in der Reaktionskinetik der *GCBHP2*-Expression verdeutlichen dagegen eine stimulusabhängige Beteiligung verschiedener Mechanismen (s. u.). Diese unterscheiden sich offenbar zumindest teilweise von jenen, die an der *GCHSP70*-Streßreaktion partizipieren.

Im Gegensatz zu *GCBHP2* und *GCHSP70* führten beide Stressoren zu keinen nennenswerten Veränderungen der *GCSEPI*-Expression. Die anhaltende, unveränderte Synthese dieses potentiell an Proliferation und Cytokinese beteiligten Septin-Homologs der Schwämme etablierte damit die selektive Expression des *GCBHP2* unter dem Einfluß von Streß. Zudem bestätigte die konstante *GCSEPI*-Expression die Wahl der Streßbedingungen als nichtletal und nichttoxisch, wodurch ein Auftreten von Nekrose ausgeschlossen werden konnte.

Im Anschluß an den Nachweis der streßinduzierten Transkription des *GCBHP2* wurde eine Korrelation der Ergebnisse auf Proteinebene überprüft (s. 4.4). Diese Untersuchungen wurden erst durch die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers ermöglicht, welcher gegen rekombinantes BHP2 gerichtet war. Nach der Verifikation der Antikörperspezifität wurde Schwammgewebe den bereits beschriebenen TBT- und Hitzestreßbedingungen ausgesetzt. Im Anschluß an eine *Recovery*-Zeit, welche die Synthese und Akkumulation des zu untersuchenden Proteins gewährleistete, wurden aus den Geweben Proteinextrakte hergestellt. Die Proteine wurden daraufhin einer SDS-PAGE unterzogen und auf Membranen transferiert. Unter Verwendung des BHP2-AK gelang schließlich der Nachweis des Bcl-2 Homologs aus dem Schwamm. Das mittels immunologischer Methoden erzielte Resultat reflektierte hierbei die durch Northern Blot Analysen erhaltenen Ergebnisse und bestätigte damit die Streßinduzierbarkeit des *GCBHP2*: Sowohl durch TBT-Einwirkung als auch durch Hitze konnte eine eindeutige Steigerung der BHP2-Translation verzeichnet werden. Analog der Transkriptions-Untersuchungen schnellte die anfangs zögerlich verlaufende, TBT-induzierte Steigerung erst nach 3 h Inkubation von 26 % auf 61 %. Im Gegensatz dazu wurde bereits nach 1 h Hitzestreß eine 78 %ige Zunahme erreicht. Auch hier verdeutlichen die Differenzen in der Reaktionskinetik eine mögliche Involvierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege, welche durch beide Stressoren induziert werden. Allerdings offenbarte sich auch ein Unterschied zu den Northern Blot Studien: Obwohl im Schwammgewebe der Kontrolle keine *GCBHP2*-Transkripte nachweisbar waren, konnte das Translationsprodukt BHP2 detektiert werden. Dies beruht vermutlich auf der differierenden Sensitivität beider Nachweismethoden. Wahrscheinlich erlaubt ein Basallevel des Proteins im nichtinduzierten Zustand eine erste direkte Reaktion auf apoptotische Stimuli, bevor die relativ zeitaufwendigen Schritte der BHP2-Transkription und -Translation durchlaufen werden. Für diese Theorie spricht auch der relativ niedrige Instabilitätsindex des BHP2, der auf ein stabiles Protein hinweist. Andererseits liefert das Auftreten von Variationen eines Motivs im 3'-untranslatierten Bereich (ATTTA) eine Erklärung für den mangelnden Nachweis der *GCBHP2*-mRNA in der Kontrolle, da dieses Motiv allgemein als Indikator für eine kurze mRNA-Halbwertszeit angesehen wird (BOERBOOM und SIROIS, 1998; s. 4.1).

Parallel zu dem eingangs beschriebenen Versuch der Apoptose-Induktion wurden in einem weiteren Ansatz die Streßbedingungen intensiviert (s. 4.3): Infolge einer Erhöhung der TBT-Konzentration (> 10 µM) bzw. einer Verlängerung der Inkubationsdauer (> 12 h) präsentierten sich hierbei dem Beobachter deutliche morphologische Veränderungen in Form einer schwarzen Färbung des gesamten Schwammgewebes. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur (> 30°C) bzw. eine Verlängerung der Hitzeschockdauer (> 8 h). Unter den Bedingungen der Apoptose-Induktion wurde dagegen nach 8 h TBT-Inkubation (1 µM) bzw. 5 h Hitzeschock (26°C) lediglich eine leichte Schrumpfung des Gewebes beobachtet, jedoch nicht diese Farbveränderung, die allgemein mit nekrotischen Prozessen assoziiert wird (MÜLLER *et al.*, 1981; BENOIT und GROBOST, 1999). Auch nach Aufhebung dieser extremen Streßbedingungen erholten sich die Schwämme nicht wieder und starben. Gleichfalls konnten o. g. Transkripte in der RNA-

Präparation dieser Exemplare nicht detektiert werden. Ein derartiger Zusammenbruch des Zellmetabolismus', inkl. der Transkription, ist ebenfalls ein charakteristisches Phänomen der Nekrose (JÄCKEL, 1998).

Nekrose ist ein unkontrolliert verlaufender, degenerativer Vorgang, der infolge massiver Einwirkung eines Stressors und der damit implizierten physischen Schäden auftritt. Die der Zelle beigebrachten Verletzungen sind hierbei so groß, daß Initiierung und Ausführung des Apoptose-Programms nicht in Frage kommen (MCCONKEY, 1998). Der Prozeß der Nekrose ist u. a. durch ein Aufbrechen der Cytoplasma-Membran gekennzeichnet. Zudem schwillt der Nukleus an, dessen Membran im weiteren Verlauf ebenfalls aufreißt und damit die ideale Voraussetzung für einen willkürlichen Abbau der genomischen DNA schafft (VERMES und HAANAN, 1994). Dieser passive Zelltod betrifft meist einen Zellverband und bedroht den gesamten Organismus (WYLLIE *et al.*, 1980).

ZAUCKE *et al.* (1998) und STRIDH *et al.* (1999) führten *in vitro* innerhalb von Minuten durch hohe TBT-Konzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$) den Tod von Säugetierzellen herbei und dokumentierten dabei die für Nekrose charakteristischen Merkmale. Niedrigere Konzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) verursachten dagegen die für apoptotische Zellen typischen morphologischen Veränderungen. Diese Experimente verdeutlichten, daß TBT in einer konzentrationsabhängigen Weise unterschiedliche Wege des Zelltods induzieren kann. Hierdurch wurde eine bereits früher angestellte Vermutung bestätigt, nach welcher die Intensität der durch Xenobiotika und andere Faktoren ausgelösten Schäden über die Form des Zelltods entscheidet (LENNON *et al.*, 1991; HARMS-RINGDAHL *et al.*, 1996). Zu einem vergleichbaren Resultat führten auch Beobachtungen von SAMALI *et al.* (1999), nach welchen bereits eine Erhöhung der normalen Wachstumstemperatur um 9°C Nekrose induziert. Daher scheint anhand der aufgeführten Ergebnisse auch bei Schwämmen die Induktion von Apoptose oder Nekrose in Abhängigkeit von der Expositionsdauer und/oder Konzentration bzw. Intensität des Stressors zu stehen.

5.5 Funktionale Analysen des BHP2

5.5.1 BHP2-Expression in einem heterologen System

Die Sequenzanalysen und -vergleiche, die Induzierbarkeit der *GCBHP2*-Expression durch Streß und weitere Überlegungen haben bereits die Existenz apoptotischer Prozesse in Schwämmen und die Teilnahme des Bcl-2 Homologs *GCBHP2* an derartigen Vorgängen vorhersehen lassen (s. 5.1 bis 5.4). Endgültigen Aufschluß konnten allerdings erst Funktionsanalysen des BHP2 erbringen. Da bis heute keine Zelllinie aus den Porifera zur Verfügung steht, wurden Säugetierzellen mit einem *GCBHP2*-Expressionskonstrukt transfiziert. Mit der Möglichkeit der stabilen Transfektion erlaubte dieses heterologe System eine Reproduzierbarkeit der Analysen unter standardisierten Bedingungen sowie eine quantitative Analyse der Ergebnisse, die bei Verwendung von Schwammindividuen bzw. primären Zelllinien schwer zu erreichen sind. Auch bezüglich der im Anschluß beschriebenen immunocytochemischen Untersuchungen der subzellulären Lokalisation des BHP2 erwiesen sich die Säugetierzellen als vorteilhafter, da derartige Analysen durch die geringe Größe der Schwammzellen limitiert sind. Ein weiterer Vorzug des heterologen Systems lag in der *de novo*-Synthese des zu exprimierenden Proteins. Bei einer Überexpression in einem homologen System sind dagegen Störungen durch endogenes Protein nicht auszuschließen. Zudem konnte der potentielle Funktionsnachweis des BHP2 in Säugetierzellen ein zusätzliches Argument für die evolutionsbiologische Konservierung der grundlegenden Apoptose-Maschinerie - von den Porifera zu den Säugetieren - liefern.

Humane und murine Zellen (*HEK-293*, *NIH/3T3*) wurden mit einem Expressionskonstrukt transfiziert, welches neben der cDNA des *GCBHP2* eine Resistenz gegen ein selektierendes Agens enthielt (s. 4.5.1). Im Anschluß an die Selektion wurden überlebende, stabil transfizierte Zellen auf die Expression des BHP2 untersucht. Hierfür wurde die Transkription des *GCBHP2* mittels RT-PCR und Gelelektrophorese überprüft. Tatsächlich konnte in den stabil *GCBHP2*-transfizierten Zellen mit spezifischen Primern eine Bande der erwarteten Größe nachgewiesen werden. In *mock*-transfizierten Zellen, die lediglich den "leeren" Vektor ohne das *GCBHP2*-Insert enthielten, wurde diese Bande dagegen nicht detektiert (s. 4.5.2). Folgende Western Blot- und immunocytochemische Analysen lieferten Aufschluß über die Translation des *GCBHP2*: Unter Verwendung des gegen rekombinantes BHP2 gerichteten polyklonalen Antikörpers konnte mittels immunologischer Methoden die Expression des BHP2 in *GCBHP2*-transfizierten Zellen erfolgreich dokumentiert werden. Wieder erwiesen sich *mock*-transfizierte Zellen diesbezüglich als negativ (s. 4.5.3).

Auch morphologisch unterschieden sich *GCBHP2*-transfizierte von *mock*-transfizierten Zellen. Dies äußerte sich in der Bildung fociartiger Strukturen (s. 4.5.1), die einen zusätzlichen Fingerzeig auf die antiapoptotische Funktion des BHP2 lieferten: BURSCH *et al.* (1991) berichteten bereits von einer derartigen Veränderung des Wachstumsmusters von Zellen. Diese Veränderung kann auf dem Einfluß antiapoptotisch wirksamer Proteine beruhen, welche die in jeder Zellpopulation spontan auftretende Apoptose hemmen und damit die Foci-Bildung unterstützen. Scheinbar übt BHP2 einen

ähnlichen antiapoptotischen Effekt aus, da *mock*-transfizierte Zellen keine Wandlung des Wachstumsmusters erkennen ließen und homogen auf der Unterlage wuchsen (s. Abb. 4.10).

Abgesehen von diesem morphologischen Phänomen deutete, unter der Voraussetzung der Funktionalität des BHP2 in den Säugetierzellen, alleine schon das Überleben der transfizierten Zellen auf den antiapoptotischen Charakter des Schwammproteins hin, da überexprimierte proapoptotische Bcl-2 Proteine den Tod transfizierter Zellen herbeiführen (CHITTENDEN *et al.*, 1995b; INOHARA *et al.*, 1997; KONOPLEVA *et al.*, 1999).

Auch immunocytochemische Analysen der subzellulären Lokalisation des BHP2 verwiesen auf dessen Zugehörigkeit zur antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie. Die Kolokalisation des BHP2 mit einem mitochondrialen Markerprotein offenbarte die für die Mitglieder dieser Subfamilie charakteristische Assoziation mit den Mitochondrien (s. 4.7). Wie auch bei diesen Bcl-2 Proteinen (KRAJEWSKI *et al.*, 1993) ist der C-terminale Bereich des BHP2 vermutlich für eine Verankerung in der äußeren Mitochondrien-Membran verantwortlich. Dadurch wird die Orientierung des restlichen Proteins festgelegt, das somit zum größten Teil ins Cytoplasma reicht (s. 4.1.3). Die Identifizierung der mitochondrialen Lokalisation des BHP2 ließ gleichermaßen einen kausalen Zusammenhang bezüglich der Ausübung seiner spezifischen antiapoptotischen Funktion vermuten (s. u.).

5.5.2 Antiapoptotische Effekte der BHP2-Expression

Untersuchungen neuer potentieller Mitglieder der Bcl-2 Familie beginnen häufig mit der Überprüfung ihrer Funktion mittels eines entsprechenden Assays. Hierfür wird meistens die Vitalität stabil transfizierter, überexprimierender Zellen unter dem Einfluß ausgewählter, apoptoseauslösender Stressoren bestimmt. Das Prinzip dieser Assays basiert oftmals auf dem Ausschluß eines Farbstoffs aus lebenden Zellen, die sich mikroskopisch von toten, gefärbten Zellen unterscheiden lassen (BOISE *et al.*, 1993; SONG *et al.*, 1999). In diesem Hinblick wurde in *GCBHP2*- und *mock*-transfizierten Zellen durch Serumentzug (0 % FCS) bzw. durch Zugabe von TBT (0,25 µM) für bis zu 92 h Apoptose induziert (BATEL *et al.*, 1993; ZOU *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 2000). Eine konstante Überprüfung der BHP2-Expression garantierte die gleichmäßige Synthese des Proteins während der gesamten Versuchsdauer (s. 4.6.1). Die in diesem Zeitraum vorgenommene mikroskopische Betrachtung beider Ansätze offenbarte einen, im Vergleich zu den BHP2-exprimierenden Zellen, hohen Anteil *mock*-transfizierter Zellen mit apoptotischer Morphologie (i. e. Abrundung der Zellen, Bildung apoptotischer Vesikel etc.). Für eine quantitative Analyse wurde die jeweilige Zahl überlebender Zellen ermittelt und in Relation zu jener der unbehandelten Kontrollen gebracht. Dabei erwiesen sich BHP2-exprimierende Zellen zu jedem Zeitpunkt resistenter gegenüber Streß als *mock*-transfizierte Zellen. Diese Resistenz äußerte sich in Überlebensraten, welche bis zu sechs- (0 % FCS) bzw. vier-zehnmals (TBT) über jenen der *mock*-transfizierten Kontrollen lagen (s. 4.6.2). Mit dieser, die Überlebensrate transfizierter Zellen steigernden Wirkung des BHP2 wurde ein neuer Hinweis auf die antiapoptotische Funktion des Schwammproteins geliefert. Diese Wirkung spiegelte

zugleich die Ergebnisse wider, die in einem vergleichbaren System durch eine Überexpression des Bcl-2 der Vertebraten erzielt wurden (GRIMM *et al.*, 1996; TURNER *et al.*, 2000).

