

**"Identifizierung und Charakterisierung neuer Proteine
des Abwehrsystems der Porifera
- ein Apoptoseregulator und ein antimikrobielles Protein
aus dem Schwamm *Suberites domuncula*"**

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

vorgelegt von
Stefanie Baumhauer-Klein
geb. in Wiesbaden

Mainz, 2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Apoptose.....	1
1.1.1 Historisches und Einführendes	1
1.1.2 Morphologische Veränderungen einer Zelle in Apoptose	2
1.1.3 Molekulare Wege in die Apoptose	3
1.1.4 Die Caspasen	6
1.1.5 Die Bcl-2 Familie	8
1.1.6 Die IAPs	8
1.1.7 TNF und TNF-Rezeptoren	9
1.1.8 Die Apoptose in Porifera	11
1.2 Das Immunsystem	12
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	12
1.2.2 Das adaptive Immunsystem.....	14
1.2.3 Das Immunsystem der Porifera	15
1.2.4 Antimikrobielle Peptide	16
1.3 Die Porifera.....	21
1.3.1 Übersicht	21
1.3.2 Morphologie.....	22
1.3.3 Symbiosen	24
1.3.4 Der Grundbauplan der Porifera	25
1.3.5 Systematik	26
1.3.6 Die Monophylie der Metazoa.....	26
1.3.7 Suberites domuncula	27
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	29
3 MATERIAL	30
3.1 Chemikalien.....	30
3.1.1 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits	32
3.1.2 Enzyme, entsprechende Puffer und Lösungen	33
3.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien	33
3.2 Antikörper	36
3.3 Verbrauchsmaterial	36
3.4 Geräte.....	37
3.5 Bakterienstämme	38
3.6 Hefestämme	39
3.7 Längen- und Gewichtsstandarts	39
3.8 Zelllinien	39
3.9 cDNA Bank	39
3.10 Vektoren.....	40
3.10.1 Klonierungsvektoren	40

3.10.2 Expressionsvektoren.....	40
3.11 Primer	40
3.11.1 Vektorspezifische Primer (pGEM [®] -T)	40
3.11.2 Gelabelte Primer (pGEM [®] -T und TOPO [®])	40
3.11.3 Genspezifische Primer	40
3.11.4 Sondenprimer	41
3.11.5 Expressionsprimer	41
3.12 Computerprogramme	41
4 METHODEN	43
4.1 Primerdesign.....	43
4.1.1 PCR Primer	43
4.1.2 Sondenprimer	44
4.1.3 Degenerierte Primer	44
4.1.4 Primer für Restriktionsverdau	44
4.1.5 Primer für Expressionen	45
4.2 Die Polymerase Kettenreaktion	45
4.2.1 Standard-PCR-Reaktion	46
4.2.2 Subklonierung mittels PCR	47
4.2.3 Checking-PCR.....	47
4.2.4 Nested-PCR.....	48
4.2.5 Touchdown-PCR.....	48
4.2.6 Labeling-PCR zur Erstellung von DNA-Sonden.....	49
4.3 Reverse Transkription von mRNA mit gekoppelter PCR (RT-PCR) „reverse transcription polymerase chain reaction“.....	50
4.4 Rapid amplification of cDNA Ends: RACE PCR.....	51
4.5 Gelelektrophorese	52
4.5.1 Herstellung der Gele.....	53
4.5.2 Analytische RNA-Agarosegele	53
4.5.3 Sequenzier-Gel	54
4.5.4 Detektion der Nukleinsäuren im Gel	55
4.6 DNA Extraktion und Aufreinigung	56
4.6.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
4.6.2 Aufreinigung von PCR-Produkten	57
4.6.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	57
4.6.4 Mini-Plasmidpräparation.....	58
4.6.5 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	58
4.7 Inkubationsversuche.....	58
4.8 RNA-Extraktion	59
4.8.1 Präparation der Materialien und Reagenzien.....	59
4.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Schwammgewebe.....	60
4.9 Synthese von cDNA mit dem GeneRacer[™]-Kit	61
4.10 Restriktionsverdau.....	61
4.11 Ligation linearer DNA	62
4.11.1 Ligation in den pGEM [®] -T-Vektor.....	63
4.11.2 Ligation in einen TOPO-Vektor.....	63

4.12 Transformation	63
4.12.1 Transformation von NovaBlue Singles™ Competent Cells (<i>E. coli</i>)	64
4.12.2 Transformation von One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells (<i>E. coli</i>)	64
4.12.3 Transformation von BL21 (DE3) Singles™ Competent Cells (<i>E. coli</i>)	65
4.12.4 Blau–Weiß-Selektion rekombinanter Klone	65
4.12.5 Bakterien–Flüssigkulturen.....	66
4.12.6 Kryokonservierung.....	66
4.13 DNA-Sequenzierung nach Sanger	67
4.13.1 Sequenzierreaktion	67
4.13.2 Sequenziergel	68
4.13.3 Sequenz-Auswertung.....	69
4.14 ProQuest™ Two Hybrid System	69
4.14.1 Das Gateway®-System und die benötigten Vektoren	72
4.14.2 Konstruieren des Testplasmids	72
4.14.3 Herstellung der benötigten Lösungen, Platten und Medien.....	74
4.14.4 „Subcloning scale“ Transformation der Hefe.....	76
4.14.5 „Library scale“ Transformation der Hefe	77
4.14.6 Detektion der Interaktion.....	78
4.15 Northern Blot-Analyse	79
4.15.1 Grundlagen.....	79
4.15.2 Präparation der verwendeten RNA-Proben	79
4.15.3 Gelelektrophoretische Auftrennung	79
4.15.4 RNA-Transfer (Blotting).....	80
4.15.5 Primäre Hybridisierung	81
4.15.6 Waschschritte	81
4.15.7 Sekundäre Hybridisierung.....	82
4.15.8 Detektion	82
4.16 Expression	83
4.16.1 Expression rekombinanter Proteine in Prokaryoten	83
4.16.2 Ligation in Exprsionsvektoren.....	83
4.16.3 Expression mit dem pTrcHis2 TOPO® TA Expressions Kit	83
4.16.4 Expression mit dem Gateway® pDEST™17-Vektor.....	84
4.16.5 Expression mit dem pBAD/gIII A-Vektor	86
4.16.6 Transformation eines Expressionsklons in kompetente <i>E. coli</i> Zellen:	86
4.16.7 Pilotexpression	87
4.16.8 Löslichkeitstest.....	88
4.16.9 Expression von Genen zur Proteinaufreinigung	88
4.16.10 Expression des SD_TNFR Proteins bei 4 °C.....	88
4.16.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	89
4.16.12 Herstellung der SDS-Gele	90
4.16.13 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	91
4.17 Western Blotting	91
4.17.1 Dot Blot zur Verifizierung der SD_TNFR-like Expression in vivo	92
4.18 Proteinaufreinigung	92
4.18.1 Extraktion unter nativen Bedingungen	93
4.18.2 Extraktion unter denaturierenden Bedingungen	94
4.19 Quantifizierung der Protein-Konzentration nach Bradford	95
4.20 Herstellung polyklonaler Antikörper	96
4.20.1 Immunisierung und Serumzubereitung	96
4.20.2 Bestimmung des Antikörpertiters.....	96

4.21 RAW-Blue™-Zellen	97
4.21.1 Kultivierung der Zellen	98
4.21.2 Detektion der NF - κ B Aktivierung	99
4.22 Antimikrobieller Test	99
4.23 Immunohistologische Färbungen	99
5 ERGEBNISSE	101
5.1 Vervollständigung eines Klons mit DD aus <i>Suberites domuncula</i>	101
5.1.1 PCR-Screening der cDNA-Bank.....	101
5.1.2 Identifizierung des Komplettklons des potentiellen <i>SD_TNFR-like</i> Klons	101
5.1.3 Analyse der Sequenz des <i>SD_TNFR-like</i> Proteins	101
5.1.4 Analyse der abgeleiteten AS-Sequenz des <i>SD_TNFR-like</i>	103
5.2 Die genomische Sequenz des <i>SD_TNFR-like</i> Gens	107
5.3 Yeast Two Hybrid Analyse mit dem <i>SD_TNFR-like</i> Gen	109
5.4 Identifizierung und Charakterisierung des <i>SD_Brevinin-like</i> Klons aus <i>Suberites domuncula</i>	111
5.4.1 Identifizierung des Komplettklons des <i>SD_Brevinin-like</i> Klons	111
5.4.2 Analyse der Sequenz des <i>SD_Brevinin-like</i> Proteins	111
5.4.3 Analyse der abgeleiteten AS-Sequenz des <i>SD_Brevinin-like</i> aus <i>S. domuncula</i>	112
5.5 Die genomische Sequenz des <i>SD_Brevinin-like</i> Gens	114
5.6 Prüfung möglicher Induktionsmechanismen	115
5.6.1 Inkubationsexperimente mit potentiellen Induktoren des <i>SD_TNFR-like</i> Gens und Nachweis der mRNA-Transkripte mittels Northern-Transfer	115
5.6.2 Inkubationsexperimente mit potentiellen Induktoren des <i>SD_Brevinin-like</i> Gens und Nachweis der mRNA-Transkripte mittels Northern-Transfer	115
5.7 Expression der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i>	116
5.7.1 Expression des <i>SD_TNFR-like</i> Proteins	116
5.7.2 Expression des <i>SD_Brevinin-like</i> Proteins.....	119
5.8 Expression des <i>SD_TNFR-like</i> Proteins in <i>S. domuncula</i>	120
5.9 Antimikrobieller Test	121
5.10 Induktion des NF - κB Wegs in RAW-Blue™ Zellen	122
5.11 Immunohistologische Analysen	124
5.12 Phylogenetische Analyse der Domänen des <i>SD_TNFR-like</i>	126
6 DISKUSSION	128
6.1 Identifizierung der <i>SD_TNFR-like</i> und <i>SD-Brevinin-like</i> Proteine aus <i>S. domuncula</i>	129
6.2 Sequenzanalyse der <i>SD_TNFR-like</i> und <i>SD-Brevinin-like</i> Proteine aus <i>S. domuncula</i>	129
6.2.1 Sequenzanalyse des <i>SD_TNFR-like</i>	129

6.2.2 Sequenzanalyse des SD_Brevinin-like	130
6.3 Strukturelle Analysen der SD_TNFR-like und SD-Brevinin-like Proteine aus S. domuncula.....	131
6.3.1 Analyse des SD_TNFR-like Proteins	131
6.3.2 Analyse des SD_Brevinin-like Proteins	133
6.3.3 Die Domänen des SD_TNFR-like Proteins.....	134
6.3.4 Die Domäne des SD_Brevinin-like Proteins	136
6.4 Untersuchungen des SD_TNFR-like Proteins	137
6.5 Untersuchungen des SD_Brevinin-like Proteins.....	140
6.6 Potentielle Wirkungsmechanismen der Schwammproteine SD_TNFR-like und SD_Brevinin-like	143
6.6.1 Das SD_TNFR-like Protein zählt zu den Adaptermolekülen	143
6.6.2 Das SD_TNFR-like Protein zählt zu den Rezeptoren	145
6.6.3 Die Wirkung des antimikrobiellen SD_Brevinin-like Proteins	146
6.6.4 Interaktion der beiden Schwammproteine.....	147
7 ZUSAMMENFASSUNG	149
8 LITERATURVERZEICHNIS	153
9 VERZEICHNISSE.....	166
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	166
9.2 Tabellenverzeichnis.....	167
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	168
DANKSAGUNGEN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einleitung

1.1 Die Apoptose

1.1.1 Historisches und Einführendes

Bis vor einigen Jahren wurde der Zelltod als ein Ereignis betrachtet, dass für den Organismus grundsätzlich negativ ist. Dass der Zelltod wichtige regulatorische Funktionen für Entwicklung und Erhalt des Organismus besitzt und damit einen zentralen Teil des Lebens darstellt, war eine überraschende Entdeckung. Einer der ersten Berichte über den natürlich auftretenden Zelltod stammt aus dem Jahre 1842 als Vogt den Tod von Knorpelzellen im Verlauf der Entwicklung von Amphibien beobachtete und beschrieb (Clarke und Clarke, 1995). Es sollte allerdings noch fast hundert Jahre dauern bis die Wissenschaft erkannte, dass der gezielte Tod von Zellen in Organismen nicht nur einfach eine Zelle gegen eine andere ersetzt, sondern dass diesem Prozess zentrale Funktionen sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Organismus zukommen. Die mit dem Zelltod verbundenen morphologischen Ereignisse wurden 1885 von Flemming geschildert und zusammenfassend als *Chromatolyse* bezeichnet. Dieser Name wurde benutzt, bis Lockshin und Williams (1964) den Begriff „programmierter Zelltod“ zur Beschreibung der im Verlauf der Transformation einer Mottenlarve zur Adultform auftretenden Eliminierung spezifischer Zellen prägten. Im Jahre 1972 wurde schließlich, als zusammenfassende Umschreibung für die im Verlauf der zellulären Selbstzerstörung auftretenden morphologischen Veränderungen, der Begriff Apoptose (gr. *apo* = ab, weg los; *ptosis* = Senkung) eingeführt (Kerr, Wyllie, Currie, 1972), der ursprünglich den Fall der Blätter im Herbst beschreibt.

Die Apoptose ist ein evolutionär von Porifera über Insekten, bis zu Vertebraten konservierter Vorgang, für dessen Existenz ebenfalls in Pilzen (Cornillon *et al.*, 1994) und Pflanzen (Mittler und Lam, 1995) Hinweise entdeckt wurden. Sie ist essentiell für die Eliminierung redundanter Zellen während der Embryogenese, Zellverkümmern durch Verlust von essentiellen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, Gewebekonstruktion und -reparatur und Vernichtung genetisch veränderter Zellen. Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle. So erfolgt während der Entwicklung des Embryos die Formgebung von Körper und Organen durch diesen Vorgang. Im adulten Organismus spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der Gewebehomöostase; Zellen deren DNA aufgrund äußerer Einflüsse, wie ionisierender Strahlung, geschädigt wurden (Lowe *et al.*, 1993) werden dadurch eliminiert um den Körper zu schützen. Zelluläre

Eliminierungsvorgänge treten meist in Geweben mit hohem Zellumsatz auf, zusammengenommen werden etwa 10^{11} Zellen am Tag durch Apoptose eliminiert. Die zentralen Vorgänge während der Apoptose lassen sich in die folgenden drei Phasen einteilen:

- Initiationsphase:** Proapoptotische Stimuli leiten die Aktivierung der molekularen „Apoptosemaschinerie“ ein
- Effektorphase :** Aktivierung der molekularen „Vollstreckungsmaschinerie“
- Abbauphase :** Morphologische Veränderungen und DNA-Fragmentierung.

Der Apoptose wird die Nekrose gegenübergestellt, bei der es sich um eine Form des Zelltods handelt, die nicht von der Zelle selbst induziert wird und die nicht aktiv unter Energieaufwand abläuft, sondern wenn die Zelle ihre strukturelle Integrität passiv aufgrund z.B. mechanischer Zerstörung oder Temperaturänderungen verliert. Daraus resultiert ein Platzen der Zelle und ihr Inhalt wird in das umgebende Gewebe entlassen (Farber, 1994). Die dabei freigesetzten Substanzen führen im Gegensatz zur Apoptose häufig zu Entzündungsreaktionen. Allerdings ist es oft schwierig, Apoptose von Nekrose zu trennen, da dasselbe Gewebe und sogar dieselbe Zelle Merkmale beider Zelltodformen aufweisen kann (Kerr *et al.*, 1972).

1.1.2 Morphologische Veränderungen einer Zelle in Apoptose

Während der Apoptose finden in der betroffenen Zelle eine Reihe charakteristischer, morphologischer Veränderungen statt. Zu Beginn der Apoptose kann eine Verringerung des Zellvolumens unter Energieverbrauch beobachtet werden, das Cytoplasma kondensiert und die Zelle verliert ihre Zell/Zell-Adhäsionen. Die Organellen bleiben in dieser frühen Phase strukturell und funktionell intakt und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft lange Zeit normal weiter. Der Zellkern und die nukleären Membranen kondensieren, ebenso das Chromatin. Intensives „*membrane blebbing*“, die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen, ist an der Cytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich kommt es zu Verlust von Struktur und Funktion der Mitochondrien, Ribosomen und des endoplasmatischen Retikulums. Das Cytoskelett wird zerstört und membran-umschlossene Vesikel, so genannte apoptotische Körperchen („*apoptotic bodies*“) beginnen sich von der Zelle abzuschneiden. Sie enthalten Cytoplasma, Zell- und Kernreste und Organellen. In vivo werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen und anderen benachbarten, phagozytierenden Zellen, aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert. Die Cytoplasmamembran bleibt bis zu diesem Zeitpunkt funktionell intakt. Biochemisch kommt es aber bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen

Veränderungen. So werden unter anderem spezifische calcium- und magnesium-abhängige DNasen im Zellkern aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische, ca. 180 bp lange Fragmente zerschneiden (*DNA Laddering*), da sie nur an bestimmten Stellen angreifen können (Cohen *et al.*, 1994). Des Weiteren kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom c und AIF aus dem Intermembranraum in das Cytoplasma freigesetzt werden. Phosphatidylserin, das normalerweise ausschließlich auf der cytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, wird auf die extrazelluläre Seite der Membran verlagert (Martin *et al.*, 1995c). Dies dient auf den apoptotischen Körperchen als Signal für die Phagozytose durch Makrophagen und andere Zellen.

1.1.3 Molekulare Wege in die Apoptose

Eine Zelle wird apoptotisch, wenn ihr positive Signale („Überlebenssignale“) entzogen werden oder ein internes oder externes Signal den Zelltod auslöst. Es können drei Wege, die Apoptose auslösen können, unterschieden werden (s. Abb.1). Der erste führt über die Aktivierung von Zellmembranrezeptoren, den Todesrezeptoren, mit bestimmten Botenstoffen zur Initiation der Apoptosemaschinerie (extrinsischer Weg). Bei Einleitung der Apoptose über den zweiten Weg (intrinsischer Weg) wird diese durch diverse Formen von Stress, die zu einer Schädigung des genetischen Materials der Zellen führen (Wesselborg *et al.*, 1999; Stepczynska *et al.*, 2001.), etwa erhöhte Spiegel von toxischen Substanzen oder mutagenen Agenzien, hohe Dosen von UV- oder Röntgenstrahlung sowie verschiedene chemische Substanzen initiiert. Diese Schädigungen führen über Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 entweder zu Reparatur oder bei irreparablen Schäden in die Apoptose (Hussain und Harris, 2006). Die molekularen Mechanismen des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs unterscheiden sich in vielen Punkten, besitzen aber auch Gemeinsamkeiten. Der dritte Weg dient der Entfernung von Tumorzellen und Zellen, die durch Pathogene infiziert wurden und wird über zwei Proteine, Perforin und Granzym B, initiiert. Doch obwohl die auslösenden Stimuli, wie oben beschrieben, sehr unterschiedlicher Natur sein können, wie z.B. Rezeptorsignale, intrazelluläre Virusinfektionen, Zellstress, Wachstumsfaktor-Mangel, falsch gefaltete Proteine, Hitze, Oxidation und vieles mehr, führt Apoptose immer zum gleichen morphologischen Resultat, der so genannten klassischen Apoptose-Morphologie.

1.1.3.1 Der extrinsische Weg

Die zellmembranständigen Rezeptoren, über die der extrinsische Weg aktiviert wird, gehören alle der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren) an (Aggarwal,

2003). Diese „Todesrezeptoren“ übertragen ein apoptotisches Signal, indem sie nach Bindung eines Liganden in Sekundenschnelle intrazelluläre Proteasen (Caspasen) aktivieren.

Die Liganden dieser Rezeptoren sind strukturell verwandte Moleküle, meist Homotrimere, die zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) gehören und sowohl auf den Zelloberflächen lokalisiert als auch, nach Abspaltung eines transmembranen Bereichs, extrazellulär in löslicher Form zu finden sind (Smith, Farrah, Goodwin, 1994). Die TNF-Rezeptoren besitzen eine homologe, cytoplasmatische „*Death Domain*“ (DD), welche die Apoptosemaschinerie der Zelle in Gang setzt (Idriss und Naismith, 2000). Ein Ligand bindet jeweils drei Rezeptormoleküle, wodurch die DD des Rezeptor-Clusters in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht werden. Nach dieser Aktivierung kommt es zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine (z.B. FADD oder TRADD) an die DD (Wajant *et al.*, 2003) des Rezeptors. Über eine weitere Domäne, die „*Death Effector Domain*“ (DED) bindet dann jedes Adapter-Molekül ein Molekül der Procaspasen (z.B. Caspase-8). Der so entstandene Komplex trägt den Namen „*death inducing signaling complex*“ (DISC) (Kischkel *et al.*, 1995) und bewirkt Oligomerisierung und autokatalytische Aktivierung der Caspasen. Die prozessierte Caspase dissoziiert vom Adapter-Molekül und aktiviert weitere Caspasen, welche die typischen morphologischen Merkmale der Apoptose auslösen.

1.1.3.2 Der intrinsische Weg

Bei diesem, durch toxische Substanzen oder Mangel an Überlebensfaktoren aktivierten Weg spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle (Schulze-Osthoff *et al.*, 1993). Sie beinhalten zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran zahlreiche proapoptotische Faktoren, wie das Cytochrom c, bekannt als Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium und gleichzeitig ein Schlüsselfaktor für die Auslösung der Apoptose. Bei einer Aktivierung dieses Apoptosewegs öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und setzen unter anderem proapoptotische Proteine, wie Cytochrom c, AIF („*Apoptosis-inducing factor*“) und Diablo/Smac („*direct IAP-binding protein with low PI*“/„*second mitochondria-derived activator of caspase*“) ins Cytoplasma frei. Gelangt Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma, bewirkt es eine Multimerisierung der Protease Apaf-1 („*apoptotic protease activating factor-1*“) und eine Apoptose fördernde Ausbildung eines hochmolekularen Komplexes, dem Apoptosom, im Cytoplasma. Dieses entsteht aus Cytochrom C, Apaf-1 und einer Procaspase (Zou *et al.*, 1999) durch Konformationsänderungen des Adapterproteins Apaf-1, welches dann, über die homologen CARDS („*Caspase Recruitment Domain*“) Procaspase-Moleküle bindet und ihnen die Oligomerisierung erlaubt (Acehan *et al.*, 2002).

Dadurch werden die Procaspasen durch allosterische Veränderungen und Dimerisierung aktiviert (Rodrigues und Lazebnik, 1999; Boathright *et al.*, 2003) und die „Todesmaschinerie“ durch Prozessierung von weiteren Caspasen in Gang gesetzt. Die Prozessierung der Procaspase ist allerdings nicht ohne weiteres möglich, da bestimmte Proteine, die IAPs („*inhibitors of apoptosis*“), diese dadurch verhindern (Salvesen und Duckett, 2002), dass sie selektiv an Effektorcaspasen binden und diese inhibieren. So wird sichergestellt, dass die Zelle ohne entsprechenden Stimulus nicht in Apoptose treten kann. IAPs werden über das ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzte Diablo/Smac gebunden und so inaktiviert um die Prozessierung zu gewährleisten (Du *et al.*, 2000). Die Procaspase aktiviert weitere Caspasen, welche über zahlreiche proapoptotische Proteine zu den typischen apoptotischen Vorgängen führt. Dieser stress-vermittelte Weg der Apoptose-Einleitung kann durch Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert werden.

Immer mehr Substanzen, welche die Mitochondrienmembran durchlässig machen, werden entdeckt. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor p53, von dem angenommen wird, dass er Apoptose durch Expression von pro-apoptotischen Genen auslöst. p53 wandert ebenfalls zu den Mitochondrien und interagiert dort mit einem Hitzeschockprotein (Hsp70). Die Expression von Hsps dient dem Schutz der Zelle und wird durch eine große Anzahl von Stressfaktoren induziert. Hsps inhibieren die Aggregation von Proteinen oder markieren Proteine für den proteolytischen Abbau. Hsps können die Apoptose aber auch unterdrücken, indem sie an Apaf-1 binden und dadurch die Aktivierung der Caspase verhindern.

1.1.3.3 Der Granzym-vermittelte Weg

Cytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killer-Zellen sind hoch spezialisierte Zellen des Immunsystems, die durch Sekretion der Serin-Protease Granzym B (GrB) und des membranolytischen Proteins Perforin virusinfizierte, körperfremde oder Tumorzellen durch Induktion von Apoptose eliminieren. Beide Proteine sind in speziellen cytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert, die über eine rezeptorvermittelte Bindung an die Zielzelle gelangen und dort Perforin sekretieren. Perforinmoleküle werden in die Membran der Zielzelle integriert, wo sie eine membrandurchspannende Pore bilden, durch die Calciumionen in das Cytosol gelangen, von denen angenommen wird, dass sie an den apoptotischen Vorgängen beteiligt sind. Granzym B gelangt über rezeptorvermittelte Endocytose und die Perforinpore in die Zielzelle. Während Perforin für die Aufnahme von Granzym B in Zielzellen und dessen Freisetzung aus den Transportvesikeln verantwortlich ist, wirkt Granzym B im Cytosol als aktive Effektorcaspase, spaltet zelluläre Caspasen wie Caspase-3 sowie verschiedene zentrale

Caspasen-Substrate. Granzym B aktiviert damit Apoptose-Signalwege am unteren Kaskadenende und umgeht daher die meisten Kontrollmechanismen (s. Abb.1).

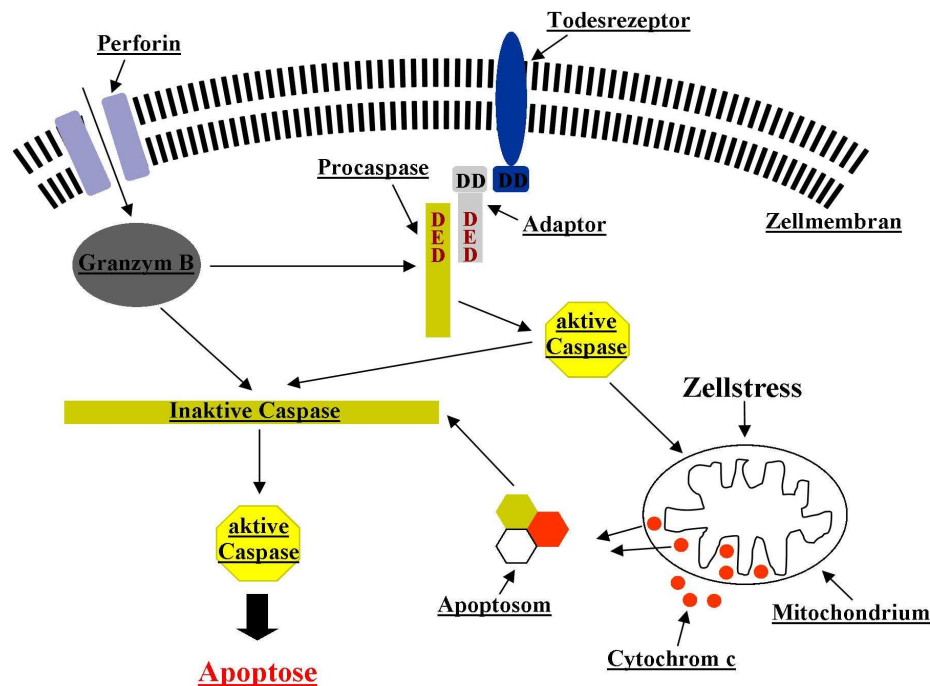


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Apoptose-Einleitung.

1.1.4 Die Caspasen

Alle Signalwege, die Apoptose auszulösen vermögen, gehören zu einer gemeinsamen Zellzerstörungs-Maschinerie, die durch eine Familie von in vielen verschiedenen Zellen exprimierten Enzymen, den Caspasen, aktiviert wird, die als eigentliche Vollstreckerenzyme den Zelltod verursachen (Los *et al.*, 1999). Caspasen, somit die Effektoren der Apoptose, sind Cysteinproteasen, die als schwach aktive Vorstufen, Zymogene/Proenzyme, im Cytosol exprimiert werden. Sie spalten ihre Substrate immer C-terminal eines Aspartatrestes (Thornberry und Lazebnik, 1998; Shi, 2002), was zu ihrer Benennung \rightarrow C-asp-ase führte. Für die Erkennung und Spaltung ihrer Substrate benötigen sie eine Erkennungssequenz, ein sehr variables Tetrapeptid-Motiv, das N-terminal der Schnittstelle liegt. Alle Mitglieder der Familie zeigen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität (Nicholson und Thornberry, 1997). Sie verfügen über drei Domänen, eine N-terminale Prodomäne, eine für eine große (ca.20 kDa) Untereinheit codierende Domäne und eine für eine kleine (ca.10 kDa); diese werden bei einer Aktivierung der Proenzyme proteolytisch an Konsensussequenzen getrennt. Im Anschluss daran vereinen sich zwei große und zwei kleine Untereinheiten zu einem aktiven Tetramer. Die Aktivierung durch Spaltung der Zymogene

erfolgt entweder durch Caspasen mit ähnlicher Spezifität oder autokatalytisch nach dem Oligomerisierungsmodell. Diesem Modell zufolge erfolgt, ausgelöst durch ein Adapterprotein, eine Annäherung zweier oder mehrerer Procaspasen, wodurch deren geringe Proteaseaktivität potenziert wird welche dann ausreicht, um eine intermolekulare, autokatalytische Aktivierung zu induzieren (Gu *et al.*, 1995). Die N-terminale Prodomäne variiert in ihrer Länge, Caspasen mit großer Prodomäne werden als Initiator-, solche mit kleiner als Effektorcaspasen bezeichnet.

1.1.4.1 Initiatorcaspasen

Diese Caspasen initiieren durch kaskadenartige Aktivierung weiterer (Effektor-) Caspasen die Effektorphase der Apoptose. Vergleichbar den Enzymkaskaden der Blutgerinnung oder des Komplementsystems, wird durch die Signalkaskade eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht. Initiatorcaspasen enthalten zwei Motive innerhalb ihrer Prodomäne, die DED, eine Interaktionsdomäne, und die CARD. Über Domänen spezieller Adapterproteine wird ihnen die Oligomerisierung und dadurch die Aktivierung ermöglicht. Diese Domänen sind im Fall der DED die FADD („*Fas-Associated Death Domain*“) und die TRADD („*TNF-R-Associated Death Domain*“) des Adapterproteins und im Fall der CARD-Domäne die entsprechende, homologe Domäne des Adapterproteins Apaf-1 („*Apoptotic protease activating factor*“).

1.1.4.2 Effektorcaspasen

Sie werden durch Initiatorcaspasen aktiviert, stehen also eher am Ende der Signalkaskade und verursachen, unter anderem durch Abbau des Zellgerüsts und der Kernmatrix, den Tod der betroffenen Zelle. Des Weiteren aktivieren sie DNA-Endonukleasen (CAD: „*Caspase activated desoxyribonuklease*“), welche die DNA zerschneiden und so zur Entstehung des über Gelelektrophorese sichtbar zu machenden, charakteristischen apoptischen DNA-Leiter-Musters führen und spalten lebenswichtige zelluläre Proteine, die bei der intrazellulären Signalübertragung entscheidende Funktionen übernehmen, sowie solche, die die Reparatur der DNA verhindern. (Wang *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2003). Durch diese Zerstörung lebenswichtiger Strukturproteine und Enzyme sind die Caspasen für die morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose verantwortlich.

1.1.4.3 Regulatoren der Apoptose

Einige Proteine, wie die der Bcl-2 Familie oder IAPs („inhibitors of apoptosis“), sind in der Lage, die Apoptoseaktivität zu regulieren, Apoptose zu induzieren oder zu blockieren.[^]

1.1.5 Die Bcl-2 Familie

Das B-Zellen Lymphom/Leukämie Gen 2 (Bcl-2) gibt dieser Proteinfamilie seinen Namen. Es handelt sich um ein, in malignen Lymphomen der B-Zellreihe entdecktes Onkogen (Tsujimoto *et al.*, 1985), welches durch Unterdrückung des Zelltods ein neoplastisches Wachstum ermöglicht (McDonnell, 1993). Die Ersten, die ein verlängertes Überleben von Zellen bei Bcl-2 Überexpression nachweisen konnten, waren 1988 Vaux *et al.*. Proteine der Bcl-2-Familie besitzen mindestens eine von vier möglichen, relativ konservierten Bcl-2-Homologie-Domänen (BH), wobei deren Anzahl die Wirkungsart, pro-oder anti-apoptotisch, bedingt. Die Größe dieser Domänen ist variabel. Bcl-2-Familienmitglieder sind über eine hydrophobe, transmembrane, C-terminale Domäne mit Organellen wie Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum oder nukleären Membranen assoziiert, deren Permeabilität sie verändern können. Sie finden sich auf der cytoplasmatischen Seite ihrer Membranen oder versammeln sich während der Apoptose dort (Hsu *et al.*, 1997; Kaufmann *et al.*, 2003). Nur Bcl-2 ist auch in gesunden Zellen als integrales Membranprotein zu finden. Inzwischen kennt man über 20 Mitglieder der Bcl-2-Familie, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Mitglieder der ersten (z.B. Bcl-2, Bcl-X) zeigen eine sehr hohe Homologie zum Bcl-2 und inhibieren die Apoptose. Sie befinden sich stets an der Außenmembran der Mitochondrien und verhindern eine Freisetzung der proapoptotischen Faktoren aus dem Lumen der Mitochondrien (Susin *et al.*, 1996). Mitglieder der zweiten (z.B. Bak, Bax, Bim), weiter entfernte Verwandte des Bcl-2, induzieren hingegen Apoptose. Das Verhältnis zwischen beiden beeinflusst die Anfälligkeit der Zelle gegenüber einer Vielzahl von Todessignalen.

1.1.6 Die IAPs

IAP-Proteine stellen eine weitere Gruppe regulatorischer Proteine dar. Die ersten Vertreter dieser Familie wurden aus dem Baculovirus *Autographia californica* isoliert. Sie werden konstitutiv im Cytoplasma exprimiert und können dort selektiv an aktive Effektorcaspasen binden und sie dadurch hemmen (Salvesen und Duckett, 2002; Vaux *et al.*, 2003). Alle Mitglieder der IAP-Familie besitzen zwei typische Motive, RING (ein Zinkfingermotiv) und bis zu vier BIR („*b*aculovirus *I*AP *r*epeat“), die für die Interaktion mit anderen Proteinen notwendig sind in ihrer Proteinsequenz.

1.1.7 TNF und TNF-Rezeptoren

1.1.7.1 Tumor-Nekrose-Faktoren

Die Tumor-Nekrose-Faktoren sind Liganden der TNF-Rezeptor Familie und spielen eine wichtige Rolle in der TNF-R-vermittelten Apoptose (s. Abb.1). Sie gehören zur Gruppe der Zytokine (wie Interleukine, Interferone, etc.) und sind Proteine, die als Botenstoffe von Zellen sekretiert werden und in vielfältiger Weise auf andere Zellen wirken. Sie können Zelldifferenzierung, Proliferation, die Sekretion weiterer Zytokine oder Apoptose auslösen oder pro-inflammatorisch wirken. Die TNFs spielen in der Immunologie eine wichtige Rolle. Sie werden in vielen Zellen des Organismus, wie Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert (Baud und Karin, 2001), primär jedoch in Makrophagen als Antwort auf immunologische Angriffe durch Bakterien (Lipopolysaccharide), Viren, Parasiten, Zytokine und anderen Substanzen.

TNF wird zellmembranständig oder löslich als Homotrimer exprimiert (Tang *et al.*, 1996; Gearing *et al.*, 1994). Auf seine Wirkung wurde im 19ten Jahrhundert der Mediziner P. Bruns aufmerksam, als er beobachtete, dass sich eine Infektion eines Patienten mit Bakterien positiv auf die Behandlung von Tumorkrankheiten auswirkte (Bruns, 1868). Es dauerte allerdings weitere hundert Jahre, bis herausgefunden wurde, dass die tumorregressive Substanz nicht bakteriellen Ursprungs war, sondern vom Organismus selbst, aufgrund der Infektion gebildet wurde (Carswell *et al.*, 1975). Aufgrund ihrer Wirkungsweise gab man ihm den Namen Tumor-Nekrose-Faktor. Allerdings wirken sie nicht nur auf Tumorzellen, sondern können zu den unterschiedlichsten Reaktionen führen. So können sie Zelldifferenzierung, Proliferation, die Sekretion weiterer Zytokine oder Apoptose (bei der Abwehr von Pathogenen) auslösen (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Des Weiteren kommt dem TNF eine zentrale Rolle bei pro-inflammatorischen Immunantworten durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF - κ B zu (Aggarwal, 2003). Da der Schwamm in marinem Milieu einer extrem hohen mikrobiellen Belastung ausgesetzt ist, ist ein wirksamer Abwehrmechanismus, wie ihn die durch TNF ausgelösten Mechanismen bilden, essentiell.

1.1.7.2 TNF-Rezeptor Familie

Die Todesrezeptoren sind Rezeptoren des Zelltods die zur großen Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-R) gehören. Sie sind sowohl auf den Zelloberflächen als auch, nach Abspaltung eines transmembranen Bereichs, extrazellulär in löslicher Form zu finden (Gearing *et al.*, 1994). Die TNF-Rezeptoren sind, neben Ereignissen wie Verlust des Kontakts einer Zelle zu ihren Nachbarn, Erleiden eines irreparablen internen Schadens oder

Empfangen simultan widersprüchlicher Signale (Evan und Littlewood, 1998), welche die Zellteilung verzögern bzw. aktivieren, eine weitere Möglichkeit, Apoptose zu initiieren und Zellen gezielt zu zerstören. Eine Stimulation kann neben der Apoptoseinduktion auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B oder der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), wie JNK (c-Jun N-terminal kinase) und p38, zur Folge haben (Wajant *et al.*, 2003).

Apoptose wird induziert, indem sie nach Bindung eines Liganden innerhalb weniger Sekunden über eine Signalkaskade verschiedene Caspasen und Mechanismen in der Zelle aktivieren und diese schließlich innerhalb von Stunden zerstören. Die Beteiligung der auf der Zelloberfläche exponierten TNF-Rezeptoren an der Initiierung der Apoptose ist vor allem in Zusammenhang mit dem Immunsystem essentiell (Osborne, 1996). Alle Mitglieder der TNF-R-Familie besitzen ähnliche, cysteinreiche, extrazelluläre Domänen (Smith *et al.*, 1994), viele zusätzlich eine homologe, cytoplasmatische Domäne von 65-80 Aminosäuren., die *Death Domain* (DD), welche häufig die Aktivierung der Apoptose-Maschinerie auslöst (Tartaglia *et al.*, 1993) und in vielen an der Apoptose beteiligten Proteinen vorhanden ist.

CD95 (auch Fas oder Apo-1, Krammer, 1999), ein transmembranes Glycoprotein, spielt eine entscheidende Rolle im physiologischen und pathologischen Regulationsmechanismus der Apoptose (Lavrik, 2005) und ist der bisher am besten charakterisierte Rezeptor. Über CD95 induzierte Apoptose spielt eine Rolle in der Eliminierung überschüssiger Lymphozyten im Anschluss an eine Immunreaktion (Green und Ware, 1997) sowie bei der Vernichtung von Krebszellen und virusinfizierten Zellen durch cytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (Oehm *et al.*, 1992; Nagata 1997). Der CD95-Ligand (CD95L) ist, wie alle Mitglieder der TNF-Familie, ein Homotrimer, der drei CD95-Moleküle bindet (Smith *et al.*, 1994) wodurch die *Death Domains* (DD) des Rezeptor-Clusters zusammen kommen, an welche jeweils ein Adaptermolekül FADD (*Fas-Associated Death Domain*) mit seiner eigenen DD bindet (Chinnaiyan *et al.*, 1995). FADD wiederum bindet über eine weitere Domäne, die DED, ein Molekül Procaspase-8. Durch ihre Oligomerisierung an den Adaptermolekülen reicht ihre Aktivität zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung (Thornberry und Lazebnik, 1998) und führt zur Aktivierung weiterer Effektorcaspasen und letztendlich zum Zelltod durch den Abbau zellulärer, lebenswichtiger Proteine (Muzio *et al.*, 1998).

Ein weiterer gut charakterisierter Rezeptor ist der TNF-R1, der in der Zellmembran vorliegt und durch Bindung seines Liganden TNF trimerisiert, wodurch die DD der Rezeptoren assoziieren (Smith *et al.*, 1994). Anschließend kann TRADD („*TNF-receptor associated death domain protein*“) an die DD rekrutiert werden (Hsu *et al.*, 1995). TRADD stellt die

zentrale Weiche in der Signalkaskade des TNF-R1 dar, da es zwei Möglichkeiten für die weitere Reaktion eröffnet. Eine stellt die Bindung von FADD an TRADD und von Caspase-8 an FADD dar und führt zur Aktivierung der Apoptose, während durch die Assoziation des RIP (*Receptor Interacting Proteins*), einer Serin-Threonin-Kinase, mit TRADD und dem TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) über mehrere Schritte eine Aktivierung von NF - κ B und JNK („*c-jun N-terminal kinase*“) erreicht wird. NF - κ B und JNK fördern schließlich die Expression antiapoptotischer Gene (Rothe *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Ashkenazi und Dixit, 1998).

1.1.8 Die Apoptose in Porifera

Schwämme benötigen einen wirksamen Schutzmechanismus, da sie als limnisch und marin vorkommende Organismen einer sehr viel höheren mikrobiellen Bedrohung ausgesetzt sind, als beispielsweise landlebende Tiere. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Konzentration an Mikroorganismen in Gewässern deutlich höher ist als jene, die beispielsweise in der Luft vorliegt. Einen entsprechenden Schutzmechanismus, der auch für ein effektives Immunsystem essentiell ist, stellt die Apoptose dar. Auch ROS („*reactive oxygen species*“) wirken in hohen Konzentrationen apoptotisch, in geringen Mengen induzieren sie dagegen die Expression von Schutzmolekülen, wie Thioredoxin und Hsp70 (Jacquier-Sarlin und Polla, 1996). Beide Proteine wurden bereits in Schwämmen nachgewiesen und es ließ sich eine durch 17 β -Östradiol induzierte Expression, vergleichbar der in Säugetierzellen, demonstrieren. Des Weiteren führt die vermehrte Bildung von ROS in Schwämmen zu DNA-Fragmentierung, einem charakteristischen Anzeichen für den Vorgang der Apoptose.

1.1.8.1 Pro-apoptotische Proteine

Pro-apoptotische Proteine wurden in den Schwämmen mit Hilfe von Allograft Experimenten untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Transplantationsexperiment, bei dem einem „Empfängerschwamm“ ein Teil eines Spenders eingesetzt wird. Hierbei findet eine Abstoßungsreaktion statt, die mit einem erhöhten Gehalt an apoptotischen Zellen einhergeht. Es ließ sich in den Allografts eine verstärkte Synthese eines TNF-Homologs (GCDD2, aus *Geodia cydonium*) nachweisen, welches über die typische, familienspezifische DD verfügt. Diese DD bewirkt die Oligomerisierung der TNF-Rezeptoren und die Aktivierung der Caspasen. Zusätzlich konnte 2007 ein LPS induzierbarer TNF aus dem Schwamm *Suberites domuncula* isoliert werden (Wiens *et al.*). Dieser TNF ist ein 139 Aminosäuren langes, 15kDa Protein mit der typischen DD. Des Weiteren wurde eine erhöhte

Proteaseaktivität nachgewiesen, welche durch Einsatz caspasespezifischer Inhibitoren gehemmt wurde (Wiens *et al.*, 2003). Durch Klonierung zweier Sequenzen aus *Geodia cydonium*, die eine hohe Homologie zur Caspase 3 der Vertebraten aufwiesen, wurde schließlich auch die Existenz dieser Proteasen in Schwämmen bestätigt.

1.1.8.2 Anti-apoptotische Proteine

Es wurden einige Proteine identifiziert, die aufgrund ihrer Homologie zu den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie als Teil der anti-apoptotischen Fraktion eingestuft wurden. Ihnen fehlt die für die pro-apoptotischen Mitglieder essentielle BH3-Domäne, was diese Vermutung unterstützt. Dies wurde schließlich durch einige Expressionsanalysen dadurch bestätigt, dass gezeigt werden konnte, dass Apoptose-Stimuli die Expression dieser Proteine induzierte und die Caspaseaktivität zeitgleich reduzierte, wodurch der Zusammenhang zwischen den als BHP2 bezeichneten Proteinen und der Regulation der Caspasen hergestellt wurde (Wiens *et al.*, 2001).

1.2 Das Immunsystem

Immunsysteme sind in allen Lebewesen vorhanden. Sie dienen dazu, den Organismus vor mikrobiellen Angriffen und Parasiten zu schützen, die ihn schädigen oder sogar zerstören könnten. Es kann zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem unterschieden werden (Klein 1989), wobei in den Porifera sowohl Komponenten des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems identifiziert wurden.

1.2.1 **Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem bildet eine erste Abwehr gegen virale und bakterielle Infekte, welche den Organismus schützt, bis die anderen Systeme aktiviert wurden. Dies kann bis zu einigen Tagen andauern. Es ist dabei in der Lage Polysacharide, LPS, Endotoxin, Lipid A, andere Produkte von Pathogenen, prokaryotische DNA und Zellschädigung zu erkennen und darauf zu reagieren. Über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), der auf allen körpereigenen Zellen existiert, können die Abwehrzellen die Erreger von körpereigenen Zellen unterscheiden und den Abwehrmechanismus einleiten.

Zu den wichtigsten Komponenten dieses Abwehrsystems zählen als erste Barriere gegen Mikroorganismen die Schleimhäute. Hinzu kommen das auf dem alternativen Weg aktivierte

Komplementsystem, Makrophagen, Granulocyten, natürlichen Killerzellen (NK), Zytokine und spezielle Rezeptoren die Krankheitserreger erkennen (z.B. Toll-like-Rezeptoren).

Eine wichtige Komponente des Immunsystems ist das so genannte Komplementsystem. Es wird u. a. zur Eliminierung von Bakterien aktiviert und besteht aus mehr als 20 verschiedenen Plasmaproteinen, die kaskadenartig zusammenwirken und in dessen Verlauf spezifische Proteasen und Makrophagen aktiviert werden. Aktivierung des Systems führt zur Zell-Lyse, welche auf der Bildung einer mikroskopisch sichtbaren Pore in der Bakterienmembran beruht. Diese Pore wird durch die Komponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 des Komplementsystems gebildet. Auslöser hierfür ist C5b, welches durch limitierte Proteolyse aus C5 entsteht. Die Aktivierung von C5b ist auf zwei Wegen möglich, dem klassischen und dem alternativen.

Der klassische Weg benötigt einen Antikörperkontakt. C1q bindet an ein Antigen-Antikörper-Aggregat auf der Zelloberfläche der zu lysierenden Zelle. An C1q lagern sich C1r und C1s an, wodurch die proteolytische Aktivität des C1s aktiviert wird. Dies führt zu einer Vielzahl von Anlagerungen und Spaltungen der Systemkomponenten, in deren letztem Schritt C3 in C3a und C3b gespalten wird. C3b opsoniert die Bakterienoberfläche und liefert diese dadurch dem Angriff der Makrophagen aus, zum anderen setzt es den alternativen Weg in Gang.

Der alternative Weg des Komplementsystems verläuft Antikörper-unabhängig. Durch geringe Aktivität der Plasmaproteasen entstehendes C3b wird an Bakterienoberflächen gebunden und lagert sich mit der Komplementkomponente B zusammen. Dieser Komplex stellt das Substrat für die Protease D dar, welche nun die B-Untereinheit spaltet. Dabei entsteht ein C3b/Bb-Komplex, der als C5-Konvertase agiert und die Bildung des lytischen Komplexes auslöst.

Zytokine, wie Interferone (If), Interleukine (Il), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNFs), Chemokine und transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs), sind ein wichtiger Teil dieser Immunabwehr. Sie regulieren und koordinieren das Zusammenwirken der beiden Systeme.

Makrophagen werden aus Blutmonocyten gebildet und dienen der Phagocytose von vorher opsonisierten Zellen und der Freisetzung von Interleukinen (z.B. Il-1, Il-8, etc), die wichtige, lokale und systemische Effekte besitzen, etwa als Auslöser einer Fieberreaktion.

Granulocyten, welche den höchsten Stellenwert in der angeborenen Immunabwehr einnehmen, phagocytieren Bakterienzellen und eliminieren sie auf vielfältige Weise. Sie enthalten eine Vielzahl an Vesikeln, die unter anderem Proteasen, NADPH-Oxidase und Lysozym enthalten und nach Phagocytose der Bakterien mit deren Membran verschmelzen und ihren Inhalt in sie entlassen. Die Vesikelenzyme katalysieren Reaktionen, durch die hoch toxische Verbindungen (O_2^- , H_2O_2 , OH^+ , OCl^-) entstehen, welche die Bakterien abtöten.

Natürliche Killerzellen sind Lymphocyten, welche weder B- noch T-Zellen sind und ebenfalls der Beseitigung von Fremdzellen dienen.

„*Toll-like receptors*“ (TLR) werden auf antigenpräsentierenden Zellen und anderen Zellen exprimiert. Sie sind Mustererkennungsrezeptoren, die Fremdantigene während der frühen Phase der Immunantwort, nach Eintritt der Erreger in den Organismus, erkennen und Zellen zur Freisetzung von Zytokinen und anderen Überträgerstoffen aktivieren. Durch Zellen der angeborenen Immunabwehr können die meisten Infektionen erkannt und bekämpft werden.

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem dient der Erkennung und Eliminierung von Fremdorganismen und basiert auf Rezeptoren und löslichen Proteinen, welche auf Antigene, die in den Organismus gelangen, reagieren. Es setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Die eine ist die humorale Immunantwort, die über eine Antikörperbildung, die zweite, die zelluläre Immunantwort, die über cytotoxische Zellen zur Zerstörung des Erregers führt.

Wichtige Komponenten dieses Abwehrsystems sind die Lymphocyten und die Immunglobuline. B- und T-Lymphocyten werden in lymphatischen Organen gebildet und richten sich gegen Zellen, welche auf ihrer Oberfläche antigene Strukturen tragen.

B-Lymphocyten müssen, um funktionsfähig zu werden, eine Differenzierung durchmachen, um dann durch Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden zu können. Das Antigen wird an B-Zellrezeptoren auf der Oberfläche gebunden, was die Umwandlung der B-Zellen in Plasmazellen auslöst. Diese können spezifische, gegen das Antigen gerichtete Igs oder, als so genannte Gedächtniszellen, Antikörper bilden und an das Blut abgeben, woraufhin Makrophagen an die Erreger binden und sie phagozytieren können.

T-Lymphocyten werden ebenfalls vor ihrer Aktivierung differenziert. Daraus resultieren zum einen cytotoxische T-Zellen, welche die befallenen Zellen direkt zerstören können, und zum anderen T-Helferzellen, die für eine Aktivierung der Makrophagen und der Dendritischen Zellen sowie für die Antikörperbildung über die Plasmazellen sorgen. Eine Aktivierung der T-Lymphocyten führt über Signalkaskaden unter anderem zur Bildung von Interleukinen, Interferonen, TNFs, Perforinen und Proteasen, welche zum Eliminieren der Antigenpräsentierenden Zellen benötigt werden. Die Dendritischen Zellen gehören, wie B-Zellen und Makrophagen zu den „Antigenpräsentierenden Zellen“, die Erreger phagozytieren und deren spezifische Proteine zusätzlich zum MHC nach außen präsentieren. Somit werden sie für andere Zellen des Immunsystems erkennbar und diese werden aktiviert.

1.2.3 Das Immunsystem der Porifera

Schwämme sind aufgrund ihrer Lebensweise einer Vielzahl von Bedrohungen ausgesetzt. Als Filtrierer nehmen sie große Mengen an Mikroorganismen, wie Bakterien oder Viren, aus dem Wasser auf. Des Weiteren müssen sie sich gegen diverse Fressfeinde, Überwachung von konkurrierenden Riffbewohnern und der Bildung des so genannten „*primary films*“ auf ihrer Oberfläche wehren. Nichts desto trotz überleben sie schon 600 bis 800 Millionen Jahre erfolgreich (Willmer 1994; Müller 1995). Dies setzt ein effizientes Abwehrsystem gegen unterschiedlichste Bedrohungen voraus (s. Tab.1).

Bedrohung der Individualität durch andere Organismen	Zytokinabhängige Faktoren	- Allograft inflammatory factor - Glutathionperoxidase - Tcf-ähnlicher Faktor
	Moleküle mit Ig-like Domänen	- Rezeptor Tyrosin Kinase - „sponge adhesion molecules“
Pilze		- Zytokine - Fibrinogen-ähnliche Moleküle - (1→3)-β-D-Glukan Weg
Fressfeinde		- Sekundäre Metabolite
Viren		- 2'-5'-Oligo-adenylat-synthetase System
Bakterien	Gram positiv	- Erkennen von bakteriellem Proteoglykan - Lysozyme -Moleküle des Adaptor-related Proteinkomplex
	Gram negativ	- Erkennung Pathogen-assoziierte molekulare Muster - MAP-Kinase Weg - 2'-5'-Oligo-adenylat-synthetase System - antimikrobielle Proteine/Peptide

Tabelle 1: Mechanismen und Moleküle der Immunabwehr der Porifera.

Viele Immunproteine der Schwämme weisen in phylogenetischen Untersuchungen die höchste Homologie zu Komponenten des angeborenen Immunsystems der Menschen auf. Zu diesen zählen:

- Moleküle mit SRCR/SRC-Domänen, wie sie auch in Makrophagen (Pancer *et al.*, 1997a; Blumbach *et al.*, 1998) und Scavenger-Rezeptoren vorkommen
- Poren bildende Proteine mit derselben Funktion wie die des Komplementsystems (Mangel *et al.*, 1992)
- Moleküle, ähnlich den Zytokinen, beispielsweise AIF („*allograft inflammatory factor*“) (Kruse *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1999c), von dem angenommen wird, dass es die Aktivierung von „Immunocyten“ zur Immunantwort auslöst

- „*Endothelial-monocyte-activating-polypeptides*“ (Pahler *et al.*, 1998; Schröder *et al.* 2000a)
- Die Glutathion-Peroxidase (GPX) (Kruse *et al.*, 1999), welche die durch Wundheilung und Entzündungsreaktionen entstehenden ROS abbaut
- Ein Schlüsselenzym des Interferon-vermittelten angeborenen Immunsystems in Säugetieren, die (2`-5`)-Oligoadenylat-Synthetase, welche sowohl aus *Suberites domuncula*, als auch aus *Geodia cydonium* isoliert werden konnte (Wiens *et al.*, 1999).

Des Weiteren ist ein Molekül aus *S. domuncula* zu erwähnen, welches hohe Ähnlichkeit zu dem menschlichen „*pre-B-cell colony- enhancing factor*“ aufweist und mit den Zytokinen verwandt ist (Müller *et al.*, 1999b).

Die größte Ähnlichkeit zu Molekülen der menschlichen adaptiven Immunantwort wurde in Sequenzen aus *G. cydonium* festgestellt. Es handelt sich um Ig-verwandte Domänen, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und die „*sponge adhesion molecules*“ (SAM).

Es wird angenommen, dass die RTK als „Antigenerkennungsmoleküle“ dienen, da Antigenerkennung in Vertebraten zur Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen führt (Samelson *et al.*, 1986) und sie das Potential besitzen, intrazelluläre Signaltransduktionsketten auszulösen (Van der Geer *et al.*, 1994). Das RTK-Molekül besitzt einen extrazellulären Abschnitt mit einer Pro/Ser/Thr-reichen Region, zwei komplette Ig-ähnliche Domänen, eine Transmembran-Domäne, eine Juxta-Membranregion und die katalytische Tyrosinkinase-Domäne (Schäcke *et al.*, 1994a, b).

Die zwei aus *G. cydonium* isolierten SAM Sequenzen enthalten ebenfalls zwei Ig-ähnliche Domänen, jedoch keine, die für die Tyrosinkinase (TK) kodiert (Blumbach *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass sie eine Rolle während einer Histokompatibilitätsreaktion spielen. In dem längeren SAM-Molekül sind zusätzlich zwei Motive enthalten, die hohe Ähnlichkeit zu entsprechenden Molekülen im adaptiven Immunsystem von Säugetieren aufweisen. Dies ist zum einen das „*immune receptor tyrosine-based motif*“ (ITIM) des ITIM-Rezeptors, welches in Säugetieren in natürlichen Killerzellen (Bolland und Ravetch, 1999) nachgewiesen wurde und das „*immune receptor tyrosine-based activation motif*“ (ITAM) des ITAM-Rezeptors, dessen Signalweg durch die ITIMs kontrolliert wird.

1.2.4 Antimikrobielle Peptide

Seit der Entdeckung des Penicillins im Jahre 1928 durch Alexander Flemming hat sich die Forschung auf dem Gebiet der Antibiotika und auch besonders der antimikrobiellen Peptide stark intensiviert. Der Grund für dieses wachsende Interesse liegt vor allem in der Zunahme

von Multiresistenzbildungen bei Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika. Zuerst wurden Antibiotika als Sekundärmetabolite aus Bakterien und Pilzen isoliert, später erst wurden Peptid-Antibiotika bzw. antimikrobielle Peptide (AMP) auch in höheren Organismen, wie Insekten und Amphibien, identifiziert. Hier bilden sie den Hauptschutz gegen eindringende Bakterien, Viren und Protozoen. Die AMP sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und bis heute wurden mehr als 800 verschiedene identifiziert (Kamysz *et al.*, 2002). Besonders häufig findet man sie neben den Pflanzen in Säugern, Vögeln, Amphibien und Invertebraten. Erstmals wurden AMP von Boman und Steiner 1980 im Rahmen der Immunantwort bei Puppen von *Hyalophora cecropia* (Riesenseidenspinner) entdeckt, wo sie als Effektormoleküle des natürlichen Abwehrsystems (Boman, 1995) eine Kontrollfunktion im Wachstum von Mikroorganismen übernehmen. AMP werden von diversen Zellen gebildet, insbesondere von Abwehrzellen, wie Makrophagen, Neutrophilen und verschiedenen Epithelmucosazellen. Sie wirken gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze und verschiedene Virenarten. AMP können kontinuierlich, teilweise sogar in bakteriziden Konzentrationen produziert werden (Hancock, 2001). Ihre Expression kann jedoch auch durch Entzündungssignale, wie Interleukine, gesteigert (Trenczek, 1998) und über Toll- und Toll-like-Rezeptoren reguliert werden, da Rezeptoren mikrobielle Komponenten, wie bakterielle Lipopolysaccharide und Peptidoglycane, sowie das Phosphoglycan von Parasiten und das β -1 \rightarrow 3-Glucan von Pilzen erkennen und die Expression der AMP steigern können.