In einem weiteren Funktionsassay sollte schließlich der Einfluß des BHP2 auf einen charakteristischen Apoptosemarker überprüft werden. Der Fokus derartiger Untersuchungen richtete sich in den vergangenen Jahren häufig auf die apoptosebegleitende, von einer Endonuklease katalysierte DNA-Fragmentierung. Neuere Analysen konnten jedoch einen Abbau genomischer DNA auch im Verlauf der Nekrose und als Artefakt der DNA-Isolierung in vitalen Zellen nachweisen (COLLINS *et al.*, 1992; ENRIGHT *et al.*, 1994). Zudem existieren auch Berichte, wonach Apoptose nicht immer von einem *laddering* begleitet wird (BAUMGARTER-PARZER, 1996). Die DNA-Leiterentstehung stellt außerdem ein relativ schwer quantifizierbares und spätes Ereignis im Prozeß des Zelltods dar, das keiner direkten Regulation durch Bcl-2 Proteine unterliegt. Im Gegensatz dazu steht die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Aktivierung der Caspasen: Wie bereits erwähnt, manifestiert sich die Exekution einer apoptotischen Zelle hauptsächlich mittels Aktivierung von Caspasen und Störung der Organell-Homöostase (s. 1.6.6). Beide Wege sind jedoch nicht getrennt zu betrachten, da einerseits durch Proteolyse der Caspase-Substrate die Funktion von Organellen beeinträchtigt wird (ORTH *et al.*, 1996; MARZO *et al.*, 1998) und andererseits durch Permeabilisierung der Organell-Membranen Aktivatoren der Caspasen ins Cytoplasma entlassen werden (LI *et al.*, 1997; PAN *et al.*, 1998). Aktivierte Initiator-Caspasen führen anschließend in einer kaskadearartigen Reaktion zur Prozessierung weiterer Proteasen, den Effektor-Caspasen. Die durch die Caspasen katalysierte Proteolyse einer Vielfalt von zellulären Proteinen leitet schließlich irreversibel den Tod der betroffenen Zelle ein (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998). Unter den Effektor-Caspasen nimmt die Caspase-3 eine zentrale Stellung ein, da sie an der Aktivierung weiterer Caspasen beteiligt ist und im Gegenzug durch viele andere Caspasen prozessiert wird (ENARI *et al.*, 1996; FALEIRO *et al.*, 1997). Dies verdeutlicht, daß sich Messungen der Caspase-Aktivität, insbesondere jene der Caspase-3, unter den gewählten Bedingungen hervorragend eignen, um den apoptotischen Status einer Zellpopulation quantitativ zu ermitteln (ZAZUETA *et al.*, 1994; STRIDH *et al.*, 1998). Hierfür wird ein modifiziertes Substrat verwendet, welches nach seiner Proteolyse ein Fluorochrom proportional der Konzentration aktivierter Caspase-3 in Zellysaten freisetzt (s. 4.6.3). Für diese Untersuchungen wurde wieder in *GCBHP2*- und *mock*-transfizierten Zellen Apoptose mittels der bereits im Vitalitätstest erprobten Bedingungen (TBT-Inkubation und Serumentzug, s. 4.6.2) induziert. Anschließende Messungen offenbarten eine Caspase-Aktivierung in beiden Ansätzen, die ihr Maximum nach etwa 68 h erreichte und danach langsam wieder abklang (-92 h). Diese Senkung der Enzymaktivität ist charakteristisch für einen Übergang in die terminale Phase der Apoptose (MARIN *et al.*, 2000). Zu allen Zeitpunkten riefen jedoch TBT-Inkubation bzw. Serumentzug in *mock*-transfizierten Zellen eine ca. zweimal höhere Aktivität der Caspase-3 als in *GCBHP2*-transfizierten Zellen hervor. Somit läßt sich die in den Vitalitätsassays beobachtete Resistenz *GCBHP2*-transfizierter Zellen gegenüber Streß direkt mit einer reduzierten Caspase-3-Aktivierung korrelieren. Diese Reduktion der Aktivität mag jedoch nicht alleine für die erstaunlich hohe Vitalität der transfizierten Zellen verantwortlich sein. Da keine

direkte Interaktion zwischen Caspasen und Bcl-2 Homologen existiert, andererseits aber Bcl-2 Proteine eine Aktivierung der Caspase-3 als Antwort auf eine Vielfalt apoptotischer Stimuli unterbinden (MONNEY *et al.*, 1996; ARMSTRONG *et al.*, 1996; IBRADO *et al.*, 1996), ist vielmehr ein Einfluß des BHP2 *upstream* der Aktivierung dieser Protease wahrscheinlich. Da bereits in den vorherigen Kapiteln ein Zusammenhang mit den Mitochondrien hergestellt wurde, ist das Wirkungsfeld des BHP2 in Reichweite dieser Organellen zu suchen. Durch seine Integration in die mitochondriale Membran reguliert BHP2 eventuell den Efflux von Molekülen im Verlauf der Apoptose, wodurch Funktionsstörungen der Mitochondrien und ein Ausstrom von Caspase-Aktivatoren gedrosselt/unterbunden werden (s. u.). Da die Initiator-Caspase-9 das Ziel dieser Aktivatoren darstellt, vermindert BHP2 wahrscheinlich die durch diese Caspase initiierte Aktivierung der Caspase-Kaskade. Dies hat natürlich nicht nur Auswirkungen auf den Aktivitätszustand der Caspase-3, sondern auch auf jenen der anderen Effektor-Caspasen. Von TURNER *et al.* (2000) geführte Untersuchungen an den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten *HEK-293* Zellen bestätigen eine derartige, durch Serumentzug hervorgerufene Mobilisierung diverser Caspasen, welche durch die Überexpression des Bcl-2 in vergleichbarer Weise gehemmt wurde.

5.6 Modelle der Apoptose-Regulation durch BHP2, einem Mitglied der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie

Mit der Entdeckung des CED-3, CED-4 und CED-9 gelang der Nachweis der Kernelemente der Apoptose im Nematoden *C. elegans*. Mittels Sequenzanalysen und Funktionsstudien erwiesen sich CED-9 und CED-3 als Mitglieder der Bcl-2- respektive der Caspase-Familie und CED-4 als Homolog des Apaf-1 der Vertebraten (HENGARTNER *et al.*, 1992; YUAN *et al.*, 1993; CHINNAIYAN *et al.*, 1997; BRUCKHEIMER *et al.*, 1998). Durch VAUX *et al.* (1992b) und WU *et al.* (1997) durchgeführte Transfektionsstudien demonstrierten das Potential des humanen Bcl-2 und des CED-9 aus dem Nematoden, sich gegenseitig funktional zu substituieren. Diese und andere Ergebnisse verdeutlichten die hohe funktionale und strukturelle Konservierung apoptotischer Mechanismen während der Evolution (NGUYEN *et al.*, 1993; HENGARTNER und HORVITZ, 1994b; VAUX und STRASSER, 1996; LINCZ, 1998). Da die bisherigen Untersuchungen der Apoptose primitiver Metazoen sich fast ausschließlich auf Nematoden beschränkten, konnten gesicherte Belege für eine Konservierung dieser Mechanismen lediglich zwischen Nematode und Mensch erbracht werden (STELLER, 1995; BERGMANN *et al.*, 1998). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erläuterten Analysen und Funktionsstudien des BHP2 der Porifera geben daher zum ersten Mal eindeutige Hinweise auf eine Konservierung der Apoptose in allen multizellulären Metazoen. Gleichzeitig gewähren sie einen ersten Einblick in die Regulation des Zelltods der primitivsten Metazoen. Ihre Kombination mit bisherigen Erkenntnissen über die Wirkungsweise der antiapoptotischen Bcl-2 Subfamilie anderer Spezies gestatten die im folgenden erörterten Modelle bezüglich der Funktion des BHP2.

5.6.1 Potentielle Wirkungsmechanismen des BHP2

TBT, Hitzeschock und Entzug von Wachstumsfaktoren stellen nur eine kleine, jedoch repräsentative Auswahl apoptotischer Stimuli dar (THOMPSON, 1995; STRIDH *et al.*, 1999). So vielfältig diese Stimuli sind, so vielfältig präsentieren sich auch die von ihnen induzierten, bisher kaum untersuchten Signaltransduktionswege. Diese Wege münden letztendlich in einen gemeinsamen, von der Bcl-2 Familie regulierten Exekutionsmechanismus, der hauptsächlich aus der Aktivierung der Caspase-Kaskade und der mitochondrialen Dysfunktion besteht (GREEN und REED, 1998). An der Dysfunktion der Organellen sind insbesondere mitochondriale Poren - die PT-Poren - beteiligt, deren Öffnung auf bisher unbekannt Weise durch TBT (STRIDH *et al.*, 1998), Hitzeschock (ANDREEVA *et al.*, 1999) und Serumentzug (HIGUCHI *et al.*, 1998) induziert wird. Aber auch die Beteiligung proapoptotischer Bcl-2 Proteine an der Bildung mitochondrialer Poren ist nicht auszuschließen (SUSIN *et al.*, 1997). Diese Vorgänge führen schließlich zum Zusammenbruch des Membranpotentials $\Delta\psi_M$ und kulminieren in der Freisetzung von Cytochrom c und anderen Molekülen aus dem Intermembranraum. Diese in das Cytoplasma entlassenen Faktoren sind ihrerseits an der Aktivierung von Caspasen beteiligt, den wichtigsten Effektoren der Apoptose (LIU *et al.*, 1996; KROEMER *et al.*, 1997). Hierbei bewirkt Cytochrom c im Cytosol und in Anwesenheit von ATP zuerst eine Aktivierung des oligomerisierten Adapterproteins Apaf-1 (MCCONKEY, 1998; SRINIVASULA *et al.*, 1998). Da Apaf-1 zugleich eine Bindungsstelle für die Procaspase-9 besitzt, bringt dieser Vorgang mehrere Procaspase-Moleküle in räumliche Nachbarschaft. Die Proenzyme besitzen eine niedrige, jedoch signifikante Protease-Aktivität (BERGMANN *et al.*, 1998). Daher leitet die Annäherung der Procaspase-Moleküle ihre autokatalytische Prozessierung und die Aktivierung der Caspase-Kaskade ein (MUZIO *et al.*, 1998). Somit unterstützt der durch Caspasen katalysierte Abbau zellulärer Proteine den durch Organellen-Schäden eingeleiteten Vorgang des Zelltods.

Mitochondriale Deregulation und Porenöffnung rufen allerdings noch einen weiteren bedeutsamen Effekt hervor, nämlich die Entstehung bestimmter Sauerstoffspezies. Diese unter dem Begriff ROS (*Reactive Oxygen Species*) zusammengefaßten Sauerstoffspezies (Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid, Produkte der Lipidperoxidation usw.) sind an umfassenden Schäden von Proteinen, DNA und Lipiden beteiligt (GRACY *et al.*, 1999). Ihre Entstehung stellt einen wichtigen Knotenpunkt dar, an welchem viele Signaltransduktionswege zusammenlaufen (KININGHAM *et al.*, 1999). So wurde als Folge der Hitzeeinwirkung die Erzeugung von ROS bereits in unterschiedlichen Zelllinien registriert (FLANAGAN *et al.*, 1998; FRANK *et al.*, 1998; MATSUMOTO *et al.*, 1999). In gleicher Weise führten auch TBT-Inkubationen, Serumentzug und viele andere Streßfaktoren zu erhöhten intrazellulären Levels dieser Sauerstoffradikalen (CORSINI *et al.*, 1997; HIGUCHI *et al.*, 1998; STRIDH *et al.*, 1999). Für die Genese der ROS stellen Mitochondrien eine Hauptquelle dar, u. a. durch Entkopplung der Elektronentransportkette im Verlauf der Apoptose (KININGHAM *et al.*, 1999). Daher können sie als wichtiges Bindeglied zwischen Mitochondrien und Zelltod angesehen werden. Da ROS aufgrund der Schädigung mitochondrialer Enzyme an der Organell-Dysfunktion beteiligt sind und eine zusätzliche PT-Porenöffnung induzieren, wird ihnen eine

Verstärker/Modulator-Funktion beigemessen (CHAS *et al.*, 1997). Entstehung und Wirkungsfeld der ROS ist jedoch nicht nur auf Mitochondrien beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf Cytoplasma (ER) und Nukleus (MIGNOTTE und VAYSSIERE, 1998). Bei der Schädigung der DNA im Zellkern, z. B. durch DNA-Strangbrüche, handelt es sich um einen besonders fatalen Effekt (CADENAS, 1998; CHANDRA *et al.*, 2000). Aus diesem Grunde wird in einem alternativen Modell dem durch ROS generierten oxidativen Streß eine mutmaßliche Beteiligung an der Induktion des apoptotischen Zelltods zugeschrieben (KATSCHINSKI *et al.*, 2000).

Neben den durch TBT, Hitze und Serumentzug eingeleiteten proapoptotischen Maßnahmen sind viele Stressoren gleichfalls an der Induktion antiapoptotischer Mechanismen beteiligt. Diese werden durch die Synthese von spezifischen Bcl-2 Homologen und Streßproteinen, z. B. BHP2 und HSP70 (s. 4.3 und 4.4), in Gang gesetzt (BOISE *et al.*, 1995; VON-FREEDEN-JEFFRY *et al.*, 1997; ZONG *et al.*, 1999). Wie die meisten der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine ist auch BHP2 mit den Mitochondrien assoziiert (s. 4.7). Es verfügt über eine carboxyterminale hydrophobe Region (s. 4.1), welcher generell eine Funktion bezüglich des Transports und der Verankerung der Bcl-2 Proteine in Organell-Membranen zugesprochen wird (TSUJIMOTO und CROCE, 1986; HOCKENBERY *et al.*, 1990; NGUYEN *et al.*, 1993). In diesem Bereich trunkeerte Bcl-2 Proteine sind in ihrer Funktion stark eingeschränkt (NGUYEN *et al.*, 1994). Mannigfaltige Überexpressionsexperimente, in denen das empfindliche intrazelluläre Gleichgewicht von pro- zu antiapoptotischen Proteinen auf die Seite letzterer verschoben wurde, bestätigen die Schutzfunktion antiapoptotischer Bcl-2 Proteine vor den meisten apoptoseauslösenden Stimuli (VAUX *et al.*, 1988; MIURA *et al.*, 1993; ZAMZAMI *et al.*, 1996; LINCZ, 1998; GROSS *et al.*, 1999 usw.). Auch die Expression des BHP2 scheint das Gleichgewicht in entsprechender Weise zu beeinflussen, wodurch sich die erhöhte Vitalität transfizierter Zellen erklären läßt (s. 4.6.2). Entsprechend ihrer Lokalisation in den Organellen-Membranen involviert dieser Schutz sicherlich eine Regulation des transmembranen Transports (BRUCKHEIMER *et al.*, 1998), läßt sich darauf jedoch nicht beschränken (CHINNAIYAN *et al.*, 1997). So sind Bcl-2 Proteine neben der Regulation mitochondrialer Vorgänge auch an jener postmitochondrialer Prozesse im Verlauf der Apoptose beteiligt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings erst ansatzweise aufgeklärt. Tatsächlich wurde für jede der subzellulären Lokalisationen der Bcl-2 Familienmitglieder ein unterschiedlicher Schutzmechanismus vorgeschlagen (GROSS *et al.*, 1999): Neben einer potentiell antioxidativen Funktion (SAH *et al.*, 1999) wird hauptsächlich eine Regulation der mitochondrialen PT-Porenöffnung bzw. eine Bildung eigenständiger Poren diskutiert (ZAMZAMI *et al.*, 1996; KLUCK *et al.*, 1997). In dieser Hinsicht ist die Existenz bestimmter struktureller Merkmale und Motive von entscheidender Bedeutung. Hierzu werden insbesondere die BH-Domänen BH1 und BH2 sowie sieben α -helikale Bereiche gerechnet. Diese Merkmale, die auch das BHP2 von *G. cydonium* kennzeichnen (s. 4.1.3), unterstützen die Hemmung der während der Apoptose auftretenden abnormalen Ionen-Bewegung durch Mitochondrien-Membranen (PETIT *et al.*, 1996; KROEMER, 1997a; GREEN und REED, 1998). Gleichzeitig sind sie potentiell an dem Rücktransport der ins Cytosol entwichenen proapoptotischen Faktoren beteiligt (MIGNOTTE und VAYSSIERE, 1998). Dadurch wird ein Einstrom von Wasser in

den hyperosmolaren Matrixraum und ein daraus resultierendes, für die Apoptose charakteristisches Anschwellen der Mitochondrien vermieden. Die infolgedessen erzielte Stabilisierung des transmembranen Potentials und des mitochondrialen Volumens gestattet die Wiederaufnahme der Atmungskette, welche eine Steigerung der ATP- und eine Reduktion der ROS-Produktion nach sich zieht (YANG *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Maßnahmen wird letztendlich die Homöostase der Organellen wiederhergestellt (CHINNAIYAN *et al.*, 1997; KLUCK *et al.*, 1997).

Neben diesen direkten, sich auf die Mitochondrien beziehenden Effekten haben Porenbildung und -regulation Einfluß auf weitere zelluläre Reaktionen. So verhindert einerseits die reduzierte Produktion von Sauerstoffradikalen Zellschäden und drosselt in einer Rückkopplungsreaktion die Induktion weiterer antiapoptotischer Proteine. Andererseits bedeutet ein verminderter Cytochrom c-Ausstrom in das Cytoplasma eine geringere Aktivierung des Adapterproteins Apaf-1 (YANG *et al.*, 1997; ALLEN *et al.*, 1998). Daraus resultiert eine Hemmung der Caspase-Kaskade, die in den Funktionsanalysen der vorliegenden Arbeit durch die Hemmung der Caspase-3-Aktivität veranschaulicht wurde (s. **4.6.3**). Da die Enzymaktivität lediglich reduziert, jedoch nicht vollständig eingestellt wurde, ist die Beteiligung zusätzlicher Signaltransduktionsmechanismen denkbar, welche die Caspase-Kaskade auslösen, aber nicht durch BHP2 kontrolliert werden.

Eine verminderte Aktivierung des Apaf-1 wird ebenfalls durch die Bindung antiapoptotischer Bcl-2 Proteine an das Adapterprotein erzielt (WU *et al.*, 1997). Dieser Effekt wird möglicherweise infolge einer Konformationsänderung des Apaf-1 bewerkstelligt (CHINNAIYAN *et al.*, 1997). Da bisher allerdings keine Bindungsstelle identifiziert wurde, bleibt diese Funktion für das BHP2 unbestätigt. Ungewiß bleibt auch die Existenz intrafamiliärer Interaktionen des BHP2. Da derartige Interaktionen in Vertebraten ein wichtiges Mittel zur Regulation der Aktivität von Bcl-2 Proteinen darstellen, die Existenz einer BH3-Domäne aber voraussetzen, erfolgt die Regulation des BHP2 vermutlich auf einem anderen Weg. Dieser könnte posttranslationale Modifikationen einschließen, für die diverse Signalsequenzen im BHP2 detektiert wurden (s. **4.1.3**).