Die AMP weisen oftmals einen amphipatischen oder hydrophoben Charakter auf und sind selten länger als 60 bis 100 Aminosäuren. Häufig werden sie durch Spaltung aus einem größeren Propeptid erzeugt, wobei das Signalpeptid und die Proregion abgespalten werden (Zasloff 2002). Lange Zeit waren nur kationische AMP bekannt, wobei die positive Ladung durch C-terminale Amidierung verstärkt werden kann. In neuerer Zeit wurden allerdings auch Peptide mit einer negativen Nettoladung identifiziert. Große Unterschiede in Struktur und Aminosäuresequenz machen es schwierig, die AMP verschiedenen Gruppen zuzuordnen. Diese Diversität reflektiert wahrscheinlich die Adaption der einzelnen Spezies an die individuellen mikrobiellen Bedrohungen, die den spezifischen Lebensraum charakterisieren (Simmaco *et al.*, 1998; Boman, 2000).

Die AMP können auf Grund ihrer Struktur folgenden drei Gruppen zugeordnet werden:

1. Peptide mit einer α -helikalen Konformation, die häufig kationisch sind und eine C-terminale Amidierung aufweisen, z.B. Cecropin und Magainin aus Insekten sowie Pleurocidin aus Fischen.

2. Zyklische Peptide oder solche mit offenen Enden, gebildet von Cystein-Paaren über Disulfidbrücken, z.B. Defensin und Protegrin aus Säugern.
3. Peptide, in denen eine AS, wie z.B. Prolin, Histidin, Arginin etc, besonders häufig vorkommt, z.B. Oncorhyncin aus Fischen.

1.2.4.1 Wirkungsmechanismen

Wirkung auf die Bakterienzellwand:

Ansatzpunkt für die Wirkungsweise vieler AMP ist die Bakterienzellwand. Besonders kationische AMP interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen mit der anionisch geladenen Membran. Die bakterielle Zellwand besteht aus der Cytoplasmamembran und einer vorgelagerten Peptidoglykanschicht (Mureinschicht, PG-Schicht). Bei Gram-positiven Bakterien ist diese PG-Schicht deutlich dicker (ca. 20 bis 28 nm) als bei Gram-negativen Bakterien (ca. 2 nm). Diese besitzen zusätzlich eine zweite, der Peptidoglykanschicht vorgelagerte äußere Membran, die aus Proteinen, Phospholipiden (negativ geladen) und Lipopolysacchariden (LPS) besteht. Die innere Membran Gram-negativer Bakterien besteht ebenso wie die Innenseite der äußeren Membran im Wesentlichen aus Phospholipiden, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol. Die dünnschichtige PG-Schicht ist im Periplasma zwischen der inneren und der äußeren Membran eingebettet. In die dicke PG-Schicht der Zellwände Gram-positiver Bakterien sind große Mengen an Teichonsäuren (TS) eingelagert, die ein molekulares Markenzeichen der Gram-positiven Zellwand und meist kovalent im PG verankert sind. Zwischen der Plasmamembran und der äußeren Zellwand-PG liegt der so genannte periplasmatische Spalt.

Ein bekannter Wirkungsmechanismus besteht in der elektrostatischen Interaktion eines kationischen AMP mit negativ geladenen Komponenten der Bakterienmembran, wie den Lipopolysacchariden (LPS) bei Gram-negativen und den Lipoteichonsäuren bei Gram-positiven Bakterien. Eine wesentliche Voraussetzung für die anschließende Einlagerung der Peptide in die Membran ist die Ausbildung einer amphipathischen Peptidstruktur, d.h. die räumliche Trennung des kationischen und des hydrophoben Anteils (Hancock und Diamond, 2000). Diese antimikrobielle Wirkung auf die Bakterienmembran kann in folgende verschiedene Modelle unterteilt werden (Brogden, 2005):

1. Im ersten bilden AMP aus einem Komplex mehrerer aggregierter Monomere ringförmige, transmembrane Poren, indem sie mit den polaren Resten einen hydrophilen Kanal formen.

Apolare Reste werden dabei der hydrophoben Lipidmembran zugewendet. Dieses Modell wird auch als „*barrel-stave mechanism*“ (Fassdauben Modell) bezeichnet (Shai, 1999).

2. Im Gegensatz zum ersten Mechanismus findet bei dem „*toroid pore mechanism*“ keine Interkalierung der Peptide mit den Lipiden statt. Es wird aber ebenfalls eine Membranpore gebildet. Die Peptide interagieren mit der negativ geladenen, hydrophoben Membran, indem sie eine α -helikale Struktur annehmen. Die Helix wird parallel zur Membran ausgerichtet, die AMP bilden Aggregate auf der Membranoberfläche und ihre hydrophoben Reste verdrängen die polaren Phospholipidköpfe. So verursachen sie einen Bruch in der hydrophoben Region der Doppellipidschicht, die Membranoberfläche wird destabilisiert. Die Peptide formen ab einem bestimmten Verhältnis von Peptid zu Lipid transiente Poren, indem sie zu Clustern assoziieren und sich senkrecht zur Membran orientieren.
3. Dieser Wirkungsmechanismus, auch „*carpet mechanism*“ (Teppich Modell) genannt, wirkt, ähnlich wie Detergenzien, destabilisierend auf die Membran. Die AMP schichten sich hierbei aufgrund von elektrostatischen Kräften teppichähnlich über die Membran und beeinträchtigen deren Fluidität und Permeabilität. Ab einer bestimmten Peptidkonzentration kommt es zur kompletten Auflösung der Membran in einzelne Micellen (Shai und Oren, 2001; Yeaman *et al.*, 2003).

Bei allen drei angesprochenen Modellen führt die Permeabilisierung der Bakterienmembran dazu, dass das Membranpotential aufgehoben wird und die Zelle abstirbt.

Über welchen Mechanismus das antimikrobielle Peptid mit der Biomembran interagiert, ist dabei zum einen abhängig von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Peptids selbst und zum anderen von der Ladung und Zusammensetzung der Membran. Es ist auch möglich, dass ein Peptid, abhängig von äußeren Faktoren, auf unterschiedlichen Wegen mit Biomembranen interagiert (Shai und Oren, 2001; Yeaman *et al.*, 2003).

Zusätzlich zu den oben erwähnten Wirkungsmechanismen gibt es für Gram-negative Bakterien die Annahme, dass eine Interaktion über eine initiale Bindung der kationischen AMP an die anionischen Domänen des LPS erfolgen kann (Piers and Hancock, 1994; Falla *et al.*, 1996). Dieser, auch „*self-promoted uptake*“ genannten, Hypothese zufolge interagieren die kationischen AMP mit der negativ geladenen Oberfläche Gram-negativer Bakterien und deren divalent-kationischen Bindungsstellen für Mg^{2+} und Ca^{2+} , welche normalerweise die Oberflächenladung neutralisieren (Peterson *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1986). Die AMP stören die Membranarchitektur entweder durch die Neutralisierung einer größeren

Membranoberfläche oder durch starke Bindung an die LPS (Nikaido and Nakae, 1979; Moore *et al.*, 1986). Es wird angenommen, dass sie sich dann in die Lipiddoppelschicht einlagern und über die Lipiddoppelschicht translozieren (Hancock, 2001).

Weiterhin gibt es Indizien dafür, dass einige AMP ihren bakteriolytischen Effekt durch stereospezifische Interaktionen ausüben (Castle *et al.*, 1999; Kragol *et al.*, 2001).

Intrazelluläre Wirkung:

Diese mögliche AMP-Wirkung führt zur intrazellulären Bindung der Peptide an essentielle Proteine, Nukleinsäuren oder Rezeptoren, was zur Hemmung von Stoffwechsel-aktivitäten und schließlich zum Absterben des Bakteriums führt (Hancock und Diamond, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Brogden, 2005). Diese Bindungen können an folgenden Stellen angreifen:

1. Einige Cathelicidine können die bakterielle DNA-Synthese blockieren, indem sie die Degradierung von Proteinen induzieren, die für die DNA-Replikation notwendig sind (Boman, *et al.*, 1993).
2. Einige Buforine und von ihnen abgeleitete Peptide können Bakterien ohne erkennbare Permeabilisierung ihrer Membran abtöten. Voraussetzung dafür scheint das Vorhandensein eines Prolins zu sein. Sie besitzen die Fähigkeit, die Membran zu durchdringen an RNA und DNA zu binden (Park, *et al.*, 2000; Park, *et al.*, 1998). Auch das Dermaseptin der Frösche kann die Bakterienmembran durchdringen, ohne sie zu schädigen (Patrzykat, A. *et al.*, 2002) und die RNA-Synthese im Bakterium inhibieren.
3. Das α -Defensin-1 wirkt ähnlich des Buforins und hemmt intrazellulär sowohl die DNA- als auch die Proteinsynthese von *Staphylococcus aureus*. (Xiong, *et al.*, 1999). Es leitet so über die Inhibition dieser essentiellen Synthesen durch Bindung an die ribosomale Untereinheit 50S den Zelltod ein (Xiong, *e al.*, 1999; Otvos, 2005).
4. Eine weitere Möglichkeit ist das Abtöten von Bakterien durch Bindung der Peptide an die Moleküle, welche für die Faltung von Proteinen notwendig sind, das 70 kDa große *Heatshock*-Protein Dnak (spezifisch) oder die 60 kDa großen Chaperone GroEL (unspezifisch), und deren Inhibition (Otvos, *et al.*, 2000; Kragol, *et al.*, 2001). Beispiele hierfür sind die prolinreichen Peptide Pyrrhocoricin und Drosocin.
5. Es gibt AMP, die hauptsächlich antimykotisch wirken, wie z.B. die Histatine, die an Membranrezeptoren von Hefen binden und darüber in das Cytoplasma gelangen. Dort

indizieren sie am Mitochondrium einen ATP-Verlust (Kavanagh, und Dowd, 2004), wodurch die Biosynthese vieler Moleküle gestoppt wird und die Zelle absterben kann.

6. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das prolinreiche Apidaecin zunächst unspezifisch an die äußere Bakterienmembran bindet, diese ohne Membranschädigung durchwandert und anschließend irreversibel an einen im Periplasma befindlichen Rezeptor bindet. Schließlich wird das Peptid in den cytoplasmatischen Raum überführt und kann dort an noch unbekannte Zielstrukturen binden (Castle *et al.*, 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass antimikrobielle Peptide sehr unterschiedliche Wirkungsmechanismen besitzen und so äußerst effizient auf unterschiedlichste mikrobielle Bedrohungen reagieren können. Auch aus diversen Porifera-Spezies konnten verschiedene antimikrobielle Peptide isoliert werden. Allerdings ist nicht eindeutig geklärt, ob alle von den Schwämmen selbst oder den assoziierten Mikroorganismen gebildet werden.

1.3 Die Porifera

1.3.1 **Übersicht**

Der Ursprung der Metazoa war seit jeher ein kontrovers diskutiertes Thema. Die Kolonialisierung einzelliger zu mehrzelligen Organismen stellte vor 1.300 bis 600 Millionen Jahren den ersten Schritt zur Entwicklung komplexer, mehrzelliger Lebensformen dar (Conway-Morris 1998). Nach Fortschritten in der Evolutionsforschung und verschiedenen Theorien über den Ursprung der Metazoa herrscht heute weitgehend die Meinung, dass die Metazoa monophyletischen Ursprungs sind (Borchiellini *et al.*, 2001; Müller 1995) und auf einen gemeinsamen Vorfahren (Urmetazoa) zurückgehen (Müller 2001).

Der Ursprung der *Porifera* (Schwämme, Porenträger; lat. *Porus* = Pore; Öffnung; *ferre* = tragen) kann basierend auf phylogenetischen und paläontologischen Untersuchungen auf einen Zeitraum von 600 bis 800 Millionen Jahren vor unserer Zeit (Präkambium) datiert werden (Müller, 1995; Müller *et al.*, 2004; Mehl *et al.*, 1998). Somit zählen sie zu den ältesten rezenten Metazoa und besitzen einen engen Verwandtschaftsgrad zum Urmetazoa. Dies macht sie zu äußerst interessanten Forschungsobjekten im Bereich der Evolution der Metazoa und der Aufklärung molekularbiologischer Vorgänge. Bis auf wenige Ausnahmen sind Porifera sessile Organismen mit einem hohen Maß an Diversität in Größe (1cm bis 2m), Morphologie und Farbgebung (Storch und Welsch, 1994). Es sind rund 8.000 rezente Arten beschrieben, Schätzungen gehen von bis zu 15.000 Arten aus, von denen lediglich ca. 150 (Familie: *Spongillidae*) limnische Biotope bewohnen; die Mehrzahl ist marin vorkommend (Westheide

und Rieger 1996; Campbell, 1997). Sie sind weltweit verbreitet, sowohl im Flachwasser als auch in bis zu 8.500 Meter tiefen Ozeanraben.

1.3.2 Morphologie

Der meist relativ einfache Grundbauplan der Porifera, das Fehlen von Nervensystem, Gonaden, speziell differenzierten Muskelzellen und „echten“ Organen, unterscheidet sie deutlich von allen anderen Metazoen (Wehner und Gehring, 1995). Dennoch bestehen sie aus von Stammzellen differenzierten Zellen, die strukturelle und funktionale Gebilde und einen definierten, teilweise komplexen Körper formen (Müller *et al.*, 2003). Hierbei ist der gesamte Körperbau von der Filtriertätigkeit bestimmt, die dem Ziel dient, den Schwamm mit Sauerstoff sowie Nahrung in Form von kleinen Zellen (Pico- und Nanoplankton) und kolloidal gelösten organischen Makromolekülen zu versorgen.

Histologisch können drei Zellschichten unterschieden werden, die jedoch nicht über die hochgradigen Spezialisierungen der Zellen der höheren Metazoen (Eumetazoa) verfügen. Die Deckschicht, das *Pinacoderm*, wird aus flachen, plattenförmigen, mitochondrienreichen, meist unbewimperten Zellen, den *Pinacocyten*, gebildet, welche sich rasch voneinander lösen und mit anderen Zellen Bindungen eingehen können. Bei den *Demospongiae* und den *Calcarea* können aus verschiedenen *Pinacocyten* des Oscularandes kontraktile *Porocyten* entstehen, welche die Poren (*Ostien*) im *Exopinacoderm* bilden, die verantwortlich für den Wassereinlass in die *Epirhyse* (einführendes Kanalsystem beim Leucontyp) sind.

Die so genannten *Choanocyten* (Kragengeißelzellen), begeißelte, epithelartige Zellen, welche mittels Geißelbewegungen die gerichtete Bewegung des Wassers durch den Schwammkörper ermöglichen, bilden das innen gelegene *Choanoderm*. *Pinacoderm* und *Choanoderm* sind von Poren durchzogen und werden durch eine bindegewebsartige Zellschicht, das *Mesohyl* voneinander getrennt, welches meist die Hauptmasse des Schwammkörpers ausmacht.

Im *Mesohyl* sind in einer glycoproteinreichen Grundsubstanz verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Funktionalität eingebettet. Der Großteil dieser Zellen sind *Amoebocyten*, die die Fähigkeit besitzen, sich mit Hilfe von Pseudopodien aktiv im Zellverbund zu bewegen, Phagocytose zu betreiben und die durch die *Choanocyten* aufgenommenen Nahrungspartikel zu transportieren. Zu den *Amoebocyten* zählen die *Archaeocyten*, totipotente Zellen, die sich zu jedem anderen Zelltypen differenzieren können und Zelltypen, die an der Bildung von skelettartigen Strukturen beteiligt sind, wie *Lopho-*, *Sclero-* und *Spongiocyten*. Weitere Zelltypen sind die *Thesocyten*, die Nahrungspartikel enthalten und als Energiespeicherzellen in die Gemmulae eingelagert werden und die *Mycocyten*, konzentrisch im *Mesohyl* des

Oscularandes und rings um die ein- und ausführenden Kanäle angeordnete Zellen, die sowohl die Kanäle als auch das *Osculum* durch Kontraktion verschließen können.

Der zentrale Hohlraum im Inneren der Porifera, das *Spongocoel*, wird durch ein System zahlreicher mikroskopisch kleiner Öffnungen (*Ostien*) stetig mit frischem Wasser gefüllt, welches durch das *Osculum* wieder nach außen abgegeben wird. Das so täglich filtrierte Wasservolumen kann dem 20.000fachen des Körpervolumens der Organismen entsprechen. Das Kanalsystem dient den Porifera als Nahrungs-, Geschlechts- und Exkretionsweg.

Die Nahrungsaufnahme erfolgt bei fast allen Arten ausschließlich durch das Filtrieren von Detritus, Plankton und Bakterien aus dem umgebenden Wasser. Durch die Art der aufgenommenen Nahrung erfüllen die Porifera eine nicht zu unterschätzende Reinigungsfunktion in den von ihnen besiedelten Biotopen (Campbell und Reece, 2003).

Im Lebenszyklus der Porifera wechselt sich eine sessile Adultform mit einer mikroskopischen Wimperlarve ab. Nur wenige Arten sind getrennt geschlechtlich (Campbell, 1997), die meisten Porifera zählen zu den *Hermaphroditen* (Zwitter). Ihre Gameten entwickeln sich aus *Choano-* oder *Amoebocyten* (Storch und Welsch, 1996), die Eizellen lagern sich im *Mesohyl* ein, Spermien werden über das *Spongocoel* entlassen. Benachbarte Individuen nehmen die Spermien mit dem eingestrudelten Wasser auf, die Befruchtung findet im *Mesohyl* statt. Aus der Zygote bildet sich eine frei schwimmende, bewimperte Larve, die ebenfalls, wie die Spermien, aus dem *Spongocoel* ins Wasser entlassen wird. Nach einer Zeit von wenigen Stunden bis einigen Tagen setzt sich die Larve mittels kollagener Ausscheidungen auf einem geeigneten Untergrund fest (Westheide und Rieger, 1996), wo sie zu dem adulten Schwamm heranwächst. Analog zur geschlechtlichen Fortpflanzung verfügen einige Arten über die Fähigkeit, sich asexuell, via Knospung oder Fragmentierung, zu reproduzieren, wobei die am weitesten verbreitete Variante die Ausbildung von kapselförmigen *Gemmulae* ist (Storch und Welsch, 1994). Diese dienen auf Grund ihrer dicken Sponginschicht, die sie schützt, auch als Überlebensform ungünstiger Lebensbedingungen (Westheide und Rieger, 1996).

Erst um 1766 wurden Schwämme als Tiere identifiziert (Wehner und Gering, 1995), zum Teil aufgrund ihrer „Immobilität“. Doch sie sind durch koordinierte, gerichtete Kriechbewegungen einzelner Zellen bedingt lokomotionsfähig (Westheide und Rieger, 1996). Eine Flucht vor Fraßfeinden ist dadurch allerdings nicht möglich, weswegen die Schwämme andere Strategien gegen diese und eine Reihe anderer Bedrohungen, z.B. schädliche Bakterien und Algen, die sie überwachsen könnten, entwickelt haben. Diese bestehen, neben dem mechanischen Schutz durch die Spiculae, in einer Vielzahl unterschiedlicher, häufig toxischer Sekundärmetabolite (Müller *et al.*, 1986). So weisen die Porifera unter den Metazoa die weitaus größte Anzahl

und Variabilität an bioaktiven Substanzen auf (Sarma *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 2000), die antiinflammatorische, antibiotische, virostatistische und cytotoxische Effekte haben können.

1.3.3 Symbiosen

In ihren natürlichen Habitaten sind Porifera häufig mit Symbionten wie Bakterien (Vacelet, 1975) oder Pilzen assoziiert. Als Filtrierer nehmen Schwämme große Mengen an Mikroorganismen aus dem Wasser auf, die in speziellen Zellen im *Mesohyl* (Hentschel *et al.*, 2003, Böhm *et al.*, 2001) gespeichert werden können, wo sie Photosyntheseprodukte (Wilkinson, 1983) und Sekundärmetabolite (Schmidt *et al.*, 2000) an den Schwamm abgeben, während sie durch seine Nähe geschützt werden. Die im Schwamm enthaltenen Mikroorganismen, wie einzellige Algen (Vacelet und Donadey, 1977), Cyanobakterien (Thacker und Starnes, 2003), Dinoflagellaten (Garson *et al.*, 1998) etc., können bis zu 40-60% der Biomasse ihres Wirtes ausmachen (Wilkinson, 1978). Eine zweite Möglichkeit, wie die symbiotischen Mikroorganismen in den Wirt gelangen, stellt die vertikale Transmission über die Oozyten oder Larven dar (Usher *et al.*, 2001; Anakina und Drozdov, 2001). Während der Aufnahme und dem Verdau der Bakterien können Teile deren DNA in die Schwammzellen gelangen und in das Genom integriert werden. Dieser horizontale Gentransfer spielt eine wichtige Rolle in Artenentstehung, Adaptation und Evolution des Lebens (Brown, 2003). Eine weitere häufige Form der Symbiose zeigt der Schwamm *Suberites domuncula*, der mit einem Einsiedlerkrebs (*Pagurus sp.*) vergesellschaftet ist. Er schützt ihn durch seine bioaktiven Substanzen, während ihn der Krebs trägt und es ihm ermöglicht, z. B. seine Spermien über ein größeres Gebiet zu verteilen (s. Abb.2).



Abbildung 2: *Pagurus sp.* in *Suberites domuncula* ©Baumhauer-Klein.

1.3.4 Der Grundbauplan der Porifera

Aufgrund der Organisation ihres Körperbaus lassen sich die Porifera in folgende drei Typen einteilen: Ascon- (Abb. 3a, gr. *Ascōs* = Schlauch), Sycon- (Abb. 3b gr. *sykon* = Feige) und Leucon-Typ (Abb. 3c, gr. *leucos* = weiß, nach dem alten Gattungsnamen *Leuconia*).

Der Ascontyp, eine dünnwandige Röhre mit einem Hohlraum (*Spongocoel*, Atrium), in den die *Aporphysen* (ausführendes Kanalsystem) münden und einem einzigen Osculum, durch das eingestrudelt Wasser den Schwamm verlässt, ist die einfachste Variante des Schwammaufbaus. Ein einschichtiges *Picanoderm* bildet die Außenwand und die *Choanocyten* sind als ebenfalls einschichtiges, ungefaltetes Epithel an der Innenseite der Schwammwand angeordnet. Das *Mesohyl* ist sehr dünn und von unverzweigten Kanälen durchzogen. Der asconoide Bauplan ist nur von zwei Vertretern der *Calcarea* (Kalkschwämme) bekannt, den *Clathrinida* den *Leucosoleniida*. Es existieren jedoch eine Reihe von höher entwickelten Schwämmen, die die asconoide Form während ihrer Entwicklung, kurz nach Festheftung der Larve, durchlaufen.

Auch der Sycontyp ist eine weniger komplexe Körperform, die nur bei wenigen Calcareaarten vorkommt. In dieser Bauform werden *Pinacoderm* und *Choanoderm* zweidimensional eingefaltet, wodurch im Gastralraum röhrenförmige *Choanocytenkammern* und radiale Ausbuchtungen entstehen. Dies erhöht die Effektivität der Nutzung des einströmenden Wassers und die Stabilität des Schwammes. Sowohl Ascon-, als auch Sycontyp werden aufgrund ihres Bauplans nicht größer als einige Zentimeter.

Der Leucontyp, dessen Vertreter bis zu zwei Meter groß werden können, ist der am weitesten verbreitete und komplexeste Schwammbauplan. Er entsteht durch Vergrößerung des *Mesohyls*, das durch den Einbau von skelettären Strukturen ermöglicht wird und eine zunehmende Einfaltung des *Choanoderms*, was zu isolierten, sphäroidalen Choanocytenkammern führt, die innerhalb des *Mesohyls* angeordnet sind. Durch Entstehung eines einführenden Kanalsystems (*Epirhyse*), durch welches Wasser in die Choanocytenkammern des Schwammes gelangt, wird die mehrschichtige Anordnung von Zellagen ermöglicht, was zu einer enormen Vergrößerung der mit dem Wasser, und somit auch den darin enthaltenen Nahrungspartikeln, in Kontakt stehenden Oberfläche führt (Wehner und Gehring, 1995). Dies ermöglicht eine effizientere Filtration und wurde vom Ascon- über den Sycon- bis hin zu Leucontyp optimiert.

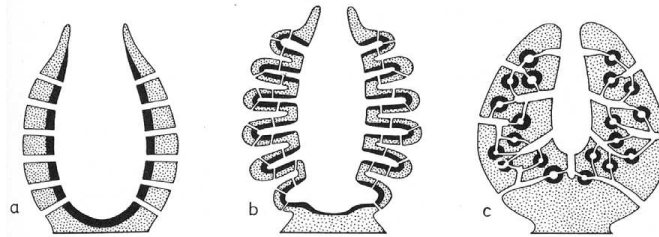


Abbildung 3: Körperbau der Porifera: Ascon-Typ (a), Sycon-Typ (b) und Leucon-Typ (c). Abbildung von V. Storch – Kurzes Lehrbuch der Zoologie.

1.3.5 Systematik

Der Stamm Porifera wurde sehr lange Zeit nur in zwei Klassen, die *Calcarea* (Kalkschwämme) und die *Silicea* (Kieselschwämme) unterteilt. Später kamen hierzu die *Sclerospongiae*, von denen aber heute bekannt ist, dass es sich hierbei um eine Gruppe sich konvergent entwickelter Demospongien handelt, die ein festes, basales Kalkskelett aufweisen (Westheide und Rieger, 1996). Die moderne Einteilung besteht aufgrund der chemischen Zusammensetzung der inneren Skelette aus drei Subphyla. Dies sind *Calcarea* (Kalkschwämme), *Demospongia* (Hornschwämme) und *Hexactinellida* (Glasschwämme) (Storch und Welsch, 1994). Die zwei Unterklassen der *Calcarea* kommen nur im Ascon- und Sycontyp vor und bilden ein Skelett aus ein-, drei- oder vierstrahligen Kalknadeln, wohingegen die *Hexactinellidae*, die ca. 300 Gattungen in zwei Unterklassen umfassen, nur im Sycontyp vorkommen und ein Skelett aus drei oder sechsstrahligen Kieselnadeln bilden. Die mit 95% aller rezenten Arten bedeutendste Gruppe, die Demospongiae, umfassen ca. 600 Gattungen in drei Unterklassen und bilden ein Skelett aus ein- oder vierstrahligen Silikatnadeln oder Spongin. Sie kommen lediglich in der Leuconform vor.

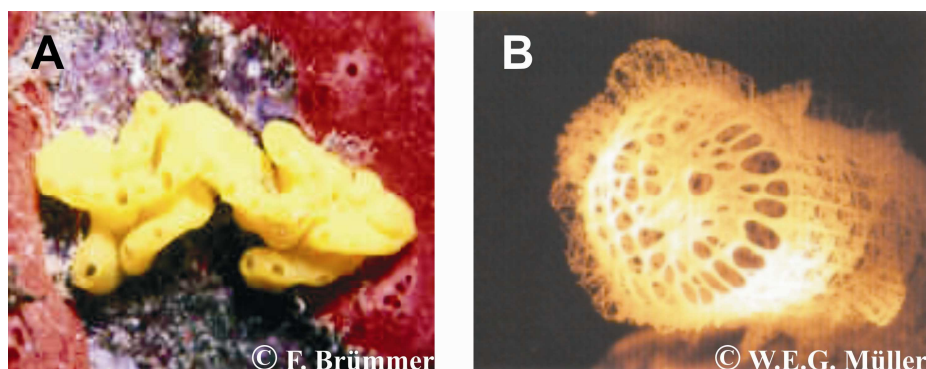


Abbildung 4: Beispiele von Organismen aus verschiedenen Schwammklassen. A: *Clathrina clathrus* (Calcarea) und B: *Euplectella aspergillum* (Hexactinellida); Demospongiae siehe Abbildung 2.

1.3.6 Die Monophylie der Metazoa

Aufgrund ihres relativ einfachen Aufbaus stellte die phylogenetische Einordnung der Porifera lange Zeit ein scheinbar unlösbares Problem dar und die Schwämme wurden im Laufe der

Jahre den unterschiedlichsten Organismen zugeordnet. So wurden sie lange Zeit als Parazoa den Metazoa gegenüber gestellt (Müller, 2001) oder zu den Protozoa gezählt (Spencer, 1864) bevor Haeckel sie auf Grund ontogenetischer Untersuchungen 1896 den Metazoa zuordnete. Erst die zunehmende Anwendung diverser molekularbiologischer Techniken (Müller *et al.*, 2004), vor allem an den marinen Schwämmen *Suberites domuncula* und *Geodia cydonium*, ermöglichte es, die Porifera phylogenetisch den Metazoa zuzuordnen, und führte zu der Annahme, dass alle Metazoa monophyletischen Ursprungs sind (Reitner und Mehl 1995; Cavalier-Smith *et al.*, 1996). Heute geht man davon aus, daß sie die ältesten multizellulären Organismen und somit die ursprünglichsten Metazoen darstellen (Wiens, 2004). Bestätigt wird dies anhand verschiedener in Schwämmen identifizierter Moleküle, die charakteristische funktionale und strukturelle Metazoenproteine darstellen, welche weder in Pflanzen noch in Pilzen oder Protozoen nachgewiesen werden konnten (Wiens, 2004). Dies sind z.B. Transkriptionsfaktoren, Morphogene und isolierte Stammzell-Markergene, die verdeutlichen, dass Schwämme die Fähigkeit zur Differenzierung besitzen (Müller *et al.*, 2004); die V-Domäne der Immunglobuline (Schäcke *et al.*, 1994; Blumbach *et al.*, 1999), Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Schäcke *et al.*, 1994), Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (Müller, 2001), GPX (*Glutathion Peroxidase*) und AIF-1 (*Allograft inflammatory factor*), die darauf hinweisen, dass Schwämme Apoptose betreiben und über ein Immunsystem verfügen (Kruse *et al.*, 1999). Interessant ist zudem die histologische Übereinstimmung der *Choanocyten*, die auch außerhalb der Porifera auftreten, speziell im Vergleich mit den Choanoflagellaten sind die Übereinstimmungen zu den Letzteren bis in Details vorhanden, was auf eine direkte Verwandtschaft mit diesen hindeutet (Müller und Müller, 1994; Storch und Welsch, 1994; Müller, 1995) und die Entdeckung von Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsmolekülen wie Fibronectin (Pahler *et al.*, 1998), Galektin (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996) und Lectin (Grundacker *et al.*, 2001), welche eine hohe Homologie in DNA-Sequenz und Proteinfunktion mit entsprechenden Molekülen anderer Metazoa aufweisen. Anhand dieser Ergebnisse wurde der monophyletische Ursprung aller Metazoa (Reitner und Mehl, 1995; Cavalier-Smith *et al.*, 1996), die Eingliederung der Porifera an der Basis (Müller und Müller, 1995; Müller, 2001) und die Abstammung von gemeinsamen Vorfahren, den Urmetazoa (Müller, 2001) bestätigt.

1.3.7 *Suberites domuncula*

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Schwamm *Suberites domuncula* (Klasse: *Demospongiae*, Ordnung: *Hadromerida*, Familie: *Suberitidae*) wurde 1792 von G. Olivi erstmals beschrieben. Diese marin vorkommende Art ist unter anderem in der Bering See,

dem arktischen, indischen und karibischen Ozean und dem Mittelmeer anzutreffen, wo sie in Tiefen von wenigen bis zu 330 Metern vorkommt. Die Größe der Tiere beläuft sich auf ca. 6-8 cm Länge und die Farbvariationen der einzelnen Individuen reichen von hellgelb über orange bis hin zu blau/violett. Einzigartig für diese Art ist die Gemeinschaft mit einem Einsiedlerkrebs, auf dessen Gehäuse sie siedelt und dadurch eine „passive Mobilität“ erlangt. Ihre Morphologie ist mehr oder minder der Kugelform angenähert.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Immunsystem eines Organismus stellt einen essentiellen, universellen Mechanismus dar, der ihn vor äußeren Einflüssen und Bedrohungen schützt. Ein wichtiger Teil dieses Abwehrsystems ist die so genannte Apoptose.

Die Apoptose stellt eine sehr spezifische Form des Zelltods dar, der essentiell für die Eliminierung beschädigter, infizierter oder unerwünschter Zellen ist. Die Schwämme als älteste, rezente Metazoen bieten somit die Möglichkeit die Mechanismen der Apoptose und die daran beteiligten Proteine in ihren Anfängen zu untersuchen.

Es konnten bereits einige Proteine aus Schwämmen identifiziert werden, die potentielle Bestandteile des Apoptosemechanismus darstellen. Darunter sind z.B. ein TNF Homolog (Wiens *et al.* 2000), eine Effectorcaspase (Wiens *et al.* 2007), Vertreter der Bcl-2 Familie (Wiens *et al.* 2000 und 2001) und weitere Caspasen (Wiens *et al.* 2003). Das Ziel dieser Arbeit war es ein neues Protein zu identifizieren welches ein potentielles Bestandteil des Abwehrsystems und speziell der Apoptosemaschinerie des Schwammes *Suberites domuncula* ist. Die Möglichkeit, dass das Protein an der Apoptose beteiligt ist konnte über die so genannte Todesdomäne gewährleistet werden, da Proteine die diese Domäne enthalten eine wichtige Rolle während der Signaltransduktion der Apoptose spielen. So sollte ein neues Protein mit Todesdomäne mit Hilfe molekularbiologischer Methoden identifiziert und charakterisiert und auf mögliche Interaktionspartner untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Adeninsulfat	SIGMA, Deisenhofen
Agar-Agar	ROTH, Karlsruhe
Agarose NA	PHARMACIA AB, Uppsala, Schweden
Aminosäure Mix/Yeast Synthetic Drop out Medium without Leu, His, Tryp, Ura	SIGMA, Deisenhofen
3-Amino-1,2,4-triazol	SIGMA, Deisenhofen
Ammoniumperoxosulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicilin	SIGMA, Deisenhofen
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	ROCHE Mannheim
L-Arabinose	ROTH, Karlsruhe
Borsäure	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (Bcip)	ROTH, Karlsruhe
BSA (Serumalbumin)	ROTH, Karlsruhe
Carbenicilin	ROTH, Karlsruhe
CDP-Star™ ready to use	ROCHE Mannheim
Chlorophorm/Trichlormethan	ROTH, Karlsruhe
Dextrose	ROTH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	ROTH, Karlsruhe
DigEasyHyb	ROCHE Mannheim
Dimethylformamid (DMF)	MERCK, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	SIGMA, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH, Karlsruhe
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	ROTH, Karlsruhe
EDTA	SIGMA, Deisenhofen
Ethanol	ROTH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen
5-Fluoroorotsäure (5FOA)	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Flüssigstickstoff	LINDE Wiesbaden
Formaldehyd	ROTH, Karlsruhe
Formamid	ROTH, Karlsruhe
Gentamycin	SIGMA, Deisenhofen

Bezeichnung	Hersteller
Glycerol	ROTH, Karlsruhe
Glucose	SIGMA, Deisenhofen
Harnstoff	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
Hefe-Extrakt	ROTH, Karlsruhe
L-Histidin	SIGMA, Deisenhofen
Imidazol	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Kanamycin	SIGMA, Deisenhofen
LB-Agar	ROTH, Karlsruhe
L-Leucin	SIGMA, Deisenhofen
Lipopolysaccharide (LPS)	SIGMA, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	MERCK, Darmstad
Sanalac Milchpulver	ConAgra Foods, Omaha, USA
Magnesiumphosphat ($MgSO_4$)	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumcitrat	ROTH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe
Di Natriumhydrogenphosphat 2 hydrat (NaH_2PO_4)	MERCK, Darmstadt
p-Nitro-tetrazolium-blauchlorid (NBT)	ROTH, Karlsruhe
PAM (Pam ₃ Csy Ser)	ALEXIS, Grünberg
10x PBS	QBiogene Carlsbad, USA
Penicilin/Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen
Pepton	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
Poly IC-Natriumsalz	SIGMA, Deisenhofen
Polyethylenglycol/Lithiumacetat (PEG/LiAc)	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Röntgenfilmentwickler	KODAK Stuttgart
Röntgenfilmfixierer	KODAK Stuttgart
Saccharose	ROTH, Karlsruhe
Salzsäure konzentriert (HCl)	ROTH, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	ROTH, Karlsruhe
Sequa Gel Complete	ROTH, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
Sequa Gel XR	ROTH, Karlsruhe
10xTBS Pulver	ROTH, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin	SIGMA, Deisenhofen
Tris	SIGMA, Deisenhofen
Trizol	GIBCO, Eggenstein
L-Tryptophan	SIGMA, Deisenhofen
Tween®20 (Poly(oxyethylen)-sorbitan monolaurat)	SIGMA, Deisenhofen
L-Uracil	SIGMA, Deisenhofen
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D galactopyranosid)	ROTH, Karlsruhe
Yeast nitrogene base ohne Aminosäuren	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Zeocin	INVIVOGEN San Diego, USA

3.1.1 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Blocking-Puffer	ROCHE, Mannheim
Blocking Reagenz	ROCHE, Mannheim
iBlot™ Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
BugBuster®	NOVAGEN, MERCK, Darmstadt
DIG Wash and Block Puffer Set	ROCHE, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	ROCHE, Mannheim
HighPure PCR Product Purification System	ROCHE, Mannheim
LB Agar LAB M™	TOPLEY HOUSE, Lancashire, England
ChargeSwitch® Plasmid Yeast Mini Kit	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
LB Broth LAB M™	TOPLEY HOUSE, Lancashire, England
Loading Dye Solution (6x)	FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot
Ni-NTA-Agarose	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
NucleoSpin® Extract	MACHEREY-NAGEL, Düren
NuPAGE® 20xMOPS/SDS Laufpuffer	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
NuPAGE® 12% Bis-Tris Gel 1.0mm x 12 oder 15 well	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
PCR Dig Probe Synthesis Kit	ROCHE, Mannheim
pGEM®-T Vektor System	PROMEGA, Madison, USA
Protease Inhibitor Tabletten	ROCHE, Mannheim

Bezeichnung	Hersteller
QUANTI-blue™	INVIVOGEN San Diego, USA
Rapid Ligationspuffer (2x)	PROMEGA, Madison, USA
Rotiporese® Gel 30	ROTH, Karlsruhe
Roti-Quant R250	ROTH, Karlsruhe
SequaGel® Complete	National Diagnostics, Georgia, USA
SEQUAGEL® XR	National Diagnostics, Georgia, USA
SDS-Gel-Cassetten	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Technovit 8100	Heraeus Kulzer, Wehrheim
humaner TNF-alpha	ImmunoTools, Friesoythe
10x Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE)	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
TBS (Tris-buffered saline, 20X)	APPLICHEM GmbH, Darmstadt

3.1.2 Enzyme, entsprechende Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Benzonase	MERCK, Darmstadt
BP Clonase™ Mix	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
LR Clonase™ Mix	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
DNA <i>Taq</i> Polymerase (1U/μl) 10x <i>Taq</i> Puffer 25 mM MgCl ₂	FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot
PEQlab <i>Taq</i> Polymerase (5U/μl) 10x <i>Taq</i> Puffer complete 10x <i>Taq</i> Puffer incomplete 25 mM MgCl ₂	PEQLAB, Erlangen
Proteinkinase K	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
RNase H	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
<i>Taq</i> Polymerase	INVITROGEN Ltd Paisley, UK

3.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

3.1.3.1 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung/Herstellung
Ampicillinlösung	500 mg Ampicillin (Natriumsalz) in 10 ml <i>Aqua dest.</i> gelöst, steril filtriert, aliquotiert, bei -20°C lagerstabil
10 %iges APS	10 g APS in 100 ml <i>Aqua dest.</i> gelöst
Blocking-Lösung	3% eines 10 %igen Blockingpuffers 1 % von 10x TBS, ad <i>Aqua bidest.</i>

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
BugBuster®	50 ml BugBuster Benzonase 25 U/ml 1 Tablette PI <i>Complete-Mini</i>
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau (w/v), 40 % Saccharose (w/v) in 10 ml <i>Aqua dest.</i>
IPTG (0,84 M)	2 g in 10 ml <i>Aqua bidest.</i> Gelöst, steril filtriert und aliquotiert
40%ige Glucoselösung	400 g Glucose in 1 l <i>Aqua dest.</i> lösen, 20 min autoklavieren
MOPS	0,2 M MOPS 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA Mit DMPC-Wasser ansetzen und auf pH7 einstellen.
1x PBS	5 ml 10xPBS mit 45 ml <i>Aqua dest</i> auffüllen
P1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl Mit DMPC-Wasser auf 1 l auffüllen, über Nacht stehen lassen und autoklavieren.
P2	10% Blocking-Reagenz (w/v) in P1
P3	100 mM Tris 100 mM NaCl Mit DMPC-Wasser auf 1 l auffüllen, auf pH9,5 einstellen, über Nacht stehen lassen und autoklavieren.
RNA Denaturierungspuffer	45,5% Formamid [deionisiert] (v/v) 15% Formaldehyd (v/v) 10% Glycerol (v/v) 10% 10x MOPS (v/v) 0,1% Bromphenolblau (v/v)
Roti®-Load 1 4x	ROTH, Karlsruhe
20xSSC	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat Auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
1xTBE	100 ml 10xTBE in 900 ml <i>Aqua dest.</i>
1xTBS	50 g TBS Pulver in 1 l <i>Aqua dest</i> lösen
1x TBS-Tween20	1 ml TWEEN20 in 1 l 1x TBS lösen
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol (v/v)
1,5M Tris HCl pH 8.8	271,79 g Tris in 950 ml <i>Aqua dest</i> lösen, den pH Wert mit HCl einstellen und auf 1 l auffüllen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
1M Tris-HCl pH 6,8	181,19 g Tris in 950 ml Aqua <i>dest</i> lösen, den pH Wert mit HCl einstellen und auf 1 l auffüllen
X-Gal	500 mg X-Gal in 10 ml DMF gelöst
Z Puffer	16.1 g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 5.5 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0.75 g KCl 0.246 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O mit autoklaviertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, den pH auf 7.0 einstellen und steril filtrieren

3.1.3.2 Kulturmedien

Die angegebenen Mengen der Inhaltsstoffe beziehen sich auf 1l Endvolumen in destilliertem Wasser. Nach Autoklavieren bei 121°C für 20 Minuten konnte die Zugabe von Antibiotika, bei einer Temperatur von ungefähr 50°C erfolgen. Dies dient der negativen Selektion.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarplatten mit Gentamycin	1 l LB-Agar Frisch autoklavierten Agar im Wasserbad auf 60°C abkühlen lassen, danach Zugabe von: 10 µg/ml Gentamycin
Agarplatten mit Kanamycin	1 l LB-Agar Frisch autoklavierten Agar im Wasserbad auf 60°C abkühlen lassen, danach Zugabe von: 50 µg/ml Kanamycin
AIX- Agarplatten (Ampicillin IPTG X-Gal)	1 l LB-Agar Frisch autoklavierten Agar im Wasserbad auf 60°C abkühlen lassen, danach Zugabe von: 100 µg/ml-1 Ampicillin 0,2 mM IPTG 0,05% X – Gal (w/v)
DMEM (Dulbecco's MEM) Biochrom AG, Berlin	3,7 g/l NaHCO ₃ 4,5 g/l D-Glucose Glutamin Na- Pyruvat
LB (Luria Bertani)-Agar	10 g/l Casein (Pepton) 5 g/l Yeast Extract 5 g/l Natriumchlorid 15 g/l Agar pH 7,5 eingestellt mit NaOH

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB (Luria Bertani)-Medium	10 g/l Casein (Pepton) 5 g/l Yeast Extract 5 g/l Natriumchlorid pH 7,0 eingestellt mit NaOH
SOC-Medium	2% Trypton (w/v) 0,5% Hefeextrakt (w/v) 8,6 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 20 mM Magnesiumsulfat 20 mM Glukose NOVAGEN, MERCK, Darmstadt
YPD Medium	QBiogene Carlsbad, USA
YPD Agar	QBiogene Carlsbad, USA

3.2 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Digoxigenin-AK	ROCHE, Mannheim
Anti-His (C-terminal)-IgG (mouse)	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Anti-Maus-Ak-Alkalische Phosphatase gelabelt	SIGMA, Deisenhofen
Anti-Myc-AK	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Anti-Rabbit-AK Alkalische Phosphatase	SIGMA, Deisenhofen

3.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Disposable 5 ml Polypropylen Säulen	PIERCE, Rockford, USA
Einwegspritzen: 10 ml und 25 ml	BRAUN, Melsungen
Falcon Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	BECTON & DICKINSON, New Jersey, USA
Fertig-SDS-Gele	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Filter (5 ml Polypropylene Columns)	PIERCE BIOTECHNOLOGY, Rockfort, USA
25 ml Zellkulturflaschen	Becton Dickinsen, Heidelberg
Latexhandschuhe	N.S. UNI GLOVES, SDN. BHD., Serembau, Malaysia
Nylonmembran	ROCHE, Mannheim
Parafilm M	American National CAN Greenwich, USA
Pasteurpipetten	POULTON & GRAF GmbH, Wertheim

Bezeichnung	Hersteller
PCR-Pipettenspitzen	BIOZYM, Hess. Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	ABGENE, Epsom, England
Petrischalen	NUNC, Wiesbaden
Pipettenspitzen	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	BRAND, Wertheim
Röntgenfilm Fuji RX New	BECHTHOLD, Kelkheim
Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
96 well Microtest TM Platten	BECTON DICKINSON, Franklin Lakes, USA
Whatman 3 mm-Papier	WHATMAN, über Fischer, Frankfurt

3.4 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav Modell C#91294	WEBECO, Ober-Ramstadt
Brutschrank Queue Modell QWJ 500	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank Typ BK 2/56	Ehret, Emmendingen
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, München
ELISA Reader Sunrise	TECAN, Crailsheim
Gel Dokumentationssystem GelDoc 2k System PC /CCIR Gel	BIO-RAD, Hercules, USA
Heizplatte	IKA LABORTECHNIK, Staufen
iBlot	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Kolbenhubpipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	GILSON, Frankreich
Heizblock:	
UNITEK HB-130	SALMON ELECTRONICS LTD, England
Wealtec HB-1	PEQLAB, Erlangen
Thermostat 5320	EPPENDORF AG, Hamburg
Thermomix comfort	EPPENDORF AG, Hamburg
Laminar Flow, Sterilbank	KÖTTERMANN [®] , Hänigsen
Li-Cor Sequenzierer Global Edition IR ² Long readir 4200	MWG AG Biotech, Ebersberg
Lichtmikroskop Olympus AHBT3	OLYMPUS, Hamburg
Magnetrührer MR 3000 u MR 3001 Magnetrührer IKAMAG [®]	HEIDOLPH, Kelheim
pH-Meter (Typ CG 840)	SCHOTT, Mainz
Photometer GeneQuant II	PHARMACIA BIOTECH, Cambridge, England

Bezeichnung	Herstellung
Precyllys 24	PEQLAB, Erlangen
Rollinkubator	eigene Anfertigung
Schüttler IKA [®] VIBRAX VXR basic	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Schüttler Heidolph Polymax 1040	HEIDOLPH, Kelheim
Schüttelinkubator CERTOMAT [®] R	BRAUN, Melsungen
Spannungsgeräte: PowerPAC 200 PowerPAC 300	BIO-RAD, München
Sterilbank	Köttermann, Hängingen
Trockensterilisationsschrank 421153000200	WTP Binder, Tübingen
Thermocycler: BIO-RAD i-cycler BIO-RAD MyCycler [™] Perkin Elmer Geneamp 9600 Primus 96 ^{plus}	BIO-RAD, München BIO-RAD, München APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt MWG AG Biotech, Ebersberg
UV Cross – Linker Stratalink [®]	Stratagene Corp., La Jolla, USA
UVP White/ UV Transilluminator UVPI Image Store 5000	UVP LIMITED, Cambridge, England
Vortexer REAX 2000 Heidolph,	LABOTECH, Wiesbaden
Waage Adventure-Pro	OHAUS Corporation, NJ, USA
Wasserbad Julabo Exatherm electronic U3	JUCHHEIM Labortechnik, Seelbach
Wärmeschrank/ Inkubationsschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
Zentrifugen: 5415 R 5415 C 5804 R	EPPENDORF, Hamburg EPPENDORF, Hamburg EPPENDORF, Hamburg

3.5 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> NovaBlue Singles [™]	<i>endA1 hsdR17</i> ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) <i>supE44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI^HZΔM15</i> ::Tn10(<i>tet^R</i>)]	NOVAGEN, MERCK, Darmstadt
OneShot [®] BL21 (DE3) Chemically Competent <i>E. coli</i>	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	INVITROGEN Ltd Paisley, UK

Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21-AI TM One Shot® Chemically Competent <i>E. coli</i>	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-)</i> gal dcm araB:: T7RNAP-tetA	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
OneShot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 galU galK rpsL (StrR) <i>endA1 nupG</i>	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Rosetta TM (DE3) Competent Cells	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Merck KGaA, Darmstadt,

3.6 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MaV203 Competent Cells, Library Scale	MATα, <i>leu2-3, 112, trp1-901, his3Δ200,</i> <i>ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL10::</i> <i>URA3, GAL1::lacZ, HIS3UASGAL1::</i> <i>HIS3@LYS2, can1R, cyh2R)</i>	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MaV203 Competent Cells, Subclone Scale	MATα, <i>leu2-3,112, trp1-901, his3Δ200,</i> <i>ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL10::</i> <i>URA3, GAL1::lacZ, HIS3UASGAL1::</i> <i>HIS3@LYS2, can1R, cyh2R)</i> (Vidal)	INVITROGEN Ltd Paisley, UK

3.7 Längen- und Gewichtsstandarts

Bezeichnung	Fragmentgröße	Hersteller
GeneRuler TM 1 kb DNA ladder mix	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250	FERMENTAS GmbH, St. Leon – Rot
Precision Plus Dual Color Protein Marker	250,150,100,75,50,37,25,20,15,10	BIO-RAD, München

3.8 Zelllinien

Es wurde die murine Makrophagen Zelllinie RAW-Blue von INVIVOGEN verwendet.

3.9 cDNA Bank

Die verwendete cDNA Bank ist in den pBK-CMV Vektor (4518 Bp) von STRATAGENE, Heidelberg inkloniert und wurde von Kruse *et al.*, 1997 hergestellt.

3.10 Vektoren

3.10.1 Klonierungsvektoren

Bezeichnung	Hersteller
pGEM [®] -T Vektor	PROMEGA, Madison, USA
pCR [®] II-TOPO [®]	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
pCR [®] 4-TOPO [®]	INVITROGEN Ltd Paisley, UK

3.10.2 Expressionsvektoren

Bezeichnung	Hersteller
pTrcHis2 TOPO [®]	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
pBAD/gIII A	INVITROGEN Ltd Paisley, UK

3.11 Primer

3.11.1 Vektorspezifische Primer (pGEM[®]-T)

Bezeichnung	Sequenz	T _m
BK	5`-CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3`	T _m = 62 °C
CMVF	5`-CTT GAT TAC GCC AAG CTC-3`	T _m = 58 °C
CMVR	5`-TAG GGC GAA TTG GGT ACA C-3`	T _m = 58 °C
M13	5`-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3`	T _m = 53,7 °C
SP6	5`-TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C-3`	T _m = 60 °C
T3	5`-CGG AAT TAA CC TCA CTA AAG-3`	T _m = 60 °C
T7	5`-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3`	T _m = 64 °C

3.11.2 Gelabelte Primer (pGEM[®]-T und TOPO[®])

Bezeichnung	Sequenz	T _m
T7	5`-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG-3`	T _m = 56 °C
SP6	5`-TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C-3`	T _m = 56 °C

3.11.3 Genspezifische Primer

3.11.3.1 Forward und Reverse Primer

Bezeichnung	Sequenz	T _m
DDSD_F1	5`-GCG TAT GGT ATA GGC TT-3`	T _m = 48,6 °C
DDSD_R2	5`-CCA GTC GAA TAG CTA GAT GT-3`	T _m = 55,3 °C
DD_R4	5`-GCT ATT GAT CTC TGG TTT A-3`	T _m = 51,4 °C

Bezeichnung	Sequenz	T _m
DD_R7*	5'-GGT GTC GAT AGT TGT AGT A-3'	T _m = 52,4 °C
TNF/R_Klon F2	5'-CAC CAT GGC TTG CTC CA-3'	T _m = 55,2 °C

3.11.4 Sondenprimer

Bezeichnung	Sequenz	T _m
Brev_Exp_F1	5'-AAG ATT GCT ATC TTT GTC CT-3'	T _m = 51,2 °C
Brev_Exp_R1	5'-GCC CCA GCG ACG TGT A-3'	T _m = 56,9 °C
TNF/R_F1_Ubiq	5'-GTC CAA TTC TCT GTG CAA-3'	T _m = 51,4 °C
DD_R3	5'-GAA CTA ACC TGT GAG TAT-3'	T _m = 49,1 °C

3.11.5 Expressionsprimer

Bezeichnung	Sequenz	T _m
Brev_pBAD_F2	5'-CAT GCC ATG GAT ATG AAG ATT GCT ATC TTT GTC CT-3'	T _m = 67,1 °C
Brev_pBAD_R1	5'-CTC TAG AGC GCC CCA GCG ACG TGT A-3'	T _m = 69,5 °C
TNF/R_Exp_F1	5'-GCT TGC TCC AAG CTT TGC CGT-3'	T _m = 61,8 °C
TNF/R_Exp_R1	5'-CTC TGT TTG TGT CTC TTG AA-3'	T _m = 61,3 °C

3.12 Computerprogramme

Bezeichnung	Entwickler
BLAST Service	NIH-NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov (Altschul <i>et al.</i> , 1990)
ClustalX (1.81)	EMBL, Hixton, England ; (Thompson <i>et al.</i> , 1997) (http://www.ebi.ac.uk/embl/)
ClustalW 1.81	EMBL, Hixton, England (Thompson, J. D., Higgins, D.G.1994)
Dnasis V 5.0	HITACHI Software Engineering Co., Ltd, Japan
DNASStar V 4.04	DNASStar Inc., Madison
e-Seq® V 2.0	LI - COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
ELM	The Eukaryotic Linear Motiv resource for Functional Sites in Proteins: http://elm.eu.org/
Excel 2003®	MICROSOFT Corp., Redmond, USA
Expasy	http://expasy.org/tools/
GENEDOC V2.6.002	Nicholas und Nicholas, www.cris.com
Jpred	http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/

Bezeichnung	Entwickler
Pfam	Protein families database of alignments and HMMs: http://sanger.ac.uk/cgi-bin/pfam/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
Sponge Base	https://octavia.vk.medizin.uni-mainz.de/index.cgi
TreeView V1.6.6	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html
Vector NTI Advance 10	INVITROGEN Ltd Paisley, UK
Word 2003®	MICROSOFT Corp.,Redmond, USA

4 Methoden

4.1 Primerdesign

Bei Primern handelt es sich um kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, die mit bestimmten DNA-Abschnitten hybridisieren können, eines an jedem Strang der Doppelhelix. Mit Hilfe eines solchen Adapters können Nukleinsäuren amplifiziert (s. 4.2.1), vervollständigt (s. 4.2.2), sequenziert (s. 4.13.1) oder spezifisch markiert (s. 4.2.6) werden. Für die Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz mittels PCR sind Primer eine grundlegende Voraussetzung. Der Bereich, der von dem Primerpaar umschlossen wird, entspricht dem, der durch die DNA-Polymerase amplifiziert wird. Für das Design der Primer sind einige Richtlinien zu beachten:

- Die Primerlängen sollten zwischen 20 und 26 bp liegen
- Der bevorzugter G/C-Gehalt der Primer liegt zwischen 40 und 60 %
- Bevorzugung eines A oder T am 3'-Ende
- Die Schmelztemperatur sollte zwischen 54 °C und 65° C liegen
- Die Schmelztemperaturunterschiede eines Primerpaares sollten nicht mehr als 4 °C betragen
- sich wiederholende Nukleotidbereiche sollten vermieden werden
- Vermeidung inter- oder intramolekular-komplementärer 3'-Enden
- Es dürfen keine Sequenzen gewählt werden, welche zur Ausbildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen (*hairpins*) und Schleifen (*loops*) oder zur Ausbildung von Primer-Dimeren führen können (Rychilk und Rhodes, 1989; Saiki, 1989; Rychilk, 1993)

Die Schmelztemperaturen von Primern sind je nach Basenzusammensetzung und Länge des Oligonukleotids verschieden. Während eine zu geringe Schmelztemperatur zu unspezifischer Anlagerung an der Matrize und dadurch zu unspezifischen Reaktionsprodukten führen kann, so führen zu hohe Temperaturen zu mangelhafter oder keiner Anlagerung und dadurch zu geringerer oder keiner Produktausbeute. Zu ihrer Berechnung wurde die Formel nach Thein *et al.* (1986) angewandt:

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

4.1.1 PCR Primer

Für die Vervollständigung einer Nukleotidsequenz, die bereits teilweise bekannt war, wurden aus diesem bereits bekannten Sequenzbereich anhand der unter 4.1 beschriebenen Kriterien sowohl geeignete genspezifische Vorwärts- als auch Rückwärtsprimer designt.

4.1.2 Sondenprimer

Zur Sondenherstellung wurden, ebenfalls nach den in 4.1 beschriebenen Kriterien, Vorwärts- und Rückwärtsprimer designiert. Die Primer eines Paares sollten hierbei einen Sequenzbereich von 300 bis 600 bp umschließen, welcher nach Amplifizierung als Sonde dient.

4.1.3 Degenerierte Primer

Degenerierte Primer werden eingesetzt um anhand eines hoch konservierten Bereiches innerhalb eines Alignments des Zielproteins aus verschiedenen Organismen, das zugehörige Gen in dem untersuchten Organismus nachzuweisen und zu analysieren (Suggs *et al.*, 1981). Die Wahl geeigneter degenerierter Primer erfolgt nach den gleichen Kriterien, wie für andere genspezifische Primer. Die Erstellung der Basenfolge der Oligonukleotide erfolgt hier jedoch anhand der Aminosäuresequenz. Da manche AS durch mehrere Basentriplets kodiert werden, erhält der resultierende Primer an diesen Stellen eine Adapterbase (s. Tab.2), welche eine Bindung an alle in der Primersequenz vorkommende Basen ermöglicht. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass die letzten 5 Basen des 3'-Endes nicht degeneriert sein sollten.

IUB-Bezeichnung	Basenaufschlüsselung
M	A oder C
R	A oder G
W	A oder T
S	C oder G
Y	C oder T
K	G oder T
V	A oder C oder G
H	A oder C oder T
D	A oder G oder T
B	C oder G oder T
X oder N	G oder A oder T oder C

Tabelle 2: Aufschlüsselung der degenerierten Basen nach der IUB-Bezeichnung.

Die designierten Primer sollten 20 bis 30 bp lang sein und die vier Basen mit gleicher Häufigkeit enthalten. Sowohl 3'-Komplementarität als auch Bereiche mit Polypurinen und -pyrimidinen sowie repetitive Sequenzabschnitte sollten vermieden werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der berücksichtigt werden muss, ist der Degenerationsgrad des Primers. Er ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl der degenerierten Basen pro AS und sollte 96 nicht überschreiten.

4.1.4 Primer für Restriktionsverdau

Um einen Restriktionsverdau durchführen zu können, müssen die passenden Schnittstellen an

ein PCR-Fragment angefügt werden. Dies erfolgt über eine PCR mit genspezifischen Primern, die vor der eigentlichen Gensequenz die Sequenz der Schnittstellen enthalten. Hierbei gibt es, je nach verwendetem Enzym und Vektor, in den später ligiert werden soll, verschiedene Regeln. Immer ist jedoch darauf zu achten, dass zwischen Schnittstelle und Start- bzw. Stopcodon einige Basen zusätzlich eingefügt werden um zu vermeiden, dass das Gen beim Schneiden wichtige Sequenzteile verliert, falls das Enzym nicht korrekt arbeitet.

4.1.5 Primer für Expressionen

Für die Ligation der Gensequenz in einige Expressionsvektoren ist es essentiell, spezifische Sequenzen an das Fragment anzufügen. Dies geschieht über Primer, an die die gewünschte Basenfolge vor bzw. nach dem genspezifischen Teil angefügt wurde. Es ist darauf zu achten, dass der genspezifische Teil des Primers ausreichend lang ist, um eine spezifische Bindung zu gewährleisten, und dass der Leserahmen des Gens erhalten bleibt. Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer wurden manuell nach den genannten Regeln konstruiert.

4.2 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR), eine in den 80er Jahren von Mullis *et al.* entwickelte Technik, dient der exponentiellen *in vitro* Amplifikation schon geringster Mengen bekannter DNA-Fragmente (Mullis *et al.*, 1986, Saiki *et al.*, 1985). Dabei werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer verwendet, welche den zu amplifizierenden Bereich flankieren und nach Denaturierung der DNA mit jeweils einem Strang der DNA-Doppelhelix hybridisieren. Die anschließende Reaktion wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) unter Verbrauch freier Desoxyribonukleosidtriphosphate katalysiert. Hierdurch entstehen komplementäre DNA-Stränge. Ein sich wiederholender Zyklus, aus drei Schritten, führt schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen Fragmentes (s. Tab.4). Im Einzelnen handelt es sich dabei im ersten Schritt um eine reversible Denaturierung der DNA-Matrize bei 95 °C. Im zweiten erfolgt die Anlagerung der Primer (welche komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind) an das einzelsträngige Template (*annealing*). Dieser Schritt ist abhängig von der gewählten Schmelztemperatur T_m der Primer (s. 4.1). In einem dritten Schritt findet ausgehend von den 3'-Enden der jeweiligen Primer die Synthese des zur Ausgangs-DNA komplementären DNA-Stranges statt (*elongation*). Die Dauer der Elongation richtete sich hierbei nach der Länge der zu amplifizierenden Fragmente,

ausgehend von einer Polymeraseaktivität von ~1000 Nukleotiden pro Minute. Nach dem ersten dieser Reaktionszyklen haben sich zwei neue DNA-Stränge von undefinierter Länge gebildet, an welche die Primer nach Denaturierung der Parentalstränge erneut hybridisieren können. Nach dem zweiten Zyklus aus *denaturation*, *annealing* und *elongation* bildet sich erstmals ein doppelsträngiges PCR-Produkt, dessen Länge exakt durch die Enden der beiden Primer determiniert wird. Dieses Syntheseprodukt dient in den nachfolgenden Zyklen wiederum als Matrize, so dass sich nach jedem weiteren Zyklus die Menge an Reaktionsprodukt verdoppelt und schließlich exponentiell akkumuliert. Durch 35 Zyklen werden etwa eine Millionen Kopien des ursprünglichen Reaktionsproduktes synthetisiert.

4.2.1 Standard-PCR-Reaktion

Die Komponenten einer PCR und deren Konzentrationen sind im Allgemeinen variabel, meist wurde jedoch folgender 50 µl Standardansatz verwendet:

Volumen	Reagenzien
5 µl	10 x Puffer (10 nmol) der Taq-Polymerase
2,5 µl	25-50 mM MgCl ₂ (falls nicht im Puffer enthalten)
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
x µl	DNA-Template (1 ng, variabel je nach Reaktionsansatz)
1 µl	5`-Primer (10 pmol)
1 µl	3`-Primer (10 pmol)
1 U	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
x µl	<i>Aq. dest.</i>
50 µl	Endvolumen

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Standard-PCR.

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

3-5 min bei 95 °C	initiale Denaturierung
<u>35-40 Zyklen:</u>	
1. 30 sec bei 95 °C	Denaturierung der DNA
2. 30 sec bei T _m °C	Annealing der Primer
3. x sec bei 74 °C	Elongation durch Taq-Polymerase (abh. von Fragmentgröße)
7-10 min bei 74 °C	terminale Elongation Konstruktion von 3`-A-Enden
Abkühlen auf 4 °C	

Tabelle 4: Bedingungen für die Standard-PCR.

Durch Verwendung spezieller DNA-Polymerasen (z. B. *Taq*-Polymerase) ist es möglich, PCR-amplifizierte Fragmente an ihren 3'-Enden mit einem überhängenden Adenosinrest zu versehen (Clark, 1988). Dies erfolgt während einer terminalen Elongation von 7 bis 10 min Länge. Der Überhang wird zum Einbau der Fragmente in linearisierte Vektoren benötigt, welche an ihren 5'-Enden einen Thymidinüberhang aufweisen (z.B. pGEM-T, TOPO TA). Der 10 x PCR-Puffer und zusätzliches Magnesiumchlorid für das entsprechende Enzym wurde von der jeweiligen Firma mitgeliefert. Der Nachweis, der auf diese Weise amplifizierten Fragmente, erfolgte über Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung (s. 4.5.4.1).

4.2.2 Subklonierung mittels PCR

Meist handelte es sich bei der DNA, die mit Hilfe der PCR aus einer cDNA-Bank amplifiziert wurde, nur um ein Teilfragment der gesuchten Sequenz. Deshalb wurden nach Ligation des Fragments in den Vektor (s. 4.11), Transformation von *E. coli* (s. 4.12), anschließender Plasmidisolation (s. 4.6.3) und der Sequenzierung des Inserts, neue Primer komplementär zu den Enden der analysierten Sequenz designt, um die noch unbekannt Bereiche (meist das 5' und/oder das 3' Ende) über das sog. *Primerwalking* aus der cDNA zu erhalten. Hierfür wurde ein genspezifischer Primer zusammen mit einem universellen Vektorprimer eingesetzt.

4.2.3 Checking-PCR

Die Checking-PCR dient der Überprüfung einer Ligation mit anschließender Transformation (s. 4.11 und 4.12) und gibt Rückschluss über das Vorhandensein und die Größe eines inklonierten Inserts im Plasmid. Diese PCR unterscheidet sich von der Standardvariante dadurch, dass als Template in Bakterien transformierte Plasmide und zwei vektorspezifische Primer, welche die „*multiple cloning site*“ des Vektors flankieren, verwendet werden. Für die Checking-PCR wurden rekombinante Klone nach der Transformation von Agarplatten gepickt und in je 12 µl LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin/Carbenicillin überführt. Waren die Kolonien mit einem Vektor transformiert, der eine Blau/Weiß-Selektion erlaubte, wurden weiße Kolonien ausgewählt (s. 4.12.4). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C wurde 1 µl der Bakteriensuspension zu 10 µl eines Standard-PCR Reaktionsmixes (s. Tab.5) gegeben. Nach der PCR wurde der gesamte Ansatz per Gelelektrophorese analysiert (s. 4.5) und so die transformierten Klone mit korrekter Insert-Länge identifiziert.

Ein Reaktionsansatz (10 µl) für eine Checking-PCR enthält folgende Komponenten:

1x R-Mix	Reagenzien
1 μ l	10 x Puffer der Taq-Polymerase (10 nmol)
0,5 μ l	25-50 mM MgCl ₂ (falls nicht im Puffer enthalten)
0,2 μ l	10 mM dNTP-Mix
0,1 μ l	5`-Vektor-Primer (10 pmol)
0,1 μ l	3`-Vektor-Primer (10 pmol)
0,2 U	Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)
x μ l	<i>Aq. dest.</i>
10 μl	Endvolumen

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Checking-PCR.

Die Checking-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt

5 min bei 95 °C	Initiale Denaturierung
<u>35 Zyklen:</u>	
1. 30 sec bei 95 °C	Denaturierung der DNA
2. 30 sec bei T _m °C	Annealing der Primer
3. x sec bei 74 °C	Elongation durch Taq-Polymerase
Abkühlen auf 4 °C	

Tabelle 6: Bedingungen für die Checking-PCR.

4.2.4 Nested-PCR

Eine Nested-PCR ermöglicht es, die Selektivität für die Amplifikation eines speziellen Fragments zu steigern. Bilden sich beispielsweise in einer Standard-PCR neben dem gewünschten Fragment mehrere unspezifische Reaktionsprodukte, kann der 1:100 mit PCR-Wasser verdünnte erste Reaktionsansatz als Template für eine zweite PCR dienen. Dabei werden Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet, welche innerhalb der Sequenz des ersten Reaktionsproduktes binden, so dass nur das gewünschte Fragment zur Amplifikation kommt.

4.2.5 Touchdown-PCR

Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität einer PCR zu steigern, bildet die Touchdown-PCR. Hierbei beginnt man die PCR mit 5 bis 10 Zyklen bei einer T_m (s. 4.1), welche bis zu 5° C über der kalkulierten T_m der Primer liegt. In diesen ersten fünf stringenten Zyklen bildet sich das gewünschte Reaktionsprodukt, jedoch nur in geringer Ausbeute. In den darauf folgenden 30 Zyklen wird die Anlagerungstemperatur dann sukzessiv um 0,1 bis 0,5 °C pro Zyklus gesenkt, bis schließlich die ermittelte optimale T_m der Primer erreicht ist. Ab diesem Zeitpunkt wird die PCR in der üblichen Weise zu Ende geführt.

4.2.6 Labeling-PCR zur Erstellung von DNA-Sonden

Die während einer Labeling-PCR markierten Fragmente werden später als Sonden zur Detektion von DNA oder RNA beispielsweise in Northern-Blot-Analysen oder der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Eine Markierung kann durch den Einbau von Estradiol-, Fluorescein-, Biotin- oder Digoxigenin-markierten Nukleotiden erfolgen. Bei den verwendeten Sonden handelt es sich um hochsensible Digoxigenin-markierte DNA-Fragmente im Größenbereich von 300 bis 600 bp, die mit dem korrespondierenden Bereich des zu detektierenden DNA/RNA-Fragments komplementär sind. Die durchgeführten Sonden-Markierungen erfolgten unter Verwendung des „*PCR DIG Probe Synthesis-Kits*“ (Roche diagnostics) während einer PCR (Kessler, 1990), bei der neben den vier Standardnukleotiden durchschnittlich alle 20 bis 25 Nukleotide ein DIG-11-UTP (Digoxigenin, ein Thyminanalogon) in den synthetisierten Strang eingebaut wird.

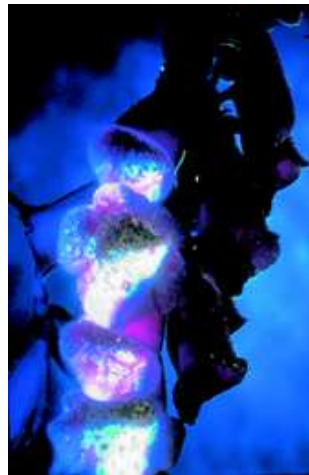


Abbildung 5: Blüten von *Digitalis purpurea*

Digoxigenin ist ein Steroidmolekül, das über seine Hydroxylgruppe leicht an Nukleotide addieren kann. Da das Digoxigenin mit hoher Affinität von einem im Kit enthaltenen Antikörper gebunden wird, welcher seinerseits mit dem Enzym Alkalische Phosphatase verbunden ist, konnte die so hergestellte Sonde mittels einer Substratreaktion der Alkalischen Phosphatase nach einer Hybridisierung nachgewiesen werden. (Antikörper basierte Detektion).

In einem ersten Schritt wurde unter Verwendung der Sondenprimern eine Standard-PCR durchgeführt, um sicher zu stellen, dass sie auch funktional sind. Erhält man daraus ein positives Ergebnis, wird die „Dig-Markierungs-PCR“ durchgeführt. Als Matrize diente hierbei entweder ein *cDNA-Transkript* des zu detektierenden RNA-Moleküls, welches in Form einer *Suberites domuncula* cDNA-Bank vorlag oder die aufgereinigte PCR, die

durchgeführt wurde, um die Wirksamkeit der Sondenprimer zu testen. Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten, welche mit Ausnahme von *Aqua dest.*, Template und der Primer, Bestandteile des Kits waren:

Volumen	Reagenzien
5 µl	10 x PCR-Puffer/ MgCl ₂
2,5 µl	DIG-Mix
2,5 µl	dNTP-Mix
25 pmol	Forward-Primer
25 pmol	Reverse-Primer
2,6 U	Enzym-Mix
0,1-1 ng	DNA-Template
x µl	<i>Aqua dest.</i>
50 µl	Endvolumen

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Dig-Markierungs-PCR.

Die anschließende DIG-Markierungs-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

3 min bei 95 °C	Initiale Denaturierung
<u>35 Zyklen:</u>	
1. 30 sec bei 95 °C	Denaturierung der DNA
2. 30 sec bei T _m °C	Annealing der Primer
3. 4 min bei 74 °C	Elongation durch Taq-Polymerase
20 min bei 74 °C	Terminale Elongation
Abkühlen auf 4 °C	

Tabelle 8: Bedingungen für die Markierungs-PCR.

Da der enzymatische Einbau gelabelter Nukleotide etwas mehr Zeit benötigt als die normale Nucleinsäure-Synthese, muss die Synthesezeit um etwa ein Drittel verlängert werden. Ob ein DNA-Fragment erfolgreich markiert worden ist, kann durch Agarosegel-Elektrophorese (s. 4.5) überprüft werden. Die DIG-Markierung verändert das Laufverhalten der Sonde im Gel, so dass diese im Vergleich zum ungelabelten DNA-Fragment etwas langsamer wandert.

4.3 Reverse Transkription von mRNA mit gekoppelter PCR (RT-PCR) „reverse transcription polymerase chain reaction“

Mit Hilfe der reversen 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 Reagenzien, die benötigt wurden sind Bestandteile des SuperScript „*First-Strand Synthesis System for RT-PCR 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.

Für die reverse Transkription wurde zuerst folgender RNA/Primer-Mix zusammen pipettiert:

Volumen	Reagenzien
x µg (1-5 µg)	RNA
1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	Oligo(dT) Primer od. GSP (genspez. Primer)
x µl	DMPC-H ₂ O
10 µl	Endvolumen

Tabelle 9: Reaktionsansatz 1 für die RT-PCR.

Zunächst wurde der obige Mix 5 min bei 65 °C denaturiert und umgehend auf Eis abgekühlt. Währenddessen wurde ein Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten vorbereitet:

Volumen	Reagenzien
4 µl	5 x First Strand Puffer
1 µl	SuperScript III RT (200 U/µl)
1 µl	0,1 M DTT
1 µl	RNase OUT (RNase Inhibitor; 40 U/µl)

Tabelle 10: Reaktionsansatz 2 für die RT-PCR.

Zu je einem abgekühlten RNA/Primer-Mix wurden 7 µl des Reaktionsansatzes hinzugegeben und 30 bis 60 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde dann die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (15 min, 70 °C) beendet und die RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H enzymatisch abgebaut (20 min, 37° C).

Zur Amplifikation eines bestimmten Transkriptes aus diesem Gemisch an Total-cDNA wurde eine Standard-PCR (s. 4.2.1) unter Einsatz genspezifischer Primer durchgeführt (s. 4.1).

4.4 Rapid amplification of cDNA Ends: RACE PCR

Die Amplifizierung von cDNA-Enden (RACE = *rapid amplification of cDNA ends*) ermöglicht die Vervollständigung, Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Nukleinsäuresequenzen am 5'- oder 3'-Ende eines Gens. Oft sind Gene einer cDNA-Bank auf Grund ihrer Herstellungsmethode vor allem am 5'-Ende unvollständig. Umschreibung durch

die reverse Transkriptase ist von der Integrität der mRNA abhängig. Fehlt die schützende Cap-Struktur am 5'-Ende, erfolgt ein rascher Abbau und die mRNAs werden nicht vollständig zu cDNAs konvertiert. Um dieses Problem zu beheben, bedient man sich bei einer RACE der mRNA, bzw. der mit Hilfe des „GeneRacer™-Kits“ hergestellten cDNA (s. 4.3) als Matrize. Die Vervollständigung der 5'-Enden wurde mit dem „5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends“ laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Um die 5' Enden eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die cDNA mit einem reversen, genspezifischen Primer und dem GeneRacer™ 5'-Primer (homolog zum GeneRacer™ RNA-Oligo) amplifiziert. So wird sichergestellt, dass nur mRNA, die das GeneRacer™ RNA-Oligo anligiert hat und komplett umgekehrt transkribiert wurde, durch PCR amplifiziert wird. Um 3'-Enden zu erhalten, wurde die „first-strand“ cDNA hingegen mit einem genspezifischen Vorwärtsprimer und dem GeneRacer™ 3'-Primer (homolog zum GeneRacer™ Oligo dT Primer) amplifiziert, wobei nur mRNA, welche die PolyA-Sequenz an ihrem 3'-Ende hatte und entgegengesetzt transkribiert wurde, in der PCR vervielfältigt wird. Das resultierende PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel (s. 4.5) aufgetrennt.

4.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können Nukleinsäuren und Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Färbung nachgewiesen werden. Das Trennprinzip der Gelelektrophorese beruht dabei auf der unterschiedlich schnellen Bewegung von Molekülen durch ein Gel (z.B. aus Agarose oder Polyacrylamid), an das Spannung angelegt wird. Diese Differenzen entstehen aufgrund der unterschiedlichen Nettoladung, Größe und Struktur der einzelnen Moleküle. Darüber hinaus beeinflussen die elektrische Feldstärke, die Porengröße der Gelmatrix sowie der verwendete Puffer die elektrophoretische Mobilität.

Agarosegele sind relativ großporig (ca. 150 nm bei 1%igen Gelen) und werden zur Auftrennung, Größenbestimmung und Aufreinigung von DNA, RNA und hochmolekularen Proteinen verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Konzentration des Agarosegels wird der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst, wobei höher konzentrierte Agarosegele kleinere Fragmente besser aufzutrennen vermögen, als niedrig konzentrierte. Die Agarose ist ein hochreines Polysaccharid aus Algen, das aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose besteht. Die Bestandteile der Gele, wie Agarose und Polyacrylamid, bilden ein engmaschiges Netzwerk, welches die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert. Kurze bzw. kleine Moleküle bewegen sich dabei schneller

durch das Gel als längere bzw. größere Moleküle. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der eingesetzten Fragmente reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Helling *et al.*, 1974; McDonell und Studier, 1977). Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad der DNA/RNA erfolgt die Wanderung in der Gelmatrix von der Kathode zur Anode. Ein Längenstandard („Marker“) mit verschiedenen Fragmenten bekannter Größen, der separat mitläuft, dient bei Gelelektrophoresen zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente.

4.5.1 Herstellung der Gele

4.5.1.1 Analytische und präparative DNA-Agarosegele

Abhängig von der Größe der zu separierenden DNA-Moleküle wurde eine entsprechende Agarosekonzentration gewählt. Meist wurden 1%ige Gele hergestellt, die sich zu einer Trennung von Fragmenten zwischen 500 und 10.000 bp eignen. Für diese Gele wurde die gewünschte Menge Agarose in TBE-Puffer zum Kochen gebracht, nach Abkühlung in eine Form ausgegossen (10 cm x 7,2 cm) und ein Kamm zum Formen der Taschen eingesetzt. Nach Erkalten des Gels wurde es in eine mit TBE als Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt. Dann wurden die mit 6 x Probenpuffer im Verhältnis 1:6 gemischten DNA-Proben und der Längenstandard in die Geltaschen pipettiert. Anhand der Bromphenolblau-Front des Ladepuffers (entspricht der Größe eines Nukleinsäurefragmentes mit 500 bp) wurde die Migration der DNA im Gel verfolgt. Bei einer angelegten Spannung von 5-10 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 verwendet, um mehr Probenvolumen auftragen zu können.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

TBE-Laufpuffer:	6 x Probenpuffer:
- 90 mM Tris-HCl, pH 8,3	- 0,25 % Bromphenolblau (w/v)
- 90 mM Borsäure	- 40 % Saccharose (w/v)
- 2 mM EDTA	

Tabelle 11: Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Puffer.

4.5.2 Analytische RNA-Agarosegele

Zur Überprüfung einer RNA-Präparation und zur Separierung von RNA-Molekülen für einen Northern Blot wurden RNA-Agarosegele verwendet. Prinzipiell erfolgte die

Auftrennung der RNA wie die der DNA, allerdings müssen einige wichtige Unterschiede beachtet werden. Die 1%igen Gele enthielten Formaldehyd, welches durch Denaturierung und Entfernung von Sekundärstrukturen eine Auftrennung einzelsträngiger RNA ermöglichte (LEHRACH *et al.*, 1977). Des Weiteren müssen Elektrophoresekammer und Kamm gründlich mit Isopropanol oder RNase Out gereinigt werden, um sie von RNasen zu befreien. Die Gele selbst bestanden aus 1,4 g Agarose welche in 14 ml 10 x MOPS und 118,5 ml DMPC-Wasser aufgekocht wurde. Nach Abkühlen auf 50 °C wurde 7,5 ml deionisiertes Formaldehyd zugegeben, gemischt und in die Gelform ausgegossen. Da RNA empfindlich auf pH-Änderungen reagiert, wurde als Laufpuffer 1 x MOPS gewählt, welches den pH-Wert im neutralen Bereich hielt. Da alle Proben sowie der RNA-Längenstandard vor Auftragen auf das Gel denaturiert werden müssen, wurden 3-5 µg der zu analysierenden RNA bzw. 100 ng des Markers im Verhältnis 1:4 mit denaturierendem Probenpuffer versetzt, 15 min auf 65° C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 3 V/cm² Gelfläche durchgeführt.

Eingesetzte Pufferlösungen:

Probenpuffer	10 x MOPS Puffer
- 45,5 % (v/v) deionisiertes Formamid	- 0,2 M N-Morpholinopropansulfonsäure
- 15 % (v/v) deionisiertes Formaldehyd	- 0,05 M Natriumacetat, pH 7,0
- 10 % (v/v) 10 x MOPS	- 0,01 M EDTA in DEPC-H ₂ O
- 10 % (v/v) Glycerol	
- 0,1 % (w/v) Bromphenolblau	

Tabelle 12: Zusammensetzung der bei einem RNA-Gel verwendeten Puffer.

4.5.3 Sequenzier-Gel

Nach ausführlicher Reinigung der Sequenzierplatten (41 cm) mit *Aqua dest.* und Isopropanol wurden diese für das Gießen des Sequenzier-Gels vorbereitet. Dazu gehörten das Einfügen von 0,25 cm dicken Abstandshaltern, so genannten Spacern, und das Fixieren der Platten mit entsprechenden Halterungen. In einem Verhältnis von 4:1 wurden das Sequa Gel XR (enthält Harnstoff, Acrylamid und Acrylamid-Derivate) und das Sequa Gel Complete (Puffer aus 5 x TBE und Katalysatoren) miteinander gemischt und steril filtriert. Nach Zugabe von 175 µl 10 %igem APS, welches die Polymerisationsreaktion startet, wurde das Gel gegossen. Ein eingefügter Vorkamm, der Platz für den später benötigten taschenformenden Kamm gewährleistet, wurde anschließend mit einer entsprechenden Vorrichtung fixiert. Das Gel polymerisiert innerhalb von 1,5 bis 2 h und wurde nach einer erneuten, gründlichen Reinigung mit *Aqua dest.* und Isopropanol in die Sequenzierungsapparatur (Li-Cor Global

Edition IR² Long readir 4200) eingesetzt. Der Vorkamm wurde entfernt und die Pufferkammern nach Säuberung der Tasche mit 1x TBE (10x TBE + entionisiertes *Aqua dest.*) gefüllt. Anschließend konnte es für die Sequenzierung verwendet werden.

4.5.4 Detektion der Nukleinsäuren im Gel

4.5.4.1 DNA-Detektion durch Färbung mit Ethidiumbromid

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente können mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiniumbromid, s. Abb.6) sichtbar gemacht werden. Dieser Farbstoff diffundiert in das Gel und lagert sich als Interkalator zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls an. Durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 bis 300 nm erfolgt eine Lichtemission durch den DNA-Ethidiumbromidkomplex im sichtbaren Bereich bei 590 nm (Crawford und Waring, 1967). Mit dieser Methode können selbst DNA-Mengen von weniger als 10 ng sichtbar gemacht werden.

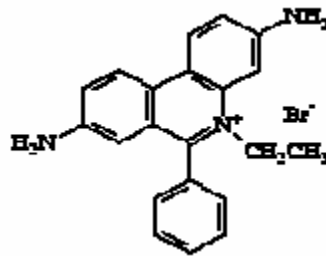


Abbildung 6: Strukturformel von EtBr.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel je nach Dicke zwischen 2 und 20 min. in eine Ethidiumbromidlösung (2 mg/l in 1 x TBE) gelegt und anschließend mit Hilfe eines Geldokumentationssystems betrachtet. Für die Dokumentation wurde das digitale Geldokumentationssystem GelDoc 2k System PC /CCIR Gel von BIO-RAD (Hercules, USA), bestehend aus Transilluminator, Videokamera, Stativ, Computer und Thermoprinter, eingesetzt.

4.5.4.2 RNA-Detektion durch Toluidinblau

Der Nachweis ribosomaler RNA-Banden im Anschluss an eine elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen gibt einen Hinweis auf die Unversehrtheit der RNA nach ihrer Präparation. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese (s. 4.5) für 5 bis 10 min in eine Toluidinblaulösung überführt, welche das gesamte Gel färbt. Die anschließende Entfärbung

des Gels 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) |
|--|

Tabelle 13: Zusammensetzung der Toluidinblau Färbelösung.

4.6 *DNA Extraktion und Aufreinigung*

Das Prinzip der Aufreinigungssysteme beruht auf der Bindung der DNA an eine Glasfaser-Matrix, der Entfernung unerwünschter Bestandteile der PCR-Ansätze durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte und der anschließenden Ablösung der DNA von der Matrix mit Hilfe eines Elutionspuffers.

4.6.1 **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 wurde das „*High Pure PCR Product Purification Kit*“ der Fa. Roche verwendet, welches alle notwendigen Puffer und Materialien enthielt. Dieses Aufreinigungssystem nutzt die Eigenschaft von Nukleinsäuren, sich in hoher Konzentration von chaotropen Salzen an die Oberfläche einer Silikatmembran zu binden (Vogelstein und Gillespie, 1979). Ein Fehlen dieser Salze verhindert aufgrund der Hydrathülle der DNA eine Interaktion mit der Matrix-Oberfläche. Das Entfernen von kontaminierenden Substanzen, wie Salzen, Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen sowie DNA-Fragmenten <100 bp (z.B. Primerdimere) erfolgt bei diesen Systemen durch mehrmaliges Waschen. Mit einer niedrig konzentrierten Salzlösung kann die DNA anschließend von der Matrix eluiert und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Nach kurzem Anfärben in Ethidiumbromid wird die gewünschte DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, wobei darauf zu achten ist, dass die UV-Intensität während des Herausschneidens der Banden möglichst gering gehalten wird, um eventuelle Schädigungen der DNA (Thymindimere) zu vermeiden.

Nach Zugabe des Bindepuffers NT1 (300 µl/100 mg Gel) folgte eine Inkubation bei 56 °C für ca. 10 min. Dabei lösten sich unter regelmäßigem Vortexen die Wasserstoffbrückenbindungen

zwischen den Zuckern des Polymers und das DNA-Fragment befindet sich anschließend in Lösung. Daraufhin wurde die Mischung auf eine Silikat-Fleece-Säule gegeben, wobei das DNA-Fragment im Anschluss an eine Zentrifugation (1 min, 6000 x g, 4 °C) an der Fleece-Matrix gebunden ist. Der Durchfluss wurde 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.

4.6.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um Kontaminationen bei DNA-Fragmenten durch unverbrauchte dNTPs und Primer nach einer PCR auszuschließen, ist eine Aufreinigung von DNA beim molekularbiologischen Arbeiten unerlässlich. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte entweder mit dem „*High Pure PCR Product Purification Kit*“ (ROCHE) oder dem „*NucleoSpin® Extract Kit*“ (Macherey Nagel) analog zu der Aufreinigung nach Eluieren aus einem Gel (s. 4.6.1).

4.6.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung von Plasmiden aus ihren Wirtszellen. Bei den zu isolierenden Plasmiden handelt es sich gewöhnlich um Vektoren, die im Zuge einer Transformation in die Bakterienzelle eingeführt und über Nacht in Flüssigmedium vermehrt wurden. Ca. 2 bis 4 ml dieser Übernacht-Kultur wurden zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien verwendet. Es wurde dafür das „*Hi Yield® Plasmid Mini Kit*“ (SLG) und das „*High Pure Plasmid Isolation Kit*“ (ROCHE) eingesetzt, welche für eine Aufreinigung von bis zu 20 µg DNA über Säulenchromatographie aus der Bakterienkultur verwendet werden können und die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Methode beruht auf zeitlich begrenzter, alkalischer Lyse der Bakterienzellen, bei der die Plasmid-DNA aus dem Bakterium freigesetzt wird. Anschließend entfernt die zugegebene RNase die gesamte RNA, Proteine werden durch chaotrophe Salze denaturiert und die Plasmid-DNA an eine Glasfasermatrix gebunden. Einige Waschschrte und Zentrifugation entfernen Zellbestandteile und „Nicht-DNA-Moleküle“ und die so gereinigte Plasmid-DNA kann durch einen speziellen Puffer eluiert und anschließend weiterverwendet werden. Alle benötigten Materialien und Puffer sind Bestandteile der Kits.

4.6.4 Mini-Plasmidpräparation

Die Bakterien wurden aus 2 bis 4 ml Suspension durch Zentrifugation pelletiert (1 min, 1.500 x g, RT) und anschließend in 200 bis 250 µl RNase-haltigem Puffer resuspendiert. Die Zugabe von 200 bis 250 µl Lysepuffer und eine folgende 2 bis 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 Neutralisationspuffer und der darauf folgenden Inkubation (1 bis 5 min, RT oder 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 (3 bis 10 min, 12.000 x g, RT) ließen sich die Zelltrümmer abtrennen, woraufhin der klare Überstand auf die Säule gegeben werden konnte. Nach einer Zentrifugation (1 min, 12.000 x g, RT) wurde der Durchfluss verworfen, die Säule zum Entfernen störender Salze in zwei Waschschritten mit 400 bis 700 µl ethanolhaltigem Puffer gewaschen und zweimal bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, um den Waschpuffer quantitativ zu entfernen. Die an die Matrix gebundene und gereinigte DNA wurde dann mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

4.6.5 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 (µg/ml): $50 \square OD_{260}$

Konzentration einzelsträngiger DNA (µg/ml): $37 \square OD_{260}$

Konzentration einzelsträngiger RNA (µg/ml): $40 \square OD_{260}$

Diese Konzentrationsmessungen wurden unter anderem nach einer Mini- oder Midi-Präparation von Plasmid-DNA sowie nach Isolation von RNA durchgeführt (s. 4.6 und 4.8).

4.7 Inkubationsversuche

Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Inkubationsversuche dienten dazu, durch Zugabe von speziellen Reagenzien eine Immunreaktion und Apoptose im Schwamm

auszulösen, um später die Transkriptionsstärke der Gene bzw. die Expressionsstärke der Proteine nachweisen zu können. Dazu wurden Gewebestücke aus *S. domuncula* von jeweils ca. einem Gramm Gewicht in mit 30 bis 40 ml natürlichem Seewasser aus den Aquarien gefüllte 50 ml-Falcons gegeben und mit Hilfe eines Pumpensystems mit Sauerstoff versorgt. Ein weiteres, welches als Kontrolle diente wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Als Inkubationssubstanzen für die späteren Northern Blot-Analysen wurden LPS (aus *E. coli* 055:B5), PAM (Pam₃Cys Ser) und Hefe eingesetzt. Die Konzentration des LPS, welches in Zellwänden Gram-negativer Bakterien zu finden ist, betrug während der Inkubationszeit 10 mg/ml, die des Lipoproteins (PAM) 10 µl/ml und die der Hefe 50 mg/ml.

Die Inkubationen wurden durchgeführt und nach 4, 6, 8 und 24 Stunden jeweils Proben entnommen. Zur Probenentnahme für eine RNA-Extraktion wurde das jeweilige Gewebestück mit Hilfe einer Pinzette aus dem Falcon entnommen und mit dem Skalpell ein Stück herausgeschnitten, welches sofort in einen 15 ml-Falcon mit Seewasser überführt wurde. Das verbleibende Gewebestück wurde wieder in den Ausgangsfalcon gegeben, die entnommene Probe möglichst klein zerschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Hierbei war darauf zu achten, dass möglichst schnell gearbeitet wurde, damit die enthaltene RNA nicht beispielsweise durch RNasen abgebaut wurde. Bis zur Verwendung der Proben wurden diese bei -80 °C gelagert.

Für eine immunohistologische Färbung wurden die Gewebestücke nicht klein geschnitten, sondern direkt in 2% Paraformaldehyd überführt, über Nacht inkubiert und anschließend weiter verwendet.

Für die Versuche zur Expressionsstärke des SD_TNFR-like Proteins *in vivo* wurden Inkubationen mit LPS sowie mit humanem TNF- α durchgeführt.

4.8 RNA-Extraktion

4.8.1 Präparation der Materialien und Reagenzien

Da RNA im Gegensatz zu DNA empfindlich gegenüber dem enzymatischen Angriff von RNA-abbauenden Enzymen, den RNAsen ist, müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die Integrität der isolierten RNA zu gewährleisten und somit einer Kontamination der Proben mit RNAsen vorzubeugen. Aufgrund der ubiquitären Verbreitung von RNAsen in der Umwelt und deren hohe Stabilität, müssen die Materialien und Reagenzien, welche für die Arbeit mit RNA eingesetzt werden sollen, speziell behandelt bzw. präpariert werden. Die Entfernung von RNAsen aus Flüssigmedien, welche autoklaviert werden können, erfolgte durch die Zugabe

von 0,1% Dimethylpyrocarbonat (DMPC) (v/v) oder alternativ Diethylpyrocarbonat (DEPC), anschließendes 15 -minütiges Rühren und einer Inkubation über Nacht. Die so präparierten Flüssigmedien wurden dann, um das noch vorhandene DMPC zu neutralisieren, eine halbe Stunde autoklaviert. DEPC und DMPC binden kovalent an Histidin- und Tyrosin-Reste von Proteinen. Die daraus resultierenden Strukturveränderungen bewirken im Falle von Enzymen den Verlust der katalytischen Aktivität (Leonard *et al.*, 1970). Oberflächen wurden zunächst mit kommerziell erwerblichen RNase-inaktivierenden Lösungen (*RNAse Away*, Roth, Karlsruhe) behandelt, Glas- und Metallgeräte im Vorfeld 3 Stunden bei 180 °C sterilisiert und vor Gebrauch gut mit Isopropanol gereinigt.

4.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Schwammgewebe

Der Vorgang der Isolation von RNA aus Zellen und Geweben beinhaltet vier Schritte:

1. Lyse der Zellen
2. Inhibierung endogener Nukleasen
3. Deproteinierung der RNA
4. Separation der RNA von anderen Komponenten des Homogenisats.

Für die RNA-Extraktion wurde Gewebe des Schwammes *Suberites domuncula* aus einem Inkubationsversuch verwendet (s. 4.7). Da der Gehalt an Nukleasen in Gewebe potentiell hoch ist, wurde hier die RNA-Isolation mit TRIzol®, ein monophasiges gebrauchsfertiges Gemisch zweier proteindenaturierender Agenzien (Guanidinthiocyanat und Phenol) empfohlen. Das Prinzip der Isolation mit TRIzol® beruht auf der „single step“ Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987), bei welcher die Zell-Lyse, die RNase-Inaktivierung und die DNA / Protein-Präzipitation in einem Reaktionsansatz stattfinden. Der letzte Schritt der RNA-Isolation, die Trennung von anderen Komponenten des Homogenisats, erfolgt schließlich mittels Fällung der RNA durch Isopropanol. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass die Zeit, in welcher eine aufschlussbedingte RNA-Degradation stattfinden könnte, maßgeblich verkürzt wird. Die Isolation wurde wie folgt durchgeführt:

Das Schwammgewebe wurde mit dem Precellys 24 System (Pqlab) zerkleinert. Dafür wurde ca. 1 g Gewebe mit 1 ml TRIzol® in ein Reaktionsgefäß mit 1,4 mm Keramikkügelchen überführt und 3 x 10 sek bei 6.800 upm zerkleinert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues DEPC-Cap überführt und die weitere RNA-Isolation wie im TRIzol® Protokoll beschrieben durchgeführt. Die so isolierte RNA wurde nach Bestimmung der Konzentration

bei -80 °C gelagert oder direkt für Northern Blot-Analysen oder cDNA-Synthese verwendet.

4.9 Synthese von cDNA mit dem GeneRacerTM-Kit

Die GeneRacerTM-Technik basiert auf RNA-Ligase und RACE-vermittelten Methoden und resultiert in der selektiven Ligation eines RNA-Oligonukleotids an die 5'-Enden von mRNA, welcher zuvor das Cap entfernt wurde (Maruyama und Sugano, 1994; Schaefer, 1995; Volloch *et al.*, 1994). Dieses RNA-Oligo liefert eine bekannte Bindestelle für GeneRacerTM-PCR-Primer, nachdem die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde.

Die RNA wird mit intestinaler Kalbsphosphatase (CIP) behandelt, um die Phosphatreste am 5'-Ende zu entfernen. Dies verhindert, dass beschädigte mRNA und Nicht-mRNA an das GeneRacerTM-RNA-Oligo ligiert wird. CIP hat jedoch keinen Effekt auf komplette mRNA mit intaktem Cap. Anschließend wird die dephosphorylierte RNA mit Tabaksäurepyrphosphatase (TAP) inkubiert, um das 5'-Cap von der intakten mRNA zu entfernen. Hierbei bleibt ein 5'-Phosphatrest erhalten, um die Ligation mit dem GeneRacerTM-RNA-Oligo zu ermöglichen. Dies erfolgt mit Hilfe einer T4 Ligase. Die ligierte mRNA wird mit dem GeneRacerTM-Oligo-dT-Primer und der SuperScriptTM III RT revers transkribiert um „*first-strand*“ cDNA mit bekannten Primerbindestellen an den 5'- und 3'-Enden zu synthetisieren. Die so erhaltene cDNA kann dann als Template für verschiedene PCRs dienen. Sie wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.10 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Basenabfolgen (z.B. Palindrome) innerhalb von DNA-Molekülen und „zerschneiden“ sie an diesen Stellen, indem sie die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden hydrolysieren. Dadurch sind sie für eine vielseitige Verwendung geeignet. Beispielsweise ermöglicht es die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten, die mit solchen Restriktionsschnittstellen versehen wurden, in Vektoren, die mit denselben Enzymen geschnitten wurden. Umgekehrt zeigt ein Restriktionsverdau von bereits transformierten Plasmiden, ob eine Ligation (s. 4.11) erfolgreich war. Durch Verwendung einer Schnittstelle innerhalb der Zielsequenz und innerhalb der MCS des Vektors, kann gezeigt werden, wie das Gen im Vektor orientiert ist. Je nach Vektor unterscheiden sich sowohl die Restriktionsenzyme als auch die Anzahl von möglichen Schnittstellen. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren wurden folgende

Restriktionsansätze verwendet:

Volumen	Reagenzien
30 µl	zu schneidende DNA (ca. 100 ng)
5 µl	10 x Enzypuffer
2 µl	Restriktionsenzym 1
2 µl	Restriktionsenzym 2
11 µl	<i>Aqua dest.</i>

Tabelle 14: Ansatz für den Restriktionsverdau.

Die verwendeten Restriktionsenzyme richteten sich nach den Vektorspezifikationen der Hersteller und der Nukleotidsequenz der zu klonierenden DNA-Fragmente. Der Restriktionsansatz wurde 60 bis 90 min bei 37 °C inkubiert, das Enzym für 15 bis 20 min bei 65 °C inaktiviert und der Ansatz anschließend aufgereinigt (s. 4.6.2).

4.11 Ligation linearer DNA

Die Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Vektormolekül bezeichnet man als Ligation. Die Ligation eines linearen DNA-Fragments mit einem linearisierten Vektor beruht auf der Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen den überhängenden Enden beider Moleküle. Hierzu wird die freie OH-Gruppe am 3'-Ende der einen DNA-Kette mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende der anderen verknüpft. Dieser Vorgang wird durch eine Topoisomerase oder eine DNA-Ligase unter Verbrauch von ATP katalysiert (Weiss *et al.*, 1968). Die für die Ligation benötigten Überhänge werden entweder durch eine DNA-Polymerase erzeugt (z.B. *Taq*-Polymerase mit Adenosin-Überhang) oder durch Restriktionsenzyme nachträglich eingefügt. Eine solche Ligation überhängender Nukleotide ist wesentlich effizienter als eine Ligation glatter Enden. Eine gerichtete Ligation der DNA-Fragmente ist jedoch nicht möglich.

Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um synthetische Bakterienplasmide, welche speziell für die Amplifikation der inserierten Fragment-DNA generiert wurden. Das Vektormolekül trägt meist mehrere funktionelle DNA-Sequenzen, die eine spätere Selektion, Amplifikation und Exzision des ligierten DNA-Fragments ermöglichen. Dies sind unter anderem Antibiotikaresistenzen (z.B. Ampicillinresistenz) sowie das Gen der β -Galaktosidase, welche die spätere Selektion der erfolgreich transformierten Zielzellen ermöglichen.

Bei der in der Arbeit angewendeten TA-Klonierung mit dem pGEM[®]-T-Vektorsystem

(Promega) oder dem TOPO TA-Vektor (Invitrogen) wurde als letzter Schritt der PCR an ein PCR-Produkt am 3'-Ende ein einzelnes Adenosin angehängt, welches mit dem 5'-Thymidin-Überhang des Vektors verbunden werden kann. Für die Ligation wurden äquimolare Mengen der Reaktionspartner eingesetzt, um eine Selbstligation des Vektors bzw. des zu klonierenden Fragments zu vermeiden.

4.11.1 Ligation in den pGEM[®]-T-Vektor

Die Ligation des Inserts in den pGEM[®]-T-Vektor wurde nach Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt. Es wurde der im Kit enthaltene Ligationspuffer mit dazugehöriger Ligase benutzt. In einem Reaktionsansatz wurden 5 µl 2 x Rapid Ligationspuffer, 2 µl *Aqua dest.*, 1 bis 2 µl PCR-Produkt, 1 µl Vektor (50 ng) und 1 µl Ligase (3 U/µl) miteinander gemischt. Die Inkubation erfolgte entweder für 2 bis 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C.

4.11.2 Ligation in einen TOPO-Vektor

Die ebenfalls angewendete TOPO TA-Klonierung stellt die schnellste Methode zur Ligation eines PCR-Produktes in einen Vektor dar. Anstelle einer Ligase wird ein mit *Vaccinia* Topoisomerase I aktivierter Vektor verwendet. Die Topoisomerase erkennt die Schnittstelle (C/T)CCCTT, schneidet die DNA und bleibt über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent gebunden. Der Vektor besitzt zwei benachbarte Schnittstellen, die die Topoisomerase blockieren, um eine Selbstligation zu verhindern. Die Topoisomerase wird durch die Verknüpfung des freien 3'-Adenosins des PCR-Produkts mit dem Thyminüberhang des Vektors freigesetzt. In dieser Arbeit wurden sowohl der pCR[®]II-TOPO[®]- als auch der pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor verwendet. In jedem Reaktionsansatz wurden 4,6 µl PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung und 0,4 µl Vektor miteinander gemischt und für 5 bis 10 Minuten inkubiert.

4.12 Transformation

Das Einschleusen von DNA-Molekülen, und somit deren genetische Veränderung, in dafür vorgesehene und vorbehandelte Bakterienstämme bezeichnet man als Transformation (Hanahan, 1983; Cypionka, 1999). *In vivo* kann dieser Vorgang auch durch Konjugation oder Infektion geschehen. Die Transformation wird in der Molekularbiologie unter anderem dazu verwendet, Plasmide in Bakterienzellen einzuschleusen, die dort durch Replikation vervielfältigt oder exprimiert werden. Bakterien sind von Natur aus in der Lage, in geringem

Maße DNA-Moleküle aus der Umgebung aufzunehmen. Um jedoch die Effizienz der Transformation zu erhöhen, bedient man sich so genannter kompetenter Zellen, welche durch physikalische und chemische Behandlung in der Lage sind, Plasmide leichter aufzunehmen. Die Transformation wird durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung (Hitzeschock) oder eine elektrische Entladung innerhalb des Mediums (Elektroporation) ausgelöst, wobei die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transformationen ausschließlich unter Anwendung der Hitzeschock-Variante durchgeführt wurden. Man geht davon aus, dass sich durch den Hitzeschock oder die Elektroporation Kanäle bzw. Poren in der Zellwand bilden, durch welche die DNA-Moleküle in die Zelle eindringen.

Als Nachweis für eine erfolgreiche Klonierung können mehrere Parameter dienen. Manche Vektoren enthalten ein Gen für β -Lactamase, was zur Folge hat, dass nur Zellen mit aufgenommenem Plasmid auf einem Medium mit Ampicilin (primäre Selektion auf die vektorbasierte Antibiotikaresistenz) wachsen können. Ein weiterer Nachweis kann über die Blau-Weiß-Selektion erfolgen, wenn der Vektor das *LacZ*-Gen enthält.

4.12.1 Transformation von NovaBlue Singles™ Competent Cells (*E. coli*)

Für eine Reaktion wurden 25 µl „NovaBlue Singles™“-Zellen (Novagen) von -80 °C auf Eis transferiert und dort 5 Minuten aufgetaut. Danach wurden 1 bis 2 ng aufgereinigtes Plasmid dazugegeben und mit der Pipettenspitze durch sanftes Rühren dispergiert. Dieser Ansatz wurde erneut 5 Minuten auf Eis belassen und danach in der Hitzeschockreaktion 30 Sekunden auf 42 °C erwärmt, um dann zuletzt 2 Minuten auf Eis wieder abgekühlt zu werden. Nach der Zugabe von 125 µl SOC-Medium wurden die Ansätze 45 Minuten bei 37 °C und 250 bis 500 rpm auf einem Laborschüttler inkubiert. Abschließend wurden zwischen 50 und 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Meist wurde der Bakterienstock geteilt, so dass zwei Reaktionen durchgeführt werden konnten. Dabei halbierten sich jeweils die eingesetzte Menge des Plasmids sowie die des SOC-Mediums.

4.12.2 Transformation von One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells (*E. coli*)

Für eine Transformation wurden 50 µl „One Shot® TOP10“-Zellen von -80 °C auf Eis überführt und dort aufgetaut. Danach wurden 2 ng aufgereinigtes Plasmid dazugegeben und mit der Pipettenspitze durch sanftes Rühren dispergiert. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach in der Hitzeschockreaktion 30 Sekunden auf 42 °C erwärmt, um dann zuletzt auf Eis wieder abgekühlt zu werden. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium

wurden die Ansätze 60 Minuten bei 37 °C und 225 rpm auf einem Laborschüttler inkubiert. Abschließend wurden ca. 50 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.12.3 Transformation von BL21 (DE3) Singles™ Competent Cells (*E. coli*)

Für die Transformation wurden 25 µl Zellen aus -80 °C auf Eis aufgetaut, 2 ng aufgereinigtes Plasmid zugegeben und durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze dispergiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert, danach für den benötigten Hitzeschock 30 Sekunden auf 42 °C erwärmt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 125 µl SOC-Medium wurden die Ansätze 60 Minuten bei 37 °C und 250 rpm auf einem Laborschüttler inkubiert. Abschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.12.4 Blau–Weiß-Selektion rekombinanter Klone

Da nur ein geringer Anteil der Bakterien durch die Fremd-DNA transformiert wird, ist es notwendig, die transformierten von den übrigen Zellen unterscheiden zu können. Dies wird durch die Blau-Weiß-Selektion gewährleistet. Sie basiert auf einem Vorgang, welcher als α -Komplementation bezeichnet wird. Die hier verwendeten Vektoren (mit Ausnahme der Expressionsvektoren) enthalten in ihrer „multiple cloning site“ zusätzlich zu den Antibiotikaresistenzgenen auch das *Lac-Z*-Gen, welches für ein Fragment der β -Galaktosidase codiert. Dieses Enzym katalysiert den Abbau von Laktose zu Galaktose und Glukose (Ullmann *et al.*, 1967). Durch die Ligation von Fremd-DNA mit einem entsprechenden Vektor wird die Genstruktur dieses Enzyms zerstört und es kommt nicht mehr zu einer Bildung reaktionsfähiger β -Galaktosidase. Wurde in die MCS jedoch kein DNA-Molekül eingefügt, es handelt sich also um den reinen Vektor, kann die funktionale β -Galaktosidase über die α -Komplementation rekonstruiert werden.

Bei Verwendung von Selektionsagarplatten, die das Laktoseanalogon X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropylthiogalaktosid) 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 funktionale β -Galactosidase zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umgesetzt. Kolonien, welche über ein Insert verfügen, bleiben demnach weiß. Diese weißen Kolonien können nun in antibiotikahaltigem LB-Medium vervielfacht und mittels einer Checking-PCR (siehe 4.2.3) auf ihre Länge getestet und weiterverwendet werden.

4.12.4.1 Zusammensetzung der Selektionsplatten (LB-Amp-IPTG-X-Gal)

LB-Agar (1,5% w/v) wurde autoklaviert und im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt. Danach werden pro Platte unter Rühren folgende Komponenten zugefügt:

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)

Tabelle 15: Zusammensetzung der LB-AIX-Platten.

Nach dem Ausgießen in Petrischalen wurden die Platten 30 Minuten zum Auskühlen stehen gelassen und anschließend gut verpackt bei 4 °C gelagert.

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

4.12.5 Bakterien-Flüssigkulturen

Im Gegensatz zu festen Nährmedien (Agar-Platten), welche zumeist der Isolation einzelner Klone dienen, werden Flüssigkulturen für die quantitative Vermehrung, vornehmlich eines einzelnen Klons bzw. dem in ihm enthaltenen Plasmid, verwendet. Die Flüssigkulturen kamen z.B. nach einer Checking-PCR zum Einsatz. Ergab sich daraus ein positives Transformationsergebnis, wurde eine Flüssigkultur aus 3 ml ampicillin- oder carbenicilinhaltigem LB-Medium mit 1,5 µl der entsprechenden Bakterienkolonie angesetzt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert, um die selektive Vermehrung der Bakterien zu ermöglichen. Enthaltene Plasmide wurden aufgereinigt (s. 4.6.3) und u.a. zum Sequenzieren weiter verwendet.

4.12.6 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%igem sterilfiltrierten Einfriermedium (v/v) versetzt und auf Trockeneis schockgefroren.

Zusammensetzung des verwendeten Einfriermediums:

- 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 100 mM MgSO₄
- 65% Glycerol (v/v)

4.13 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung lässt sich die Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Fragment ermitteln. Das hier beschriebene Verfahren der DNA-Sequenzierung beruht auf der enzymatischen Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Hierbei bindet ein Primer komplementär an einen DNA-Strang und dient als Ausgangspunkt für die enzymatische Neusynthese des Komplementärstranges. Das Funktionsprinzip dieser Methode ist der statistische Einbau von 2',3'-Dideoxyribonukleotiden (ddNTPs), so genannten Kettenterminatoren, in ein wachsendes DNA Molekül während der Replikation. Dies hat zur Folge, dass die Polymerisation an der Stelle des Einbaus zum Erliegen kommt, da die DNA-Kette nach der Anlagerung eines Dideoxynukleotid-Triphosphats aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Zuckeranteils nicht verlängert werden kann. Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung ist nicht möglich und es entstehen unterschiedlich lange DNA-Moleküle, welche jeweils ein identisches ddNTP an ihrem 3' Ende tragen. Die ddNTPs sind in vier parallelen Reaktionsansätzen neben den „normalen“ dNTPs, einer DNA-Matrize und einer Polymerase vorhanden. Ihre Konzentration ist dabei so gewählt, dass auch längere DNA-Moleküle synthetisiert werden können. Die synthetisierten DNA-Doppelstränge werden dann durch Hitzedenaturierung getrennt und die DNA nachfolgend nebeneinander über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. So lässt sich die Sequenz der verwendeten DNA-Matrize von unten nach oben aus dem Bandenmuster ablesen. Um die Detektion der Banden in dem Gel zu ermöglichen bedarf es einer Markierung der replizierten DNA-Fragmente. Hierfür stehen zwei Möglichkeiten, die radioaktive und die nicht-radioaktive Markierung, zur Verfügung. Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Sequenzierungen erfolgten ausschließlich durch Anwendung der nicht-radioaktiven Variante, wobei sich die Markierung mit Infrarotfarbstoffen (IRD₇₀₀ oder IRD₈₀₀) am 5'-Ende der verwendeten Primer befand. Da hier nur ein Primer zum Einsatz kam, wurde die DNA nicht exponentiell sondern linear amplifiziert. In der Reihenfolge ACGT wurden die Ansätze auf das Sequenziergel aufgetragen und die unterschiedliche Laufweite der Banden ergab ein charakteristisches Leiternmuster, welches durch Passieren eines Lasers sichtbar gemacht wurde. Die Emission des Lichtes wurde anschließend detektiert und gespeichert.

4.13.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion ist, technisch betrachtet, eine Abwandlung der PCR, wobei keine exponentielle, sondern eine lineare Amplifikation vorliegt. Bedingt wird dies durch die

Anwesenheit nur eines Primers, so dass bei jedem Amplifikationszyklus nur die anfängliche DNA-Matrize repliziert werden kann. Für die Synthese wurde der „Thermo Sequenase Kit“ mit fluoreszenzmarkiertem 7-deaza-dGTP verwendet. Es wurden 1,5 µg DNA eingesetzt (s. 4.6.5). Bei höheren Konzentrationen wurden die Proben vorher mit *Aqua dest.* verdünnt. Nach dem Vorlegen von jeweils 1,5 µl des Terminationsmixes (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) in die vier getrennten PCR-Reaktionsgefäße (200 µl), wurde zu jeder verdünnten DNA 0,9 bis 1,3 µl des Sequenzier-Primers (10 pmol) zugegeben, gevortext und anzentrifugiert. Anschließend wurden je 4,5 µl der Ansätze (gesamt = 18,75 µl) in jedes Reaktionsgefäß mit dem Terminationsmix pipettiert. Wie bei der unter 4.2.1 beschriebenen Standard-PCR-Reaktion durchliefen die Sequenzierproben folgende Schritte, wobei in diesem Fall einzelsträngige, primermarkierte Produkte unterschiedlicher Länge erzeugt wurden:

3 min bei 95 °C	Initiale Denaturierung
<u>35 Zyklen:</u>	
1. 30 sec bei 95 °C	Denaturierung der DNA
2. 20 sec bei 55 °C	Annealing
3. 45 sec bei 70 °C	Elongation

Tabelle 16: Bedingungen für die Sequenzier-PCR.

Die Sequenzierungs-PAGE kann ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, da nur bei einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen, welche keine Tertiärstrukturen aufweisen, eine direkte Korrelation zwischen der Kettenlänge und der Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb des Gels gegeben ist. Deswegen muss nach Abschluss der Sequenzierreaktion die noch doppelsträngige DNA für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, sofort auf Eis heruntergekühlt und die Reaktion mit je 3 µl Denaturierungs-Ladepuffer pro Reaktionsgefäß gestoppt werden.

Zusammensetzung des Stoppuffers:

100% Formamid (v/v)
0,1% Bromphenolblau (w/v)

Tabelle 17: Zusammensetzung der Stoppuffers.

Die Proben können anschließend auf dem polymerisierten Sequenziergel aufgetragen oder bei -20 C aufbewahrt werden

4.13.2 Sequenziergel

Das Sequenziergel wurde wie unter 4.5.3 beschrieben hergestellt und in die

Sequenzierungsapparatur eingesetzt. Das Äquilibrieren des Gels erfolgte im Pre-Run (Vorlauf), dem das Auftragen der Proben (je 1,3 µl) in die Geltaschen folgte. Nach dem Einfüllen der Proben in die Taschen wurde der Lauf des Gels gestartet. Die Daten wurden in Echtzeit von dem Netwinder-Kontrollrechner aufgezeichnet und später zum Zwecke der Auswertung auf einen PC übertragen. Sowohl Prerun als auch der eigentliche Run wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Parameter	Höhe
Voltage	1500 V
Current	40 mA
Power	50 W

Tabelle 18: Sequenzereinstellungen.

4.13.3 Sequenz-Auswertung

Die aus den Sequenzierungen hervorgegangenen Sequenzen wurden auf dem Windows®-2000-PC-System mit der Software e-Seq® V 2.0 oder 3.0 (Li-Cor Biosciences GmbH, BRD) gemäß der Herstellerbeschreibung bearbeitet. Von dem Sequenzerfassungsalgorithmus als mehrdeutig eingestufte Signale wurden, sofern sie dennoch eindeutig waren, durch manuelle Korrekturen beseitigt und die Sequenz zur weiteren Analyse abgespeichert.

4.14 ProQuest™ Two Hybrid System

Das „ProQuest™ Two Hybrid System“ (Invitrogen) liefert eine Methode zur Identifizierung von Proteininteraktionen und den daran beteiligten Proteinen *in vivo* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Durfee *et al.*, 1993; Fields und Song, 1989; Vojtek *et al.*, 1993). Während dieser Arbeit wurde ein so genannter „Forward-Two-Hybrid Library Screen“ durchgeführt, bei dem eine *Suberites domuncula*-Bibliothek auf Proteine untersucht wurde, die mit dem bekannten Ausgangsprotein interagieren. Dabei nutzt das „Two Hybrid System“ die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren zwei Domänen enthalten, eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Aktivationsdomäne (AD), welche zusammenkommen müssen, um eine Expression zu gewährleisten.

Für den Test werden zwei unterschiedliche Hybridproteine konstruiert, wobei X und Y den zu testenden Proteinen entsprechen:

1. DBD/Protein-X-Fusionsprotein, auch "bait" (Opfer) genannt,
2. AD/Protein-Y-Fusionsprotein, auch "prey" (Räuber, Raubtier) genannt.

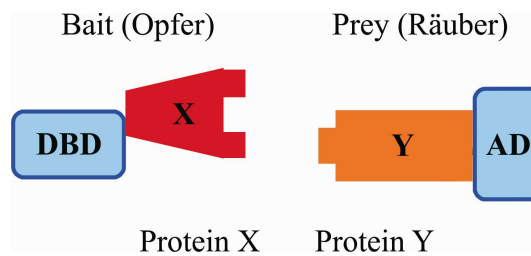


Abbildung 7: Bait und Prey, die beiden Hybridproteine die eine Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen ermöglichen.