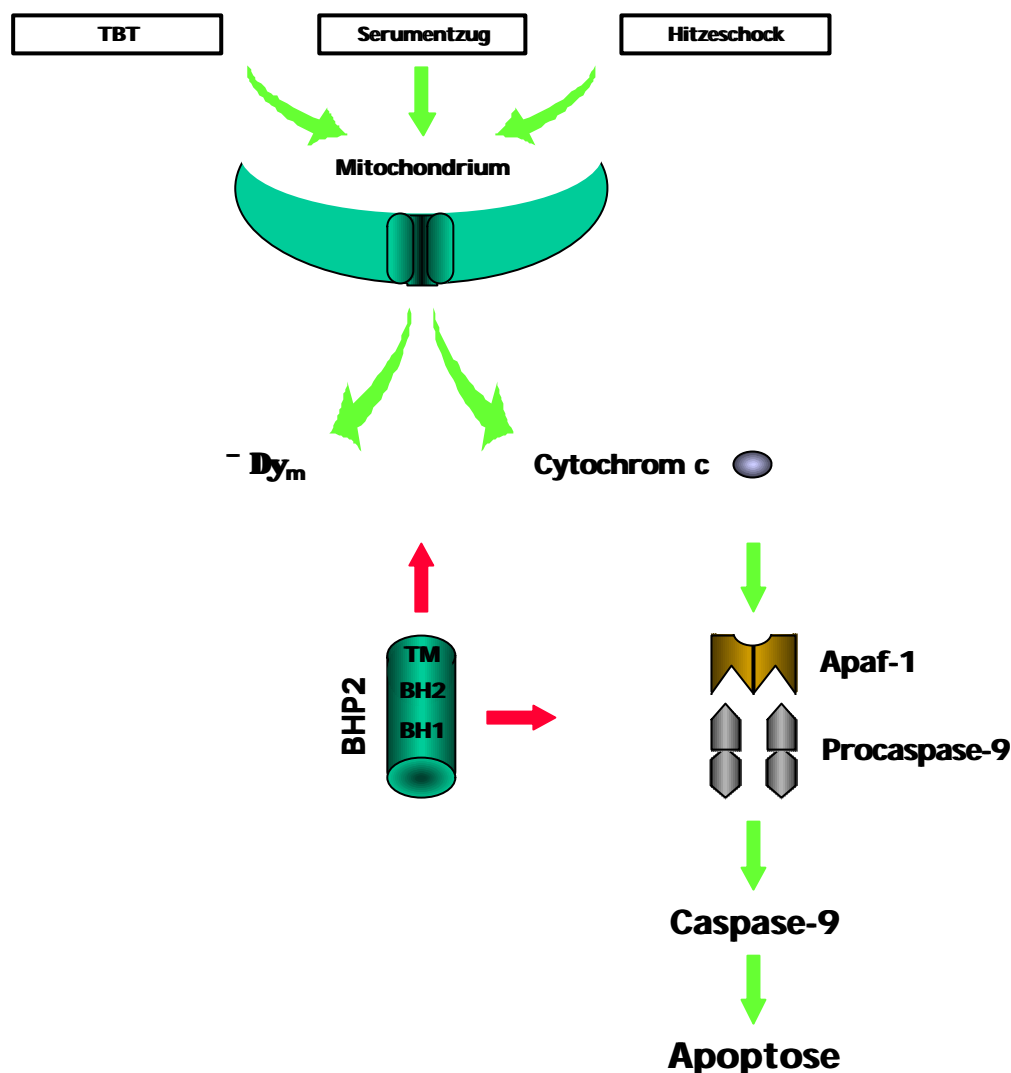


Abb. 5.1: Modell der durch TBT, Serumentzug und Hitzeschock induzierten proapoptischen Vorgänge im Bereich der Mitochondrien (grüne Pfeile) und mögliche Angriffspunkte des antiapoptisch wirksamen BHP2 (rote Pfeile) in *G. cydonium*. Stressoren bewirken eine Öffnung der mitochondrialen PT-Poren bzw. die Porenbildung durch proapoptische Bcl-2 Proteine. Dadurch bricht nicht nur der transmembrane Gradient zusammen ($\Delta\psi_m$), sondern es strömt auch Cytochrom *c* ins Cytosol. Dieses aktiviert das Adapterprotein Apaf-1, welches eine Bindungsstelle für die Procaspase-9 besitzt. Durch Oligomerisierung des Adapters gelangen mehrere Procaspase-Moleküle in enge räumliche Nachbarschaft, so daß die geringe Protease-Aktivität für eine intermolekulare, autokatalytische Aktivierung ausreicht. Dies führt schließlich mittels der Caspase-Kaskade den Zelltod herbei. Indem BHP2 durch Porenbildung oder Regulation bestehender Poren den Efflux von Molekülen aus den Mitochondrien ins Cytosol reguliert, übt es seine antiapoptische Wirkung aus. Dabei wird nicht nur der transmembrane Gradient aufrechterhalten/wiederhergestellt, sondern auch die Aktivierung des Adapters Apaf-1 durch Cytochrom *c* vermieden. Gleichzeitig hält BHP2 durch Bindung des Apaf-1 diesen möglicherweise in seinem inaktiven Zustand. Die antiapoptische Funktion des BHP2 basiert auf strukturellen Merkmalen, welche die Bcl-2 Familie charakterisieren: die BH-Domänen (BH1 und BH2) und der transmembrane Anker (TM).

5.6.2 Analogien der BHP2- und der HSP70-Expression

Ähnlich den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen stehen auch Hitzeschockproteine (darunter das molekulare Chaperon HSP70) mit zellulären Mechanismen in Verbindung, die Schutz vor einer Reihe von Schäden bieten (s. 5.1; HIRVONEN *et al.*, 1996). Damit erschöpfen sich jedoch nicht alle Übereinstimmungen: In mehreren Modellen wurde unter apoptoseauslösenden Bedingungen eine Induktion des HSP70, ähnlich jener der Bcl-2 Proteine, beobachtet (CHANT *et al.*, 1996; HE *et al.*, 1997). Daher erstaunt auch die hitzeinduzierte Expression des *GCHSP70* nicht sonderlich (s. 4.3). Generell reagieren pro- und eukaryotische Organismen bei einer Erhöhung der normalen Wachstumstemperatur um 5 - 10°C mit der Synthese von Hitzeschockproteinen (SCHUMANN, 1997). Auch *G. cydonium* stellt hier keine Ausnahme dar (KOZIOL *et al.*, 1997). Zusätzlich bestätigt die unter TBT-Einwirkung beobachtete *GCHSP70*-Transkription (s. 4.3) das Potential anthropogener Substanzen, in Schwämmen eine Hitzeschockantwort zu induzieren. Eine vergleichbare Reaktion - als Folge der Einwirkung von TBT, oxidativem Streß, Schwermetallen und organischen Chlorverbindungen bzw. nach Wachstumsfaktorentzug - wurde ebenfalls für Rotifera, Muschel- und Vertebratenzellen beschrieben (COCHRANE *et al.*, 1991; GORMAN *et al.*, 1999; RYAN, 1997; SANDERS *et al.*, 1994). Diese verschiedenartigen Stressoren induzieren einerseits den Cytochrom c-Ausstrom aus den Mitochondrien und die Aktivierung der Caspase-Kaskade, beides Vorgänge, welche der Regulation der Bcl-2 Proteine unterliegen (s. 5.6.1) Andererseits beruht die den Streßfaktoren gemeinsame Auslösung der HSP-Streßantwort und der Apoptose-Induktion aber auch auf ihrer proteinschädigenden Wirkung (HIGHTOWER, 1991): Diese wird entweder durch ein direktes Einwirken des Stressors hervorgerufen oder durch ROS-Bildung (cytoplasmatisch oder mitochondrial durch Entkopplung der Atmungskette) ausgelöst bzw. verstärkt (s. 5.6.1). In ihrer Schutzfunktion übernehmen Hitzeschockproteine vielfältige Aufgaben, z. B. Reaktivierung denaturierter Proteine, Sicherung der korrekten Faltung naszierender Proteine und geschützter Transport der Proteine zu ihrem Bestimmungsort. In dieser Funktion schützt HSP70 auch vor der apoptoseauslösenden Wirkung von oxidativem Streß, Strahlung und TNF (JÄÄTTELÄ *et al.*, 1992; MOSSER *et al.*, 1997). Daher wird die Wirkung des Hitzeschockproteins häufig als antiapoptotisch interpretiert und direkt mit jener der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine verglichen (BUZZARD *et al.*, 1998). Zwar wurden die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nur ansatzweise aufgeklärt. Jedoch scheinen Hitzeschockproteine, besonders im Cytoplasma lokalisiertes HSP70, die Aktivierung von Caspasen zu regulieren und zusätzlich Caspase-Substrate vor einem proteolytischen Abbau zu behüten (BUZZARD *et al.*, 1998; JÄÄTTELÄ *et al.*, 1998a). Auch wird eine zusätzliche Beteiligung an den mitochondrialen Ereignissen im Verlauf der Apoptose diskutiert (POLLA *et al.*, 1996). Diese Beobachtungen verdeutlichen die komplexe Vernetzung der Mechanismen, aus welchen sich das zelluläre Abwehrsystem zusammensetzt und lassen Analogien bezüglich der streßinduzierten Transkription des HSP70 und des BHP2 vermuten: Die durch Streßfaktoren (hier TBT, Serumentzug und Hitze) induzierte HSP70-Transkription wird mittels konservierter Transkriptionsfaktoren, den Hitzeschockfaktoren (HSF), reguliert. HSF wurden bisher in vielen

Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten vorgefunden und fungieren als molekulare Verbindung zwischen Streßfaktor und Hitzeschockprotein-Induktion (MORIMOTO *et al.*, 1994a; WU *et al.*, 1994). Da während eines Streßeinflusses die Konzentration denaturierter zellulärer Proteine steigt, führt dies zur Dissoziation eines Komplexes aus HSF und HSP70. HSP70 steht anschließend für die Renaturierung der beschädigten Proteine bereit. HSF binden dagegen in ihrer aktivierten Form im Nukleus an Hitzeschockelemente (HSE), welche im Promotorbereich der Hitzeschockgene auftreten (SORGER, 1991). Diese HSF-HSE Interaktion bedingt schließlich die Transkription der Hitzeschockgene (SCHUMANN, 1997). Für die Aktivierung der verschiedenen HSF sind unterschiedliche Stressoren verantwortlich. So zeichnet sich HSF1 durch seine generelle Reaktion auf Streß (darunter auch ROS) aus (HUNT und MORIMOTO, 1985; KATSCHINSKI *et al.*, 2000). HSF2 wird dagegen entwicklungsabhängig induziert, während HSF3 zwar auch als Reaktion auf Streß aktiviert wird, jedoch im Vergleich zu HSF1 eine verzögerte Kinetik aufweist (SARGE *et al.*, 1994). Ein ähnlicher Mechanismus kann auch bezüglich der *GCBHP2*-Transkription vorgeschlagen werden: Abhängig vom auslösenden Stimulus werden spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert, wahrscheinlich durch Dissoziation von einem unbekanntem Repressorprotein. Die Transkriptionsfaktoren induzieren daraufhin die Expression des *GCBHP2* mit einer in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor stehenden Kinetik. Eine solche transkriptionale Regulation antiapoptotischer Bcl-2 Proteine wurde für Vertebraten mehrfach beschrieben (BOISE *et al.*, 1995; VON-FREEDEN-JEFFRY *et al.*, 1997; SUSCHEK *et al.*, 1999). Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors nF- κ B an der Regulation dieser Prozesse scheint wahrscheinlich: CORSINI *et al.* (1997) und GRIMM *et al.* (1996) berichteten von einer durch TBT- und durch Serumentzug induzierten nF- κ B Aktivierung. Möglicherweise wirken ROS wiederum als Bindeglied zwischen einer Vielfalt an Stimuli und der durch sie induzierten nF- κ B Aktivierung (GRIMM *et al.*, 1996; GRACY *et al.*, 1999). Eine solche Aktivierung induziert oftmals die Expression von Apoptose-Suppressoren (CHINNAIYAN *et al.*, 1996; ALLEN *et al.*, 1998; ASHKENAZI und DIXIT, 1998). Neben der Expression von Caspase-Inhibitoren (sog. *Inhibitors of Apoptosis* [IAPs]; UREN *et al.*, 1998) fördert nF- κ B auch jene antiapoptotischen Bcl-2 Proteine, die in ihrem Promotorbereich einen nF- κ B-Konsensus aufweisen (LEE *et al.*, 1999). Mittels Screening der cDNA-Bibliothek wurden bereits potentielle nF- κ B-Homologe in Schwämmen nachgewiesen (BORGER *et al.*, unveröffentlicht). Deren tatsächliche Beteiligung an den streßinduzierten Vorgängen in *G. cydonium* bleibt vorerst jedoch genauso unbestätigt wie auch die Existenz einer derartigen Konsensussequenz im Promotorbereich des *GCBHP2*. Das in Abb. 5.2 dargestellte Modell demonstriert die Vernetzung der wichtigsten Bestandteile der streßinduzierten Apoptose und der daraufhin eingeleiteten zellulären Verteidigungsmaßnahmen der Porifera, in welchen BHP2 und HSP70 eine zentrale Rolle einnehmen.

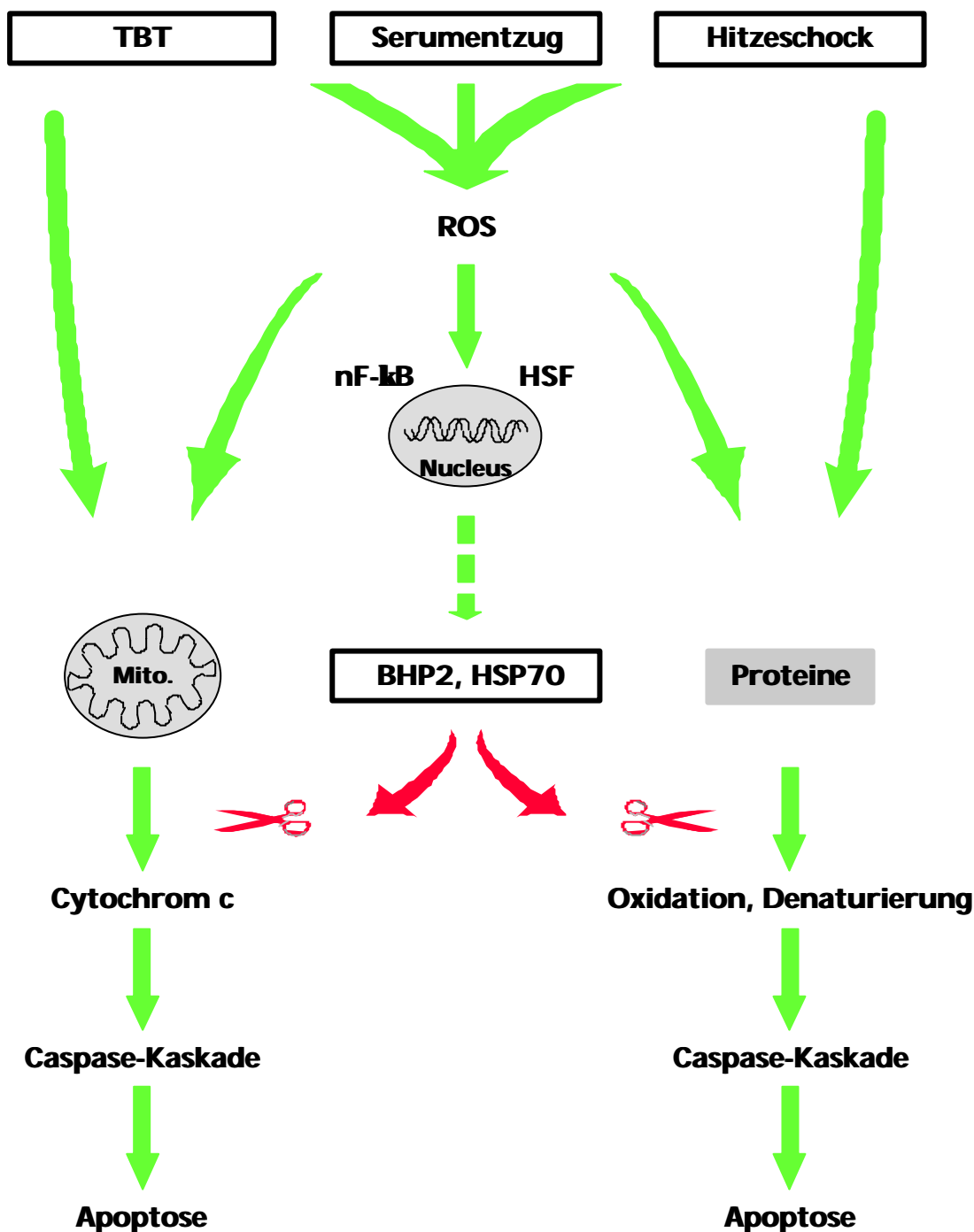


Abb. 5.2: Modell der Vernetzung der durch TBT, Serumentzug und Hitzeschock induzierten pro- und anti-apoptotischen zellulären Vorgänge (grüne und rote Pfeile) von *G. cydonium*, inkl. der Signaltransduktion. Die Stressoren rufen eine verstärkte Bildung von ROS hervor, die cytosolisch bzw. mitochondrial durch Entkopplung der Elektronentransportkette erfolgt. Einerseits führen die Streßfaktoren (inkl. der ROS) durch Porenöffnung zu mitochondrialen Dysfunktionen und zum Ausstrom von Cytochrom c. Andererseits verursachen sie Proteinschäden durch Denaturierung und Oxidation. In allen Fällen wird infolge einer Aktivierung der Caspase-Kaskade Apoptose ausgelöst. Den proapoptotischen Vorgängen wirkt die ROS-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (nF-kB und HSF) entgegen, welche die Synthese von Proteinen mit Schutzfunktion einleitet. In dieser Funktion reguliert BHP2 die mitochondrialen Poren und stellt die Homöostase der Organellen wieder her; HSP70 stabilisiert und reaktiviert beschädigte Proteine.