Als Vektoren wurden folgende zwei im Kit enthaltene Vektoren verwendet:

pDEST 32: - zum Kreieren des „bait“ Plasmids
 - mit einligierter SD_TNFR-like Sequenz
 - exprimiert Leucin als Markergen

pDEST 22: - „prey“ Plasmide von allen Genen aus *S. domuncula*
 - exprimiert Tryptophan als Markergen

Der verwendete Hefestamm (*Saccharomyces cerevisiae*) „MaV203 Competent Cells Library Scale“ (Invitrogen) enthält einige Besonderheiten, wie Reporter- (z.B. *lacZ*) und auxotrophe Markergene (z.B. *HIS3* und *URA3*), um die Auswahl der positiven Klone zu ermöglichen. Die regulatorischen Regionen dieser Gene wurden dabei so konstruiert, dass sie die DNA-Bindestelle (Operator Sequenz) für das DBD/Protein-X-Fusionsprotein enthalten, welche als upstream aktivations Sequenz (UAS) in Hefe dienen. Wenn nun der Hefestamm mit den „bait“ und „prey“ Plasmiden transformiert wird und Protein-X mit Protein-Y im Nukleus interagiert, kommt die Aktivierungsdomäne mit der DNA-Bindestelle zusammen, was zur Aktivierung der Transkription und so der Expression der Reportergene führt (s. Abb.8).

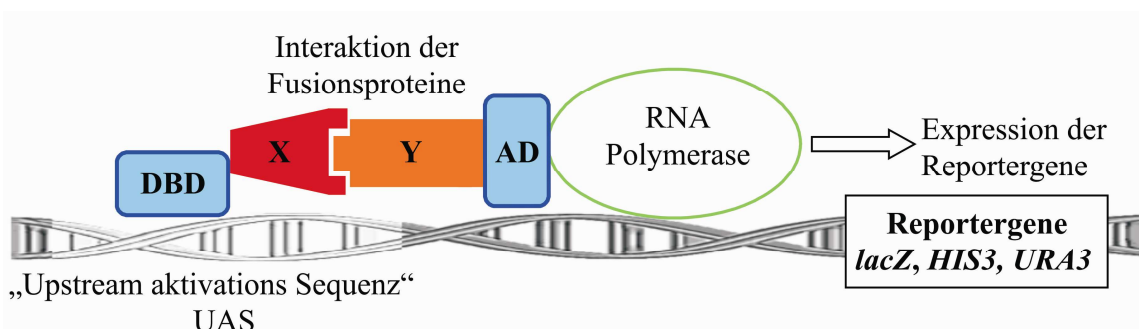


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Reaktion bei positiver Interaktion zweier Proteine.

Das „*Yeast Two Hybrid System*“ bietet, um positive Interaktionen zweier Proteine zu detektieren zwei Ansätze, welche beide nacheinander angewendet wurden. Eine Möglichkeit besteht darin, die transformierten Hefezellen auf Agarplatten wachsen zu lassen, in denen die auxotrophen Markersubstanzen wie Histidin oder Uracil fehlen. Positive Zellen, die interagierende „*bait*“ und „*prey*“ Plasmide enthalten, können dort wachsen und Kolonien bilden, während Zellen in deren Kern sich keine interagierenden Proteine befinden, nicht wachsen.

Die zweite Möglichkeit zur Identifizierung positiver Zellen ist die β -Galaktosidase Aktivität. Positive Kolonien besitzen β -Galaktosidase Aktivität, da das *lacZ* Gen exprimiert wird und die Kolonien sich nach Zugabe von X-Gal blau färben. Dieser Test wird verwendet, um falsche Positive aus den auxotrophen Tests zu identifizieren und um Aussagen über die Stärke der Interaktion zu machen.

Als dritte Methode dient eine Detektion über Negativselektion mit einem Wachstumstest auf Agarplatten, die 5-Fluororotsäure (5FOA) enthalten. 5FOA tötet in bestimmten Hefestämmen Zellen, die *URA3* exprimieren, was dazu führt, dass positive Zellen, die interagierende bait und prey Plasmide enthalten, nicht auf Platten mit 5FOA wachsen, da sie *URA3* exprimieren.

Nach allen Tests können folgende vier Phänotypen auftreten:

Reaktion	Platten ohne HIS	Platten ohne URA	β -Gal Aktivität	Platten mit 5FOA
Keine Interaktion von X und Y	-	-	weiß	+
Interaktion von X und Y	+	+	blau	-

Tabelle 19: Ergebnisse der verschiedenen Testmöglichkeiten für positive Interaktion.

Für den „*forward two hybrid library screen*“ wurden folgende Einzelschritte durchgeführt:

1. Konstruieren des Testplasmids („bait“)
2. Bereitstellen einer *S. domuncula* two hybrid Bibliothek (schon vorhanden)
3. Testen des bait Plasmids und ermitteln der optimalen 3-AT Konzentration
4. Transformation der Hefezellen mit bait Plasmid und Bibliothek
5. Positive Selektion über Agarplatten ohne die auxotrophen Markergene
6. Überprüfen der Interaktionen über β -Galaktosidase-Aktivität und negative Selektion auf 5FOA-Platten

4.14.1 Das Gateway®-System und die benötigten Vektoren

Alle im „ProQuest™ Two Hybrid System“ enthaltenen Vektoren sind Teil des so genannten Gateway®-Systems. Dies ermöglicht eine schnelle und einfache Konstruktion von „bait“ und „prey“ Plasmiden und erleichtert weiterführende Anwendungen. Die Gateway®-Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, die Vorteile der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda nutzt (Landy, 1989). Zwei Rekombinationsreaktionen bilden die Grundlage der Gateway®-Technologie: die BP- und die LR-Reaktion.

Die BP-Reaktion vereinfacht das Kreieren eines Eingangsklons, der die *attL* Sequenz enthält, durch Rekombination eines *attB* Substrats (PCR Produkt, das die *attB* Sequenz enthält) mit einem *attP* Substrat (Donor Vektor). Diese Reaktion wird von dem BP Clonase™ II Enzym-Mix katalysiert. Die LR-Reaktion wird von dem LR Clonase™ II-Mix katalysiert und erleichtert die Rekombination eines *attL* Substrats (Eingangsklon) mit einem *attR* Substrat (Expressionsklon) zur Erzeugung eines Expressionsklons, der *attB* enthält.

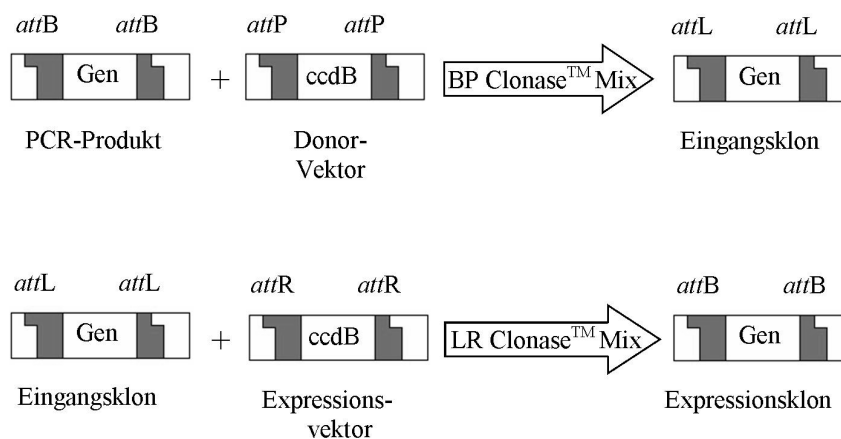


Abbildung 9: Darstellung der Schnittstellen zur Erstellung der verschiedenen Klone.

Die *att* Sequenzen bieten hierbei die Möglichkeit einer gerichteten Klonierung und eines unkomplizierten Austausches von Fragmenten zwischen den einzelnen Gateway®-Vektoren. Das *ccdB* Gen dient der negativen Selektion von Donor- und Expressionsvektoren in vielen *E.coli* Stämmen, da das *ccdB* Protein mit der DNA-Gryase der Bakterien interagiert (Bernard und Couturier, 1992) und so ihr Wachstum hemmt.

4.14.2 Konstruieren des Testplasmids

Um das Testplasmid zu konstruieren, wurden spezielle Primer designt, welche mit der Basensequenz CACC begannen. Diesen Basen folgten 12 bis 18 Basen des Anfangs des Gens ab dem Startcodon für den Vorwärtsprimer bzw. 12 bis 18 Basen des Endes einschließlich Stopcodon für den Rückwärtsprimer. Mit Hilfe dieser speziellen Primer wurde eine Standard-

PCR (s. 4.2.1) durchgeführt und danach über eine Sequenzierung (s. 4.13) sichergestellt, dass das Fragment korrekt vorliegt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in einen Eingangsvektor ligiert. Für diese Ligation wurden folgende Komponenten gemischt:

Volumen	Reagenzien
3 μ l	H ₂ O
1 μ l	PCR Produkt
1 μ l	Salzlösung
1 μ l	pENTR™-Vektor

Tabelle 20: Ligationsansatz zum Konstruieren des Testplasmids

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine Transformation analog zu 4.12.2 in „One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*“ Zellen. Der verwendete pENTR™-Vektor verfügt über eine Kanamycinresistenz, weshalb die transformierten Zellen auf Selektionsplatten mit diesem Antibiotikum ausplattiert wurden. Von den daraus resultierenden Kolonien wurden am nächsten Morgen 12 bis 15 verschiedene gepickt und durch eine Checking-PCR mit genspezifischen Primern überprüft, ob das korrekte Insert enthalten ist. Ein solcher positiver Klon wurde über Nacht in Flüssigmedium kultiviert und eine Plasmidisolierung, wie in 4.6.3 beschrieben, durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Rekombination des Inserts in den pDEST™ 32-Expressionsvektor. Der Rekombinationsansatz wurde wie folgt angesetzt:

Volumen	Reagenzien
50-150 ng	Plasmid
1 μ l	pDEST™32 Vektor
x μ l	Elutionspuffer ITE
8 μ l	Endvolumen

Tabelle 21: Rekombinationsansatz für die Rekombination in den pDEST™32 Vektor.

Danach wurden 2 μ l LR Clonase™ Enzym-Mix zugegeben und 60 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Clonase durch Zugabe von 1 μ l Proteinkinase K und Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten inaktiviert.

Um zu überprüfen, ob das Gen komplett und im richtigen Leserahmen in den Vektor ligiert wurde, folgte eine Transformation in „One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* Zellen“. Diese wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt und die transformierten Zellen anschließend auf LB-Agar-Platten mit 10 μ g/ml Gentamycin (für die Selektion) ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden 10 bis 15 Kolonien gepickt, danach eine

Checking-PCR, wie in 4.3.2 beschrieben, durchgeführt und die Klone mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Ein korrekter Klon wurde zur weiteren Verwendung ausgewählt und ein Glycerolstock der Kolonie zur Langzeitverwahrung eingefroren (s. 4.12.6).

4.14.3 Herstellung der benötigten Lösungen, Platten und Medien

Im Laufe des “*forward two-hybrid library screens*” werden verschiedene Agarplatten als Wachstums- oder Selektionsmedien verwendet. Diese wurden im Voraus vorbereitet und bei 4 °C gelagert. Auch alle benötigten Lösungen und Medien wurden vorbereitet und nach Herstellerangaben gelagert.

4.14.3.1 Lösungen

40% Glucoselösung: - 400 g Glucose

- auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen und 20 min autoklavieren

Histidinlösung: - 85,6 mg/l: 856 mg in 10 ml dest. Wasser lösen und steril filtrieren

- auf 1 l Medium/Agar 1 ml Histidinlösung einsetzen

Leucinlösung: -1,734 mg/l: 1,734 g in 10 ml 1 M HCl lösen und steril filtrieren

- auf 1 l Medium/Agar 1 ml Leucinlösung einsetzen

Tryptophanlösung: - 85,6 mg/l: 856 mg in 10 ml 0,5 M HCl lösen und steril filtrieren

- auf 1 l Medium/Agar 1 ml Tryptophanlösung einsetzen

Uracillösung: - 85,6 mg/l: 856 mg in 20 ml DMSO lösen und steril filtrieren

- auf 1 l Medium/Agar 2 ml Uracillösung einsetzen

4.14.3.2 Platten

Synthetic Complete-Platten:

- 20 g Agar-Agar

- 6,7 g Yeast nitrogene base ohne Aminosäuren

- 1,35 g Aminosäure Mix/SC

- In 900 ml dest. Wasser lösen und den pH Wert auf 5,9 einstellen, danach auf 950 ml auffüllen und 20min autoklavieren.

Selektionsplatten:

Der Agar für die Platten wird wie oben beschrieben (*Synthetic Complete-Platten*) hergestellt. Nach dem Autoklavieren wird der flüssige Agar langsam im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt und anschließend unter Rühren folgende Lösungen zugefügt:

Platten:	SC-Leu-Tryp	SC-Leu-Tryp-Ura	SC-His-Leu-Tryp
Histidin	1 ml	1 ml	-
Leucin	-	-	-
Uracil	2 ml	-	2 ml
40% Glucoselösung	50 ml	50 ml	50 ml

Tabelle 22: Zusammensetzung der Selektionsplatten.

3-Amino-1,2,4-triazol-Platten (3-AT):

Das 3-Amino-1,2,4-triazol dient der Unterdrückung der basalen Histidinexpression, die immer auftritt, wenn die beiden Vektoren zusammentreffen. Dies würde zu einer Störung der Selektion führen und sollte vermieden werden. Um die 3-AT-Konzentration zu ermitteln, bei der die basale Expression gerade unterdrückt wird, wurden 3-AT-Platten in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Dazu wurde 1 l SC-Leu-Tryp-His-Agar verteilt auf 4 Flaschen mit je 250 ml, wie oben beschrieben, hergestellt und im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt.

Das 3-AT wurde wie folgt in einer 2,5 molaren Stocklösung angesetzt:

84,08 g/mol => 10,51 g wurden in 50 ml dest. Wasser gelöst und steril filtriert.

Anschließend wurden folgende Mengen an 3-AT zugegeben, mit einem Rührfisch gut vermischt und die Platten gegossen:

Endkonzentration	Volumen
10 mmol	1 ml
25 mmol	2,5 ml
50 mmol	5 ml
75 mmol	7,5 ml

Tabelle 23: Zusammensetzung der 3-AT-Platten.

Die fertigen Platten wurden bis zu ihrer Verwendung eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

YPAD-Platten:

Um YPAD-Platten herzustellen wurde 1 l YPAD-Medium wie oben beschrieben hergestellt und vor dem Autoklavieren 20 g Agar (bacteriological-grade) zugefügt. Anschließend wurde

der pH-Wert unter Rühren auf 6.0 eingestellt und anschließend 25 Minuten autoklaviert. Bei einer Temperatur von 50 °C wurde der Agar in Petrischalen ausgegossen und diese nach dem Abkühlen eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

4.14.3.3 Medien

YPD/YPAD-Medium:

Das YPD/YPAD-Medium ist ein Wachstumsmedium zur Kultivierung der Hefezellen. Für dieses Medium werden folgende Zutaten gemischt:

Volumen	Reagenzien
10 g	Bacto-Hefe-Extrakt
20 g	Bactopepton
20 g	Dextrose
für YPAD-Medium:	
100 mg	Adeninsulfat

Tabelle 24: Zusammensetzung der YPD und YPAD Medien.

Mit autoklaviertem destilliertem Wasser wurde auf einen Liter aufgefüllt.

4.14.4 „Subcloning scale“ Transformation der Hefe

Um das „bait“-Plasmid zu testen und die optimale 3-AT Konzentration zu ermitteln, wird eine so genannte „subcloning scale“ Transformation durchgeführt. Für diese Hefetransformation wurde Polyethylenglycol/LiAc (PEG/LiAc) im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Ist dies geschehen, wurde ein Cap kompetente Hefezellen 90 Sekunden lang im 30 °C warmen Wasserbad aufgetaut, kurz invertiert und 50 µl Aliquots angefertigt. Danach wurde je Aliquot 25 ng bait-Plasmid in pDEST 32 und 25 ng leerer pDEST 22 Vektor zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 300 µl PEG/LiAc pro Aliquot zugegeben, durch Invertieren gemischt und der Ansatz 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 16,8 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden die Zellen 20 Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, wobei die Transformation alle 5 bis 10 Minuten durch Invertieren gemischt wurde. Die Zellen wurden in einer Mikrozentrifuge 5 Sekunden lang pellettiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl 0,9% NaCl resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf SC-Leu-Tryp-Platten ausplattiert, um zu kontrollieren, ob beide Vektoren aufgenommen wurden. Dies ist möglich, da pDEST 22 Tryptophan und pDEST 32 Leucin exprimiert. So können nur die Zellen wachsen, die beide Vektoren enthalten. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert und am nächsten Morgen wurde auf 3-AT-Platten mit

verschiedenen Konzentrationen gestempelt.

Um die Hefekolonien von einer Platte auf eine andere überführen zu können, wurde ein Stempel benutzt. Dieser bestand aus einem Holzkolben, der mit Samt bespannt wurde. Er wurde ohne Druck kurz auf die Ausgangsplatte aufgelegt und anschließend leicht auf die neue Platte gedrückt. Danach wurde der Stempel mit neuem Samt bespannt und erneut auf die neue Platte gedrückt, um überflüssige Hefezellen zu entfernen. Dies wurde so lange fortgesetzt, bis keine Hefe mehr auf der Platte zu erkennen war. Dieses so genannte „*Cleaning*“, also Säubern der Platte, soll verhindern, dass die Hefezellen übereinander wachsen und so das Ergebnis auf den Selektionsplatten verfälschen. Dies wurde am nächsten Tag wiederholt und am Tag darauf die Platten auf Hefewachstum kontrolliert. Die 3-AT-Konzentration, bei der gerade noch ganz schwach etwas wächst, wurde für die weiteren Versuche verwendet.

4.14.5 „*Library scale*“ Transformation der Hefe

Durch diese Transformation wurde das zu testende Plasmid und die „*prey*“ Plasmide in die „*MaV203 Library Scale kompetente*“ Zellen eingebracht. Dazu wurde Polyethylenglycol/LiAc (PEG/LiAc) im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und gut gemischt. Anschließend wurde ein Cap kompetente Hefezellen 90 Sekunden lang im 30 °C warmen Wasserbad aufgetaut, kurz invertiert und je 250 µl in 15 ml Falcons überführt. Danach wurde zu jedem Aliquot 10 ng „*bait*“-Plasmid in pDEST 32- und 10 ng pDEST 22-Vektor mit der *S. domuncula*-Bibliothek zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 1,5 ml PEG/LiAc pro Aliquot zugegeben, durch Invertieren gemischt und der Ansatz 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 88 µl DMSO wurden die Zellen 20 Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, wobei die Zellen alle 5 bis 10 Minuten durch Invertieren gemischt wurden. Die Zellen wurden bei 640 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in je 4 ml 0,9% NaCl resuspendiert. 100 µl wurden abgenommen, zwei Verdünnungen, 1:100 und 1:1.000, hergestellt und auf SC-Leu-Tryp-Platten ausplattiert. Der Rest wurde zu je 250 µl auf 20 mmol 3-AT-Platten ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden SC-Leu-Tryp-Platten vorgewärmt und in 10 bis 12 durchnummerierte Felder aufgeteilt. Es wurden Kolonien von der Transformation gepickt und je eine Kolonie pro Feld auf die so genannte Masterplatte ausgestrichen. Diese Platten dienten als Ausgangsplatten und wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Waren die Kolonien ausreichend gewachsen, wurde von der Masterplatte auf Testplatten gestempelt.

4.14.6 Detektion der Interaktion

Von der Masterplatte wurde auf drei unterschiedliche vorgewärmte Testplatten gestempelt. Als Nachweis der Uracilexpression wurde auf SC-Leu-Tryp-Ura-Platten gestempelt, für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest auf YPAD-Platten mit aufgelegter Nitrozellulosemembran (positive Selektion). Die negative Selektion erfolgte nach Stempeln auf 5-Fluororotsäure-(5FOA)-Platten. Nach dem Stempeln wurden die Platten nicht mit frischem Samt gesäubert, sondern direkt über 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit Stempeln mit frischem Samt gesäubert und weitere 24 Stunden inkubiert. Die Kolonien, die auf den SC-Leu-Tryp-Ura-Platten gewachsen waren, lieferten ein erstes positives Ergebnis auf der Suche nach möglichen Interaktionspartnern. Auf den 5FOA-Platten sollte bei einer Interaktion der Proteine aus pDEST 22 und pDEST 32 auch 2 Tage nach dem Säubern keine Kolonie wachsen.

Der β -Galaktosidase-Aktivitätstest diente als weiterer Nachweis der Interaktion zweier Proteine. Für den Test wurden 2 Whatman Filterpapiere zugeschnitten und in eine Petrischale gelegt. Sie wurden mit einer Mischung aus Dimethylformamid/10mgX-Gal (DMF/X-Gal), β -Mercaptoethanol und Z-Puffer getränkt, die wie folgt zusammen pipettiert wurde:

Volumen	Reagenzien
100 μ l	DMF/X-Gal
60 μ l	β -Mercaptoethanol
10 μ l	Z-Puffer

Tabelle 25: Zusammensetzung der Lösung für den β -Galaktosidase Aktivitätstest.

Anschließend wurde die Membran mit einer Pinzette von den YPAD-Platten abgenommen und 20 bis 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Zellen aufzubrechen. Danach wurde sie möglichst ohne Luftblasen auf die Filterpapiere in den Petrischalen gelegt. Die Membranen wurden bei 37 °C inkubiert und die Blaufärbung, welche bei vorhandener Interaktion auftritt, beobachtet.

Von den Kolonien, die durch die Tests als diejenigen identifiziert wurden, in denen die Expressionsprodukte miteinander interagieren, wurden Kulturen in 6 ml SC-Leu-Tryp-Ura-Medium angesetzt. Die Kulturen wurden bis zu einem OD₆₀₀ von ungefähr 1,5 bis 2,0 kultiviert und die Plasmide anschließend mit dem „ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit“ nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss daran wurden die Plasmide wie in 4.12.2 beschrieben in „One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli“ Zellen transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Dies dient dazu, die Zellen, die den pDEST 32-

Vektor mit dem Ausgangsgen enthalten auszuwählen, da diesem die Resistenz gegen Ampicillin fehlt. Der pDEST 22-Vektor verfügt über die Resistenz und so wachsen auf den Platten nur die Kolonien, die die pDEST 22-Vektoren mit dem Interaktor enthalten. Von diesen Kolonien wurden 12 bis 15 gepickt und eine Checking-PCR (s. 4.2.3) mit pDEST 22 spezifischen Primern durchgeführt. Anschließend wurden Über-Nacht-Kulturen angefertigt (s. 4.12.5) und die Plasmide am nächsten Tag isoliert (s. 4.6.3). Die so erhaltenen Plasmide konnten anschließend sequenziert und die Interaktoren charakterisiert werden.

4.15 Northern Blot-Analyse

4.15.1 Grundlagen

Die Northern Blot-Analyse dient der Identifikation und Größenbestimmung von RNA-Transkripten sowie Expressionsanalysen. Sie basiert darauf, dass zueinander komplementäre, einzelsträngige Nukleinsäuren unter geeigneten Bedingungen hybridisieren (Southern, 1975) und sich doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle bilden. Dieser Gesetzmäßigkeit folgen Desoxyribonuklein- und auch Ribonukleinsäuren, wobei auch Hybridmoleküle aus DNA- und RNA-Molekülen möglich sind. Die isolierte RNA wird dabei gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.5), auf ein geeignetes Trägermaterial überführt und immobilisiert (Alwine *et al.*, 1977). Der Ablauf einer Northern Blot-Analyse kann in folgende Schritte eingeteilt werden:

1. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Fragmente in einem denaturierenden Agarose-Gel
2. Transfer der RNA-Fragmente auf eine geeignete Membran
3. Primäre Hybridisierung (DNA-Sonden)
4. Waschschritte
5. Sekundäre Hybridisierung (Antikörper)
6. Detektion der Sonden

4.15.2 **Präparation der verwendeten RNA-Proben**

Die Präparation der verwendeten RNA-Proben erfolgte analog zu 4.2.6.

4.15.3 **Gelelektrophoretische Auftrennung**

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte wie unter 4.5.2 beschrieben. Das verwendete Gel setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Volumen	Reagenzien
1,4 g	Agarose
14 ml	MOPS
118,5 ml	DMPC-Wasser
7,5 ml	Deionisiertes Formaldehyd bei 50 °C

Tabelle 26: Zusammensetzung des Agarosegels.

Die Menge der eingesetzten RNA betrug 3 bis 5 µg. Sie wurde je nach Größe der Geltaschen mit DMPC-Wasser auf 15 bis 20 µl aufgefüllt und mit 2,5 µl Probenpuffer aufgetragen. Als Längen- und Gewichtsstandard diente der „RNA Molecular Weight Marker I“, von dem 3 µl mit 1 µl Probenpuffer aufgetragen wurden.

4.15.4 RNA-Transfer (Blotting)

Der Transfer der RNA aus dem Gel auf eine geeignete Membran im Rahmen der hier beschriebenen Versuche, in denen als Trägermaterial eine positiv geladene Nylonmembran verwendet wurde, erfolgte mit folgendem Versuchsaufbau:

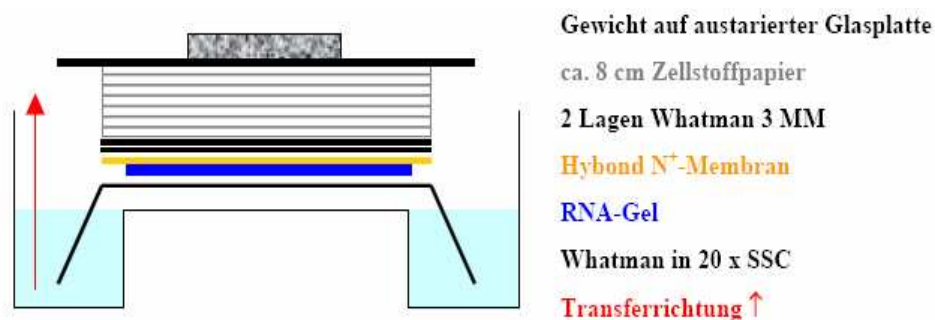


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Northern Blot Versuchsaufbaus.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten in eine Laufkammer auf Whatman-Filterpapier gelegt, welches auf beiden Seiten in die mit 20 x SSC gefüllten Puffertanks reicht. Anschließend wurde die auf Gelgröße zurechtgeschnittene, positiv geladene Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel gebracht und mit einem weiteren Whatman-Filterpapier und einem 8 bis 10 cm hohen Stapel Papiertücher bedeckt. Zur Erhöhung der kapillaren Saugkraft wurde der Stapel mit einem Gewicht beschwert, mit einer Wasserwaage austariert und um einer Verdunstung der Pufferlösung vorzubeugen, wurde der gesamte Aufbau mit Frischhaltefolie umwickelt. Die RNA-Fragmente wurden über Nacht durch den Fluss des Transferpuffers, welcher durch die Kapillarkraft hervorgerufen wird, aus dem Gel in Richtung der Papierhandtücher bewegt. Nach Verlassen der Gelmatrix trafen die Fragmente auf die positiv geladene Nylonmembran,

an welcher diese aufgrund von ionischen Wechselwirkungen adhärirten.

Am nächsten Tag wurde der Versuchsaufbau abgebaut und die Membran kurz getrocknet. Eine permanente Verbindung zwischen den RNA-Molekülen und der Nylonmembran wurde durch das so genannte „*Cross-Linking*“ erreicht. Die Immobilisierung wird durch die UV induzierte Bildung kovalenter Bindungen zwischen den Uridin-Resten der RNA-Moleküle und primären Amin-Gruppen auf der Oberfläche der Nylonmembran erzielt. Die UV-Induktion wurde durch den Einsatz eines Stratalinkers® (Stratagene, USA), bei 1250 μ J realisiert. Die derart präparierten Membranen können in Plastik eingeschweißt bei einer Temperatur von 4 °C gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

4.15.5 Primäre Hybridisierung

Bevor die primäre Hybridisierung mit der Sonde erfolgen kann, wird der Blot für zwei Stunden in auf 42 °C vorgewärmter Prähybridisierungslösung („*DIG-Easy-Hyb*“) in einem Wasserbad prähybridisiert, wobei für kleine Blots (ca. 7 x 7 cm) 10 ml und für große (ca. 7 x 14 cm) Blots 15 ml verwendet wurden. Durch diesen Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockiert, um das Hintergrundsignal möglichst gering zu halten. Die durch das Blotting erhaltene Membran und die für das zu detektierende RNA-Molekül spezifischen Sonden dienen als Grundlage für die primäre Hybridisierung. Im Verlauf der Hybridisierung lagert sich die Sonde an das zu ihr komplementäre RNA-Molekül an und ermöglicht so die spätere Detektion desselben. Um dies zu ermöglichen, wurden 20 bis 40 μ l (ca. 2 μ l Sonde/ml) der Sonde zu der Prähybridisierungslösung zugegeben, die Blots in Folien wasserdicht eingeschweißt und über Nacht bei 42 °C im Wasserbad inkubiert.

4.15.6 Waschschritte

Die hybridisierten Membranen wurden am nächsten Morgen mehreren Waschschritten unterzogen, um sie von fehlhybridisierten und nicht gebundenen Sondenfragmenten zu reinigen. Es ist darauf zu achten, dass alle Gefäße RNase-frei, also mit Isopropanol oder anderen geeigneten Lösungen gereinigt worden sind. Für die kleinen Blots wurden jeweils 70 bis 100 ml Waschpuffer verwendet und für die großen 150 ml. Die Inkubationen fanden unter steter Bewegung statt. Der erste Waschschritt erfolgte über vier mal 5 Minuten in 2 x SSC/0,1% SDS (w/v) bei RT, der zweite über vier mal 9 Minuten in 0,1 x SSC/0,1% SDS (w/v) erfolgte bei 42 °C im Wasserbad. Danach erfolgte eine kurze Äquibrillierung in P1.

4.15.7 Sekundäre Hybridisierung

Das Ziel der sekundären Hybridisierung ist die Markierung der hybridisierten Sonden mit einem Antikörper-Enzym-Konstrukt. Im Falle der hier erläuterten Versuche handelt es sich bei dem Konstrukt um die variablen Ketten eines Antikörpers (Fab-Fragmente), an welche eine alkalische Phosphatase konjugiert ist. Die antigene Determinante des Antikörpers wird von dem Digoxigenin-Rest der in den Sonden inkorporierten Digoxigenin-11-dUTP-Nukleotide dargestellt. Da an eine Sonde mehrere Digoxigenin-Reste gebunden sind, an welche Antikörper binden, führt dies zu einer Verstärkung des Signals. Im Vorfeld der sekundären Hybridisierung wurden die freien unspezifischen Antikörperbindungsstellen der Membranen blockiert. Dies wurde über einen 50 Minuten Blockierungsschritt in P2 (10% Blockingreagenz in P1) bei RT erreicht. Für große Blots wurden 15 ml und für kleine 10 ml verwendet. Danach wurden die Blots in P2, welcher den Antikörper in Verdünnung von 1:10.000 enthielt, eingeschweißt und über einen Zeitraum von 60 Minuten bei RT inkubiert.

4.15.8 Detektion

Die Detektion der Sonden erfolgt über Chemilumineszenz. Diese entfaltet sich in Verbindung mit einem geeigneten Substrat durch den katalytischen Einfluss der alkalischen Phosphatase. Da die alkalische Phosphatase an den Antikörper konjugiert ist, welcher wiederum an die Digoxigenin markierten Sonden gebunden hat, entsteht die Chemilumineszenz nur an jenen Stellen der Membran, die von den gesuchten RNA-Molekülen besetzt sind. Der Nachweis dieser Chemilumineszenz erfolgt über einen Röntgenfilm. Durch den katalytischen Charakter der Reaktion ergibt sich eine extreme Signal-Amplifikation, die je nach Expositionsdauer variiert und deren Faktor durch eine Regulation derselbigen bestimmt werden kann.

Die Membran wurde nach der AK-Bindung zweimal 15 Minuten in 1 x P1/0,1% TWEEN20 (v/v) gewaschen, um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Nach anschließender Äquibrierung in P3 (Detektionspuffer), die der Herstellung eines alkalischen Milieus diene, konnte der Blot mit dem Substrat, CDP-Star „*ready to use*“ (Roche) benetzt und ungefähr 5 Minuten inkubiert werden. Nachdem das Substrat vollständig entfernt war, wurde die Membran in eine geeignete Folie eingeschweißt und in der Dunkelkammer die Exposition der Röntgenfilme begonnen. Nach einer initialen Expositionsdauer von einer Minute wurden die Filme entwickelt, das Signal der Sonden geprüft und, wenn die Signalstärke nicht ausreichend war, weitere Filme mit steigenden Expositionszeiten aufgelegt.

4.16 Expression

4.16.1 Expression rekombinanter Proteine in Prokaryoten

Neu identifizierte Gene lassen sich gezielt in Vektoren klonieren, die z.B. in Prokaryoten durch geeignete Promotoren die entsprechenden Proteine *in vivo* exprimieren. Prokaryotische Expressionssysteme eignen sich sehr gut zur schnellen Expression einer großen Menge des rekombinanten Proteins. Die Besonderheit der verwendeten Vektoren liegt darin, dass sie z.B. an das C-terminale Ende des Proteins 6 Histidinreste anfügen (6 x His-tag), die eine spätere Aufreinigung über Affinitätschromatographie erlauben. Weiterhin unterscheiden sich die Vektoren bezüglich ihrer Regulierungsmöglichkeiten und der synthetisierten Proteinmenge. Vektoren (z.B. pBAD) mit streng regulierten Promotoren schalten die Expression erst nach Zugabe des entsprechenden Induktors an und stellen geringe Mengen an Protein her (man spricht von *tight* regulierten Vektoren). Der Vorteil ist, dass die resultierenden Proteine meist löslich und damit funktionell aktiv bleiben (Lee 1980; Lee *et al.* 1987), während bei hochexprimierenden Vektoren (z.B. pTrcHis2) eine Basalexpression auch ohne Zugabe des entsprechenden Induktors erfolgt (man bezeichnet diese als *leaky*). Dies führt unter Umständen zu großen Mengen Protein, das dann jedoch in unlöslicher, inaktiver Form in „inclusion bodies“ innerhalb der Bakterien gespeichert werden kann. Die hier exprimierten Proteine ließen sich über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus lysierten Zellen aufreinigen.

4.16.2 Ligation in Exprssionsvektoren

Die Ligation eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor funktioniert wie die Ligation in einen Replikationsvektor. Es ist jedoch auf einige Dinge besonders zu achten. Vor der Ligation in einen Expressionsvektor sollte sicher gestellt sein, dass die Sequenz des Gens frei von Basenaustauschen ist, welche z.B. ein Stopcodon in der Sequenz entstehen lassen können und so die korrekte Expression verhindern. Des Weiteren ist es wichtig, darauf zu achten, dass das Gen im Vektor im richtigen Leserahmen einligiert ist, um sicher zu stellen, dass das Startmethionin korrekt erkannt wird.

4.16.3 Expression mit dem pTrcHis2 TOPO® TA Expressions Kit

Der pTrcHis2-TOPO®-Vektor enthält ein C-terminales Peptid mit einem *c-myc*-Epitop und einem 6-fachen His-Tag (Markierung) zum einfachen Nachweisen und Aufreinigen des rekombinanten Proteins. Der lineare Vektor enthält einzelne 3'-Thymidin Überhänge sowie kovalent gebundene Topoisomerase I für die TA-Klonierung. Ein starker *trc* Promotor,

welcher von dem Produkt des *lacI^q* Gens unterdrückt wird, reguliert die Expression in *E.coli*. Um diese zu induzieren, wird IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zur Bakterienkultur gegeben. Das rekombinante Protein kann durch Bindung eines proteinspezifischen Antikörpers oder eines Antikörpers gegen das His oder *c-myc*-Epitop nachgewiesen werden. Um eine Gensequenz in den pTrcHis2-TOPO®-Vektor ligieren zu können, müssen die Primer, mit denen man die vorhergehende PCR durchführt, passend gewählt werden. Der Vektor verfügt über ein Initiations-ATG, was bedeutet, dass der Vorwärtsprimer direkt nach dem Startcodon beginnen sollte. Es ist sehr wichtig, darauf zu achten, dass es zu keiner Leserahmenverschiebung kommt. Der Rückwärtsprimer muss so gewählt werden, dass das Stopcodon nicht in der Sequenz enthalten ist, so dass das C-terminale 6 x His Tag translatiert werden kann. Mit den designten Primern wird, als erster Schritt eine Standard-PCR durchgeführt, um das gewünschte PCR-Produkt zu erhalten. Nach Aufreinigung wird auf einem DNA-Gel überprüft, ob eine einzelne deutliche Bande anzeigt, dass die Gensequenz korrekt amplifiziert wurde. Ist dies der Fall, kann das Fragment in den Vektor ligiert werden. Dazu werden folgende Reagenzien in einen Ansatz gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert:

Volumen	Reagenzien
0,5 µl–4 µl	frisches PCR Produkt (10-20 ng/µl)
Volumen auf 5 µl auffüllen	steriles Wasser
1 µl	pTrcHis2-TOPO®-Vektor
5 µl	Endvolumen

Tabelle 27: Ansatz für die Ligation in den pTrcHis2-TOPO®-Vektor.

Nach der Inkubation wurden die Produkte direkt in kompetente Zellen transformiert oder bei -20 °C gelagert. Über eine Checking-PCR und eine Sequenzierung wurden Klone identifiziert, die das Zielgen in der richtigen Orientierung, Sequenz und Länge enthielten. Diese wurden ausgewählt und für die Expression genutzt, nachdem ein Glycerolstock zur Konservierung hergestellt wurde.

4.16.4 Expression mit dem Gateway® pDEST™17-Vektor

Die Klonierung in den pDEST™17-Vektor (Invitrogen) erfolgte über das *E. coli* Expressions-System mit Gateway®-Technologie. Hierbei handelt es sich um Vektoren mit den speziellen Rekombinationsschnittstellen *attR1* und *attR2*, die es ermöglichen, das zu exprimierende Gen über Rekombination von einem in den anderen Vektor zu überführen. Des Weiteren verfügen sie über einen T7-Promoter für eine T7-RNA-Polymerase regulierte

Expression des Gens (Studier and Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990), ein N- oder C-terminales His-Tag zur Detektion und Aufreinigung, im Fall der pDESTTM 17-Vektors N-terminal, sowie eine Ampicillin-Resistenz für Selektion in *E. coli*. Die Klonierung in pDESTTM 17 erfolgt in zwei Schritten. Als Erstes wird ein „Entry“-Klon hergestellt, indem das Gen in einen speziellen „Entry/Donor-Vektor“ kloniert wird. Aus diesem wird es durch Rekombination in den pDESTTM-Vektor überführt. Im hier vorliegenden Fall befand sich das Gen allerdings schon in einem pDESTTM-Vektor, dem pDESTTM 22. Aus diesem wurde es mit BP-Klonierung in den pDNORTM 211-Vektor und anschließend in den pDESTTM 17-Vektor überführt. In einem ersten Schritt wurden folgende Reagenzien gemischt:

Volumen	Reagenzien
1-7 µl	50-150 ng Plasmid
1 µl	pDNOR TM 211-Vektor
auf 8 µl auffüllen	Elutionspuffer ITE
2 µl	BP Clonase
10 µl	Endvolumen

Tabelle 28: Ansatz für die Ligation in den pDNORTM211-Vektor.

Der Mix wurde bei 25 °C eine Stunde inkubiert und das Enzym anschließend mit 1 µl Proteinkinase K 10 Minuten bei 37 °C inaktiviert. Danach wurden „One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli*“ Zellen transformiert und ausplattiert. Durch eine Checking-PCR (s. 4.2.3) mit genspezifischen Primern wurde sichergestellt, dass das Gen korrekt in den Vektor ligiert wurde. Anschließend wurden von positiven Klonen Über-Nacht-Kulturen angesetzt und die Plasmide am nächsten Tag isoliert (s. 4.6.3). In einem zweiten Schritt wurden dann zur Klonierung in den pDESTTM 17-Vektor folgende Reagenzien gemischt:

Volumen	Reagenzien
3,5 µl	50-150 ng Plasmid
1 µl	pDEST TM 17-Vektor
3,5 µl	Elutionspuffer ITE
2 µl	LR Clonase
10 µl	Endvolumen

Tabelle 29: Ansatz für die Ligation in den pDESTTM17-Vektor.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 25 °C wurde das Enzym wiederum mit 1 µl Proteinkinase K 10 Minuten bei 37 °C inaktiviert und die Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (s. 4.12).

4.16.5 Expression mit dem pBAD/gIII A-Vektor

Der pBAD/gIII A-Vektor von Invitrogen verfügt über ein C-terminales *c-myc* Epitop sowie eine Polyhistidinregion. Dies ermöglicht eine Detektion über einen Anti-Myc- ebenso wie über einen Anti-HIS-Antikörper und eine schnelle Aufreinigung mittels Ni-NTA. Der Vektor liegt zirkulär vor und verfügt über mehrere Restriktionsschnittstellen. Um also ein Zielgen in diesen Vektor ligieren zu können benötigt man spezielle Primer welche die Schnittstellen der gewünschten Restriktionsendonukleasen enthalten. Die Primer wurden so gewählt, dass die Schnittstellen nicht ebenfalls innerhalb der Gensequenz vorkommen, da das Gen sonst innerhalb der kodierenden Sequenz geschnitten wird. Ebenfalls wichtig war, dass der offene Leserahmen auch nach der Ligation erhalten blieb, was die korrekte Expression des gesamten Gens gewährleistete. Nachdem die Primer bereitgestellt waren, wurde eine PCR durchgeführt, um die Schnittstellen an das Fragment anzufügen. Nach einer Gelelektrophorese zur Verifizierung des PCR-Resultats wurde der Restriktionsverdau des Vektors und der PCR-Produkte wie in 4.10 beschrieben durchgeführt. Nach Inaktivierung der Enzyme wurde der komplette Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert (s. 4.6.1). Optional kann der Restriktionsansatz auch direkt nach Inaktivierung aufgereinigt (s. 4.6.2) und anschließend auf Gel kontrolliert werden. Die Ligation erfolgte in zwei Konzentrationen, wobei das Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor 1:2 bzw. 1:4 betrug. Folgende Reaktionsansätze wurden für die Ligation zusammen pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert:

Reagenzien	1:2	1:4
Puffer	3 µl	3 µl
PCR-Produkt	12 µl	12 µl
Vektor	3 µl	6 µl
T4-Ligase	1 µl	1 µl
H ₂ O	11 µl	8 µl

Tabelle 30: Ansatz für die Ligation in den pBAD/gIII A Vektor.

Anschließend wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert (s. 4.12) und über eine Sequenzierung ein Klon identifiziert, der das gewünschte Zielgen in korrekter Orientierung, Sequenz und in voller Länge enthielt. Dieser konnte für die folgende Expression verwendet werden.

4.16.6 Transformation eines Expressionsklons in kompetente *E. coli* Zellen:

Die wie in 4.16.2 beschrieben ligierten Expressionsklone wurden in verschiedenen *E coli*

Stämmen exprimiert. Je nach Länge des Gens und abhängig vom gewünschten Induktor wurden in dieser Arbeit „*BL21(DE3) Singles™*, *BL21-AI™ One Shot® Chemically Competent Cells*, *Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells* und *One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells*“ verwendet. Die Transformation erfolgte wie in 4.12 beschrieben, nach Herstellerangaben. Um den Erfolg der Transformation zu überprüfen, wurden je 50 bis 70 µl jedes Ansatzes auf eine LB-Agar-Platte, je nach verwendetem Vektor mit unterschiedlichen Antibiotika und mit oder ohne Glucose ausplattiert, wobei die Glucose eine basale Expression der Proteine verhindert und über Nacht kultiviert.

4.16.7 Pilotexpression

Die Pilotexpression dient der Festlegung der Konditionen, unter denen die gewünschten Proteine am erfolgreichsten überexprimiert werden. Dies ist unter anderem abhängig von der Temperatur, der Dauer der Expression und der Konzentration des eingesetzten Induktors. Für eine Pilotexpression wurden von den Kolonien, die nach erfolgreicher Transformation auf den LB-Agar-Platten gewachsen waren am nächsten Tag ein bis zwei in 5 ml Flüssigmedium (LB mit Antibiotikum und mit oder ohne Glucose) überführt und über Nacht kultiviert. Davon wurden 200 bis 500 µl in 6 ml neues LB-Medium transferiert und kultiviert bis der OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 lag. Danach wurde als Nullpunkt/Negativkontrolle jeweils ein Milliliter abgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20 °C eingefroren oder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die restlichen 5 ml LB-Medium wurden induziert, wobei verschiedene Induktoren und Konzentrationen verwendet werden können. Als Beispiel sind die in dieser Arbeit eingesetzten Induktoren in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Volumen	Reagenzien
5 µl	IPTG = 1 mM
0,5 µl	IPTG = 0,1 mM
20 µl	L-Arabinose = 0,2%
12,5 µl	L-Arabinose = 0,1%

Tabelle 31: Induktoren und Konzentrationen für die Expression in *E. coli*.

Über einen Zeitraum von mehreren Stunden wurden stündlich weitere Proben entnommen und zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, welches die Zellen und das Protein enthält, eingefroren. Dies wurde über mindestens fünf bis sieben Stunden durchgeführt und in einigen Fällen wurde nach zwanzig Stunden noch eine letzte Probe genommen. Die so gewonnenen Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Expression induziert werden konnte.

4.16.8 Löslichkeitstest

Die Löslichkeit des exprimierten Proteins stellt einen wichtigen Faktor für die weitere Vorgehensweise dar. Während lösliche Proteine relativ leicht in ihrer nativen Konformation aus den Zellpellets aufgereinigt werden können, werden unlösliche häufig in so genannten „*inclusion bodies*“ eingelagert, aus denen sie sich unter nativen Bedingungen nicht aufreinigen lassen. Eine Aufreinigung muss dann unter denaturierenden Bedingungen erfolgen, um die „*inclusion bodies*“ aufzubrechen. Gegebenenfalls muss das Protein im Anschluss zurückgefaltet werden. Deshalb ist es sinnvoll, im Vorfeld einen Löslichkeitstest durchzuführen, um zu entscheiden, welche der beiden Methoden am erfolgversprechendsten erscheint. Dazu wird nach der optimalen Expressionszeit eine Probe von einem Milliliter entnommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird anschließend in 5ml nativem Lysispuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nachdem das Pellet auf Eis aufgetaut war, folgen 4 bis 6 Sonicationsschritte (Ultraschallbehandlungen) für 10 Sekunden bei 200 bis 300 Watt, um die Zellen aufzubrechen. Danach folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 10.000 x g für 20 bis 30 Minuten. Der daraus entstandene Überstand enthält lösliche Proteine und wird zum Testen auf einem SDS-Gel aufbewahrt. Das Pellet wird in 5 ml Lysispuffer resuspendiert und stellt die unlöslichen Proteine dar. Beide Fraktionen können anschließend auf einem SDS-Gel nach dem Zielprotein untersucht werden.

4.16.9 Expression von Genen zur Proteinaufreinigung

Wenn in der Pilotexpression ein Klon überexprimiert wird und im Western Blot bestätigt wurde, dass es sich um das gesuchte Protein handelt, wurde eine Über-Nacht-Kultur mit 1 µl des jeweiligen Klons in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum und eventuell mit Glucose zur Unterdrückung der basalen Expression angeimpft. Am nächsten Morgen wurden die 5 ml in 196 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und bei 37 °C oder 20 °C kultiviert, bis der OD₆₀₀ bei ca. 0,6 lag. Danach wurde eine Negativkontrolle von einem Milliliter als entnommen und die restliche Kultur je nach verwendetem Vektor mit IPTG oder L-Arabinose induziert und unter ständigem Schütteln so lange inkubiert, bis die Zeit der entsprach, die während der Pilotexpression die besten Ergebnisse zeigte. Anschließend wurden die 200 ml in 50 ml Falcons abzentrifugiert und die Pellets bis zur Aufreinigung eingefroren.

4.16.10 Expression des SD_TNFR Proteins bei 4 °C

Wenn der Löslichkeitstest ergibt, dass das zu exprimierende Protein unlöslich ist, kann versucht werden, durch eine Expression über einen längeren Zeitraum und bei 4 °C die

Löslichkeit zu verbessern. Hierzu wurde eine Über-Nacht-Kultur mit 1 µl des jeweiligen Klons in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum und eventuell mit Glucose zur Unterdrückung der basalen Expression angeimpft. Am nächsten Morgen wurden die 5 ml in 196 ml LB Medium mit Antibiotikum überführt und bei 37 °C kultiviert, bis der OD₆₀₀ bei ca. 0,6 lag. Danach wurde eine 1 ml Probe als Negativkontrolle entnommen und die restliche Kultur je nach verwendetem Vektor mit IPTG oder L-Arabinose induziert. Die Expression fand für 7 bis 10 Tage unter ständigem Schütteln bei 4 °C in einem Kühlraum statt.

4.16.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Auf einem SDS-Gel lassen sich SDS-denaturierte Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes auftrennen (Laemmli 1970) und durch Färbung nachweisen. Bei gleichzeitiger Auftrennung eines standartisierten Proteinmarkers lassen sich die Molekulargewichte der Proteine durch den Vergleich der Wanderungsstrecken ermitteln. Des Weiteren können derart aufgetrennte Proteine zum immunologischen Nachweis in einer Western Blot-Analyse auf Membranen transferiert werden. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird fast ausschließlich für die Trennung von Proteinen bis 500 kDa verwendet. Hierbei werden Polyacrylamidgele als Trennmatrix verwendet. Die Porengröße des Gels ist durch Einstellung verschiedener Acrylamidkonzentrationen stark variabel. Je nach Molekulargewicht variiert der Prozentanteil des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemischs im Gel. Je höher das Molekulargewicht des Proteins, desto geringer wird die Acrylamidkonzentration gewählt. Um die unterschiedlichen Ladungen der Proteine anzugleichen, wird sowohl dem Gel, als auch dem verwendeten Ladepuffer SDS (Sodiumdodecylsulfat) zugesetzt. Dieses anionische Detergenz lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis von 1,4 g SDS pro Gramm Protein an diese an (Voet und Voet 1994) und denaturiert sie. Dadurch erhalten sie eine negative Nettoladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Es entstehen anionische Mizellen, welche die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes im Gel laufen lassen (Weber und Osborn, 1969). Die Zugabe von β-Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirkt zusätzlich eine reduktive Zerstörung von vorhandenen Disulfidbrücken und somit eine Abtrennung von derart verknüpften Proteinuntereinheiten. Um die Auftrennung der Proteine deutlich zu verbessern, wurde das Polyacrylamidgel in ein Sammel- und ein Trenngel aufgeteilt. Im Sammelgel führt eine niedrigere Acrylamid-Konzentration, d.h. größere Porenweite, ein niedrigerer pH-Wert und eine geringere Salzkonzentration als im Trenngel zu einem Stapeln (Stacking) des Proteins im Gel. Dies führt im angrenzenden Trenngel zu einer geraderen Lauffront und einer schärferen Auftrennung.

4.16.12 Herstellung der SDS-Gele

Auf Grund der unterschiedlichen Größe wurden für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine 12%ige und 15%ige Gele eingesetzt. Die Gele wurde in das Mini-Protean II (Bio-Rad) System oder spezieller Plastikcassetten (Invitrogen) gegossen. Während bei dem Mini-Protean II System Glasplatten vorbereitet mit 0,75 mm Platzhaltern (*Spacern*) und in der Gießvorrichtung befestigt werden mussten, sind die Cassetten fertig präpariert und das Gel kann direkt gegossen werden. Für die Gele wurden folgende Reagenzien gemischt:

Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 6 %	Reagenzien
3,3 ml	2,3 ml	5,3 ml	<i>Aqua dest.</i>
4 ml	5 ml	2 ml	Rotiporese Gel 30
2,5 ml	2,5 ml		1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8
-	-	2,5 ml	1 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8
0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	10% SDS

Tabelle 32: Zusammensetzungen der Komponenten für die SDS-Gelelektrophorese.

Anschließend wurde dem Trenngel Ammoniumperoxodisulfat (APS) zum Start der Polymerisation der Gellösung und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Beschleunigung derselben zugegeben. Das gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Grenzschicht zu erreichen und einen Ausschluss von Luftsauerstoff bei der Polymerisation zu gewährleisten. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel nach Zugabe von APS und TEMED dazugefügt. In das noch flüssige Gel wurde ein Teflonkamm zum Aussparen der Geltaschen eingesetzt und das Gel zum Polymerisieren 30 Minuten stehen gelassen.

Das fertig auspolymerisierte Gel wurde nun senkrecht in die Gelkammer gestellt und diese mit TBS-Laufpuffer befüllt, so dass die Geltaschen mit Puffer bedeckt waren. Danach konnten die Proben geladen werden. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:4 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden sie 3 mal 5 bis 10 Sekunden gesonicated und bis zum Auftragen wieder auf Eis gestellt. Der verwendete „pre-stained“ Proteinmarker konnte direkt aufgetragen werden. Nach dem Befüllen der Gelkammern wurde eine Spannung von 90 V, nach Erreichen der Trenngelfront von 130-140 V angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

4.16.13 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Der Farbstoff Coomassie G-250 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. Für diese Arbeit wurde die fertige Färbelösung „SimplyBlue™ SafeStain“ (Invitrogen) verwendet. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Gele 10 Minuten in Wasser gewaschen und anschließend 30 bis 60 Minuten gefärbt. Um klare Banden und möglichst wenig Background zu gewährleisten, wurden die Gele danach ca. eine Stunde in Wasser entfärbt.

4.17 *Western Blotting*

Beim Western Blotting werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (s. 4.16.11) durch das so genannte „*Semi dry Blotting*“ (Westermeier *et al.*, 1989) quantitativ aus dem Gel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Trägermembran transferiert. Auf diese Weise werden die Proteine, deren Trennmuster erhalten bleibt, für den Nachweis mit immunologischen Methoden zugänglich (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde das „*iBlot™ Dry Blotting System*“ von Invitrogen verwendet. In das Gerät wurden die speziell dafür geeigneten Komponenten in folgender Sandwich-Anordnung eingelegt: Zuerst der „*iBlot™ Anode Stack Bottom*“ mit einer Kupferelektrode als erste Lage, auf der sich eine Gelschicht befindet, auf der wiederum die Nitrozellulosemembran aufliegt. Auf diese Membran können nun bis zu 2 vorbereitete Gele platziert werden, welche mit einem mit Wasser angefeuchteten Filterpapier bedeckt wurden. Als nächste Lage wurde der „*iBlot™ Cathode Stack Top*“ so aufgelegt, dass das Gel auf dem Filterpapier lag und die Kupferschicht nach oben zeigte. In den Deckel wurde ein Einmalschwamm gelegt, der sich eventuell bildende oder überschüssige Flüssigkeit aufsaugen und für den nötigen Druck auf den Stapel sorgen sollte. Je nach Größe des zu transferierenden Proteins konnte die Länge des Transfers variiert werden. Der Durchschnitt lag bei 5 bis 7 Minuten. Nach dem Blotten wurde die Membran auseinander geschnitten und in einer 5%igen Milchlösung (Milchpulver in TBS-T) blockiert um freie Bindungsstellen abzusättigen und so eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Der Blockierungsschritt wurde entweder für 1½ Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Proteindetektion erfolgte auf indirektem Weg durch enzymgekoppelte Sekundäntikörper, die der Erkennung proteinspezifischer Primäntikörper dienten. Nach dem Blockierungsschritt wurde der erste Antikörper ebenfalls in einer 5%igen Milchlösung (Milchpulver in TBS-T) in einer Verdünnung von 1:2.000 bis 1:5.000 zugegeben und die

Blots 2 bis 24 Stunden unter Schütteln inkubiert. Bei wenigen Stunden fand die Inkubation bei Raumtemperatur, über Nacht bei 4 °C statt. Anschließende Waschschrte (5 bis 6 x 5 Minuten mit TBS-T) dienten zum Entfernen nicht gebundener Antikörper.

Zum Nachweis der im Falle eines positiven Ergebnisses gebundenen Primärantikörper dienten enzymgekoppelte Sekundärantikörper, welche gegen das spezifische Immunglobulin des Primärantikörpers gerichtet waren. Gängigerweise werden Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet, die mit Alkalischer Phosphatase oder Peroxidase gekoppelt sind. Diese Enzyme erlauben eine Detektion der Antikörper durch Umsetzen eines enzyspezifischen Farbstoffsubstrates. Nach dem Waschschrte mit TBS-T wurde die Membran einer ein- bis zweistündigen Inkubation mit dem entsprechend verdünnten Sekundärantikörper (1:4.000) unterzogen. Dieser ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, so dass die Membran im Anschluss an zwei letzte Waschschrte (4-5 x 5 Minuten in TBS-T und anschließend 2-3 x 5 Minuten in TBS) mit einem enzyspezifischen Substrat inkubiert und die Proteinbanden, welche sich dadurch braun färbten, detektiert werden konnten.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

Blockierungslösung: 5% Milchpulver in TBS-T	TBS: 10 mM Tris-HCl, Ph 8,0 150 mM NaCl	TBS-T: 0,1% Tween 20 in TBS (v/v)
--	---	--------------------------------------

Tabelle 33: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Western Blot.

4.17.1 Dot Blot zur Verifizierung der SD_TNFR-like Expression in vivo

Um festzustellen, ob das SD_TNFR-like auch im lebenden Organismus exprimiert wird und ob die Expressionsrate durch bestimmte Stoffe beeinflusst wird, wurden Stücke eines *S. domuncula* Individuums über mehrere Stunden mit LPS (bis zu 48 h) und TNF α (1-4 h) inkubiert und anschließend im Precyllys 24 in Lysispuffer zerkleinert. Die Lösung wurde mit Roti[®]-Load gemischt, bei 95 °C denaturiert und mit Ultraschall behandelt. Währenddessen wurde eine Nitrocellulosemembran 5 Minuten in Transferpuffer äquibriert und danach auf mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere überführt. Die Proben wurden in gleichen Mengen (5 μ g) aufgetragen und kurz angetrocknet. Anschließend folgten dieselben Blockierungs-, Detektions- und Waschschrte wie bei einem normalen Western-Blot (s. oben).

4.18 Proteinaufreinigung

Die Proteinaufreinigung kann sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, je nachdem, ob das rekombinante Protein löslich oder

unlöslich in den so genannten „*inclusion bodies*“ vorliegt und zu welchen weiter führenden Experimenten sie eingesetzt werden sollen. Sowohl die native als auch die denaturierende Aufreinigung wurde gemäß des „The Qiaexpressionist“ Handbuchs (Qiagen) durchgeführt, aus dem auch die verwendeten Pufferzusammensetzungen stammen. Hierbei werden die rekombinant erzeugten Proteine über ein angefügtes HIS-Tag an immobilisierte Ni²⁺-Ionen, die zusammen mit NTA (*Nitrilotriaceticacid*) einen Chelatkomplex ausbilden (HOCHULI *et al.* 1987), gebunden. Dieser ist an Agarose gekoppelt und ermöglicht so die Aufreinigung über eine Polypropylenssäule (Pierce). Die gebundenen His-Tag-Proteine können anschließend durch Absenken des pH-Wertes (Protonierung der Histidinreste), Zugabe von Imidazol (konkurriert mit den Ni²⁺-Bindungsstellen des Ni-NTA) oder EGTA/EDTA (komplexiert die Ni²⁺-Ionen) von der Matrix abgelöst werden. Von allen Zwischenschritten werden Proben genommen und auf einem SDS-Gel überprüft, ob die Aufreinigung funktioniert hat.

4.18.1 Extraktion unter nativen Bedingungen

Ziel dieser Methode ist es, die Proteine, sofern es sich um lösliche Proteine handelt, in ihrer aktiven Form aufzureinigen, um z.B. unmittelbar Tests zu ihrer Wirkungsweise durchführen zu können. Das Bakterienpellet wurde gewogen und in 5 ml/g BugBuster® mit Benzonase und Proteininasehibitor resuspendiert und für 60 bis 90 Minuten bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Die im Lysepuffer enthaltene Benzonase degradiert die DNA, während die Proteine durch Proteinaseinhibitoren geschützt werden. Durch eine 20- bis 30-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C wurden intakte Bakterien und Zelldebris pelletiert und der Überstand abgenommen. Dieser enthält schon einige lösliche Proteine und kann auf einem SDS-Gel auf das Zielprotein überprüft werden. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 2 bis 5 ml nativem Lysispuffer pro Gramm Gewicht resuspendiert.

Es gibt zwei Vorgehensweisen, um die Lyse der Zellen zu unterstützen, die beide während dieser Arbeit angewandt wurden. Zum Einen gibt es die Möglichkeit, Lysozym zu einer Endkonzentration von 1mg/ml zuzugeben und 30 Minuten zu inkubieren und zum Anderen kann die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und auf Eis wieder aufgetaut werden. Dann folgen 4 bis 6 Sonicationsschritte (Ultraschallbehandlungen) für 10 Sekunden bei 200 bis 300 Watt, um die Zellen aufzubrechen und eine Zentrifugation für 20 bis 30 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C, um den Zelldebris zu entfernen. Der Überstand sollte nun die löslichen Proteine enthalten und wird im nächsten Schritt mit 1 ml 50% Ni-NTA-Agarose pro 4ml Lysat gemischt und bei 4 °C mit leichter Rotationsbewegung 60 bis 90 Minuten inkubiert. Bis zu 5 ml des Ni-NTA-Lysat-Gemisches konnten nun auf eine

Polypropylen säule/Siebsäule (Pierce) geladen werden, deren Durchlauf mit einem Cap verschlossen war. Nachdem sich das Gel einige Zeit abgesetzt hatte, wurde der Durchlauf geöffnet und die Flüssigkeit aufgefangen. Sie darf optimalerweise kein Zielprotein enthalten, da dieses komplett an die Ni-NTA-Agarose gebunden und so über dem Filter gehalten werden sollte. Nachdem die komplette Lösung durchgelaufen war, folgten zwei Waschschriffe mit je 4 ml Waschpuffer und die anschließende Elution mit 4 x 500 µl Elutionspuffer. Anschließend konnte die Ni-NTA-Agarose der Säule bei Bedarf mit 250 µl 125 mM EDTA gestrippt werden. Dies bewirkt, dass sämtliche Proteine von der Matrix gelöst werden. Die Proteinlösungen wurden bis zu ihrer Weiterverwendung bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt.

Zusammensetzung der BugBuster®- Lösung:

BugBuster®: - Benzonase 25 U/ml - 1 Tablette PI <i>Complete-Mini</i> - 50 ml BugBuster®

Tabelle 34: Komponenten der BugBuster®-Lösung.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Lysispuffer, pH 8:	Waschpuffer, pH 8:	Elutionspuffer, pH 8:
- 50 mM NaH ₂ PO ₄	- 50 mM NaH ₂ PO ₄	- 50 mM NaH ₂ PO ₄
-300 mM NaCl	-300 mM NaCl	-300 mM NaCl
- 10 mM Imidazol	- 20 mM Imidazol	-250 mM Imidazol

Tabelle 35: Zusammensetzung der Puffer für die native Proteinaufreinigung.

4.18.2 Extraktion unter denaturierenden Bedingungen

Ein großer Teil der Proteine wird von Bakterien in unlöslicher, inaktiver Form in membranumschlossenen „*inclusion bodies*“ gespeichert. Um diese aufzuschließen, wurde das Bakterienpellet analog zu 4.18.1 mit 5 ml BugBuster® resuspendiert und lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 5 ml Puffer B (Solubilisierungspuffer) oder Lysispuffer mit Imidazol pro Gramm erneut resuspendiert. Im Solubilisierungspuffer ist 8 M Harnstoff enthalten, welcher die „*inclusion bodies*“ auflöst und das enthaltene Protein entfaltet.

Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgten 3 bis 4 Sonicationsschritte (Ultraschallbehandlungen) für 10 Sekunden und anschließend ein Zentrifugationsschritt von 20 bis 30 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde, wie in 4.18.1 beschrieben, mit der entsprechenden Menge Ni-NTA-Agarose versetzt und 60 bis 90 Minuten bei RT auf

einem Rotor gemischt. Nach Ende der Inkubation wurde das Ni-NTA-Agarose-Gemisch auf eine Polypropylensäule/Siebsäule geladen. Nachdem sich das Gel etwas abgesetzt hatte, wurde der Durchlauf geöffnet und die Lösung aufgefangen. Es folgten 2 bis 4 Waschschritte mit Puffer C bzw. W1 und W2 mit Imidazol und zwei Elutionsschritte mit Puffer D und E bzw. E1 und E2 mit Imidazol. Auch hier kann bei Bedarf wieder mit 250 µl 125 mM EDTA gestrippt werden. Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Lyse-Puffer B, pH 8,0: -100 mM NaH ₂ PO ₄ -1 mM Tris/HCl -8 M Harnstoff	Waschpuffer C, pH 6,3: -100 mM NaH ₂ PO ₄ -10 mM Tris/HCl -8 M Harnstoff	Elutionspuffer D, pH 5,9: -100 mM NaH ₂ PO ₄ -10 mM Tris/HCl -8 M Harnstoff	Elutionspuffer E, pH 4,5: -100 mM NaH ₂ PO ₄ -10 mM Tris/HCl -8 M Harnstoff
---	--	---	---

Lysispuffer, pH 8: - 6 M Harnstoff - 300 mM KCl - 50 mM NaH ₂ PO ₄ - 5 mM Imidazol	W1, pH 8: - 6 M Harnstoff - 300 mM KCl - 50 mM NaH ₂ PO ₄ - 5 mM Imidazol	W2, pH 8: - 6 M Harnstoff - 300 mM KCl - 50 mM NaH ₂ PO ₄ - 10 mM Imidazol
E1, pH 8: - 6 M Harnstoff - 300 mM KCl - 50 mM NaH ₂ PO ₄ - 250 mM Imidazol	E2, pH 8: - 6 M Harnstoff - 300 mM KCl - 50 mM NaH ₂ PO ₄ - 350 mM Imidazol	

Tabelle 36: Zusammensetzung der Puffer für die denaturierte Proteinaufreinigung.

4.19 Quantifizierung der Protein-Konzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration eines Extraktes wurde die photometrische Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Das dabei eingesetzte Roti-Quant enthält „Coomassie Brilliant-Blue R250“, welches seine Absorptionseigenschaften je nach Ladung (kationisch, neutral, anionisch) ändert. Dies kann im ELISA-Reader nachgewiesen werden. 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. Für die Messung wurden 25 µl eines Proteinextraktes bzw. 25 µl diverser BSA-Verdünnungen (Bovines Serumalbumin als Eichwerte) mit definierter Proteinkonzentration mit 1 ml Roti-Quant gemischt und 5 Minuten inkubiert. Als Blindprobe diente Wasser, das auch mit Roti-Quant gemischt und

inkubiert wurde. In jeweils zwei benachbarte *wells* einer 96-*well* Mikrotiterplatte wurden je 100 µl der Albuminverdünnungen, sowie der Probenlösungen pipettiert und die Extinktion bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Readers bestimmt. Aus den gemessenen Werten wurden später die Mittelwerte berechnet und anhand der durch die BSA-Verdünnungsreihe ermittelten Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Extrakte bestimmt werden.

4.20 Herstellung polyklonaler Antikörper

In dieser Arbeit wurde der polyklonale Antikörper durch mehrfache Immunisierung eines weiblichen Kaninchens (Weiße Neuseeländer) gewonnen (siehe Ausubel *et al.*, 1994). Er wird nach Injektion des Antigens von verschiedenen B-Zelllinien des Kaninchens gebildet und stellt eine Mischung von Immunglobulin-Molekülen dar, die die verschiedenen Epitope des Antigens erkennen und binden. Der Antikörper stellt die Grundlage für den Nachweis des Antigens (SD_TNFR-like) mittels immunologischer Methoden, wie z.B. im Western-Transfer (s. 4.17) oder bei der immunocytochemischen Färbung von Gewebeschnitten (s. 4.23) dar.

4.20.1 Immunisierung und Serumzubereitung

Das Kaninchen wurde mit einem im prokaryotischen System exprimierten, rekombinanten Protein (s. 4.16) als Antigen immunisiert. Vor der Immunisierung erfolgte die Abnahme von Blut zur Erzeugung des Präimmunserums. Das Antigen wurde dem Kaninchen dreimal im Abstand von vier Wochen subkutan injiziert. Als Immunantwort bilden die B-Lymphozyten IgG-Immunglobuline gegen das Antigen. Jeweils 12 Tage nach der zweiten und dritten Immunisierung wurde dem Versuchstier 15 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, um den Antikörpertiter zu bestimmen (s. 4.20.2). Zur Serumzubereitung dieses, wie auch des vor der Immunisierung entnommenen Blutes, wurde es eine Stunde bei 37 °C, dann eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 16.000 x g abzentrifugiert. Das Serum wurde von den geronnenen Blutbestandteilen getrennt und bei -20 °C gelagert.

4.20.2 Bestimmung des Antikörpertiters

Zur Bestimmung des Antikörpertiters wurden ELISA-Platten mit dem Antigen beschichtet und mit Antiserum (bzw. Präimmunserum als Kontrolle) inkubiert. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte indirekt über einen Sekundärantikörper, der den Antigen/Antikörper-Komplex erkennt und durch eine Farbreaktion markiert. Die *wells* der ELISA-Platten wurden dafür mit 100 µl Antigenlösung (1 µg/ml Carbonatpuffer, s. u.)

beladen, 3 Stunden bei RT getrocknet und nichtgebundene Komponenten durch Waschen (3 x PBS, s. u.) entfernt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde mit 150 µl 3%igem BSA (w/v) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach drei kurzen Waschschritten mit PBS wurden für die folgende Antikörperreaktion verschiedene Verdünnungen des Präimmun- und Antiserums in PBS eingesetzt (1:100 bis 1:2.000; bei Serum nach der dritten Immunisierung bis 1:500.000). 100 µl der jeweiligen Verdünnungen wurden pro *well* eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und 3 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl des mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-*Rabbit*-Sekundärantikörpers (1:2.000 in PBS) wurde 30 Minuten bei RT inkubiert und erneut 3 x mit PBS gewaschen. Die enzymatisch katalysierte Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung für 10 Minuten im Dunkeln. Mit 25 µl H₂SO₄ (1 M) wurde diese gestoppt und die Platten bei 450 nm im ELISA-Reader ausgewertet.

Verwendete Medien:

PBS-Puffer, pH 7,2 -137 mM NaCl -2,7 mM KCl -9,6 mM Na ₂ HPO ₄ -1,8 mM KH ₂ PO ₄	Carbonatpuffer -0,1 M NaHCO ₃	Substratlösung -1,25 mM Tetramethyl- benzidin -2,2 mM H ₂ O ₂
---	--	---

Tabelle 37: Verwendete Medien für die Bestimmung des Antikörpertiters.

4.21 *RAW-Blue*TM-Zellen

Die *RAW-Blue*TM-Zellen (Invitrogen) sind eine Makrophagen Zelllinie aus Mäusen. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr und exprimieren eine Reihe so genannter „*pattern recognition receptors*“ ("mustererkennende Rezeptoren"). Diese Rezeptoren, wie beispielsweise Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder NOD-like Rezeptoren (NLRs), erkennen konservierte Strukturen von Pathogenen, die „*pathogen associated molecular patterns* (PAMPs)“. Ihre Erkennung führt zur Aktivierung der Rezeptoren und somit zu verschiedensten Reaktionen, wie vermehrte Expression von regulatorischen und antimikrobiellen Molekülen sowie der Induktion von Apoptose. Einer dieser Wege führt dabei über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF - κB (nuklearer Faktor kappa B). Dies wird bei den Versuchen mit den *RAW-Blue*TM-Zellen ausgenutzt, da diese ein Gen exprimieren, das für embryonale alkalische Phosphatase (SEAP) codiert, welches durch die Transkriptionsfaktoren NF - κB und AP-1 induziert und anschließend ins

Medium abgegeben wird. Dort kann die Aktivierung über einen Farbwechsel bei Inkubation mit einer speziellen Färbelösung (QUANTI-Blue™) direkt optisch gemessen werden.

NOD-like Rezeptoren (NLRs) sind die löslichen Gegenstücke der Toll-like-Rezeptor-Familie, deren Architektur der von Apaf-1 entspricht. Sie agieren unabhängig von den TLR, es wird jedoch angenommen, dass sie mit diesen kooperieren und die Immunantwort auf mikrobielle Eindringlinge auslöst. Es wird angenommen, dass sie PAMPs erkennen, was zur Aktivierung von Caspasen und Kinasen führt.

4.21.1 Kultivierung der Zellen

Die RAW-Blue™-Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Als Medium diente den Zellen DMEM (*high glucose*), welches jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (v/v), 200 µg/ml Zeocin und 50 U/ml Penicilin/Streptomycin (Pen/Strep) angereichert worden war. Sämtliche Vorgänge wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden. Die bei 37 °C im Wasserbad aufgetauten Zellen wurden in einen Falcon mit 15 ml vorgewärmtem Medium überführt und anschließend bei 2.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem Milliliter Medium (ohne Antibiotika) resuspendiert, in eine Kulturflasche mit 12,5 ml vorgewärmtem Medium überführt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium im Wasserbad erwärmt und, wenn es 37 °C erreicht hatte, die Zellen aus dem Inkubator entnommen. Das alte Medium wurde vorsichtig ausgegossen und durch 12,5 ml frisches Medium mit 200 µg/ml Zeocin und 50 U/ml Pen/Strep (Selektionsmedium) ersetzt.

Die Zellen wurden so lange inkubiert, bis sie eine Konfluenz von 70 bis 80% aufwiesen. Dann wurden sie wie folgt in 2 neue Kulturflaschen aufgeteilt: Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde das alte Medium ausgegossen und die Zellen kurz mit 5 ml 1 x PBS gewaschen. Nach Verwerfen der Waschlösung wurde 1 ml Trypsin zugegeben um die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen und die Zellen zu vereinzeln. Die Inkubation sollte nicht länger als 5 Minuten dauern und kann durch leichtes Klopfen der Kulturflasche auf einen festen Untergrund beschleunigt werden. Während dieser Zeit wurden zwei neue Kulturflaschen mit je 12,5 ml warmem Medium vorbereitet und mit je zwei bis drei Tropfen der Zellsuspension angeimpft. Danach wuchsen die Zellen, bis sie erneut eine Konfluenz von 70 bis 80% erreicht hatten.

4.21.2 Detektion der NF - κ B Aktivierung

Für den Nachweis der NF - κ B Aktivierung wurden alle zu testenden Proben auf 37 °C aufgewärmt. Während dieser Zeit wurden die Zellen vom Medium befreit, zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin in Lösung gebracht. Anschließend wurde die Zellkonzentration in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Mit frischem Medium wurde eine Zellsuspension von ca. 550.000 Zellen/ml hergestellt. In eine 96-*well* Platte wurden jeweils 20 μ l der zu testenden Proben, der Positiv- (Pam3CSK4) sowie der Negativ-Kontrolle (Wasser) pipettiert und je 180 μ l Zellsuspension zugefügt. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurden je 160 μ l der vorbereiteten QUANTI-Blue™ Lösung in eine neue 96-*well*-Platte pipettiert und 40 μ l des Zellüberstands der inkubierten Zellen zugegeben. Die Platten wurden 30 Minuten bis 3 Stunden inkubiert und der Farbumschlag im Spektrophotometer bei 620-655 nm gemessen.

4.22 Antimikrobieller Test

Der antimikrobielle Test kann entweder in Flüssigkulturen oder mit Agarplatten durchgeführt werden, wobei für den in dieser Arbeit durchgeführten Test Agarplatten gewählt wurden. Es wurden Tests mit einem *E. coli*- (NovaBlue Single) und einem *S. cerevisiae*- (Ma V203) Stamm durchgeführt. Dazu wurden die passenden Agarplatten ohne weitere Zusätze vorbereitet, LB-Agar für die Bakterien und YPAD-Agar für die Hefe. Von den zu testenden Bakterien/Hefen wurden 1,5 μ l in Wachstumsmedium überführt und 14 bis 16 Stunden bei 37 °C/30 °C kultiviert. Je nach Plattengröße wurden 3 bis 8 ml auf den Platten verteilt. Nach kurzer Einwirkzeit wurde der nicht eingezogene Rest abgegossen und auf den Platten kleine Filterpapierkreise in ca. 4 bis 5 cm Abstand aufgebracht. Auf diese wurde die zu testende Proteinlösung aufgetropft (negativ Kontrolle, 50/500/5.000 μ g/ml) und die Platten über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Morgen wurden die Platten kontrolliert und fotografiert.

4.23 Immunohistologische Färbungen

Immunohistochemische Untersuchungen werden in unterschiedlichsten Bereichen der klinischen Diagnostik eingesetzt und dienen zur Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten. Dabei wird die natürliche Bindung des Antikörpers zu seinem speziellen Antigen im Gewebe genutzt. Um die Gewebeschnitte anfertigen zu können, wurden

Gewebestücke wie in 4.7 beschrieben inkubiert und anschließend für 24 Stunden bei 4 °C direkt in 2% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (pH 7,4) überführt. Nach einem Über-Nacht-Waschschritt bei 4 °C in PBS-Puffer (pH 7,4) mit 6,8% Saccharose wurde das Gewebestück 60 Minuten bei 4 °C in 100% Aceton dehydriert, wobei des Aceton während der ersten Minuten so oft erneuert wurde, bis die Flüssigkeit klar blieb. Die Kunststoffeinbettung fand mit „Technovit 8100“ (Heraeus Kulzer) nach Herstellerangaben statt, einem histologischen Einbettmaterial auf Basis von Methacrylat, das in der Lichtmikroskopie verwendet werden kann. Hierzu wurde das Gewebe in die Einbettungslösung getaucht und inkubiert, bis das Gewebe auf den Boden sank. Die Lösung wurde gewechselt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die gut gemischte Einbettungslösung (15 ml Einbettungslösung mit Härter I und 0.5 ml Härter II) in die Teflonform gegossen, das Gewebestück eingelegt, die Form luftdicht mit Folie verschlossen und auf Eis platziert. Nachdem das Plastik ausgehärtet war, konnte das Gewebe aus der Form entnommen und geschnitten werden. Schnitte unterschiedlicher Dicke wurden mit einer rotierenden Schneidemaschine hergestellt, in Wasser gestreckt, auf Objektträgern platziert und 30 Minuten in 1% Saponin in PBS inkubiert, um die Poren zu öffnen. Nach dreimaligem Waschen für je 15 Minuten in PBS wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer eingelegt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Antikörper (1:25.000, verdünnt mit 0,3% BSA) in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschritt von 3 x 30 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit Cy3-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:800 in PBS-T mit 0,3% (w/v) BSA und 15 mM Natriumazid) für 90 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten von je 30 Minuten in PBS wurde 10 Minuten mit DAPI (4'-6- Diamidino-2-phenylindole, 2 µM in 0,3% BSA) inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Nach Waschen und Eindecken des Gewebes mit härtendem Gel/Fixierer (Natutech) wurde Nagellack um das Deckglas aufgetragen, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Anschließend wurden sie unter dem Lichtmikroskop (Olympus AHB T3) überprüft.

5 Ergebnisse

5.1 Vervollständigung eines Klons mit DD aus *Suberites domuncula*

5.1.1 PCR-Screening der cDNA-Bank

In der Sponge Base der AG Müller wurden Sequenzen mit einer Todesdomäne („*Death domain*“ = DD) gesucht und aus dem vorliegenden Sequenzabschnitt neue genspezifische Primer erstellt (s. 4.1.1). Mit Hilfe einer PCR wurde die *Suberites domuncula* cDNA-Bank sowohl in 5`-, als auch in 3`-Richtung gescreent, um die Sequenz zu komplettieren. Die PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung in den pGEM-T- oder TOPO-Vektor ligiert und anschließend nach Transformation in *E. coli* amplifiziert. Über eine Checking-PCR wurden Klone identifiziert, welche nach der Länge des Fragments in Frage kamen. Die Sequenzierung dieser Klone und der Sequenzvergleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (NCBI) ermöglichte die Komplettierung der Sequenz. Der Klon, der in der BLAST-Analyse das interessanteste Ergebnis lieferte, wurde anschließend für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Dieser Klon (*SD_TNFR-like* Gen) zeigte Homologien zu einer Vorstufe des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors 6 aus *Canis familiaris*.

5.1.2 Identifizierung des Komplettklons des potentiellen *SD_TNFR-like* Klons

Nachdem die vollständige Nukleotid-Sequenz des *SD_TNFR-like* Gens vorlag, wurden zwei neue genspezifische Primer erstellt, mit denen die komplette Sequenz aus der cDNA amplifiziert wurde. Eine Sequenzierung und deren anschließende Auswertung mit Hilfe des Programms Vector NTI Advance 10 ergab eine vollständige Nukleotidsequenz des *SD_TNFR-like* Gens.

5.1.3 Analyse der Sequenz des *SD_TNFR-like* Proteins

Die Gesamtlänge der *SD_TNFR-like* Sequenz beträgt 1572 bp und umfasst einen offenen Leserahmen von 1171 bp, der für ein potenzielles Protein von 390 AS kodiert. Am 5`-Ende befindet sich ein untranslatierter Bereich von 108 bp, während der untranslatierte Bereich am 3`-Ende 401 bp lang ist.

TGACATGGACTGAAGGAG

TAGAAAAATTTCCAAGAACCACAGCATGCAGTGCAGTGCATATGACTTGCTAGCTAGCTACAGGGTATAAGAGTGCTAGAGTCCA
 1 M A C S K L C R L T V E Y Q T I S G S F K R I Q P 25
 GGTACATGGCTTGCTCCAAGCTTGGCGTCTGACTGTGGAGTACCAGACCATCAGCGGGTCTTTAAACGTATTCAACCG 75

26 N K G K V I E V H F P L N E T V N N F I K H L G H 50
 76 AATAAAGGAAAAGTGATTGAAGTACTTTCCACTAAACGAAACCGTCAACAATTTTATTAACATCTAGGTCAC 150

51 S F N S L H S Q T S A G K E L Y L I R G X V H T R 75
 151 AGTTTCAATAGCTTGCACTCTCAGACATCTGCTGGAAAAGAACTGTATCTTATTCGCGGAARAGTGACACTCGA 225

76 L D E K K G F S L V Q F S V Q D G D R F V L L G Y 100
 226 TTAGATGAAAAGAAGGGATTCTCTCTTGTCCAATTCTCTGTGCAAGATGGTGATCGCTTTGTATTGCTAGGGTAC 300

101 K P I S R I K F T I V V K G L D G N R M E F D V L 125
 301 AAACCAATAAGTCGAATAAAAATTCACCATTGTGGTGAAAGGCCTTGATGGTAACCGAATGGAGTTTGTATGACTC 375

126 N T T T I D T L L K H R I Q D R T G I H E S D I I L 150
 376 AATACTACAACATATCGACACCCTAAAGCACAGGATCCAAGATAGGACTGGGATCCATGAGTCTGACATTATACTT 450

151 M Y K G K V V P K G S R K T V E F Y D G R S G S K 175
 451 ATGTACAAGGAAAAGTAGTACCAAAGGGATCCCGTAAAACCTGTTGAATTTTATGATGGAAGGTCTGGAAGTAAA 525

176 A Q L E V B Q R S I A K E P E E D V S R S K E E P 200
 526 GCACAGCTGGAAGTARACCAGAGATCAATAGCAAAAAGAGCCTGAAGAGGATGTTTCTCGCTCTAAAGAAGAACCT 600

201 V S S E T D G P F Q N R R N T Q Q G A F V R E N T 225
 601 GTTCTAGTGAGACAGACGGGCCCTTTTCAGAACAGAAGGAACACCCAGCAAGGAGCTTTTGTGCGAGAGAATACA 675

226 R R S C R S R Q G A P R Y S Q V S S L G C A E D Q 250
 676 AGGAGGAGCTGTCGATCTCGCCAAGGAGCACCTCGATACTCACAGTTAGTTCGTTGGGGTGTGCTGAGGACCAA 750

251 V R Y E T D K E M L A R V P H A P I S D T G L L D 275
 751 GTGCGGTACGAAACTGATAAAGAGATGCTGGCAAGAGTTCACATGCACCTATATCTGATACTGGGCTCTTGGAT 825

276 I S K K M T G W K H L A I R L G L N E S E R V V I 300
 826 ATTAGCAAGAAGATGACAGGATGGAAACATCTAGCTATTCGACTGGGACTAAATGAAAGTGAGCGTGTGTGATT 900

301 E E D S R Y D F A E Q K V Q M L L K W K R K N G R 325
 901 GAAGAAGACAGCCGATATGACTTTGCCGAACAAAAGTACAAATGTTACTTAAATGGAAACGCAAAAATGGTAGA 975

326 E A T W R K L L C R V Q E E E D R E L A W K I V R 350
 976 GAAGCAACTTGAGGAAGCTGTTATGTAGAGTGCAAGAGGAAGAGGATAGAGAAGCTTGCTTGAAAATGTGACAG 1050

351 I S Q K R K D S D S V Q C A L D V A S P Q A S V A 375
 1051 ATCTCACAAAACGAAAGGATTCTGACTCTGTGCAATGTGCTCTAGATGTTGCCAGTCCCCAAGCTTCAGTAGCT 1125

376 P I S N E G A P V Q E T Q T E *
 1126 CCAATAAGCAACGAAGGAGCACCTGTTCAAGAGACACAAAACAGAGTGAACCTAAGCGTATGGTATAGGCTTGAAT 1200
 1201 TGATAAGTCAACACTCCATTGTTGTGAGTAGACTACTTACTGTTTAAACCACCTACTTGAAAGGTATTGATCTG 1275
 1276 ACTTGGCATGAAAAGTTGCCGTATTTAAATGTGCTGCATATGTATGCATTTCCGACCACACATGCAGCAAAG 1350
 1351 TTATTTGTTGTTATTTATTTAGCTACATCTAATGTAGTTTTGAAGTTATCCACATTATAGTGCAGCATCATGTGA 1425
 1426 CTTTAGACAATTGGTTATGGCTTGATTTACATAGCTCAGCAATTTTTCATAAGGTANNANTCATTTTTAAAATCC 1500
 1501 TGTGCTACTAATCATACTTATGTGTTGATGTGTGTACCATGAACGC (A)_n 1560

Abbildung 11: Basen- und abgeleitete AS-Sequenz des *SD_TNFR-like* Gens, mit Hilfe von DNasis 2.5 erstellt. Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind blau, translatierte Bereiche schwarz dargestellt. Rot markiert sind Start- und Stop-Codon der Sequenz. Die für die Vervollständigung der Sequenz verwendeten Primer sind unterstrichen.

Die abgeleitete AS-Sequenz des *SD_TNFR-like* Gens umfasst 390 Aminosäuren und weist ein errechnetes Molekulargewicht von 44.426 kDa und einen theoretischen pI von 9.32 auf. *In vivo* spielen die N-terminalen Aminosäuren eines Proteins eine wichtige Rolle für dessen Stabilität, da diese für den ubiquitin-markierten proteolytischen Abbau von Bedeutung sind

(Gonda *et al.*, 1989; Tobias *et al.*, 1991). Demnach bedeutet ein errechneter Instabilitätsindex von 41,14 für dieses Protein eine Einordnung zu den instabilen Proteinen (Guruprasad *et al.*, 1990), für welches nach Bachmair *et al.* (1986) eine geschätzte Halbwertszeit (*in vitro*) von ungefähr 30 Stunden errechnet wurde. Hinsichtlich konservierter Domänen ergab ein Vergleich der SD_TNFR-like Proteinsequenz mit anderen Proteinen aus Gendatenbanken (NCBI mit BLASTP- Algorithmus) eine Homologie zur konservierten „Death-Domain“ (DD oder Todesdomäne, Pfam *Acc. No.* PF00531; E-Wert = $9e^{-06}$, As 273-350) und zur UBQ-Domäne aus der UBQ-Familie (Smart *Acc. No.* smart00213; E-Wert = $6e^{-06}$, AS 108-182). Allerdings konnte keine Transmembranregion detektiert werden, welche typisch für einen Rezeptor ist.

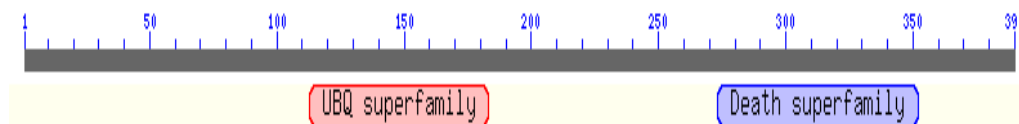


Abbildung 12: Ergebnis der Domänensuche des BLASTP mit der SD_TNFR-like Sequenz.

5.1.4 Analyse der abgeleiteten AS-Sequenz des SD_TNFR-like

Die Analyse der Homologie des *SD_TNFR-like* Gens von *S. domuncula* zu ähnlichen Genen anderer Organismen gestaltete sich sehr schwierig, da bis zum heutigen Zeitpunkt nur ein weiteres Gen mit der selben Domänenkombination bekannt ist. Dies ist ein bisher nicht weiter charakterisiertes, hypothetisches Gen aus *Caenorhabditis elegans* (zwei unterschiedlich lange Sequenzen, *Acc. No.* NP_871663, bzw. NP_498714.1), welches über die BLAST Suche nach derselben Domänen-Architektur identifiziert wurde.

In der folgenden Abbildung 13 ist ein Alignment verschiedener Aminosäure-Sequenzen der BLAST-Hits mit der höchsten Übereinstimmung dargestellt, welche über BLASTP der Datenbank (NCBI) entnommen wurden. Die höchste Homologie im Vergleich der Proteinsequenz mit Proteinen aus Gendatenbanken (NCBI mit BLASTP-Algorithmus) ergab sich zu der MGC78788 Protein-Sequenz aus *Strongylocentrotus purpuratus* (*Acc. No.* XP_785111, E-Wert: 0,006), einer Seeigel-Art.

	* 20 * 40 * 60 * 80	
hyp. BRAFL	: MATQMRISEWTGRHLQIKEKLFQNGQASWPDADYYMQMSHWTOLEKLEFPDCSFEWKSITDGTYSLAIKSKDPPCIPDFLKH	: 82
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 100 * 120 * 140 * 160	
hyp. BRAFL	: DPRTLKVSQHLHSVNRMKKIPAGISIFSQVTDVKLDRNKLSLTQEFTELKKIKNLDLGHNVFKTFPAQIKEFRELEVLRFSS	: 164
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 180 * 200 * 220 * 240	
hyp. BRAFL	: VNQVEEIPPGVFPCLPKMKNLRIKSNRLKTLPEDLVSLERLEYLKISSNKFTMFPQLLQLPRIQVCLSANKITEVPLEFF	: 246
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 260 * 280 * 300 * 320	
hyp. BRAFL	: DKPLELFQAEADNPLSEPPQEVCIQGIITAIKQYQCQLKAGVTEDRRMKIMLLGDTGAGKTSLCLSLKGTGQSNLVDIQDRTHGI	: 328
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 340 * 360 * 380 * 400 *	
hyp. BRAFL	: DRHDITEGDVTFLLTWDFAGQQDYLVTHPVFITKDALVLLVNVHLETYRLGDEKSYRRHVGVWIDNIAMRVPNAAVLVVGTSLD	: 410
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 420 * 440 * 460 * 480 *	
hyp. BRAFL	: RVTAEADAQEKLADILKKEIQDKRLKTIERHISQLKRRKLDQPGSRDADVVMDLLANLEEKQGVRLRVHPQGLPLSSAPGL	: 492
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 500 * 520 * 540 * 560 *	
hyp. BRAFL	: QGFDSFKQTVSHLAQTYLQQAWRKIPTSWTKVENIMKPSQKGRSAEPTDGPVVIDIDEAVDDILHFTDVKTRHEAKVVLKYL	: 574
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 580 * 600 * 620 * 640 *	
hyp. BRAFL	: HGLGLLIWYSEIDCLKTYVFDPAVLVAVFKVVIRDGLQEELASITMDQMADEGMSTKFKNQLKKFQRKALLDHRILTLILW	: 656
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----	: -
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 660 * 680 * 700 * 720 * 7	
hyp. BRAFL	: KKAKDNKMLNVPEDVQLLVNVLEQFQLCFTYTPPEPDMLNPAAPAFHPGSPWAPP SNKPPVSPDQLRKSTMYLFP CYLHDTL	: 738
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: -----MLFLGCLGAWGRGRQVQPQT LASIAGPWPRGVKAQVTSLS	: 41
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 760 * 780 * 800 * 820	
hyp. BRAFL	: PSDEWSDPCPTDQEQRVGLTFFPEVPGYGFERLCVCLHQLCPGLKLWRDSAKLQNNVSMVVRKHQGGCHGSDTVSELQDVW	: 820
MGC78788_STRPU	: -----	: -
poly_UBQ_STRPU	: -----	: -
TNFR6_CANFA	: YKVLRSGTRKESDCTS YAGKSHCVPCQEGEEYTDKTHLSPKCRRCGICDGEHGLEVERICTQTRNTKCRCKPNFYCDVSPCE	: 123
SD_TNF/R_SUBDO	: -----	: -
	* 840 * 860 * 880 * 900	
hyp. BRAFL	: NDPTIEMVARGNKPPADPTPRDPLWDPVLRVVGVAQSLLTWPVGNIDMFSLCPRCEPDNAEVFEVPLPVKLESEDEGQATY	: 902
MGC78788_STRPU	: -----MSMTEPHKVLKQVAPDFND-LDSDDIVPYLGDFAISRDRDK	: 44
poly_UBQ_STRPU	: KSMYADLVENLNCALCQDVLKEARDLSGHTYCLKCLQELVAMK-GWTSDIKCLCQKMTSIPSSGLN	: 74
TNFR6_CANFA	: HCNPCSTCEHGILERCPTSDTKCEEGSSYLWFCVLPITSVLVVCWCVLWCHRRDARVTRAPWTDVLSVETVPCLSDI	: 205
SD_TNF/R_SUBDO	: -----MACSKLCLTVEYQTSISGFKRIQPNKGVIEVHFLN-ETVNNFIKHLGHSFNSLS-----QTS	: 61

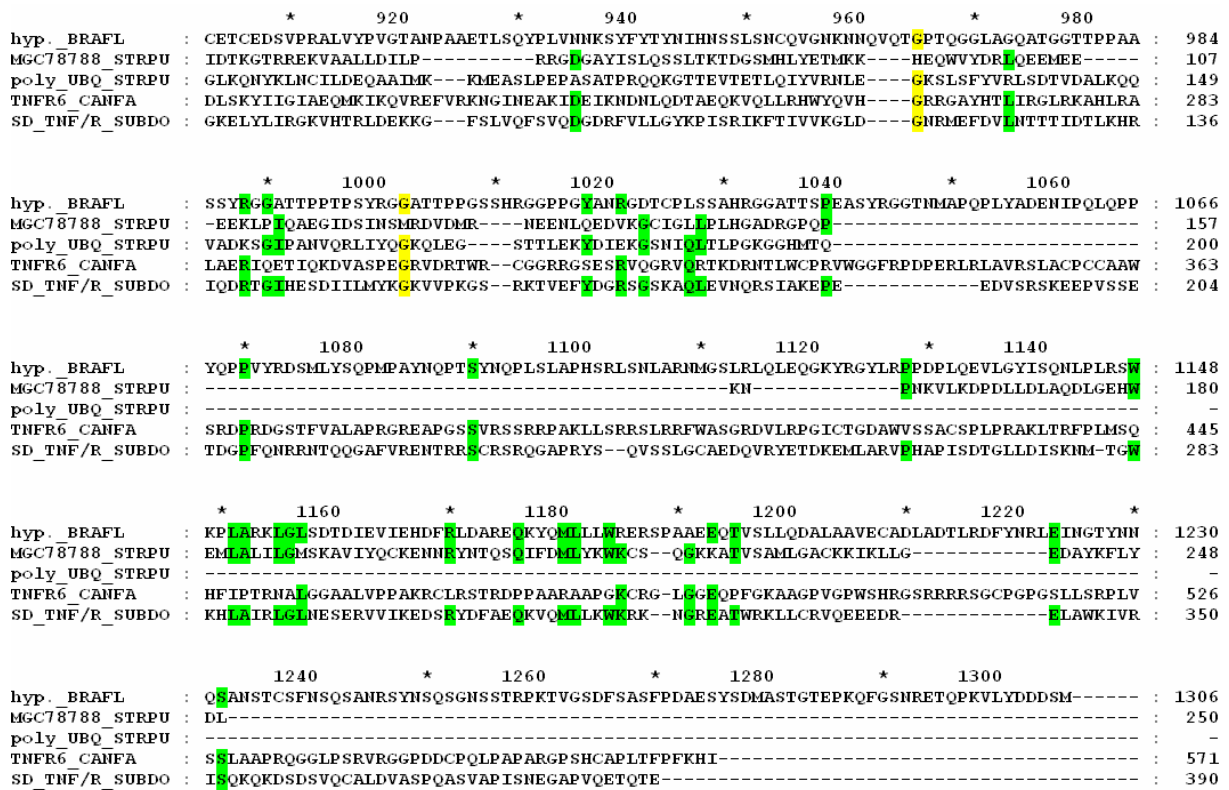


Abbildung 13: Das Multi-Alignment von abgeleiteten AS-Sequenzen des SD_TNFR-like und ähnlichen Proteinen einiger anderer Organismen wurde mit ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt und mit Genedoc 2.6 bearbeitet. Folgende Sequenzen wurden dazu verwendet: *Suberites domuncula*; *Strongylocentrotus purpuratus* (similar to MGC78788 protein, *Acc. No.* XP_785111), *Branchiostoma floridae* (hypothetical protein BRAFLDRAFT_80159, *Acc. No.* EEA62499), *Strongylocentrotus purpuratus* (similar to polyubiquitin, *Acc. No.* XP_783170) und *Canis familiaris* (similar to Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 precursor (FASL receptor) (Apoptosis-mediating surface antigen FAS) (Apo-1 antigen) (CD95 antigen), *Acc. No.* XP_543595). Die nach der BLOSUM62 Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992) angefertigte Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung von konservierten Aminosäuren (blau = 100 %, gelb = ≥ 80 %, grün = ≥ 60 %). - : eingefügte Lücken zum Maximieren der Sequenzähnlichkeit

Tabelle 38 zeigt die Parameter des für das Alignment verwendeten BLASTP-Algorithmus.

Optionen für den BlastP		Format	
Limitierung	Metazoa	Graphical Overview; Linkout; Sequence Retrieval	X X
Filter	low complexity	Limitierung	Metazoa
Expect	10	Descriptions; Alignments	500; 250
Word Size	3	Masking Character	Default (X for protein, n for nucleotide)
Matrix	BLOSUM62	Masking Color NCBI-gi	Black Alignment (HTML)
Gap costs	Existence: 11 Extension: 1	Alignment view with inclusion threshold	pair wise 0.005
		Layout; formatting options Autoformat	2 windows; none semi-auto

Tabelle 38: Parameter des verwendeten BLASTP-Algorithmus der NCBI-Datenbank mit der AS-Sequenz des SD_TNFR-like von *S. domuncula*.

Eine Übersicht über die Charakteristika der in dem Alignment (s. Abb.13) miteinander verglichenen AS-Sequenzen ist in der folgenden Tabelle 39 dargestellt. Sie wurden durch von ExPASy (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) ermittelt.

Organismus	Protein	AS	MG (kDa)	Theoretischer pI	Instabilitätsindex
<i>S. domuncula</i>	SD_TNFR-like	390	44,426	9,32	41.14; unstabil
<i>S. purpuratus</i>	hypoth. MGC78788	250	28,595	5,04	41.91; unstabil
<i>B. floridae</i>	BRAFLDRAFT_80159	1306	146,591	6,02	42.68; unstabil
<i>C. familiaris</i>	TNFR6 precursor	571	63,376	9,93	57.76; unstabil
<i>S. purpuratus</i>	Polyubiquitin	200	22,141	6,81	37.83; stabil

Tabelle 39: Charakteristika der in Abbildung 13 miteinander alignierten Proteine der angegebenen Organismen.

Die Werte zeigen, dass alle Proteine, bis auf eines dem Instabilitätsindex nach unstabil sind. Die theoretischen pI variieren innerhalb der Proteine im Alignment, wobei der der SD_TNFR-like Sequenz relativ hoch liegt. Mit einer Länge von 390 AS liegt das SD_TNFR-like im mittleren Bereich. Der Vergleich der MG-Werte zeigt, dass der SD_TNFR-like aus *S. domuncula* ein mittleres Molekulargewicht aufweist. Um Ähnlichkeiten der translatierten Aminosäuresequenzen von *S. domuncula* und *S. purpuratus* zu verifizieren, wurde ein Alignment der Sequenz des MGC78788 Proteins aus *S. purpuratus* angefertigt, da dadurch konservierte Sequenzbereiche besser lokalisiert werden können. Es wurde auf Basis der Substitutionsmatrize BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff, 1993) angefertigt. Wie in Abbildung 14 dargestellt, ist die translatierte Sequenz des SD_TNFR-like zu 15,9% mit der aus *S. purpuratus* identisch, wobei eine AS-Sequenzähnlichkeit von 29,7% vorliegt.

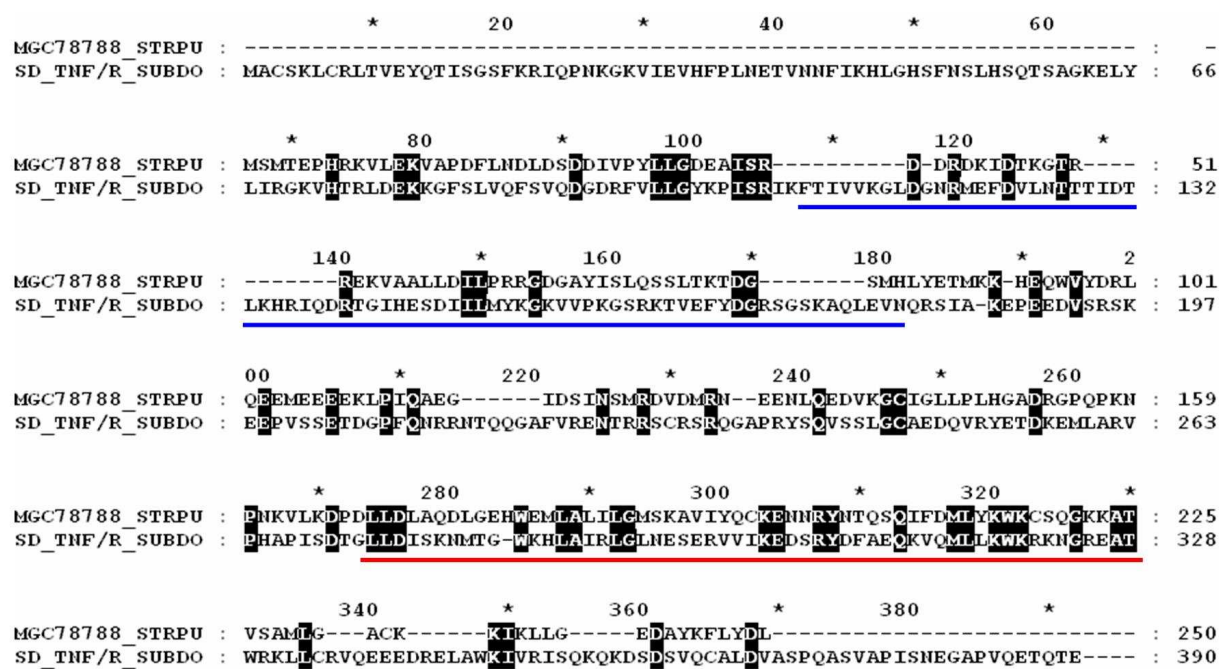


Abbildung 14: Das Alignment der SD_TNFR-like Sequenz aus *S. domuncula* mit der MGC78788 Proteinsequenz aus *S. purpuratus* zur genaueren Darstellung der Sequenzhomologien. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt und mit einem * gekennzeichnet, die ähnlichen Aminosäuren sind hell hinterlegt und mit einem : gekennzeichnet. Die in beiden Sequenzen enthaltene „Death Domäne“ ist rot unterstrichen, die UBIQUITIN Domäne des SD_TNFR-like blau.

Da bis jetzt nur eine weitere Gensequenz mit einer UBIQUITIN und einer „Death“ Domäne bekannt ist (*Caenorhabditis elegans*, zwei unterschiedlich lange Sequenzen, *Acc. No.* NP_871663,

bzw. NP_498714.1), waren in einem Alignment mit Sequenzen anderer Organismen nur wenige identische Bereiche zu finden. Um die Ähnlichkeiten der translatierten SD_TNFR-like Aminosäuresequenz mit Sequenzen anderer Organismen noch besser darstellen zu können, wurden deshalb zwei weitere Alignments nur mit den Aminosäuresequenzen der SD_TNFR-like Domänen angefertigt. Auf diese Weise konnten homologe Sequenzbereiche besser lokalisiert werden. Auch dieses Alignment erfolgte auf Basis der Substitutionsmatrize BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff 1993). Wie in der folgenden Abbildung 15 dargestellt, ist die translatierte Sequenz der UBQ Domäne des SD_TNFR-like Gens zu 32% mit der UBQ Domäne aus *S. purpuratus* identisch, wobei eine AS-Sequenzähnlichkeit von 52% vorliegt.

```

                *           20           *           40           *           60           *
UBQ_TETHH : ---FVKTLGSGQT IKLDYDS SDTIDNINIKNKIYDIEGTPPDQQRLLIFPGKILENG--YTLSDYNIQNGSTIHLVLI-- : 68
UBQ_ORYSA : ---FVKTLGKKTITLEVESDITIDNVKAKIQDKEGTPPDQQRLLIFAGKQLEDG--RTLADYNIQKESTLHLVLI-- : 69
UBQ_ARATH : ---KVKTLGKKEIEITIEPTDITIDRDKERVEEKEGTPPVQQRLLIYAGKQLADD--KTAKDYNIIEGGSVLHLVLI-- : 68
UBQ_STRPU : ---VRNIEGKSLSFYVRLSDTVDALKQQVADKSGDPAVQRLIYQKQLEGS--TILEKYDIEKGSNIQL---- : 65
UBQ_SUBDO : FTIVVKGIDGNRMEFVLLHTTTITIDTKHRLQDRTGTHESDILIMYKGVVPKESRRTIVVEFYDGRSLSKAQLEVNQ : 75

```

Abbildung 15: Alignment der UBQ Domänen (Ubiquitin homologe) Sequenzen aus *Suberites domuncula*, *Strongylocentrotus purpuratus* (similar to polyubiquitin, Acc. No. XP_783170.1), *Tetrahymena thermophila* (Ubiquitin family protein, Acc. No. XP_001008804.1), *Oryza sativa* (polyubiquitin-like, Acc. No. CAD27944.1) und *Arabidopsis thaliana* (A Chain A, Structure Of Ubiquitin-Like Protein, Rub1, Acc. No. 1BT0_A). Die nach der BLOSUM62 Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992) angefertigte Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung von konservierten Aminosäuren (blau = 100 %, gelb = ≥ 80 %, grün = ≥ 60 %). - : eingefügte Lücken zum Maximieren der Sequenzähnlichkeit

In Abbildung 16 ist das Alignment der Sequenzen verschiedener Todesdomänen dargestellt. Es zeigt sich, dass die translatierte Sequenz der Todesdomäne des SD_TNFR-like Gens zu 33% mit einer Todesdomäne aus *Branchiostoma floridae* identisch ist, wobei eine AS-Sequenzähnlichkeit von 50% vorliegt.

```

                *           20           *           40           *           60           *           80
DD_CANFA : IGLAEQMKIKQVREFVRKNGIIEAKIDEIINDNIQDTAEOKVQDLRHYYQVH--GRRGAYHTLIIRGRFAHLRALAERIQETI : 81
DD_BRAFL : GYISQNLPLRSWRPLARKLGLSDTDIEVIEHDFILDAREOKYQQLLRNRRSPAAEEQTVSLLQDALAAVECADLADTLRD-- : 81
DD_ORYCU : PTIAEEMKINEVKEFVRKNGVIEAKIDEIINDNIQDTAEOKVQDLRNHQHLH--GKKDAYNTLIKGLRANICALAEKIQDIV : 81
DD_STRPU : LLLDLAQLGHEWMLALLGMSKAVIYQCENNNYNTQSQIFDLIYKQKCSQ--GKKATVSAMLGACKIILK----- : 70
DD_SUBDO : -LLDISKINMTGWHLAIRLGLNESESRVVTEEDSEYDFAEOKVQQLLKKRKN--GREATWRKLLCRVQEEEDRELAWKIVR-- : 78

```

Abbildung 16: Alignment einiger DD (Death Domänen) verschiedener Organismen. Die verwendeten Sequenzen waren *Suberites domuncula* (SD_TNFR-like), *Strongylocentrotus purpuratus* (similar to MGC78788 protein, Acc. No. XP_785111), *Branchiostoma floridae* (hypothetical protein BRAFLDRAFT_80159, Acc. No. EEA62499), *Oryctolagus cuniculus* (Fas antigen, Acc. No. BAA78428.1) und *Canis familiaris* (similar to Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 precursor (FASL receptor) (Apoptosis-mediating surface antigen FAS) (Apo-1 antigen) (CD95 antigen), Acc. No. XP_543595). Die nach der BLOSUM62 Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992) angefertigte Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung von konservierten Aminosäuren (blau = 100 %, gelb = ≥ 80 %, grün = ≥ 60 %). - : eingefügte Lücken zum Maximieren der Sequenzähnlichkeit

5.2 Die genomische Sequenz des SD_TNFR-like Gens

Um die Intron/Exon-Struktur des SD_TNFR-like Gens aufklären zu können, wurde eine PCR mit genomischer DNA durchgeführt. Daraus erhaltene Sequenzen wurden mittels Vector NTI 10 mit der Ausgangssequenz des SD_TNFR-like Gens aligniert. Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnten vier Introns identifiziert werden, die alle der klassischen GT-AG-Form entsprechen.

Die Genstruktur lässt sich somit wie folgt darstellen:

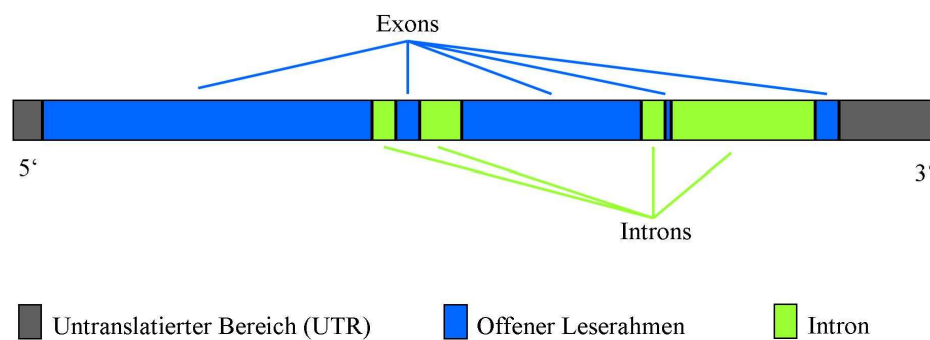


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Genstruktur des *SD_TNFR-like* Gens.

Weiterhin wurde die Aminosäuresequenz auf mögliche posttranslationale Modifikationen überprüft. Dazu wurden Prosite-Analysen durchgeführt, wodurch folgende Sequenzbereiche mit der Möglichkeit für eine posttranslationale Modifikation erkannt wurden:

1. Phosphorylierung eines Threoninrestes durch eine Proteinkinase C (Konsensus: [ST]-x-[RK]; Kishimoto *et al.*, 1985): AS₁₉-AS₂₁, AS₁₃₂-AS₁₃₄, AS₁₆₁-AS₁₆₃, AS₂₂₅-AS₂₂₇, AS₂₂₈-AS₂₃₀, AS₂₅₅-AS₂₅₇, AS₂₉₅-AS₂₉₇; AS₃₂₈-AS₃₃₀, AS₃₅₂-AS₃₅₄.
2. N-Glykosylierung eines Asparaginrestes (Konsensus: N-{P}-[ST]-{P}; Marshall, 1972): AS₃₈-AS₄₁, AS₁₂₆-AS₁₂₉, AS₂₇₉-AS₂₈₂, AS₂₉₃-AS₂₉₆.
3. Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes durch eine Casein Kinase II (Konsensus: [ST]-x(2)-[DE]; Pinna, 1990): AS₇₄-AS₇₇, AS₈₈-AS₉₁, AS₁₂₈-AS₁₃₁, AS₁₉₆-AS₁₉₉, AS₂₀₃-AS₂₀₆, AS₂₅₅-AS₂₅₈, AS₃₀₄-AS₃₀₇, AS₃₈₇-AS₃₉₀.
4. N-Myristoylierung eines Glycinrestes (Konsensus: G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}; Towler *et al.*, 1988): AS₁₁₄-AS₁₁₉, AS₁₄₂-AS₁₄₇, AS₁₆₀-AS₁₆₅, AS₂₉₁-AS₂₉₆.
5. Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes durch eine cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase (Konsensus: [RK](2)-x-[ST]; Fremisco, Glass, Krebs, 1980): AS₁₁₂-AS₁₁₅.

5.3 *Yeast Two Hybrid Analyse mit dem SD_TNFR-like Gen*

Nach Vervollständigung der *SD_TNFR-like* Sequenz wurde ein „*Yeast Two Hybrid Screen*“ durchgeführt, um potentielle Interaktoren des *SD_TNFR-like* Proteins zu identifizieren. Nach Ligation des *SD_TNFR-like* in den pDEST 32-Vektor und Identifizierung eines korrekten Klons über Checking-PCR und Sequenzierung wurde ein „*Library scale*“ Screen durchgeführt. Hierzu wurden das Testplasmid und die „*prey*“ Plasmide in die „*MaV203 Library Scale*“ kompetenten Hefezellen transformiert und diese auf speziellen Platten kultiviert. In diversen

Tests konnte eine positive Interaktion detektiert werden. Als Kontrolle für eine positive Transformation, das heißt, beide Plasmide wurden in eine Hefezelle transformiert, dient das Wachsen der Kolonie auf SC-Leu-Tryp Platten. Abbildung 19 zeigt diese Masterplatte, auf der 8 Kolonien mit dem Testplasmid sowie Negativkontrollen (wt) und eine Kolonie mit einem schwachen Interaktionspartner (m1) als Positivkontrolle ausplattiert wurden.

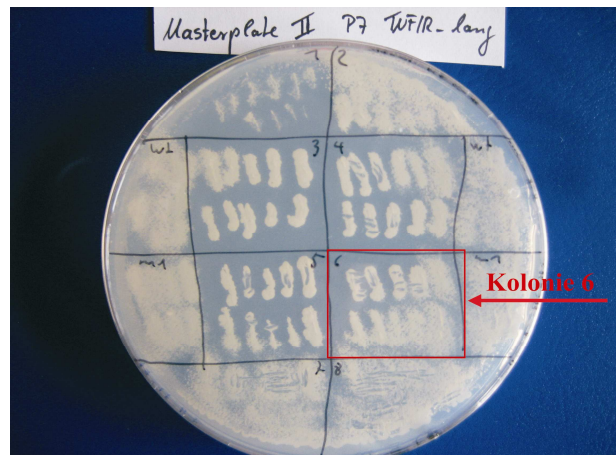


Abbildung 19: Masterplatte des „Yeast TwoHybrid Screens“. 1-8: Testkolonien, m1: leichte Interaktion, wt: Neaktivkontrolle.

Als Test zur Verifizierung der Interaktionen wurde der 5FOA-Test durchgeführt. Hierzu wurde von der Masterplatte auf 5FOA-Platten gestempelt und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Platte „gecleant“ und für weitere 24 Stunden kultiviert. Es war schon vor dem „Cleaning“ deutlich zu erkennen, dass die Kolonien 4 bis 8 nicht, die Kolonie m1 kaum und die Kolonien 1 bis 3 sowie wt stark gewachsen waren. Viel versprechende Kolonien sind diejenigen, die nicht wachsen und daher mögliche Interaktoren enthalten.

Als letzter Test wurde der β -Galaktosidase-Aktivitätstest durchgeführt und die blauen Kolonien in 6 ml SC-Leu-Tryp-Ura-Medium kultiviert und die Plasmide anschließend nach Herstellerangaben mit dem „ChargeSwitch Plasmid Yeast Mini Kit“ isoliert.

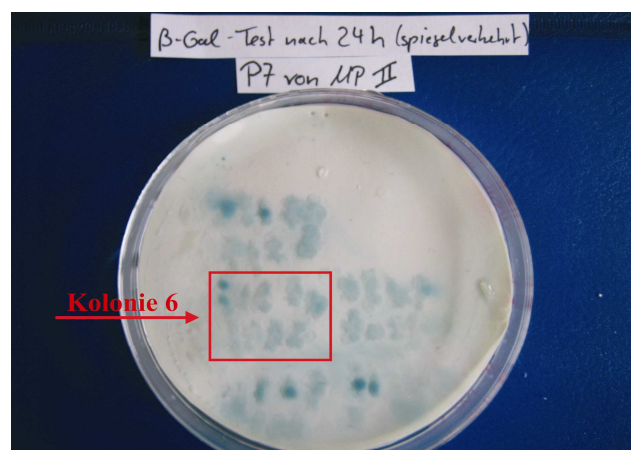


Abbildung 20: Ergebnis des β -Galaktosidase-Aktivitätstests. Anordnung der Kolonien ist spiegelverkehrt zu der in Abb. 19

Nach Transformation in „One Shot® TOP10“ chemisch kompetente *E. coli* Zellen und Selektion auf LB-Amp-Platten zum Selektieren der pDEST 32-Plasmide mit dem Ausgangsgen, wurden Kolonien gepickt, eine Checking-PCR mit pDEST 22-spezifischen Primern durchgeführt und die Kolonien sequenziert. Die Auswertung der Kolonien der Masterplatte II lieferte Interaktoren, die im BLASTP nur Ähnlichkeiten zu hypothetischen oder uncharakterisierten Proteinen zeigten. Kolonie 6 wies im SMART Ähnlichkeit zu der Domäne des antimikrobiellen Peptids Brevinin auf und wurde weiter untersucht.

5.4 Identifizierung und Charakterisierung des SD_Brevinin-like Klons aus *Suberites domuncula*

5.4.1 Identifizierung des Komplettklons des SD_Brevinin-like Klons

Nachdem die komplette Nukleotid-Sequenz des SD_Brevinin-like Klons vorlag, wurden zwei genspezifische Primer erstellt, mit denen die komplette Sequenz aus der cDNA amplifiziert wurde. Die Auswertung der Sequenzierung mit Hilfe des Programms Vector NTI Advance 10 ergab eine vollständige Nukleotidsequenz des SD_Brevinin-like Gens.