5.7 Perspektiven für die weitere Erforschung der Apoptose der Porifera

Seit der ersten Identifizierung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie in den Porifera wurde über das Vorkommen der restlichen Elemente der Apoptose-Maschinerie in Schwämmen spekuliert. Die Existenz dieser Bauteile wurde anhand der Funktionsanalysen des BHP2 immer wahrscheinlicher. Tatsächlich gelang inzwischen - in den Rahmen dieser Arbeit überschreitenden Untersuchungen - die Klonierung eines Caspase-3-Homologs aus *G. cydonium*, welches eine hohe Konservierung bezüglich seiner Vertebratenpendants aufweist (WIENS *et al.*, unveröffentlicht). Die Entdeckung der Caspasen in den Schwämmen eröffnet somit eine Fülle erwägenswerter Untersuchungen, welche sich einerseits im engeren Sinne auf die Charakterisierung und Funktionsanalyse dieser Protease konzentrieren. Andererseits sind die potentiellen Interaktionen - direkte oder indirekte - mit anderen Proteinen in Betracht zu ziehen. Hierzu bieten sich als mögliche Substrate eine Fülle bereits bekannter Schwammproteine an, welche auf das Vorkommen einer Erkennungssequenz, die sie als potentielle Caspase-Substrate qualifiziert, untersucht werden müssen. Als Regulatoren der Caspase sind dagegen die Bcl-2-homologen Proteine der Schwämme, BHP1 und BHP2, zu erwägen. In diesem Zusammenhang erscheint insbesondere eine Kotransfektion der *GCBHP2*-transfizierten Zellen mit dem Caspase-3-Homolog, gefolgt von einer Apoptose-Induktion, interessant.

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Regulatoren und Effektoren der Apoptose in Schwämmen steht gleichfalls der molekularbiologische Nachweis des Adapters Apaf-1 aus, wodurch die Existenz der fundamentalen Elemente der den Zelltod auslösenden Signalkaskade nahezu vollständig enthüllt wäre. Die geringe Zahl bisher bekannter Proteinsequenzen wird allerdings die Suche nach diesem Adapter mittels z. B. degenerierter Primer erschweren. Von schnellerem Erfolg mag dagegen die Suche nach dem Caspase-Aktivator Cytochrom c gekrönt sein. Dessen hohe Konservierung *in puncto* Sequenz und Funktion (BABA *et al.*, 1996) läßt auch auf einen entsprechenden Anteil am Zelltod der Porifera vermuten. Die Aufklärung der Proteinsequenz bildet in diesem Zusammenhang die Grundlage immuncytologischer Analysen, welche mit Hilfe eigens hergestellter Antikörper einen apoptoseinduzierenden Ausstrom des Cytochrom c ins Cytosol schnell aufdecken könnten.

Natürlich lösen auch die bisherigen Analysen der Bcl-2-homologen Proteine der Schwämme vielfältige Fragen aus, welche die Notwendigkeit künftiger Untersuchungen verdeutlichen. Neben kristallographischen Analysen des BHP2, die möglicherweise zusätzliche Indizien bezüglich dessen Funktion liefern, werden Mutagenese-Studien die funktional unentbehrlichen Aminosäuren der BH-Domänen aufdecken. Ein zusätzlicher Fokus wird sich auf die Funktionsanalyse des BHP1 und den Nachweis proapoptotischer Regulatoren der Bcl-2 Familie aus den Porifera richten.

Diese und weitere Untersuchungen werden nicht nur zum Verständnis des Zelltods in Invertebraten beitragen, sondern hoffentlich auch an der Entschlüsselung bisher ungelöster Rätsel der Apoptose in Säugetieren mitwirken.

6 Zusammenfassung

Lebensweise und Körperbauplan der Porifera verdeutlichen die Erfordernis effizienter metabolischer Strategien zur Abwehr ungünstiger Einflüsse aus der Umwelt. In höheren Metazoen stellt die Apoptose einen Prozeß zur Entfernung beschädigter, infizierter oder redundanter Zellen dar, dessen Konservierung vom Nematoden zum Menschen bereits nachgewiesen wurde. Auf der Suche nach der molekularbiologischen Grundlage der Apoptose in den Porifera, dem phylogenetisch ältesten Tierstamm der Metazoen, wurden Mitglieder der Bcl-2 Familie - einer zu den Kernelementen der Apoptose gehörenden Familie von Regulatoren - unter Anwendung von PCR- und Screening-Techniken in einer cDNA-Bank des marinen Schwammes *G. cydonium* identifiziert. Im Anschluß an ihre Sequenzierung wurden die hierbei isolierten Klone *GCBHP1* und *GCBHP2* (*Geodia cydonium* Bcl-2-homologes Protein 1 bzw. 2) diversen Sequenz- und Strukturanalysen unterzogen. Diese offenbarten die Existenz zweier funktional bedeutsamer Domänen (BH1 und BH2) der potentiellen Proteine BHP1 und BHP2, welche die antiapoptotische Fraktion der Bcl-2 Familie charakterisieren. Beide Domänen vermitteln den Mitgliedern dieser Subfamilie das Potential, Poren in Organellen-Membranen zu bilden bzw. bestehende Poren zu regulieren und damit Einfluß auf den transmembranen Transport von Molekülen im Verlauf der Apoptose zu nehmen. Gleichfalls charakteristisch ist das Vorkommen sieben α -helikaler, die Porenbildung unterstützender Bereiche sowie einer C-terminalen hydrophoben Region, die eine Verankerung in der äußeren Membran der Mitochondrien gestattet.

Als letzte Rettungsmaßnahme vor dem herannahenden Zelltod induzieren apoptotische Stimuli die Expression vieler Bcl-2 Proteine. Eine Überprüfung der Transkription mittels Northern Blot Analysen bestätigte auch für das BHP2 die induzierte Expression unter dem Einfluß eines chemischen und eines physikalischen Modell-Stressors (Tributylzinn und Hitze). Die parallel dokumentierte Induktion des HSP70 (eines etablierten Streßmarkers) zeugte von der BHP2-Expression als Bestandteil einer antiapoptotischen Streßantwort zum Schutz des Organismus'. Die kontinuierliche Transkription des im Rahmen dieser Arbeit gleichfalls klonierten Proliferationsmarkers SEP1 veranschaulichte mit der unveränderten Vitalität der Schwammzellen zudem die Effektivität dieser Streßreaktionen.

Mit der Herstellung eines rekombinanten BHP2-Proteins wurde die Immunisierung von Kaninchen und die folgende Gewinnung eines polyklonalen BHP2-Antikörpers ermöglicht. Dieser gestattete den Nachweis der streßinduzierten BHP2-Expression mittels Western Blot Analysen auch auf Proteinebene.

Zum Zweck der Funktionsstudie wurden Säugetierzellen (*HEK-293*, *NIH/3T3*) analog vieler Bcl-2-Überexpressionsexperimente mit einem BHP2-Konstrukt transfiziert. Im Anschluß an ihre Selektion wurden diese transfizierten Zellen auf die Expression des BHP2 untersucht, sowohl bezüglich der Transkription als auch der Translation. Stabil transfizierte, BHP2-exprimierende Zellen unterschieden sich bereits in ihrem Wachstumsmuster (Bildung fociartiger Strukturen) von jenem *mock*-transfizierter Zellen (disperses Wachstum) und verdeutlichten dadurch phänotypisch die

Wirkung eines antiapoptotischen Proteins auf den Zellmetabolismus. In folgenden Assays wurde unter dem Einfluß zweier repräsentativer apoptotischer Stimuli (Tributylzinn und Serumentzug) für BHP2-transfizierte Zellen eine bis zu vierzehn- bzw. sechsmal höhere Vitalität als im Vergleich zu *mock*-transfizierten Zellen registriert. Dieses Ergebnis korrelierte mit der gleichzeitig beobachteten reduzierten Aktivierung der Caspase-Kaskade, hier repräsentiert durch jene der Caspase-3. Gleichsam verdeutlichte es jedoch auch die Teilnahme weiterer, der Kontrolle durch das BHP2 unterliegender apoptotischer Prozesse. Da immuncytochemische Analysen der subzellulären Lokalisation eine Assoziation mit den Mitochondrien erkennen ließen und Strukturanalysen gleichfalls die zur Porenbildung erforderlichen Merkmale offenbarten, scheint sich die Kontrollfunktion des BHP2 auf den transmembranen Transport von Signalmolekülen im Verlauf der Apoptose zu beziehen. Laut dieser Theorie verhindert BHP2 mittels Regulation bestehender Poren bzw. durch Bildung eigener Poren den Zusammenbruch des mitochondrialen transmembranen Gradienten und vermindert dadurch die Entstehung proapoptotisch wirksamer Sauerstoffspezies (ROS). Gleichzeitig reduziert es den Ausstrom mitochondrialen Cytochrom c ins Cytosol und verhindert dadurch die adaptervermittelte Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Da Bcl-2 Proteine und Hitzeschockproteine zentrale Bestandteile der zellulären Antwort auf Streß darstellen, wurden schließlich in einer Erweiterung des Modells Analogien der BHP2- und der HSP70-Expression ausgearbeitet und die Vernetzung der antiapoptotischen Wirkung beider Proteine aufgezeigt.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse und Schlußfolgerungen demonstrieren somit die erstmalige Expression eines funktionalen Schwammproteins in Säugetierzellen und belegen die Existenz konservierter apoptotischer Mechanismen in den Porifera. Das weitere Studium dieser Mechanismen besitzt das Potential, zu einem besseren Verständnis der Apoptose der Säugetiere beizutragen.

7 Literaturverzeichnis

Abastado, J.P. (1996):

"Apoptosis: function and regulation of cell death",
Res. Immunol. 147 (7), 443-456

Adams, J.M.; Cory, S. (1998):

"The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival",
Science 281 (5381), 1322-1326

Allen, R.T.; Cluck, M.W.; Agrawal, D.K. (1998):

"Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases",
Cell. Mol. Life. Sci. 54 (5), 427-445

Althoff, K.; Schutt, C.; Steffen, R.; Batel, R.; Müller, W.E.G (1998):

"Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria?",
Mar. Biol. 130 (3), 529-536

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990):

"Basic local alignment search tool",
J. Mol. Biol. 215 (3), 403-410

Alwine, J.C.; Kemp, D.J.; Stark, G.R. (1977):

"Methods for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA-probes",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 (12), 5350-5354

Andreeva, L.; Heads, R.; Green, C.J. (1999):

"Cyclophilins and their possible role in the stress response",
Int. J. Exp. Pathol. 80 (6), 305-315

Armstrong, R.C.; Aja, T.; Xiang, J.; Gaur, S.; Krebs, J.F.; Hoang, K.; Bai, X.; Korsmeyer, S.J.; Karanewsky, D.S.; Fritz, L.C.; Tomaselli, K. (1996):

"Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors",
J. Biol. Chem. 271 (28), 16850-16855

Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. (1998):

"Death receptors: signaling and modulation",
Science 281 (5381), 1305-1308

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1994):

"Current protocols in molecular biology",
John Wiley and Sons Inc., NY, USA

Baba, M.L.; Darga, L.L.; Goodman, M.; Czelusniak, J. (1996):

"Evolution of cytochrome C investigated by the maximum parsimony method",
J. Mol. Evol. 17 (4), 197-213

Bairoch, A. (1988):

"Sequence patterns in protein kinases",
Nature 331 (6151), 22

Batel, R.; Bihari, N.; Rinkevich, B.; Dapper, J.; Schäcke, H.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (1993):

"Modulation of organotin-induced apoptosis by the water pollutant methyl mercury in a human lymphoblastoid tumor cell line and a marine sponge,"
Mar. Ecol. Prog. Ser. 93 (3), 245-251

Baumgartner-Parzer, S. (1996):

"Apoptose - der programmierte Zelltod",
Wien. Klin. Wochenschr. 108 (11), 311-320

Beck, S.; Koester, H. (1990):

"Application of dioxetane chemiluminescent probes to molecular biology",
Analyt. Chem. 62 (21), 2258-2270

Benoit, R.; Grobost, O. (1999):

"Black esophagus related to acute esophageal necrosis: a new case",
Presse Med. 28 (28), 1509-1512

Benton, W.D.; Davis, R.W. (1977):

"Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ",
Science 196 (4286), 180-182

Bergmann, A.; Agapite, J.; Steller, H. (1998):

"Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates",
Oncogene 17 (25), 3215-3223

Bergquist, P.R. (1978):

"Sponges",
Hutchinson, London

Bernardi, P.; Broekemeier, K.M.; Pfeiffer, D.R. (1994):

"Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane",
J. Bioenerg. Biomembr. 26 (5), 509-517

Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979):

"A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA",
Nucleic Acids Res. 7 (6), 1513-1522

Blackstone, N.W. (1995):

"A units-of-evolution perspective on the endosymbiont theory of the origin of the mitochondrion",
Evolution 49 (5), 785-796

Blake, M.S.; Johnston, K.H.; Russel-Jones, G.H.; Gotschlich, E.C. (1984):

"A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots",
Anal. Biochem. 136 (1), 175-179

Blumbach, B.; Diehl-Seifert, B.; Seack, J.; Steffen, R.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1999):

"Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*",
Immunogenetics 49 (9), 751-763

Blume-Jensen, P.; Janknecht, R.; Hunter, T. (1998):

"The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136",
Curr. Biol. 8 (13), 779-782

Boerboom, D.; Sirois, J. (1998):

"Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles",
Endocrinology 139 (4), 1662-1670

Boise, L.H.; Gonzalez-Garcia, M.; Postema, C.E.; Ding, L.; Lindsten, T.; Turka, L.A.; Mao, X.; Nunez, G.; Thompson, C.B. (1993):

"Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death",
Cell 74 (4), 597-608

Boise, L.H.; Minn, A.J.; Noel, P.J.; June, C.H.; Accavitti, M.A.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. (1995):

"CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL",
Immunity 3 (1), 87-98

Borchiellini, C.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Le-Parco, Y. (1998):

"Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi",
Mol. Biol. Evol. 15 (6), 647-655

Bradford, M.M. (1976):

"A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding",
Anal. Biochem. 72, 248-254

Bredesen, D.E. (1995):

"Neural apoptosis",
Ann. Neurol. 38 (6), 839-851

Brown, T.A. (1993):

"Gentechnologie für Einsteiger: Grundlagen, Methoden, Anwendungen",
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg

Brown, D.G.; Sun, X.M.; Cohen, G.M. (1993):

"Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation",
J. Biol. Chem. 268 (5), 3037-3039

Bruckheimer, E.M.; Cho, S.H.; Sarkiss, M.; Herrmann, J.; McDonnell, T.J. (1998):

"The Bcl-2 gene family and apoptosis",
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 62, 75-105

Bujard, H.; Gentz, R.; Lanzer, M.; Stüber, D.; Müller, M.; Ibrahimi, I.; Häuptle, M.T.; Dobberstein, B. (1987):

"A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*",
Methods Enzymol. 155, 416-433

Bursch, W.; Liehr, J.G.; Sirbasku, D.A.; Putz, B.; Taper, H.; Schulte-Hermann, R. (1991):

"Control of cell death (apoptosis) by diethylstilbestrol in an estrogen-dependent kidney tumor",
Carcinogenesis 12 (5), 855-860

Buzzard, K.A.; Giaccia, A.J.; Killender, M.; Anderson, R.L. (1998):

"Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis",
J. Biol. Chem. 273 (27), 17147-17153

Cadenas, E. (1998):

"Biochemistry of oxygen toxicity",
Annu. Rev. Biochem. 58, 79-110

Chandra, J.; Samali, A.; Orrenius, S. (2000):

"Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress",
Free Radical Biol. Med. 29 (3-4), 323-333