5.4.2 Analyse der Sequenz des SD_Brevinin-like Proteins

Die Gesamtlänge der SD_Brevinin-like Sequenz beträgt 474 bp und umfasst einen offenen Leserahmen von 327 bp, der für ein potenzielles Protein von 109 AS kodiert. Am 3'-Ende befindet sich ein untranslatierter Bereich von 146 bp. Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

```

                                                    GCGGGATTCCAGC
1  M  K  I  A  I  F  V  L  A  F  I  A  V  T  A  S  V  A  Y  A  A  P  Q  G  E  25
TAGCATGAAGATTGCTATCTTTGTCCTGGCATTTCATTGCTGTACAGCCAGTGTGGCATATGCAGCTCCACAAGGAGAA  75

26  E  T  D  V  E  E  A  D  I  E  E  A  D  I  Q  T  L  L  K  R  I  M  K  E  K  50
76  GAGACTGATGTCGAAGAGGCTGATATTGAAGAAGCTGATATCCAGACACTCCTCAAGAGAATCATGAAAGAAAAA  150

51  L  A  E  Q  Q  D  H  N  D  D  D  E  N  Q  A  Q  V  Q  S  L  L  A  E  L  E  75
151 CTAGCAGAACAACAAGATCACAATGACGACGATGAGAACCAGGCTCAAGTCCAGTCTCTGCTTGAATTGGAA  225

76  E  Y  E  K  A  L  T  D  T  K  A  E  K  Q  K  Y  H  P  I  R  P  Y  P  T  W  100
226 GAGTACGAAAAAGCTTTAACTGATACCAAAGCTGAAAAACAGAAATATCATCCCATTCGTCCTTACCCACATGG  300

101 G  R  R  R  T  R  R  W  G  *  109
301 GGTTCGTCGTCGTACACGTCGCTGGGGCTGATGTCCTTTGAGGATTGGACTGACTCTGTAGTTGTAGTTGTCTTTG  375
376 CATTGCATGATGCAGTGAATTAATTTGTATATATATCGATTTCATTCAAATGGAAAAAATGTCAGTGAAGGATCAT  450
451 G (A) n

```

Abbildung 21: Basen- und abgeleitete AS-Sequenz des SD_Brevinin-like Gens, mit Hilfe von DNAsis 2.5 erstellt. Untranslatierter Bereich am 3'-Ende der Sequenz ist blau, translatierte Bereiche schwarz dargestellt. Rot markiert sind Start- und Stop-Codon der Sequenz. Die für die Überprüfung des Komplettklons verwendeten Primer sind unterstrichen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des SD_Brevinin-like Gens umfasst 109 AS mit einem

errechneten Molekulargewicht von 12,603 kDa und einen theoretischen pI von 4,85. *In vivo* spielen N-terminale AS eines Proteins eine besondere Rolle bei dessen Stabilität, da sie für den ubiquitin-markierten proteolytischen Abbau von Bedeutung sind (Gonda *et al.*, 1989; Tobias *et al.*, 1991). Demnach bedeutet ein errechneter Instabilitätsindex von 60,96 für das SD_Brevinin-like eine Zuordnung zu den instabilen Proteinen (Guruprasad *et al.*, 1990), für das nach Bachmair *et al.* (1986) eine geschätzte Halbwertszeit (*in vitro*) von ca. 30 Stunden errechnet wurde. Ein Vergleich zwischen der SD_Brevinin-like-Proteinsequenz und anderen Proteinen aus Datenbanken (Pfam) ergab hinsichtlich konservierter Domänen Ähnlichkeit zur Brevinin-Domäne (Pfam *Acc. No.* PF03032; E-Wert=3.9, AS₁₋₄₅), einer Gruppe von antimikrobiellen Proteinen. Des Weiteren enthält die Sequenz ein Signalpeptid (AS₁-AS₂₀).

5.4.3 Analyse der abgeleiteten AS-Sequenz des SD_Brevinin-like aus *S. domuncula*

Die Analyse der Sequenzhomologie des SD_Brevinin-like zu ähnlichen Proteinen anderer Organismen gestaltete sich sehr schwierig, da es in den verschiedenen Gruppen von AMP viele gibt, die in ihrer AS-Sequenz stark variieren. Besonders Mitglieder der α -helikalen AMP (s. 1.2.4) sind untereinander sehr heterolog. Folgende Abbildung zeigt ein Alignment verschiedener AS-Sequenzen von diversen antimikrobiellen Peptiden sowie deren Vorstufen.

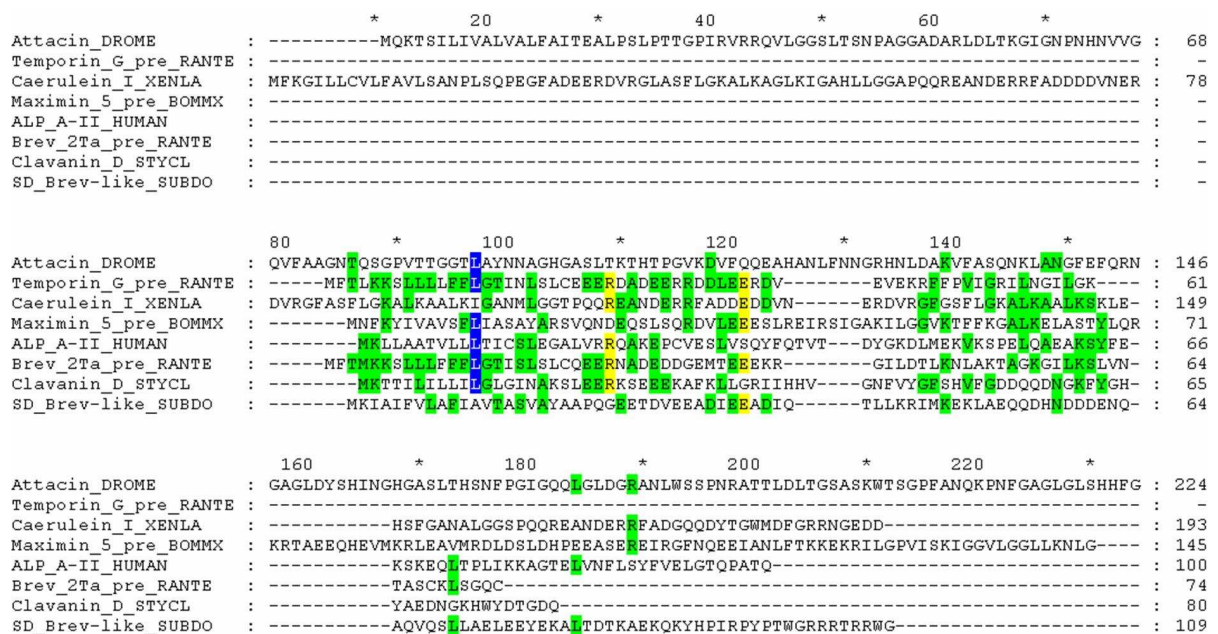


Abbildung 22: Das Multi-Alignment abgeleiteter AS-Sequenzen des SD_Brevinin-like und AMP anderer Organismen wurde mit ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt und mit Genedoc 2.6 bearbeitet. Folgende andere Sequenzen wurden verwendet: *Drosophila melanogaster* (Attacin, *Acc. No.* CAA86995), *Xenopus laevis* (Caerulein type I, *Acc. No.* AAA49688), *Rana temporaria* (Brevinin-2Ta precursor, *Acc. No.* P82268), *Rana temporaria* (Temporin G precursor, *Acc. No.* CAA70564), *Bombina maxima* (Maximin 5 precursor, *Acc. No.* AF378908), *Homo sapiens* (Apolipoprotein A-II, *Acc. No.* CAH72151) und *Styela clava* (Clavanin D protein, *Acc. No.* CAA71426). Die nach der BLOSUM62 Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992) angefertigte Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung von konservierten Aminosäuren (blau = 80 %, gelb = ≥ 60 %, grün = ≥ 40 %). - : eingefügte Lücken zum Maximieren der Sequenzähnlichkeit.

Die Aminosäure-Sequenzen entstammen unterschiedlicher Organismen und wurden der BLASTP der Datenbank (NCBI) entnommen. Die höchste Homologie im Vergleich der Proteinsequenzen ergab sich zu der Clavanin_D Protein Sequenz aus *Styela clava* (Acc. No. CAA71426), einer Falten-Seescheide.

Eine Übersicht über die Charakteristika der im Alignment (s. Abb.22) verglichenen Aminosäure-Sequenzen ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Sie wurden durch das Programm ProtParam von ExPASy (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) ermittelt.

Organismus	Protein	AS	MG (kDa)	Theoretischer pI	Instabilitäts-index
<i>S. domuncula</i>	SD_Brevinin-like	109	12,604	4,85	60,96; unstabil
<i>D. melanogaster</i>	Attacin	224	23,239	9,99	21,42; stabil
<i>X. laevis</i>	Caerulein type I	193	21,105	5,12	29,05; stabil
<i>R. esculenta</i>	Esculentin 1b precursor	84	9,133	8,86	16,40; stabil
<i>R. temporaria</i>	Temporin G precursor	61	7,171	4,73	49,15; unstabil
<i>B. maxima</i>	Maximin 5 precursor	145	16,337	7,94	54,27; unstabil
<i>H. sapiens</i>	Apolipoprotein A-II	100	11,175	6,27	27,23; stabil
<i>S. clava</i>	Clavanin D	80	9,155	5,89	35,73; stabil

Tabelle 40: Charakteristika der in Abbildung 22 miteinander alignten Proteine der angegebenen Organismen.

Die Tabelle zeigt, dass einige Proteine dem Instabilitätsindex nach stabil, andere hingegen unstabil sind. Die theoretischen pI variieren innerhalb der Proteine des Alignments, wobei der der Sequenz aus *S. domuncula* der niedrigste ist. Mit einer Länge von 109 Aminosäuren liegt das SD_Brevinin-like Protein im mittleren Bereich. Der Vergleich der MG-Werte zeigt, dass das SD_Brevinin-like aus *S. domuncula* ein mittleres Molekulargewicht aufweist.

Um die Ähnlichkeiten der translatierten Aminosäuresequenzen von *Suberites domuncula* und *Styela clava* zu verifizieren, wurde ein Alignment mit der Aminosäuresequenz des Clavanin D Proteins aus *S. clava* angefertigt, da hierdurch konservierte Sequenzbereiche besser lokalisiert werden können. Das Alignment wurde auf Basis der Substitutionsmatrize BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff, 1993) angefertigt. Wie in Abbildung 23 dargestellt, ist die translatierte Sequenz des SD_Brevinin-like Gens zu 16% mit der aus *S. clava* identisch, wobei eine Aminosäure-Sequenzähnlichkeit von 26% vorliegt.

```

Clavanin-D_STYCL : MKTTTLTLLILGLGIN-----AKSLERKSEEEKAFKLLGRILHHVGNFVYGFSHV : 51
SD_Brev-like_SUBDO : MKIATFVLAFAIVTASVAYAAPQGEETDVEEADIEEADIQTLIKRIMKEKLAEQQ--DHN : 58

Clavanin-D_STYCL : FGDDQDNGKFGHYAEDNGKHWDYDGDQ----- : 80
SD_Brev-like_SUBDO : DDDENQAQVQSLLAELEEYKALTDTKAEKQKYHPIRPYPTWGRRRTRRWG : 109

```

Abbildung 23: Das Alignment der SD_Brevinin-like Sequenz aus *S. domuncula* mit der Clavanin D Sequenz aus *S. clava* zur genaueren Darstellung der Sequenzhomologien. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt und mit einem * gekennzeichnet, die ähnlichen Aminosäuren sind hell hinterlegt und mit einem : gekennzeichnet.

Da die Homologie der SD_Brevinin-like Sequenz zu anderen antimikrobiellen Peptiden sehr gering war, sollte untersucht werden, ob das Protein der Gruppe der α -helikalen antimikrobiellen Peptide zugeordnet werden kann. Dafür wurde die Sekundärstruktur des SD_Brevinin-like mit Hilfe des JPred 3 Programmes auf α -helikale Strukturen hin untersucht.

```

MKIAIFVLAFIAVTASVAYAAPQGEETDVEEADIEEADIQTLLKRIMKEKLAEQQDHND DENQAQVQSLLAELE
--HHHHHHHHHHHHHHHHEE-----HHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHH-HH

EYEKALTDTKAEKQKYHPYPTWGRRRTRRWG
HHHHHHH-----

```

Abbildung 24: Sekundärstruktur des SD_Brevinin-like Proteins. H: Helixstrukturen, E: erweiterte Strukturen.

Wie aus der Abbildung 24 hervorgeht, weist das SD_Brevinin-like Protein vier helikale Strukturen auf, was ein eindeutiger Hinweis darauf ist, dass es der Gruppe der α -helikalen antimikrobiellen Peptide zugeordnet werden kann. Dies wird ebenfalls durch Prosite-Analysen bestärkt. Dabei wurden mehrere Sequenzbereiche erkannt, die eine Möglichkeit für eine posttranslationale Modifikation bieten, unter anderem eine Amidierung, die für Peptide der α -helikalen Gruppe typisch ist:

1. Amidierung, bevorzugt an neutralen, hydrophoben Aminosäuren (Konsensus: x-G-[RK]-[RK], wobei x die eigentliche Amidierungsstelle ist; Kreil, 1984): AS₁₀₀-AS₁₀₃.
2. Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes durch eine Casein Kinase II (Konsensus: [ST]-x(2)-[DE]; und AS₈₄-AS₈₇; Pinna, 1990): AS₂₇-AS₃₀.
3. Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes durch eine cAMP und cGMP-abhängige Proteinkinase (Konsensus: [RK](2)-x-[ST]; Fremisco, Glass, Krebs, 1980): AS₁₀₂-AS₁₀₅.
4. Phosphorylierung eines Threoninrestes durch eine Proteinkinase C (Konsensus: [ST]-x-[RK]; Kishimoto et al., 1985): AS₁₀₅ - AS₁₀₇.

5.5 Die genomische Sequenz des SD_Brevinin-like Gens

Um die Intron/Exon-Struktur des *SD_Brevinin-like* Gens aufklären zu können, wurde eine PCR mit genomischer DNA durchgeführt. Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von Vector NTI 10 mit der Ausgangssequenz des *SD_Brevinin-like* Gens aligniert. Es konnten dabei keine Introns identifiziert werden.

5.6 Prüfung möglicher Induktionsmechanismen

5.6.1 Inkubationsexperimente mit potentiellen Induktoren des *SD_TNFR-like* Gens und Nachweis der mRNA-Transkripte mittels Northern-Transfer

Die Tumor-Nekrose-Faktoren und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehrreaktion auf diverse äußere Einflüsse, zu denen auch mikrobielle Bedrohungen zählen. Ihre Aktivierung resultiert in verschiedensten Reaktionen, wie Induktion von Apoptose zur Beseitigung von infizierten oder geschädigten Zellen, aber auch Proliferation, Differenzierung und das Überleben des Organismus. Um zu überprüfen, ob die Transkriptionsrate des *SD_TNFR-like* Gens durch Induktoren erhöht werden kann, wurden Stücke eines Schwammindividuums mit verschiedenen möglichen Induktoren (LPS, PAM, Hefe; 50 µg/ml) für 4, 6, 8 und 24 Stunden inkubiert (s. 4.7) und die RNA isoliert (s. 4.8). In einem anschließenden Northern Blot konnte die Transkriptionsrate über genspezifischen Sonden auf Röntgenfilm visualisiert werden (s. 4.15).



Abbildung 25: Northern Blot-Analyse der differentiellen Expression des *SD_TNFR-like* Gens auf mRNA-Ebene nach Inkubation mit potentiellen Induktoren. Ein adultes Exemplar von *S. domuncula* wurde zerteilt, 4 h, 8 h, oder 24 h mit LPS inkubiert und die RNA extrahiert. Spur 1 enthält RNA einer Kontrolle ohne vorherige Inkubation, Spur 2 RNA nach 4 h, Spur 3 RNA nach 8 h und Spur 4 RNA nach 24 h Inkubation. Je 5 µg der entsprechenden RNA wurden für die Analyse verwendet. SD Tub wurde als Kontrolle verwendet.

Das Experiment zeigt, dass das Transkriptionsniveau des *SD_TNFR-like* schon ohne Inkubation recht hoch war. Während einer Inkubation mit LPS (s. Abb.25) wurde die Transkription anfangs nicht wesentlich erhöht. Erst nach Inkubation über 24 Stunden stieg die Expressionsrate leicht an. Sowohl bei der Inkubation mit PAM, als auch mit Hefe konnte kein signifikanter Anstieg der Expression beobachtet werden (Bilder hier nicht gezeigt).

5.6.2 Inkubationsexperimente mit potentiellen Induktoren des *SD_Brevinin-like* Gens und Nachweis der mRNA-Transkripte mittels Northern-Transfer

Um die Rolle des potentiellen antimikrobiellen Proteins *SD_Brevinin-like* besser charakterisieren zu können, wurde das Transkriptionslevel dieses Gens ebenfalls über eine Northern Blot-Analyse untersucht. Dadurch sollte gezeigt werden, welche Substanzen eine Hochregulierung des Gens auslösen und welche nicht, das heißt auf welche Bedrohung der Schwammorganismus mit Hilfe dieses Proteins reagiert. Hierzu wurde die RNA aus dem

Inkubationsversuch 4.7 eingesetzt und die Transkriptionsrate in einem anschließenden Northern-Transfer mit genspezifischen Sonden detektiert.

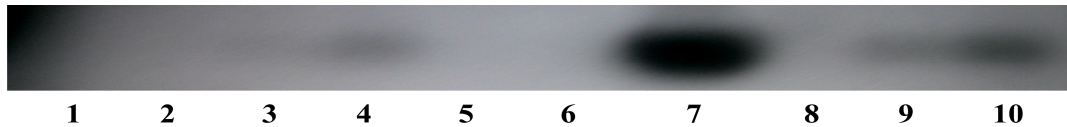


Abbildung 26: Northern Blot-Analyse der differentiellen Expression des *SD_Brevinin-like* Gens auf mRNA-Ebene nach Inkubation mit potentiellen Induktoren. Ein adultes Exemplar von *S. domuncula* wurde zerteilt, 4 h, 6 h, oder 24 h entweder mit LPS, PAM oder Hefe inkubiert und die RNA extrahiert. Spur 1 enthält RNA einer Kontrolle ohne Inkubation, Spuren 2-4 wurden mit LPS inkubiert, 2: RNA nach 4 h, 3: RNA nach 6 h und 4 RNA nach 24 h Inkubation. Spuren 5-7 wurden mit PAM inkubiert, 5: RNA nach 4 h, 6 RNA nach 6 h und 7 RNA nach 24 h. Spuren 8-10 wurden mit Hefe inkubiert, 8: RNA nach 4 h, 9 RNA nach 6 h und 10 RNA nach 24 h. Jeweils 5 µg der entsprechenden RNA wurden für die Analyse verwendet.

Das Ergebnis des Northern Blots zeigt eindeutig, dass die Transkription des *SD_Brevinin-like* Gens durch alle drei Induktoren hochreguliert wurde. Besonders stark erfolgte dies nach der Inkubation mit PAM über 24 Stunden. Auch nach Inkubation mit Hefe zeigte sich eine deutliche Hochregulierung der Transkriptionsrate des *SD_Brevinin-like*, wohingegen LPS nur einen eher geringen Einfluss auf die Transkriptionsrate zeigte.

5.7 Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*

5.7.1 Expression des *SD_TNFR-like* Proteins

Die Expression des rekombinanten Proteins diente zur Produktion des funktionellen Produkts für Aktivitätstests und zur Produktion polyklonaler Antikörper für immunohistochemische *in situ* Analysen. Hierfür wurde der kodierende Bereich des *SD_TNFR-like* mit genspezifischen Primern (s. 4.1.1) aus der *S. domuncula* cDNA-Bank amplifiziert (s. 4.2.1) und in den Expressionsvektor pTrcHis2-TOPO kloniert (s. 4.16.2). Die daraus resultierenden Plasmide wurden in verschiedene Bakterienstämme transformiert und anschließend als 6-His Fusionsprotein exprimiert (s. 4.1.3). Die Expression in *Rosetta*TM(DE3) Zellen lieferte hierbei die größte Proteinmenge. Die Expression des rekombinanten *SD_TNFR-like* Proteins wurde im SDS-Gel detektiert und im Western Blot mittels anti-His-Antikörper überprüft (s. 4.17). Abbildung 27 zeigt das SDS-Gel der *SD_TNFR-like* Pilotexpression mit Proben von 1 bis 4 Stunden und einen Western Blot mit Proben von 1 bis 5 Stunden.

Nach einer Induktionszeit von 1 bis 5 Stunden zeigte sich eine deutliche Überexpression in Form einer starken Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Dieses Molekulargewicht entspricht dem berechneten Gewicht des *SD_TNFR-like* Proteins von 44,4 kDa plus 3,6 kDa des angefügten His-Tags.

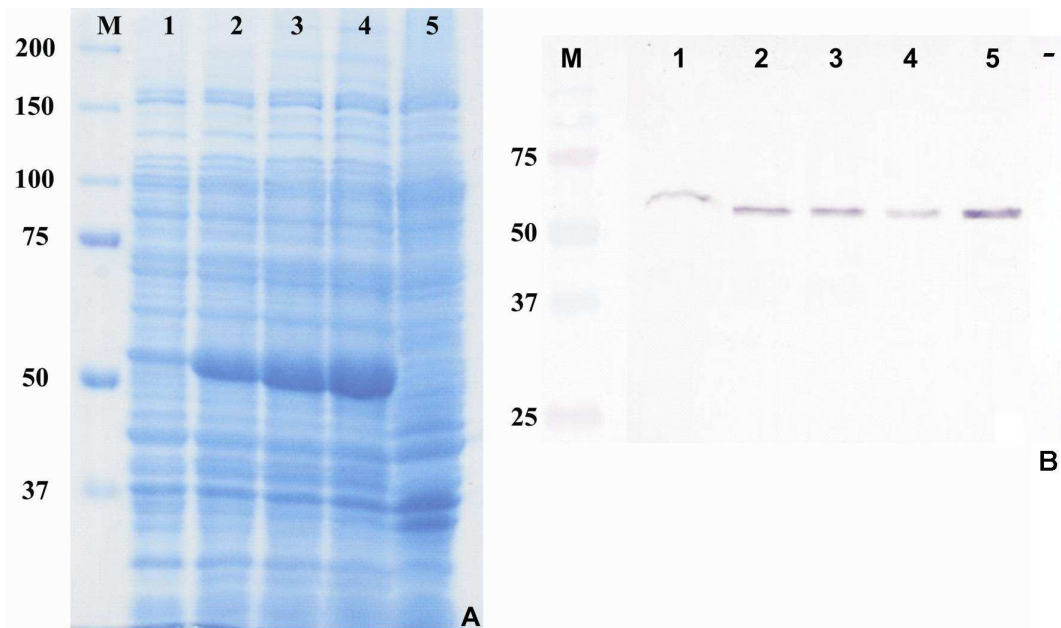


Abbildung 27: A) SDS-Gel zur Darstellung der Expression des rekombinant hergestellten Proteins SD_TNFR-like. Dargestellt sind die aus *E. coli* Expressionskulturen gewonnenen Proben; von links nach rechts: M = Marker: Protein Standard Dual Color, 1 = 1 h, 2 = 2 h, 3 = 3 h, 4 = 4 h und 5 = Negativkontrolle. Das Gel wurde mit Comassie Färbelösung angefärbt. B) Western-Blot der SD_TNFR-like Expression, von links nach rechts aufsteigend von 1 h bis 5 h (Spur 1-5). - ist die Negativkontrolle. Detektion mit Primärantikörper Anti-His, Sekundärantikörper Anti-Mouse mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase.

Nach dem Western Blot zur Verifizierung der Expression des rekombinanten SD_TNFR-like Proteins wurde mit den bereits in einem SDS-Gel getesteten Kulturen eine 1 Liter Bakterienkultur angesetzt, um eine ausreichend große Menge an Protein produzieren zu können. Die Kultur wurde bis zu einem OD_{600} von ca. 0,5 bis 07 kultiviert, anschließend mit IPTG induziert und für ca. 4 bis 5 Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Die exprimierten rekombinanten Proteine wurden anschließend unter denaturierenden Bedingungen über Ni-NTA aufgereinigt (s. 4.18.2), da das Protein fast ausschließlich in unlöslicher Form als „*inclusion bodies*“ gespeichert wurde. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel getestet. Da das Gel zeigte, dass das Eluat E noch zu viele andere Proteine enthielt, wurde es nochmals mit Ni-NTA inkubiert und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.

Das exprimierte SD_TNFR-like Protein, das im Eluat 2 enthalten war, wurde mittels Bradford Assay (s. 4.19) quantifiziert und konnte anschließend zur Antikörperproduktion (s. 4.20) verwendet werden, da dafür kein natives Protein benötigt wird. Die Proteinkonzentration betrug 175 µg/ml.

Die Abbildung 28 zeigt ein SDS-Gel des zweifach aufgereinigten rekombinanten SD_TNFR-like Proteins.

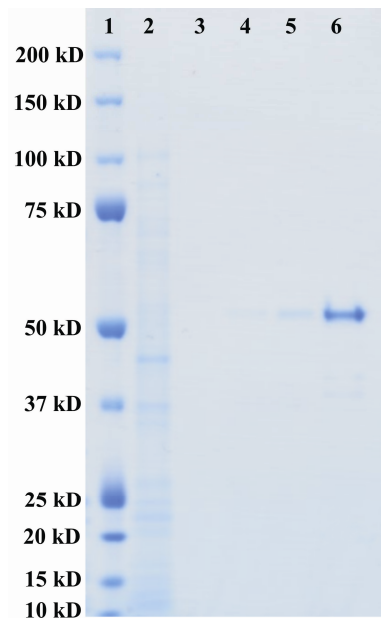


Abbildung 28: SDS-Gel der Expression des SD_TNFR-like nach erneuter Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen. 1: Marker: Protein Standard Dual Color, 2: Durchfluss, 3: Waschfraktion 1, 4: Waschfraktion 2, 5: Eluat 1 und 6: Eluat 2.

Um das Protein in großen Mengen produzieren und nativ aufzureinigen zu können, wurde in einem 2-Liter-Erlenmeyerkolben eine 1-Liter-Bakterienkultur (von der vorher in SDS-Gel und Western-Blot getesteten Kultur) angesetzt, bei einem OD_{600} von 0,5 bis 0,7 mit IPTG induziert und über eine Woche bis 10 Tagen bei 4 °C unter ständigem Schütteln im Kühlraum kultiviert. Dadurch kann verhindert werden, dass Proteine in „*inclusion bodies*“ eingelagert werden, die Löslichkeit der Proteine wird erhöht. Anschließend wurden die Proteine nach Herstellerprotokoll mit Ni-NTA unter nativen Bedingungen aufgereinigt.

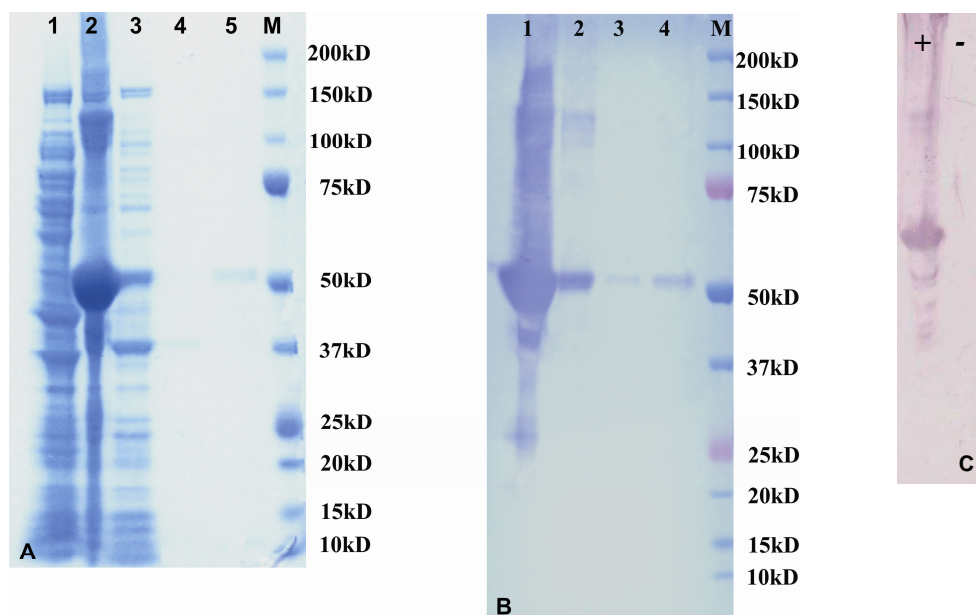


Abbildung 29: A) SDS-PAGE des nativ aufgereinigten SD_TNFR-like Proteins. Spur 1: BugBuster Überstand, 2: *E. coli* Lysat, 3: Durchfluss, 4: Waschfraktion, 5: Eluat und Marker: Protein Standard Dual Color B) Western Blot des SD_TNFR-like mit dem proteinspezifischen Antikörper. Spur 1: Expression nach 8 Tagen bei 4 °C, 2: Durchfluss, 3: Waschfraktion, 4: Eluat und Marker M: Protein Standard Dual Color. C) Test des spezifischen Antikörpers: +: Expression nach 8 Tagen bei 4°C, -: Präimmunserum. Detektion mit Sekundärintikörper Anti-Rabbit mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase.

Abbildung 29 zeigt ein SDS-Gel des nativ aufgereinigten SD_TNFR-like und einen Western Blot mit spezifischem anti-SD_TNFR-like Antikörper, der garantiert, dass das korrekte Protein isoliert wurde.

5.7.2 Expression des SD_Brevinin-like Proteins

Die Expression des rekombinanten Proteins diente zur Produktion des funktionellen Produkts für Aktivitätstests und Produktion von polyklonalen Antikörpern für immunohistochemische *in situ* Analysen. Der kodierende Bereich des SD_Brevinin-like wurde mit genspezifischen Primern (s. 4.1.1) aus der *S. domuncula* cDNA-Bank amplifiziert (s. 4.2.1) und in den Expressionsvektor pBAD/gIII A kloniert (s. 4.16.2). Daraus resultierende Plasmide wurden in Bakterien transformiert und als 6-His Fusionsprotein mit Induktion durch L-Arabinose exprimiert (s. 4.16.5). Es wurden verschiedene Bakterienstämme getestet und dabei festgestellt, dass in keinem System eine Überexpression des Proteins erreicht werden konnte. Allerdings konnte die Expression des rekombinanten SD_Brevinin-like Proteins im Western Blot mittels anti-Myc-Antikörper detektiert werden. Abbildung 30 zeigt den Western Blot der SD_Brevinin-like Pilotexpression mit Proben nach 30 Minuten bis 2 Stunden.

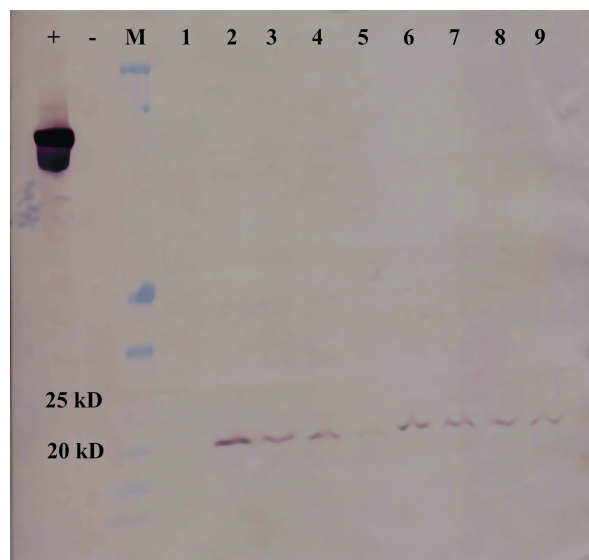


Abbildung 30: Western Blot der SD_Brevinin-like Expression. Es wurden folgende Proben aufgetragen: + : Positivkontrolle, - : Negativkontrolle, M : Marker: Protein Standard Dual Color (Biorad), Spur 1: Kolonie 1 nach 0 h Induktion, Spur 2: Kolonie 1 nach 30 min , Spur 3: Kolonie 1 nach 1 h, Spur 4: Kolonie 1 nach 1 ½ h, Spur 5: Kolonie 2 nach 0 h Induktion, Spur 6: Kolonie 2 nach 30 min, Spur 7: Kolonie 2 nach 1 h, Spur8: Kolonie 2 nach 1 ½ h und Spur 9: Kolonie 2 nach 2 h. Detektion mit Primärantikörper Anti-His, Sekundärantikörper Anti-Mouse mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase.

Es zeigte sich eine Expression in Form von Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Dieses Molekulargewicht entspricht dem berechneten Gewicht des SD_Brevinin-like Proteins von 12,7 kDa plus 6,8 kDa des angefügten Vektorstücks mit His-Tag. Es konnte

festgestellt werden, dass die Expression bereits nach einer Stunde wieder abnahm, was darauf zurück zu führen sein kann, dass das Protein toxisch auf die *E. coli* Zellen wirkt. Nach einem Western Blot zur Verifizierung der Expression des rekombinanten SD_Brevinin-like Proteins über 2 Stunden wurde mit der getesteten Kultur eine 1-Liter-Bakterienkultur angesetzt, um eine ausreichend große Menge an Protein produzieren zu können. Die Aufreinigung des Proteins gelang allerdings nie. Das His-Tag konnte im Western Blot auch nicht detektiert werden, was damit zu erklären sein könnte, dass sich das Protein so einfaltet, dass das His-Tag nach innen zu liegen kommt und der Antikörper bzw. das Ni-NTA nicht binden kann. So war es auch nicht möglich, einen polyklonalen Antikörper zu produzieren. Die Zellen wurden nach der Expression also nur in BugBuster und nativem Lysispuffer lysiert, die Zellreste abzentrifugiert und der Proteinextrakt direkt für die antimikrobiellen Tests verwendet.

5.8 Expression des SD TNFR-like Proteins in *S. domuncula*

Um zu verifizieren, dass das SD_TNFR-like Protein auch *in vivo* im Organismus exprimiert wird, und um zu überprüfen, ob die Expressionsrate durch Induktoren erhöht werden kann, wurde ein Dot Blot durchgeführt (s. 4.17.1). Dazu wurden Schwammextrakte aus mit LPS und humanem TNF-alpha inkubierten Stücken eines Individuums von *S. domuncula* hergestellt, indem das Gewebe in nativem Lysispuffer mit dem Precyllys 24 zerkleinert wurde. Zellreste wurden abzentrifugiert und anschließend die Proteinmengen bestimmt. Die Schwammextrakte wurden so auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen, dass sie gleiche Mengen an Proteinen enthielten, und der Dot-Blot mit dem SD_TNFR-like spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse dieser Dot-Blots.

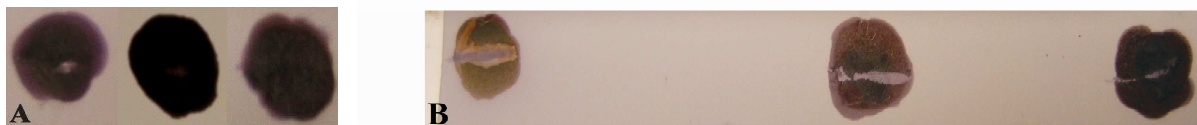


Abbildung 31: A) Dot Blot nach Inkubation von *S. domuncula* Gewebe mit LPS. Von links nach rechts: Negativkontrolle, nach 8 h und nach 24 h Inkubation. B) Dot Blot nach Inkubation von *S. domuncula* Gewebe mit humanem TNF-alpha. Von links nach rechts: Negativkontrolle, nach 1 h und nach 3 h Inkubation. Detektion mit Primärantikörper Anti-His, Sekundärantikörper Anti-Rabbit mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase.

Es ist zu erkennen, dass die Expressionsrate des SD_TNFR-like Proteins bei einer Inkubation mit LPS nach 24 Stunden leicht angestiegen ist, danach allerdings wieder abfällt. Auch bei Inkubation mit humanem TNF-alpha kann nach nur wenigen Stunden ein deutlicher Anstieg des Expressionslevels detektiert werden.

5.9 Antimikrobieller Test

Um die Wirksamkeit des SD_Brevinin-like Proteins als antimikrobielles Peptid/Protein zu verifizieren, wurden zwei antimikrobielle Tests durchgeführt. Hierfür wurde der Proteinextrakt verwendet, der aus der Expression in *E. coli* Zellen stammte. Proteine über 50 kDa wurden mit speziellen Filtercaps abzentrifugiert. Als Negativkontrolle diente ein Proteinextrakt, bei dem nur der leere pBAD/gIII A Vektor in die Bakterien eingebracht und die Expression der vektorspezifischen Proteine induziert wurde.

Im ersten Test wurden *E. coli* Bakterien (NovaBlue Singles™ von Novagen) über Nacht in LB-Medium kultiviert und anschließend auf eine LB-Platte ausgestrichen. Nach Auftragen der Proben (1, 5, 25, 50, 500, 5.000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration) auf Filterpapierkreise wurde die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert und das Ergebnis am nächsten Morgen ausgewertet. Es konnte jedoch keine Inhibierung des Bakteriewachstums festgestellt werden.

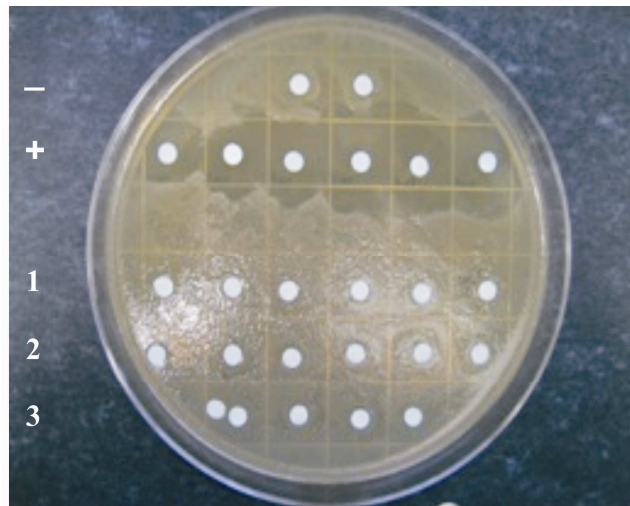


Abbildung 32: Antimikrobieller Test. Wirkung des SD_Brevinin-like Proteins auf *E. coli* Zellen nach einer Inkubation von 24 h Dauer. Aufgetragen wurde als Negativkontrolle (-) Wasser, als Positivkontrolle (+) Ampicilin in verschiedenen Konzentrationen, aufsteigend von links nach rechts, als Proben (1+2) SD_Brevinin-like Proteinextrakte aus verschiedenen Expressionen und als weitere Negativkontrolle (3) der Proteinextrakt der Expression des leeren Vektors.

Als zweiter antimikrobieller Test sollte die Wirkung des SD_Brevinin-like Proteins auf Hefezellen getestet werden. Hierzu wurde 1 µl eines *S. cerevisiae* Stammes („MaV203 kompetente Zellen *Subcloning Scale*“) bei 30 °C über Nacht in etwa 5 ml YPAD-Medium kultiviert und am nächsten Tag auf zwei YPAD-Platte ausgestrichen. Nachdem kleine, runde Filterpapierstücke auf die Platten aufgebracht und die Platten leicht abgetrocknet waren, wurden die Testlösungen vorsichtig auf die Papierstücke aufgetropft (50, 500, 5.000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration) und die YPAD-Platten über Nacht bei 30 °C im Brutschrank

inkubiert. Die Abbildung 33 dokumentiert das Ergebnis des antimykotischen Tests am nächsten Morgen.

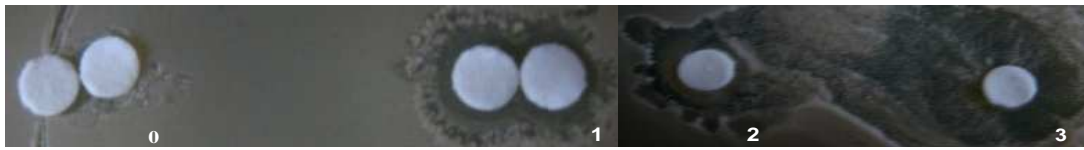


Abbildung 33: Antimykotischer Test. Wirkung des SD_Brevinin-like Proteins auf *S. cerevisiae* Zellen nach einer Inkubation über 24 h. Aufgetragen wurde als Negativkontrolle (0) der Proteinextrakt der Expression des leeren Vektors und als Proben: SD_Brevinin-like Proteinextrakte : 50 µg/ml (1), 500 µg/ml (2) und 5000 µg/ml (3).

Es war deutlich zu erkennen, dass bereits bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml eine Hemmung des Hefewachstums stattfand, die mit höherer Konzentration deutlich anstieg. Die Negativkontrolle hingegen zeigte keine solche Reaktion, was beweist, dass das SD_Brevinin-like Protein den antimykotischen Effekt auslöst.

5.10 Induktion des NF - κ B Wegs in RAW-Blue™ Zellen

RAW-Blue™ Zellen sind eine murine Makrophagen-Zelllinie und dienen zum Nachweis der Beteiligung eines Proteins/Stoffes an der Immunantwort über den NF - κ B Weg. In diesem Versuch wurden RAW-Blue™ Zellen über mehrere Tage kultiviert und der Test, wenn diese dicht genug gewachsen waren, nach Herstellerangaben in einer 96-Well-Platte durchgeführt (s. 4.21). Die zu testenden Proteine waren hierbei das SD_TNFR-like und das SD_Brevinin-like Protein.

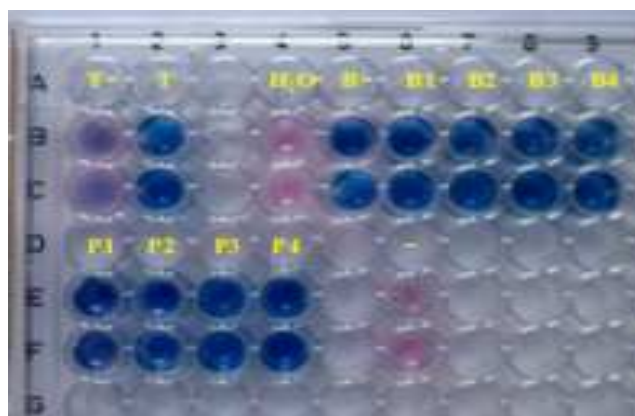


Abbildung 34: Foto des Ergebnisses des RAW-Blue™ Tests nach photometrischer Messung. Untereinander wurden jeweils dieselben Proben aufgetragen. Als Positivkontrollen diente PAM in verschiedenen Konzentrationen: P1 = 0,1 µg/ml, P2 = 1 µg/ml, P3 = 10 µg/ml und P4 = 1000 µg/ml. Es wurden mehrere Negativkontrollen verwendet: T = nativer Elutionspuffer, H₂O, B- = nur der leere pBADgIII A Vektor exprimiert und - = nur Zellen. Die zu testenden Proteine waren: T = SD_TNFR-like in nativem Elutionspuffer, B1 = SD_Brevinin-like pBAD Pellet, B2 = SD_Brevinin-like pBAD BugBuster Fraktion, B3 = SD_Brevinin-like pDEST Pellet und B4 = SD_Brevinin-like pDEST BugBuster Fraktion.

Die photometrische Messung fand nach zwei Stunden Inkubation statt. Das Foto zur Dokumentation wurden erst später gemacht. Dies erklärt die Unterschiede zwischen Messung, wo beispielsweise zwischen den verschiedenen PAM Konzentrationen deutliche Konzentrationsunterschiede festzustellen sind, und der Abbildung, wo die PAM Farbtöne fast identisch aussehen. Die Negativkontrollen veränderten sich im Laufe der Inkubation nicht/kaum, was sicherstellt, dass die Induktion des NF - κ B Wegs nicht durch äußere Einflüsse erfolgte.

Das SD_Brevinin-like Protein löste während der Inkubation schon nach kurzer Zeit eine starke Reaktion aus. Allerdings reagierten auch die vektorspezifischen Proteine der Negativkontrolle und setzten die NF - κ B Produktion in Gang, wenn auch nicht ganz so stark, wie die Probe mit dem SD_Brevinin-like Protein. Es kann hier nicht eindeutig geklärt werden, ob das Protein eine Wirkung auf die NF - κ B Transkription besitzt oder nicht.

Die Reaktion auf das SD_TNFR-like Protein war etwas langsamer und auch der native Elutionspuffer, in dem sich das Protein befand, löste eine leichte Reaktion aus. Allerdings war diese nicht so stark, wie die mit Protein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das SD_TNFR-like Protein eine Auswirkung auf die NF - κ B Aktivierung besitzt.

Die genauen Werte der photometrischen Messung sind in Tabelle 41 abgebildet.

	T -	T	H ₂ O	B -	B1	B2	B3	B4
M1	0,237	0,373	0,159	1,065	1,139	1,039	1,125	0,985
M2	0,23	0,427	0,099	0,962	1,005	1,392	1,196	1,204
∅	0,234	0,4	0,129	1,014	1,072	1,216	1,161	1,095

	P1	P2	P3	P4	-
M1	0,261	0,401	0,419	0,569	0,131
M2	0,272	0,518	0,58	0,675	0,086
∅	0,267	0,46	0,5	0,622	0,109

Tabelle 41: Messwerte der photometrischen Auswertung des RAW-Blue™ Tests. Es wurden jeweils zweimal dieselben Proben untereinander aufgetragen, gemessen (M1 und M2) und der Durchschnitt (∅) der Messwerte ermittelt. P1, P2, P3 und P4 sind die unterschiedlichen PAM Konzentrationen. T- ist nativer Elutionspuffer, B- nur der leere pBAD Vektor exprimiert und - nur RAW-Blue™ Zellen. T ist das SD_TNFR-like Protein in Elutionspuffer, B1 das SD_Brevinin-like pBADgIII A Pellet, B2 das SD_Brevinin-like pBAD Protein in BugBuster, B3 das SD_Brevinin-like pDEST Pellet und B4 das SD_Brevinin-like pDEST in BugBuster.

Die folgende Abbildung 35 stellt die Ergebnisse der photometrischen Auswertung des RAW-Blue™ Tests mit dem SD_TNFR-like und dem SD_Brevinin-like Protein, der besseren Übersicht wegen, in einem Blockdiagramm dar.

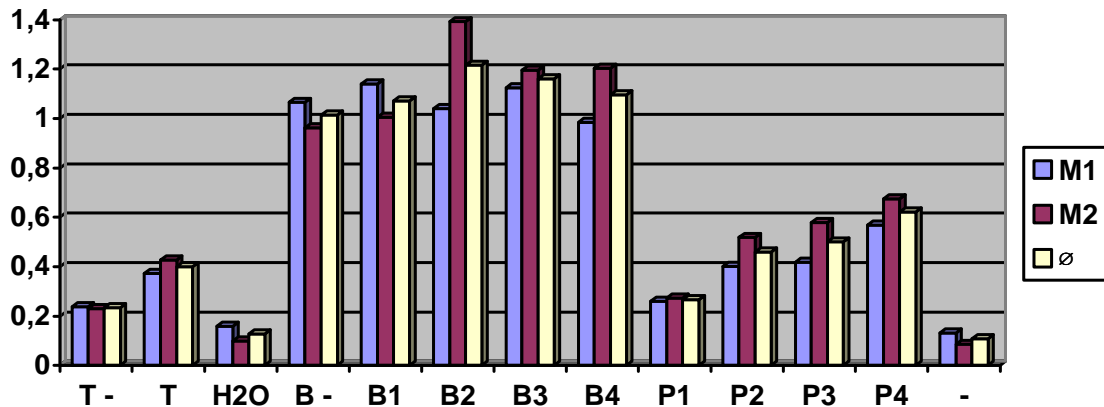


Abbildung 35: Messwerte der photometrischen Auswertung des RAW-Blue™ Tests. Abgebildet sind die beiden Messungen M1 und M2 und deren Durchschnittswert (Ø). P1, P2, P3 und P4 sind die unterschiedlichen PAM Konzentrationen. T- ist nativer Elutionspuffer, B- nur der leere pBAD Vektor exprimiert und - nur RAW-Blue™ Zellen. T ist das SD_TNFR-like Protein in Elutionspuffer, B1 das SD_Brevinin-like pBAD Pellet, B2 das SD_Brevinin-like pBAD Protein in BugBuster, B3 das SD_Brevinin-like pDEST Pellet und B4 das SD_Brevinin-like pDEST in BugBuster.

Der kontinuierliche Anstieg der Werte der Positivkontrollen mit steigender Konzentration ist deutlich zu erkennen, ebenso wie die Reaktionen auf die Testsubstanzen. Die Reaktion des SD_TNFR-like Proteins war ungefähr doppelt so hoch, wie dessen Negativkontrolle und auch bei dem SD_Brevinin-like konnte eine leichte Erhöhung der Reaktion detektiert werden. Nachfolgend ist zur besseren Übersicht ein Blockdiagramm der errechneten Durchschnittsmesswerte des RAW-Blue™ Tests mit den zugehörigen Negativkontrollen dargestellt.

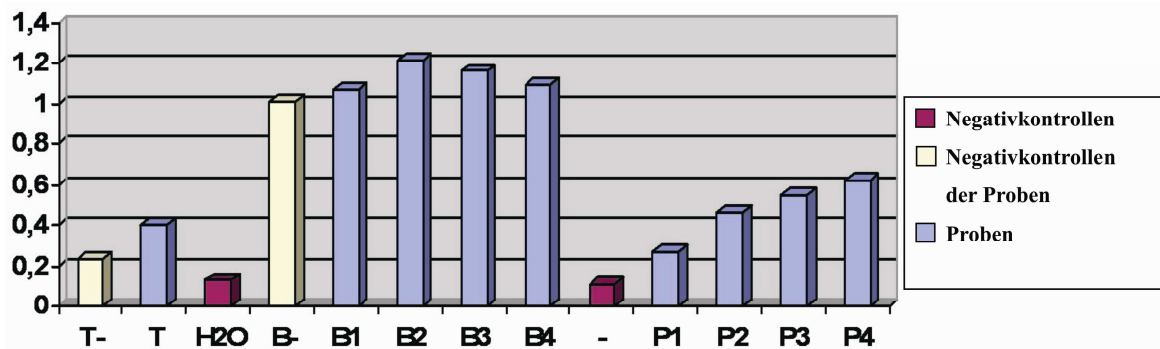


Abbildung 36: Blockdiagramm der durchschnittlichen Messergebnisse des RAW-Blue™ Tests. P1, P2, P3 und P4 sind die unterschiedlichen PAM Konzentrationen. T- ist nativer Elutionspuffer, B- nur der leere pBAD Vektor exprimiert und - nur RAW-Blue™ Zellen. T ist das SD_TNFR-like Protein in Elutionspuffer, B1 das SD_Brevinin-like pBAD Pellet, B2 das SD_Brevinin-like pBAD Protein in BugBuster, B3 das SD_Brevinin-like pDEST Pellet und B4 das SD_Brevinin-like pDEST in BugBuster.

5.11 Immunohistologische Analysen

Für die Untersuchungen der SD_TNFR-like Proteinexpression durch immunocytochemische Analysen wurde der polyklonale SD_TNFR-like Antikörper eingesetzt. Es sollte untersucht werden, wo dieses Protein im Schwammgewebe lokalisiert ist und ob LPS die Expression des

Proteins zu steigern vermag. Dazu wurden Schwammstücke über mehrere Tage mit LPS inkubiert (s. 4.7) und die Schnitte anschließend wie in 2.23 beschrieben vorbereitet. Bei der anschließenden Auswertung der Färbungen am Mikroskop war zu erkennen, dass kein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration nach einer LPS Inkubation zu erkennen war. Abbildung 37 D, E, J und K zeigt, dass das SD_TNFR-like Protein im gesamten Schwammgewebe, auch am Rand des Gewebestücks, vorkommt.

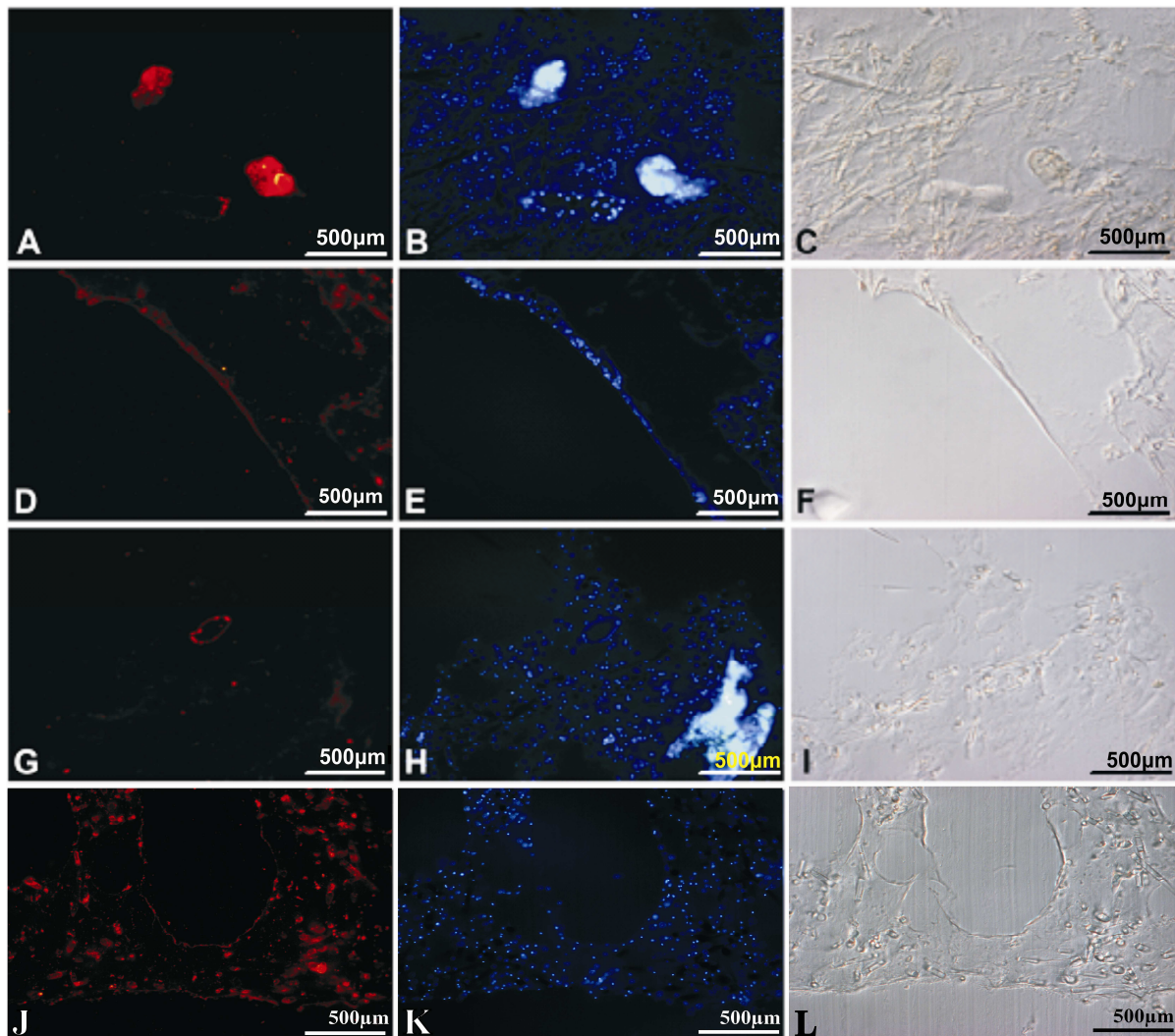


Abbildung 37: Immunohistologische Färbung von Gewebeschnitten aus *S. domuncula* vor und nach einer LPS Inkubation. Immunofluoreszenzanalysen der Lokalisation des SD_TNFR-like Proteins im Gewebe mit einem proteinspezifischen Antikörper. A, D, G und J zeigen die Immunofluoreszenz des Proteins, das mit dem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht wurde. B, E, H und K zeigen die zusätzliche DAPI-Doppelfärbung der Zellkerne der Schnitte und J, C, F, I und L zeigen die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Betrachtung der Schnitte (Nomarsky Bilder). Vergrößerung: A-I 20fach und J-L 40fach.

Es ist bekannt, dass *S. domuncula* Bakterien in speziellen Zellen, den Bakteriozysten, speichert (Böhm *et al.* 2001). Diese Bakterien lassen sich von anderen, die im Mesohyl verstreut vorkommen, unterscheiden (Thakur *et al.* 2005). In den Schnitten ist deutlich zu erkennen, dass sich das SD_TNFR-like um die Bakteriozysten, ebenso wie um verschiedene

andere Mikroorganismen herum ansammelt, welche deutlich angefärbt wurden (s. Abb. 36 A und G). Diese Bakteriencluster bzw. Mikroorganismen konnten nach einer DAPI Färbung deutlich identifiziert werden (s. Abb. 36 B). Auch im Schwammgewebe wird das SD_TNFR-like Protein exprimiert, wobei kein deutlicher Anstieg der Expression nach Inkubation mit LPS zu erkennen war.

5.12 Phylogenetische Analyse der Domänen des SD TNFR-like

Über eine phylogenetische Analyse der beiden Domänen des SD_TNFR-like sollte eine mögliche Eingruppierung zu einer der unzähligen Proteinfamilien mit Todes- bzw. Ubiquitindomäne untersucht werden. Zum Erstellen eines Phylogramms (s. Abb. 38A) wurden in einer ersten Analyse die Aminosäuresequenzen verschiedener Todesdomänen aus verschiedenen Proteinfamilien und Organismen der Blast Datenbank entnommen und daraus ein Baumdiagramm berechnet (ClustalX; 2.10). Mit TreeView (2.10) wurde dieses visualisiert.

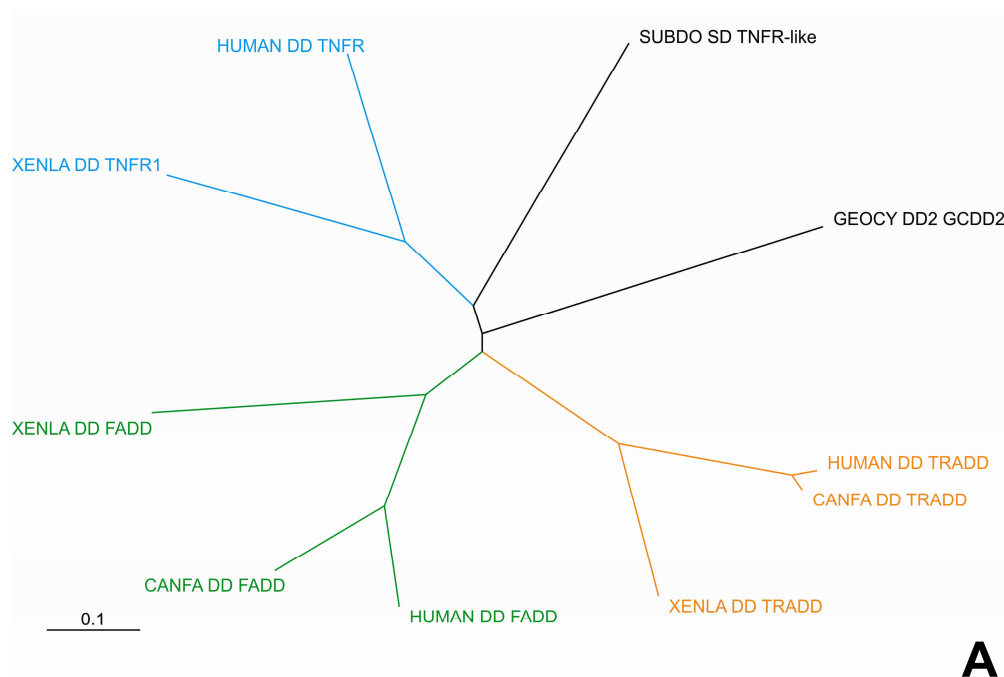


Abbildung 38: Phylogramm zur Eingruppierung der SD_TNFR-like Domänen. Die Todesdomänen aus TNF-Rezeptoren sind in blau, die aus FADDs grün und die aus TRADDs in orange dargestellt. Die Äste zu den beiden Schwamm-domänen sind schwarz eingefärbt. Exakte Artnamen und *Accession Numbers*: *Xenopus laevis* (XENLA DD TNFR1 = tumor necrosis factor receptor 1, *Acc. No.* NP_001108251); *Homo sapiens* (HUMAN DD TNFR = TNF receptor, *Acc. No.* AAA36756); *Geodia cydonium* (GEOCY DD2 GCDD2 *Acc. No.* CAB97128); *Homo sapiens* (HUMAN DD TRADD = tumor necrosis factor receptor type 1 associated protein, *Acc. No.* AAA98482); *Xenopus laevis* (XENLA DD TRADD = tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein, *Acc. No.* Q32NG6); *Canis familiaris* (CANFA DD TRADD = similar to TNFRSF1A-associated via death domain isoform 1, *Acc. No.* XP_853998); *Homo sapiens* (HUMAN DD FADD = Fas (TNFRSF6)-associated via death domain, *Acc. No.* AAP36297); *Xenopus laevis* (XENLA DD FADD = Fas-associating death domain-containing protein, *Acc. No.* NP_001089017); *Canis familiaris* (CANFA DD FADD = similar to FADD protein, *Acc. No.* XP_854485).

Die Domänen gruppieren darin anhand ihrer Funktion und Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie. Im Phylogramm der Todesdomänen erkennt man deutlich die Gruppierungen von TNF-Rezeptoren, FADD und TRADD Proteinen. Ein näherer Verwandtschaftsgrad zwischen Enzymen gleicher Herkunft und Funktion ist offensichtlich, während der Abstand zwischen den einzelnen Proteingruppen relativ groß ist. Die Todesdomäne des TNFR-like aus *S. domuncula* geht auf den gleichen Ursprung wie der der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren zurück, zweigt aber früh in der gemeinsamen Entwicklung ab.

In einer zweiten Analyse wurde dies mit Aminosäuresequenzen von Ubiquitindomänen wiederholt (s. Abb. 39).

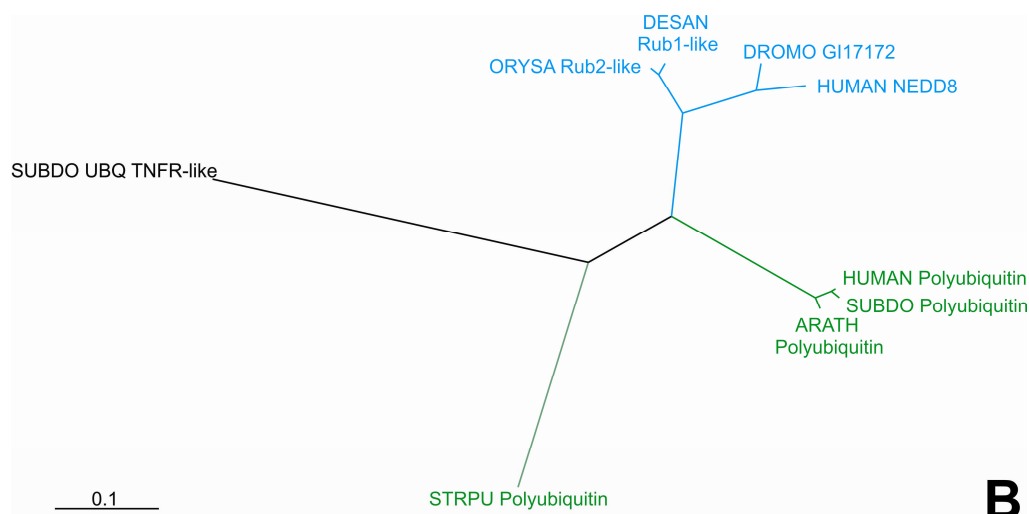


Abbildung 39: Phylogramm zur Eingruppierung der SD_TNFR-like Domänen. Die Ubiquitindomänen aus Polyubiquitinen sind in blau dargestellt, die aus Rub/NEDD8 Proteinen in grün. Der Ast zu der Schwammdomäne ist schwarz eingefärbt. Exakte Artnamen und *Accession Numbers*: *Strongylocentrotus purpuratus* (STRPU Polyubiquitin = similar to polyubiquitin, *Acc. No.* XP_783170); *Homo sapiens* (HUMAN Polyubiquitin = polyubiquitin, *Acc. No.* BAA09860); *Arabidopsis thaliana* (ARATH Polyubiquitin = polyubiquitin, *Acc. No.* AAC39466); *Suberites domuncula* (SUBDO Polyubiquitin = polyubiquitin, *Acc. No.* CAA76577); *Oryza sativa* (ORYSA Rub2-like = NEDD8-like protein RUB2, *Acc. No.* P0C031); *Drosophila mojavensis* (DROMO GI17172 = GI17172, *Acc. No.* XP_002002053); *Deschampsia antarctica* (DESAN Rub1-like = NEDD8-like protein RUB1; Precursor, *Acc. No.* P0C073); *Homo sapiens* (HUMAN NEDD8 = NEDD8, *Acc. No.* CAG28590).

Aus dem Phylogramm der Ubiquitindomänen erkennt man, dass die Proteine auch hier nach ihrer Funktion clustern. So gruppieren sich Polyubiquitine verschiedener Organismen zusammen, ebenso wie Rub/NEDD8 Proteine. Besonders deutlich wird der hohe Verwandtschaftsgrad der Polyubiquitine/Ubiquitine, von dem sich die Sequenzen aus *S. purpuratus* und *S. domuncula* deutlich abheben. Die Ubiquitindomäne zeigt Verwandtschaft zu dem *S. purpuratus* Polyubiquitin, allerdings ist der Abstand relativ groß.

6 Diskussion

Das Immunsystem und die damit verbundenen Mechanismen und Reaktionen sind für das erfolgreiche Überleben eines Organismus essentiell. Von den einfachsten, bis hin zu den komplexen Lebensformen entwickelte sich ein vielfältiges Arsenal an Abwehr- und Verteidigungsmechanismen. Diese schützen vor Angriffen anderer Organismen, Parasitismus, Fusionierung mit genetisch unterschiedlichen Individuen und Fehlbildungen während des morphologischen Wachstums (Vetvicka und Sima, 1998). Lange Zeit war der evolutionäre Ursprung des Immunsystems der Metazoen völlig unklar. Die Schwämme, als älteste rezente Tiere und nächste Verwandte des Urmetazoa, bieten aufgrund der Annahme, dass alle Tierarten monophyletischen Ursprungs sind (Gamulin *et al.* 1994; Müller 1995), die Möglichkeit, den Ursprung und die Entwicklung der Immunsysteme höherer Metazoen zu untersuchen.

Insbesondere Schwämme sind aufgrund ihrer Lebensweise als sessile Filtrierer verschiedensten äußeren Bedrohungen ausgesetzt. Über ihre enorme Filtrierleistung von 0.002–0.84 ml/s/cm³ Schwammgewebe nehmen sie neben Nahrungspartikeln auch große Mengen an Mikroorganismen, darunter auch pathogene, wie z.B. Viren und Bakterien aus dem umgebenden Wasser auf. Andere Bedrohungen sind beispielsweise zahlreiche Fressfeinde, Überwucherung von anderen Riffbewohnern, wie Korallen und Anemonen, die Bildung des so genannten „Primärfilms“ auf ihrer Oberfläche und die Ansiedelung von Epibionten auf den Schwammlarven. Auch dem Umweltstress, den sie in ihrem Lebensraum ausgesetzt sind (speziell in Hafenanlagen) muss der Schwamm eine Möglichkeit entgegen setzen, um ungünstigen Einflüssen Widerstand zu leisten bzw. bereits entstandene Schäden zu beheben.

Trotz dieser Vielfalt an Bedrohungen existieren die Schwämme seit 600 bis 800 Millionen Jahren (Willmer 1994; Müller 1995) in Meerwasserhabitaten, was ein sehr effektives Abwehrsystem voraussetzt. Interessanterweise beherbergen Schwämme eine große Anzahl an symbiotischen Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze, was außerdem einen Mechanismus zur Differenzierung von symbiotischen und pathogenen Mikroorganismen impliziert. Um die Abwehrsysteme der Porifera besser charakterisieren zu können, ist es wichtig, die einzelnen Komponenten bzw. die daran beteiligten Proteine zu identifizieren. Beide, während dieser Arbeit identifizierten, Proteine (SD_TNFR-like und SD_Brevinin-like) sind potentielle Bestandteile dieses Immunsystems.

6.1 Identifizierung der SD_TNFR-like und SD-Brevinin-like Proteine aus *S. domuncula*

Die Klonierung apoptotisch wirksamer Proteine aus dem Schwamm *Suberites domuncula* wurde mit einem „Screen“ der SpongeBase Datenbank begonnen, die nach Proteinen mit Todesdomäne durchsucht wurde, da diese potentielle Komponenten des Abwehrsystems der Porifera sind. Nach Komplettierung der Genfragmente (4.2) und Sequenzierung (4.13) wurde ein Gen zur näheren Charakterisierung ausgewählt. Da bis heute noch keine Todesrezeptoren aus Schwämmen identifiziert wurden, wurde eine Gensequenz ausgewählt, deren Todesdomäne die größte Ähnlichkeit mit der eines Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors aufwies. Daraus resultiert auch die Namensgebung des neuen Proteins SD_TNFR-like.

Mit diesem Protein wurde ein „Yeast Two Hybrid Screen“ durchgeführt um mögliche Interaktoren zu identifizieren. Der interessanteste Interaktor war ein Protein, welches Ähnlichkeiten zu einem antimikrobiellen Peptid, dem Brevinin zeigte. Dem entsprechend erfolgte die Namensgebung des neuen Proteins SD_Brevinin-like. Die Interaktion dieser zwei Proteine erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich. Allerdings konnte die Tatsache, dass ein weitere Interaktor, auf den hier nicht näher eingegangen werden soll, ebenfalls Homologien zu einem antimikrobiellen Peptid, dem Defensin, zeigte, das Ergebnis unterstützen.

6.2 Sequenzanalyse der SD_TNFR-like und SD-Brevinin-like Proteine aus *S. domuncula*

6.2.1 Sequenzanalyse des SD_TNFR-like

Das *SD_TNFR-like* Gen umfasst inklusive der untranslatierten Bereiche 1681 Basenpaare, wovon 1171 bp zum offenen Leserahmen gehören (s. Abb.11). Das Startcodon des *SD_TNFR-like* ist nicht von der aus Vertebraten bekannten Konsensussequenz (GCC A/G CCATGG) für eine optimale Translationsinitiation umgeben (Kozak, 1991). Die Sequenz des SD_TNFR-like weicht in beiden Tripletts davon ab (AGG TAC ATGG), beinhaltet aber sowohl die minderwichtige Pyrimidinbase C an Position -1, als auch die überaus wichtige Purinbase G an Position +4 (Kozak, 1991), jedoch nicht an -3. Ob diese Basen alleine für eine gesteigerte Translationseffizienz ausreichen, wie für *Drosophila* und einige Pflanzen gezeigt wurde (Kozak, 1991), kann nicht eindeutig bestätigt werden. Die angegebene Konsensussequenz bezieht sich jedoch auf Säugerzelllinien. Es ist also wahrscheinlich, dass die optimale Konsensussequenz speziesabhängig verschieden ist.

Der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des *SD_TNFR-like* fehlt ein typisches Polyadenylierungssignal (z.B. bei Vertebraten: AATAAA; Zarkower *et al.*, 1986), ein in Schwämmen häufig beobachtetes Phänomen (Pfeifer, *et al.* 1993). Der hohe Anteil der Basen A und T innerhalb der 3'-UTR mit insgesamt 68% weist auf ein kurzlebigen mRNA-Transkript hin. Diese regulativen AU-reichen Elemente (ARE) der 3'-UTR können anhand bekannter Erkennungsmerkmale unabhängig von der Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden. Die destabilisierenden Eigenschaften resultieren allerdings nicht alleine auf den bisher bekannten AU-Motiven und deren Interaktion mit ARE-Bindeproteinen, sondern es spielen noch weitere, bis heute unbekannte Faktoren eine Rolle.

Klassifizierung	Spezifische Merkmale	Art der Proteine
Typ I ARE	Sequenzelement (AUUUA), meist in mehreren Kopien innerhalb des 3'-UTR	Hauptelemente der mRNA von Transkriptionsfaktoren und Proteinen, die an zellregulatorischen Prozessen beteiligt sind
Typ II ARE	mindestens zwei überlappende [UUAUUUA(U/A)U/A]	viele Zytokine
Typ III ARE	keine einheitliche Konsensussequenz, oft mit repetitiven AU-Pentameren	einige Transkriptionsfaktoren und zellregulatorische Proteine

Tabelle 42: AU-reiche Elemente (ARE) der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) bestimmen die Halbwertszeit von mRNA-Transkripten. Klassifizierung nach Barreau *et al.* (2005).

Der 3'-UTR des *SD_TNFR-like* enthält drei Kopien des AUUUA Sequenzelements, aber ebenso zwei des UUAUUUA(U/A)U/A). Eine eindeutige Klassifizierung ist daher nicht möglich.

6.2.2 Sequenzanalyse des *SD_Brevinin-like*

Das *SD_Brevinin-like* Gen umfasst inklusive der untranslatierten Bereiche 474 Basenpaare, wovon 327 bp zum offenen Leserahmen gehören (s. Abb.21). Das Startcodon des *SD_Brevinin-like* ist ebenfalls nicht von der aus Vertebraten bekannten Konsensussequenz (GCC A/G CCA**ATGG**) für eine optimale Translationsinitiation umgeben (Kozak, 1991).

Die Sequenz des *SD_TNFR-like* weicht in beiden Triplets von dieser Konsensussequenz ab (GCT AGC **ATGG**), beinhaltet aber ebenso wie das *SD_TNFR-like* die minderwichtige Pyrimidinbase C an Position -1 und die überaus wichtige Purinbase G an Position +4 (Kozak, 1991), jedoch nicht an -3. Hier kann ebenfalls nicht eindeutig bestimmt werden, ob diese Basen alleine für eine gesteigerte Translationseffizienz ausreichen oder ob eine Regulierung

auf transkriptionaler Ebene oder als posttranslationale Modifikation des resultierenden Proteins erfolgt. Der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des *SD_Brevinin-like* fehlt ebenfalls ein typisches Polyadenylierungssignal. Der hohe Anteil der Basen A und T innerhalb der 3'-UTR mit insgesamt 64%, weist auf ein kurzlebiges mRNA-Transkript des Typ III ARE hin, da keine Motive der anderen Gruppen zu erkennen sind. Im Gegensatz zur BCO lassen sich keine eindeutigen Muster repetitiver Sequenzabschnitte in diesem Bereich erkennen.

6.3 Strukturelle Analysen der SD TNFR-like und SD-Brevinin-like Proteine aus *S. domuncula*

6.3.1 Analyse des SD_TNFR-like Proteins

Die mittels PCR mir genspezifischen Primern aus einer *S. domuncula* cDNA-Bibliothek isolierte und komlettierte cDNA (SD_TNFR-like, s. 5.1) wies nach Datenbankanalysen (BLASTP) Übereinstimmungen zu proapoptotischen Proteinen sowie zu Ubiquitin auf. Die höchsten Homologien im Vergleich der Proteinsequenz mit Proteinen aus Gendatenbanken (NCBI mit BLASTP-Algorithmus) ergab sich zu der MGC78788 Protein-Sequenz aus *Strongylocentrotus purpuratus*, einer Seeigel-Art, sowie zu einem hypothetischen Protein aus *Branchiostoma floridae*, einem Polyubiquitin aus *Strongylocentrotus purpuratus* und einem TNFR aus *Canis familiaris*.

	<i>B. floridae</i> hyp. Protein	<i>S. purpuratus</i> MGC78788	<i>S. purpuratus</i> poly_UBQ	<i>C. familiaris</i> TNFR6	<i>S. domuncula</i> SD_TNFR-like
<i>B. floridae</i> hyp. Protein		2%	0%	4%	4%
<i>S. purpuratus</i> MGC78788	4%		6%	3%	11%
<i>S. purpuratus</i> poly_UBQ	2%	14%		2%	7%
<i>C. familiaris</i> TNFR6	7%	8%	8%		6%
<i>S. domuncula</i> SD_TNFR-like	8%	23%	16%	16%	

Tabelle 43: Aminosäuresequenzhomologie des SD_TNFR-like Proteins mit anderen Proteinen verschiedener Spezies. Die prozentualen Werte beziehen sich auf **identische** bzw. **ähnliche** (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren. Für die genaue Klassifizierung der Organismen mit zugehörigen *Acc. No* s. Abbildung 13.

Die relativ geringe Homologie der Sequenz zu anderen Proteinen lässt sich dadurch erklären, dass das SD_TNFR-like Protein über zwei sehr spezifische Domänen, die Todesdomäne („*Death Domain*“) und die UBQ Domäne, verfügt, welche zur Zeit in dieser Kombination nur in einem weiteren, noch nicht näher charakterisierten Protein aus *Caenorhabditis elegans*

(zwei unterschiedlich lange Sequenzen, *Acc. No.* NP_871663 bzw. NP_498714.1) vorkommen. Um die Homologien des SD_TNFR-like Proteins zu anderen Proteinen besonders im Bereich dieser Domänen zu verdeutlichen, wurden diese einzeln betrachtet.

	<i>C. familiaris</i> DD	<i>B. floridae</i> DD	<i>O. cuniculus</i> DD	<i>S. purpuratus</i> DD	<i>S. domuncula</i> DD
<i>C. familiaris</i> DD		21%	72%	16%	25%
<i>B. floridae</i> DD	44%		24%	19%	33%
<i>O. cuniculus</i> DD	92%	46%		17%	25%
<i>S. purpuratus</i> DD	37%	35%	35%		24%
<i>S. domuncula</i> DD	49%	50%	49%	44%	

Tabelle 44: Aminosäuresequenzhomologie der Todesdomäne (DD) aus Proteinen verschiedener Spezies. Die prozentualen Werte beziehen sich auf identische bzw. ähnliche (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren. Für die genaue Klassifizierung der Organismen mit zugehörigen *Acc. No.* Siehe Abbildung 16.

Der Vergleich der Sequenzen demonstrierte, dass eine hohe Homologie zwischen den beiden Todesdomänen aus Säugetieren besteht (*C. familiaris* und *O. cuniculus*), diejenigen aus anderen Organismen jedoch recht heterolog sind. Die maximale Übereinstimmung überschreitet nur einmal 25% (49%) identischer (ähnlicher) Aminosäuren.

	<i>T. thermophila</i> UBQ	<i>O. sativa</i> UBQ	<i>A. thaliana</i> UBQ	<i>S. purpuratus</i> UBQ	<i>S. domuncula</i> UBQ
<i>T. thermophila</i> UBQ		72%	54%	41%	29%
<i>O. sativa</i> UBQ	84%		60%	44%	29%
<i>A. thaliana</i> UBQ	73%	78%		42%	32%
<i>S. purpuratus</i> UBQ	61%	66%	61%		32%
<i>S. domuncula</i> UBQ	53%	52%	49%	52%	

Tabelle 45: Aminosäuresequenzhomologie der Ubiquitindomäne (UBQ) aus Proteinen verschiedener Spezies. Die prozentualen Werte beziehen sich auf identische bzw. ähnliche (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren. Für die genaue Klassifizierung der Organismen mit zugehörigen *Acc. No.* Siehe Abbildung 16.

Der Sequenzvergleich der Proteine mit Ubiquitindomäne demonstrierte, dass generell eine hohe Homologie zwischen diesen Domänen besteht. Die Homologie der Domäne des SD_TNFR-like Proteins zu anderen ist jedoch weniger ausgeprägt. Die maximale Übereinstimmung liegt hier bei 32% (52%) identischer (ähnlicher) Aminosäuren, während die

niedrigste Homologie der anderen Domänen bei 41% (61%) identischer (ähnlicher) Aminosäuren liegt (Vergleich von *S. purpuratus* mit *T. thermophila*).

In weiteren Analysen wurde untersucht, ob das SD_TNFR-like Protein eine Transmembrandomäne sowie eine TNFR Domäne enthält, welche für die Einordnung zu den TNF-Rezeptoren essentiell sind. Hierzu lieferten ein SMART Scan sowie mehrere Analysen mit anderen Programmen (Expasy) ein eindeutiges Ergebnis: Die Proteinsequenz lässt keine Annahme einer Transmembrandomäne sowie einer TNFR-Domäne zu.

6.3.2 Analyse des SD_Brevinin-like Proteins

Der mittels „Yeast Two Hybrid Screen“ identifizierte Interaktor wurde über eine PCR mit genspezifischen Primern aus einer cDNA-Bibliothek isoliert (SD_Brevinin-like, s. 5.4.1). Die Sequenz wies nach Datenbankanalysen Übereinstimmungen zu antimikrobiellen Proteinen auf. Die höchste Homologie im Vergleich der Proteinsequenz mit Proteinen aus Gendatenbanken (NCBI mit BLASTP-Algorithmus) ergab sich zu der Clavanin_D Proteinsequenz aus *Styela clava* (Acc. No. CAA71426), einer Falten-Seescheide.

	<i>D. melanogater</i> Attacin	<i>R. temporaria</i> Temporin G precursor	<i>X. laevis</i> Caerulein Type I	<i>B. maxima</i> Maximin 5 precursor	<i>H. sapiens</i> Apolipoprotein A-II	<i>R. temporaria</i> Brevinin-2Ta precursor	<i>S. clava</i> Clavanin D	<i>S. domuncula</i> SD_Brevinin-like
<i>D. melanogater</i> Attacin		1%	5%	3%	4%	1%	3%	3%
<i>R. temporaria</i> Temporin G precursor	4%		8%	6%	8%	40%	18%	6%
<i>X. laevis</i> Caerulein Type I	14%	15%		7%	6%	6%	5%	6%
<i>B. maxima</i> Maximin 5 precursor	3%	6%	7%		5%	8%	6%	8%
<i>H. sapiens</i> Apolipoprotein A-II	8%	16%	11%	19%		12%	13%	6%
<i>R. temporaria</i> Brevinin-2Ta precursor	5%	54%	15%	17%	22%		13%	7%
<i>S. clava</i> Clavanin D	7%	30%	14%	17%	27%	31%		16%
<i>S. domuncula</i> SD_Brevinin-like	11%	19%	13%	28%	25%	16%	29%	

Tabelle 46: Aminosäuresequenzhomologie des SD_Brevinin-like Proteins mit antimikrobiellen Proteinen verschiedener Spezies. Die prozentualen Werte beziehen sich auf identische bzw. ähnliche (bez. physikalischer/chemischer Eigenschaften) Aminosäuren.

Die relativ geringe Homologie der Sequenzen lässt sich dadurch erklären, dass antimikrobielle Peptide in mehrere Gruppen unterteilt werden können, die sich in ihren Sequenzen stark unterscheiden. Besonders Peptide der Gruppe der α -helikalen antimikrobiellen Peptide zeigen untereinander nur geringe Sequenzhomologien.

6.3.3 Die Domänen des SD_TNFR-like Proteins

Eine der über Sequenzanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz des SD_TNFR-like identifizierte Domäne, die Todesdomäne („*Death domain*“), kommt in verschiedenen Proteinen vor, welche in die Signaltransduktion während der Apoptose involviert sind (Feinstein *et al.*, 1995). Des Weiteren gibt es einige Proteine mit Todesdomäne, die eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen (z.B. MyD88). Ein Apoptose-Signal kann durch unterschiedliche physiologische und pathogene Stimuli ausgelöst werden, welche den kontrollierten Tod einer Zelle mittels diverser Signaltransduktionswege einleiten (Thompson, 1995; Konopleva *et al.*, 1999). Proteine mit Todesdomäne sind u.a. Todesrezeptoren, wie Fas/CD95, TNF-R1 und TNF-R2 (Krammer, 1999; Tartaglia, 1993) sowie Adapterproteine wie FADD, RIP (Chinnaiyan, 1995) und TRADD (Hsu, 1995). Darunter sind interessanterweise Proteine die Apoptose auslösen und solche, die sie verhindern können. Zu den Apoptose auslösenden Proteinen gehören der TRAIL/DR4-Rezeptor, FAS/CD95-Rezeptor und FADD. Proteine, die das Überleben der Zelle fördern, sind beispielsweise TNF-R2 und TRAF2. Darüber hinaus existieren einige Proteine mit Todesdomäne, welche je nach Situation, Stimulus und beteiligten Adaptern, sowohl Apoptose induzieren als auch verhindern können. Dazu gehören TNF-R1, TRADD und RIP. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese wichtige Domäne in weiteren Analysen isoliert betrachtet.

In einer BLASTP-Analyse zeigte die SD_TNFR-like Todesdomäne höchste Ähnlichkeit mit Todesdomänen aus unbekanntem Proteinen sowie TNF-Rezeptoren.

Unabhängig von ihrer Wirkung wurden Sequenzen von Todesdomänen verschiedener Spezies untersucht. Hierbei fällt auf, dass nur sehr wenige Aminosäuren in allen Todesdomänen konserviert sind. Es gibt keine einheitliche Konsensussequenz. Allerdings konnten in einem Prosite Alignment neun Aminosäuren identifiziert werden, die weitgehend konserviert sind. Von diesen enthält die SD_TNFR-like Todesdomäne sieben (AS₂₈₇, AS₂₉₀, AS₂₉₄, AS₃₂₀, AS₃₂₃, AS₃₃₆ und AS₃₅₂). Es konnten jedoch keine zusätzlichen Domänen identifiziert werden, die eine Zuordnung des Proteins zu einer bestimmten Gruppe an Apoptoseproteinen ermöglichte.

Allerdings enthält das SD_TNFR-like Protein außer der Todesdomäne noch eine UBL („*Ubiquitin Superfamily*“) Domäne (Jentsch *et al.*, 1991). Ubiquitin- und Ubiquitin-ähnliche Domänen sind in Eukaryoten weit verbreitet und übernehmen verschiedenste Funktionen in den Organismen. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden (Buchberger, 2002): Zum einen übernehmen das Ubiquitin selbst sowie Ubiquitin-analoge Proteine (UBLs wie SUMO,

NEDD8 oder Fat10) das Markieren nicht (mehr) benötigter Proteine für den Abbau im Proteasom oder deren Schutz vor eben diesem (SUMO). Dabei sind sie in verschiedene Prozesse, wie die Kontrolle des Zellzyklus, die Signaltransduktion und die Embryogenese (NEDD8; Kurz *et al.*, 2002; Lammer *et al.*, 1998) oder die Zellteilung und die Regulation der Transkription (SUMO; Gill, 2004) involviert.

Zu der anderen Gruppe zählen Proteine mit einer Ubiquitin-ähnlichen-Domäne (UDP wie Parkin, Rad23 oder DSK2), die sich jedoch in ihrer weiteren Sequenz stark von Ubiquitin sowie von anderen Proteinen dieser Gruppe unterscheiden. Häufig enthalten sie die Ubiquitin Domäne am N-terminalen Teil des Proteins, während sich an ihrem C-terminalen Part eine weitere Domäne befindet, die ihre Funktion bestimmt. Neuere Studien belegen, dass viele UDP die Fähigkeit besitzen, mit dem regulatorischen 19S Part des 26S Proteasoms zu interagieren. Diese Fähigkeit hängt von ihrer Ubiquitin-ähnlichen-Domäne ab und es wird angenommen, dass dies für alle UDP zutrifft (Hartmann-Petersen und Gordon, 2004).

Ubiquitin ist ein Protein von 76 AS Länge, welches in allen Eukaryotenzellen zu finden ist. Seine Sequenz ist hoch konserviert, allerdings gibt es eine Vielzahl von verwandten Proteinen, die sich, bis auf eine Konsensussequenz, stark voneinander unterscheiden können. Das Ubiquitin-System ist unter anderem am Protein-Abbau, der Signaltransduktion und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Zum Proteinabbau wird das Ubiquitin über einen Proteinkomplex, der ein Aktivierungsenzym (E1), ein Konjugationsenzym (E2) und eine Proteinligase (E3) enthält, kovalent an sein Substrat gebunden (Orian *et al.*, 1995; Sudakin *et al.*, 1995). Wichtig für seine Funktion sind die letzten 4 C-terminalen Aminosäuren Leu-Arg-Gly-Gly. Sie bilden eine Art „Schwanz“, der aus dem globulären Protein herausragt und an dessen letzter Aminosäure Gly das Zielprotein binden kann. Ubiquitinierung mit 4 bis 5 oder mehr Ubiquitinen markiert das Zielprotein dabei für den Abbau im 26S Proteasom.

Über eine „Prosite“ Suche konnte eine Ubiquitin-Konsensussequenz identifiziert werden. Dieser Bereich umfasst 26 Aminosäuren und der Konsensus lautet: K-x(2)-[LIVM]-x-[DESAK]-x(3)-[LIVM]-[PAQ]-x(3)-Q-x-[LIVM]-[LIVMC]-[LIVMFY]-x-G-x(4)-[DE]. Die Aminosäuren, die in der SD_TNFR-like Sequenz nicht enthalten sind rot markiert, alle anderen kommen innerhalb der UBQ-Domäne vor.

Ubiquitin ist ebenfalls an der intrazellulären Signal-Weiterleitung von äußeren Stimuli beteiligt, so zum Beispiel beim NF- κ B-Signalweg (Karin und Ben-Neriah, 2000). Dieser wird beispielsweise durch den TNF aktiviert, welcher an einen TNFR bindet. Durch Konformationsänderung kann TRAF2 binden, welcher E3-Ligase-Aktivität besitzt (erkennt

Zielproteine und bindet das aktivierte Ubiquitin daran). TRAF2 ubiquitiniert sich selbst und das Protein RIP (Meylan, und Tschopp, 2005), wodurch verschiedene Kinasen aktiviert werden. Eines dieser phosphorylierenden Enzyme, die I κ -Kinase β , phosphoryliert das Protein I κ B, welches das NF- κ B freisetzt. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert die Transkription verschiedener „Überlebensfaktoren“ im Zellkern.

Sequenzanalysen und phylogenetischen Untersuchungen geben einen Hinweis darauf, dass die UBQ Domäne des SD_TNFR-like am ehesten zu den Polyubiquitinen oder Ubiquitin-analogen Proteinen gezählt werden kann. Die Tatsache, dass das Protein eine weitere, C-terminale Domäne enthält und die Homologie der Domäne zu Ubiquitin recht gering ist, deutet allerdings darauf hin, dass es eher den UBD zugeordnet werden kann.

Zusammenfassend ließen die Beobachtungen erste Schlussfolgerungen zu:

Aufgrund der Existenz einer Todesdomäne, die Ähnlichkeit mit der von TNF-Rezeptoren aufweist, ist es wahrscheinlich, dass das SD_TNFR-like Protein eine Rolle in der Apoptose spielt. Dies kann sowohl eine pro- als auch eine antiapoptotische Beteiligung an den Signaltransduktionskaskaden bedeuten. Diese Theorie wird zusätzlich durch die helikale Konformation im Bereich der Todesdomänen unterstützt, wie sie z.B. auch bei Fas, FADD oder TRADD vorkommt. Das Fehlen einer Transmembranregion war jedoch ein erster Hinweis dafür, dass das SD_TNFR-like Protein kein Membranrezeptor ist. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch den Mangel einer Ligandenbindestelle, beispielsweise für einen TNF, wie sie für Signaltransduktionsrezeptoren essentiell ist. Die zusätzliche Domäne aus der Ubiquitin Superfamilie lässt viele potentielle Funktionsweisen des SD_TNFR-like Proteins zu. Da die größte Sequenzhomologie zu einem Polyubiquitin besteht, kann angenommen werden, dass auch die Funktion ähnlich ist. Dagegen spricht allerdings das Fehlen der essentiellen 4 Aminosäuren am C-Terminus sowie die Tatsache, dass eine weitere Domäne in dem Protein enthalten ist. Dies deutet eher auf eine Zugehörigkeit zu den UDP hin.

6.3.4 Die Domäne des SD_Brevinin-like Proteins

Sequenzanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz des SD-Brevinin-like zeigten Ähnlichkeiten zu einer Gruppe von Proteinen, die antimikrobielle Wirkung zeigen. Besonders ein Bereich zu Beginn des Proteins weist Homologien zu der so genannten Brevinin Domäne auf. AMP sind sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich weit verbreitet und dienen als Kontrollsystem im Wachstum von Mikroorganismen. Gebildet werden sie in verschiedenen Zelltypen, wie Makrophagen, Neutrophilen oder Epithelzellen. In der Haut von Amphibien werden z.B. Dermorphine, Deltorphine, Dermoseptine oder Temporine gebildet, die das hoch

spezifische Immunsystem der Vertebraten unterstützen. Sie stellen eine erste effiziente Schutzbarriere gegen eine Vielzahl von Eindringlingen, wie Bakterien, Pilze, Protozoen, Viren und Nematoden dar (Bulet, *et al.*, 2004), da sie sehr schnell aktiviert werden. Die antimikrobiellen Peptide bilden Gruppen, deren Sequenzen sich stark voneinander unterscheiden. Vergleicht man die Sekundärstruktur des SD-Brevinin-like Proteins mit der Struktur anderer antimikrobieller Peptide, so kann man es der Gruppe der α -helikalen AMP zuordnen, da es über vier α -Helix Strukturen verfügt. Die Domäne zeigt hingegen nur geringe Homologie zu der Brevinin Domäne.

6.4 Untersuchungen des SD_TNFR-like Proteins

Proteine mit Todesdomäne sind in der Immunabwehr und Apoptose häufig anzutreffen. Sie spielen sowohl in der Einleitung der Apoptose als auch im Überleben der Zellen eine wichtige Rolle. Über sie entscheidet sich das Schicksal der Zelle nach einem pathogenen Einfluss, da sie als Rezeptoren oder Mitglieder der Signaltransduktionsketten wichtige Funktionen erfüllen. Über ihre Signalweiterleitung sind sie in der Lage, sowohl pro- als auch antiapoptotisch zu wirken.

Einen ersten Hinweis darauf, dass das SD_TNFR-like Protein Teil der Reaktion auf pathogene Einflüsse ist, lieferten die Northern Blot- sowie die Expressions-Analysen. Diese zeigten, dass die Expression des Proteins nach Inkubation sowohl mit LPS als auch mit humanem TNF- α deutlich hoch reguliert wurde, wobei auch die konstitutive Expression des Gens recht hoch ist. Dies ist bei anderen, an der Immunreaktion und Apoptose beteiligten Proteinen, wie TLR und IRAK-4, häufig zu beobachten (Wiens *et al.*, 2007) und garantiert eine schnelle Reaktion auf bedrohliche Einflüsse.

Um einordnen zu können, welche Rolle das SD_TNFR-like Protein innerhalb des Schwammes einnimmt, müssen verschiedene essentielle Merkmale der einzelnen Proteine mit Todesdomäne berücksichtigt werden, welche sie in Rezeptoren und verschiedene Adapterproteine unterteilen. Todesrezeptoren erhalten ein extrazelluläres Signal, welches sie in die Zelle weiterleiten. Hierfür ist es essentiell, dass sie über einen extrazellulären Part verfügen und dass ein spezieller Ligand wie beispielsweise TNF- α , FASL oder TRAIL an den Rezeptor bindet. Dies impliziert, dass spezielle Ligandenbindestellen in der Rezeptorsequenz enthalten sind oder die Bindung durch spezielle Strukturen ermöglicht wird. Im Fall des TNF-Rezeptors sind dies zwei „Loop“-Strukturen, der 50's-Loop und der 90's-Loop.

In den Struktur- und Sequenzanalysen des SD_TNFR-like Proteins konnten keinerlei

potentielle Ligandenbindestellen identifiziert werden. Dadurch wurde, trotz höchster Verwandtschaft der SD_TNFR-like-Todesdomäne zu Todesdomänen anderer Organismen, die Annahme widerlegt, dass das Schwammprotein ein Todesrezeptor sein könnte. Unterstützt wird diese Erkenntnis dadurch, dass keine einzelne Transmembranhelix innerhalb der Sequenz des SD_TNFR-like vorliegt. Dadurch existiert kein extrazellulärer Part und die Möglichkeit der extrazellulären Ligandenbindung besteht nicht. Dies ist jedoch für einen membranständigen Todesrezeptor essentiell. Ein weiterer Unterschied zu Todesrezeptoren ist das Fehlen einer cysteinreichen Region (ebenfalls extrazellulär), die unter den einzelnen Rezeptoren sehr homolog ist (Smith *et al.*, 1994).

Nach Recherchen über andere, im Schwamm identifizierte immunologisch aktive Rezeptoren, konnten allerdings einige Regionen identifiziert werden, die denen im TLR aus *S. domuncula* ähnlich sind (Wiens *et al.*, 2007). Dazu gehören mehrere Leucin-reiche Bereiche (wichtig für die PAMP Bindung) sowie eine Region ähnlich der HP-Region (helikales Motiv, Konsensus: [SNTC]-X-Ø.X[2]-Ø-X[4]-F-X[2]-L; Ø = beliebige hydrophobe Aminosäure, rot dargestellt sind Abweichungen in der SD_TNFR-like Sequenz). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Konsensussequenz, wie sie für Leucin-reiche Bereiche von Metazoen von Bell *et al.* 2003 postuliert wurde (X-L-X[2]-L-X-L-X[2]), nicht in dem SD_TNFR-like enthalten ist. Trotzdem konnten drei „Repeats“ lokalisiert werden, die in ihrer Sequenz ähnlich sind und im N-terminalen Bereich des Proteins vorkommen ([VD]-[HR]-[FT]-X-L). Dies ist zwar deutlich geringer als die Zahl an „Repeats“ die in TLR normalerweise vorkommen, Variationen in Länge und Sequenz dieser Leucin-reichen Bereiche sind jedoch keine Seltenheit.

Des Weiteren konnte mit Hilfe der PRED-TMBB Onlinesoftware ein Bereich am N-terminalen Ende der Sequenz identifiziert werden, für den mehrere membrandurchspannende Bereiche vorhergesagt werden. Der „e-Value“ dieser Voraussage war jedoch sehr hoch und Analysen der extrazellulären Regionen zeigten keine Ligandenbindestellen. Dies und die Tatsache, dass mit anderen Transmembranregionen vorhersagenden Programmen keine solche Region detektiert wurde deutet darauf hin, dass es sich nicht um einen membranständigen Rezeptor handelt. .

```

1  MACSKLCRLTVEYQTIISGSEFKRIQPNKGVIEVHFPLNETVNNFIKHLGHSEFNSLHSQTS 60
61  AGKELYLIRGKVHTRLDEKKGFSLVQFSVQDGDGRFVLLGYKPISRIFKFTIVVKGLDGNRM 120
121  EFDVLTNTTIDTLKHRIQDRTGIHESDIILMYKGVVPGKSRKTVEFYDGRSGSKAQLEV 180
181  NQRSLAKEPEEDVSRSEKEEPVSSSETDGPFPQNRRTQQGAFVRENTRRSCRSRQGAPRYSQ 240
241  VSSLGCAEDQVRYETDKEMLARVPHAPISDTGLLDISKNMTGWKHLAIRLGLNESERVVI 300
301  KEDSRDYFAEQKVQMLLKWKRKNGREATWRKLLCRVQEEEDRELAWKIVRISQKQKSDS 360
361  VQCALDVASPOASVAPISNEGAPVQETQTE

```

Abbildung 39: Mögliche transmembrane Bereiche des SD_TNFR-like Proteins. TM sind rot, außen liegende Bereiche blau und innen liegende Bereiche schwarz gekennzeichnet. Vorhersage mit der PRED-TMBB Software.

Danach wurde die Sequenz des SD_TNFR-like Proteins nach anderen möglichen Bindestellen untersucht, die für eine Beteiligung an der pro- oder antiapoptotischen Signalkaskade essentiell sind. Über eine Analyse mit ELM konnte ein Bindemotiv für TRAF2 identifiziert werden. Es umfasst vier Aminosäuren und die Konsensussequenz lautet [PSAT]-X-[QE]-E. In dem SD_TNFR-like Protein sind zwei dieser möglichen Bindestellen enthalten. Diese befinden sich jeweils C-terminal der Domänen und umfassen folgende Aminosäuren: AS₁₉₆₋₁₉₉ und AS₃₈₃₋₃₈₆. TRAF Proteine wirken vor allem auf Signalwege der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren, die das Überleben der Zelle garantieren. So können sie die Zellproliferation, das Zellüberleben und andere antiapoptotische Funktionen auslösen. Dies geschieht beispielsweise über die Aktivierung der MAP-Kinase („*mitogen-activated protein kinase*“) und von Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B). Diese transkribieren Gene der Immunantwort und von Entzündungsreaktionen (Ye *et al.*, 1999). TRAF kann direkt oder indirekt via TRADD an einige Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren binden und deren Signaltransduktion beeinflussen (Hsu *et al.*, 1996b). Somit kann angenommen werden, dass das SD_TNFR-like Protein eine antiapoptotische Funktion ausübt.

Dies wird durch die Ergebnisse des RAW-Blue™ Tests bestätigt. Die Reaktion der Zellen und die daraus folgende Aktivierung des NF- κ B-Wegs als Reaktion auf die Zugabe von SD_TNFR-like Protein kann zwei Ursachen haben. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Proteinlösung einen pathogenen Effekt auf die Zellen zeigt und so die Reaktion über die TLR auslöst um das Überleben der Zellen zu garantieren. Die andere Möglichkeit ist, dass das Protein in die Zellen aufgenommen wurde und direkt in der Signalkaskade wirkt. Dies ist denkbar, da in der TLR Signalkaskade ebenfalls Proteine mit Todesdomänen beteiligt sind (z.B. MyD88), die das Signal über TRAF weiterleiten.

Des Weiteren konnten über eine ELM Suche mögliche Spaltungsstellen, beispielsweise für die Proprotein Konvertase 7, identifiziert werden (AS₂₂₂₋₂₂₈), die eine Spaltung des Proteins zwischen den beiden Domänen ermöglicht, so dass die beiden entstandenen Proteine getrennt voneinander auf unterschiedliche Weise reagieren können.

Ebenfalls identifiziert werden konnten drei USP7-Bindemotive innerhalb des Gens, die zwischen den Domänen bzw. am C-terminalen Ende des Gens liegen (USP7_1 und USP7_2 Bindestellen: AS₂₀₀₋₂₀₄ und AS₃₇₀₋₃₇₄ für _1 und AS₁₈₉₋₁₉₅ für _2). Diese Motive sind Zielstrukturen für das deubiquitinierende USP7 Enzym („*ubiquitin-specific protease*“), dessen Substrate Regulatoren verschiedener „Überlebenskaskaden“ von Zellen sind. Durch Deubiquitinierung können die Proteine ihrem Abbau im Proteasom entkommen. Dies impliziert eine wichtige Rolle des USP7 in verschiedenen zellulären Prozessen.

Ein weiteres sehr interessantes Motiv ist das MAPK-Andockmotiv. Es wurde zweimal innerhalb des Gens identifiziert (AS₂₇₋₃₅ und AS₇₉₋₈₇). Dies kann bedeuten, dass das SD_TNFR-like Protein ein MAPK-interagierendes Molekül ist. Möglicherweise ist es an der Regulation spezifischer Interaktionen in der MAPK- Kaskade beteiligt oder die MAPK spielt eine Rolle in der Regulation des SD_TNFR-like selbst. Hier könnte sie beispielsweise durch Bindung an SD_TNFR-like Konformationsänderungen und allosterische Regulationen beeinflussen (beschrieben in Reményi *et al.* 2006)

6.5 Untersuchungen des SD_Brevinin-like Proteins

Antimikrobielle Peptide sind evolutionär alte Verteidigungsmoleküle, die sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Sie stellen einen schnellen und effektiven Schutz gegen verschiedenste mikrobielle Bedrohungen dar. Ihre Zielstrukturen sind dabei die mikrobiellen Zellmembranen, die sich von denen der Pflanzen und Tiere unterscheiden. Ihre geringe Homologie, die großen strukturellen Unterschiede und ihre vielfältigen Wirkungsweisen erschweren es, ihnen neue potentiell antimikrobiell wirksame Peptide zuzuordnen. Es sind sowohl antimikrobielle Peptide bekannt, die gegen verschiedene Mikroben wirken, als auch solche, die nur gegen einen speziellen Mikroorganismus Aktivität zeigen. Ein erstes Indiz für die Zugehörigkeit des SD_Brevinin-like Proteins zu den antimikrobiellen Peptiden lieferte die Existenz einer Domäne mit Ähnlichkeit zur Brevinin Domäne. Alle AMP werden aus längeren Vorstufen abgeleitet. Diese bestehen aus einem 19 bis 20 Aminosäuren langen Signalpeptid, eventuell einer Pro-Region und einer oder mehrerer Regionen, die für die antimikrobiellen Peptide kodieren. Zu den posttranslationalen Modifikationen gehören beispielsweise die C-terminale Amidierung sowie die proteolytische Prozessierung.

Auch das SD_Brevinin-like weist eine Signalsequenz von 20 Aminosäuren, welche essentiell für die Sekretion der AMP ist, sowie eine C-terminale Amidierung auf (AS₁₀₀₋₁₀₃). Letztere stabilisiert und verstärkt die positive Ladung, die viele AMP tragen. In verschiedenen Analysen wurden potentielle Angriffspunkte für Proteasen zur Prozessierung des Prä-Pro-Proteins untersucht. Proteasen spalten Proteine durch Hydrolyse der Peptidbindungen. So kann beispielsweise Trypsin, welches auch in Schwämmen bereits nachgewiesen wurde, das SD_Brevinin-like Protein an verschiedenen Stellen spalten. Auch das Signalpeptid wird beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum entfernt. Aus dem Prä-Pro-Protein werden somit 3 verschiedene potentielle Fragmente generiert.

MKIAIFVLAFIAVTASVAYAAPQGEETDVEEADIEEADIQTLLKRIMKEKLAEQDHNDDENQAQVQSLLAEELEYEKALDTDKAEKQKYHPYPTWGRRRTRRWG



Abbildung 40: Das Prä-Pro-Protein des SD_Brevinin-like. Dargestellt sind die Fragmente, welche durch Spaltung an potentiellen Trypsin-Spaltungsstellen entstehen.

Das Propeptid weist häufig eine negative Ladung auf (Michaelson *et al.*, 1992). Es wird angenommen, dass es möglicherweise die Aktivität des eigentlichen AMP durch ladungsabhängige Interaktionen inhibieren kann (Liu und Ganz, 1995). Auch im SD_Brevinin-like Protein entsteht ein anionisches Pro-Peptid. Es umfasst die AS₂₁₋₇₀ und ist stark negativ geladen. Das eigentliche, durch die Spaltung entstandene, potentielle antimikrobielle Peptid umfasst die AS₇₁₋₁₀₉ und weist eine positive Nettoladung auf. Dies ist für eine Interaktion mit anionischen Zellwänden und Phospholipidmembranen von Mikroorganismen von Vorteil (Oren und Shai, 1998). Zusätzlich zu dieser kationischen Ladung nehmen AMP häufig eine amphipatische Konformation an, wobei eine hydrophobe Gruppe einer hydrophilen entgegengelagert wird. Diese Konformation ist für die Membranassoziiierung gut geeignet. Häufig entsteht die amphipatische, α -helikale Struktur des Peptids erst bei Kontakt mit der mikrobiellen Membran (Shai, 1999).

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass besonders die kationische Aminosäure Arginin (R) sowie die aromatische Aminosäure Tryptophan (W) von Bedeutung für die Interaktion einiger AMP mit der Membran sind (Vogel *et al.*, 2002). So konnte vor einiger Zeit gezeigt werden, dass kleine R/W-reiche Peptide eine hohe antimikrobielle Aktivität aufweisen (Strom *et al.*, 2002). Auch für das SD_Brevinin-like konnte eine potentielle Proteaseschnittstelle vorhergesagt werden, die ein kleines R/W-reiches Peptid generiert (AS₁₀₁₋₁₀₉, GRRRTRRWG).

Als eine weitere Möglichkeit kann angenommen werden, dass durch Spaltung des SD_Brevinin-like Proteins anionische Fragmente entstehen. Bis heute sind einige wenige anionische antimikrobielle Proteine bekannt, beispielsweise das Dermcidin (Schitteck *et al.*, 2001). Für diese Peptide muss ein anderer Wirkungsmechanismus als die Interaktion mit der negativen Membran angenommen werden. Denkbar wäre, dass sie entweder die Zellwandsynthese hemmen oder verhindern, dass die Mikroorganismen für sie lebenswichtige Nährstoffe aufnehmen können.

AMP können entweder kontinuierlich in geringen bis antimikrobiell wirksamen Dosen exprimiert werden oder erst nach Kontakt mit den Mikroorganismen selbst. So konnte bei

Insekten nachgewiesen werden, dass nach Kontakt mit Bakterien antibakterielle Peptide und nach Kontakt mit Pilzen antimykotische Peptide gebildet wurden (Fehlbaum *et al.*, 1994; Lemaitre *et al.*, 1997). Northern Blot-Analysen zeigten, dass die Transkription des SD_Brevinin-like Proteins erst nach Kontakt mit mikrobiellen Signalsequenzen begann.

Diese selektive Induktion kann über zwei Signalkaskaden, den Toll- bzw. Toll-like- (TLR) und den Imd- („*Immune deficiency*“) Weg reguliert werden.

Der Toll- bzw. der TLR-Weg kann beispielsweise in Säugern und Insekten durch Kontakt mit speziellen mikrobiellen Strukturen aktiviert werden. Diese sind unter anderem das β -1,3-Glucan der Pilze, das Peptidoglycan und die Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterien und das Phosphoglycan der Parasiten. Die membranständigen Rezeptoren werden hierbei aktiviert und setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang (Ferrandon *et al.*, 1998; Imler und Hoffmann, 2000a). Weiterhin konnte bei Säugern gezeigt werden, dass unterschiedliche TLRs durch die verschiedenen mikrobiellen Strukturen aktiviert werden. So lässt sich erklären, dass die verschiedenen AMP als Reaktion auf verschiedene Mikroben exprimiert werden. Der Toll-Weg wird dabei hauptsächlich durch Gram-positive Bakterien und Pilze aktiviert.

Der zweite Induktionsweg, der Imd-Pfad, führt über eine Kaskade ebenfalls zur Expression antimikrobieller Peptide und wird größtenteils durch Gram-negative Bakterien aktiviert (Leulier *et al.*, 2003).

Es wurde in Northern Blot-Analysen überprüft, ob die Transkription des SD_Brevinin-like ebenfalls über „Mustererkennungsrezeptoren“ reguliert werden kann. Dies wäre durchaus denkbar, da erst vor kurzem ein TLR in *S. domuncula* identifiziert wurde (Wiens *et al.*, 2007). In den Analysen, wurde gezeigt, dass die Transkriptionsrate des SD_Brevinin-like nach einer Inkubation mit verschiedenen mikrobiellen Komponenten bzw. Hefe teilweise stark anstieg. Da diese Komponenten, wie beispielsweise LPS, die TLR aktivieren, kann angenommen werden, dass am Ende der dadurch induzierten Signalkaskade die Transkription des AMP durch bestimmte Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B aktiviert wird, wie es bereits aus anderen Organismen bekannt ist. Die Northern Blot-Analysen zeigten deutlich, dass die Transkriptionsrate nach Inkubation mit verschiedenen Pathogenen hochreguliert wurde, wohingegen die Transkription in der Negativkontrolle nicht erkennbar war. Hierbei zeigte sich auch, dass die Reaktion auf LPS eher gering ausfiel.

Dies lieferte einen Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins an der Reaktion auf mikrobielle Bedrohungen und die antimikrobielle Aktivität des SD_Brevinin-like Proteins wurde in zwei Tests mit Bakterien und Hefe überprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass das Protein antimykotisch wirkte, auf Gram-negative *E.coli* Zellen jedoch keinen Einfluss ausübte. Dies

ist nicht ungewöhnlich, da es unter den antimikrobiellen Peptiden viele Vertreter gibt, die nur auf bestimmte Mikroorganismen reagieren, andere jedoch nicht beeinflussen.

6.6 Potentielle Wirkungsmechanismen der Schwammproteine SD_TNFR-like und SD_Brevinin-like

Die Kombination der Domänen des SD_TNFR-like Proteins, „Ubiquitin-like“ und Todesdomäne erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich. Dennoch konnten bis heute einige Proteine identifiziert werden, welche zusätzlich zu ihrer funktionsbestimmenden Domäne eine Ubiquitin-ähnliche Domäne besitzen. Die Variabilität der Domänenkombinationen könnte beispielsweise aus einer Genduplikation und Verschiebung von Schlüsselmotiven unter ökologischem Druck resultieren (Loker *et al.*, 2004). Unabhängig davon kann jedoch angenommen werden, dass das Protein in Immunabwehr oder Apoptose involviert wird, da es über die Todesdomäne verfügt und bei Inkubation mit LPS oder TNF- α vermehrt exprimiert wird. Für die potentielle Wirkungsweise des Proteins gibt es mehrere Möglichkeiten. Auch in Bezug auf das Protein selbst sind zwei verschiedene Wege denkbar:

1. Das komplette Protein wirkt, wobei eine oder beide Domänen eine Funktion ausübt/ausüben.
2. Das Protein wird zwischen seinen Domänen gespalten und die Fragmente wirken einzeln.

Auch für die mögliche Zugehörigkeit des SD_TNFR-like Proteins entweder zu den Rezeptoren oder zu Adaptermolekülen gibt es mehrere denkbare Möglichkeiten.

6.6.1 Das SD_TNFR-like Protein zählt zu den Adaptermolekülen

Es gibt mehrere Wirkungsweisen für ein SD_TNFR-like Adapterprotein. Dabei bindet das Protein an einen Todesdomänen-Rezeptor und leitet darüber ein Signal weiter. Für die Bindung kommen zwei verschiedene Mechanismen in Frage:

1. Die Todesdomäne des SD_TNFR-like Proteins bindet an die des Rezeptors. Dadurch kommt es zu Anlagerung weiterer Adaptermoleküle und schließlich einer Abwehrreaktion. Da im Protein zwei Bindestellen für TRAF2 lokalisiert werden konnten, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Signalkaskade ähnlich der des TNF-Rezeptors involviert ist. Das SD_TNFR-like Protein wirkt in diesem Fall ähnlich des TRADD. Nach Bindung an den Rezeptor lagert sich TRAF2 an. Dies löst eine Aktivierung von Überlebensfaktoren,

beispielsweise durch NF- κ B, aus. Die Ubiquitin-domäne spielt hierbei keine bekannte Rolle.

2. Das SD_TNFR-like Protein bindet über seine Ubiquitin-domäne an den Rezeptor. Diese Version der Bindung ist unter anderem von dem DAP-1 Protein bekannt (Liou und Liou, 1999), welches an den TNF-R1 binden und so Apoptose auslösen kann. Eine Bindung des SD_TNFR-like Proteins über seine Ubiquitin-domäne resultiert in einer freien Todesdomäne, an die weitere Proteine assoziieren können. Dies können beispielsweise dem FADD ähnliche proapoptotische Proteine sein, die eine Aktivierung von Caspasen auslösen.

Denkbar ist weiterhin, dass das SD_TNFR-like Protein gespalten wird, um seine Wirkung ausüben zu können. Belegt wird diese Hypothese beispielsweise durch ein Bindemotiv für die Proprotein Konvertase 7, das zwischen den beiden Domänen des Proteins liegt. Durch Spaltung an dieser Stelle entstünde ein Fragment mit 221 Aminosäuren und 25,1 kDa sowie eines von 169 Aminosäuren Länge und 19,4 kDa Gewicht. Dies wird durch einige Ergebnisse während der Western Blot-Analysen bestätigt, in denen sich neben dem 50 kDa schweren kompletten Fragment ein weiteres, ca. 23 kDa schweres Fragment detektieren ließ. Dies entsprach exakt dem 19,4 kDa Fragment plus den ca. 3,6 kDa des angehängten „Tags“. Allerdings war dies nach der nativen Aufreinigung des Proteins nicht detektierbar. Demnach wären folgende Wirkungsmechanismen denkbar:

1. Das SD_TNFR-like Protein bindet über seine Todesdomänen an einen Rezeptor. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und eine Spaltung des Proteins wird möglich. Das UBQ-Fragment wird abgespalten und das Fragment mit Todesdomäne bindet, wie oben beschrieben, TRAF2 und wirkt so positiv auf das Überleben der Zelle. Die Funktion des UBQ-Fragments bleibt dabei unklar. Es wird für einige Ubiquitin-ähnliche Proteine angenommen, dass sie mit der 19S Untereinheit des Proteasomes interagieren können (Hartmann-Petersen und Gordon, 2004) und so regulatorisch wirken. Denkbar wäre weiterhin, dass die UBQ-Domäne die wichtige Todesdomäne inaktiviert.
2. Das SD_TNFR-like Protein bindet den Rezeptor über seine Ubiquitin-domäne, was ebenfalls zu einer Konformationsänderung und der anschließenden Abspaltung des Teils mit Todesdomäne führt. Dies würde den Rezeptor inaktivieren und eine Signalweiterleitung verhindern. So kann eine mögliche Apoptose verhindert und das Überleben der Zelle unterstützt werden.

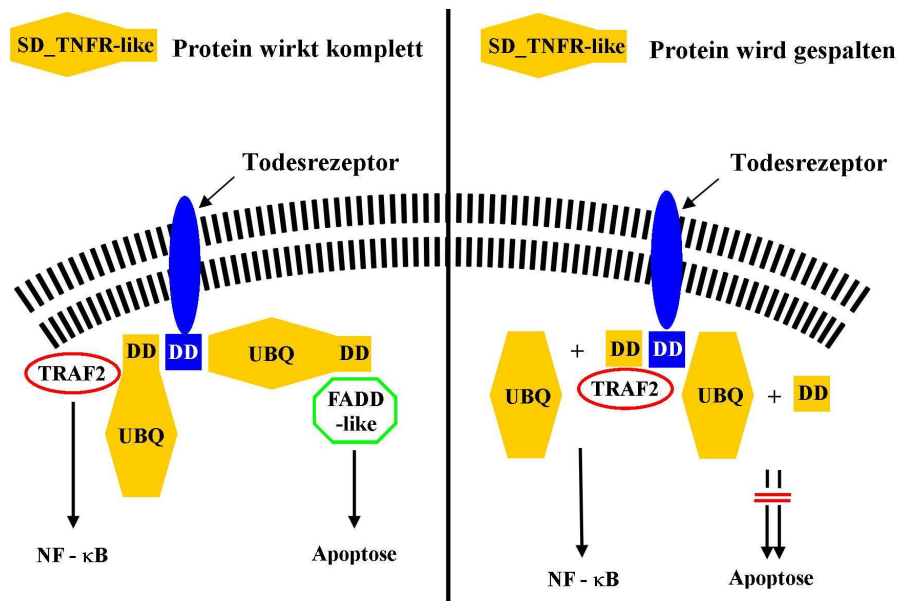


Abbildung 41: Mögliche Wirkungsweisen des SD_TNFR-like Proteins als Adaptermolekül.