- Chang, B.S.; Minn, A.J.; Muchmore, S.W.; Fesik, S.W.; Thompson, C.B. (1997):**
"Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2",
EMBO J. 16 (5), 968-977
- Chant, I.D.; Rose, P.E.; Morris, A.G. (1996):**
"Susceptibility of AML cells to *in vitro* apoptosis correlates with heat shock protein 70 (hsp 70) expression",
Br. J. Haematol. 93 (4), 898-902
- Chao, D.T.; Korsmeyer, S.J. (1998):**
"BCL-2 family: regulators of cell death",
Annu. Rev. Immunol. 16, 395-419
- Cheng, E.H.; Levine, B.; Boise, L.H.; Thompson, C.B.; Hardwick, J.M. (1996):**
"Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL",
Nature 379 (6565), 554-556
- Chen-Levy, Z.; Cleary, M.L. (1990):**
"Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated *in vitro*",
J. Biol. Chem. 265 (9), 4929-4933
- Chicheportiche, Y.; Bourdon, P.R.; Xu, H.; Hsu, Y.M.; Scott, H.; Hession, C.; Garcia, I.; Browning, J.L. (1997):**
"TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis",
J. Biol. Chem. 272 (51), 32401-32410
- Chinnaiyan, A.M.; O'Rourke, K.; Lane, B.R.; Dixit, V.M. (1997):**
"Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death",
Science 275 (5303), 1122-1126
- Chinnaiyan, A.M.; O'Rourke, K.; Tewari, M.; Dixit, V.M. (1995):**
"FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis",
Cell 81 (4), 505-512
- Chinnaiyan, A.M.; Tepper, C.G.; Seldin, M.F.; O'Rourke, K.; Kischkel, F.C.; Hellbardt, S.; Krammer, P.H.; Peter, M.E.; Dixit, V.M. (1996):**
"FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis",
J. Biol. Chem. 271 (9), 4961-4965
- Chittenden, T.; Flemington, C.; Houghton, A.B.; Ebb, R.G.; Gallo, G.J.; Elangovan, B.; Chinnadurai, G.; Lutz, R.J. (1995a):**
"A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions",
EMBO J. 14 (22), 5589-5596
- Chittenden, T.; Harrington, E.A.; O'Connor, R.; Flemington, C.; Lutz, R.J.; Evan, G.I.; Guild, B.C. (1995b):**
"Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak",
Nature 374 (6524), 733-736
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987):**
"Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction",
Anal. Biochem. 162 (1), 156-159
- Clarke, L.; Carbon, J. (1976):**
"A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome",
Cell 9 (1), 91-99

- Clarke, P.G.; Clarke, S. (1995):**
"Historic apoptosis",
Nature 378 (6554), 230
- Clarke, P.G.; Clarke, S. (1996):**
"Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena",
Anat. Embryol. Berl. 193 (2), 81-99
- Cochrane, B.J.; Irby, R.B.; Snell, T.W. (1991):**
"Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*",
Comp. Biochem. Physiol. C. 98 (2-3), 385-390
- Cohen, G.M. (1997):**
"Caspases: the executioners of apoptosis",
Biochem. J. 326 (Pt1), 1-16
- Cohen, G.M.; Sun, X.M.; Snowden, R.T.; Dinsdale, D.; Skilleter, D.N. (1992):**
"Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation",
Biochem. J. 286 (Pt2), 331-334
- Collins, R.J.; Harmon, B.V.; Gobe, G.C.; Kerr, J.F. (1992):**
"Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis",
Int. J. Radiat. Biol. 61 (4), 451-453
- Conway-Morris, S. (1998):**
"The question of metazoan monophyly and the fossil record",
Prog. Mol. Subcell. Biol. 21, 1-19
- Corsini, E.; Viviani, B.; Marinovich, M.; Galli, C.L. (1997):**
"Role of mitochondria and calcium ions in tributyltin-induced gene regulatory pathways",
Toxicol. Appl. Pharmacol. 145 (1), 74-81
- Cory, S. (1995):**
"Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family",
Annu. Rev. Immunol. 13, 513-543
- Cramer, W.A.; Heymann, J.B.; Schendel, S.L.; Deriy, B.N.; Cohen, F.S.; Elkins, P.A.; Stauffacher, C.V. (1995):**
"Structure-function of the channel-forming colicins",
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24, 611-641
- Crawford, L.V.; Waring, M.J. (1967):**
"Supercoiling of polyoma virus DNA measured by its interaction with ethidium bromide",
J. Mol. Biol. 25 (1), 23-30
- Cryns, V.; Yuan, J. (1998):**
"Proteases to die for",
Genes Dev. 12 (11), 1551-1570
- Datta, S.R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M.E. (1997):**
"Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery",
Cell 91 (2), 231-241
- Dedio, J.; Jahnen-Dechent, W.; Bachmann, M.; Müller-Esterl, W. (1998):**
"The multiligand-binding Protein gC1qR, putative C1q Receptor, is a mitochondrial protein",
J. Immunol. 160 (7), 3534-3542

- Del-Peso, L.; Gonzalez-Garcia, M.; Page, C.; Herrera, R.; Nunez, G. (1997):**
"Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt",
Science 278 (5338), 687-689
- Desagher, S.; Osen-Sand, A.; Nichols, A.; Eskes, R.; Montessuit, S.; Lauper, S.; Maundrell, K.; Antonsson, B.; Martinou, J.C. (1999):**
"Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis",
J. Cell. Biol. 144 (5), 891-901
- Diaz, J.L.; Oltersdorf, T.; Horne, W.; McConnell, M.; Wilson, G.; Weeks, S.; Garcia, T.; Fritz, L.C. (1997):**
"A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members"
J. Biol. Chem. 272 (17), 11350-11355
- Dinareello, C.A. (1991):**
"Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases",
Curr. Opin. Immunol. 3 (6), 941-948
- Driscoll, M. (1992):**
"Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*",
J. Neurobiol. 23 (9), 1327-1351
- DuPont, Fa. (1993):**
"GeneScreen™ Instruction Manual",
DuPont Research Products, Boston
- Earnshaw, W.C.; Martins, L.M.; Kaufmann, S.H. (1999):**
"Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis",
Annu. Rev. Biochem. 68, 383-424
- Ellis, H.M.; Horvitz, H.R. (1986):**
"Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*",
Cell 44 (6), 817-829
- Ellis, R.E.; Yuan, J.Y.; Horvitz, H.R. (1991):**
"Mechanisms and functions of cell death",
Annu. Rev. Cell Biol. 7, 663-698
- Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. (1998):**
"A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD",
Nature 391 (6662), 43-50
- Enari, M.; Talanian, R.V.; Wong, W.W.; Nagata, S. (1996):**
"Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis",
Nature 380 (6576), 723-726
- Endicott, J.A.; Ling, V. (1989):**
"The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance",
Annu. Rev. Biochem. 58, 137-171
- Enright, H.; Hebbel, R.P.; Nath, K.A. (1994):**
"Internucleosomal cleavage of DNA as the sole criterion for apoptosis may be artifactual",
J. Lab. Clin. Med. 124 (1), 63-68
- Evan, G.; Littlewood, T. (1998):**
"A matter of life and cell death",
Science 281 (5381), 1317-1322

Fadok, V.A.; Voelker, D.R.; Campbell, P.A.; Cohen, J.J.; Bratton, D.L.; Henson, P.M. (1992):

"Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages",
J. Immunol. 148 (7), 2207-2216

Faleiro, L.; Kobayashi, R.; Fearnhead, H.; Lazebnik, Y. (1997):

"Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells",
EMBO J. 16 (9), 2271-2281

Felsenstein, J. (1993):

"PHYLIP-Phylogeny inference package",
Cladistics 5, 164-166

Feramisco, J.R.; Glass, D.B.; Krebs, E.G. (1980):

"Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase",
J. Biol. Chem. 255 (9), 4240-4245

Fernandes-Alnemri, T.; Armstrong, R.C.; Krebs, J.; Srinivasula, S.M.; Wang, L.; Bullrich, F.; Fritz, L.C.; Trapani, J.A.; Tomaselli, K.J.; Litwack, G.; Alnemri, E.S. (1996):

"*In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (15), 7464-7469

Field, C.M.; Kellogg, D. (1999):

"Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases?",
Trends Cell. Biol. 9 (10), 387-394

Flanagan, S.W.; Moseley, P.L.; Buettner, G.R. (1998):

"Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping",
FEBS Lett. 431 (2), 285-286

Frade, J.M.; Michaelidis, T.M. (1997):

"Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism",
Bioessays 19 (9), 827-832

Frank, J.; Kelleher, D.K.; Pompella, A.; Thews, O.; Biesalski, H.K.; Vaupel, P. (1998):

"Enhancement of oxidative cell injury and antitumor effects of localized 44 degrees C hyperthermia upon combination with respiratory hyperoxia and xanthine oxidase",
Cancer Res. 58 (13), 2693-2698

Fröhlich, K.U.; Madeo, F. (2000):

"Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour",
FEBS Lett. 473 (1), 6-9

Gearing, A.J.; Beckett, P.; Christodoulou, M.; Churchill, M.; Clements, J.; Davidson, A.H.; Drummond, A.H.; Galloway, W.A.; Gilbert, R.; Gordon, J.L. (1994):

"Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases",
Nature 370 (6490), 555-557

Golstein, P. (1997):

"Cell death: TRAIL and its receptors",
Curr. Biol. 7 (12), 750-753

Golstein, P.; Ojcius, D.M.; Young, J.D. (1991):

"Cell death mechanisms and the immune system",
Immunol. Rev. 121, 29-65

Goping, I.S.; Gross, A.; Lavoie, J.N.; Nguyen, M.; Jemmerson, R.; Roth, K.; Korsmeyer, S.J.; Shore, G.C. (1998):

"Regulated targeting of BAX to mitochondria",
J. Cell. Biol. 143 (1), 207-215

Gorman, A.M.; Heavey, B.; Creagh, E.; Cotter, T.G.; Samali, A. (1999):

"Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis",
FEBS Lett. 445 (1), 98-102

Gracy, R.W.; Talent, J.M.; Kong, Y.; Conrad, C.C. (1999):

"Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?",
Mutat. Res. 428 (1-2), 17-22

Green, D.R.; Reed, J.C. (1998):

"Mitochondria and apoptosis",
Science 281 (5381), 1309-1312

Green, D.R.; Ware, C.F. (1997):

"Fas-ligand: privilege and peril"
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (12), 5986-5990

Greenberg, A.H. (1996):

"Granzyme B-induced apoptosis",
Adv. Exp. Med. Biol. 406, 219-228

Grimm, S.; Bauer, M.K.; Baeuerle, P.A.; Schulze-Osthoff, K. (1996):

"Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis",
J. Cell. Biol. 134 (1), 13-23

Gross, A.; Jockel, J.; Wie, M.C.; Korsmeyer, S.J. (1998):

"Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis",
EMBO J. 17 (14), 3878-3885

Gross, A.; McDonnell, J.M.; Korsmeyer, S.J. (1999):

"BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis",
Genes. Dev. 13 (15), 1899-1911

Gruber, G.; Reitner, J. (1991):

"Isolierte Mikro- und Megaskleren von Porifera aus dem Unterkampan von Hover (Norddeutschland) und Bemerkungen zur Phylogenie der Geodiidae (Demospongiae)",
Berliner Geowiss. Abh. Reihe A, Geologie und Paläontologie 134, 107-117

Gruner, H.E.; Grell, K.G.; Kilian, E.F. (1993):

"Wirbellose Tiere 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera",
Gustav Fischer Verlag, Jena & Stuttgart & New York, 251-273

Gu, Y.; Wu, J.; Faucheu, C.; Lalanne, J.L.; Diu, A.; Livingston, D.J.; Su, M.S. (1995):

"Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms *in vivo*",
EMBO J. 14 (9), 1923-1931

Guihard, G.; Boulanger, P.; Benedetti, H.; Llobes, R.; Besnard, M.; Letellier, L. (1994):

"Colicin A and the Tol proteins involved in its translocation are preferentially located in the contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli* cells",
J. Biol. Chem. 269 (8), 5874-5880

Haldar, S.; Jena, N.; Croce, C.M. (1995):

"Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (10), 4507-4511

- Hamada, T.; Sasaguri, T.; Tanimoto, A.; Arima, N.; Shimajiri, S.; Abe, T.; Sasaguri, Y. (1996):**
"Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein",
Biochem. Biophys. Res. Commun. 219 (3), 829-834
- Hamaguchi, K.; Geiduschek, E.P. (1962):**
"The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix",
J. Am. Chem. Soc. 84, 1329-1337
- Hanahan, D. (1983):**
"Studies of the transformation of *Escherichia coli* with plasmids",
J. Mol. Biol. 166 (4), 557-580
- Hansen, I.V.; Weeks, J.M.; Depledge, M.H. (1995):**
"Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas and the implications for biomonitoring",
Mar. Poll. Bull. 31 (1-3), 133-138
- Harlow, E.; Lane, D. (1988):**
"Antibodies, a laboratory Manual",
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Harms-Ringdahl, M.; Nicotera, P.; Radford, I.R. (1996):**
"Radiation induced apoptosis",
Mutat. Res. 366 (2), 171-179
- Harrison, F.W.; Cowden, R.R. (1976):**
"Aspects of sponge biology"
Academic Press, NY, USA
- Hartmann, E.; Rapoport, T.A.; Lodish, H.F. (1998):**
"Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (15), 5786-5790
- He, L.; Fox, M.H. (1997):**
"Variation of heat shock protein 70 through the cell cycle in HL-60 cells and its relationship to apoptosis",
Exp. Cell. Res. 232 (1), 64-71
- Helling, R.B.; Goodman, H.M.; Boyer, H.W. (1974):**
"Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose gel-electrophoresis",
J. Virol. 14 (5), 1235-1244
- Hengartner, M. (1998):**
"Apoptosis. Death by crowd control",
Science 281 (5381), 1298-1299
- Hengartner, M.O.; Ellis, R.E.; Horvitz, H.R. (1992):**
"*Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death",
Nature 356 (6369), 494-499
- Hengartner, M.O.; Horvitz, H.R. (1994a):**
"Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*",
Curr. Opin. Genet. Dev. 4 (4), 581-586
- Hengartner, M.O.; Horvitz, H.R. (1994b):**
"*C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of mammalian proto-oncogene bcl-2",
Cell 76 (4), 665-676

Henikoff, S.; Henikoff, J.G. (1992):

"Amino acid substitution matrices from protein blocks",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (22), 10915-10919

Hightower, L.E. (1991):

"Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity",
Cell 66 (2), 191-197

Higuchi, M.; Proske, R.J.; Yeh, E.T. (1998):

"Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis",
Oncogene 17 (19), 2515-2524

Hirvonen, M.R.; Brune, B.; Lapetina, E.G. (1996):

"Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide",
Biochem. J. 315 (Pt3), 845-849

Hochuli, E.; Dobeli, H.; Schacher, A. (1987):

"New metal chelate adsorbant selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues",
J. Chromatog. 411, 177-184

Hockenbery, D.M.; Nunez, G.; Milliman, C.; Schreiber, R.D.; Korsmeyer, S.J. (1990):

"Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death",
Nature 348 (6299), 334-336

Hockenbery, D.M.; Oltvai, Z.N.; Yin, X.M.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J. (1993):

"Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis",
Cell 75 (2), 241-251

Hofmann, K.; Bucher, P.; Tschopp, J. (1997):

"The CARD domain: a new apoptotic signalling motif",
Trends Biochem. Sci. 22 (5), 155-156

Hsu, H.; Shu, H.B.; Pan, M.G.; Goeddel, D.V. (1996):

"TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways",
Cell 84 (2), 299-308

Hu, Y.; Benedict, M.A.; Wu, D.; Inohara, N.; Nunez, G. (1998):

"Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (8), 4386-4391

Hug, H. (1998):

"Programmierter Zelltod: Bedeutung der Apoptose für zukünftige Therapien",
Deutsche Apotheker Zeitung 138 (8), 44-49

Hunt, C.; Morimoto, R.I. (1985):

"Conserved features of the eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (19), 6455-6459

Hunter, T. (1982):

"Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase",
J. Biol. Chem. 257 (9), 4843-4848

Ibrado, A.M.; Huang, Y.; Fang, G.; Liu, L.; Bhalla, K. (1996):

"Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells",
Cancer Res. 56 (20), 4743-4748

Ichas, F.; Jouaville, L.S.; Mazat, J. (1997):

"Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals",
Cell 89 (7), 1145-1153

Inohara, N.; Ding, L.; Chen, S.; Nunez, G. (1997):

"Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L)",
EMBO J. 16 (7), 1686-1694

Inohara, N.; Gourley, T.S.; Carrio, R.; Muniz, M.; Merino, J.; Garcia, I.; Koseki, T.; Hu, Y.; Chen, S.; Nunez, G. (1998):

"Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death",
J. Biol. Chem. 273 (49), 32479-32486

Irmeler, M.; Thome, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Steiner, V.; Bodmer, J.L.; Schroter, M.; Burns, K.; Mattmann, C.; Rimoldi, D.; French, L.E.; Tschopp, J. (1997):

"Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP",
Nature 388 (6638), 190-195

Ito, T.; Deng, X.; Carr, B.; May, W.S. (1997):

"Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function",
J. Biol. Chem. 272 (18), 11671-11673

Jäättelä, M.; Wissing, D.; Bauer, P.A.; Li, G.C. (1992):

"Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity",
EMBO J. 11 (10), 3507-3512

Jäättelä, M.; Wissing, D.; Kokholm, K.; Kallunki, T.; Egeblad, M. (1998):

"Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases",
EMBO J. 17 (21), 6124-6134

Jäckel, M.C. (1998):

"Die genetische Kontrolle des programmierten Zelltods (Apoptose). Perspektiven für ein biologisches Tumorstaging?",
HNO 46 (6), 614-625

Jacobson, M.D.; Burne, J.F.; Raff, M.C. (1994):

"Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus",
EMBO J. 13 (8), 1899-1910

Johnston, B.A.; Eisen, H.; Fry, D. (1991):

"An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits",
Lab. Anim. Sci. 41 (1), 15-21

Jürgensmeier, J.M.; Krajewski, S.; Armstrong, R.C.; Wilson, G.M.; Oltersdorf, T.; Fritz, L.C.; Reed, J.C.; Otilie, S. (1997):

"Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*",
Mol. Biol. Cell. 8 (2), 325-339

Kästner, A. (1993):

"Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere",
in Gruner, H.E. (ed.): "1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera",
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 251-297

Katschinski, D.M.; Boos, K.; Schindler, S.G.; Fandrey, J. (2000):

"Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis",
J. Biol. Chem. 275 (28), 21094-21098

- Kaufmann, S.H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N.E.; Poirier, G.G. (1993):**
"Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis",
Cancer Res. 53 (17), 3976-3985
- Kelekar, A.; Chang, B.S.; Harlan, J.E.; Fesik, S.W.; Thompson, C.B. (1997):**
"Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL",
Mol. Cell. Biol. 17 (12), 7040-7046
- Kelekar, A.; Thompson, C.B. (1998):**
"Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis",
Trends Cell. Biol. 8 (8), 324-330
- Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. (1972):**
"Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics",
Br. J. Cancer. 26 (4), 239-257
- Kessler, C. (1991):**
"The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology: a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system",
Mol. Cell. Probes 5 (3), 161-205
- Kinningham, K.K.; Oberley, T.D.; Lin, S.; Mattingly, C.A.; St-Clair, D.K. (1999):**
"Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death",
FASEB J. 13 (12), 1601-1610
- Kishimoto, A.; Nishiyama, K.; Nakanishi, H.; Uratsuji, Y.; Nomura, H.; Takeyama, Y.; Nishizuka, Y. (1985):**
"Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase",
J. Biol. Chem. 260 (23), 12492-12499
- Kitada, S.; Miyashita, T.; Tanaka, S.; Reed, J.C. (1993):**
"Investigations of antisense oligonucleotides targeted against bcl-2 RNAs",
Antisense Res. Dev. 3 (2), 157-169
- Kitson, J.; Raven, T.; Jiang, Y.P.; Goeddel, D.V.; Giles, K.M.; Pun, K.T.; Grinham, C.J.; Brown, R.; Farrow, S.N. (1996):**
"A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis",
Nature 384 (6607), 372-375
- Kluck, R.M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D. (1997):**
"The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis",
Science 275 (5303), 1132-1136
- Konopleva, M.; Zhao, S.; Xie, Z.; Segall, H.; Younes, A.; Claxton, D.F.; Estrov, Z.; Kornblau, S.M.; Andreeff, M. (1999):**
"Apoptosis. Molecules and mechanisms",
Adv. Exp. Med. Biol. 457, 217-236
- Korsmeyer, S.J.; Shutter, J.R.; Veis, D.J.; Merry, D.E.; Oltvai, Z.N. (1993):**
"Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death",
Semin. Cancer Biol. 4 (6), 327-332
- Kothakota, S.; Azuma, T.; Reinhard, C.; Klippel, A.; Tang, J.; Chu, K.; McGarry, T.J.; Kirschner, M.W.; Kohts, K.; Kwiatkowski, D.J.; Williams, L.T. (1997):**
"Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis",
Science 278 (5336), 294-298

Kozak, M. (1991):

"Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation",
J. Biol. Chem. 266 (30), 19867-19870

Koziol, C.; Batel, R.; Arinc, E.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (1997):

"Expression of the potential biomarker heat shock protein 70 and its regulator, the metazoan DnaJ homolog, by temperature stress in the sponge *Geodia cydonium*",
Mar. Ecol. Prog. Ser. 154, 261-268

Koziol, C.; Borojevic, R.; Steffen, R.; Müller, W.E.G (1998):

"Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells",
Mech. Ageing Dev. 100 (2), 107-120

Koziol, C.; Wagner-Hülsmann, C.; Cetkovic, H.; Gamulin, V.; Kruse, M.; Pancer, Z.; Schäcke, H.; Müller, W.E.G. (1996):

"Cloning of the heat-inducible biomarker, the cDNA encoding the 70-kDa heat shock protein, from the marine sponge *Geodia cydonium*: response to natural stressors",
Mar. Ecol. Prog. Ser. 136 (1-3), 153-161

Kozopas, K.M.; Yang, T.; Buchan, H.L.; Zhou, P.; Craig, R.W. (1993):

"MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 (8), 3516-3520

Krajewski, S.; Tanaka, S.; Takayama, S.; Schibler, M.J.; Fenton, W.; Reed, J.C. (1993):

"Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes",
Cancer Res. 53 (19), 4701-4714

Krammer, P.H. (1999):

"CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die",
Adv. Immunol. 71, 163-210

Krasko, A.; Schröder, H.C.; Perovic, S.; Steffen, R.; Kruse, M.; Reichert, W.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1999):

"Ethylene modulates gene expression in cells of the marine sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis",
J. Biol. Chem. 274 (44), 31524-31530

Kroemer, G. (1997a):

"The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis",
Nat. Med. 3 (6), 614-620

Kroemer, G. (1997b):

"Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution",
Cell Death Differ. 4 (6), 443-456

Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S.A. (1997):

"Mitochondrial control of apoptosis",
Immunol. Today 18 (1), 44-51

Kurelec, B. (1994):

"Inhibition of multixenobiotic defense mechanism in aquatic organisms: Ecotoxic consequences",
in Müller, W.E.G. (ed.): "Use of aquatic invertebrates as tools for monitoring of environmental hazards",
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

- Kurelec, B.; Krca, S.; Pivcevic, B.; Ugarkovic, D.; Bachmann, M.; Imsiecke, G.; Müller, W.E.G. (1992):**
"Expression of Pglycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125-kDa drug-binding glycoprotein",
Carcinogenesis 13 (1), 69-76
- Kyte, J.; Doolittle, R.F. (1982):**
"A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein",
J. Mol. Biol. 157 (1), 105-132
- Laemmli, U.K. (1970):**
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4",
Nature 227 (259), 680-685
- Lafay, B.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Christen, R. (1992):**
"An analysis of partial 28S ribosomal RNA sequences suggests early radiation of sponges",
Biosystems 28 (1-3), 139-151
- Lee, H.H.; Dadgostar, H.; Cheng, Q.; Shu, J.; Cheng, G. (1999):**
"NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (16), 9136-9141
- Lehrach, H.; Diamond, D.; Wozney, J.M.; Boedtker, H. (1977):**
"RNA molecules weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical re-examination"
Biochem. 16 (21), 4743- 4751
- Lennon, S.V.; Martin, S.J.; Cotter, T.G. (1991):**
"Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli",
Cell. Prolif. 24 (2), 203-214
- Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. (1997):**
"Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade",
Cell 91 (4), 479-489
- Li, J.K.; Parker, B.; Kowalik, T. (1987):**
"Rapid alkaline blot-transfer of viral dsRNAs",
Anal. Biochem. 163 (1), 210-218
- Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.J.; Yuan, J. (1998):**
"Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis",
Cell 94 (4), 491-501
- Lin, T.J.; Hung, D.Z.; Kao, C.H.; Hu, W.H.; Yang, D.Y. (1998):**
"Unique cerebral dysfunction following triphenyltin acetate poisoning",
Hum. Exp. Toxicol. 17 (7), 403-405
- Lincz, L.F. (1998):**
"Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death",
Immunol. Cell. Biol. 76 (1), 1-19
- Lindahl, T. (1995):**
"Recognition and processing of damaged DNA",
J. Cell. Sci. Suppl. 19, 73-77
- Liu, X.; Kim, C.N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. (1996):**
"Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c",
Cell 86 (1), 147-150

Lockshin, R.A.; Williams, C.M. (1964):

"Programmed cell death. II: Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms",
J. Insect. Physiol. 10, 643-649

Longtine, M.S.; DeMarini, D.J.; Valencik, M.L.; Al-Awar, O.S.; Fares, H.; De-Virgilio, C.; Pringle, J.R. (1996):

"The septins: roles in cytokinesis and other processes",
Curr. Opin. Cell. Biol. 8 (1), 106-119

Lupas, A.; Van-Dyke, M.; Stock, J. (1991):

"Predicting coiled coils from protein sequences",
Science 252 (5010), 1162-1164

Manon, S.; Chaudhuri, B.; Guerin, M. (1997):

"Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL",
FEBS Lett. 415 (1), 29-32

Margulis, L. (1996):

"Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (3), 1071-1076

Mariani, S.M.; Matiba, B.; Armandola, E.A.; Krammer, P.H. (1997):

"Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells",
J. Cell. Biol. 137 (1), 221-229

Marin, N.; Romero, B.; Bosch-Morell, F.; Llansola, M.; Felipo, V.; Roma, J.; Romero, F.J. (2000):

"Beta-amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons",
Mech. Ageing Dev. 119 (1-2), 63-67

Marshall, R.D. (1972):

"Glycoproteins",
Annu. Rev. Biochem. 41, 673-702

Marsters, S.A.; Pitti, R.M.; Donahue, C.J.; Ruppert, S.; Bauer, K.D.; Ashkenazi, A. (1996):

"Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA",
Curr. Biol. 6 (6), 750-752

Marzo, I.; Susin, S.A.; Petit, P.X.; Ravagnan, L.; Brenner, C.; Larochette, N.; Zamzami, N.; Kroemer, G. (1998):

"Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function",
FEBS Lett. 427 (2), 198-202

Matsumoto, H.; Hayashi, S.; Hatashita, M.; Ohnishi, K.; Ohtsubo, T.; Kitai, R.; Shioura, H.; Ohnishi, T.; Kano, E. (1999):

"Nitric oxide is an initiator of intercellular signal transduction for stress response after hyperthermia in mutant p53 cells of human glioblastoma",
Cancer Res. 59 (13), 3239-3244

Matsuoka, M.; Igisu, H. (1996):

"Induction of c-fos expression by tributyltin in PC12 cells: Involvement of intracellular Ca²⁺",
Environ. Toxicol. Pharmacol. 2 (4), 373-380

McConkey, D.J. (1998):

"Biochemical determinants of apoptosis and necrosis",
Toxicol. Lett. 99 (3), 157-168

- McConkey, D.J.; Orrenius, S. (1996):**
"Signal transduction pathways in apoptosis",
Stem Cells 14 (6), 619-631
- McDonnell, T.J. (1993):**
"Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia",
Mol. Carcinog. 8 (4), 209-213
- McDonnell, J.M.; Fushman, D.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J.; Cowburn, D. (1999):**
"Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists",
Cell 96 (5), 625-634
- McDonell, M.W.; Studier, M.N. (1977):**
"Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels",
J. Mol. Biol. 110 (1), 119-146
- Meisenholder, G.W.; Martin, S.J.; Green, D.R.; Nordberg, J.; Babior, B.M.; Gottlieb, R.A. (1996):**
"Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection",
J. Biol. Chem. 271 (27), 16260-16262
- Merry, D.E.; Korsmeyer, S.J. (1997):**
"Bcl-2 gene family in the nervous system",
Annu. Rev. Neurosci. 20, 245-267
- Mignotte, B.; Vayssiere, J.L. (1998):**
"Mitochondria and apoptosis",
Eur. J. Biochem. 252 (1), 1-15
- Miura, M.; Zhu, H.; Rotello, R.; Hartwig, E.A.; Yuan, J. (1993):**
"Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*",
Cell 75 (4), 653-660
- Monney, L.; Otter, I.; Olivier, R.; Ravn, U.; Mirzasaleh, H.; Fellay, I.; Poirier, G.G.; Borner, C. (1996):**
"Bcl-2 overexpression blocks activation of the death protease CPP32/Yama/apopain",
Biochem. Biophys. Res. Commun. 221 (2), 340-345
- Morimoto, R.; Jurivich, D.A.; Kroeger, P.E.; Mathur, S.K.; Murphy, S.P.; Nakai, A.; Sarge, K.; Abravaya, K.; Siston, L.T. (1994a):**
"Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors",
in Morimoto, R.; Tissières, A.; Georgopoulos, C. (eds.): "The biology of heat shock proteins and molecular chaperones",
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 417-455
- Morimoto, R.; Tissieres, A.; Georgopoulos, C. (1994b):**
"The biology of heat shock proteins and molecular chaperones",
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1-30
- Morrow, C.S.; Cowan, K.H. (1988):**
"Mechanisms and clinical significance of multidrug resistance",
Oncology 2 (10), 55-63
- Mosser, D.D.; Caron, A.W.; Bourget, L.; Denis-Larose, C.; Massie, B. (1997):**
"Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis",
Mol. Cell. Biol. 17 (9), 5317-5327

Muchmore, S.W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R.P.; Harlan, J.E.; Yoon, H.S.; Nettesheim, D.; Chang, B.S.; Thompson, C.B.; Wong, S.L.; Ng, S.L.; Fesik, S.W. (1996):

"X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death",
Nature 381 (6580), 335-341

Müller, W.E.G. (1995):

"Molecular phylogeny of Metazoa (animals): monophyletic origin",
Naturwissenschaften 82 (7), 321-329

Müller, W.E.G. (1997):

"Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review",
Cell Tissue Res. 289 (3), 383-395

Müller, W.E.G. (1998):

"Origin of Metazoa: sponges as living fossils",
Naturwissenschaften 85 (1), 11-25

Müller, W.E.G.; Batel, R.; Bihari, N.; Rinkevich, B.; Dapper, J.; Schäcke, H. (1994):

"Organotin-induced apoptosis is modulated by the water pollutant methyl mercury",
in Müller, W.E.G. (ed.): "Use of aquatic invertebrates as tools for monitoring of environmental hazards",
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Müller, W.E.G.; Bernd, A.; Zahn, R.K.; Kurelec, B.; Dawes, K.; Müller, I.; Uhlenbruck, G. (1981):

"Xenograft rejection in marine sponges. Isolation and purification of an inhibitory aggregation factor from *Geodia cydonium*",
Eur. J. Biochem. 116 (3), 573-579

Müller, W.E.G.; Blumbach, B.; Müller, I.M. (1999):

"Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates",
Transplantation 68 (9), 1215-1227

Müller, W.E.G.; Schäcke, H. (1996):

"Characterization of the receptor protein-tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*",
Prog. Mol. Subcell. Biol. 17, 183-208

Müller, W.E.G.; Steffen, R.; Rinkevich, B.; Kurelec, B. (1996):

"Multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*: its potential application in assessment of environmental pollution",
Mar. Biol. 125 (1), 165-170

Mullis, K.B.; Faloona, F.; Scharf, S.J.; Saiki, R.K.; Horn, G.T.; Ehrlich H.A. (1986):

"Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction",
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263-273

Muslin, A.J.; Tanner, J.W.; Allen, P.M.; Shaw, A.S. (1996):

"Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine",
Cell 84 (6), 889-897

Muzio, M.; Stockwell, B.R.; Stennicke, H.R.; Salvesen, G.S.; Dixit, V.M. (1998):

"An induced proximity model for caspase-8 activation",
J. Biol. Chem. 273 (5), 2926-2930

Nagata, S. (1997):

"Apoptosis by death factor",
Cell 88 (3), 355-365

Nathans, D.; Smith, H.O. (1975):

"Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules",
Annu. Rev. Biochem. 44, 273-293

Neufeld, T.P.; Rubin, G.M. (1994):

"The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud-neck filament proteins",
Cell 77 (3), 371-379

Nguyen, M.; Branton, P.E.; Walton, P.A.; Oltvai, Z.N.; Korsmeyer, S.J.; Shore, G.C. (1994):

"Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus",
J. Biol. Chem. 269 (24), 16521-16524

Nguyen, M.; Millar, D.G.; Yong, V.W.; Korsmeyer, S.J.; Shore, G.C. (1993):

"Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence",
J. Biol. Chem. 268 (34), 25265-25268

Nicholas, K.B.; Nicholas, H.B.Jr. (1997):

"GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments",
Version 1.1.004, Vertrieb durch die Autoren

Nicholson, D.W.; Ali, A.; Thornberry, N.A.; Vaillancourt, J.P.; Ding, C.K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P.R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y.A. (1995):

"Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis",
Nature 376 (6535), 37-43

Nicholson, D.W.; Thornberry, N.A. (1997):

"Caspases: killer proteases",
Trends Biochem. Sci. 22 (8), 299-306

Nicotera, P.; Rossi, A.D. (1994):

"Nuclear Ca²⁺: physiological regulation and role in apoptosis",
Mol. Cell. Biochem. 135 (1), 89-98

Nishimura, A.; Morita, M.; Nishimura, Y.; Sugino, Y. (1990):

"A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells",
Nucleic Acids Res. 18 (20), 6169

Oehm, A.; Behrmann, I.; Falk, W.; Pawlita, M.; Maier, G.; Klas, C.; Li-Weber, M.; Richards, S.; Dhein, J.; Trauth, B.C. (1992):

"Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen",
J. Biol. Chem. 267 (15), 10709-10715

Olesen, T.M.; Weeks, J.M. (1994):

"Accumulation of Cd by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas: effects upon filtration rate and its relevance for biomonitoring",
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52 (5), 722-728

Oltvai, Z.N.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J. (1993):

"Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death",
Cell 74 (4), 609-619

Orth, K.; Chinnaiyan, A.M.; Garg, M.; Froelich, C.J.; Dixit, V.M. (1996):

"The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A",
J. Biol. Chem. 271 (28), 16443-16456