Als möglicher Adapter kann das SD_TNFR-like Protein also sowohl Apoptose als auch das Überleben der Zellen auslösen, wobei die zweite Variante bevorzugt werden muss, da eine Interaktion mit dem SD_Brevinin-like Protein nachgewiesen wurde. Dieses antimikrobielle Protein wird durch Aktivierung der Überlebensstrategien der Zelle aktiviert, um Angriffe abzuwehren.

6.6.2 Das SD_TNFR-like Protein zählt zu den Rezeptoren

Weiterhin könnte das SD_TNFR-like Protein als Rezeptor wirken. Zwei Möglichkeiten können hierbei die die Reaktion auf mikrobielle Zielsequenzen erklären, die von der Lokalisation des Rezeptors abhängig sind. Als erste Möglichkeit wird ein membranständiger Rezeptor mit einem extrazellulären und einem intrazellulären Part angenommen. Das Protein verfügt nicht über eine klassische Transmembranregion. Allerdings konnten mit PRED-TMBB sechs membrandurchspannende Sequenzbereiche im N-terminalen Teil des Proteins identifiziert werden (AS₇₋₁₅, AS₃₁₋₄₁, AS₄₄₋₅₂, AS₆₆₋₇₆, AS₈₁₋₈₉, AS₁₀₆₋₁₁₅), wenn auch mit einem hohen „*e-Value*“. Des Weiteren existiert kein eigentlicher extrazellulärer Bereich, nur die zwischen den transmembranen Bereichen liegenden Sequenzabschnitte haben Kontakt zum extrazellulären Milieu. Dies erschwert die Ligandenbindung, weshalb diese mögliche Form des Rezeptors so gut wie ausgeschlossen werden kann.

Die zweite Möglichkeit stellt einen intrazellulären, cytosolischen Rezeptor, ähnlich den NLR (NOD-like Rezeptoren) dar. Es wird angenommen, dass diese Rezeptoren in inaktiver Form

vorliegen und nach Kontakt mit dem Liganden aktiviert werden. Dadurch werden die für die Signalweiterleitung benötigten Domänen durch Konformationsänderungen aktiviert und können weitere Proteine binden (Le Bourhis, Benko, Girardin, 2007). Bei dieser Wirkungsweise müssen die Liganden allerdings zuerst in das Cytosol aufgenommen werden. Dies wäre durch ein Eindringen der Mikroorganismen in die Zellen zu erklären.

Beide Möglichkeiten lassen folgende verschiedene Signalwege zu:

1. Bindung von TRADD-ähnlichen Proteinen an den Rezeptor, an das FADD-ähnliche Adaptermoleküle assoziieren können, was zu einer Signalkaskade führt, an deren Ende Apoptose ausgelöst wird.
2. Assoziieren von TRAF2- und RIP-ähnlichen Proteinen und daraus resultierende Aktivierung des NF - κ B-Wegs.

Bevorzugt wird auch hier allerdings die antiapoptotische Wirkung des SD_TNFR-like Proteins. Dies wird durch die Ergebnisse des RAW-Blue-Tests, die Aktivierung des TLR und NLR vermittelten NF - κ B-Wegs sowie die Interaktion mit SD_Brevinin-like untermauert.

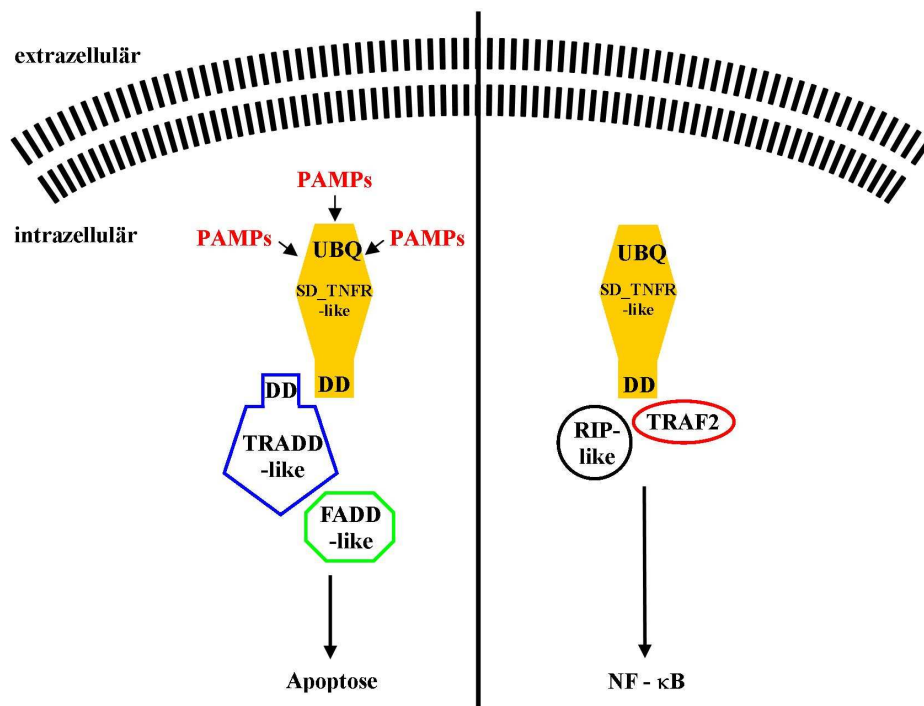


Abbildung 42: Mögliche Wirkungsweisen der SD_TNFR-like Proteins als Rezeptor.

6.6.3 Die Wirkung des antimikrobiellen SD_Brevinin-like Proteins

Nach den verschiedenen, während dieser Promotion durchgeführten, Analysen kann für das SD_Brevinin-like eine analoge Wirkungsweise zu den α -helikalen kationischen

antimikrobiellen Peptiden angenommen werden. Nach Abspaltung des Signal- sowie des Propeptids kann ein 39 Aminosäuren umfassendes, positiv geladenes Peptid entstehen. Das SD_Brevinin-like zeigte in einem Test antimykotische Aktivität. Für die Wirkungsweise kann somit angenommen werden, dass das Peptid direkt mit der negativ geladenen Membran der Mikroorganismen interagieren kann. Das Protein dient dem Schutz des Organismus vor mikrobiellen Angriffen und sichert dessen Überleben.

6.6.4 Interaktion der beiden Schwammproteine

Die Tatsache, dass das SD_TNFR-like mit einem antimikrobiellen Protein interagieren kann, deutet darauf hin, dass es an einem Prozess beteiligt ist, der den Organismus schützen und die schädlichen Mikroorganismen gezielt bekämpfen kann. Die im *“Two Hybrid System”* identifizierte Interaktion der beiden Proteine SD_TNFR-like und SD_Brevinin-like kann an mehreren Punkten stattfinden. Als erstes wäre es denkbar, dass die Interaktion zwischen dem Ubiquitin-Teil des SD_TNFR-like Proteins und dem SD_Brevinin-like stattfindet. Dies könnte beispielsweise nach Beendigung der Reaktion der Fall sein, wenn das antimikrobielle Protein inaktiviert bzw. das Protein degradiert werden soll. Weiterhin wäre denkbar, dass das SD_Brevinin-like Protein bindet um die Reaktion zu stoppen. Diese kann beispielsweise zur Spaltung des SD_TNFR-like Proteins und so zur Inaktivierung des Todesdomänen-Fragments bzw. zur Abspaltung des Ubiquitin-Fragments von dem Rezeptor führen. Das Ubiquitin-Fragment könnte anschließend an beteiligte Proteine binden und diese inaktivieren oder an das Proteasom binden. Beide Wege stellen eine negative Rückkopplung dar.

Die letzte Möglichkeit ist eine positive Verstärkung der Abwehrreaktion, welche durch schädliche Mikroorganismen ausgelöst wird. Denkbar wäre beispielsweise, dass das SD_Brevinin-like Protein, das als Reaktion auf eine antimikrobielle Bedrohung exprimiert wird, die eindringenden Mikroorganismen direkt bekämpft und zeitgleich an das SD_TNFR-like Protein bindet. Dieses wird dadurch aktiviert, kann weitere Proteine binden und setzt so weitere Mechanismen in Gang, die die Abwehrreaktion und das Überleben des Organismus unterstützen.

Die Tatsache, dass in dem *„Yeast TwoHybrid Screen“* keine weiteren Interaktoren, wie beispielsweise andere Adapterproteine identifiziert wurden deutet darauf hin, dass das SD_TNFR-like Protein erst durch eine Bindung mit dem SD_Brevinin-like Protein aktiviert wird und so andere Proteine binden kann. Dies könnte beispielsweise durch eine Konformationsänderung nach Bindung des SD_Brevinin-like gewährleistet werden.

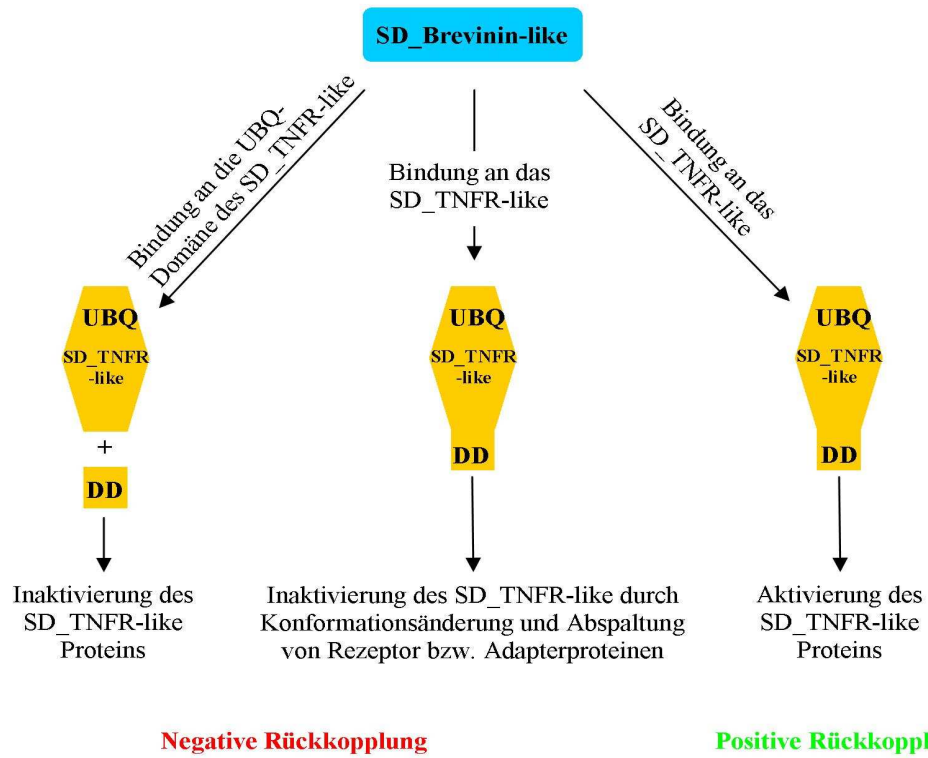


Abbildung 43: Mögliche Interaktions- bzw. Regulationsmechanismen der beiden Proteine SD_TNFR-like und SD_Brevinin-like.

7 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer Lebensweise und -umgebung sind effiziente Strategien zur Abwehr bedrohender Einflüsse essentiell für die Porifera. Eine dieser Strategien stellen die Apoptose in höheren Metazoen, sowie ein effizientes Immunsystem dar. Diese sichern sowohl das Überleben des Organismus als auch die Entfernung beschädigter, infizierter oder redundanter Zellen. Bei Untersuchungen der Porifera auf Moleküle, die an diesen Prozessen beteiligt sind, konnten in den letzten Jahren beachtliche Erfolge erzielt werden. So konnten das in der Apoptose involvierte Protein GCDD2 (proapoptotisch), die antiapoptotischen GCBHP1 und GCBHP2 Proteine (Wiens *et al.*, 2001), sowie ein LPS induzierbarer TNF (Wiens *et al.*, 2007) und zwei Caspasen (Wiens *et al.*, 2003) in Schwämmen identifiziert werden. Um diese essentiellen Mechanismen besser verstehen zu können, sollte ein möglicher Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor identifiziert werden. Hierzu wurde die SpongeBase Datenbank nach Proteinen mit Todesdomänen durchsucht und diese unter Anwendung von PCR- und Screening-Techniken in einer cDNA-Bank des marinen Schwammes *S. domuncula* komplettiert. Im Anschluss an ihre Sequenzierung wurde ein Klon ausgewählt, dessen Todesdomäne größte Homologie zu einem TNFR zeigte. Dieser Klon SD_TNFR-like (*Suberites domuncula* TNFR-homologes Protein) wurde anschließend diversen Sequenz- und Strukturanalysen unterzogen. Diese offenbarten die Existenz zweier funktional bedeutsamer Domänen (Ubiquitin-like und Todesdomäne). Vor allem die Todesdomäne impliziert eine Beteiligung des Proteins an apoptotischen Prozessen. Über einen „*Yeast Two Hybrid Screen*“ sollten Proteine identifiziert werden, welche mit dem Ausgangsprotein interagieren. Hierbei wurde ein Protein identifiziert, das Ähnlichkeit mit einem antimikrobiellen Peptid aufweist. Dieses Protein kann analog zu einer Gruppe von antimikrobiellen Peptiden, den α -helikalen kationischen Peptiden, in drei Teile gespalten werden. Das Signalpeptid sowie ein anionisches Propeptid werden abgespalten und es entsteht ein kationisches, antimykotisch wirksames Peptid.

Beide Proteine sollten, sofern sie in die Abwehrreaktionen involviert sind, durch Inkubation mit mikrobiellen Strukturen vermehrt exprimiert werden. Eine Überprüfung der Transkription mittels Northern Blot Analysen bestätigte dies für das SD_TNFR-like nach Inkubation mit LPS und TNF- α sowie für SD_Brevinin-like nach Inkubation mit LPS, PAM und Hefe. Mit der Herstellung eines rekombinanten SD_TNFR-like-Proteins wurde die Immunisierung von Kaninchen und die folgende Gewinnung eines polyklonalen SD_TNFR-like-Antikörpers ermöglicht. Dieser gestattete den Nachweis der SD_TNFR-like -Expression mittels Western

Blot-Analysen sowie die stressinduzierte erhöhte Expression mittels Dot Blot-Analysen auch auf Proteinebene.

Um die Funktion des SD_TNFR-like Proteins zu charakterisieren, wurde ein Test mit RAW-Blue™-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse implizieren, dass das Protein Teil der Immunreaktion analog der TLR- bzw. NLR- Reaktion ist. Auch die Interaktion mit einem antimikrobiellen Protein, welches für das Überleben des Organismus und die Bekämpfung der Mikroorganismen sorgt, deutet auf eine solche Beteiligung hin. Zusätzlich wird diese These durch ein Ergebnis der Strukturanalysen unterstützt, nämlich die Identifizierung einer TRAF2 Bindestelle. TRAF2 ist ein Adapterprotein der TNFR und aktiviert Überlebensfaktoren über den NF - κ B-Weg.

Immunohistochemische Analysen zeigten, dass das SD_TNFR-like Protein im Organismus vor allem um die Bakteriozysten, um verschiedene Mikroorganismen und am Rand des Schwammes exprimiert wird, was ebenfalls für eine immunologische Funktionsweise spricht. Auch im restlichen Gewebe wird es kontinuierlich, auch ohne vorherige LPS Inkubation exprimiert. Diese Akkumulation zeigt deutlich, dass das Protein in einen Schutzmechanismus gegen äußere Bedrohungen involviert ist. Es scheint dabei direkt an den eindringenden Mikroorganismen zu wirken.

Das SD_TNFR-like ist demnach ein potentieller Bestandteil der Immunantwort des Schwammes, welches Apoptose verhindern und Überlebensmechanismen aktivieren kann.

Das SD_Brevinin-like Protein besitzt antimykotische Aktivität, wie in einem antimikrobiellen Test gezeigt werden konnte. Weiterhin scheint es für das SD_TNFR-like Protein als positiver bzw. negativer Regulator von Bedeutung zu sein, der eine Reaktion entweder beendet oder die Expression von Überlebensfaktoren verstärkt.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen demonstrieren somit die Identifizierung eines neuen Schwammproteins, welches eine Rolle in der Immunantwort spielt, sowie eines neuen antimikrobiellen Peptids, welches die Wirkung des TNFR-like moduliert.

Es müssen jedoch noch weitere Funktionsanalysen folgen, um den Mechanismus des SD_TNFR-like Proteins und seine Regulation genauer charakterisieren zu können

Abstract

Sponges are, due to their living conditions exposed to numerous exterior threats. As marine sessile filter feeders they filtrate huge amounts of water (0.002–0.84 ml/s/cm³ of sponge tissue) through their aquiferous canal system to extract edible material. Therefore they are exposed to large amounts of microorganisms such as bacteria and viruses that are present in seawater. This requires efficient defence strategies like apoptosis and an immune system which ensure surviving of the organism as well as removal of damaged, infected or redundant cells. Analyses of poriferan molecules during the last years revealed the existence of some proteins which are involved in this processes. Examples are the apoptotic proteins GCDD2, GCBHP1 and GCBHP2 (Wiens *et al.*, 2001), as well as an LPS inducible TNF (Wiens *et al.*, 2007) and two capsizes (Wines *et al.*, 2003) and immunological proteins like a TLR-like protein (Wines *et al.*, 2007). To understand these processes and to identify further mechanisms the SpongeBase databank should be screened for a prospective TNF-receptor. Therefore it was searched for proteins which include a death domain and candidates were found and completed from cDNA of the marine sponge *S. domuncula* using PCR and screening methods. Afterwards one clone, which showed the highest homology with a TNF-receptor death domain, was chosen for further characterisations. Sequence and structure analyses of this SD_TNFR-like (*Suberites domuncula* TNFR-homologous) protein revealed the existence of an additional domain (Ubiquitin-like). In a „Yeast Two Hybrid Screen“ proteins could be identified which were interacting with the SD_TNFR-like. Thereby a protein could be identified which showed homology to an antimicrobial peptide. This protein (SD_Brevinin-like) was used for several analyses. It could be showed that this protein can be cleaved in three parts as it is known from a group of antimicrobial peptides, the α -helical cationic peptides. Cleavage of an anionic propeptid as well as a signal peptide generates the active peptide which showed antimycotic activity in an antimicrobial test.

As these proteins are expected to be part of defence reactions in the sponge their expression should be up regulated after exposure with microbial compounds. This could be proved for the SD_Brevinin-like during northern blot analyses after incubation of tissue with LPS, PAM and yeast. SD_TNFR-like expression was up regulated as well after incubation with LPS and TNF- α as shown during northern and dot blot analyses. But the up regulation was not as strong as the one for the SD_Brevinin-like. This result could be proved on the protein level in western blot analyses with a gene specific antibody that was generated for the SD_TNFR-like protein.

Furthermore a test with -BlueTM-cells was done to characterise the function of the SD_TNFR-like protein. The result as well as the fact that the interactor is an antimicrobial peptide implies that the protein is part of the immunological TLR resp. NLR like reaction and preserves the organism from microbial invaders. This thesis was provided with the identification of a TRAF2 binding site during structural analyses. This protein acts as an adapter of TNF-receptors which leads to activation of the NF - κ B pathway to ensure the surviving of the organism.

Therefore it is conceivable that both proteins are part of the sponge immunresponse. SD_TNFR-like protein can prevent apoptosis and activate surviving mechanisms while SD_Brevinin-like protein possesses antimycotical activity. Furthermore it seems as if it acts as a regulatory factor for the SD_TNFR-like protein which modulates its activity.

Nevertheless further functional analyses are required to characterise the particular effects and the regulation of the SD_TNFR-like protein.

8 Literaturverzeichnis

Acehan, D.; Jiang, X.; Morgan, D.G.; Heuser, J.E.; Wang, X.; Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol. Cell*, **9**:423-432

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**:745-756

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. USA.*, **74**(12): 5350–5354

Anakina, R.P.; Drozdov A.L. (2001). Gamete structure and fertilization in the Barents Sea sponge *Leucosolenia complicata*. *Russ. J. Mar. Biol.*, **27**:143–150

Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281** (5381):1305-1308

Ausubel F.; Brent R.; Kingston R.; Moore D.; Seidman J.; Smith J.; Struhl K. (1994). Current protocols in molecular biology. *John Wiley and Sons Inc.*, NY, USA

Bachmair, A.; Finley, D.; Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**:179-186

Baud, V.; Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends. Cell. Biol.*, **11**:372-377

Bell, J.K.; Mullen, GED.; Leifer, CA.; Mazzoni, A.; Davies, DR.; Segal, DM. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in toll-like receptors. *Trends Immunol.* **24**:528–533

Bernard, P.; Couturier, M. (1992). Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. *J. Mol. Biol.*, **226**:735-745

Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**(6):1513-1522

Blumbach, B.; Pancer, Z.; Diehl-Seifert, B.; et al. (1998). The putative sponge aggregation receptor: isolation and characterisation of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. *J. Cell Sci.*, **111**:2635-26344

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*. *Immuno-Genetics.*, **49**:751-763

Boatright, K.M.; Renatus, M.; Scott, F.L.; Sperandio, S.; Shin, H.; Pedersen, I.M.; Ricci, J.E.; Edris, W.A.; Sutherlin, D.P.; Green, D.R. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell*, **11**:529-541

Böhm, M.; Hentschel, U.; Friedrich, A.; Fieseler, L.; Steffen, R.; Gamulin, V.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (2001). Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar. Biol.*, **139**:1037-1045

- Boldin, M.P.; Varfolomeev, E.E.; Pancer, Z.; Mett, I.L.; Camonis, J.H.; Wallach, D. (1995).** A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.*, **270**:7795-7789
- Bolland, S.; Ravetch, J.V. (1999).** Inhibitory pathways triggered by ITIM containing receptors. *Adv. Immunol.*, **72**:149-175
- Boman, H.G.; Agerberth, B.; Boman, A. (1993).** Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect.Immun.*, **61**:2978-2984
- Boman, H.G. (1995).** Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**:61-92
- Boman, H.G. (2000).** Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.*, **173**:5-16
- Borchiellini, C.; Manuel, M.; Alivon, E.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Le Parco, Y. (2001).** Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *J. Evol. Biol.*, **14**:171-179
- 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
- Brogden, K.A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**:238-250
- Brown, J.R. (2003).** Ancient horizontal gene transfer. *Nat. Rev. Genet.*, **4**:121-132
- Bruns, P. (1868).** Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitr. Klin. Chir.*, **3**:443-446
- Buchberger, A. (2002).** From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol.*, **12**:216-21
- Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L. (2004).** Anti-microbial peptides: from invertebrates to Vertebrates. *Immunol. Rev.*, **198**:169-184
- Campbell, N.A. (1997).** Biologie Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 649-6
- Campbell, N.A.; Reece, J.B. (2003).** Biologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag
- Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975).** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**:3666-3670
- Castle, M.; Nazarian, A.; Yi, S.S.; Tempst, P. (1999).** Lethal effects of apidaecin on Escherichia coli involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J. Biol. Chem.*, **274**:32555-32564
- Cavalier-Smith, T.; Allsopp, M.T.E.P.; Chao, E.E.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J. (1996).** Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.*, **74**:2031-2045
- 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

- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162(1)**: 156-9
- Clarke, P.G.; Clarke, S. (1995).** Historic apoptosis. *Nature*, **378**:230
- Cohen, G.M.; Sun, X.M.; Fearnhead, H.; MacFarlane, M.; Brown, D.G.; Snowden, R.T.; Dinsdale, D. (1994).** Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J. Immunol.*, **153**:507-516
- Conway-Morris, S. (1998).** The question of metazoan monophyly and the fossil record. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **21**:1-19
- Cornillon, S.; Foa, C.; Davoust, J.; Buonavista, N.; Gross, J.D.; Golstein, P. (1994).** Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.*, **107**:2691-2704
- Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. (2000).** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**:33-42
- Durfee, T.; Becherer, K.; Chen, P.L.; Yeh, S.H.; Yang, Y.; Kilburn, A.E.; Lee, W.H.; Elledge, S.J. (1993).** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.*, **7**:555-569
- Evan, G.; Littlewood, T. (1998).** A matter of life and cell death. *Science*, **281 (5381)**: 1317-1322
- Falla, T.J.; Karunaratne, D.N.; Hancock, R.E. (1996).** Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.*, **271**:19298-19303
- Farber, E. (1994).** Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod. Pathol.*, **7**:605-609
- Fehlbaum, P.; Bulet, P.; Michaut, L.; Lagueux, M.; Broekaert, W.F.; Hetru, C.; Hoffmann, J.A. (1994).** Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.*, **269**:33159-33163
- Feinstein, E.; Kimchi, A.; Wallach, D.; Boldin, M.; Varfolomeev, E. (1995).** The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 342-344
- Ferrandon, D.; Jung, A.C.; Criqui, M.; Lemaitre, B.; Uttenweiler-Joseph, S.; Michaut, L.; Reichhart, J.; Hoffmann, J. A. (1998).** A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J.*, **17**:1217-1227
- Fields, S.; Song, O. (1989).** A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interaction. *Nature*, **340**:245-246
- Fischer, U.; Jänicke, R.U.; Schulze-Osthoff, K. (2003).** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.*, **10**:76-100
- Gamulin, V.; Rinkevich, B.; Schäcke, H.; Kruse, M.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1994).** Cell adhesion receptors and nuclear receptors are highly conserved from the lowest Metazoa (marine sponges) to vertebrates. *Biol. Chem., Hoppe-Seyler* 1994; **375**: 583
- Garson M.G.; Flowers A.E.; Webb R.I.; Charan R.D.; McCaffrey E.J. (1998).** A sponge/dinoflagellate association in the haposclerid sponge *Haliclona sp.*: cellular origin of cytotoxic alkaloids by percoll density gradient fractionation. *Cell. Tissue. Res.*, **293**:365-373

- 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**:555-557
- Gill, G. (2004).** SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.*, **18**[17]:2046-59
- Gonda, D.K.; Bachmair, A.; Wunning, I.; Tobias, J.W.; Lane, W.S.; Varshavsky, A. (1989).** Universality and structure of the N-end rule. *J. Biol. Chem.*, **264**:16700-16712
- Green, D.R.; Ware, C.F. (1997).** Fas-ligand: privilege and peril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94** (129): 5986-5990
- Gu, Y.; Wu, J.; Faucheu, C.; Lalanne, J.L.; Diu, A.; Livingston, D.J.; Su, M.S. (1995).** Interleikin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms *in vivo*. *EMBO J.*, **14** (9):1923-1931
- Gundacker, D.; Leys, S.P.; Schröder, H.C.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (2001).** Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. *Glycobiology*, *in press*
- Guruprasad, K.; Reddy, B.V.B.; Pandit, M.W. (1990).** Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Prot. Eng.*, **4**:155-161
- Haeckel, E. (1896).** Systematische Phylogenie der Wirbellosen Thiere; Teil 2. Georg Reimer, Berlin
- Hancock, R.E.; Diamond, G. (2000).** The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*, **8**:402-410
- Hancock, R.E. (2001).** Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet*, **1**:156-164
- Hartmann-Petersen, R.; Gordon, C. (2004).** Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting Proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **15**[2]:247-59
- Hehlgans, T.; Pfeffer, K. (2005).** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, **115**:1-20
- Henikoff, S.; Henikoff, J. G. (1993).** Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* **17**: 49-61
- Hentschel, U.; Fieseler, L.; Wehrl, M.; Gernert, C.; Steinert, M.; Hacker, J.; Horn, M. (2003).** Microbial diversity of marine sponges. In: Müller, WEG (ed.), *Molecular Marine Biology of Sponges*, 59–88. Springer, Heidelberg
- Hochuli E.; Dobeli H.; Schacher A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.*, **18**:177-184
- Hsu, H.; Xiong, J.; Goeddel, D.V. (1995).** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, **81**:495-504
- Hsu, H.; Shu, H.B.; Pan, M.G.; Goeddel, D.V. (1996b).** TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84** (2):299-308

- Hsu, Y.-T.; Wolter, K.G.; Youle, R.J. (1997).** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-x during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**:3668-3672
- Hultmark, D.; Steiner, H.; Rasmuson, T.; Boman, H.G. (1980).** Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, **106**:7-16
- Hussain, S.P.; Harris, C.C. (2006).** p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *J. Nippon Med. Sch.*, **73**:54-64
- Idriss, H.T. and Naismith, J.H. (2000).** TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.*, **50**:184-195
- Imler, J.L.; Hoffmann, J.A. (2000a).** Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**:16-22
- Jacquier-Sarlin, M.R.; Polla, B.S. (1996).** Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem. J.*, **318**:187-193
- Jentsch, S.; Seufert, W.; Hauser, H.-P. (1991).** Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1089**:127-139
- Kamysz, W.; Okroj, M.; Lukasiak, J. (2001).** Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochimica Polonica*, **50**:461-469
- Karin, M.; Ben-Neriah, Y. (2000).** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.*, **18**:621-663
- Kaufmann, T.; Schlipf, S.; Sanz, J.; Neubert, K.; Stein, R.; Borner, C. (2003).** Characterisation of the signal that directs Bcl- xL, but not Bcl-2, to the outer mitochondrial membrane. *J. Cell Biol.*, **160**:53-64
- 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
- Kischkel, F.C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P.H.; Peter, M.E. (1995).** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, **14**:5579-5588
- Klein, J. (1989).** Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? *Scand. J. Immunol.*, **29**:499
- 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
- Kozak, M. (1991).** Structural features in eucaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, **266**:19867-19870
- Kozak, M. (1997).** Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **7**:3428-3445
- Kragol, G.; Lovas, S.; Varadi, G.; Condie, B.A.; Hoffmann, R.; Otvos, L. Jr. (2001).** The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, **40**:3016-3026

- Krammer, P.H. (1999).** CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.*, **71**:163-210
- Kruse, M.; Steffen, R.; Batel, R.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1999).** Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J. Cell. Sci.*, **112**:4305-4313
- Kurz, T.; Pintard, L.; Willis, J. H.; Hamill, D. R.; Gonczy, P.; Peter, M.; Bowerman, B. (2002).** Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science*, **295**[5558]:1294-8
- Laemmli, U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685
- Lammer, D.; Mathias, N.; Laplaza, J. M.; Jiang, W.; Liu, Y.; Callis, J.; Goebel, M.; Estelle, M. (1998).** Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev.*, **12**[7]:914-26
- Land, A. (1989).** Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**:913-949
- Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P.H. (2005).** Death receptor signalling. *Journal of Cell Science*, **118**:265-267
- Le Bourhis, L.; Benko, S.; Girardin, SE. (2007).** Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochemical Society transactions*, **35**(6):1479-84
- Lee, N. (1980).** Molecular Aspects of ara Regulation. In: The Operon. Miller J. und Reznikoff W. (eds) *Cold Spring Harbor, N.Y* pp. 389-410
- Lee, N.; Francklyn, C.; Hamilton, E. (1987).** Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to araI2 activates the araBAD Operon Promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**:8814-8818
- Lemaitre, B.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A. (1997).** Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**:14614-14619
- Leonard, N.J.; McDonald, J.J.; Reichmann, M.E. (1970).** Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**:93
- Leulier, F.; Parquet, C.; Pili-Floury, S.; Ryu, J.H.; Caroff, M.; Lee, W.J.; Mengin-Lecreulx, D.; Lemaitre, B. (2003).** The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition, *Nat. Immunol.*, **4**:478-484
- Liou, Mei-Ling; Liou, Hsiou-Chi (1999).** The Ubiquitin-homology Protein, DAP-1, Associates with Tumor Necrosis Factor Receptor (p60) Death Domain and Induces Apoptosis *J. Biol. Chem.*, **274**(15):10145–10153
- Liu, L.; Ganz, T. (1995).** The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting. *Blood*, **85**:1095-1103
- 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**:643-64
- Loker, ES.; Adema, CM.; Zhang, SM.; Kepler, TB. (2004).** Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.*, **198**:10–24. *Review*

- Los, M.; Wesselborg, S.; Schulze-Osthoff, K., (1999).** The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction: Lessons from knock-out mice. *Immunity*, **10**:629-639
- Lowe, S.W.; Schmitt, E.M.; Smith, S.W.; Osborne, B.A.; Jacks, T. (1993).** p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**:847-849
- Mangel, A.; Leitao, J.M.; Batel, R.; Zimmermann, H.; Müller, W.E.G.; Schröder, H.C.; (1992).** Purification and characterisation of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium* *Eur. J. Biochem.*, **210**:499-507
- Martin, S.J.; Reutelingsperger, C.P.; McGahon, A.J.; Rader, J.A.; van Schie, R.C.; LaFace, D.M.; Green, D.R. (1995c).** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, **182**:1545-1556
- Maruyama, K.; Sugano, S. (1994).** Oligo-Capping: A Simple Method to Replace the Cap Structure of Eukaryotic mRNAs with Oligoribonucleotides. *Gene*, **138**:171-174
- McDonnell, T.J. (1993).** Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia. *Mol. Carcinog.*, **(4)**:209-213
- Mehl, D.; Müller, W.E.G. (1998).** Molecular biological and palaeontological evidence that Eumetazoa including Porifera (sponges) are of monophyletic origin. In: Watanabe, Y., N. Fusetani., (Eds.), *Sponge Science- Multidisciplinary Perspectives*. Springer, Tokio: 152-165
- Meylan, E.; Tschopp, J. (2005).** The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci.*, **30(3)**:151-159
- Michaelson, D.; Rayner, J.; Couto, M.; Ganz, T.; (1992).** Cationic defensins arise from charge-neutralized properdins: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukoc. Biol.*, **51**:634-639
- Mittler, R.; Lam, E., (1995).** Identification, characterisation and purification of a tobacco. *Plant Cell*, **7**:1951-1962
- Moore, R.A.; Bates, N.C.; Hancock, R.E. (1986).** Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**:496-500
- Müller, W.E.G.; Diehl-Seifert, B.; Sobel, C.; Bechtold, A.; Kljajic, Z.; Dorn, A. (1986).** Sponge secondary metabolites: biochemical and ultrastructural localization of the antimitotic agent avarol in *Dysidea avara*. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**:1687-90
- Müller, W.E.G.; Müller, I.M. (1994).** On the monophyletic evolution of the metazoa. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, **27**:2083-2096
- Müller, W.E.G. (1995).** Molecular Phylogeny of Metazoa (animals): monophyletic origin. *Naturwissenschaften.*, **7**:321-329
- Müller, W.E.G.; Perovic, S.; Wilkesman, J.; Kruse, M.; Müller, I.M.; Batel, R. (1999b).** Increased gene expression of a cytokine-related molecule and profilin after activation of *Suberites domuncula* cells with xenogenetic sponge molecules. *DNA Cell Biol.*, **18**:885-893

- Müller, W.E.G.; Kruse, M.; Blumbach, B.; Skorokhod, A.; Müller, I.M. (1999c).** Gene structure and function of the tyrosine kinase in the marine sponge *Geodia cydonium*: an autapomorphic character of Metazoa. *Gene*, **238**:179-193
- Müller, W.E.G.; Böhm, M.; Batel, R.; De Rosa, S.; Tommonaro, G.; Müller, I.M., et al. (2000).** Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.*, **63**:1077–81
- Müller, W.E.G. (2001).** Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol Integr. Physiol.*, **129(2-3)**:433-460
- Müller, W.E.G.; Brümmer, F.; Batel, R.; Müller, I. M.; Schröder, H.C. (2003).** Molecular biodiversity. Case study: Porifera (sponges). *Naturwissenschaften*, **90**:103-120 (REVIEW)
- Müller, W.E.G.; Wiens, M.; Adell, T.; Gamulin, V.; Schröder, H.C.; Müller, I. M. (2004).** Bauplan of Urmetazoa: Basis for Genetic Complexity of Metazoa. *Internat. Review of Cytology*, **235**:53-92
- 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
- Myelan, E.; Tschopp, J. (2005).** The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem. Sci.*, **30(3)**:151-159
- Nagata, S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell*, **88 (3)**:355-365
- Nicholson, D.W.; Thornberry, N.A. (1997).** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22 (8)**:299-306
- Nikaido, H.; Nakae, T. (1979).** The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, **20**:163-250
- 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
- Oren, Z.; Shai, Y. (1998).** Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **47**:451–463
- Orian, A.; Whiteside, S.; Israel, A.; Stancovski, I.; Schwartz, A.L.; Ciechanover, A. (1995).** Ubiquitin-mediated Processing of NF-kappaB Transcriptional Activator Precursor p105. *J. Biol. Chem.*, **270**: 21707–21714
- Osborne, B.A. (1996).** Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, **8 (2)**:245-254
- Otvos, L. Jr. (2005).** Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J. Pept. Sci.*, **11**:697-706.
- Otvos, L.Jr.; Rogers, M.E.; Consolvo, P.J.; Condie, B.A.; Lovas, S.; Bulet, P.; Blaszczyk-Thurin, M. (2000).** Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, **39**:14150-14159

- Pahler, S.; Krasko, A.; Schütze, J.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1998).** Isolation and characterisation of a cDNA encoding a potential morphogen from the marine sponge *Geodia cydonium*, that is conserved in higher metazoans. *Proc R. Soc. Lond. B.*, **265** :421-425
- Pancer, Z., Kruse, M.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G.. (1997a).** On the origin of the adhesion Receptors of metazoa: cloning of the integrin α subunit cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Mol. Bio. Evol.*, **12**:391-398
- Park, C.B.; Kim, H.S.; Kim, S.C. (1998).** Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **244**:253-257
- Park, C.B.; Yi, K.S.; Matsuzaki, K.; Kim, M.S.; Kim, S.C. (2000).** Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, **97**:8245-8250
- Peterson, A.A.; Hancock, R.E.; McGroarty, E.J. (1985).** Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **164**:1256-1261
- Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F.; Müller, W. (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*. *Glycobiol.*, **3**:179-184
- Piers, K.L.; Hancock, R.E. (1994).** The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, **12**:951-958
- Reitner, J.; Mehl, D. (1995).** Early Paleozoic diversification of sponges: new data and evidences, *Geol. Paläontol. Mitt. Innsbruck*, **20**:335-347
- Reményi, A.; Good, MC.; Lim, WA. (2006).** Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**:676–685. Review.
- Rodriguez, J.; Lazebnik, Y. (1999).** Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes & Dev.*, **13**:3179-3184
- 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
- Salvesen, G.S.; Duckett, C.S. (2002).** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**:401–410
- Samelson, L.E.; Patel, M.D.; Weissman, A.M.; Harford, J.B.; Klausner, R.D. (1986).** Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T-cell antigen receptor. *Cell*, **46**:1083-1090
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** (12):5463-5467
- Sarma, A.S.; Daum, T.; Müller W.E.G. (1993).** Secondary metabolites from marine sponges. Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Ullstein-Mosby Verlag, Berlin, Germany

- Schäcke, H.; Rinkevich, B.; Gamulin, V.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (1994).** Immunoglobulin-like domain is present in the extracellular part of the receptor tyrosine kinase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Recog.*, **7**:27-276
- Schaefer, B.C. (1995).** Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Anal. Biochem.*, **227**:255-273
- Schittek, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Schirle, M.; Schröder, K.; Blin, N.; Meier, F.; Rassner, G.; Garbe, C. (2001).** Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, **2**:1133-1137
- Schmidt E.W.; Obratsova A.Y.; Davidson S.K.; Faulkner D.J.; Haygood M.G. (2000)** Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium. "Candidatus *Entotheonella palauensis*." *Mar. Biol.*, **136**:969–977
- Schröder, H.C.; Krasko, A.; Batel, R.; Skorokhod, A.; Pahler, S.; Kruse, M.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (2000).** Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. *FASEB J.*, **14**:2022-2031
- Schulze-Osthoff, K.; Beyaert, R.; Vandevoorde, V.; Haegeman, G.; Fiers, W. (1993).** Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO*, **12**:3095-3104
- Shai, Y. (1999).** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, **1462**:55–70
- Shai, Y.; Oren, Z. (2001).** From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, **22**:1629-1641
- Shi, Y. (2002).** Mechanismus oof Caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, **9**:459-470
- 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
- Simmaco, M.; Mignigna, G.; Barra, D. (1998).** Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers*, **47**:435-450
- 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
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-17
- Spencer, H. (1864).** The principles of biology, Vol. 1. Williams and Norgate, London
- Stepczynska, A.; Lauber, K.; Engels, I.H.; Janssen, O.; Kabelitz, D.; Wesselborg, S.; Schulze-Osthoff, K. (2001).** Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene*, **20**:1193-1202
- Storch, V.; Welsch, U. (1994, 1996).** Kurzes Lehrbuch der Zoologie. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag
- Strom, M.B.; Rekdal, O.; Svendsen, J.S. (2002).** Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. *J. Pept. Sci.*, **8**:431-437

- Studier, F.W.; Moffatt, B.A. (1986).** Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.*, **189**:113-130
- Studier, F.W.; Rosenberg, A.H.; Dunn, J.J.; Dubendorff, J.W. (1990).** Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Meth. Enzymol.*, **185**:60-89
- Sudakin, V.; Ganoth, D.; Dahan, A.; Heller, H.; Hershko, J.; Luca, F.C.; Ruderman, J.V.; Hershko, A. (1995).** The cyclosome, a large complex containing cyclin-specific ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Cell. Biol.*, **6**:185-197
- Susin, S.A.; Zamzami, N.; Castedo, M.; Hirsch, T.; Marchetti, P.; Macho, A.; Daugas, E.; Geuskens, M.; Kroemer, G. (1996).** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, **184**:1331
- Tang, P.; Hung, M.-C.; Klostergaard, J. (1996).** Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, **35**:8216-8225
- 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
- Thacker, R.W.; Starnes, S. (2003).** Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* in marine sponge, *Dysides* spp. *Mar. Biol.*, **142**:643-648
- Thakur, N.L. Perović-Ottstadt, S.; Batel, R.; Korzhev, M.; Diehl-Seifert, B.; Müller, I.M.; Müller, W.E.G. (2005).** Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against gram positive bacteria: Induction of lysozyme and AdaPTin. *Mar. Biol.* **146**:271-282
- Thompson, C.B. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267 (5203)**: 1456-1462
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. (1997).** CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res.*, **24**:4876-4882
- Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. (1998).** Caspases: Enemies within. *Science*, **281 (5381)**:1312-1316
- Tobias, J.W.; Shrader, T.E.; Rocap, G.; Varshavsky, A. (1991).** The N-end rule in bacteria. *Science*, **254**:1374-1377
- 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
- Trenczek, T. (1998).** Endogenous defense mechanism of insects. *Zoology*, **101**:298-315
- Tsujimoto, Y.; Cossmann, J.; Jaffe, E.; Croce, C.M. (1985).** Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228 (4706)**:1440-1443
- Usher, K.M.; Kuo, J.; Fromont, J.; Sutton, D.C. (2001).** Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia*, **461**:9-13
- Vacelet, J. (1975).** Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell*, **23**:271-288

- Vacelet, J.; Donadey, C. (1977).** Electro microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **30**:301–314
- Van der Geer, P.; Hunter, T.; Lindberg R.A. (1994).** Receptor proteintyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**:251-337
- 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. ; Silke, J. (2003).** Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **304**:499-504
- Vetvicka, V.; Sima, P. (1998).** Evolutionary mechanisms of defense reactions. Basel: Birkhäuser Verlag; 1998
- Vidal, M. (1997).** *The Reverse Two-Hybrid System.* The Two-Hybrid System, Oxford University Press, New York
- Voet, D.; Voet, J., G. (1994).** Biochemie. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo. 97
- Vogel, H.J.; Schibli, D.J.; Jing, W.; Lohmeier-Vogel, E.M.; Epand, R.F.; Epand, R.M. (2002).** Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem. Cell Biol.*, **80**:49-63
- Vojtek, A.B.; Hollenberg, S.M.; Cooper, J.A. (1993).** Mammalian Ras Interacts Directly with the Serine/Threonine Kinase Raf. *Cell*, **74**:205-214
- Volloch, V.; Schweitzer, B.; Rits, S. (1994).** Ligation-Mediated Amplification of RNA from Murine Erythroid Cells Reveals a Novel Class of Beta-Globin mRNA with an Extended 5'-Untranslated Region. *Nucleic Acids Res.*, **22**:2507-2511
- Wagner-Hülsmann, C.; Bachinski, N.; Diehl-Seifert, B. et al. (1996).** A galectin links the aggregation factor to cells in the Sponge (*Geodia cydonium*) system. *Glycobiology*, **6**:785-793
- Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. (2003).** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.*, **10**:45-65
- Wang, Z.Q.; Stingl, L.; Morisson, C.; Jantsch, M.; Los, M.; Schulze-Osthoff, K.; Wagner, E.W. (1997).** ADPRT/PARP is important for genomic stability but is dispensable in apoptosis. *Genes & Dev.*, **11**:2347-2358
- Weber, K.; Osborn, M. (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406-4412
- Wehner, R.; Gehring, W. (1995).** Zoologie, 23. Auflage. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.* 626-632
- 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. (Hrsg.) (1996).** Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und wirbellose Tiere. Gustav Fischer, Stuttgart **75-119**

- Wesselborg, S.; Engels, I.; Rossmann, E.; Los, M.; Schulze-Osthoff, K. (1999).** Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood.*, **93**:3053-3063
- 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.; 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**: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.*, **8**:887-898
- Wiens, M.; Krasko, A.; Perovic, S.; Müller, W.E.G. (2003).** Caspase mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochem. Biophys. Acta*, **1593**:179-189
- Wiens, M. (2004).** Grundlegende Mechanismen der Apoptose in den einfachsten Invertebraten, den Porifera. *Z. Gerontol Geriatr* **37**:190-19
- Wiens, M.; Korzhev, M.; Perović-Ottstadt, S.; Luthringer, B.; Brandt, D.; Klein, S.; Müller, W.E.G. (2007).** Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evol.* **24(3)**:792-804
- Wilkinson, C.R. (1978).** Microbial association in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.*, **49**:161-167
- Wilkinson, C.R. (1983).** Net primary productivity in coral reef sponges. *Science*, **219**:410-412
- Willmer, P. (1994).** Invertebrate relationships. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Xiong, Y.Q.; Yeaman, M.R.; Bayer, A.S. (1999).** In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**:1111-1117
- Ye, H.; Park, Y.C.; Kreishman, M.; Kieff, E.; Wu, H. (1999).** The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol. Cell.*, **4(3)**:321-30
- Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. (2003).** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, **55(1)**:27-55
- Zarkower, D.; Stephenson, P.; Sheets, M. (1986).** The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus pre-mRNA *in vitro*. *Mol. Cell. Bio.*, **6**:2317-2323
- Zasloff, M. (2002).** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*; **415**
- Zhang, G.; Ross, C.R.; Blecha, F. (2000).** Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet. Res.*, **31**:277-296.
- Zou, H.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, X. (1999).** An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, **274**:11549-11556

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Apoptose-Einleitung.....	6
Abbildung 2:	<i>Pagurus sp.</i> in <i>Suberites domuncula</i>	24
Abbildung 3:	Körperbau der Porifera.....	26
Abbildung 4:	Beispiele von Organismen aus verschiedenen Schwammklassen.....	26
Abbildung 5:	Blüten von <i>Digitalis purpurea</i>	49
Abbildung 6:	Strukturformel von EtBr.....	55
Abbildung 7:	Bait und Prey Hybridproteine.....	70
Abbildung 8:	Schematische Darstellung positiver Interaktion zweier Proteine.....	70
Abbildung 9:	Darstellung der Schnittstellen zur Erstellung der verschiedenen Klone.....	72
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des Northern Blot Versuchsaufbaus.....	80
Abbildung 11:	Basen- und abgeleitete AS-Sequenz des <i>SD_TNFR-like</i> Gens.....	102
Abbildung 12:	Ergebnis der Domänensuche in BLASTP mit <i>SD_TNFR-like</i> Sequenz.....	103
Abbildung 13:	Das Multi-Alignment von abgeleiteten AS-Sequenzen des <i>SD_TNFR-like</i> und ähnlichen Proteinen anderer Organismen.....	105
Abbildung 14:	Alignment des <i>SD_TNFR-like</i> mit der MGC78788 Proteinsequenz aus <i>S. purpuratus</i>	106
Abbildung 15:	Alignment der UBP Domänen verschiedener Domänen.....	107
Abbildung 16:	Alignment einiger Todes Domänen verschiedener Organismen.....	107
Abbildung 17:	Alignment der genomischen <i>SD_TNFR-like</i> Sequenz mit der aus der cDNA-Bank.....	108
Abbildung 18:	Schematische Darstellung der Genstruktur des <i>SD_TNFR-like</i> Gens.....	109
Abbildung 19:	Masterplatte des Yeast TwoHybrid Screens.....	110
Abbildung 20:	Ergebnis des β -Galaktosidase-Aktivitätstests.....	110
Abbildung 21:	Basen- und abgeleitete AS-Sequenz des <i>SD_Brevinin-like</i> Gens.....	111
Abbildung 22:	Multi-Alignment abgeleiteter AS-Sequenzen des <i>SD_Brevinin-like</i> Gens und antimikrobieller Proteine anderer Organismen.....	112
Abbildung 23:	Das Alignment der <i>SD_Brevinin-like</i> Sequenz mit der Clavanin D Sequenz aus <i>S. clava</i>	113
Abbildung 24:	Sekundärstruktur des <i>SD_Brevinin-like</i> Proteins.....	114
Abbildung 25:	Northern Blot-Analyse des <i>SD_TNFR-like</i> Gens.....	115
Abbildung 26:	Northern Blot-Analyse des <i>SD_Brevinin-like</i> Gens.....	116
Abbildung 27:	A) SDS-Gel der Expression des rekombinanten Proteins <i>SD_TNFR-like</i> B) Western-Blot der <i>SD_TNFR-like</i> Expression.....	117
Abbildung 28:	SDS-Gel der Expression des <i>SD_TNFR-like</i> Proteins nach einer weiteren Aufreinigung.....	118
Abbildung 29:	A) SDS-PAGE des nativ aufgereinigten <i>SD_TNFR-like</i> Proteins B) Western Blot des <i>SD_TNFR-like</i> Proteins mit dem proteinspezifischen Antikörper.....	118
Abbildung 30:	Western Blot der <i>SD_Brevinin-like</i> Expression.....	119
Abbildung 31:	A) Dot Blot nach Inkubation von <i>S. domuncula</i> Gewebe mit LPS B) Dot Blot nach Inkubation von <i>S. domuncula</i> Gewebe mit humanem TNF-alpha.....	120
Abbildung 32:	Antibakterieller Test.....	121
Abbildung 33:	Antimykotischer Test.....	122
Abbildung 34:	Foto des Ergebnisses des RAW-Blue™ Tests.....	122

Abbildung 35: Messwerte der photometrischen Auswertung des RAW-Blue™ Tests.....	124
Abbildung 36: Blockdiagramm der durchschnittlichen Messergebnisse des RAW-Blue™ Testsr	124
Abbildung 37: Immunohistologische Färbung von <i>S. domuncula</i> Gewebeschnitten	125
Abbildung 38: Phylogramm zur Eingruppierung der Todesdomäne des SD_TNFR-like	126
Abbildung 39: Phylogramm zur Eingruppierung der UBQ-Domäne des SD_TNFR-like ...	127
Abbildung 40: Mögliche transmembrane Bereiche des SD_TNFR-like Proteins.	138
Abbildung 41: Das Prä-Pro-Protein des SD_Brevinin-like	141
Abbildung 42: Mögliche Wirkungsweisen des SD_TNFR-like als Adaptermolekül.....	145
Abbildung 43: Mögliche Wirkungsweisen der SD_TNFR-like als Rezeptor.	146
Abbildung 44: Mögliche Interaktions- bzw. Regulationsmechanismen der beiden Proteine SD_TNFR-like und SD_Brevinin-like.	148

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mechanismen und Moleküle der Immunabwehr der Porifera.....	15
Tabelle 2: Aufschlüsselung der degenerierten Basen nach der IBU-Bezeichnung.....	44
Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Standard-PCR.	46
Tabelle 4: Bedingungen für die Standard-PCR.....	46
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Checking-PCR.	48
Tabelle 6: Bedingungen für die Checking-PCR.....	48
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Dig-Markierungs-PCR.....	50
Tabelle 8: Bedingungen für die Markierungs-PCR.....	50
Tabelle 9: Reaktionsansatz 1 für die RT-PCR.	51
Tabelle 10: Reaktionsansatz 2 für die RT-PCR.	51
Tabelle 11: Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Puffer.	53
Tabelle 12: Zusammensetzung der bei einem RNA-Gel verwendeten Puffer.	54
Tabelle 13: Zusammensetzung der Toluidinblau Färbelösung.	56
Tabelle 14: Ansatz für den Restriktionsverdau.	62
Tabelle 15: Zusammensetzung der LB-AIX-Platten.....	66
Tabelle 16: Bedingungen für die Sequenzier-PCR.	68
Tabelle 17: Zusammensetzung der Stopppuffers.	68
Tabelle 18: Sequenziereinstellungen.....	69
Tabelle 19: Ergebnisse der verschiedenen Testmöglichkeiten für positive Interaktion.....	71
Tabelle 20: Ligationsansatz zum Konstruieren des Testplasmids.....	73
Tabelle 21: Rekombinationsansatz für die Rekombination in den pDEST™32 Vektor.....	73
Tabelle 22: Zusammensetzung der Selektionsplatten.	75
Tabelle 23: Zusammensetzung der 3-AT-Platten.....	75
Tabelle 24: Zusammensetzung der YPD und YPAD Medien.....	76
Tabelle 25: Zusammensetzung der Lösung für den β -Galaktosidase Aktivitätstest.	78
Tabelle 26: Zusammensetzung des Agarosegels.....	80
Tabelle 27: Ansatz für die Ligation in den pTrcHis2-TOPO®-Vektor.	84
Tabelle 28: Ansatz für die Ligation in den pDNOR™211-Vektor.	85
Tabelle 29: Ansatz für die Ligation in den pDEST™17-Vektor.	85
Tabelle 30: Ansatz für die Ligation in den pBAD/gIII A Vektor.	86
Tabelle 31: Induktoren und Konzentrationen für die Expression in <i>E. coli</i>	87
Tabelle 32: Zusammensetzungen der Komponenten für die SDS-Gelelektrophorese.....	90
Tabelle 33: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Western Blot.	92
Tabelle 34: Komponenten der BugBuster®-Lösung.....	94

Tabelle 35: Zusammensetzung der Puffer für die native Proteinaufreinigung.	94
Tabelle 36: Zusammensetzung der Puffer für die denaturierte Proteinaufreinigung.	95
Tabelle 37: Verwendete Medien für die Bestimmung des Antikörpertitersg.	97
Tabelle 38: Parameter des verwendeten BLASTP-Algorithmus	105
Tabelle 39: Charakteristika der in Abb. 13 miteinander alignnten Proteine der angegebenen Organismen.	106
Tabelle 40: Charakteristika der in Abb. 22 miteinander alignnten Proteine der angegebenen Organismen.	113
Tabelle 41: Messwerte der photometrischen Auswertung des RAW-Blue™ Tests.....	123
Tabelle 42: AU-reiche Elemente (ARE) der 3'-untranslatierten Region.	130
Tabelle 43: Aminosäuresequenzhomologie des SD_TNFR-like Proteins mit anderen Proteinen verschiedener Spezies.....	131
Tabelle 44: Aminosäuresequenzhomologie der Todesdomäne (DD) aus Proteinen verschiedener Spezies.	132
Tabelle 45: Aminosäuresequenzhomologie der Ubiquitin-domäne (UBQ) aus Proteinen verschiedener Spezies..	132
Tabelle 46: Aminosäuresequenzhomologie des SD_Brevinin-like Proteins mit antimikrobiellen Proteinen verschiedener Spezies.	133

9.3 Abkürzungsverzeichnis

A

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc. No.	Genbank <i>accession number</i>
AD	Aktivierungsdomäne
AG	Arbeitsgruppe
AIF	<i>Apoptotic inflammatory factor</i>
AK	Antikörper
AMPs	Antimikrobielle Proteine
Amp	Ampicilin
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure

B

Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-Zellen Lymphom/Leukämie Gen 2
BH	Bcl-2-Homologie-Domänen
Bp	Basenpaare
<i>B. maxima</i>	<i>Bombina maxima</i>
<i>B. floridae</i>	<i>Branchiostoma floridae</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise

C

C1-10	Komplementfaktor
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAD	<i>Caspase activated desoxyribonuklease</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>C. familiaris</i>	<i>Canis familiaris</i>
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal

D

DBD	DNA-Bindedomäne
DD	<i>Death domain</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DED	Death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid

F

F	<i>Forward</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
5 FOA	5-Fluoroorotsäure

G

g	Gramm bzw. relative Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
<i>G. cydonium</i>	<i>Geodia cydonium</i>
GPX	Gluathion-Peroxidase
gr.	griechisch

H

h	Stunde(n)
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsp	Hitzeschockprotein

I

IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
If	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
ITAM	<i>immune receptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immune receptor tyrosine-based motif</i>

J

JNK	c-Jun N-terminal kinase
-----	-------------------------

K

kb	kilobase(s)
kDa	Kilodalton

L

l	Liter
lat.	Lateinisch
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid

M

M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
μg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	millimolar (mmol/l)
MW	Molekulargewicht

N

NBT	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor κchain transcription in B cells</i>
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal

O

OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
<i>O. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Palmitoyl-tripeptid, bakterielles Lipoprotein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
pmol	Picomol
Poly IC	synthetische doppelsträngige RNA

R

R	Reverse
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
<i>R. temporaria</i>	<i>Rana temporaria</i>
RIP	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

S

s.	siehe
SAM	<i>sponge adhesion molecules</i>
<i>S. domuncula</i>	<i>Suberites domuncula</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunde(n)
Ser	Serin
SOC-Medium	Spiroorthocarbonat Medium
sog.	so genannte
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
ssDNA	„Single stranded“ DNA/einzelsträngige DNA
<i>S. purpuratus</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>

*S. clava**Styela clava*

T

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBT	<i>Tributyl chloride</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transformierende Wachstumsfaktoren
TIR	<i>Toll – interleukin 1 – resistance Domain</i>
TK	katalytische Tyrosinkinase
TLR	Toll-like-Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R/TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren
TRADD	<i>TNF-R-Associated Death Domain</i>
TRAF-2	<i>TNFR-associated Factor-2</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween®20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

U

U	Unit(s) = Enzymeinheit; µmol Substratumsatz pro Minute
UAS	upstream aktivations Sequenz
UDP	<i>Ubiquitin Domain Protein</i>
ü.N.	über Nacht
U/µl	Units pro Mikroliter
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
(v/v)	Volumen/Volumen

W

W	Watt
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewicht/Volumen

X

<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

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.

Wiesbaden, April 2009

S. Baumhauer-Klein