Osborne, B.A. (1996):

"Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system",
Curr. Opin. Immunol. 8 (2), 245-254

Pan, G.; O'Rourke, K.; Dixit, V.M. (1998):

"Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex",
J. Biol. Chem. 273 (10), 5841-5845

Pancer, Z.; Münkner, J.; Müller, I.; Müller, W.E.G. (1997):

"A novel member of an ancient superfamily: sponge (*Geodia cydonium*, Porifera) putative protein that features scavenger receptor cysteine-rich repeats",
Gene 193 (2), 211-218

PC/Gene (1995):

"Data Banks CD-Rom, Release 14.0",
IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA

Pearson, W.R.; Lipman, D.J. (1988):

"Improved tools for biological sequence comparison",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 (5), 2444-2448

Petit, P.X.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Mignotte, B.; Kroemer, G. (1996):

"Mitochondria and programmed cell death: back to the future",
FEBS Lett. 396 (1), 7-13

Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F.; Müller, W.E.G. (1993):

"S-type lectins occur also in invertebrates: unusual subunit composition and high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*",
Glycobiology 3 (2), 179-184

Phillips, H.J. (1973):

"Dye exclusion tests for cell viability",
in Kruse, P.F. (ed.): "Tissue Culture",
Academic Press, NY, 407-408

Polla, B.S.; Kantengwa, S.; Francois, D.; Salvioli, S.; Franceschi, C.; Marsac, C.; Cossarizza, A. (1996):

"Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (13), 6458-6463

Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975):

"Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation",
Nature 258 (5536), 598-599

Puthalakath, H.; Huang, D.C.; O'Reilly, L.A.; King, S.M.; Strasser, A. (1999):

"The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex",
Mol. Cell. 3 (3), 287-296

Qiagen (1998):

"The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6×His-tagged proteins",
Qiagen, Hilden

Raff, M.C. (1992):

"Social controls on cell survival and cell death",
Nature 356 (6368), 397-400

Raff, M.C.; Barres, B.A.; Burne, J.F.; Coles, H.S.; Ishizaki, Y.; Jacobson, M.D. (1993):

"Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system",
Science 262 (5134), 695-700

Raffray, M.; Cohen, G.M. (1993):

"Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy *in vivo*",
Arch. Toxicol. 67 (4), 231-236

Ray, C.A.; Black, R.A.; Kronheim, S.R.; Greenstreet, T.A.; Sleath, P.R.; Salvesen, G.S.; Pickup, D.J. (1992):

"Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme",
Cell 69 (4), 597-604

Reed, J.C. (1994):

"Bcl-2 and the regulation of programmed cell death",
J. Cell. Biol. 124 (1-2), 1-6

Reed, J.C. (1997):

"Double identity for proteins of the Bcl-2 family",
Nature 387 (6635), 773-776

Reitner, J.; Mehl, D. (1995):

"Early Paleozoic diversification of sponges: new data and evidences",
Geol. Paläont. Mitt. Innsbruck 20, 335-347

Rheaume, E.; Cohen, L.Y.; Uhlmann, F.; Lazure, C.; Alam, A.; Hurwitz, J.; Sekaly, R.P.; Denis, F. (1997):

"The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 *in vitro* and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis",
EMBO J. 16 (21), 6346-6354

Rothe, M.; Pan, M.G.; Henzel, W.J.; Ayres, T.M.; Goeddel, D.V. (1995):

"The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins",
Cell 83 (7), 1243-1252

Rothman, J.E. (1989):

"Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells",
Cell 59 (4), 591-601

Rotonda, J.; Nicholson, D.W.; Fazil, K.M.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Labelle, M.; Peterson, E.P.; Rasper, D.M.; Ruel, R.; Vaillancourt, J.P.; Thornberry, N.A.; Becker, J.W. (1996):

"The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis",
Nat. Struct. Biol. 3 (7), 619-625

Rudel, T.; Bokoch, G.M. (1997):

"Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2",
Science 276 (5318), 1571-1574

Ryan, J.A. (1997):

"Fish stress proteins as *in vitro* biomarkers",
Dissertation, Universität Connecticut, USA

Sah, N.K.; Taneja, T.K.; Pathak, N.; Begum, R.; Athar, M.; Hasnain, S.E. (1999):

"The baculovirus antiapoptotic p35 gene also functions via an oxidant-dependent pathway",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (9), 4838-4843

Saiki, R.K.; Scharf, S.J.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. (1985):

"Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia",
Science 230 (4732), 1350-1354

- Samali, A.; Holmberg, C.I.; Sistonen, L.; Orrenius, S. (1999):**
"Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins",
FEBS Lett. 461 (3), 306-310
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989):**
"Molecular cloning I-III",
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanders, B.M.; Martin, L.S.; Howe, S.R.; Nelson, W.G.; Hegre, E.S.; Phelps, D.K. (1994):**
"Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations",
Toxicol. Appl. Pharmacol. 125 (2), 206-213
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977):**
"DNA sequencing with chain-terminating inhibitors",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 (12), 5463-5467
- Sarà, M.; Vacelet, J. (1973):**
"Traité de zoologie: Spongiaires. Tome III (1)",
Ed. Grassé, P.P. Masson, Paris, F, 462-576
- Saraste, A.; Pulkki, K. (2000):**
"Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis",
Cardiovasc. Res. 45 (3), 528-537
- Saraste, M.; Sibbald, P.R.; Wittinghofer, A. (1990):**
"The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins",
Trends Biochem. Sci. (11), 430-434
- Sarge, K.D.; Park-Sarge, O.K.; Kirby, J.D.; Mayo, K.E.; Morimoto, R.I. (1994):**
"Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis",
Biol. Reprod. 50 (6), 1334-1343
- Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R.P.; Harlan, J.E.; Eberstadt, M.; Yoon, H.S.; Shuker, S.B.; Chang, B.S.; Minn, A.J.; Thompson, C.B.; Fesik, S.W. (1997):**
"Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis",
Science 275 (5302), 983-986
- Saunders, J.W. (1966):**
"Death in embryonic systems",
Science 154 (749), 604-612
- Schendel, S.L.; Xie, Z.; Montal, M.O.; Matsuyama, S.; Montal, M.; Reed, J.C. (1997):**
"Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (10), 5113-5118
- Schlegel, R.A.; Stevens, M.; Lumley-Sapanski, K.; Williamson, P. (1993):**
"Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes",
Immunol. Lett. 36 (3), 283-288
- Schlesinger, M.J.; Ashburner, M.; Tissieres, A. (1982):**
"Heat Shock. From Bacteria to Man",
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA

Schröder, H.C.; Batel, R.; Lauenroth, S.; Hassanein, H.M.; Lacorn, M.; Simat, T.; Steinhart, H.; Müller, W.E.G. (1999a):

"Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula* Olivi",
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 233 (2), 285-300

Schröder, H.C.; Hassanein, H.M.; Lauenroth, S.; Koziol, C.; Mohamed, T.A.; Lacorn, M.; Steinhart, H.; Batel, R.; Müller, W.E.G. (1999b):

"Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*",
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36 (1), 47-55

Schumann, W. (1997):

"Die molekulare Antwort auf Stress",
in: Mannheimer Forum 96/97: "Ein Panorama der Naturwissenschaften",
Boehringer Mannheim GmbH, 57-104

Searle, J.; Lawson, T.A.; Abbott, P.J.; Harmon, B.; Kerr, J.F. (1975):

"An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells",
J. Pathol. 116 (3), 129-138

Sedlak, T.W.; Oltvai, Z.N.; Yang, E.; Wang, K.; Boise, L.H.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. (1995):

"Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (17), 7834-7838

Seto, M.; Jaeger, U.; Hockett, R.D.; Graninger, W.; Bennett, S.; Goldman, P.; Korsmeyer, S.J. (1988):

"Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma",
EMBO J. 7 (1), 123-131

Shaham, S.; Horvitz, H.R. (1996):

"Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer",
Genes Dev. 10 (5), 578-579

Shibasaki, F.; Kondo, E.; Akagi, T.; McKeon, F. (1997):

"Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2",
Nature 386 (6626), 728-731

Short, J.M.; Fernandez, J.M.; Sorge, J.A.; Huse, W.D. (1988):

"Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties",
Nucleic Acids Res. 16 (15), 7583-7600

Shu, H.B.; Halpin, D.R.; Goeddel, D.V. (1997):

"Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis",
Immunity 6 (6), 751-763

Shub, D.A. (1994):

"Bacterial viruses. Bacterial altruism?",
Curr. Biol. 4 (6), 555-556

Simpson, T.L. (1984):

"The cell biology of sponges",
Springer Verlag, NY, USA

Smith, C.A.; Farrah, T.; Goodwin, R.G. (1994):

"The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death",
Cell 76 (6), 959-962

Smith, T.F.; Waterman, M.S. (1981):

"Identification of common molecular subsequences",
J. Mol. Biol. 147 (1), 195-197

Song, Q.; Kuang, Y.; Dixit, V.M.; Vincenz, C. (1999):

"Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1",
EMBO J. 18 (1), 167-178

Sorger, P.K. (1991):

"Heat shock factor and the heat shock response",
Cell 65 (3), 363-366

Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. (1998):

"Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization",
Mol. Cell. 1 (7), 949-957

Srinivasula, S.M.; Fernandes-Alnemri, T.; Zangrilli, J.; Robertson, N.; Armstrong, R.C.; Wang, L.; Trapani, J.A.; Tomaselli, K.J.; Litwack, G.; Alnemri, E.S. (1996):

"The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2 alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32",
J. Biol. Chem. 271 (43), 27099-27106

Steller, H. (1995):

"Mechanisms and genes of cellular suicide",
Science 267 (5203), 1445-1449

Steller, H.; Grether, M.E. (1994):

"Programmed cell death in *Drosophila*",
Neuron 13 (6), 1269-1274

Strasser, A.; Harris, A.W.; Huang, D.C.; Krammer, P.H.; Cory, S. (1995):

"Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis",
EMBO J. 14 (24), 6136-6147

Stridh, H.; Fava, E.; Single, B.; Nicotera, P.; Orrenius, S.; Leist, M. (1999):

"Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production",
Chem. Res. Toxicol. 12 (10), 874-882

Stridh, H.; Kimland, M.; Jones, D.P.; Orrenius, S.; Hampton, M.B. (1998):

"Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis",
FEBS Lett. 429 (3), 351-355

Sulkowski, E. (1989):

"The saga of IMAC and MIT",
Bioessays 10 (5), 170-175

Suschk, C.V.; Krischel, V.; Bruch-Gerharz, D.; Berendji, D.; Krutmann, J.; Kroncke, K.D.; Kolb-Bachofen, V. (1999):

"Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation",
J. Biol. Chem. 274 (10), 6130-6137

Susin, S.A.; Lorenzo, H.K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Brenner, C.; Larochette, N.; Prevost, M.C.; Alzari, P.M.; Kroemer, G. (1999):

"Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process",
J. Exp. Med. 189 (2), 381-394

Susin, S.A.; Lorenzo, H.K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B.E.; Brothers, G.M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; Larochette, N.; Goodlett, D.R.; Aebersold, R.; Siderovski, D.P.; Penninger, J.M.; Kroemer, G. (1997):

"Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor",
Nature 397 (6718), 441-446

Takasu, T.; Lyons, J.C.; Park, H.J.; Song, C.W. (1998):

"Apoptosis and perturbation of cell cycle progression in an acidic environment after hyperthermia",
Cancer Res. 58 (12), 2504-2508

Tao, W.; Korschner, C.; Morgan, J.I. (1997):

"Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins",
J. Biol. Chem. 272 (24), 15547-15552

Tartaglia, L.A.; Ayres, T.M.; Wong, G.H.; Goeddel, D.V. (1993):

"A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death",
Cell 74 (5), 845-853

Tartaglia, L.A.; Goeddel, D.V. (1992):

"Two TNF receptors",
Immunol. Today 13 (5), 151-153

Thein, S.L.; Lynch, J.R.; Weatherall, D.J.; Wallace, R.B. (1986):

"Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides",
Lancet 1 (8472), 93

Thompson, C.B. (1995):

"Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease",
Science 267 (5203), 1456-1462

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994):

"CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice",
Nucleic Acids Res. 22 (22), 4673-4680

Thornberry, N.A.; Bull, H.G.; Calaycay, J.R.; Chapman, K.T.; Howard, A.D.; Kostura, M.J.; Miller, D.K.; Molineaux, S.M.; Weidner, J.R.; Aunins, J. (1992):

"A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes",
Nature 356 (6372), 768-774

Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. (1998):

"Caspases: Enemies within",
Science 281 (5381), 1312-1316

Thornberry, N.A.; Rano, T.A.; Peterson E.P.; Rasper, D.M.; Timkey, T.; Garcia-Calvo, M.; Houtzager, V.M.; Nordstrom, P.A.; Roy, S.; Vaillancourt, J.P.; Chapman, K.T.; Nicholson, D.W. (1997):

"A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis",
J. Biol. Chem. 272 (29), 17907-17911

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979):

"Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (9), 4350-4354

Towler, D.A.; Gordon, J.I.; Adams, S.P.; Glaser, L. (1988):

"The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation",
Annu. Rev. Biochem. 57, 69-99

Trump, B.F.; Goldblatt, P.J.; Stowell, R.E. (1965):

"Studies of mouse liver necrosis *in vitro*. Ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei",
Lab. Invest. 14 (11), 1969-1999

Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E.; Croce, C.M. (1985):

"Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma",
Science 228 (4706), 1440-1443

Tsujimoto, Y.; Croce, C.M. (1986):

"Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83 (14), 5214-5218

Turner, P.R.; Mefford, S.; Christakos, S.; Nissenson, R.A. (2000):

"Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP)",
Mol. Endocrinol. 14 (2), 241-254

Ullmann, A; Jacob, F.; Monod, J. (1967):

"Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*",
J. Mol. Biol. 24 (2), 339-343

Uren, A.G.; Coulson, E.J.; Vaux, D.L. (1998):

"Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts",
Trends Biochem. Sci. 23 (5), 159-162

Vander-Heiden, M.G.; Chandel, N.S.; Williamson, E.K.; Schumacker, P.T.; Thompson, C.B. (1997):

"Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria",
Cell 91 (5), 627-637

Van-Furth, R.; Van-Zwet, T.L. (1988):

"Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells",
J. Immunol. Methods 108 (1-2), 45-51

Vaux, D.L. (1997):

"CED-4—the third horseman of apoptosis",
Cell 90 (3), 389-390

Vaux, D.L.; Aguila, H.L.; Weissman, I.L. (1992a):

"Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing",
Int. Immunol. 4 (7), 821-824

Vaux, D.L.; Cory, S.; Adams, J.M. (1988):

"Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells",
Nature 335 (6189), 440-442

Vaux, D.L.; Haeccker, G.; Strasser, A. (1994):

"An evolutionary perspective on apoptosis",
Cell 76 (5), 777-779

Vaux, D.L.; Strasser, A. (1996):

"The molecular biology of apoptosis",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (6), 2239-2244

Vaux, D.L.; Weissman, I.L. (1993):

"Neither macromolecular synthesis nor myc is required for cell death via the mechanism that can be controlled by Bcl-2",
Mol. Cell. Biol. 13 (11), 7000-7005

Vaux, D.L.; Weissman, I.L.; Kim, S.K. (1992b):

"Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2",
Science 258 (5090), 1955-1957

Verdenal, B.; Diana, C.; Arnoux, A.; Vacelet, J. (1990):

"Pollutant levels in Mediterranean commercial sponges",
in Rützler, K. (ed.): "New Perspectives in Sponge Biology",
Smithsonian Institution Press, Washington, USA

Vermes, I.; Haanen, C. (1994):

"Apoptosis and programmed cell death in health and disease",
Adv. Clin. Chem. 31, 177-246

Viviani, B.; Rossi, A.D.; Chow, S.C.; Nicotera, P. (1995):

"Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells",
Neurotoxicology 16 (1), 19-25

Vogel, S. (1977):

"Current induced flow through living sponges in nature",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 (5), 2069-2071

Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979):

"Preparative and analytical purification of DNA from agarose",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (2), 615-619

Vogt, C. (1842):

"Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte *Alytes obstreticans*",
Jent & Gassman, Solothurn, Schweiz

Von-Freeden-Jeffry, U.; Solvason, N.; Howard, M.; Murray, R. (1997):

"The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression",
Immunity 7 (1), 147-154

Wagner, C.; Steffen, R.; Koziol, C.; Batel, R.; Lacorn, M.; Steinhart, H.; Simat, T.; Müller, W.E.G. (1998):

"Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria)",
Mar. Biol. 131 (3), 411-421

Waldmann, P.; Pivcevic, B.; Müller, W.E.G.; Zahn, R.K.; Kurelec, B. (1994):

"Increased genotoxicity of aminoanthracene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: Studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*",
in Müller, W.E.G. (ed.): "Use of aquatic invertebrates as tools for monitoring of environmental hazards",
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Walker, N.P.; Talanian, R.V.; Brady, K.D.; Dang, L.C.; Bump, N.J.; Ferenz, C.R.; Franklin, S.; Ghayur, T.; Hackett, M.C.; Hammill, L.D. (1994):

"Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer",
Cell 78 (2), 343-352

Weber, K.; Osborn, M. (1969):

"The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis",
J. Biol. Chem. 244 (16), 4406-4412

- Weiss, B.; Jacquemin-Sablon, A.; Live, T.R.; Fareed, G.C.; Richardson, C.C. (1968):**
"Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4",
J. Biol. Chem. 243 (17), 4543-4555
- Wempe, F.; Einspanier, R.; Scheit, K.H. (1992):**
"Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein",
Biochem. Biophys. Res. Commun. 183 (1), 232-237
- Wen, L.P.; Fahrni, J.A.; Troie, S.; Guan, J.L.; Orth, K.; Rosen, G.D. (1997):**
"Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis",
J. Biol. Chem. 272 (41), 26056-26061
- Westermeier, R.; Gronau, S.; Schickle, H. (1989):**
"Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen",
Pharmacia, Freiburg, Sonderdruck SD 072
- Westheide, W.; Rieger, R. (1996):**
"Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere",
Gustav Fischer Verlag, Jena & Stuttgart & New York
- Wiens, M.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.; Batel, R.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (1998):**
"Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*: novel biomarkers for polychlorinated biphenyls",
Mar. Ecol. Prog. Ser. 165, 247-257
- Wiens, M.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1999a):**
"A homolog of the putative tumor suppressor QM in the sponge *Suberites domuncula*: downregulation during the transition from immortal to mortal (apoptotic) cells",
Tissue Cell 31 (2), 163-169
- Wiens, M.; Seack, J.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.A.; Steffen, R.; Korzhev, M.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (1999b):**
"17[beta]-Estradiol-dependent regulation of chaperone expression and telomerase activity in the marine sponge *Geodia cydonium*",
Mar. Biol. 133 (1), 1-10
- Wiley, S.R.; Schooley, K.; Smolak, P.J.; Din, W.S.; Huang, C.P.; Nicholl, J.K.; Sutherland, G.R.; Smith, T.D.; Rauch, C.; Smith, C.A. (1995):**
"Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis",
Immunity 3 (6), 673-682
- Wilkinson, C.R.; Garrone, R. (1980):**
in Smith, D.C.; Tiffon, Y. (eds.): "Nutrition in the lower metazoa",
Pergamon Press, Oxford, UK
- Williams, G.T. (1991):**
"Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis",
Cell 65 (7), 1097-1098
- Willmer, P. (1994):**
"Invertebrate relationships",
Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Wilson, K.P.; Black, J.A.; Thomson, J.A.; Kim, E.E.; Griffith, J.P.; Navia, M.A.; Murcko, M.A.; Chambers, S.P.; Aldape, R.A.; Raybuck, S.A. (1994):**
"Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme",
Nature 370 (6487), 270-275

Winkler, A.; Fickel, J.; Melzig, M.F. (1994):

"Efficient removal of hybridization signal from RNA dot blots probed with digoxigenin-labeled cRNA",
BioTech. 16 (1), 61-62

Wu, C.; Clos, J.; Giorgi, G.; Haroun, R.I.; Kim, S.J.; Rabindran, S.K.; Westwood, J.T.; Wisniewski, J.; Yim, G. (1994):

"Structure and regulation of heat shock transcription factor",
in Morimoto, R.; Tissières, A.; Georgopoulos, C. (eds.): "The biology of heat shock proteins and molecular chaperones",
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 395-416

Wu, D.; Wallen, H.D.; Nunez, G. (1997):

"Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9",
Science 275 (5303), 1126-1129

Wyllie, A.H. (1987):

"Apoptosis: cell death in tissue regulation",
J. Pathol. 153 (4), 313-316

Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.; Currie, A.R. (1980):

"Cell death: the significance of apoptosis",
Int. Rev. Cytol. 68, 251-306

Xiang, J.; Chao, D.T.; Korsmeyer, S.J. (1996):

"BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases",
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (25), 14559-14563

Xiong, J.W.; Leahy, A.; Stuhlmann, H. (1999):

"Retroviral promoter-trap insertion into a novel mammalian septin gene expressed during mouse neuronal development",
Mech. Dev. 86 (1-2), 183-191

Xue, D.; Horvitz, H.R. (1997):

"*Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor",
Nature 390 (6657), 305-308

Yamauchi, K. (1991):

"The sequence flanking translational initiation site in protozoa",
Nucleic Acids Res. 19 (10), 2715-2720

Yang, E.; Korsmeyer, S.J. (1996):

"Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death",
Blood 88 (2), 386-401

Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C.N.; Ibrado, A.M.; Cai, J.; Peng, T.I.; Jones, D.P.; Wang, X. (1997):

"Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked",
Science 275 (5303), 1129-1132

Yang, E.; Zha, J.; Jockel, J.; Boise, L.H.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. (1995):

"Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death",
Cell 80 (2), 285-291

Yarmolinsky, M.B. (1995):

"Programmed cell death in bacterial populations",
Science 267 (5199), 836-837

Yin, X.M.; Oltvai, Z.N.; Korsmeyer, S.J. (1994):

"BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax",
Nature 369 (6478), 321-323

- Yuan, J.; Shaham, S.; Ledoux, S.; Ellis, H.M.; Horvitz, H.R. (1993):**
"The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme",
Cell 75 (4), 641-652
- Zamzami, N.; Brenner, C.; Marzo, I.; Susin, S.A.; Kroemer, G. (1998):**
"Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins",
Oncogene 16 (17), 2265-2282
- Zamzami, N.; Susin, S.A.; Marchetti, P.; Hirsch, T.; Gomez-Monterrey, I.; Castedo, M.; Kroemer, G. (1996):**
"Mitochondrial control of nuclear apoptosis",
J. Exp. Med. 183 (4), 1533-1544
- Zarkower, D.; Stephenson, P.; Sheets, M.; Wickens, M. (1986):**
"The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus pre-mRNA *in vitro*",
Mol. Cell. Biol. 6 (7), 2317-2323
- Zaucke, F.; Zoeltzer, H.; Krug, H.F. (1998):**
"Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells in organotin compounds",
Fresenius J. Anal. Chem. 361 (4), 386-392
- Zazueta, C.; Reyes-Vivas, H.; Bravo, C.; Pichardo, J.; Corona, N.; Chavez, E. (1994):**
"Triphenyltin as inductor of mitochondrial membrane permeability transition",
J. Bioenerg. Biomembr. 26 (4), 457-462
- Zha, H.; Aime-Sempe, C.; Sato, T.; Reed, J.C. (1996a):**
"Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2",
J. Biol. Chem. 271 (13), 7440-7444
- Zha, J.; Harada, H.; Osipov, K.; Jockel, J.; Waksman, G.; Korsmeyer, S.J. (1997):**
"BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity",
J. Biol. Chem. 272 (39), 24101-24104
- Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J.; Korsmeyer, S.J. (1996b):**
"Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)",
Cell 87 (4), 619-628
- Zhu, W.; Cowie, A.; Wasfy, G.W.; Penn, L.Z.; Leber, B.; Andrews, D.W. (1996):**
"Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types",
EMBO J. 15 (16), 4130-4141
- Zong, W.X.; Edelstein, L.C.; Chen, C.; Bash, J.; Gelinas, C. (1999):**
"The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNF-alpha-induced apoptosis",
Genes Dev. 13 (4), 382-387
- Zou, H.; Henzel, W.J.; Liu, X.; Lutschg, A.; Wang, X. (1997):**
"Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3",
Cell 90 (3), 405-413

8 Abkürzungsverzeichnis

8.1 Abkürzungen, Akronyme und Summenformeln

A

A	Ampère(s)
Abb.	Abbildung
Acc. No.	Genbank <i>accession number</i>
Ak	Antikörper
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
Apo2	<i>TNF-related apoptosis inducing receptor</i>
Apo2L	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aq. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat

B

Bad	<i>Bcl-2-homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma/leukaemia gene 2</i>
BH-Domäne	Bcl-2 Homologie Domäne
BHP	Bcl-2-homologes Protein aus <i>G. cydonium</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
bp	<i>base pair(s)</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>

C

°C	Grad Celsius
CAD	<i>Caspase Activated Deoxyribonuclease</i>
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
CARD	<i>Caspase-Recruitment Domain</i>
CBS	<i>Chemiluminescence Blotting Substrate</i>
<i>C. coturnix</i>	<i>Coturnix coturnix</i>
CD95	<i>Cluster of Differentiation 95</i>
CD95L	CD95 Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDP-Star	<i>Disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan-4-yl)-1-phenyl phosphate</i>
ced	<i>cell death abnormal</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cGMP	Guanosin-3',5'-monophosphat
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
C-terminal	carboxyterminal
Cy3	Indocarbocyanin 3

D

$\Delta\varphi_m$	mitochondriale Membranpotentialänderung
DcR	<i>Decoy Receptor</i>
DD	<i>Death Domain</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethanol
DED	<i>Death Effector Domain</i>
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

	DIG	Digoxigenin
	<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
	DMPC	Dimethylpyrocarbonat
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
	DNase	Desoxyribonuklease
	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
	DR4/5	<i>Death Receptor 4/5</i>
	DTT	1,4-Dithiothreitol
	dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
E		
	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
	ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
F		
	FADD	<i>FAS-Associated Death Domain</i>
	FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
	fl.	flüssig
	FLIP	<i>FADD-Like ICE Inhibitory Protein</i>
G		
	g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
	g	Gramm
	<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
	<i>GCBHP</i>	Bcl-2-homologes Protein aus <i>G. cydonium</i>
	<i>GCSEPI</i>	Septin-Homolog aus <i>G. cydonium</i>
	<i>G. cydonium</i>	<i>Geodia cydonium</i>
	GSCN	Guanidinthiocyanat
	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
	gU	große Untereinheit
H		
	h	Stunde(n)
	HCl	Salzsäure
	HEK	<i>Human Embryonal Kidney cells</i>
	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
	His	Histidin
	H ₂ O	Wasser
	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
	HSP70	Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa
I		
	IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
	ICE	<i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>
	IgG	Immunglobulin G
	IL-3	Interleukin-3
	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
	IR	infrarot
J		
	JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
K		
	kb	<i>kilobase(s)</i>
	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilodalton
	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
	KOH	Kaliumhydroxid
	kU	kleine Untereinheit

L		
	l	Liter
	LB	Luria Bertani
	log	logarithmisch
M		
	m	Meter
	M	molar [mol/l]
	mA	Milliampère(s)
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
	min	Minute(n)
	mJ	Millijoule(s)
	ml	Milliliter
	mm	Millimeter
	mM	millimolar
	<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
	MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
	mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i>
	MXR	Multixenobiotischer Resistenzmechanismus
	µl	Mikroliter
	µM	mikromolar
N		
	NaCl	Natriumchlorid
	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
	NaOH	Natriumhydroxid
	Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
	NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
	nF-κB	<i>nuclear Factor κchain transcription in B cells</i>
	ng	Nanogramm
	NIH/3T3	NIH <i>Swiss mouse embryonal cells</i>
	nm	Nanometer
	Nt _{-x}	Nukleotid des 5'-nichtkodierenden Bereichs einer cDNA
	Nt _x	Nukleotid des kodierenden bzw. des 3'-nichtkodierenden Bereichs einer cDNA
	NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
	N-terminal	aminoterminal
O		
	OD	Optische Dichte
P		
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
	pfu	<i>plaque forming units</i>
	pH	<i>potentia hydrogenii</i>
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	POD	Peroxidase
	PVDF	Polyvinylidendifluorid
R		
	Raf-1	<i>Regulator of afetoprotein-1</i>
	RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
	RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
	RNase	Ribonuklease
	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
	rpm	<i>rounds per minute</i>
	<i>R. rattus</i>	<i>Rattus rattus</i>
	rRNA	ribosomale RNA
	RT	Raumtemperatur
	RT	Reverse Transkription

S	
S	Svedberg-Einheit (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
sec	Sekunde(n)
SEP1	Septin-Homolog aus <i>G. cydonium</i>
SM	<i>Suspension Medium</i>
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>
SSPE	<i>Saline-Sodium Phosphate-EDTA</i>
T	
Tab.	Tabelle
TBE	<i>Tris Borate EDTA buffer</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBT	<i>Tributyltin chloride</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Primer-Schmelztemperatur
TNF(R)	Tumor-Nekrose-Faktor (-Rezeptor)
TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TRAF2	<i>TNFR-Associated Factor 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Poly(oxyethylen) ₂₀ -sorbitan-monolaurat
U	
U	<i>unit(s)</i>
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
W	
w/v	<i>weight per volume</i>
X	
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat

8.2 Abkürzungscodes für Aminosäuren und Basen

Aminosäure	Einbuchstabencode	Aminosäure	Einbuchstabencode
Alanin	A	Arginin	R
Asparagin	N	Aspartat	D
Cystein	C	Glutamat	E
Glutamin	Q	Glycin	G
Histidin	H	Isoleucin	I
Leucin	L	Lysin	K
Methionin	M	Phenylalanin	F
Prolin	P	Serin	S
Threonin	T	Tryptophan	W
Tyrosin	Y	Valin	V

Base	Buchstabencode
Adenin	A
Cytosin	G
Guanin	C
Thymin	T
Uracil	U

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben. Des weiteren versichere ich, daß ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

Publikationsliste

Schröder, H.C.; Wiens, M.; Kuusksalu, A.; Kelve, M.; Müller, W.E.G. (1997):

"Modulation of 2'-5'oligoadenylate synthetase by environmental stress in the marine sponge *Geodia cydonium*",
Environ. Toxicol. Chem. 16 (7), 1403-1409

Schröder, H.C.; Badria, F.A.; Ayyad, S.N.; Batel, R.; Wiens, M.; Hassanein, H.M.A.; Kurelec, B.; Müller, W.E.G. (1998):

"Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*",
Environ. Toxicol. Pharmacol. 5 (2), 119-126

Wiens, M.; Koziol, C.; Batel, R.; Müller, W.E.G. (1998):

"Phenylalanine hydroxylase from the sponge *Geodia cydonium*: implication for allorecognition and evolution of aromatic amino acid hydroxylases",
Dev. Comp. Immunol. 22 (5-6), 469-478

Wiens, M.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.; Batel, R.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (1998):

"Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachloro-biphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*: novel biomarkers for polychlorinated biphenyls",
Mar. Ecol. Prog. Ser. 165, 247-257

Müller, W.E.G.; Koziol, C.; Müller, I.M.; Wiens, M. (1999):

"Towards an understanding of the molecular basis of immune responses in sponges: the marine demosponge *Geodia cydonium* as a model",
Microsc. Res. Tech. 44 (4), 219-236

Müller, W.E.G.; Wiens, M.; Batel, R.; Steffen, R.; Schröder, H.C.; Borojevic, R.; Custodio, M.R. (1999):

"Establishment of a primary cell culture from a sponge: Primmorphs from *Suberites domuncula*",
Mar. Ecol. Prog. Ser. 178, 205-219

Wiens, M.; Koziol, C.; Batel, R.; Müller, W.E.G. (1999):

"Prolidase in the marine sponge *Suberites domuncula*: enzyme activity, molecular cloning, and phylogenetic relationship",
Mar. Biotech. 1 (2), 191-199

Wiens, M.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1999):

"A homolog of the putative tumor suppressor QM in the sponge *Suberites domuncula*: downregulation during the transition from immortal to mortal (apoptotic) cells",
Tissue Cell 31 (2), 163-169

Wiens, M.; Kuusksalu, A.; Kelve, M.; Müller, W.E.G. (1999):

"Origin of the interferon-inducible (2'-5')oligoadenylate synthetases: cloning of the (2'-5')oligoadenylate synthetase from the marine sponge *Geodia cydonium*",
FEBS Lett. 462 (1-2), 12-18

Wiens, M.; Lukic, L.; Müller, W.E.G.; Gamulin, V. (1999):

"Ubiquitins (polyubiquitin and ubiquitin extension protein) in marine sponges: cDNA sequence and phylogenetic analysis",
Biol. J. Linnean Soc. 67 (1), 43-56

Wiens, M.; Seack, J.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.A.; Steffen, R.; Korzhev, M.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (1999):

"17[beta]-Estradiol-dependent regulation of chaperone expression and telomerase activity in the marine sponge *Geodia cydonium*",
Mar. Biol. 133 (1), 1-10

Wiens, M.; Ammar, M.S.A.; Nawar, A.H.; Koziol, C.; Hassanein, H.M.A.; Eisinger, M.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (2000):

"Induction of heat-shock (stress) protein gene expression by selected natural and anthropogenic disturbances in the octocoral *Dendronephthya klunzingeri*",
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 245 (2), 265-276

Wiens, M.; Krasko, A.; Blumbach, B.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (2000):

"Increased expression of the potential proapoptotic molecule DD2 and increased synthesis of leukotriene B4 during allograft rejection in a marine sponge",
Cell Death Differ. 7 (5), 461-469

Wiens, M.; Krasko, A.; Müller, C.I.; Müller, W.E.G. (2000):

"Molecular evolution of apoptotic pathways: cloning of key domains from sponges (Bcl-2 homology domains and death domains) and their phylogenetic relationships",
J. Mol. Evol. 50 (6), 520-531

Wiens, M.; Diehl-Seifert, B.; Müller, W.E.G. (2001):

"Sponge Bcl-2 homologous protein (BHP2-GC) confers distinct stress resistance to human *HEK-293* cells",
Cell Death Differ, *in pres*

